

Université de Montréal

Régulation de la MAPK atypique ERK3 par le système ubiquitine-protéasome

par
Philippe Coulombe

Département de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures (FES)

Thèse présentée à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor
en biologie moléculaire

Avril, 2006

©, Philippe Coulombe, 2006



QH
506
U54
2006
V.032

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:

Régulation de la MAPK atypique ERK3 par le système ubiquitine-protéasome

présentée par:

Philippe Coulombe

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Marc Therrien, Ph.D.
Président-rapporteur

Sylvain Meloche, Ph.D.
Directeur de recherche

Benoit Coulombe, Ph.D.
Membre du jury

Simon S. Wing, Ph.D.
Examineur externe

Stephen W. Michnick, Ph.D.
Représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

Les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) sont des enzymes conservées de la levure jusqu'à l'homme régulant une multitude de processus biologiques comme la prolifération cellulaire ou le développement embryonnaire. ERK3 (Extracellular signal-Regulated Kinase 3) est un homologue atypique de MAPK peu caractérisé. Dans le but d'obtenir des indices sur sa fonction, j'ai étudié les mécanismes de régulation de ERK3. Dans un premier temps, j'ai pu constater que ERK3 est constitutivement dégradée par le système ubiquitine-protéasome. Ce système protéolytique très conservé contrôle de nombreux aspects de la vie des eucaryotes telle la division cellulaire ou la réparation de l'ADN. Deux régions en N-terminal de ERK3 sont importantes pour sa dégradation par le protéasome. Par des approches de mutagenèse dirigée et de spectrométrie de masse, il fut constaté que ERK3 est ubiquitinée sur son α -amine en N-terminal. Ce type d'ubiquitination est relativement rare et n'avait jamais été directement observé auparavant. D'un autre côté, l'expression de ERK3 est induite lors de la différenciation de deux lignées cellulaires modèles. De manière intéressante, l'expression de formes stables de ERK3 inhibe la prolifération cellulaire. Finalement, mes résultats indiquent que ERK3 est phosphorylée sur au moins deux sites *in vivo*: les sérines 189 et 386. De manière surprenante, la phosphorylation de la boucle d'activation (Ser189) est constitutive et insensible aux stimuli extracellulaires. En conclusion, mes travaux mettent en évidence de nouveaux modes de régulation pour les MAPK. De plus, ils suggèrent un rôle possible de ERK3 dans le contrôle de la prolifération et/ou la différenciation cellulaire.

MOTS CLÉS: différenciation cellulaire, prolifération cellulaire, ubiquitine, site d'ubiquitination, ubiquitination en N-terminal, modélisation, phosphorylation, spectrométrie de masse, dégron, p21^{WAF1}

ABSTRACT

MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) are enzymes found in all eukaryotes implicated in numerous biological processes including cellular proliferation and embryonic development. ERK3 (Extracellular signal-Regulated Kinase 3) is an atypical MAPK homologue poorly characterized. To gain information about its physiological function, I decided to study the mechanisms regulating ERK3 activity. First, I found that ERK3 is constitutively degraded by the ubiquitin-proteasome system. This highly conserved proteolytic system plays important roles in numerous aspects of eukaryotic life like cell division or DNA repair. Two N-terminal regions of ERK3 were shown to be important for its degradation *in vivo*. Using a combination of directed mutagenesis and mass spectrometry, ERK3 was found to be ubiquitinated on the N-terminal α -amine. This type of ubiquitination is relatively rare and has not been directly observed before. On the other hand, ERK3 expression was found to increase in two different differentiation models. Interestingly, expression of stable forms of ERK3 inhibits cell proliferation. Finally, I focus my study on ERK3 phosphorylation. My results reveal that ERK3 is phosphorylated on at least two sites *in vivo*: Ser189 and Ser386. Surprisingly, activation loop phosphorylation (Ser189) is constitutive and insensitive to common MAPK stimuli. In conclusion, this study highlights novel mechanisms of MAPK regulation. Moreover, the results suggest that ERK3 might be an important regulator of cellular proliferation and/or differentiation.

KEYWORDS: cellular differentiation, cellular proliferation, ubiquitin, ubiquitination site, N-terminal ubiquitination, 3D modeling, phosphorylation, mass spectrometry, degran, p21^{WAF1}

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
1.1. LES VOIES MAP KINASES	2
1.1.1. Découverte de la phosphorylation des protéines jusqu'au kinome humain.....	2
1.1.2. Caractéristiques et fonctionnement d'un domaine kinase.....	3
1.1.3. Découverte des MAPK.....	7
1.1.4. Caractéristiques des MAPK.....	9
1.1.5. Le MAP kinome chez l'homme.....	9
1.1.5.1. La voie ERK1/2.....	10
1.1.5.1.1. Identification.....	11
1.1.5.1.2. Structure.....	11
1.1.5.1.3. Expression.....	11
1.1.5.1.4. Régulation de l'activité de ERK1/2.....	12
1.1.5.1.5. Membres de la voie ERK1/2.....	15
1.1.5.1.5.1. MAPKKK: RAF1, A-RAF, B-RAF et c-MOS.....	15
1.1.5.1.5.2. MAPKK: MEK1/2.....	18
1.1.5.1.6. Fonctions de la voie ERK1/2.....	20
1.1.5.1.6.1. Prolifération cellulaire.....	20
1.1.5.1.6.2. Différenciation cellulaire.....	21
1.1.5.1.6.3. Contrôle de la traduction.....	22
1.1.5.1.6.4. Survie cellulaire.....	22
1.1.5.1.6.5. Rôle de ERK1 dans les fonctions cognitives.....	22
1.1.5.1.6.6. Rôle de ERK2 dans le développement du trophectoderme.....	23
1.1.5.1.6.7. Transformation et sénescence.....	24
1.1.5.2. La voie JNK.....	24
1.1.5.2.1. Identification.....	25
1.1.5.2.2. Structure.....	25
1.1.5.2.3. Expression.....	26
1.1.5.2.4. Régulation de l'activité des JNK.....	27
1.1.5.2.5. Membres de la voie JNK.....	28
1.1.5.2.5.1. MAPKKK: MEKK1-4, TPL-2, DLK, MLK1-3/7, MLTK, LZK, TAK1 et ASK1/2.....	28

1.1.5.2.5.2. MAPKK: MKK4/7	29
1.1.5.2.6. Fonctions de la voie JNK	29
1.1.5.2.6.1. Contrôle de l'apoptose	29
1.1.5.2.6.2. Développement embryonnaire	30
1.1.5.2.6.3. Prolifération et cancer	31
1.1.5.2.6.4. Rôle dans le diabète de type II	32
1.1.5.2.6.5. L'inflammation	32
1.1.5.3. La voie p38	33
1.1.5.3.1. Identification	33
1.1.5.3.2. Structure	34
1.1.5.3.3. Expression	34
1.1.5.3.4. Régulation de l'activité des p38	35
1.1.5.3.5. Membres de la voie p38	37
1.1.5.3.5.1. MAPKKK: MEKK1-4, TAK1, TAO1/2 et ASK1/2	37
1.1.5.3.5.2. MAPKK: MKK3/6	37
1.1.5.3.6. Fonctions de la voie p38	38
1.1.5.3.6.1. Osmorégulation	38
1.1.5.3.6.2. Différenciation cellulaire	38
1.1.5.3.6.3. Développement placentaire	39
1.1.5.3.6.4. Production des cytokines proinflammatoire	40
1.1.5.4. La voie ERK5	41
1.1.5.4.1. Identification	42
1.1.5.4.2. Structure	42
1.1.5.4.3. Expression	42
1.1.5.4.4. Régulation de l'activité de ERK5	43
1.1.5.4.5. Membres de la voie ERK5	44
1.1.5.4.5.1. MAPKKK: MEKK2/3 et TPL-2	44
1.1.5.4.5.2. MAPKK: MEK5	45
1.1.5.4.6. Fonctions de la voie ERK5	46
1.1.5.4.6.1. Prolifération cellulaire	46
1.1.5.4.6.2. Survie cellulaire	49
1.1.5.4.6.3. Différenciation neuronale et musculaire	50
1.1.5.4.6.4. Régulation du système cardiovasculaire et angiogenèse	51

1.1.5.4.6.5. Contrôle du volume cellulaire.....	53
1.1.5.4.6.6. ERK5 et tumorigenèse.....	54
1.1.5.5. La voie NLK.....	54
1.1.5.5.1. Identification.....	55
1.1.5.5.2. Structure.....	55
1.1.5.5.3. Expression.....	56
1.1.5.5.4. Régulation de l'activité de NLK.....	56
1.1.5.5.5. Membres de la voie NLK.....	57
1.1.5.5.5.1. MAPKKK: TAK1.....	57
1.1.5.5.5.2. MAPKK: HIPK2.....	58
1.1.5.5.6. Fonctions de la voie NLK.....	58
1.1.5.5.6.1. Modulation de la voie WNT/ β -caténine.....	58
1.1.5.5.6.2. Régulation de l'activité de STAT3.....	59
1.1.5.5.6.3. Contrôle de la survie et de la mort cellulaire.....	60
1.1.5.5.6.4. Régulation de la stabilité de c-MYB.....	61
1.1.5.5.6.5. Phénotype des souris <i>Nlk</i> KO.....	61
1.1.5.6. La voie ERK8 (et ERK7).....	61
1.1.5.6.1. Identification.....	62
1.1.5.6.2. Structure.....	62
1.1.5.6.3. Expression.....	63
1.1.5.6.4. Régulation de l'activité de ERK7 (et ERK8).....	63
1.1.5.6.5. Membres de la voie ERK7 (et ERK8).....	64
1.1.5.6.6. Fonctions de la voie ERK7.....	65
1.1.5.6.6.1. Régulation négative de la prolifération cellulaire.....	65
1.1.5.6.6.2. Rôle dans la transport chloreux.....	65
1.1.5.6.6.3. Rôle dans la signalisation du récepteur à l'œstrogène.....	66
1.1.5.7. La voie ERK3/4.....	66
1.1.5.7.1. Identification.....	66
1.1.5.7.2. Structure.....	67
1.1.5.7.3. Expression.....	68
1.1.5.7.4. Régulation de l'activité de ERK3.....	69
1.1.5.7.5. Membres de la voie ERK3/4.....	70
1.1.5.7.6. Fonctions de la voie ERK3/4.....	70

1.1.5.7.6.1. Implication potentielle dans la prolifération et/ou la différenciation cellulaire.....	70
1.1.5.7.6.2. Rôle essentiel pour la viabilité post-natale.....	71
1.1.5.7.6.3. Résistance aux stress de la voie du protéasome.....	71
1.1.5.7.6.4. Activation de MAPKAPK-5 (PRAK/MK5).....	71
1.1.6. Régulation positive de l'activité des MAPK par phosphorylation.....	72
1.1.7. Régulation négative de l'activité des MAPK par déphosphorylation.....	74
1.1.7.1. Sérine-thréonine phosphatases.....	75
1.1.7.2. Tyrosine phosphatases.....	76
1.1.7.3. Phosphatases à double spécificité (MKP/DUSP).....	77
1.1.7.3.1. Classe I.....	77
1.1.7.3.2. Classe II.....	78
1.1.7.3.3. Classe III.....	79
1.1.7.3.4. Classe IV.....	79
1.1.7.3.5. Régulation de l'expression des MKP.....	79
1.1.7.3.6. Relation structure/activité des MKP.....	80
1.1.7.3.7. Fonctions physiologiques.....	81
1.1.8. Régulation de la localisation subcellulaire des MAPK.....	83
1.1.8.1. Mécanismes d'import nucléaire de ERK1/2.....	83
1.1.8.2. Mécanismes d'export nucléaire de ERK1/2.....	86
1.1.8.3. Implication des protéines d'interaction dans la localisation nucléaire de ERK1/2.....	87
1.1.8.4. Implication des protéines d'interaction dans la localisation cytoplasmique de ERK1/2.....	87
1.1.8.5. Localisation des MAPK atypiques.....	89
1.1.9. Protéines d'échafaudage.....	91
1.1.9.1. Chez la levure.....	92
1.1.9.2. Chez les métazoaires.....	93
1.1.9.2.1. Protéines adaptatrices de la voie ras/ERK.....	93
1.1.9.2.1.1. KSR.....	93
1.1.9.2.1.2. CNK.....	96
1.1.9.2.1.3. MP1.....	98
1.1.9.2.1.4. SUR-8.....	99

1.1.9.2.2. Protéines adaptatrices des voies MAPK de stress	99
1.1.9.2.2.1. Les JIP	99
1.1.9.2.2.1.1. JIP1/2	99
1.1.9.2.2.1.2. JIP3/4	100
1.1.9.2.2.2. OSM	101
1.1.9.2.2.3. SKRP1	101
1.1.9.2.3. Protéines d'échafaudage pour les voies MAPK atypiques	101
1.1.10. Sites d'arrimage ("Docking sites")	102
1.1.10.1. Séquences présentes chez les partenaires des MAPK	102
1.1.10.1.1. Domaine D	103
1.1.10.1.2. Motif FxF(P) (ou domaine DEF)	105
1.1.10.2. Séquences présentes chez les MAPK responsables de l'association avec les sites d'arrimages	107
1.1.10.2.1. Séquences interagissant avec le domaine D	108
1.1.10.2.1.1. Domaine CD	108
1.1.10.2.1.2. Domaine ED	109
1.1.10.2.1.3. Sillon d'arrimage ("Docking groove")	111
1.1.10.2.2. Séquence interagissant avec le motif FxF(P): la poche hydrophobe	114
1.2. LE SYSTÈME UBIQUITINE-PROTÉASOME	117
1.2.1. Historique et Prix Nobel	117
1.2.2. Une protéolyse nécessitant une protéase, un signal de dégradation et de l'énergie	118
1.2.3. Le 26S protéasome	119
1.2.3.1. Découverte du protéasome	119
1.2.3.2. Le 20S protéasome	120
1.2.3.2.1. Structure	120
1.2.3.2.2. Activité enzymatique	121
1.2.3.2.3. Les inhibiteurs du protéasome	122
1.2.3.2.3.1. Inhibiteurs analogues de peptides	123
1.2.3.2.3.1.1. Peptides aldéhydes	123
1.2.3.2.3.1.2. Peptides acides boroniques	124
1.2.3.2.3.1.3. Autres inhibiteurs peptidomimétiques	124

1.2.3.2.3.2. Inhibiteurs non-peptidiques.....	124
1.2.3.2.3.2.1. Lactacystine.....	124
1.2.3.2.3.2.2. Gliotoxine.....	125
1.2.3.3. Le 19S protéasome.....	125
1.2.3.3.1. La base du 19S protéasome.....	125
1.2.3.3.2. Le couvercle ("Lid") du 19S protéasome.....	127
1.2.4. Ubiquitination.....	128
1.2.4.1. Ubiquitine.....	129
1.2.4.1.1. Structure.....	129
1.2.4.2. E1 ou enzyme d'activation de l'ubiquitine.....	130
1.2.4.2.1. Structure.....	131
1.2.4.3. E2 ou enzymes de conjugaison de l'ubiquitine.....	133
1.2.4.3.1. Structure.....	133
1.2.4.4. E3 ou ubiquitine ligases.....	134
1.2.4.4.1. Ligases à domaine HECT.....	135
1.2.4.4.1.1. Structure.....	135
1.2.4.4.1.2. E6-AP.....	137
1.2.4.4.2. Ligases à domaine RING.....	137
1.2.4.4.2.1. Structure.....	138
1.2.4.4.2.2. Ligases RING monomériques.....	139
1.2.4.4.2.2.1. E3 α /Ubr1p.....	139
1.2.4.4.2.2.2. c-CBL.....	142
1.2.4.4.2.3. Ligases RING multimériques.....	142
1.2.4.4.2.3.1. Identification des complexes SCF.....	142
1.2.4.4.2.3.2. SKP1/Culline-1/RBX1 forment un complexe SCF de base.....	143
1.2.4.4.2.3.3. Protéines à boîte F.....	143
1.2.4.4.2.3.3.1. Les PBF à domaine WD40 ou Fbw.....	144
1.2.4.4.2.3.3.1.1. β -TrCP1/2.....	145
1.2.4.4.2.3.3.1.2. hCDC4/FBW7.....	147
1.2.4.4.2.3.3.2. Les PBF à domaine LRR ou Fbl.....	149
1.2.4.4.2.3.3.2.1. SKP2.....	149
1.2.4.4.2.3.3.3. Les PBF à domaine SBD ou Fbs.....	151

1.2.4.4.2.3.3.4. Les autres PBF ou Fbo.....	152
1.2.4.4.2.3.4. Structure des complexes SCF.....	153
1.2.4.4.2.3.5. Complexes contenant un homologue de culline (SCF-like complex).....	155
1.2.4.5. E4 ou enzymes de polymérisation de l'ubiquitine.....	155
1.2.4.5.1. E4 à boîte U.....	155
1.2.4.5.2. Activité E3 ligase de la boîte U.....	157
1.2.4.5.3. Structure de la boîte U.....	157
1.2.4.6. Topologie de l'ubiquitination.....	158
1.2.4.6.1. Monoubiquitination.....	158
1.2.4.6.1.1. Réparation de l'ADN.....	159
1.2.4.6.1.2. Transcription.....	159
1.2.4.6.1.3. Endocytose.....	160
1.2.4.6.1.4. Localisation subcellulaire.....	161
1.2.4.6.2. Polyubiquitination.....	161
1.2.4.6.2.1. Lysine 48.....	162
1.2.4.6.2.2. Lysine 63.....	163
1.2.4.6.2.3. Lysine 29.....	164
1.2.4.6.2.4. Lysine 6.....	164
1.2.4.6.2.5. Autres lysines.....	165
1.2.4.7. Site d'ubiquitination.....	165
1.2.4.7.1. Lysine.....	165
1.2.4.7.2. N-terminal.....	166
1.2.4.7.3. Cystéine (et sérine).....	167
1.2.4.8. Dégradation par le protéasome de manière ubiquitine-indépendante.....	168
1.2.5. Domaines de liaison à l'ubiquitine.....	169
1.2.5.1. Le domaine UIM.....	170
1.2.5.2. Le domaine UBA.....	171
1.2.5.3. Les autres domaines.....	171
1.2.6. Enzymes de déubiquitination (DUB).....	172
1.2.6.1. Les UCH.....	172
1.2.6.2. Les USP ou UBP.....	173
1.2.6.3. Les protéases à domaine OTU.....	174

1.2.7. Les protéines semblable à l'ubiquitine.....	174
1.2.7.1. SUMO.....	175
1.2.7.2. NEDD8.....	177
1.2.8. Implication du système ubiquitine-protéasome dans le contrôle des MAPK.....	178
1.2.8.1. ERK1/2.....	178
1.2.8.2. ERK7.....	179
1.2.8.3. ERK3.....	179
1.3 OBJECTIFS DE CETTE THÈSE.....	180
1.3.1. Objectif général.....	180
1.3.2. Objectifs spécifiques.....	180
1.3.2.1. Étudier la régulation de la phosphorylation de ERK3.....	180
1.3.2.2. Étudier la régulation de l'expression de ERK3.....	180
1.3.2.3. Analyser l'effet de ERK3 sur la prolifération et/ou la différenciation cellulaire.....	181

CHAPITRE 1: Développement de nouveaux vecteurs pour procaryotes permettant une expression plus efficace des protéines pleines longueurs.....	182
2.1. MISE EN SITUATION.....	184
2.2. ARTICLE 1: "Dual-tag prokaryotic vectors for enhanced expression of full-length recombinant proteins".....	185

CHAPITRE 2: Régulation de la MAPK ERK3 par le système ubiquitine- protéasome.....	195
3.1. MISE EN SITUATION.....	197
3.2. ARTICLE 2: "Rapid turnover of Extracellular signal-Regulated Kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of Mitogen- Activated Protein Kinase regulation during cellular differentiation".....	198

CHAPITRE 3: La MAPK ERK3 et l'inhibiteur de CDK p21^{WAF1} sont ubiquitinés en N-terminal <i>in vivo</i>.....	239
4.1. MISE EN SITUATION.....	241
4.2. ARTICLE 3: "N-terminal ubiquitination of Extracellular signal-Regulated	

Kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome"	243
CHAPITRE 4: Étude de la phosphorylation de ERK3 <i>in vivo</i>	279
5.1. MISE EN SITUATION	281
5.2. ARTICLE 4: "ERK3 is constitutively phosphorylated on the activation loop and displays kinase-independent cell cycle arresting activity"	282
DISCUSSION	317
6.1. Modes de régulation de ERK3	318
6.1.1. Phosphorylation	318
6.1.1.1. Sérine 189	318
6.1.1.1.1. Régulation	318
6.1.1.1.2. La ERK3 kinase	319
6.1.1.1.3. Impact de la phosphorylation de la Ser189	320
6.1.1.2. Autres sites	322
6.1.2. Ubiquitination	323
6.1.2.1. NDR1/2, les dégrons de ERK3	323
6.1.2.2. Ubiquitination sur l' α -amine (N-terminal)	324
6.1.2.3. Ubiquitination sur une ϵ -amine (lysine)	328
6.2. Ubiquitination versus acétylation en N-terminal	328
6.2.1. La maturation du N-terminal chez les eucaryotes	328
6.2.2. L'acétylation en N-terminal est-elle irréversible ?	330
6.2.3. La dégradation de p21 ^{WAF1} se fait-elle sans ubiquitination ?	333
6.3. Activité kinase de ERK3	336
6.3.1. Motif SPR du sous-domaine VIII	337
6.3.2. Motif SEG de la boucle d'activation	341
6.3.3. Proposition de séquences consensus de substrats pour ERK3	346
6.3.4. Génération de la souris ERK3 ^{KDKI}	347
6.4. Rôles biologiques de ERK3	348
6.4.1. ERK3, un régulateur négatif de la prolifération cellulaire ?	348
6.4.2. ERK3, un régulateur positif de la différenciation cellulaire ?	351

CONCLUSION **352**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES **355**

LISTE DU TABLEAU

Table I: Predicted substrate specificity of ERK1 and ERK3 314

LISTES DES FIGURES

Figure 1: Voie de la glycogénolyse.....	2
Figure 2: Le kinome humain.....	4
Figure 3: Le domaine kinase peut être divisé en 12 sous-domaines.....	5
Figure 4: Structure du domaine kinase.....	6
Figure 5: Structure primaire des MAPK chez l'homme.....	8
Figure 6: Le MAP kinome chez l'homme.....	10
Figure 7: Activation de la voie ERK1/2 par les récepteurs tyrosine kinase (RTK).....	13
Figure 8: Régulation de la MAPKKK RAF-1.....	15
Figure 9: Structure de la MAPKK MEK1.....	19
Figure 10: Activation de la voie JNK par le récepteur de l'IL-1.....	26
Figure 11: Régulation de l'expression des molécules pro-inflammatoires via des mécanismes post-transcriptionnels par la voie p38/MK-2.....	40
Figure 12: Voie de signalisation de ERK5 régulant la prolifération et la survie cellulaire.....	47
Figure 13: Régulation de la voie WNT par la voie TAB1/TAK1/NLK chez les métazoaires.....	59
Figure 14: Mécanisme d'activation des MAPK par phosphorylation.....	73
Figure 15: Les phosphatases à double spécificité MKP/DUSP peuvent être regroupées en 4 classes.....	78
Figure 16: Domaine phosphatase DUSP de DUSP2/PAC1.....	80
Figure 17: Le site actif de DUSP2 n'est pas dans une configuration active.....	81
Figure 18: Mécanismes proposés pour le transport nucléaire régulé de ERK1/2.....	85
Figure 19: Régulation de la distribution nucléocytoplasmique de ERK3.....	90
Figure 20: Ste5p, une protéine d'échafaudage de la voie de la conjugaison ("mating") chez <i>S cerevisiae</i>	92
Figure 21: Protéines d'échafaudage de la voie RAS/ERK.....	94
Figure 22: Régulation de KSR par IMP dans l'activation de la voie ERK1/2.....	95
Figure 23: Alignement des domaines D présents chez différentes classes d'interacteurs de MAPK.....	103
Figure 24: Localisation du domaine D chez les interacteurs des MAPK.....	104
Figure 25: Alignement des domaines FxF(P) des interacteurs des MAPK ERK1/2.....	105

Figure 26: Les MAPK possèdent deux surfaces distinctes liant les sites d'arrimages.....	107
Figure 27: Alignement du domaine CD des MAPK chez l'homme.....	109
Figure 28: Alignement du domaine ED étendu des MAPK chez l'homme.....	110
Figure 29: Identification d'un sillon liant les domaines D chez p38 α	112
Figure 30: Alignement des résidus formant le sillon d'arrimage (docking groove).....	113
Figure 31: Domaines CD et ED et sillon d'arrimage proposés de ERK2 et ERK3.....	113
Figure 32: Identification d'une poche hydrophobe interagissant avec le motif FxF(P) sur ERK2.....	114
Figure 33: La poche hydrophobe est masquée chez la forme non-phosphorylée de ERK2.....	115
Figure 34: Alignement des régions impliquées dans la formation de la poche hydrophobe liant le motif FxF(P) des MAPK chez l'homme.....	116
Figure 35: Poche hydrophobe de ERK2 et ERK3.....	117
Figure 36: Modèle tridimensionnel du 26S protéasome basé sur des données de microscopie électronique et de cristallographie chez <i>Drosophila</i> et <i>Thermoplasma</i>	119
Figure 37: Modèle tridimensionnel du 20S protéasome de <i>Thermoplasma</i>	120
Figure 38: Mécanisme proposé de l'hydrolyse catalysée par le 20S protéasome.....	121
Figure 39: Structure des inhibiteurs du protéasome.....	123
Figure 40: La réaction d'ubiquitination.....	129
Figure 41: L'ubiquitine.....	130
Figure 42: Réaction catalysée par la E1 ou enzyme d'activation de l'ubiquitine.....	131
Figure 43: Structure de APP-BP1/UBA3, la E1 de la voie NEDD8.....	132
Figure 44: L'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2.....	134
Figure 45: Structure des E3 à domaine HECT E6-AP et WWP1/AIP5.....	136
Figure 46: Ubiquitine ligase à domaine RING.....	138
Figure 47: La voie du "N-end rule".....	140
Figure 48: Les protéines à boîtes F (PBF) chez l'homme.....	144
Figure 49: Structure du complexe SKP1/ β -TrCP1/ β -caténine.....	146
Figure 50: Structure du complexe SKP1/Cdc4p/CPD.....	148
Figure 51: Structure de SKP2/SKP1.....	150
Figure 52: Structure du domaine de liaison au sucre SBD de FBS1.....	151

Figure 53: Modèle de complexes SCF complets.....	154
Figure 54: La boîte U et le domaine RING sont structurellement similaires.....	157
Figure 55: Trois types d'ubiquitination observés <i>in vivo</i>	158
Figure 56: Différents modes d'ubiquitination.....	161
Figure 57: Structure en solution de l'ubiquitine sous forme dimérique.....	162
Figure 58: Ciblage des protéines ubiquitinées vers le 26S protéasome.....	170
Figure 59: L'ubiquitine, SUMO-1 et NEDD8 se replie de manière similaire.....	175
Figure 60: Modèle de l'activation de ERK3 par phosphorylation.....	321
Figure 61: Alignement des dégrons NDR1/2 de ERK3 avec les séquences homologues de ERK1, ERK4 et ERK7.....	323
Figure 62: Rôle possible de la voie UFD dans l'ubiquitination de ERK3.....	327
Figure 63: L'acétylation en N-terminal des protéines chez les mammifères.....	329
Figure 64: Modèle de la régulation de la N-acétylation chez les mammifères.....	331
Figure 65: Alignement des sous-domaines VIII, IX et XI de ERK3, ERK2, CDK5 et CK1 δ	337
Figure 66: Repliement du sous-domaine VIII.....	338
Figure 67: Stabilisation du lobe C-Terminal par un réseau de ponts hydrogènes unissant les sous-domaines VIII, IX et XI chez ppERK2, CDK5 et CK1 δ telle que révélée par les structures cristallines.....	339
Figure 68: Les kinases spécifiques envers les substrats pré-phosphorylés (phosphate-directed kinases).....	341
Figure 69: Organisation tridimensionnelle des sites de liaison du phosphate de GSK3, Sky1p et ERK3.....	343
Figure 70: Modèle théorique de l'interaction de GSK3 et Sky1p avec leur substrat phosphorylé.....	344
Figure 71: Spécificités et substrats proposés pour ERK3.....	345
Figure 72: Stratégie pour générer des souris exprimant une forme catalytiquement inactive de ERK3.....	346
Figure 73: Cibles potentielles de ERK3 responsables de son activité anti-proliférative.....	349

CHAPITRE 1: Développement de nouveaux vecteurs pour procaryotes permettant une expression plus efficace des protéines pleines longues

FIG. 1. The dual-tag pHGST prokaryotic expression vectors.....	193
FIG. 2. Expression and purification of full-length recombinant ERK3 fusion proteins using pHGST vectors.....	194

CHAPITRE 2: Régulation de la MAPK ERK3 par le système ubiquitine-protéasome

FIG. 1. ERK3 is an unstable protein.....	229
FIG. 2. ERK3 is degraded by the proteasome.....	230
FIG. 3. A functional ubiquitin-conjugating system is required for ERK3 proteolysis.....	231
FIG. 4. Role of S189 phosphorylation, kinase activity and C-terminal extension on the stability of ERK3.....	232
FIG. 5. A signal located in the N-terminus of ERK3 regulates its stability.....	233
FIG. 6. The N-terminal lobe of ERK3 kinase domain contains two regions that control protein stability.....	234
FIG. 7. The N-terminal lobe of ERK3 kinase domain is sufficient to target proteins for rapid proteasomal degradation.....	235
FIG. 8. Induction of ERK3 expression during cellular differentiation.....	236
FIG. 9. Stable forms of ERK3 inhibit S phase entry in NIH 3T3 fibroblasts.....	237
FIG. 10. Model of ERK3 regulation by proteasome-mediated degradation.....	238

CHAPITRE 3: La MAPK ERK3 et l'inhibiteur de CDK p21^{WAF1} sont ubiquitinés en N-terminal *in vivo*

FIG. 1. A lysine-less mutant of ERK3 is unstable.....	271
FIG. 2. ERK3 is degraded by the proteasome in a lysine-independent manner.....	272
FIG. 3. Lysine-less ERK3 is ubiquitinated <i>in vivo</i> and requires a functional ubiquitin conjugation pathway for its efficient degradation.....	273
FIG. 4. Addition of large N-terminal tags stabilizes ERK3 expression.....	274
FIG. 5. The presence of a large N-terminal tag inhibits ERK3 ubiquitination.....	275

FIG. 6. Addition of large N-terminal tags stabilizes expression of ERK3 and p21, but not that of proteins ubiquitinated on internal lysine residues.....	276
FIG. 7. Degradation of lysine-less p21 is dependent on a functional ubiquitin conjugation pathway.....	277
FIG. 8. Identification of N-terminally ubiquitinated ERK3 and p21 by MS/MS.....	278

CHAPITRE 4: Étude de la phosphorylation de ERK3 *in vivo*

FIG. 1. ERK3 is phosphorylated <i>in trans</i> on serine 189 <i>in vivo</i>	308
FIG. 2. Serine 189 phosphorylation is constitutive.....	309
FIG. 3. ERK3 is phosphorylated on serine 386 <i>in vivo</i>	310
FIG. 4. Effect of serine 386 phosphorylation on ERK3 subcellular localization and serine 189 phosphorylation status.....	311
FIG. 5. Generic and predicted substrates are poorly phosphorylated by ERK3 <i>in vitro</i>	312
FIG. 6. ERK3 inhibitory effect on cell cycle is independent of its kinase activity but requires its C-terminal extension.....	313
SUPPLEMENTARY FIG. 1. Tyrosine phosphorylation of ERK3.....	315
SUPPLEMENTARY FIG. 2. Reversion of the SPR motif to APE does not rescue the lack of ERK3 protein kinase activity.....	316

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

AIP5	Atrophin-1 interacting protein 5
AKAP	A kinase (PKA) anchor protein
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
AMPc	Acide adénosine monophosphorique cyclique
ANAP	Actin N-terminal aminopeptidase
AP-1	Activating protein-1
APC/C	Anaphase promoting complex/cyclosome
APF-1	ATP-dependent proteolysis factor 1
APP-BP1	Amyloid precursor protein binding protein-1
AR	Aldose réductase ou Androgen receptor
ARE	AU-rich element
AREBP	ARE-binding protein
ARF	Alternative reading frame
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATE1	Arginyltransferase 1
ATF-2	Activating transcription factor 2
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
AUF1	ARERNA-binding factor 1
β -gal	beta-galactosidase
BARD	BRCA1-associated RING domain protein 1
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BGT1	Betaine, GABA transporter 1
BH3	Bcl-2 homology 3
bHLH	Basic helix-loop-helix
BMP	Bone morphogenetic protein
BRCA1	Breast cancer 1
BRF-1	Butyrate response factor 1
CamKII	Calmodulin dependent kinase II
CD	Common docking
Cdc	cell division cycle
CDK2	Cyclin dependant kinase 2
cDNA	complementary DNA
CDT1	Cdc10 dependent transcript 1
CHIP	C-terminus of heat shock protein 70 interacting protein
CK1	Casein kinase 1
CKS1	CDK subunit 1
CLIC	Chloride intracellular channel
Clk	Cdc2-like kinase
CMGC	<u>CDK</u> , <u>MAPK</u> , <u>GSK3</u> et <u>CDK-like/CLK</u>
CNK	Connector enhancer of KSR
CoA	CoenzymeA
COP	Constitutively photomorphogenic

COX-2	Cyclo-oxygenase-2
CREB	cAMP response element binding protein
CRM1	Chromosome region maintenance 1
CSAID	Cytokine suppressive anti-inflammatory drug
CYLD	Mutated in cylindromatosis
DAL-1	Differentially expressed in adenocarcinoma of the lung-1
DEAE	Diethylaminoethyl
DEF	Docking for ERK, FXFP
DEN	Domaine d'export nucléaire
DIAP1	Drosophila inhibitor of apoptosis
DLK	Dual leucine zipper-bearing kinase
DUB	Deubiquitinating enzyme
DUSP	Dual specificity phosphatase
DVD	Domain for versatile docking
E	Embryonic day
E1	Ubiquitin activating enzyme
E2	Ubiquitin conjugating enzyme
E3	Ubiquitin ligase
E4	Ubiquitin chain assembly factor
E6-AP	E6-associated protein
ED	Glutamic acid/aspartic acid domain
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	EGF receptor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
eIF3	Eukaryotic Initiation factor 3
eIF-4E	Eukaryotic Initiation factor 4E
ELK-1	ETS-like 1
EMI-1	Early mitosis inhibitor-1
ENTH	Epsin N-terminal homology
EPO	Erythropoietin
ER	Estrogen receptor
ERAD	ER associated protein degradation
ERGIC	Endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment
ESCRT	Endosomal sorting complexes required for transport
EST	Expressed sequence tag
ETS	E26 transformation-specific sequence
Fbl	Fbox protein with LRR repeats
Fbs	Fbox protein with SBD
Fbo	Fbox protein with other domain
Fbw	Fbox protein with WD40 domain
FG-repeats	Phenylalanine/glycine-repeats
FGF	Fibroblast growth factor
FxF(P)	Phenylalanine/x/phenylalanine/(proline)
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GFP	Green fluorescent protein

GPCR	G-protein coupled receptor
GRB-2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
GST	Glutathione S-transferase
HDAC	Histone deacetylase
HECT	Homology to E6-AP C-terminus
HGF	Hepatocyte growth factor
HIF	Hipoxia inducible factor
HIPK	Homeodomain interacting protein kinase
HIS ₆	Hexa-histidine
HLA	Human leukocyte antigen
HMG	High mobility group
hnRNPA0	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0
HPV	Human papilloma virus
HOG	High osmolarity glycerol
HSP27/70/90	Heat shock protein of 27/70/90 kDa
HuR	RNA binding protein homologous to human R-antigen
IC ₅₀	Inhibitory concentration 50%
Id	Inhibitor of differentiation
I κ B	Inhibitor of NF- κ B
IKK	I κ B kinase
IL	interleukin
IMP	Impedes mitogenic signal propagation
INK4	Inhibitor of CDK4
IR	Insulin receptor
IRS	IR substrate
IS	Inhibitory sequence
JAK	Janus kinase
JAMM	JAB1/MPN/Mov34 metalloprotease
JIP	JNK interacting protein
JNK	c-jun N-terminal kinase
kDa	kiloDalton
K _i	Enzyme inhibition constant
KI	Knock-In
KIM	Kinase interaction motif
K _m	Michaelis constant
KO	Knock-Out
KPC	Kip1 ubiquitination-promoting complex
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus
KSR	Kinase suppressor of activated ras
LAP	LLR and PDZ
LIN	Cell lineage
LMB	Leptomycin B
LMP	Late membrane protein

LPA	Lysophosphatidic acid
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine rich repeats
LZK	Leucine zipper bearing kinase
MADS	Mcm1, agamous, deficiens and srf
MAP	Methionine aminopeptidase
MAP2	Microtubule associated protein 2
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MAPKK	MAPK kinase
MAPKKK	MAPKK kinase
MAPKAPK	MAPK activated protein kinase
MBP	Myelin basic protein
MDM2	Mouse double minute 2
MEF	Mouse embryonic fibroblasts
MEF2	Myocyte-specific enhancer factor 2
MEK	MAPK or ERK kinase
MEKK	MEK kinase
MHC	Major histocompatibility complex
MIR	Modulators of immune recognition
MK-2	MAPKAPK-2
MKB	MAPK binding domain
MKK	MAPKK
MKP	MAPK phosphatase
MLK	Mixed lineage kinase
MLTK	MLK-like MAP triple kinase
MMP	Matrix metalloprotease
MMS	Methyl methane sulfonate
MNK	MAPK-interacting kinase
MORG1	MAPK organizer 1
MP1	MEK partner 1
MPN	MPR1p and PAD1p N-terminal
MST2	Mammalian sterile twenty-like
MVB	Multivesicular body
NAP	N-terminal aminopeptidase
NAT	N-terminal acetyltransferase
NDAC	N-terminal deacetylase
NDR1/2	N-terminal degradation region 1 and 2
NEDD8	Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8
NEK2	NimA-related protein kinase 2
NES	Nuclear export sequence
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NF-kB	Nuclear factor kappa B
NFZ	Npl4 zinc finger
NGF	Nerve growth factor
NIPA	Nuclear-interacting partner of ALK
NLK	Nemo-like kinase
NLS	Nuclear localisation signal

NPC	Nuclear pore complexe
NT3	Neurotrophin-3
ODC	Ornithine decarboxylase
OGM	Organisme génétiquement modifié
OSM	Osmosensing scaffold for MEKK3
OTU	Ovarian tumor
PABP1	Poly(A)-binding protein 1
PAK-1	P21-activated kinase-1
PB1	P67phox and bem1p
Pbs2p	Polymyxin B sensitivity 2
PBF	Protéine à boîte F
PcG	Polycomb group
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
PEA-15	Phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa
PEST	Sequence rich in proline, glutamic acid, serine and threonine
PH	Pleckstrin homology
PI3K	Phosphoinositide-3 kinase
PIN1	cis/trans prolyl isomerase
pl:pC	Poly-inositic:poly-cytodylic acid
PKA	Protein kinase A
PKB	Protein kinase B
PLK	Polo-like kinase
PP	Serine/threonine protein phosphatase
PRC1L	Polycomb repressive complex 1-like
PTB	Phospho-tyrosine binding domain
PTP	Protein-tyrosine phosphatase
PUBs	Polyubiquitin site-1
RALGDS	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator
RBD	Ras binding domain
RBX1	RING box protein 1
RD kinase	Arginine/aspartic acid kinase
RGS	Regulator of G-protein signalling
RIM	Raf interacting motif
RING	Really interesting new gene
RIR	Raf inhibitory region
RNAi	RNA interference
Rpt	Proteasome regulatory particle, ATPase-like
Rpn	Proteasome regulatory particle, non-ATPase-like
RSK	Ribosomal S6 kinase
RTK	Receptor tyrosine kinase
SAP	SRF accessory protein 1
SBD	Sugar binding domain
SCF	SKP1/cullin1/Fbox protein complex

SEF	Similar expression to FGF genes
Sem	Sevenmaker
SGK	Serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase
SH2	Src homology domain 2
SH3	Src homology domain 3
SHFM	Split hand and foot malformation
siRNA	Short interfering RNA
SKP1	S-phase kinase associated protein 1
SKP2	S-phase kinase associated protein 2
SKRP	Stress-activated protein kinase pathway-regulating phosphatase
SMIT	Sodium/myo-inositol co-transporter
SR-factor	Serine/Arginine Factor
SRC	Sarcoma kinase
SRE	Serum response element
SRF	Serum response factor
SRPK	SR-factor protein kinase
SOS	Son-of-sevenless
STAT	Signal-transducing activators of transcription
Ste	Sterile
Sty	Kinase having serine-, threonine-, and tyrosine-phosphorylating activities
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
TAB1	TAK1 binding protein 1
TAK1	TGF- β activated kinase
TAP	Tandem affinity purification
TAO	Thousand and one amino acids
TCF	Ternary complex factor
TCR	T-cell receptor
TGF- β	Transforming growth factor- β
TIA-1	T-cell restricted intracellular antigen-1
TIAR	TIA-1-related protein
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Tumor necrosis factor
TonE	Tonicity enhancer
TonEBP	TonE binding protein
TPA	Tetradecanoyl phorbol acetate
TPL-2	Tumor progression locus 2
TRAF	TNF receptor associated factor
TRF1	Telomeric repeat binding factor protein 1
TRK	Tropomyocin receptor kinase
TTP	Tristetraprolin
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling
UBA	Ubiquitin associated domain
UBC	Ubiquitin conjugating enzyme
Ubl	Ubiquitin-like domain
Ubr	Ubiquitin-arginine-fusion
UCH	Ubiquitin C-terminal hydrolase

UFD	Ubiquitin-fusion degradation
UIM	Ubiquitin interaction motif
ULP	Ubiquitin-like protein
USP	Ubiquitin specific protease
UV	Rayon Ultra-Violet
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WAF1	Wild type p53 activated fragment 1
WGA	Wheat germ agglutinin
WWP1	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1

REMERCIEMENTS

La genèse de cette thèse n'a pas toujours été facile. Les "culs-de-sac" scientifiques ont été nombreux, tout comme les moments de découragement. Je comprends maintenant un peu mieux l'expression "PhD = Permanent Head Damage". Heureusement, j'ai eu le support de plusieurs personnes et organismes, me permettant de compléter ma formation doctorale en toute sérénité.

Tout d'abord, je tiens à remercier Sylvain Meloche de m'avoir accueilli dans son équipe de recherche. Merci de m'avoir fait confiance en me donnant un sujet si passionnant et pourtant si vierge. Sylvain m'a toujours pleinement épaulé dans ma démarche. De plus, il m'a permis de développer mon indépendance et mon sens critique.

Je tiens à remercier Marc Therrien, Benoit Coulombe, Stéphane Richard et André Veillette pour avoir siégé sur mes comités de formation.

Je remercie cordialement les membres du jury, Marc Therrien, Benoit Coulombe, Simon Wing et Stephen Michnick d'avoir accepté évaluer cette thèse. Je sais que votre temps est précieux et j'apprécie l'intérêt que vous me portez.

Je remercie les organismes subventionnaires qui m'ont permis de manger durant mes études graduées, notamment le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) et l'Institut National du Cancer du Canada (NCIC). Je tiens également à remercier le département de biologie moléculaire de l'Université de Montréal, Keystone Symposia et l'American Association for Cancer Research (AACR) pour m'avoir permis de présenter mes résultats dans des congrès internationaux.

Je remercie Pierre Thibault et Eric Bonneil pour leur compétence et leur efficacité en spectrométrie de masse.

Je voudrais également remercier les agents de recherche qui m'ont aidé de près ou de loin dans mon projet, et qui ont supporté mes humeurs. Merci à Johanne Pellerin d'avoir fait les

premières constructions de ERK3 (avec de si belles cartes), à François Comte pour l'initiation aux traductions *in vitro* à 9:00 AM, à Josyyyyyyy Noël pour le criblage de double hydride, le professionnalisme et les galettes de sarrasin et à Edith "ED Power" Giasson pour s'assurer qu'on défonce pas le budget et le meurtre et mystère...

Je tiens à remercier vivement mes collègues de laboratoire et amis que j'ai eu le privilège de côtoyer au fil des ans. Particulièrement, merci à Deng-Fu Guo de m'avoir initié aux bench, à Benjamin pour la "Team ERK3" et les dîners chez EURO, à Marc I, Laure et KG pour m'avoir initié aux "shifts de nuit", à Catherine pour sa bonne humeur et la qualité de son travail sur ERK3, à Frank, pour les conversations de science et à la nouvelle team ERK3/4 (Justine, Pierre-Luc et Paul) pour enfin comprendre à quoi ça sert!

Je veux remercier particulièrement Stéphane Pelletier pour son enthousiasme scientifique communicatif. Je m'ennuie des cigarettes fumées sur St-Urbain ou au Madona Pizza en parlant de JAK/STAT et d'ERK3.

J'en profite pour dire merci à Mathieu, Alexandre et Alexis pour l'aventure musicale. Nos "jams" hebdomadaires ont été essentiels pour mon équilibre. J'ai eu énormément de plaisir à développer "mon autre côté du cerveau" avec vous. Y aura-t-il un (n=2) à notre retour ?

Merci à ma famille pour leurs encouragements et leurs intérêts dans ce que je fais...

Finalement, j'adresse mes plus vifs remerciements à une personne très importante pour moi, Geneviève Rodier. Bien qu'initialement on ne s'entendait pas sur le rangement de la T4 DNA Ligase ("crisssse!"), notre passion scientifique réciproque nous a vite réconcilié. Geneviève m'a grandement influencé. Avec elle, j'ai compris l'importance du travail et de la rigueur. Quand on veut un résultat... il faut faire la manip! J'ai hâte de poursuivre notre association outre-mer.

INTRODUCTION

1.1. LES VOIES MAP KINASES

1.1.1. Découverte de la phosphorylation des protéines jusqu'au kinome humain

La phosphorylation réversible des protéines est un mécanisme fondamental de régulation. Ce mécanisme fut découvert pendant les années 50 par Edmond Fischer et Edwin Krebs durant leur étude portant sur la phosphorylase, l'enzyme catalysant l'étape limitante de la glycogénolyse. On savait depuis la fin des années 30, par les travaux de Carl et Gerty Cori, que la phosphorylase existe soit sous une forme active (a) ou inactive (b) (148). Fisher et Krebs ont découvert que la forme inactive (b) peut être convertie en forme active (a) par l'addition d'un phosphate (387). Cette *phosphorylation* est catalysée par une protéine spécifique, la phosphorylase *kinase* (Figure 1). La réaction inverse est également possible.

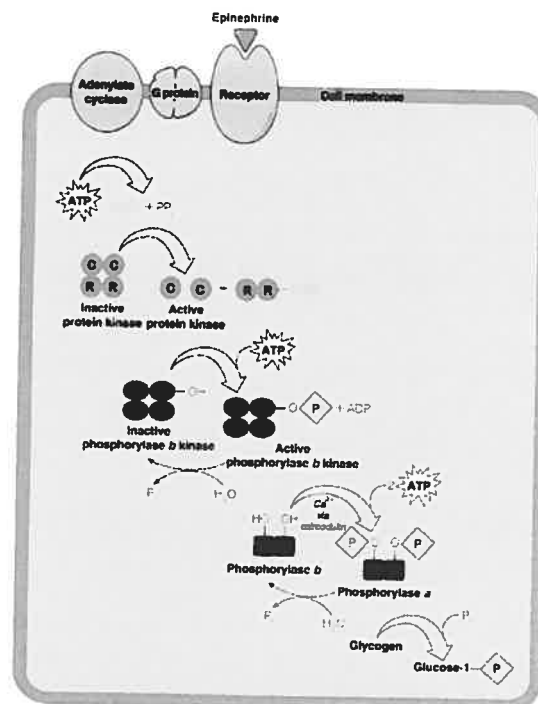


Figure 1: Voie de la glycogénolyse. L'épinéphrine, via son récepteur (β_2 -adrénergique) active l'adénylate cyclase, conduisant à l'accumulation intracellulaire d'AMPc. Ce second messager lie les sous-unités régulatrices (R) de la protéine kinase A (PKA) entraînant l'activation de la sous-unité catalytique (C). La PKA phosphoryle et active la phosphorylase kinase. Cette dernière phosphoryle et active la phosphorylase, générant la forme active a. La phosphorylase clive et mobilise le glycogène. Tirée de (http://www.bmb.psu.edu/courses/bmb211/bchmovie/glycolysis/MvH13_18.gif).

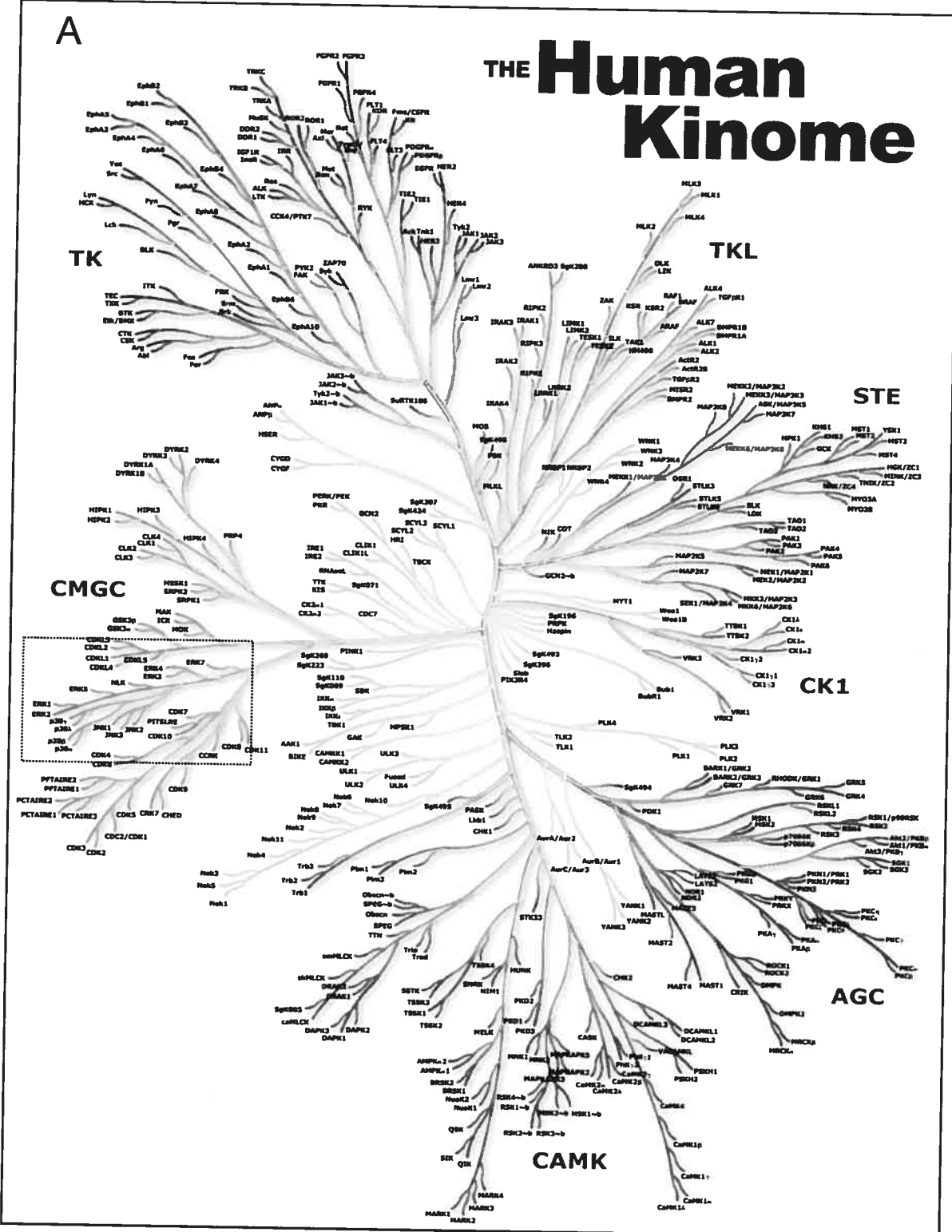
Ainsi, la phosphorylase a redevient inactive (b) à la suite de la perte du phosphate (18). Cette réaction de *déphosphorylation* est médiée par une protéine *phosphatase*. Comment la conversion de la forme b en a de la phosphorylase est-elle régulée physiologiquement?

L'activité de la phosphorylase kinase (et par le fait même de la phosphorylase) est sensible à certaines hormones. Ainsi, l'épinéphrine (ou noradrénaline) est un activateur puissant de la dégradation du glycogène. Cette hormone induit l'accumulation intracellulaire d'adénosine mono-phosphate cyclique (AMPc), un second messenger découvert par Earl Sutherland (605). Un des rôles de l'AMPc est d'activer une protéine kinase, la PKA (Protéine Kinase activée par l'AMPc). Vers la fin des années 60, le groupe de Krebs a montré que la PKA phosphoryle directement la phosphorylase kinase, entraînant son activation (Figure 1) (758). La *voie de signalisation* définie par la PKA et la phosphorylase kinase est ainsi le premier exemple d'une *cascade de protéine kinases* ou *cascade de phosphorylation*.

Depuis les années 70-80, de plus en plus d'exemples de processus biologiques impliquant les protéines kinases ont été découverts. Par exemple, la phosphorylation joue un rôle central dans le cycle cellulaire (665) et dans la contraction musculaire (187). D'un autre côté, une dérégulation de la phosphorylation est à l'origine de certaines pathologies chez l'homme. Notamment, certaines protéines kinases furent identifiées comme proto-oncogènes, illustrant l'implication de ces enzymes dans la tumorigenèse (144). Pour souligner l'importance de leur découverte, le Prix Nobel de Médecine et Physiologie fut octroyé à Fischer et Krebs en 1992. Les protéines kinases sont maintenant reconnues comme étant des molécules de signalisation essentielles à la vie des eucaryotes. Chez l'homme, le séquençage du génome révèle que les protéines kinases forment une famille nombreuse avec près de 500 membres (Figure 2). Ainsi, plus de 1,5% de nos gènes codent une protéine kinase, illustrant clairement leur importance (462).

1.1.2. Caractéristiques et fonctionnement d'un domaine kinase

Il existe différents domaines protéiques possédant une activité phosphotransférase. Ces protéines kinases n'ont pas la même spécificité au niveau du site accepteur du phosphate. Chez les eucaryotes, les protéines kinases les plus étudiées (et les plus importantes ?) phosphorylent le groupement hydroxyle de la sérine, la thréonine et/ou la tyrosine de leur substrat. Mentionnons qu'il existe également des protéines kinases spécifiques pour l'histidine et l'acide aspartique (793). Ces dernières sont importantes pour la physiologie des



B

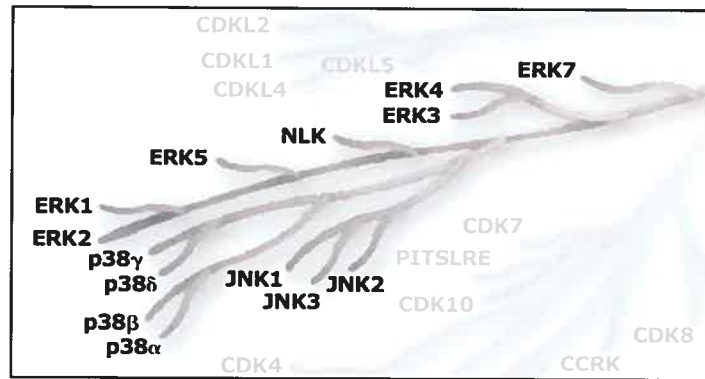


Figure 2: Le kinome humain. (A) Le séquençage du génome humain révèle la présence de près de 500 protéines kinases. Les grandes familles sont CMGC (CDK, MAPK, GSK3 et CDK-like), TK (tyrosine kinase), TKL (tyrosine kinase-like), STE (STE7, STE11 et STE20-like), CK1 (casein kinase-1-like), AGC (PKA, PKG et PKC) et CAMK (calcium/calmoduline kinase-like). Les MAPK humaines sont encadrées d'un pointillé. (B) La branche des MAPK est soulignée. Adaptée de (462).

plantes, des eucaryotes unicellulaires et des procaryotes. La phosphorylation en histidine (de même que sur les lysines (669)) est néanmoins observée chez les animaux et pourrait constituer un niveau additionnel de régulation. Dans tous les cas, l'ATP est le donneur préférentiel du phosphate.

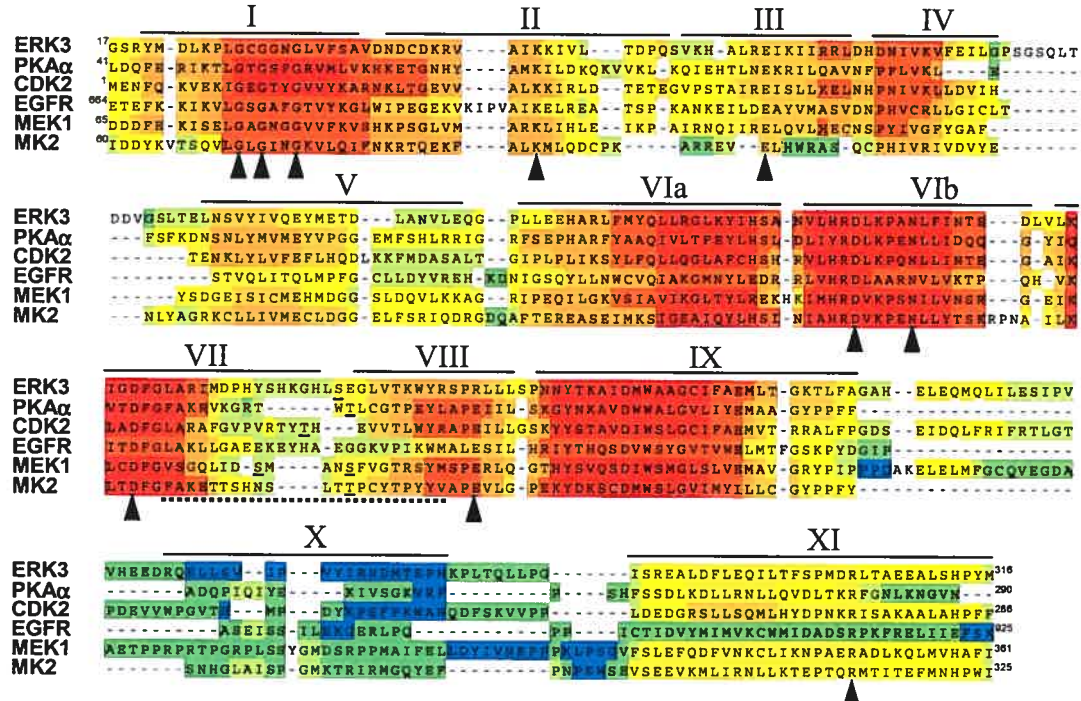


Figure 3: Le domaine kinase peut être divisé en 12 sous-domaines. Alignement du domaine kinase de six protéines kinases peu apparentées. Les résidus hautement conservés sont identifiés par une flèche. La région soulignée du trait pointillé correspond à la boucle d'activation. Elle comprend un ou plusieurs sites de phosphorylation (soulignés en noir). ERK3 et CDK2 font parties de la superfamille CMGC, PKA α des AGC, EGFR des TK, MEK1 des STE et MK2 des CAMK. Plus les séquences sont homologues entre elles, plus elles sont colorées en rouge. Alignement généré à l'aide de Coffee T (<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>).

Les protéines kinases sont toutes (ou presque) caractérisées par la présence d'un domaine protéique d'environ 275 acides aminés. Vers la fin des années 80, le nombre de séquences de protéines kinases disponibles dans les banques a atteint une "masse critique" permettant d'identifier par alignement de séquence des motifs conservés. Ainsi, SK Hanks et collègues identifièrent douze sous-domaines présents chez toutes les protéines kinases (256) (Figure 3). Certains sous-domaines (I, II, III, VIb, VII, VIII et XI) présentent des résidus hautement conservés. La mutation de ces résidus abolit généralement l'activité enzymatique suggérant que ceux-ci ont une importance structurelle et/ou catalytique (228).

Les études structurales et biochimiques ont permis de comprendre le fonctionnement du domaine kinase. Le domaine kinase se replie en une structure globulaire comportant deux lobes : le lobe N-terminal et le lobe C-terminal (Figure 4A). Le lobe N-terminal est essentiellement composé d'un feuillet- β déformé alors que le lobe C-terminal est plus riche en hélices- α , tel qu'illustré par la structure de la kinase CDK2 (une protéine kinase dépendante des cyclines, un enzyme essentiel pour la division cellulaire) (91). On remarque dans cette structure cristallographique que l'ATP s'intercale entre les deux lobes.

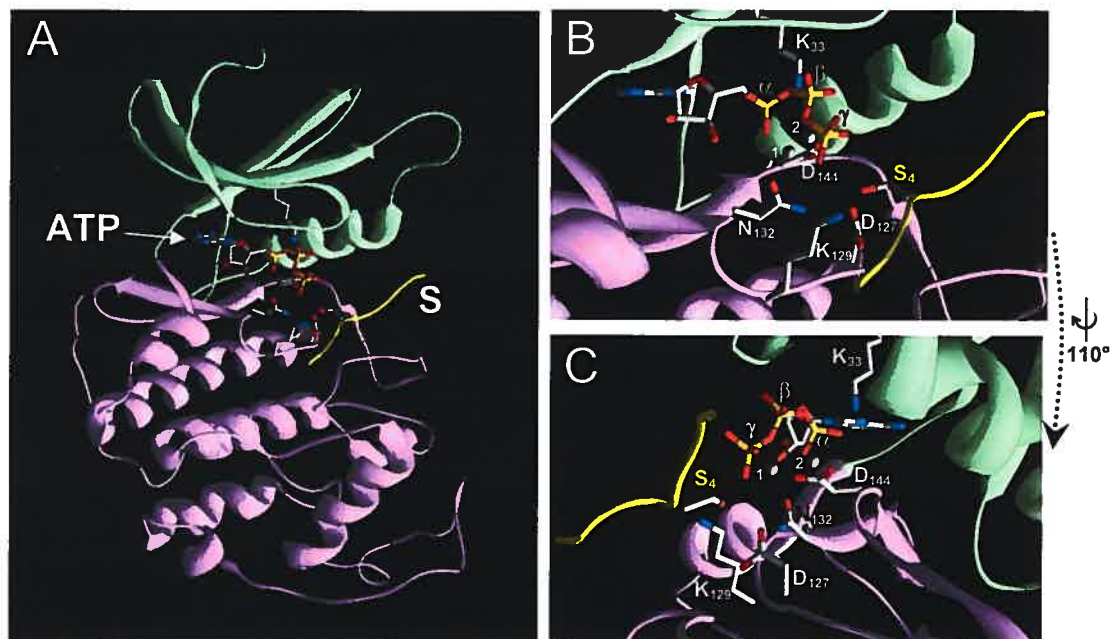


Figure 4: Structure du domaine kinase. (A) Représentation en ruban de CDK2 complexée avec une molécule d'ATP et un substrat peptidique optimal HHASPRK (S, en jaune). Le domaine kinase est constitué d'un lobe N-terminal (en vert) et C-terminal (en violet). L'ATP s'insère dans l'interface entre les deux lobes. (B) et (C) Site actif du domaine kinase de CDK2. Les résidus catalytiques, l'ATP de même que le site accepteur sont montrés. La Lys33 interagit directement avec l'ATP et assure son bon positionnement. L'Asn132 et l'Asp145 sont elles aussi impliquées dans la liaison de l'ATP en chélatant deux ions Mg^{2+} (numérotés 1 et 2 respectivement). L'Asp127 est physiquement près du site accepteur (la Ser4, en jaune) et joue le rôle de base catalytique en déprotonant le groupement hydroxyle. La Lys129 aide la réaction de phosphotransfert en neutralisant la charge du phosphate. Figure générée à l'aide de SPDBV 3.7. Adaptée de (91).

Plusieurs des résidus conservés sont impliqués dans la liaison à l'ATP (381). Premièrement, les glycines présentes dans le sous-domaine I forment une tige-boucle interagissant avec les phosphates α et β de l'ATP. La lysine (K33) du sous-domaine II, de part sa charge positive, lie et positionne ces phosphates de l'ATP (Figure 4B, C). Cette lysine doit également interagir avec l'acide glutamique (E51) du sous-domaine III (non illustré). L'ATP lie la kinase complexée avec deux ions de Mg^{2+} . L'asparagine (N132) et l'acide aspartique (D144) des sous-domaines VIb et VII chélatent ces deux ions, facilitant l'association avec l'ATP (Figure 4B, C). Le sous-domaine VIb, également appelé la boucle catalytique, joue un rôle essentiel dans la catalyse de la réaction de phosphotransfert. Tout d'abord, on estime que l'acide aspartique (D127) de ce sous-domaine agit comme base générale. La structure de CDK2 comprend également le substrat peptidique optimal HHASPRK (Figure 4, en jaune). On remarque que l'Asp127 est près de la sérine du substrat. Ainsi, ce résidu catalytique essentiel est impliqué dans la déprotonation du groupement hydroxyle, favorisant l'attaque nucléophile du phosphate γ de l'ATP. La lysine129 est conservée chez les sérine/thréonine kinases et favorise la réaction en neutralisant la charge négative du phosphate γ . Finalement, l'acide glutamique (E171) et l'arginine (R274) des sous-domaines VIII et XI, ne sont pas directement liés à la catalyse. Ces deux résidus forment plutôt un pont salin interne, stabilisant la conformation du C-terminal (pour plus de détails, voir section 6.3.1.). Parce que le lobe C-terminal est généralement impliqué dans l'interaction avec le substrat, la perte de ce pont augmente le K_m de l'enzyme envers celui-ci (228). Certaines kinases (comme les MAPK, voir ci-dessous) requièrent la phosphorylation de résidu(s) présent(s) dans la boucle d'activation pour leur activité.

1.1.3. Découverte des MAPK

La phosphorylation en tyrosine a été identifiée tardivement comparativement à la sérine/thréonine phosphorylation. Certains oncogènes de même que les récepteurs des facteurs de croissance sont des tyrosines kinases (Récepteur Tyrosine Kinase, RTK), suggérant un rôle de ce type de phosphorylation dans la prolifération et la tumorigenèse. Durant la décennie 80, plusieurs laboratoires ont eu comme objectif de comprendre le mécanisme d'action de ces kinases. Bien que ces récepteurs phosphorylent les tyrosines, la majorité de la phosphorylation induite par les facteurs de croissance se situe sur les résidus

sérines et thréonines (141). Les évidences biochimiques indiquaient ainsi que l'activation des RTK entraînent l'activation d'une (ou plusieurs) activité sérine/thréonine kinase capable de phosphoryler *in vitro* la protéine basique de la myéline (myelin basic protein, MBP) et la protéine associée au microtubule-2 (microtubule associated protein-2, MAP2) (591). Du fait de sa spécificité *in vitro*, cet enzyme fut nommé MAP-2 kinase ou MAPK. En 1988-89, le groupe de Thomas W. Sturgill montra que la MAP kinase est une protéine de 42 kDa contenant de la phospho-tyrosine (616). On pensait (à tort) que cette protéine pourrait être une cible directe des RTK, expliquant l'effet stimulateur de ces derniers sur la phosphorylation en sérine/thréonine (145). Ce fut finalement le groupe de Mélanie H Cobb qui clona la première MAP kinase de mammifère en la purifiant biochimiquement (82). La protéine identifiée était très semblable à deux kinases de levure, suggérant que ces enzymes sont conservés dans l'évolution. Parce que la nouvelle kinase est fortement activée par les mitogènes, elle fut "re"nommée MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). Au cours des années suivantes, plusieurs autres MAPK furent identifiées.

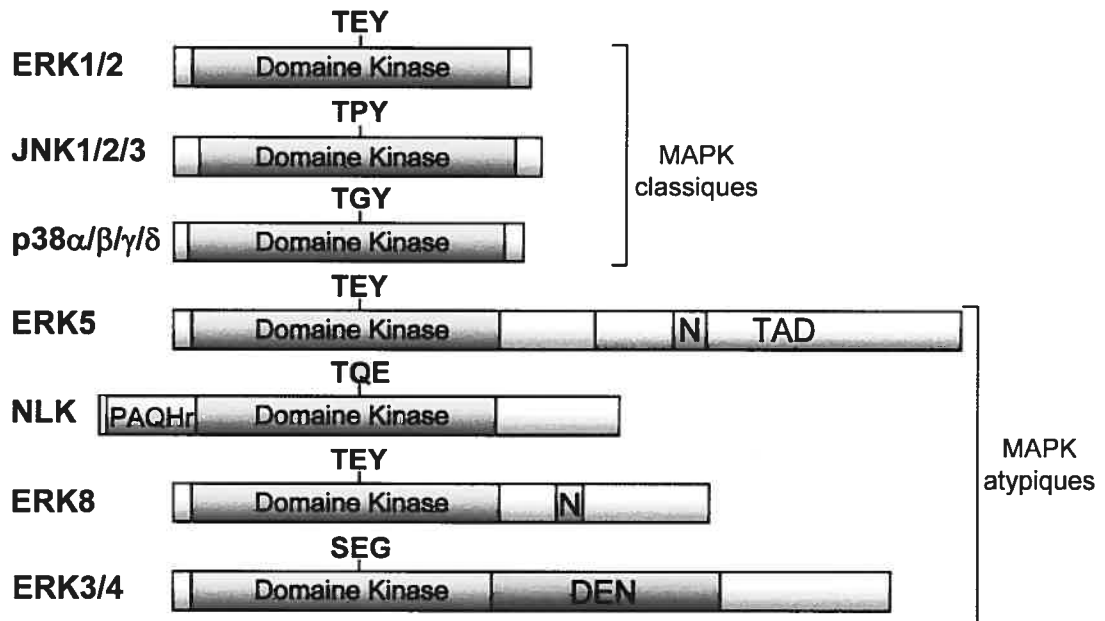


Figure 5: Structure primaire des MAPK chez l'homme. ERK1/2, les JNK et les p38 forment les MAPK dites classiques alors que ERK5, NLK, ERK8 et ERK3/4 sont des MAPK atypiques. Le ou les sites phospho-accepteurs de la boucle d'activation sont indiqués. La localisation de certaines MAPK atypiques est influencée par la présence de séquences d'import et d'export nucléaire dans le C-terminal. Le C-terminal de ERK5 possède également une activité transcriptionnelle. TAD: TransActivation Domain; N: Nuclear Localisation Signal; PAQHr: séquence riche en proline, alanine, glutamine et histidine; DEN: Domaine d'Export Nucléaire.

1.1.4. Caractéristiques des MAPK

Les MAPK sont des enzymes conservés de l'homme jusqu'à la levure, suggérant qu'elles participent à des voies de signalisation importantes à la vie eucaryotique (554). L'architecture d'une MAPK est relativement simple. En effet, elles ne sont (en général) constituées que d'un domaine kinase flanqué de petites extensions en N- et C-terminal (Figure 5). Structurellement, les MAPK ressemblent aux CDK, ces deux familles de kinases faisant partie de la superfamille CMGC (pour CDK, MAPK, GSK3 et CDK-like/CLK, Figure 2). Les MAPK sont des kinases "dirigées contre les prolines" (ou "proline directed kinases"). Ainsi, ces kinases nécessitent une proline en position P+1 sur le substrat. Le peptide KNIVTPRTPPPSQGK (issu de la MBP) est un exemple de substrat de MAPK (673). À l'instar de la phosphorylase, l'activité des MAPK est contrôlée par phosphorylation. Ainsi, ces enzymes nécessitent une double phosphorylation sur un motif Thr-X-Tyr (TXY) présent dans la boucle d'activation (Figure 5). La phosphorylation d'un seul des deux résidus n'est pas suffisante pour l'activation (pour savoir pourquoi, voir section 1.1.6.). Le motif TXY est présent chez presque toutes les MAPK. La phosphorylation de ce motif est catalysée par une protéine kinase en amont nommée MAPK kinase (MAPKK). Les MAPKK sont ainsi des protéines kinases à double spécificité, soit sérine/thréonine ET tyrosine. Comme les MAPK, ces enzymes sont également régulés positivement par phosphorylation de leur boucle d'activation. Cette modification est catalysée par un autre enzyme en amont nommé MAPKK kinase (MAPKKK). L'organisation de cette cascade de phosphorylation (MAPKKK/MAPKK/MAPK) est caractéristique des voies MAPK (Figure 6).

1.1.5. Le MAP kinome chez l'homme

Le génome humain code pour 14 membres de la famille MAPK (Figure 2) (462). Ces MAPK définissent au moins 7 voies de signalisation distinctes (Figure 6). Les membres des voies ERK1/2, JNK et p38 furent parmi les premiers à être caractérisés. Ces MAPK sont souvent qualifiées de "classiques" car elles possèdent toutes les caractéristiques énumérées ci-dessus. À l'opposé, ERK3, ERK4, ERK5, ERK8 et NLK sont dites MAPK atypiques ou non-conventionnelles. Ces dernières sont caractérisées par une extension de plus d'une

centaine d'acides aminés en C-terminal absente chez les MAPK classiques. De plus, certaines ne contiennent pas le motif TXY dans leur boucle d'activation.

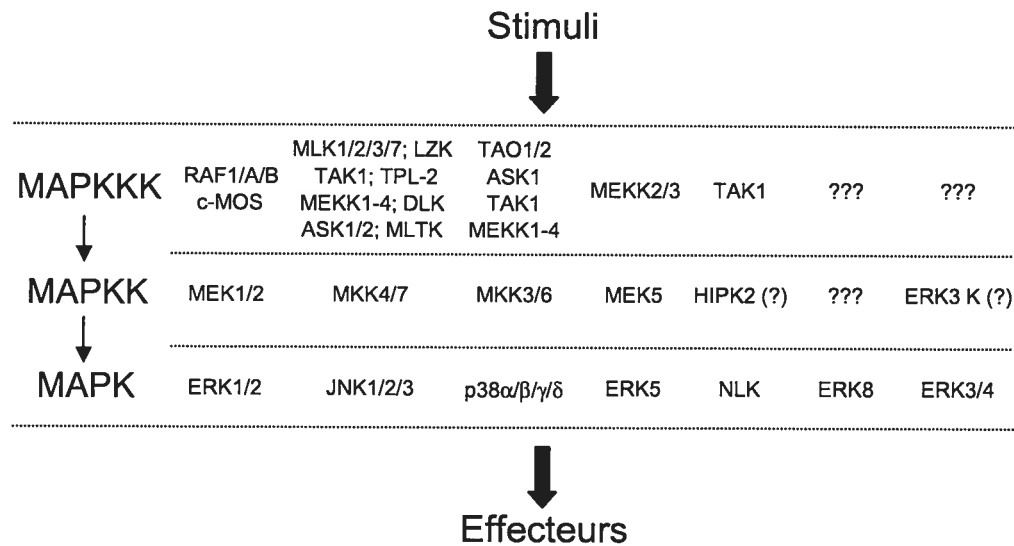


Figure 6: Le MAP kinome chez l'homme. L'homme possède potentiellement au moins 7 voies MAPK: la voie ERK1/2, JNK, p38, ERK5, NLK, ERK8 et ERK3/4. Une voie MAPK comprends généralement une (ou des) MAPK kinase (MAPKK) et une MAPKK kinase (MAPKKK). Quelquefois, une MAPKKK kinase (MAPKKKK, non illustrée) est impliquée dans l'activation des MAPKKK. Les signaux activateurs ou stimuli de même que les substrats ou effecteurs varient selon la voie MAPK. Adaptée de (554).

Les connaissances sur les MAPK accumulées au fil des années seront décrites dans les sections suivantes. Ma protéine d'intérêt (ERK3) étant une MAPK atypique, je vais mettre l'emphase sur cette catégorie de MAPK. De plus, du fait que ma thèse porte sur les mécanismes de régulation de ERK3, je vais décrire le plus exhaustivement possible les mécanismes de régulation connus des MAPK. Souvent, je vais discuter de ces mécanismes du point de vue de ERK3.

1.1.5.1. La voie ERK1/2

La voie de signalisation ERK1/2 est une des voies les plus étudiées. Cet engouement provient du fait que cette voie est impliquée dans une multitude de processus biologiques. Ainsi, ERK1/2 seraient sollicitées pour la prolifération, la différenciation, le développement embryonnaire, la sénescence, la survie cellulaire, la mémoire et la traduction, entres autres. D'un autre côté, le dérèglement de la voie ERK1/2 est souvent associé à des pathologies humaines, notamment le cancer (voir revue (554, 576)).

1.1.5.1.1. Identification

La kinase régulée par les signaux extracellulaires, ERK1 (Extracellular signal Regulated Kinase-1) fut clonée par purification biochimique. Le groupe de MH Cobb purifia l'activité phosphorylant MAP2 *in vitro* issue de cellules stimulées à l'insuline (82). Les seules protéines homologues à ERK1 en 1990 étaient Kss1p et Fus3p, deux kinases de levures impliquées dans la réponse de l'accouplement ("mating") et de la croissance invasive ("invasive growth"). Une année plus tard, le même groupe clona une protéine kinase homologue à ERK1 par criblage d'une banque de cDNA à faible stringence (81). La nouvelle kinase, ERK2, est 85 % homologue à ERK1. ERK1 et ERK2 furent ainsi les premières MAPK de mammifères identifiées moléculairement.

1.1.5.1.2. Structure

ERK1/2 sont des MAPK classiques. Dans ce sens, elles sont constituées d'un domaine kinase flanqué de petites extensions en N- et C-terminal (Figure 6). Bien que courte, l'extension C-terminale est nécessaire pour les interactions des MAPK (voir section 1.1.10.). ERK1/2 possède le motif de phosphorylation TEY dans sa boucle d'activation. La structure de ERK2 est connue depuis 1994. Le repliement tridimensionnel de ERK2 est caractéristique des sérine/thréonine kinases (834). Cette structure est décrite plus en détails à la section 1.1.6.

1.1.5.1.3. Expression

ERK1/2 sont des enzymes ubiquitaires. Cependant, une plus forte expression est observée au niveau du cerveau, du muscle squelettique, du thymus et du cœur (81). En général, les signaux extracellulaires affectent uniquement l'état de phosphorylation des MAPK. Toutefois en 2002, les groupes de T Hunter et MH Cobb montrèrent qu'un choc osmotique chronique diminue l'expression de ERK1/2 (449). Cette réduction est la conséquence d'une dégradation de ERK1/2 par le système ubiquitine-protéasome (voir section 1.2). La MAPKKK MEKK1 serait impliquée dans la dégradation de ERK1/2. L'implication du système ubiquitine-protéasome dans la régulation des MAPK sera discutée plus en détails dans la section 1.2.8.

1.1.5.1.4. Régulation de l'activité de ERK1/2

L'activité enzymatique de ERK1/2 est relativement facile à détecter *in vitro*. Ceci a permis leur identification ainsi que la caractérisation de leur activité. L'activité catalytique de ERK1/2 est ainsi dépendante de la double phosphorylation du motif TEY présent dans la boucle d'activation. Cette phosphorylation entraîne des changements conformationnels rendant la catalyse possible, tel que décrit en détails à la section 1.1.6.

ERK1/2 ont été identifiées du fait de leur activation catalytique par l'insuline et le EGF (facteur de croissance de l'épithélium), deux ligands agissant par des récepteurs tyrosine kinases (81, 82, 616). L'activation d'autres récepteurs tyrosines kinases, tels les récepteurs du FGF (facteur de croissance des fibroblastes), du PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes), du VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), du HGF (facteur de croissance des hépatocytes) ou du NGF (facteur de croissance des nerfs) entraîne l'activation de ERK1/2. Les cytokines, les ligands de certains récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) et certains stress sont également des activateurs de ERK1/2. La petite GTPase p21RAS, un proto-oncogène, est aussi un activateur puissant de la voie MAPK (421).

Comment un facteur de croissance parvient-il à activer la voie ERK1/2 ? Grâce à une combinaison d'approches génétiques et biochimiques, le mécanisme permettant aux récepteurs tyrosine kinases d'activer ERK1/2 est assez bien caractérisé. Cette activation nécessite l'activité de nombreuses protéines qui transmettent, à leur manière, l'information extracellulaire jusqu'au noyau, via les MAPK (Figure 7). Tout d'abord, la liaison du EGF à son récepteur, le EGFR, induit son homodimérisation. Dans cette conformation, le récepteur est activé et s'autophosphoryle sur plusieurs résidus tyrosines. Le récepteur tyrosine-phosphorylé s'associe alors avec plusieurs effecteurs. GRB2 est l'effecteur important pour l'activation des MAPK. GRB2 (pour Growth factor Receptor Bound protein-2) fut identifiée pour sa capacité à lier EGFR sous forme phosphorylée (445). Cette association se fait via le domaine SH2 présent chez les effecteurs. Les domaines SH2, initialement trouvés chez la tyrosine kinase c-SRC, ont ainsi la capacité de lier les phospho-tyrosines. Les 3-4 résidus en C-terminal de la phospho-tyrosine sont des déterminants

importants reconnus par les domaines SH2 (685). En plus de son domaine SH2, GRB2 possède deux domaines SH3. Ces derniers sont des domaines initialement trouvés chez c-SRC et pouvant lier des motifs riches en prolines (685).

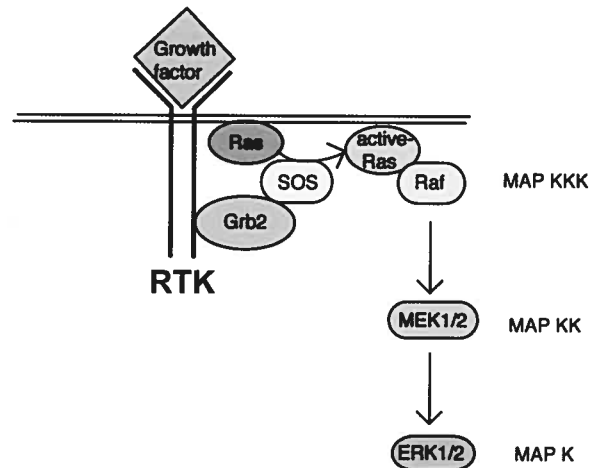


Figure 7: Activation de la voie ERK1/2 par les récepteurs tyrosine kinase (RTK). Voir texte pour détails. Tirée de (http://www.brc.riken.jp/lab/dna/en/GENESETBANK/mapk_ras.png).

GRB2 ne possède pas d'activité catalytique. Quelle est la fonction biochimique de cette protéine ? Les expériences génétiques conduites chez les organismes modèles (où la signalisation des RTK est largement conservée) nous ont grandement éclairé sur le sujet. Ainsi, les groupes de PW Sternberg et HR Horvitz montrèrent que l'oncogène RAS est une molécule essentielle en aval des RTK chez *C elegans* (52, 252). Génétiquement, l'homologue de GRB2 chez *C elegans*, SEM-5, agit en aval des RTK et en amont de RAS (139). Un autre composant également en aval des RTK et amont de RAS est SOS. Initialement identifié chez la drosophile, SOS (Son Of Sevenless) (612) présente de l'homologie avec les échangeurs nucléotidique guanilique (GEF). La structure primaire de SOS prédit donc que celui-ci agit directement sur le proto-oncogène RAS. En effet, Ras existe sous deux formes: active ou inactive. RAS complexée avec le GDP est sous forme inactive et ne transmet aucun signal. La liaison de Ras avec le GTP lui donne une conformation active, lui permettant d'interagir avec ses effecteurs. L'échange du GDP pour le GTP est catalysé par des protéines GEF, tel que SOS. Spontanément, RAS hydrolyse son GTP associé en GDP. Cette réaction est grandement accélérée par une protéine activatrice de l'activité GTPase (GAP pour GTPase Activating Protein), un régulateur négatif de l'activité biologique de RAS. Sachant ceci, plusieurs groupes ont indépendamment montré

que GRB2 s'associe avec SOS *in vivo* (96, 115). Ainsi, la fonction de GRB2 est de recruter SOS au récepteur, donc près de la membrane. SOS se retrouve ainsi près de son substrat, RAS (ancrée à la membrane par son groupement farnésyle), et catalyse son activation.

RAS est une molécule importante car elle est en amont de plusieurs voie de signalisation. Sous sa forme active (liée au GTP), RAS lie directement RAF, la MAPKKK de la voie ERK1/2 et l'active. RAF phosphoryle et active à son tour les MAPKK MEK1/2. Ces dernières phosphorylent directement et activent ERK1/2. Au moins 10 effecteurs de RAS ont été documentés dans les dernières années, incluant la PI₃K et le RAL-GDS, impliqués dans la prolifération et l'apoptose (198, 545). Ces deux dernières molécules jouent un rôle dans la tumorigénèse induite par la forme oncogénique de RAS.

La série d'évènement qui vient d'être décrite n'est qu'une approximation de ce qui se passe dans la vraie vie. En effet, des études génétiques ont par la suite identifié d'autres molécules favorisant l'activation de la voie ERK1/2. On pense que plusieurs de ces molécules sont des protéines d'échafaudage n'ayant pas d'activité enzymatique. Ces molécules sont décrites plus en détails à la section 1.1.9.

L'intensité et la cinétique de l'activation de ERK1/2 dépendent grandement de la nature du stimulus. Par exemple, le NGF induit une activation forte et soutenue de ERK1/2 chez les cellules de phaeochromocytomes PC12, alors que le EGF active de manière transitoire ces MAPK (585). Comme nous allons le voir plus loin, la puissance d'activation des MAPK affecte la réponse cellulaire.

L'activité de ERK1/2, comme toutes les MAPK, est sensible à l'action des protéine-phosphatases. Ces dernières sont des enzymes spécialisés dans l'hydrolyse du lien phosphate-protéine. De par leur nécessité d'être phosphorylées sur les résidus thréonine ET tyrosine pour être actives, les MAPK sont sensibles à trois classes de protéine phosphatases: les phospho-sérine/thréonine phosphatases (PP), les phospho-tyrosine phosphatases (PTP) et les phosphatases à double spécificité (DUSP). La régulation des MAPK par les phosphatases est décrite en détails à la section 1.1.7.

1.1.5.1.5. Membres de la voie ERK1/2

1.1.5.1.5.1. MAPKKK: RAF-1, A-RAF, B-RAF et c-MOS

RAF fut identifié initialement comme un oncogène rétroviral de souris et de poulet en 1983 (313, 590). Par homologie de séquence, trois homologues cellulaires ont été identifiés chez les mammifères, c-RAF-1, A-RAF et B-RAF (48, 74, 667). En 1990, plusieurs groupes découvrirent que l'activité kinase de RAF est augmentée par les mitogènes de manière semblable aux MAPK (66, 109). Seulement deux années plus tard, le lien entre ces deux kinases fut réalisé. Des formes constitutivement actives de RAF activent fortement ERK1/2 *in vivo* (163). Finalement, c'est en 1993 que l'on fit l'importante observation que RAF est un effecteur de la GTPase RAS (838).

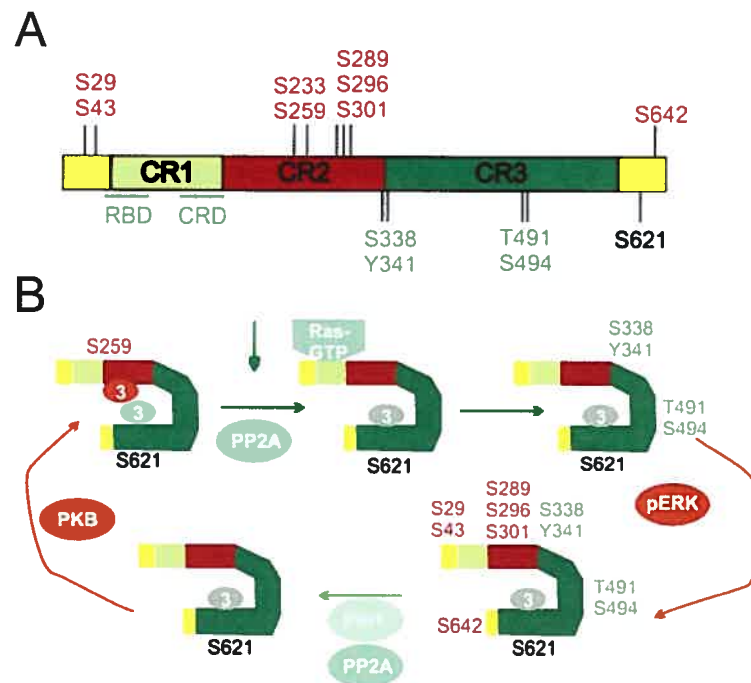


Figure 8: Régulation de la MAPKKK RAF-1. (A) Structure primaire de RAF-1. Les régions conservées CR1/2/3 sont montrées. Le domaine de liaison à RAS (RBD) et le domaine riche en cystéine (CRD) sont soulignés. Les sites de phosphorylations positifs (en vert) et négatifs (en rouge) sur l'activité de RAF-1 sont indiqués. (B) Mécanisme d'activation de RAF-1. Voir texte pour plus de détails. Tirée de (26).

RAF comporte trois régions conservées: les Conserved Regions 1, 2 et 3 (CR1-3) (Figure 8A). Le CR3 correspond au domaine kinase de RAF alors que les CR1 et CR2 sont des régions riches en cystéines et sérines respectivement. Le CR1 est important car il contient le domaine de liaison à RAS ou RBD (Ras Binding Domain) (838). On peut mentionner que le RBD se plie de manière similaire à l'ubiquitine (voir section 1.2.4.1.). La délétion

du CR1 et CR2 de RAF entraîne une kinase constitutivement active, indiquant que ces régions sont impliquées dans la régulation négative de RAF (552).

La régulation de RAF est complexe. La phosphorylation joue un rôle important dans la régulation positive et négative de RAF (Figure 8B). Dans les cellules quiescentes, RAF est phosphorylée sur les S259 et S621. Ces deux sites sont reconnus par les protéines 14-3-3 et gardent RAF dans une conformation inactive. Les protéines 14-3-3 sont des molécules dimériques spécialisées dans la liaison aux phospho-sérines (pour revue, voir (733)). La mutation de la S259 augmente l'activité de RAF, indiquant que ce site est impliqué dans la régulation négative (182). Suite à une stimulation mitogénique, la S259 est déphosphorylée par l'action de la protéine phosphatase PP2A, ce qui permet l'interaction de RAF avec RAS via son RBD (541). L'interaction avec RAS entraîne le recrutement de RAF à la membrane. Cette translocation a un rôle positif sur l'activité de RAF car un mutant constitutivement membranaire de RAF est plus actif (422). À la membrane, RAF est phosphorylée sur la S338 et la Y341, conduisant à son activation. La S338 peut être phosphorylée par PAK1, une sérine/thréonine kinase activée par CDC42 et RAC, deux petites GTPases de la famille RHO (465). La tyrosine 341 est la cible des kinases de la famille c-SRC. La boucle d'activation de RAF, comprenant la T491 et la S494, doit être phosphorylée pour l'activité catalytique. Il se peut que ces événements de phosphorylation soient autocatalytiques.

D'autres kinases ont un rôle négatif sur l'activité de RAF. C'est le cas de la PKA qui phosphoryle directement RAF sur trois sites: les S43, S233 et S259. Comme on vient de voir, la S259 favorise une conformation inactive de RAF avec l'aide des protéines 14-3-3. La S233 peut aussi servir de site de liaison aux 14-3-3 (182). La phosphorylation de la S43 interfère avec la liaison de RAF à RAS. D'un autre côté, le groupe de DK Morisson a récemment montré que RAF-1 est un substrat de ERK1/2 *in vivo* (179). En effet, l'activation de RAF-1 entraîne son hyperphosphorylation par une voie dépendant de MEK1/2. De manière intéressante, RAF-1 hyperphosphorylée n'interagit pas avec RAS-GTP. Les sites de phosphorylation identifiés *in vivo* par spectrométrie de masse sont les sérines S29, S289, S296, S301 et S642. On remarque que trois de ces sites sont situés dans le CR2. Tous ces sites possèdent une proline en position P+1 et sont phosphorylés par ERK2 *in vitro*. La mutation de ces sites empêche l'hyperphosphorylation de RAF-1 induit par les mitogènes. De manière intéressante, ce mutant reste actif plus longtemps que RAF-1

de type sauvage, indiquant que cette phosphorylation fait partie d'une boucle de rétroaction négative. Les auteurs montrent finalement que PIN1, une proline isomérase et PP2A sont impliquées dans la déphosphorylation de RAF-1 sur les sites ERK, permettant une réactivation.

Certaines données génétiques et biochimiques indiquent que RAF possède d'autres effecteurs que MEK1/2. Ainsi, les souris déficientes en *Raf-1* meurent vers le milieu de la gestation d'anomalies cérébrales, vasculaires et hépatiques (302). Ces malformations sont dues en partie à une mort cellulaire excessive. Comment RAF régule la survie cellulaire? Les souris *Raf-1* KO ne présente pas une hypoactivation de ERK1/2 ou de NF- κ B, deux voies anti-apoptotiques. Le groupe de Hanan Fu a plutôt découvert que RAF-1 interagit directement avec ASK1, une MAPKKK des voies JNK et p38 aux propriétés pro-apoptotiques (120). RAF-1 est en fait un inhibiteur de l'activité de ASK1, favorisant la survie cellulaire. De manière surprenante, l'action de RAF-1 sur ASK1 se fait indépendamment de son activité kinase! Plus récemment, le groupe de W Kolch a montré que RAF-1 interagit et inhibe MST2, une autre kinase pro-apoptotique (527). Encore ici, un mutant inactif de RAF est aussi efficace pour inhiber MST2 que la protéine de type sauvage. Ces exemples montrent clairement que les protéines kinases peuvent avoir des fonctions indépendamment de leur activité kinase.

Finalement, RAF étant un proto-oncogène, elle est une cible thérapeutique de choix. Des inhibiteurs pharmacologiques de RAF ont été développés ces dernières années. Mentionnons le composé BAY-43-9006 qui possède une activité anti-tumorale contre les carcinomes rénaux (237). Ce composé inhibe toutefois certains récepteurs tyrosine kinases (677).

c-MOS est un proto-oncogène de 39 kDa capable d'activer la voie ERK1/2 (voir revue (731)). v-MOS fut initialement trouvé chez le rétrovirus MMLV (Moloney murine leukemia virus) (551). Physiologiquement, c-MOS est importante pour la maturation des oocytes. Son activité est régulée par son expression et sa stabilité protéique. Ainsi, c-MOS est induite par la progestérone alors que sa demi-vie est régulée par phosphorylation (voir revue (731)).

D'autres MAPKKK pourraient être impliquées dans l'activation de ERK1/2. Ainsi, la surexpression de MEKK1 (MEK kinase-1) et TPL-2/COT induit l'activation de la voie ERK1/2 (130, 195). D'un autre côté, les cellules souches embryonnaires *Mekkl1* KO ont un défaut d'activation de ERK1/2 en réponse à différents stimuli (827). Cependant, ces résultats n'ont pas été reproduits par le groupe de M Karin (800). L'implication de ces deux MAPKKK dans l'activation de la voie ERK1/2 reste à clarifier.

1.1.5.1.5.2. MAPKK: MEK1/2

Après le clonage de ERK1 et ERK2, plusieurs laboratoires décidèrent d'identifier leurs activateurs par une approche biochimique. On se rendit compte qu'il existait une activité capable de réactiver ERK1/2 préalablement inactivées par un traitement aux phosphatases. Cet activateur devient actif à la suite d'un traitement aux facteurs de croissance et aux esters de phorbol (PMA) (10, 615). Cet activateur est également actif durant la maturation des oocytes du xénope (380). Bien qu'il fût initialement envisagé que cet activateur puisse agir en stimulant l'autophosphorylation des MAPK (10), la séquence partielle de cette protéine montra une forte homologie avec le domaine kinase (380). Les évidences chromatographiques révélaient également que l'activité kinase phosphorylant la tyrosine et la thréonine co-purifie, suggérant qu'une seule protéine exécute ces deux phosphorylations (239). Ce fut finalement les groupes de R Erikson et E Krebs qui clonèrent MEK1 (la Mapk ou Erk Kinase 1) en 1992 (151, 646). Cette même année, MEK2 fut clonée par homologie de séquence avec MEK1 (796).

Comme les MAPK, MEK1/2 sont constituées d'un domaine kinase avec de petites extensions en N- et C- terminal (Figure 9A). L'activité des MEK1/2, et des MAPKK en général, est dépendante de leur phosphorylation sur deux sérines et/ou thréonine présentes dans la boucle d'activation. La substitution de ces deux sites par des acides aminés phosphomimétiques (D ou E) rend MEK1/2 constitutivement actives (463). Ce mutant est souvent utilisé pour induire l'activation de la voie ERK1/2.

L'extension N-terminale de MEK1/2 contient deux motifs importants (Figure 9A). Premièrement, MEK1/2 possèdent un motif nommé domaine D permettant l'association avec leur substrat, ERK1/2. Le domaine D est un site d'arrimage également présent chez

d'autres interacteurs des MAPK (voir section 1.1.10.). De manière intéressante, le domaine D de MEK1/2 est la cible du facteur létal (LF) (40). Cette toxine est une métalloprotéase qui clive le domaine D de toutes les MAPKK. Il s'en suit une absence d'activation des voies MAPK chez les cellules infectées par *Bacillus anthracis*, l'agent causant la maladie du charbon (32). Le N-terminal de MEK1/2 possède également un signal d'export nucléaire (NES) riche en résidus leucine (211). Ce motif est important pour la localisation cytoplasmique de MEK1/2 et par le fait même de ERK1/2 (voir section 1.1.8.).

A



B

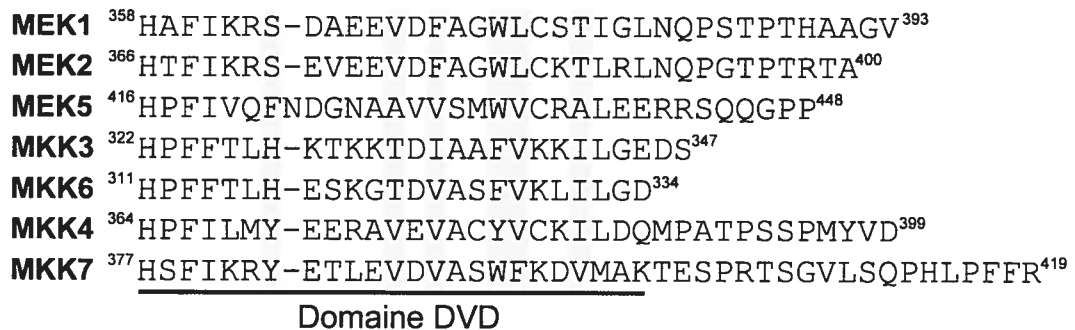


Figure 9: Structure de la MAPKK MEK1. (A) MEK1 est constituée d'un domaine kinase flanqué de petites extensions en N- et C-terminal. Un domaine D impliqué dans l'association avec ERK1/2 et une séquence d'export nucléaire (NES) sont présents en N-terminal. Le domaine DVD est présent en C-terminal. Ce motif permet l'interaction des MAPKK avec les MAPKKK. (B) Alignement des domaines DVD présents chez les MAPKK chez l'homme. Les acides aminés dont la mutation entraîne l'inactivation du domaine DVD chez MKK6 sont soulignés ombragés. Adaptée de (697).

Très récemment, le groupe de Haruo Saito a identifié un second site d'arrimage présent chez les MAPKK (697). Ce site, nommé domaine DVD (pour Domain for Versatile Docking) est situé dans la courte extension C-terminale des MAPKK et permet leur interaction le lobe N-terminal des MAPKKK (Figure 9B). De plus, ce motif est responsable d'une certaine spécificité des MEK envers leurs activateurs.

MEK1/2 sont hautement spécifiques pour leur substrat. Ces kinases ne phosphorylent que ERK1/2 et aucune autre MAPK ou tout autre substrat protéique (645). De plus, il a été montré qu'un peptide correspondant à la boucle d'activation de ERK1/2 ne peut être phosphorylé par MEK1/2, révélant que ces dernières reconnaissent la structure tridimensionnelle de leurs substrats (645).

Plusieurs inhibiteurs ont été développés contre ces enzymes et ils possèdent d'intéressantes propriétés anti-tumorales (671). Ces inhibiteurs agissent de manière non-compétitive face à l'ATP. Les inhibiteurs de kinases classiques interagissent avec le site de liaison de l'ATP et sont donc dits compétitifs. La structure de MEK1 complexée avec l'ATP et son inhibiteur PD-184352 permet de comprendre le mécanisme d'action de ce dernier (533). Ainsi, le PD-184352 s'insère dans une poche distincte de celle de l'ATP. On pense que l'inhibiteur stabilise ainsi une conformation inactive de MEK1. Le site de liaison du PD-184352 est absent chez toutes les autres kinases, à l'exception de MEK2 et MEK5, expliquant la grande spécificité des inhibiteurs de MEK1/2. Par alignement de séquence, MEK5 aurait partiellement cette poche de liaison, expliquant pourquoi cette MAPKK est partiellement sensible aux inhibiteurs de MEK1/2.

1.1.5.1.6. Fonctions de la voie ERK1/2

1.1.5.1.6.1. Prolifération cellulaire

ERK1/2 sont fortement activées par les mitogènes, suggérant qu'elles sont impliquées dans la division cellulaire. L'inhibition de cette voie par des mutants dominants négatifs et des inhibiteurs pharmacologiques a confirmé le rôle essentiel de ERK1/2 dans la sortie de la quiescence et l'entrée dans le cycle cellulaire (548, 671). Plus récemment, des expériences utilisant des siRNA dirigés contre MEK1/2 confirmèrent cette conclusion (737). L'activation de ERK1/2 doit être soutenue pour induire la prolifération (577). Moléculairement, ERK1/2 favorise la prolifération de plusieurs manières. Tout d'abord, ERK1/2 phosphorylent et activent la MAPKAPK (MAPK-Activated-Protein-Kinase) RSK1 (520). Cette dernière a un rôle positif sur le cycle cellulaire en phosphorylant le proto-oncogène c-FOS. c-FOS s'associe avec un autre proto-oncogène, c-JUN, formant ainsi le facteur de transcription AP1 (Activating Protein-1) aux propriétés pro-proliférative (revue (654)). La phosphorylation du proto-oncogène c-FOS augmente son activité transcriptionnelle et induit sa stabilisation protéique (535). La cycline D1 est un gène cible du facteur AP1.

ERK1/2 favorise la prolifération également en phosphorylant les facteurs de transcription de la famille TCF/ELK1 (312). Ces facteurs de transcriptions de la famille ETS sont impliqués dans l'induction des gènes précoces induits par les mitogènes (voir revue (822)). La cycline D1 et c-FOS sont des cibles de ELK1. Finalement, ERK1/2 stimulent la synthèse de l'ADN (ou phase S) par la phosphorylation directe et l'activation de la carbamoyle phosphate synthétase II, l'enzyme catalysant l'étape limitante dans la biosynthèse des nucléotides pyrimidiniques (242).

1.1.5.1.6.2. Différenciation cellulaire

Paradoxalement, ERK1/2 sont également des joueurs importants de la différenciation cellulaire. Il a été montré que ERK1/2 sont essentielles et suffisantes pour la différenciation des cellules PC12 et K562 en neurones et en mégacaryocytes respectivement (150, 587). Comment les mêmes enzymes peuvent stimuler dans un cas la différenciation cellulaire, c'est-à-dire l'arrêt de la prolifération, et la division cellulaire dans l'autre ? On pense qu'une partie de la réponse vient de la différence dans l'intensité et la durée de l'activation de ERK1/2. Par exemple, les PC12 prolifèrent lorsqu'elles sont stimulées par le EGF mais se différencient en réponse au NGF. Le premier induit une activation transitoire de ERK1/2 alors que le second génère une activation soutenue. En accord avec l'hypothèse qu'une activation soutenue cause la différenciation, la surexpression du EGFR chez les PC12 rend celles-ci susceptibles de se différencier par le EGF uniquement (173).

Récemment, les données génétiques sont venues confirmer le rôle de ERK1 dans la différenciation cellulaire. En effet, le groupe de B Binetruy (en collaboration avec J Pouyssegur) a montré que les souris *Erk1* KO sont résistantes à l'obésité induite par une diète riche en graisse (79). Ces souris sont plus maigres et ne développent pas de résistance à l'insuline, comme les souris normales le font face à cette diète. Ce phénotype proviendrait d'un défaut au niveau de l'adipocytogenèse. Ainsi, les préadypocytes *Erk1* KO se différencient mal en culture, indiquant que la voie ERK1/2 est requise pour cette différenciation cellulaire. D'un autre côté, la maturation des cellules T est également perturbée chez les souris *Erk1* KO (547).

1.1.5.1.6.3. Contrôle de la traduction

Les mitogènes induisent une augmentation du taux général de traduction. Les inhibiteurs de MEK1/2 empêchent cette induction. L'activation de la voie ERK1/2 est accompagnée d'une phosphorylation du facteur d'initiation des eucaryotes 4E (eIF-4E) sur la S209 (766). Cette forme de eIF-4E favorise l'association des ribosomes avec les autres facteurs d'initiation et les ARNm (672), augmentant ainsi la traduction. ERK1/2 ne phosphorylent pas directement eIF-4E. Cette phosphorylation est plutôt médiée par MNK1/2, deux kinases activées par les MAPK (MAPKAPK) ERK1/2 et p38 (620). Les MAPK ERK1/2 stimulent également l'activité de mTOR, un régulateur important de la traduction (452).

1.1.5.1.6.4. Survie cellulaire

L'activation de RSK1 par ERK1/2 a également un rôle positif dans la survie cellulaire (38). Tout d'abord, RSK1 phosphoryle BAD sur la S212 (75). BAD est une protéine proapoptotique jouant sur la voie intrinsèque de l'apoptose, voie caractérisée par une libération du cytochrome c par les mitochondries (pour revue, voir (728)). BAD sous forme phosphorylée interagit avec les protéines 14-3-3, ce qui l'inactive fonctionnellement (700). RSK1/2 phosphorylent également le facteur de transcription CREB, augmentant ainsi son activité transcriptionnelle (802). BCL-2, BCL-XL et le BDNF (brain-derived neurotrophic factor) sont des cibles anti-apoptotiques de CREB (759). Les deux premiers inhibent l'apoptose dépendant de la voie mitochondriale alors que le BDNF est une neurotrophine sécrétée favorisant la survie des neurones. Finalement, la protéine proapoptotique BIM est une cible de la voie ERK1/2 dans les neurones (64). La phosphorylation de BIM par ERK1/2 entraîne sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome (voir section 1.2), favorisant ainsi la survie neuronale (428, 429).

1.1.5.1.6.5. Rôle de ERK1 dans les fonctions cognitives

Les souris KO de ERK1 ont été générées en 1999 par l'équipe de J Pouyssegur. Les souris *Erk1*^{-/-} ne présentent pas de phénotype majeur (547). En fait, les souris sont viables et fertiles. Les MEF issus de souris *Erk1* KO prolifèrent normalement en culture. Il semble donc que ERK2 soit capable de remplir les fonctions essentielles de la voie ERK1/2. Un

examen plus approfondi a néanmoins montré que les souris *Erk1* KO présentent des problèmes neurologiques. Ces souris sont hyperactives et ont une mémorisation à long terme plus efficace (477). Ceci pourrait être du à la suractivation de ERK2 consécutive de l'absence de ERK1. Ces observations suggèrent que ERK1 aurait le rôle de diminuer l'activation de ERK2 dans les cellules neuronales (477).

1.1.5.1.6.6. Rôle de ERK2 dans le développement du trophoctoderme

Le KO de ERK2 a été généré indépendamment par trois équipes (268, 625, 817). Toutes les études ont démontré que ERK2 est essentielle pour le développement précoce du tissu extraembryonnaire. Cette structure est essentielle pour l'implantation et donne naissance au placenta notamment. Les embryons *Erk2* KO meurent donc peu de temps après l'implantation, soit vers le jour 6.5 embryonnaire. Des expériences de sauvetage de l'embryon par agrégation de tétraploïdes indiquent que ERK2 agit directement au niveau du placenta pour son développement (625). L'inactivation de *Mek1* entraîne également une mort embryonnaire causée par un défaut placentaire (231). Cependant, la mort arrive plus tard, vers le jour 10,5 embryonnaire. Cette mort plus tardive pourrait être due à la compensation par MEK2 (dont le KO n'a pas de phénotype (53)). L'analyse des doubles KO *Mek1/2* sera intéressante.

Il semble donc que, contrairement à ERK2, la seule présence de ERK1 ne soit pas suffisante pour effectuer les fonctions vitales de la voie ERK1/2. Donc, de ce point de vue, la redondance entre ERK1 et ERK2 est partielle. Ce phénomène peut avoir au moins deux explications possibles. Il se peut, malgré la grande homologie de séquence entre ERK1 et ERK2, que ces deux enzymes possèdent des caractéristiques biochimiques différentes. Il se peut également que la différence de phénotypes entre les souris *Erk1* et *Erk2* KO soit du à des différences d'expression. Des expériences de type "Knock-In" (KI), où l'on remplace la séquence codant ERK2 par celle de ERK1, et vice-versa, nous révéleraient laquelle des possibilités se rapproche le plus de la réalité. Par exemple, la viabilité d'une souris ERK1 KI dans ERK2 homozygote indiquerait que les enzymes ERK1 et ERK2 ont les mêmes propriétés biochimiques et que la différence phénotypique des souris KO s'explique par un patron d'expression différent entre ces deux homologues.

1.1.5.1.6.7. Transformation et sénescence

Des mutations oncogéniques sont trouvées chez RAS et RAF dans de nombreux cancers humains. Par exemple, RAS est mutée chez 30 % de tous les cancers alors que B-RAF est mutée dans près de 60 % des mélanomes (155). La conséquence de ces mutations est une activation constitutive de la voie ERK1/2 (12). Est-ce une cause ou une conséquence de la transformation ? La suractivation de ERK1/2 est suffisante pour induire la transformation de nombreuses lignées cellulaires, indiquant que cette voie est impliquée dans le cancer (150). Les inhibiteurs pharmacologiques de MEK1/2 ont permis de montrer que certains cancers sont dépendants de la voie ERK1/2 pour leur prolifération/survie (12).

Les lignées susceptibles d'être transformées par une suractivation de la voie ERK1/2 ne sont pas normales: elles sont immortelles. Ainsi, contrairement aux cellules primaires, les cellules immortalisées poussent indéfiniment en culture, indiquant qu'elles ont perdu certains mécanismes de contrôle. De manière intéressante, la suractivation de la voie ERK1/2 dans des cellules normales ne les transforme pas. Au contraire, ces cellules arrêtent de proliférer et adoptent un état semblable à la sénescence (650). La sénescence est un état métabolique caractéristique des cellules primaires ayant atteint leur capacité proliférative (voir revue (794)). Ces cellules sont morphologiquement étendues, ont de courts télomères et de haut niveau de p53 et p16^{INK4A}, deux gènes suppresseurs de tumeurs (650). Il semble donc que la sénescence induite par l'hyperactivation de la voie ERK1/2 soit un mécanisme anti-tumoral. En accord avec cette idée, le groupe de DS Peepers a récemment montré que les lentigos (grains de beauté) sont des amas de mélanocytes sénescents (489). Rappelons que les lentigos sont fréquemment associées à des mutations activatrices de B-RAF.

1.1.5.2. La voie JNK

La voie JNK est importante pour la régulation du facteur AP-1, un facteur de transcription important pour la prolifération. On estime que les JNK sont également impliquées dans l'inflammation, la tumorigénèse, le diabète et les maladies neurodégénératives (voir revue (401, 554)).

1.1.5.2.1. Identification

En 1990, le groupe de Joseph Avruch a identifié et purifié une nouvelle MAP-2 kinase, pp54, isolée à partir d'homogénat de foie de rat traité à la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique (402). Les propriétés biochimiques de cette MAP-2 kinase diffèrent de celles de ERK1/2. Notamment, ERK1/2 et pp54 n'ont pas la même spécificité de substrat *in vitro* (402). Néanmoins, pp54 est inactivée par les sérine/thréonine-phosphatases et tyrosine-phosphatases, suggérant que celle-ci ressemble aux MAPK. En 1994, le groupe de JR Woodgett, en collaboration avec J Avruch, a cloné moléculairement pp54 (403). pp54 ressemble à ERK1/2, confirmant qu'elle fait partie des MAPK. pp54 fut nommée SAPK (pour Stress Activated Protein Kinase) car elle est activée plus fortement par les stress cellulaires que par les mitogènes.

Le proto-oncogène c-JUN est un régulateur important de la prolifération. Ce facteur de transcription est régulé par phosphorylation. En 1991, le groupe de JR Woodgett montre que les deux sites majeurs de phosphorylation de c-JUN *in vivo* (S63 et S73) peuvent être phosphorylés par pp54 *in vitro* (582). La mutation de ces sérines diminue l'activité transcriptionnelle de c-JUN, indiquant que cette phosphorylation a un rôle positif sur l'activité de c-JUN. Une année plus tard, le groupe d'AS Kraft a fait l'importante observation que la kinase des S63/73 peut former un complexe stable avec c-JUN (8). Plus particulièrement, cette kinase interagit avec un motif N-terminal de c-JUN nommé domaine δ . La mutation de ce domaine détruit l'association de c-JUN avec sa kinase. En utilisant une approche de type "pull-down", les groupes de M Karin et RJ Davis ont purifié et cloné JNK1, la c-JUN N-terminal Kinase, en 1993-94 (164). JNK1 et pp54SAPK sont identiques.

Par homologie de séquences, deux autres gènes furent identifiés: JNK2 et JNK3 (248).

1.1.5.2.2. Structure

Les JNK sont des MAPK classiques. Ces enzymes ont ainsi un domaine kinase muni de courtes extensions en N- et C- terminal. JNK3 possède une extension N-terminale légèrement plus longue que les autres JNK. Ces MAPK sont caractérisées par le motif TPY présent dans leur boucle d'activation (Figure 5). JNK1 et 3 sont plus apparentées entre

elles qu'avec JNK2, suggérant qu'elles forment une sous-famille distincte de cette dernière. La structure tridimensionnelle de JNK3 complexée avec un analogue d'ATP montre que JNK ressemble aux autres protéines kinases (801). Les analyses structurales ont également été employées pour faciliter l'élaboration d'inhibiteurs spécifiques de JNK. Ces inhibiteurs sont des agents anti-inflammatoires à l'étude (voir section 1.1.5.2.6.5.).

1.1.5.2.3. Expression

JNK1/2 sont des enzymes ubiquitaires. À l'opposé, l'expression de JNK3 est restreinte au cerveau, et dans une moindre mesure au cœur et au testicule. De manière intéressante, il existe au moins 10 isoformes de JNK issus de l'épissage alternatif des trois gènes codant les JNK (461). Ces isoformes diffèrent de par la longueur de leur extension en C-terminal et par la présence ou non d'un insert entre les sous-domaines IX et X du domaine kinase. Ces différences influencent leur liaison aux substrats (248).

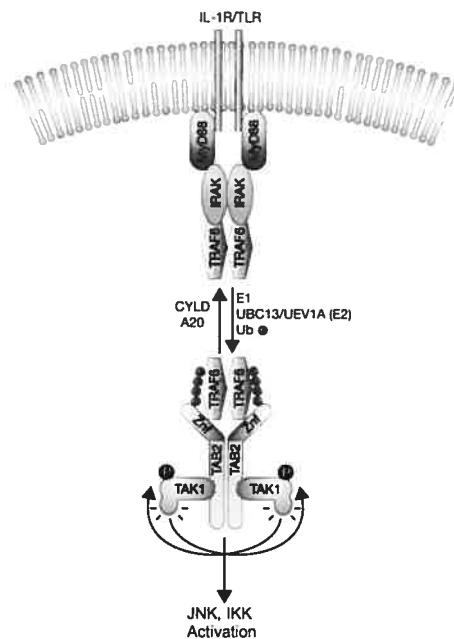


Figure 10: Activation de la voie JNK par le récepteur de l'IL-1. La stimulation du récepteur IL-1R entraîne l'activation et l'autoubiquitination de la ligase TRAF6. La chaîne d'ubiquitines polymérisées via la lysine 63 est reconnue par TAB1-3. TAB s'associe avec la MAPKKK TAK1 et l'active par oligomérisation. TAK1 est responsable de l'activation des voies JNK et NF- κ B. Adaptée de (127).

1.1.5.2.4. Régulation de l'activité des JNK

La découverte de c-Jun comme substrat physiologique majeur de JNK1-3 a permis de mettre au point un essai enzymatique robuste. Grâce à cet essai, la régulation de l'activité des JNK1-3 a pu être étudiée en détail. Comme ERK1/2, JNK nécessite sa double phosphorylation sur le motif TPY pour sa pleine activation. De manière surprenante, un mutant TPF possède environ 30 % de l'activité de JNK1 doublement phosphorylée (724). À l'opposé, le mutant APY n'a aucune activité. La phosphorylation de la thréonine du motif TPY semble donc suffisante pour activer partiellement JNK1.

JNK1-3 sont activées fortement par les stress cellulaires (782). Ainsi, les inhibiteurs de la synthèse protéique (cycloheximide, anisomycine), les stress osmotiques et oxydatifs de même que les irradiations UV sont de puissants activateurs des JNK. Les cytokines tels TNF α et IL-1 et les ligands de la famille WNT augmentent l'activité de JNK. Les mitogènes et Ras induisent aussi l'activation des JNK, mais à un moindre degré. Le mécanisme d'activation de JNK par les stress est peu caractérisé. Par contre, l'activation des JNK par certains agonistes est mieux comprise. Par exemple, les ubiquitines ligases TRAF2/6, les protéines de liaison à l'ubiquitine TAB1-3 et la MAPKKK TAK1 sont nécessaires pour l'activation des JNK par le TNF α et l'IL-1 (694) (Figure 10). L'activation de JNK par les WNT requiert plutôt les protéines Dishevelled, PAR-1 et Naked (776). Dans ces voies, la MAPKKK MEKK1 semble être requise pour l'activation des JNK.

Il existe des inhibiteurs de l'activité enzymatique des JNK. Le SP-600125 (ou compound 1) est un des inhibiteurs les plus caractérisés (461). Il inhibe les trois isoformes de JNK avec une efficacité semblable (le K_i est d'environ 100-150 nM *in vitro*). Le SP-600125 n'affecte pas les autres MAPK. Cet inhibiteur agit de manière compétitive face à l'ATP. Les inhibiteurs de JNK ont des propriétés anti-inflammatoires (voir section 1.1.5.2.6.5.).

L'activation des JNK est influencée par de nombreuses protéines d'échafaudage comme les JIP (Jnk Interacting Proteins, voir section 1.1.9.2.2.1.). Comme ERK1/2, l'inactivation des JNK est exécutée par diverses protéine-phosphatases (voir section 1.1.7.).

1.1.5.2.5. Membres de la voie JNK

1.1.5.2.5.1. MAPKKK: MEKK1-4, TPL-2, DLK, MLK1-3/7, MLTK, LZK, TAK1 et ASK1/2

La voie JNK est contrôlée par un grand nombre de MAPKKK. Ainsi, en surexpression, MEKK1-4 (MEK Kinase 1-4), TPL-2 (Tumor progression locus 2), DLK (Dual Leucine zipper-bearing Kinase), MLK1-3/7 (Mixed Lineage Kinase 1-3/7), MLTK (MLK-like MAP Triple Kinase), LZK (Leucine Zipper bearing Kinase), TAK1 (TGF- β Activated Kinase-1) et ASK1/2 (Apoptosis Signal regulated Kinase-1/2) induisent l'activation de la voie JNK (voir revue (194)). Certaines kinases, notamment les MEKK, activent aussi la voie p38. Ces enzymes furent en majorité clonés par homologie avec d'autres kinases ou par complémentation fonctionnelle chez la levure (194, 554). *In vitro*, ces enzymes sont capables de phosphoryler et d'activer MKK4 et/ou MKK7, les MAPKK de la voie JNK.

Les données génétiques ont permis de confirmer le rôle de quelques-unes de ces MAPKKK dans l'activation de la voie JNK. Ainsi, l'inactivation de MEKK1 et de TAK1 perturbe l'activation de JNK en réponse à l'IL-1, au TNF α et au LPS (660, 800). D'autre part, l'activation de JNK par le FGF-2, le LPA et le sérum est diminuée en l'absence de MEKK2 (351). Les données indiquent toutefois que les stress n'utilisent pas ces trois MAPKKK pour l'activation de JNK.

Les mécanismes régulant l'activité de MAPKKK de la voie JNK sont peu caractérisés. MEKK1/4 interagissent avec les petites GTPases CDC42 et RAC et pourraient être des effecteurs (195). Ces deux kinases possèdent également un domaine PH (plekstrin homology), domaine liant les phosphatidyls inositoles phosphorylés. Il se peut ainsi que MEKK1/4 soit des effecteurs de la PI₃K. Certaines MAPKKK, comme les MLK, s'homodimérisent, possiblement via leur leucine zipper, ce qui favorise leur autophosphorylation et autoactivation (194). L'activité des MAPKKK peut être régulée par une protéine de liaison. Ainsi, TAB1-3 interagit avec le C-terminal de TAK1, favorisant son activation (628).

1.1.5.2.5.2. MAPKK: MKK4/7

Les MAPKK de la voie JNK ont été clonées par homologie de séquences avec les MAPKK de la voie ERK1/2 (290, 629). MKK4/7 ont des caractéristiques biochimiques intéressantes. *In vitro*, MKK4 phosphoryle préférentiellement la tyrosine alors que MKK7 préfère la thréonine du motif TPY (412). Les stimuli de la voie JNK n'activent pas MKK4/7 de manière identique. Les cytokines TNF α et l'IL-1 activent uniquement MKK7 alors que les stress activent les deux MAPKK (voir revue (401)). Ainsi, l'activation de JNK par le TNF α et l'IL-1 est beaucoup plus affectée par l'absence de MKK7 que par MKK4 (724). Les données génétiques indiquent toutefois que les deux MAPKK participent à l'activation de JNK par les stress physiques et chimiques. En l'absence de MKK4/7, les JNK ne sont plus activées, indiquant que ces deux MAPKK sont les activateurs majeurs de cette voie MAPK *in vivo* (724).

In vitro, p38 est un substrat de MKK4 (165). Cependant, l'activation de p38 est normale chez les fibroblastes *Mkk4* KO, suggérant que cette MAPKK ne joue pas un rôle essentiel dans l'activation de p38 *in vivo* (86).

1.1.5.2.6. Fonctions de la voie JNK

1.1.5.2.6.1. Contrôle de l'apoptose

Les données génétiques montrent clairement que les JNK ont un rôle dans l'induction de certains types d'apoptose. Ainsi, les MEF *Jnk1/2* KO sont complètement résistants face à l'apoptose induite par les rayons UV ou l'agent alkylant MMS (méthyl-méthanesulfonate) mais sont sensibles aux autres agents pro-apoptotiques tels le ligand FAS (725). Les cellules déficientes en *Mkk4/7* se comportent de manières identiques (724). JNK3 est quant à lui un important médiateur de l'apoptose neuronale. En effet, les neurones issus de souris *Jnk3* KO sont résistants à l'apoptose induit par le retrait des facteurs de croissance en culture (391). Ces neurones sont également résistants à l'apoptose induite par le peptide β -amyloïde, un peptide neurotoxique s'accumulant dans le cerveau des personnes atteints de

la maladie d'Alzheimer. Les souris *Jnk3*^{-/-} sont moins susceptibles aux crises d'épilepsie induites par l'acide kainique, un agoniste puissant des récepteurs du glutamate (812). Ces souris présentent également moins de mort cellulaire induite par l'acide kainique au niveau de l'hippocampe. Pour ces raisons, on pense que des inhibiteurs pharmacologiques des JNK pourraient être utilisés dans le traitement de certaines maladies neurodégénératives.

Comment JNK contrôle l'apoptose ? On estime que l'activation du facteur c-JUN par JNK joue un rôle important dans l'induction de l'apoptose. En effet, les cellules exprimant un mutant de c-JUN ne possédant plus les deux sites de phosphorylation de JNK (S63/73AA, généré par une approche de type "Knock-In") sont résistantes à l'apoptose induite par les rayons UV, comme les cellules *Jnk1/2* KO (50). D'un autre côté, les données biochimiques indiquent que l'apoptose dépendante de JNK est causée par la voie intrinsèque. Cette voie est caractérisée par une perméabilité de la membrane externe des mitochondries, entraînant la libération dans le cytoplasme de facteurs pro-apoptotiques, notamment le cytochrome c. Les protéines de la famille BCL-2 ont un rôle protecteur de la membrane des mitochondries, et par le fait même sur l'apoptose. Les données génétiques indiquent que JNK nécessite les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK pour son effet sur la mitochondrie (423). Ces dernières sont des cibles de la famille anti-apoptotique BCL-2.

1.1.5.2.6.2. Développement embryonnaire

L'inactivation d'un seul des trois gènes des JNK n'affecte pas significativement le développement *in utero*. Cependant, la délétion de *Jnk1/2* entraîne la mort à la mi-gestation d'un défaut de fermeture du tube neural (392). Ainsi, JNK1 et 2 ont des fonctions redondantes durant le développement. À l'opposé, les souris *Mkk4* ou *Mkk7* KO meurent aux jours E10.5-E12.5 d'un défaut de prolifération et d'une apoptose massive au niveau du foie (177, 811). Les MAPKK sont donc non redondantes durant le développement surtout pour leur fonction hépatique. La différence entre les souris *Mkk4* KO ou *Mkk7* KO et *Jnk1/2* KO implique que, soit ces MAPKK ont d'autres substrats *in vivo*, ou bien que JNK3 exécute les fonctions hépatiques en l'absence des autres JNK.

1.1.5.2.6.3. Prolifération et cancer

Le substrat majeur de la voie JNK, c-JUN, est essentiel pour une transition G1/S efficace. Ainsi, les fibroblastes *c-jun* KO prolifèrent plus lentement en culture (327). De manière similaire, les fibroblastes déficients en JNK1/2 prolifèrent lentement et montrent un défaut d'accumulation de cycline D1, une cible de AP-1 (626). Cette faible activité de AP-1 est associée à une très faible expression de c-JUN.

JNK1 et 2 n'ont pas une activité redondante sur la prolifération. En effet, les cellules *Jnk1* KO prolifèrent moins bien que les cellules normales alors que l'inactivation de JNK2 au contraire favorise la prolifération (626)! Comment expliquer ces observations ? Les données du groupe de EF Wagner suggèrent que l'association de c-JUN avec JNK2 entraîne sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome. Ainsi, l'absence de JNK2 entraîne une stabilisation et une accumulation de c-JUN. À l'opposé, JNK1 serait responsable de la phosphorylation et de la stabilisation de AP1. En son absence, c-JUN est faiblement exprimé et phosphorylé, ce qui diminue l'induction de cycline D1. On ignore quelle E3 ubiquitine ligase est responsable de dégrader c-JUN associé à JNK2. On ignore également pourquoi des différences si importantes entre JNK1 et JNK2 sur la prolifération des cellules en culture n'ont pas de répercussions majeures *in vivo* chez la souris!

c-JUN est également essentiel pour la transformation induite par RAS. En effet, les fibroblastes issus de souris *c-Jun* KO sont complètement réfractaires à la transformation induite par une forme oncogénique de RAS (326). Encore plus intéressant, l'expression du mutant S63/73AA de c-JUN ne permet pas la transformation également, suggérant fortement que l'activité JNK est essentielle pour ce processus (49). D'un autre côté, la voie JNK est hyperactive dans de nombreuses lignées cancéreuses (voir (305)). Ces observations permettent de penser que JNK est indispensable pour la transformation par RAS oncogénique. De manière surprenante, le groupe de RJ Davis a montré que les fibroblastes *Jnk1/2* KO peuvent être transformés par RAS (626)! Ces cellules cancéreuses *Jnk1/2* KO se divisent légèrement moins vite que les cellules possédant une voie JNK, montrant que cette voie a un certain effet positif sur la transformation par RAS. Le plus surprenant est que les cellules *Jnk1/2* KO transformées forment des tumeurs en plus grand nombre et plus volumineuses que les cellules de type sauvage lorsque implantées dans des souris

athymiques nues. Cette plus grande tumorigénicité des cellules *Jnk1/2* KO provient d'un défaut d'apoptose. En effet, l'expression d'une forme oncogénique de RAS induit une certaine mort cellulaire qui semble être principalement dépendante de la voie JNK. Ainsi, la voie JNK se comporte comme une voie de signalisation "suppresseur de tumeurs". En accord avec cette idée, des mutations inactivatrices chez *Mkk4* ont été trouvées chez certains cancers de la prostate et de l'ovaire (823).

1.1.5.2.6.4. Rôle dans le diabète de type II

Le diabète de type II est caractérisé par une insensibilité à l'insuline et est souvent associé à l'obésité. Durant le développement de la maladie, les adipocytes sécrètent le $\text{TNF}\alpha$, activant la voie JNK. Ainsi, la voie JNK est hyperactive dans deux modèles murins différents de diabètes de type II (voir revue (461)). On estime que la voie JNK contribue à cette maladie car les souris déficientes en *Jnk1* sont partiellement résistantes au diabète induit par une diète riche en graisse (285). Il est possible que l'action promotrice du diabète de JNK1 se fasse au niveau de IRS1 (Insuline Receptor Substrate-1), un substrat et effecteur du récepteur de l'insuline (IR). L'absence de JNK1 diminue la phosphorylation de IRS1 sur la S307, un site inhibant l'activité de IRS1 (285).

1.1.5.2.6.5. L'inflammation

La sclérose en plaque, l'asthme ou l'arthrite rhumatoïde sont des maladies causées par une surabondance de molécules inflammatoires. Le $\text{TNF}\alpha$, l'IL-2 ou les MMP (Matrix MetalloProteases) sont des molécules impliquées dans ces maladies. Ces molécules sont des cibles de la voie JNK via les substrats et facteurs de transcription c-JUN et ATF2 (voir revue (461)). JNK affecte également l'IL-2 en favorisant la stabilité de son ARNm (113). Les JNK sont ainsi des cibles thérapeutiques intéressantes pour le développement de nouveaux médicaments anti-inflammatoires. Dans cette optique, il fut observé que les souris *Jnk2* KO sont partiellement protégées de l'arthrite induite par le collagène (254). Plusieurs compagnies pharmaceutiques ont développé des inhibiteurs de JNK. Celgene a notamment développé l'inhibiteur SP-600125 (ou Compound 1) actif contre les trois formes de JNK (59). Cet agent inhibe la production de $\text{TNF}\alpha$ et de IL-2 par les monocytes et les

cellules Jurkat en culture. Le SP-600125 s'est montré efficace dans un modèle d'arthrite (253). Les inhibiteurs de JNK pourraient être utilisés également pour le traitement de maladies neurodégénératives.

1.1.5.3. La voie p38

La voie p38 est conservée de la levure jusqu'à l'homme et joue un rôle important dans la réponse aux stress osmotiques. De plus, cette voie est impliquée dans la différenciation cellulaire. Son implication dans l'inflammation en a fait une voie de signalisation très étudiée (voir revue (401, 554)).

1.1.5.3.1. Identification

La voie p38 a été identifiée par trois groupes indépendamment. En août 1994, le groupe de RJ Ulevitch a publié une étude identifiant une nouvelle MAPK activée par le LPS et l'hyperosmolarité. Ces stimuli induisent la phosphorylation en tyrosine d'une protéine d'environ 40 kDa. Ils ont purifié celle-ci par une colonne d'anticorps anti-phospho-tyrosine et l'ont cloné. Cette protéine était très homologue aux MAPK, spécialement à Hog1p, une MAPK de levure également activée par l'hyperosmolarité. La nouvelle MAPK fut simplement nommée p38 (251).

Un mois plus tard, le groupe d'AR Nebreda reporta la purification d'une nouvelle kinase responsable de l'activation de MAPKAPK-2 (MK2). Cette dernière kinase a été initialement identifiée comme substrat de ERK1 *in vitro* (683). Cependant, les stimuli de ERK1/2 n'activent pas MK2 *in vivo*. Plutôt, MK2 est activée par les stress cellulaires (208). Une nouvelle kinase, nommé RK (pour Reactivating Kinase) fut purifiée biochimiquement pour son habileté de réactiver MK2 *in vitro* (618). RK est immunologiquement semblable à la MAPK de levure Hog1p.

Finalement, en décembre 1994, le groupe de PR Young publia une étude remarquable sur une kinase impliquée dans la production de cytokines pro-inflammatoire (416). Les scientifiques de la SmithKline Beecham Pharmaceuticals ont identifié une série de composés imidazoles bicycliques capable d'inhiber la production de TNF α et de IL-1 en réponse aux

endotoxines (comme le LPS). De part leur effet biologique, ces composés furent appelés CSAID (pour Cytokine Suppressive AntiInflammatory Drugs). Des analyses à l'aide d'un radioligand photoactif ont révélé l'existence d'un récepteur cellulaire d'environ 40 kDa. Ce récepteur fut purifié biochimiquement et cloné. La protéine identifiée est homologue à Hog1p. Cette kinase fut nommée CSBP1 (pour CSAID Binding Protein-1). CSBP1 est identique à p38.

Ensuite, trois autres membres de la voie p38 ont été identifiés par homologie de séquence avec la première p38 identifiée, p38 α . Ces homologues sont maintenant connus comme p38 β , p38 γ et p38 δ (235, 317, 413). Étonnamment, p38 γ fut également clonée à l'aide d'une sonde dérivée de ERK3! ERK3 est néanmoins plus homologue à ERK1/2 qu'à p38 γ .

1.1.5.3.2. Structure

Les MAPK p38 forment la dernière et troisième voie dite classique. Ces MAPK sont donc constituées d'un domaine kinase muni de courtes extensions en N- et C-terminal. Toutes les p38 possèdent le motif TGY dans leur boucle d'activation. Ce motif est également présent chez l'homologue de levure de p38, Hog1p. p38 α/β et p38 γ/δ sont plus apparentées entre elles et forment deux sous-familles. Les structures cristallines de p38 α non-phosphorylée et p38 γ phosphorylée sont disponibles (54, 765). Les p38 se replient de manière très semblable aux autres MAPK. La phosphorylation de p38 entraîne des changements conformationnels semblable à ceux observés chez ERK2, suggérant que toutes les MAPK sont régulées par des mécanismes semblables. Les études structurales sur p38 servent au développement de meilleurs inhibiteurs enzymatiques (voir section 1.1.5.3.6.4.).

1.1.5.3.3. Expression

p38 α/β sont exprimées dans tous les tissus. Une plus forte expression est observée dans le cerveau, le cœur, le poumon et le muscle squelettique. À l'opposé, la sous-famille p38 γ/δ possède un patron d'expression plus restreint. Ainsi, p38 γ est fortement exprimée dans le muscle squelettique alors que l'expression de p38 δ est forte dans le rein et le poumon.

p38 α/β possèdent des isoformes plus courtes aux propriétés biochimiques différentes (voir revue (554)).

L'expression protéique de p38 α est sensible à son association avec son substrat, MK2. Ainsi, les cellules déficientes en *Mk2* expriment de très faibles niveaux de p38 α (383). La réintroduction de MK2 dans ces cellules restaure l'expression de la MAPK. De manière surprenante, l'expression d'un mutant catalytiquement inactif de MK2 est parfaitement capable d'induire l'expression de p38 α endogène. Ainsi, MK2 n'a pas à phosphoryler p38 α (ou toutes autres protéines) pour l'affecter. L'expression de p38 α n'est pas restaurée par un mutant de MK2 ne s'associant plus avec elle, suggérant que l'association seule de p38 α avec MK2 est suffisante pour expliquer cet effet. Le groupe de M Gaestel affirme que MK2 stabilise p38 α par son association. Cependant, aucune donnée portant sur des changements de demi-vie n'est publiée! Cette affirmation est prématurée. On ignore ainsi comment MK2 induit l'expression de p38 α .

Réciproquement, p38 α influence l'expression de MK2. En effet, l'expression de MK2 endogène est fortement diminuée chez les cellules *p38 α KO* (684). La restauration de p38 α dans ces cellules s'accompagne d'une augmentation de l'expression de MK2. On ignore si l'effet de p38 α est dépendant de son activité kinase. On ignore également par quel mécanisme l'expression de MK2 est augmentée.

1.1.5.3.4. Régulation de l'activité des p38

Les p38 possèdent une activité kinase démontrée expérimentalement. Certains substrats de ERK1/2 sont reconnus par les p38 *in vitro*. Les p38 nécessitent la double phosphorylation sur leur motif TGY pour leur activité enzymatique. Cette phosphorylation activatrice est médiée *in vivo* par les MAPKK MKK3 et MKK6. La MAPKK de la JNK MKK4 peut également phosphoryler et activer les p38 *in vitro*. Les cellules *Mkk4 KO* ne présente pas de défaut d'activation de p38, suggérant que cette MAPKK ne joue pas un rôle essentiel dans ce processus (811).

En 2002, le groupe de J Han montra que la phosphorylation de p38 α sur le motif TGY peut se faire sans l'aide de MAPKK (223). En effet, l'association de TAB1 (une protéine adaptatrice impliquée dans l'activation de la MAPKKK TAK1) avec p38 α entraîne son autophosphorylation et autoactivation. Malheureusement, cette découverte n'a pas eu beaucoup de suite. De plus, comme la surexpression de TAB1 active TAK1, une MAPKKK de la voie p38, le mécanisme d'activation de p38 α par TAB1 n'est pas clair.

Les signaux activateurs de la voie p38 ressemblent à ceux de la voie JNK; c'est pour cette raison que certains chercheurs qualifient collectivement ces deux voies de SAPK (401). Ainsi, les p38 sont activées par les stress cellulaires (chaleur, hyperosmolarité et agents oxydants) de même que certaines hormones et cytokines (tel le TNF α et l'IL-1). Des signaux pathogéniques comme le LPS, le protéoglycan de staphylocoques et le virus simplex de l'herpès sont des stimuli de p38 via l'activation des récepteurs de la famille TLR (toll-like receptors). Les petites protéines G CDC42 et RAC peuvent également activer la voie p38. Par exemple, le groupe de GL Johnson impliqua RAC en plus de la MAPKKK MEKK3, la MAPKK MKK3 et la protéine d'échafaudage OSM dans l'activation de p38 par l'hyperosmolarité (734).

La sensibilité des p38 aux CSAID a permis leur identification. Ces composés sont des inhibiteurs de l'activité phosphotransférase des p38 en compétitionnant l'ATP. Ces molécules, comme le SB202190, agissent sélectivement sur p38 α/β et non sur p38 γ/δ . Les données structurales des complexes p38 α /CSAID indiquent que la thréonine 106 de p38 α est un déterminant important de la spécificité du SB202190 (764). En effet, p38 γ/δ possèdent une méthionine à la place de la thréonine 106 de p38 α . La chaîne latérale volumineuse de cette méthionine empêche l'association avec l'inhibiteur. La mutation de cette méthionine rend p38 γ/δ sensible au SB202190.

Comme les autres MAPK, les p38 sont inactivées par déphosphorylation (voir section 1.1.7.). De plus, ces MAPK interagissent avec leurs activateurs, régulateurs négatifs et substrats via des domaines d'arrimages (voir section 1.1.10.).

1.1.5.3.5. Membres de la voie p38

1.1.5.3.5.1. MAPKKK: MEKK1-4, TAK1, TAO1/2 et ASK1/2

Comme la voie JNK, la voie p38 est contrôlée par de nombreuses MAPKKK. Ainsi, les expériences de surexpression suggèrent que les MAPKKK de la voie JNK MEKK1-4, TAK1 et ASK1/2 agissent également comme activateurs de la voie p38. L'activation des p38 par le EGF, le FGF-2 et le PDGF n'est pas affectée par l'absence de *Mekk2* (351). Il est néanmoins possible que MEKK2 soit responsable de l'activation de p38 par d'autres stimuli. MEKK3 a été montrée impliquée dans l'activation de p38 par l'hyperosmolarité via une approche de RNAi (734). Dans cette activation, MEKK3 semble être en aval de la petite GTPase RAC. TAO1/2 sont des kinases de très grande taille (1001 acides aminés) n'activant que la voie p38 en surexpression (635). Des expériences de type perte de fonction manquent afin de confirmer la pertinence de TAO1/2 dans l'activation de p38 par des stimuli.

1.1.5.3.5.2. MAPKK: MKK3/6

Les MAPKK de la voie p38 furent trouvées par homologie de séquences avec les autres MAPKK et purification biochimique (165, 499). Comme les autres MAPKK, MKK3/6 sont activées par double phosphorylation de leur boucle d'activation. MKK6 est active envers tous les membres de la voie p38 alors que MKK3 semble préférer p38 α/β (620). Les évidences génétiques révèlent que ces deux MAPKK sont redondantes. En effet, les souris *Mkk3* KO sont viables, fertiles et ne présentent pas de phénotype évident à l'instar des souris *Mkk6* KO (447, 701, 799). Les doubles mutants meurent durant la gestation, de manière similaire aux souris p38 α KO (86) (voir section 1.1.5.3.6.3.). Ceci indique que ces deux MAPKK ont une fonction essentielle à la survie intra-utérine. Les cellules issues de souris *Mkk3/6* KO n'activent pas p38 en réponse au TNF α . Par contre, p38 est partiellement activée en réponse aux rayons UV. La suppression de MKK4 par des siRNA chez les cellules *Mkk3/6* KO empêche complètement l'activation de p38. D'un autre côté, la seule délétion de *Mkk4* n'a aucun effet sur l'activation de p38 par les rayons UV (86). Ainsi donc,

MKK3/6 sont les activateurs redondants et principaux de p38 *in vivo*. En leur absence, MKK4 peut partiellement remplir leur fonction en amont de p38. Cependant, MKK4 ne peut remplir la fonction de MKK3/6 durant l'embryogenèse.

1.1.5.3.6. Fonctions de la voie p38

1.1.5.3.6.1. Osmorégulation

L'homologue de p38 chez la levure joue un rôle essentiel dans l'adaptation à l'hyperosmolarité (voir revue (657)). Comme Hog1p, p38 est fortement activée par les stress osmotiques, laissant suggérer que la fonction de cette voie dans l'osmorégulation est conservée dans l'évolution. Les cellules de mammifères s'adaptent à l'hyperosmolarité en accumulant des osmolytes organiques. Les transporteurs BGT1 (transportant le bétaine) et SMIT (transportant l'inositol et la taurine) de même que l'aldose réductase (AR, transformant le D-glucose en sorbitol) sont des protéines clés de cette réponse. Ces gènes possèdent l'élément de réponse TonE (pour Tonicity Enhancer) ce qui leur permet d'être induits par l'hyperosmolarité. Le facteur de transcription NFAT5/TonEBP (TonE Binding Protein) est impliqué dans cette induction (voir (657)).

L'inhibition pharmacologique de la voie p38 empêche l'induction de BGT1, SMIT et AR par l'hyperosmolarité dans les macrophages, les cellules de rein et le foie (162). La surexpression d'un dominant-négatif de p38 α inhibe l'activité NFAT5 (368). Il semble donc que la voie p38 régule positivement l'activité de NFAT5. On ignore pour l'instant le mécanisme de cette activation. On peut toutefois souligner que les homologues NFAT2 et NFAT4 sont directement phosphorylés par JNK (132). Dans ce cas-ci, cette phosphorylation régule négativement l'activité des facteurs NFAT.

1.1.5.3.6.2. Différenciation cellulaire

Quelques études suggèrent que les p38 sont des régulateurs positifs de la différenciation cellulaire. Ainsi, la surexpression de p38 γ stimule la différenciation des cellules C2C12 en

myotubes (413). À l'opposé, un mutant inactif de p38 γ inhibe ce processus. La voie p38 est également un stimulateur de la différenciation terminale des rhabdomyosarcomes. Ce cancer est caractérisé par un blocage de la myogenèse corrélé avec une faible activité p38 (583). La réactivation de la voie p38, en collaboration avec les facteurs de transcription MYOD et MEF2/C, permet la différenciation des cellules de rhabdomyosarcomes. La voie p38 semble également impliquée dans la différenciation neuronale. Ainsi, l'expression d'une forme constitutivement active de la MAPKKK ASK1 induit la croissance de neurite chez les cellules PC12 (695). Dans ces cellules, ASK1 active principalement la voie p38. La différenciation induite par ASK1 n'est pas inhibée par le PD98059 (l'inhibiteur de MEK1/2), mais plutôt par l'inhibiteur de p38 α/β SB202190. Ainsi, la différenciation des cellules PC12 peut être enclenchée par l'activation soutenue des voies ERK1/2 ou p38.

1.1.5.3.6.3. Développement placentaire

L'analyse des souris déficientes en certaines molécules de la voie p38 a montré que celle-ci est essentielle pour la survie et le développement *in utero*. Ainsi, les souris *p38 α* KO et *Mkk3/6* KO meurent vers le jour E11 (7, 86). Dans les deux cas, les souris présentent des défauts au niveau de placenta et du système vasculaire. Notamment, le labyrinthe placentaire est particulièrement sous-développé. L'agrégation d'un embryon *p38 α* KO avec un autre de type sauvage dont le génome est tétraploïde permet le développement d'un placenta normal. Cette procédure permet la naissance de souris *p38 α* KO, indiquant que la mort au jour 11 est due à défaut du placenta. Cette expérience confirme que p38 α est essentiel pour le développement du placenta.

Dans un fond génétique mixte Sv129/C57Bl6, certains embryons *p38 α* KO survivent jusqu'au 16^e jour embryonnaire (698). Ces embryons sont toutefois anémiques due à un défaut de production de l'EPO (érythropoïétine). p38 α pourrait être impliquée dans la stabilisation du message de l'EPO chez les cellules de foie foetal. Cette observation est toutefois controversée.

1.1.5.3.6.4. Production des cytokines pro-inflammatoires

p38 α fut identifiée initialement par son rôle dans la production de TNF α et d'IL-1 en réponse au LPS (416). La voie p38 affecte la production d'autres molécules pro-inflammatoires comme IL-3, IL-6, IL-12 et COX-2 (la cyclooxygénase-2, la cible du Vioxx) (voir revue (401)). En plus des évidences pharmacologiques, les données génétiques confirment l'implication de la voie p38 dans ce processus inflammatoire. Par exemple, les cellules déficientes en *Mkk3*, possédant une activité p38 α réduite, produisent moins de IL-1, IL-6 et IL-12 (447). Par quel mécanisme p38 régule positivement la production de ces molécules ? Les évidences indiquent que cette voie régule positivement la stabilité et le taux de traduction des ARNm codant pour des molécules pro-inflammatoires. Ainsi, l'inhibition de la voie p38 n'affecte pas les niveaux d'ARNm du TNF α et de l'IL-1, suggérant que ces MAPK affectent leur taux de traduction (138). En effet, le messenger du TNF α co-purifie avec la fraction monoribosomale et n'est pas associé aux messagers hautement traduits des polyribosomes en présence d'inhibiteurs de p38 α/β . D'un autre côté, les ARNm de IL-3, IL-6 et COX-2 sont instable en présence de CSAID (790).

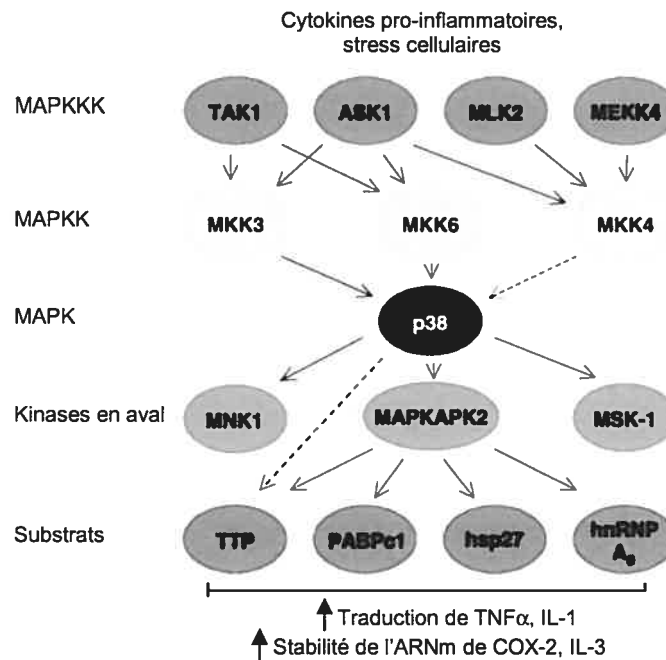


Figure 11: Régulation de l'expression des molécules pro-inflammatoires via des mécanismes post-transcriptionnels par la voie p38/MK-2. Voir texte pour détails. Adaptée de (138).

Les ARNm sensibles à p38 possèdent des éléments riches en adénosine et uridine (AU-rich elements, ARE) dans leur 3'UTR ("UnTranslated Region"). Ces ARE jouent un rôle important dans le contrôle de la stabilité et de la traduction des ARNm (35). La séquence AUUUA de ces ARE est reconnue *in vivo* par les AREBP (ARE Binding Proteins): hnRNP A0 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0), PABP1 (poly(A)-binding protein 1), AUF1 (ARERNA-binding factor 1), HuR (RNA binding protein homologous to human R-antigen), BRF-1 (butyrate response factor 1), TTP (Tristetraprolin), TIA-1 (T-cell restricted intracellular antigen-1) et TIAR (TIA-1-related protein). Des expériences de surexpression suggèrent que la stabilité du messenger de l'IL-3 est négativement régulée par HuR et TTP (490). L'activation constitutive de la voie p38 restaure l'expression de l'IL-3, suggérant que l'activité de HuR/TTP est sensible à cette voie.

Les évidences génétiques indiquent que MK2 est un effecteur important de la régulation post-transcriptionnelle dépendante de p38 (Figure 11). Par exemple, les cellules *Mk2* KO ont un défaut de production de TNF α et de IL-6 en réponse au LPS (382). En conséquence, les souris *Mk2* KO sont résistantes au choc endotoxique induit par l'injection de LPS. Des expériences de complémentation indiquent que l'activité catalytique de MK2 est nécessaire pour son effet pro-inflammatoire (383). MK2 affecte le métabolisme de l'ARN de deux manières. Tout d'abord, MK2 s'associe avec et/ou phosphoryle les AREBP. Récemment, les groupes de TW Sturgill et P Anderson ont montré que la phosphorylation de la AREBP TTP l'inactive via son association avec les protéines 14-3-3 (134, 682). De plus HSP27, un substrat spécifique de MK2, semble également impliqué dans la régulation post-transcriptionnelle. L'expression d'un mutant de HSP27 phospho-mimétique (soit constitutivement "phosphorylée" par MK2) stabilise le 3'UTR de COX-2 (410). On ignore la spécificité et le mécanisme de cette activité de HSP27.

1.1.5.4. La voie ERK5

La voie ERK5 est une voie MAP kinase présente chez les métazoaires. Cette voie joue un rôle important dans de nombreux processus biologiques, notamment la survie, la prolifération et la croissance cellulaire. ERK5 est également essentielle pour l'intégrité du

système vasculaire chez l'adulte. De plus, on soupçonne que la voie ERK5 est impliquée dans la tumorigénèse (voir revue (271, 554)).

1.1.5.4.1. Identification

Deux groupes ont indépendamment découvert ERK5 il y a une décennie. ERK5 fut tout d'abord clonée par homologie de séquence avec les MAPK classiques par une approche PCR (417). Le groupe de Dixon a pour sa part identifié ERK5 en cherchant pour le substrat de MEK5 par double hybride (845). Des études subséquentes ont montré que ERK5 est le seul substrat physiologique de MEK5, son activateur. Des homologues de ERK5 sont présents du nématode jusqu'à l'homme.

1.1.5.4.2. Structure

ERK5 possède un domaine kinase en N-terminal très similaire aux MAPK (Figure 5). Comme ERK1/2, son domaine kinase contient la séquence TEY au niveau de la boucle d'activation. De part son organisation, ERK5 peut être considérée comme une MAPK atypique. En effet, une extension de 400 acides aminés en C-terminal est présente chez cette MAPK. Les MAPK atypiques ERK3, 4 et 7 et NLK contiennent également un domaine C-terminal (non apparenté). L'examen de l'extension C-terminale de ERK5 révèle la présence de régions riches en proline. L'extension possède une activité d'activation transcriptionnelle (342). Le C-terminal joue également un rôle important dans la régulation de ERK5. Ainsi, il semble que l'extension C-terminale de ERK5 inhibe son activité kinase (99), possiblement via l'interaction avec les protéines 14-3-3 (844). De plus, cette extension semble posséder des séquences d'import et d'export nucléaire (99).

1.1.5.4.3. Expression

ERK5 est une MAPK ubiquitaire (417). L'ARNm de ERK5 est abondant dans le cœur, le placenta, les poumons, les reins et le muscle squelettique.

1.1.5.4.4. Régulation de l'activité de ERK5

ERK5 est une kinase ciblant les prolines (proline directed kinase) active envers le substrat classique MBP. Physiologiquement, cette MAPK phosphoryle certains facteurs de transcription, enzymes et molécules de signalisation (voir revue (110, 271)). Le groupe d'A Ullrich a également montré que le domaine C-terminal de ERK5 est un bon substrat *in vitro* (99). On ignore la relevance physiologique de cette autophosphorylation, ni même si elle existe *in vivo*.

Comme les MAPK classiques, l'activité catalytique de ERK5 requiert la double phosphorylation de sa boucle d'activation. Le motif TEY de la boucle d'activation de ERK5 est identique à celui de ERK1/2. ERK5 ne lie pas et n'est pas phosphorylée par MEK1/2, les activateurs de ERK1/2 (188). ERK5 est plutôt phosphorylée et activée par MEK5, une MAPKK n'ayant pas d'activité envers ERK1/2. De façon intéressante, les inhibiteurs de MEK1/2, PD98059 et U0126 sont également actifs envers MEK5 à plus forte concentration, soulevant ainsi des doutes sur les études basées sur ces agents pharmacologiques (495).

ERK5 fut d'abord montrée comme étant une MAPK régulée par les stress. Ainsi, ERK5 est activée par des stress osmotiques (sorbitol) et oxydatifs (peroxyde d'hydrogène), suggérant une implication de cette MAPK dans les réponses de survie et/ou de mort cellulaire (1). Les données plus récentes suggèrent que ERK5 serait un régulateur important de la survie cellulaire, notamment pour les neurones (110). En accord avec cette affirmation, ERK5 est activée par les neurotrophines NGF et BDNF, deux hormones ayant de puissants effets neuroprotecteurs (770). ERK5 est également activée par les mitogènes. Ainsi, le EGF, VEGF, FGF2 et les esters de phorbol sont des activateurs puissants de ERK5 (334, 343, 344, 351). L'activation de ERK5 par les récepteurs tyrosine kinases peut dépendre de la petite protéine G RAS, selon le type cellulaire (334, 344). Finalement, la stimulation de récepteurs couplés aux protéines G entraîne une activation de ERK5. Les récepteurs couplés spécifiques aux protéines G_q et G_{12/13}, comme le récepteur PAR-1 de la thrombine ou les récepteurs muscariniques M1 et M2, sont capables d'activer ERK5 (214).

De manière intéressante, l'activité de ERK5 est modulée par son extension C-terminale. La délétion des 75 acides aminés en C-terminal de ERK5 produit une kinase 6 fois plus active (99). Cet effet serait causé par une plus forte activation par sa kinase en amont. Il semble donc que le C-terminal masque d'une certaine façon le domaine kinase en N-terminal.

Comme les MAPK classiques, ERK5 est sensible à certaines phosphatases (98, 334). Notamment, ERK5 interagit et est directement déphosphorylée par la tyrosine phosphatase PTP-SL (voir section 1.1.7.). De plus, des expériences de surexpression suggèrent que les phosphatases à double spécificité DUSP sont des régulateurs négatifs de l'activité de ERK5.

1.1.5.4.5. Membres de la voie ERK5

1.1.5.4.5.1. MAPKKK: MEKK2/3 et TPL-2

MEKK2 et 3 furent assignées à la voie ERK5 par une approche de double hybride. En effet, le groupe de GL Johnson a identifié MEK5 (la MAPKK de ERK5) comme une protéine interagissant avec les 188 premiers acides aminés de MEKK2 (687). MEKK3, une MAPKKK homologue à MEKK2, interagit également avec MEK5. Deux années plus tard (en 2003), le même groupe a caractérisé un domaine PB1 dans la région N-terminal de MEKK2/3 et MEK5 (512). Ce domaine, initialement trouvé chez les protéines Phox1 et Bem1p, a la faculté d'interagir avec d'autres domaines PB1. Isolé, le domaine PB1 de MEKK2 et de MEKK3 lie directement MEK5 *in vitro*. Inversement, le domaine PB1 de MEK5 s'associe avec MEKK2/3. Les MAPKK activant les MAPK classiques requièrent leur domaine DVD présent dans leur C-terminal pour l'interaction avec les MAPKKK (697). Par alignement de séquence, MEK5 semble posséder un domaine DVD également (Figure 9). On ignore encore si en plus du domaine PB1, MEK5 nécessite son domaine DVD présumé pour son activation.

La surexpression de MEKK2 et 3 entraîne l'activation de ERK5 (114, 687). Inversement, l'expression de dominant négatif de ces deux MAPKKK inhibe l'activation de ERK5 en réponse à l'EGF et au peroxyde d'hydrogène (114, 687). Les données génétiques confirment le rôle de MEKK2 dans l'activation de ERK5. Les fibroblastes issus de souris *Mekk2* KO ont un défaut d'activation de ERK5 en réponse aux mitogènes (FGF-2) et aux stress

(sorbitol et H₂O₂) (351). Le phénotype des souris *Mekk2* KO étant moins sévère que celui des souris *Erk5* KO (voir section 1.1.5.4.6.4.), on peut penser qu'il y a redondance pour les MAPKKK de ERK5. D'autre part, les souris déficientes en *Mekk3* ont un phénotype similaire à celui des souris *Erk5* KO (813), suggérant que cette MAPKKK est l'activateur majeur de ERK5.

TPL-2/COT est une protéine kinase initialement identifiée pour son activité transformante (492). En 2000, le groupe de J. S. Gutkind a étudié les voies de signalisation en aval de TPL-2 (130). Ils montrèrent que l'induction de c-Jun est essentielle pour l'activité tumorigénique de TPL-2. TPL-2 est capable d'activer de nombreuses voies MAPK *in vivo* et *in vitro*. Ainsi, ERK2, JNK1, p38 γ et ERK5 sont fortement activées par TPL-2. TPL-2 phosphoryle et active directement les MAPKK MEK1, MEK4, MEK5 et MEK6. Finalement, un dominant négatif de MEK5 diminue l'induction de c-JUN par TPL-2, suggérant que la voie ERK5 est importante pour transmettre les signaux oncogéniques de TPL-2. Néanmoins, on ignore si cette MAPKKK est impliquée dans l'activation physiologique de ERK5.

1.1.5.4.5.2. MAPKK: MEK5

MEK5 fut identifiée par le groupe de Jack E Dixon par homologie de séquence (845). Une approche basée sur le PCR et des amorces spécifiques pour les régions conservées des MEK (correspondant aux sous-domaines IV et VIII) a été utilisée. MEK5 est ainsi homologue aux MAPKK des MAPK classiques. MEK5 possède un domaine PB1 en N-terminal important pour son interaction avec ses activateurs MEKK2/3. MEK5 possède également un domaine DVD potentiel en C-terminal. Rappelons que le domaine DVD a récemment été impliqué dans l'interaction entre les MAPKK et les MAPKKK. On ignore la pertinence du domaine DVD de MEK5.

Les inhibiteurs pharmacologiques de MEK1/2, tel le PD98059 ou le U0126 sont également actifs envers MEK5. Ceci s'explique par le fait que MEK5 possèdent, par alignement de séquence avec MEK1/2, une cavité permettant l'interaction avec ces inhibiteurs (533). Cette cavité ne serait pas présente chez les autres MAPKK, d'où leur insensibilité à ces inhibiteurs. Le IC₅₀ du U0126 pour MEK5 est 3 fois plus élevé que pour MEK1/2 (495).

Contrairement aux MAPKK des voies classiques, MEK5 est le seul activateur de la voie ERK5. Conséquemment, le phénotype de l'inactivation génique de MEK5 et ERK5 sont très similaire (763) (voir section 1.1.5.4.6.4.).

1.1.5.4.6. Fonctions de la voie ERK5

1.1.5.4.6.1. Prolifération cellulaire

Les données issues d'expériences de culture cellulaire indiquent que ERK5 jouerait un rôle important dans la croissance cellulaire. Ainsi, la surexpression d'une forme inactive de ERK5 inhibe la prolifération de cellule épithéliale du sein (189) et de l'ovaire (344). Le mécanisme par lequel ERK5 agit sur le cycle cellulaire commence à être compris. Tout d'abord, ERK5 agit sur le cycle cellulaire via SGK (Figure 12). Une expérience de double hybride a permis d'identifier la kinase induite par le sérum et les glucocorticoïdes (SGK) comme un substrat spécifique de ERK5 (272). SGK est phosphorylée sur la serine 78 et activée par ERK5. ERK5 serait ainsi un régulateur positif important de SGK en réponse au mitogène EGF. SGK est connue comme étant un régulateur positif sur la transition G1/S du cycle cellulaire. Les données permettent d'émettre l'hypothèse que ERK5 agit positivement sur l'entrée en phase S via l'activation de SGK par phosphorylation directe (272).

La voie ERK5 régule positivement l'expression de plusieurs proto-oncogènes, notamment, c-JUN et c-FOS (334, 343). c-JUN et c-FOS font partie de la famille des facteurs de transcription AP-1. Ces molécules jouent un rôle important dans la prolifération cellulaire, spécifiquement dans l'induction de gènes impliqués pour la progression dans la phase G1 du cycle cellulaire. Les mécanismes par lequel ERK5 agit sur c-JUN et c-FOS sont semblables mais non identiques. L'induction transcriptionnelle du gène de c-JUN par ERK5 nécessite l'activité des facteurs de transcription myocyte enhancer factor 2, MEF2 (343). Les facteurs MEF2 (MEF2A, B, C et D) font partie de la famille de facteurs de transcription à boîte MADS également impliqués dans la différenciation musculaire (496). Le lien entre MEF2 et ERK5 fut découvert par plusieurs groupes (343, 810). L'interaction entre ERK5 et MEF2D a été montré par double hybride (810). Des expériences de gènes

reporteurs ont montré que la voie ERK5 régule positivement l'activité transcriptionnelle de MEF2A, C et D (342, 343, 810). Cette activation nécessite la phosphorylation des facteurs MEF2 par ERK5 (345). Comme les substrats des MAPK classiques, ERK5 reconnaît ces substrats via des interactions de type arrimage (voir section 1.1.10.). Bien qu'impliqués dans la myogenèse, les facteurs MEF2 sont également impliqués dans l'induction des gènes précoces (immediate-early genes) en réponse aux mitogènes. En effet, le promoteur c-JUN contient un élément de réponse MEF2 (65).

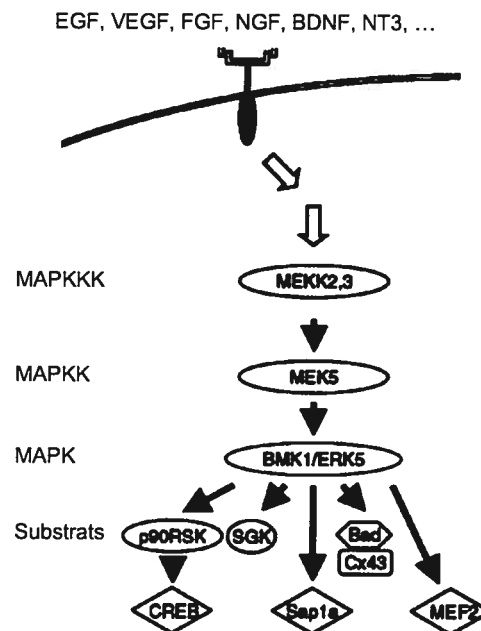


Figure 12: Voie de signalisation de ERK5 régulant la prolifération et la survie cellulaire. Voir texte pour détails. Adaptée de (271).

La transcription du gène précoce c-FOS est également augmentée par la voie ERK5. Dans ce cas, le facteur de transcription SAP1A et non MEF2 est la cible de ERK5 (334). Le facteur SAP1A (et également le facteur ELK1) fait partie de la famille de facteur à boîte ETS et est responsable de l'activation des promoteurs contenant l'élément de réponse au sérum, SRE. Comme c'est le cas pour MEF2, la phosphorylation de SAP1A par ERK5 augmente son activité transcriptionnelle. SAP1A est également la cible des trois classes de MAPK classiques (221). La présence d'un site SRE dans le promoteur de c-FOS rend ainsi celui-ci sensible à l'activité de la voie ERK5 (334). L'utilisation de dominant négatif de la voie ERK5, de même que la voie ERK1/2, a montré que ces MAPK sont impliquées de

manière non redondante dans l'induction de c-FOS en réponse au sérum (334). On observe donc ici un exemple d'intégration de deux voies MAPK.

La voie ERK5 régule également la protéine c-FOS. Ainsi, l'activation de la voie ERK5 stimule la phosphorylation de c-FOS, entraînant plusieurs conséquences. Premièrement, l'activité transcriptionnelle de c-FOS est augmentée par sa phosphorylation (709). De plus, la phosphorylation de c-FOS stabilise la protéine, ce qui explique en partie son induction en réponse à ERK5. En effet, c-FOS est une molécule dont la stabilité métabolique est fortement régulée par le système ubiquitine-protéasome (voir section 1.2.). *In vitro*, c-FOS n'est pas un bon substrat de ERK5. De plus, la mutation des cinq sites putatifs de phosphorylation de c-FOS par ERK5 n'empêche pas sa phosphorylation *in vivo*. Donc, il doit exister une ou des kinases en aval de ERK5 responsable de la phosphorylation de c-FOS. Une de ces kinases pourrait être RSK2. RSK2 fait partie de la famille de kinase activée par les MAPK (les MAPKAPK). On sait que ERK5 est capable d'activer RSK2 *in vivo* (553). De plus, il est connu que RSK2 est impliquée dans la phosphorylation de c-FOS (122). Cependant, les évidences prouvant la pertinence de la voie ERK5-RSK2-c-FOS dans la prolifération cellulaire manquent. De manière identique, ERK5 régule l'activité et la stabilité de FRA-1, un homologue de c-FOS (709).

ERK5 semble être un régulateur positif important du gène codant la cycline D1. Ainsi, l'expression d'un dominant-négatif de ERK5 diminue l'expression de la cycline D1 en réponse au sérum (509). De nombreuses voies de signalisation mitogéniques convergent sur l'induction transcriptionnelle de la cycline D1. La cycline D1 est une sous-unité régulatrice des kinases dépendantes des cyclines 4 et 6 (CDK4/6) et joue un rôle important pour la progression dans la phase G1 du cycle cellulaire. Il est intéressant de remarquer que le promoteur de cycline D1 répond aux facteurs AP-1 (dimère c-JUN/c-FOS) et ETS (SAP1A et ELK1). On peut ainsi facilement comprendre comment ERK5 est potentiellement un régulateur important de l'entrée et la progression en phase G1.

En accord avec l'idée que la voie ERK5 est importante pour la prolifération cellulaire, le groupe de C Tournier a observé une forte diminution de l'incorporation de BrdU chez les embryons déficients en MEK5 (763).

1.1.5.4.6.2. Survie cellulaire

De nombreuses études montrent que ERK5 a un rôle anti-apoptotique. Les neurones sont des cellules dépendantes de l'activité de ERK5 pour leur survie. Par exemple, le stress oxydatif induit l'apoptose chez les cellules PC12 différenciées en neurones (167). L'activation de ERK5 en réponse à ce stress joue un rôle protecteur car son inhibition aggrave la mort cellulaire induite par le H₂O₂ (691). De manière similaire, la voie MEK5-ERK5 est requise pour la survie des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) exposés à un stress osmotique (763). Ainsi, les MEF *Mek5* KO sont significativement plus sensibles à l'apoptose induite par le sorbitol que des cellules de type sauvage (WT). La voie ERK5 est également requise pour la survie neuronale dans des contextes plus physiologiques. Les cellules neuronales sont très sensibles à l'absence de sérum dans leur milieu de culture. Les neurotrophines (NT) telles NGF, BDGF et NT3/4 sont des facteurs puissants de survie cellulaire (110). Les récepteurs tyrosines kinases des NT, les TRK, activent de nombreuses voies de signalisation, dont les voies ERK5, ERK1/2 et PI₃K-AKT. Les données indiquent que la voie ERK5 transmet en partie le signal anti-apoptotique de ces agonistes. Ainsi, l'inhibition de la voie ERK5 par l'expression de dominant négatif ou par des agents pharmacologiques diminue l'effet anti-apoptotique des NT (440). Il semble que les facteurs de transcription MEF2A et C sont les substrats de ERK5 importants pour la survie neuronale. Ainsi, l'expression de formes dominantes négatives de ces facteurs induit l'apoptose alors qu'une forme constitutivement active de MEF2C empêche la mort cellulaire (653).

ERK5 est également impliquée dans la signalisation rétrograde. Dans ce type de signalisation, un signal extracellulaire de type NT situé à l'extrémité axonale est internalisé et voyage le long de l'axone jusqu'au corps cellulaire permettant des changements transcriptionnels favorisant la survie et la connection nerveuse (770). La stimulation des axones distaux par le NGF et le BDGF active localement la voie ERK5. Grâce à la signalisation rétrograde, ERK5 située au corps cellulaire du neurone est également activée. À l'opposé, une stimulation des axones distaux active les MAPK ERK1/2 que localement et non dans le corps cellulaire des neurones. D'un autre côté, l'inhibition de la voie ERK5 perturbe l'activité anti-apoptotique d'une stimulation distale par des neurotrophines. L'inhibition de ERK1/2 n'a pas d'effet sur la survie induite par les NT. La survie neuronale

dépendante de la voie ERK5 se fait via la phosphorylation et subséquente activation du facteur de transcription CREB (Ca^{2+} /cAMP response element binding protein). Les MAPKAPK de la famille RSK sont impliquées dans la phosphorylation et l'activation de CREB.

La mort *in utero* des souris *Erk5* KO n'a pas permis de confirmer le rôle de la voie ERK5 dans la survie neuronale *in vivo*. Pour obtenir des données sur le sujet, le groupe de J-D Lee a généré un KO conditionnel au niveau du cerveau (271). Surprenamment, les souris transgénique se développent normalement. Il existe plusieurs possibilités expliquant cette absence de phénotype. Premièrement, il se peut qu'*in vivo*, il existe des voies de signalisations compensant la perte de *Erk5*. Il se peut que des différences entre espèces expliquent l'absence de phénotype chez le cerveau des souris *Erk5* KO. En effet, les données recueillies *in vitro* sont basées sur des cultures de neurones de rat (440, 770). Finalement, les données *in vitro* suggèrent que l'activité anti-apoptotique de ERK5 est essentielle seulement pour la survie des neurones issus d'embryon (440). Ainsi, l'inhibition de la voie ERK5 n'affecte pas la survie des neurones matures. Il se peut donc que les promoteurs spécifiques aux neurones utilisés pour la souris KO conditionnel soient exprimés trop tardivement pour révéler l'action anti-apoptotique de ERK5 *in vivo*.

En plus des facteurs de transcription décrits plus haut, ERK5 influence également NF- κ B (553). NF- κ B désigne une famille de facteurs de transcription très importante générant notamment des signaux de survie cellulaire (voir revue (159)). Ainsi, les gènes IAP1 et BCL-2 sont des effecteurs importants de l'activité anti-apoptotique de la voie NF- κ B. À elle seule, la voie ERK5 est très peu efficace pour activer la voie NF- κ B. Néanmoins, ERK5 synergise avec la voie ERK1/2 pour son activation (553). Il fut observé chez les neurones que les NT activent ces deux voies MAPK (770). Il se peut donc qu'en plus de MEF2 et CREB, ERK5 module la survie neuronale via NF- κ B.

1.1.5.4.6.3. Différenciation neuronale et musculaire

L'étude de ERK5 chez le xénope a clairement montré son rôle dans le développement du système nerveux central. L'injection d'oligonucléotides antisens dirigés contre ERK5 ou

MEK5 résulte en une absence partielle de la tête (523). Contrairement à ce qui est mentionné plus haut, cette malformation ne semble pas la conséquence d'une mort cellulaire accrue des neurones en l'absence de ERK5 mais indique plutôt que ERK5 est essentielle à la différenciation neuronale chez la grenouille. Des expériences d'épistasie montrent que ERK5 est en aval de SOXD, un gène impliqué dans l'induction neuronale, et en amont de XNGNR1, un effecteur important de SOXD ayant une activité pro-neurale. L'activation de MEF2C est essentielle pour l'activité neurogène de ERK5. L'analyse des embryons *Erk5* KO suggère également un rôle de ERK5 dans le développement de la tête et du cerveau (809). En effet, les embryons *Erk5* mutants ont une tête plus petite et malformée. Une analyse histologique révèle une diminution du mésenchyme céphalique. Cette réduction du mésenchyme est due à une augmentation de l'apoptose tel que révélé par des essais TUNEL. Le mésenchyme est également le siège d'hémorragies résultantes d'un défaut de l'intégrité vasculaire (voir section 1.1.5.4.6.4.). Il se peut donc que les défauts de la tête observés chez les souris *Erk5* KO soient secondaires à un défaut vasculaire. Un KO conditionnel neuronal effectué par le groupe de Lee indique pour sa part que ERK5 semble non-essentielle pour le développement du cerveau chez la souris (271). Il se peut que les promoteurs utilisés (synaptine I et nestine) soient actifs après que ERK5 ait exécuté son activité neurogène.

D'autre part, une étude suggère que ERK5 possède un rôle positif sur la différenciation musculaire. Ainsi, la suractivation de la voie ERK5 facilite la différenciation de la lignée myoblastique C2C12 en myotube (174). À l'opposé, l'inhibition de la voie (par l'utilisation d'un dominant-négatif ou d'antisens) réduit la myogenèse *in vitro*. Il se peut que la phosphorylation directe de MYOD, un facteur de transcription de la famille bHLH myogénique, soit impliquée dans l'activité myogénique de ERK5. Des études biochimiques supplémentaires sont nécessaires pour confirmer le lien ERK5-MYOD.

1.1.5.4.6.4. Régulation du système cardiovasculaire et angiogénèse

L'analyse du phénotype des souris *Erk5*^{-/-} a révélé un rôle primordial de ERK5 dans le développement et l'homéostasie du système cardiovasculaire. Les souris *Erk5* KO meurent *in utero* entre le jour embryonnaire E9.5 et 11.25 d'un défaut du système cardiovasculaire

(594). Le placenta, le sac vitellin et le cerveau présentent des défauts majeurs de vascularisation. Dans ces tissus, les branchements des vaisseaux sanguins sont réduits. De plus, l'intégrité des vaisseaux sanguins est diminuée ce qui entraîne des hémorragies spontanées. Le placenta est capable de se former normalement chez les souris *Erk5* KO. À partir du jour E9.5, on observe une diminution du labyrinthe et de la zone d'échange sanguin entre la mère et le fœtus. On observe également une augmentation de l'apoptose au niveau du labyrinthe placentaire.

Les embryons mutants présentent aussi des défauts cardiaques. Le groupe de Kuida a tout d'abord observé un défaut de morphogénèse cardiaque (le "rightward looping") (594). Le myocarde est aminci et les trabécules sont désordonnés comparativement à un cœur normal. Pour examiner le rôle de ERK5 dans le développement du cœur, le groupe de Lee a généré un KO conditionnel de *Erk5* dans le cœur. De façon surprenante, les souris transgéniques possèdent un cœur normal et fonctionnel (271). ERK5 ne semble donc pas jouer un rôle important chez les cardiomyocytes matures. Le défaut cardiaque observé chez les souris *Erk5* KO serait secondaire à un autre défaut, possiblement le défaut vasculaire.

Les souris *Erk5* KO montrent clairement que cette MAPK est un régulateur essentiel de la fonction des cellules endothéliales. Ainsi, les cellules endothéliales des souris *Erk5* KO sont arrondies et désorganisées, expliquant les hémorragies observées chez les embryons mutants. Les vaisseaux des souris *Erk5* KO recrutent moins de cellules musculaires lisses, les rendant ainsi plus fragiles. Le groupe de Lee a également généré un KO inducible (270). L'administration de pI:pC (activant l'expression du transgène Mx-1/Cre recombinase) induit l'excision de *Erk5* (presque) complète dans la moelle osseuse, le foie et la rate mais également chez d'autres organes (15-85 % d'efficacité). Ce protocole conduit à la délétion complète dans les cellules endothéliales. Environ 2 semaines après le traitement au pI:pC, les souris meurent d'un syndrome de fuite vasculaire. L'absence aiguë de *Erk5* entraîne l'apoptose des cellules endothéliales *in vivo*. Ce phénomène est également observé dans des cellules endothéliales en culture où ERK5 est excisée par l'expression ectopique de la Cre recombinase. Ainsi, ERK5 est requise pour la prolifération et la survie des cellules endothéliales. L'apoptose des cellules endothéliales induite par l'absence de *Erk5* est prévenue par une forme constitutive de MEF2C (270), suggérant que ce facteur est un effecteur anti-apoptotique important de la voie ERK5.

ERK5 peut également favoriser la survie des cellules endothéliales via BAD. BAD fait partie des protéines pro-apoptotiques contenant un domaine BH3. Ces protéines régulent l'apoptose en changeant la perméabilité de la membrane mitochondriale, facilitant la libération du cytochrome c, un médiateur important de l'apoptose. ERK5 est capable, par phosphorylation directe, d'inactiver BAD, protégeant ainsi les cellules endothéliales de l'apoptose, en particulier à la suite d'un stress mécanique ("shear stress") (562).

ERK5 régule le système vasculaire aussi via la réponse hypoxique. L'hypoxie, soit l'absence d'oxygène, est ressentie chez les cellules de mammifères par les facteurs de transcription de la famille HIF (voir revue (332)). Un des gènes cibles de HIF est le VEGF, un facteur de croissance puissant des cellules endothéliales. L'absence de *Erk5* entraîne une augmentation significative de gènes hypoxiques, notamment du VEGF. Des études de gènes reporteurs ont montré que ERK5 est en fait un régulateur négatif de l'activité de HIF (670). Parce que le VEGF est un agent augmentant la perméabilité vasculaire, il se peut que ce facteur soit responsable, en partie du moins, des hémorragies observées chez les souris *Erk5* KO.

Le phénotype cardiovasculaire des souris *Erk5* KO est très similaire aux phénotypes des souris *Mekk3*, *Mek5* et *Mef2c* KO (436, 763, 813). MEKK2 est également capable d'activer ERK5 chez des cellules en cultures. Néanmoins, les souris *Mekk2* KO sont viables et ne présentent pas de phénotype vasculaire. Ces données indiquent la pertinence physiologique de la voie MEKK3-MEK5-ERK5-MEF2C dans le contrôle de la prolifération et la survie des cellules endothéliales.

1.1.5.4.6.5. Contrôle de la taille cellulaire

Des évidences génétiques obtenues chez l'organisme modèle *C elegans* suggèrent que la voie ERK5 contrôle la taille cellulaire (768), à l'instar de la voie mTOR/4E-BP (517). Ainsi, la mutation de l'homologue de ERK5, SMA-5, diminue la taille du ver mature de 75%! De plus, les vers mutants se développent plus lentement. La différence de taille n'est pas due à une diminution du nombre de cellules mais à la présence de cellules plus petites chez le ver mutant *sma-5*. On ignore présentement quel effecteur de la voie ERK5 est

impliqué dans le contrôle de la taille cellulaire. De plus, on ne sait pas encore si la capacité de ERK5 à réguler la taille cellulaire est conservée dans l'évolution.

1.1.5.4.6.6. ERK5 et tumorigenèse

Étant donné les rôles positifs de ERK5 dans l'angiogenèse, la prolifération et la survie cellulaire, on peut soupçonner que cette voie soit impliquée dans l'oncogenèse. En effet, les cancers nécessitent une activation aberrante de ces trois processus biologiques. Tout d'abord, il existe une forte corrélation entre la surexpression et/ou la suractivation de la voie ERK5 et la malignité cancéreuse (271). Par exemple, MEK5 est surexprimée dans les cancers hautement métastatiques de la prostate (481). MEK5 est aussi surexprimée dans des cellules de cancers du sein résistantes à la chimiothérapie (773). Plus directement, le groupe de M Cobb a montré que l'activation de la voie ERK5 facilite la transformation cellulaire induite par la suractivation de la voie ERK1/2 (553). Les auteurs proposent que ces deux voies MAPK synergisent au niveau du facteur de transcription NF- κ B. Des expériences de type perte de fonction ont quant à elle confirmé l'implication de ERK5 dans la tumorigenèse. Ainsi, l'inhibition de la voie ERK5 diminue le pouvoir oncogénique de RAF constitutivement actif dans les cellules NIH 3T3 (553). Également, l'expression d'un dominant négatif de ERK5 inhibe la prolifération de cellules cancéreuses mammaires (509). Cette diminution de prolifération s'accompagne d'une réduction de cycline D1.

La mort embryonnaire précoce des souris *Erk5* KO n'a pas facilité l'étude du rôle de ERK5 dans l'oncogenèse *in vivo*. Les MEF *Erk5* et *Mek5* KO sont des outils intéressants pour analyser l'implication de la voie ERK5 dans la transformation par différents oncogènes. Il se peut également que les souris ERK5 hétérozygotes soient résistantes à la formation de certains cancers. Malgré son rôle indispensable à l'intégrité du système vasculaire chez l'adulte, il se peut que des inhibiteurs pharmacologiques de la voie ERK5 puissent être utiles contre certaines pathologies, dont le cancer.

1.1.5.5. La voie NLK

Nemo-like kinase (NLK) est l'unique MAPK d'une importante voie de signalisation conservée du nématode jusqu'à l'homme. Cette voie, comprenant entre autres la kinase

TAK1, régule l'activité de nombreux facteurs de transcription, notamment LEF/TCF et STAT3 (voir revue (51, 554)).

1.1.5.5.1. Identification

En 1994, K-W Choi et S Benzer ont identifié une kinase impliquée dans la morphogenèse de l'œil chez la drosophile (131). L'inactivation de ce gène, nommé *nemo* (*nmo*), diminue grandement la viabilité. Quatre années plus tard, Brott et al. clonèrent des kinases homologues aux MAPK chez la souris en utilisant une approche PCR (90). Un clone codait une protéine nouvelle présentant une forte homologie à *nemo*, d'où son nom de *nemo-like kinase*, NLK. En 1999, les groupes de B Bowerman, de K Matsumoto et de CC Mello ont identifié génétiquement NLK comme un joueur important de la voie WNT chez *C elegans* et les mammifères (307, 484, 608).

1.1.5.5.2. Structure

NLK est une protéine de 516 acides aminés constituée d'un domaine kinase flanqué d'extensions en N- et C-terminale (Figure 5). Le domaine kinase présente de l'homologie vis-à-vis les MAPK mais également les CDK (90). La boucle d'activation de NLK ne contient pas la séquence TXY des MAPK classiques mais plutôt le motif TQE ressemblant plus au motif d'une CDK. La longueur de l'extension en N-terminal de NLK varie selon l'espèce. Cette région est riche en résidus glutamine (Q), alanine (A), histidine (H) et proline (P). NLK contient également une extension en C-terminal très bien conservée chez tous les homologues. Un mutant identifié chez *C elegans* révèle que ce domaine est essentiel dans la fonction de NLK. Ainsi, la substitution d'une cystéine située en C-terminal du domaine kinase par une tyrosine inactive fonctionnellement NLK. Le C-terminal pourrait être important pour réguler l'activité enzymatique de NLK. Alternativement, l'extension pourrait être le siège d'interactions protéine/protéine essentielles. Les données montrent en fait que la mutation C→Y détruit l'interaction entre NLK et TCF4, un substrat spécifique (voir section 1.1.5.5.6.1.).

1.1.5.5.3. Expression

NLK est une MAPK ubiquitaire. Son expression est forte dans le cerveau et le poumon (90). Durant le développement embryonnaire chez la souris, l'expression de NLK est induite durant les jours E12,5 à 14,5.

1.1.5.5.4. Régulation de l'activité de NLK

NLK possède un domaine kinase dont l'activité est démontrée expérimentalement. En effet, NLK immunoprécipitée de cellules de mammifères peut s'autophosphoryler *in vitro* (90). Étrangement, cette MAPK ne phosphoryle aucun des substrats génériques (MBP, caséine, histone ou Rb) suggérant que NLK possède une spécificité de substrat restreinte. Des études génétiques ont par la suite montré que NLK est spécifique pour certains facteurs de transcriptions, notamment TCF1-4, STAT3 et c-MYB (voir section 1.1.5.5.6.). Sur ces substrats, NLK phosphoryle des résidus sérines/thréonine suivis d'une proline.

NLK possède le motif TQE dans sa boucle d'activation. La thréonine de ce motif correspond à la thréonine 183 de la séquence TEY de ERK2. NLK s'autophosphoryle sur la Thr286 de la boucle d'activation *in vitro* (90). Cependant, il n'existe aucune évidence que ce site est phosphorylé *in vivo*. Néanmoins, un mutant T286V de NLK est inactif *in vivo* (339). Il semble donc que NLK nécessite une phosphorylation activatrice pour son activité *in vivo*.

L'activité de NLK est affectée par certains signaux extracellulaires. Les ligands de la famille WNT (WNT1 et WNT5a) sont des agonistes puissants de l'activation de NLK (306, 339). Cette activation est observée de *C elegans* jusqu'aux mammifères. Ces ligands agissent par l'intermédiaire des récepteurs Frizzled de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (voir revue (299)). Les cytokines IL-6 et G-CSF, agissant via le co-récepteur gp130, sont également des activateurs de NLK (374). NLK peut finalement être activée par certains agonistes de la superfamille TGF- β (TGF- β , Activine A et BMP4) (532). Le calcium intracellulaire a également un effet positif sur l'activité de NLK via la protéine kinase dépendante de la calmoduline CAMKII (306).

1.1.5.5. Membres de la voie NLK

1.1.5.5.1. MAPKKK: TAK1

Les groupes de K Matsumoto et B Bowerman ont assigné la MAPKKK TAK1 en amont de NLK. Ainsi, la mutation de MOM-4 (l'homologue de TAK1) et LIT-1 (l'homologue de NLK) affecte de la même manière la voie WNT chez *C elegans* (484). L'activation ectopique de TAK1 active NLK, indiquant que la MAPKKK est située en amont de NLK. La voie TAK1/NLK a été également observée chez la grenouille et les mammifères (307, 532). L'activation de NLK par TAK1 nécessite l'activité kinase de cette dernière. Bien que non montrée expérimentalement encore, l'activation de NLK dépendante de TAK1 devrait s'accompagner de sa phosphorylation sur la Thr286 du motif TQE. TAK1 agit comme MAPKKK pour les voies de JNK et p38 en phosphorylant leur MAPKK respectivement (498, 661). On ignore présentement si NLK est un substrat de MKK3/4/6/7. Récemment, le groupe de Ishii a suggéré que la protéine kinase interagissant avec l'homéodomaine-2 (HIPK2) est la MAPKK de NLK (339).

TAK1 est une kinase importante pour l'activation de la voie NF- κ B. Les cellules déficientes en TAK1 n'activent pas la kinase de l'inhibiteur de NF- κ B, IKK β (660). Dans tous les cas, l'activité de TAK1 dépend de son association avec une protéine adaptatrice de la famille TAB. La surexpression de TAB1 induit l'activation de TAK1 (659). Physiologiquement, TAB1 est une protéine de liaison des chaînes de polyubiquitine (voir section 1.2.5.). Cette protéine adaptatrice est ainsi connue pour sa capacité de lier la forme polyubiquitinée de TRAF2 et 6, ubiquitines ligases effectrices des récepteurs du TNF α et de IL-6 (694) (voir Figure 10). On ignore si l'activation de TAK1 par la voie WNT et TGF- β nécessite l'activité d'une ubiquitine ligase. Dans tous les cas, on estime que TAB1 induit l'oligomérisation, l'autophosphorylation et l'autoactivation de TAK1.

La kinase dépendante de la calmoduline CAMKII peut jouer le rôle de MAPKKKK dans la voie TAK1/NLK (306). Ainsi, l'expression d'une forme active de CAMKII induit l'activation de TAK1 et NLK *in vivo*. *In vitro*, CAMKII interagit et phosphoryle directement TAK1 sur des sites encore inconnus. L'élévation du calcium intracellulaire

(activant CAMKII) est suffisante pour activer TAK1. Finalement, l'activation de la voie TAK1/NLK par WNT5a est inhibée par le KN-93, un inhibiteur relativement sélectif de CAMKII. Ainsi, CAMKII serait impliquée dans la voie de signalisation de WNT5a.

1.1.5.5.2. MAPKK: HIPK2

Dans un crible cherchant des protéines d'interaction avec NLK, le groupe de S Ichii (en collaboration avec K Matsumoto) a isolé une protéine kinase de grande taille, la protéine kinase interagissant avec les homéodomains-2 (homeodomain-interacting protein kinase 2, HIPK2) (339). HIPK2 et ses kinases homologues HIPK1, 3 et 4 font partie de la superfamille de kinases CMGC (358). HIPK2 n'est ainsi pas apparentée aux MAPKK des voies ERK1/2, JNK, p38 et ERK5. Toutefois, les expériences de surexpression indiquent que cette kinase est en aval de TAK1 et en amont de NLK. Néanmoins, les évidences biochimiques montrant que HIPK2 est directement activée (et phosphorylée) par TAK1 manquent encore.

L'implication de HIPK2 dans la voie TAK1/NLK n'est montrée uniquement que pour la voie de dégradation de c-MYB (voir section 1.1.5.5.6.4.). On ignore si cette MAPKK putative médie les signaux dans les voies de WNT ou TGF- β /STAT3.

1.1.5.5.6. Fonctions de la voie NLK

1.1.5.5.6.1. Modulation de la voie WNT/ β -caténine

Les données disponibles indiquent que NLK est un régulateur de la voie WNT- β -caténine. Chez *C elegans*, des mutations dans la voie TAK1/NLK perturbent l'établissement de l'asymétrie antéro-postérieures, un processus dépendant de la voie WNT (437, 484). La fonction biochimique de NLK est de phosphoryler POP-1, le facteur à boîte HMG ciblé par la voie WNT. Chez le xénope, NLK est également un régulateur positif de la voie WNT dans le développement embryonnaire précoce. En particulier, NLK agit de concert avec la voie WNT dans l'induction du mésoderme et du neurectoderme (718). Chez les mammifères, NLK joue un rôle biochimique similaire (307). En effet, l'activation de la

voie TAK1/NLK conduit à la phosphorylation de protéines de la famille LEF/TCF (possédant également une boîte HMG). Quelles sont les conséquences fonctionnelles de l'activation de la voie NLK ? Chez *C. elegans*, le facteur à boîte HMG POP-1 est un répresseur transcriptionnel. La voie WNT entraîne l'inhibition de POP-1, via le cofacteur WRM-1 (Figure 13). La phosphorylation de POP-1 par NLK conduit à son inactivation, possiblement par une relocalisation du facteur de transcription du noyau au cytoplasme (608). En séquestrant POP-1 dans le cytoplasme, NLK potentialise ainsi la réponse WNT. À l'opposé chez les mammifères, les facteurs TCF1-4 (homologues de Pop-1) sont surtout connus comme étant des activateurs transcriptionnels en association avec β -caténine (51). De manière similaire à POP-1, les protéines LEF/TCF sont inactivées par phosphorylation. Spécifiquement, il fut montré que la phosphorylation inhibe l'activité de liaison à l'ADN des protéines LEF/TCF. L'activité de la voie NLK inactive donc le complexe TCF/ β -caténine, inhibant la signalisation de la voie WNT. Ainsi, dépendant du contexte cellulaire, la voie NLK synergise ou antagonise la voie WNT (Figure 13).

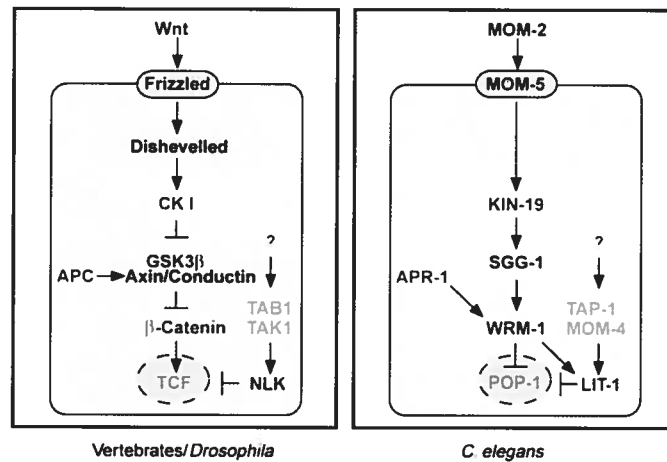


Figure 13: Régulation de la voie WNT par la voie TAB1/TAK1/NLK chez les métazoaires. Voir texte pour détails. Adaptée de (51).

1.1.5.5.6.2. Régulation de l'activité de STAT3

Récemment, la voie TAK1/NLK fut impliquée dans des réponses cellulaires régulées par STAT3 (374, 532). Les facteurs de transcription STAT sont activés par les tyrosine kinases JAK, formant ainsi la voie de signalisation JAK/STAT. Cette voie importante régule entre autres la prolifération et la différenciation cellulaire, notamment des cellules hématopoïétiques (voir revue (363)). Les facteurs STAT sont activés à la membrane

plasmique par phosphorylation en tyrosine exécutée par les JAK. Une fois phosphorylés, les STAT dimérisent et sont importés au noyau où ils influencent l'activité transcriptionnelle de gènes cibles comme c-MYC et c-FOS. Certains STAT, notamment STAT3, nécessite une phosphorylation en sérine en C-terminal pour une activité transcriptionnelle optimale. Les MAPK ERK1/2 et p38 peuvent phosphoryler ce site dans certaines circonstances (641). La kinase en amont de NLK, TAK1 fut identifiée par une approche biochimique comme étant une protéine interagissant avec STAT3 (374). Des expériences de transfection indiquent que NLK est impliquée dans la phosphorylation de STAT3 en C-terminal en réponse à l'interleukine 6 (IL-6). De manière intéressante, le substrat, STAT3, est requis pour une activation maximale de NLK en réponse à l'IL-6. STAT3 pourrait jouer un rôle d'échafaudage.

NLK phosphoryle également STAT3 en réponse au TGF- β . Chez la grenouille, l'induction du mésoderme en réponse au TGF- β nécessite la phosphorylation le STAT3 en C-terminal par NLK (532). La MAPKKK TAK1 est également impliquée dans ce processus. Le domaine SH2 de STAT3 est responsable de l'interaction avec NLK. On ignore si cette interaction est importante pour l'action positive de NLK sur STAT3.

1.1.5.5.6.3. Contrôle de la survie et de la mort cellulaire

Les MAPK classiques sont impliquées dans le contrôle de la survie et/ou la mort cellulaire. Similairement, NLK semble posséder une activité apoptotique. Ainsi, la surexpression de NLK induit l'apoptose chez les cellules DLD-1, une lignée isolée à partir d'un cancer du colon (819). Cet effet de NLK dépend de son activité kinase. Récemment, il fut montré que NLK influence négativement l'activité de nombreux facteurs de transcription, notamment NF- κ B (821). Parce que NF- κ B est un régulateur puissant de la survie cellulaire, il se peut que l'activité pro-apoptotique de NLK soit due à sa régulation négative de NF- κ B. Similairement, chez la drosophile, Nemo a des propriétés pro-apoptotiques (491).

À l'opposé, un crible basé sur le RNAi a identifié NLK comme un régulateur positif de la survie cellulaire (453). Ainsi, la suppression de l'expression de NLK augmente de plus de 5 fois l'apoptose chez les cellules HeLa. Bien que NLK soit décrit comme un régulateur

négatif de l'activité transcriptionnelle de p53 (821), l'apoptose induite par sa suppression n'est pas dépendante de ce facteur car les cellules HeLa n'ont pas de voie p53 fonctionnelle (193). On ignore comment l'absence de NLK affecte la survie cellulaire.

1.1.5.5.6.4. Régulation de la stabilité de c-MYB

NLK est un régulateur négatif du facteur de transcription c-MYB. c-MYB est impliqué dans la prolifération des précurseurs des cellules T (13). c-MYB est dégradé par le système ubiquitine-protéasome en réponse aux WNT. La cascade TAK1/NLK joue un rôle essentiel dans cette dégradation (339, 340). La phosphorylation directe de c-MYB par NLK est essentielle pour la dégradation de ce facteur de transcription. La phosphorylation est souvent un signal de dégradation (voir section 1.2.4.4.2.3.3.1.). La protéine kinase HIPK2 est également impliquée dans ce processus.

1.1.5.5.6.5. Phénotype des souris *Nlk* KO

Le phénotype résultant de l'absence de *Nlk* chez la souris est publié depuis un certain temps (378). Dans le fond génétique C57BL/6, le gène *Nlk* est essentiel pour le développement embryonnaire. En effet, les embryons *Nlk*^{-/-} meurent *in utero* durant les jours E14-E18 de causes encore inconnues. À l'opposé, les souris *Nlk* KO dans le fond génétique 129/Sv meurent 4 à 6 semaines après la naissance. Ces souris présentent des anomalies cérébrales et hématopoïétiques. Les souris *Nlk*^{-/-} ont un déficit en cellules sanguines. Des expériences de reconstitution chez des souris nue irradiées ont montré que NLK n'agit pas de manière cellulaire autonome ("cell autonomous") dans l'hématopoïèse. NLK est plutôt essentielle pour le développement des cellules stromales de la moelle osseuse, tissu indispensable pour la différenciation des cellules hématopoïétiques. Malheureusement, l'étude des souris *Nlk*^{-/-} n'a pas encore permis de confirmer (ou d'infirmer) le rôle de NLK dans les voies WNT, STAT3, c-MYB de même que la survie et/ou l'apoptose.

1.1.5.6. La voie ERK8 (et ERK7)

ERK7 (et son homologue humain ERK8) forme une voie de signalisation peu caractérisée. Les données montrent néanmoins que ERK7 semble avoir un rôle dans le contrôle de la

prolifération cellulaire et également dans la réponse aux oestrogènes. La régulation de l'activité de ERK7 est également unique parmi les MAPK (voir revue (72)).

1.1.5.6.1. Identification

Par une approche basée sur le PCR, Abe et al. ont amplifié à partir d'ARN de rat un fragment du domaine kinase de ERK7 à l'aide d'amorces spécifiques aux régions très conservées des MAPK (3). Le cDNA de ERK7 a par la suite permis l'identification de son homologue humain, nommé ERK8, par homologie de séquence (4). Le groupe de MR Rosner a nommé ces deux homologues différemment du fait que leur homologie de séquences est relativement faible, soit 69 % d'identité. L'analyse des génomes séquencés révèle que des homologues de ERK7 sont présents chez les vertébrés de même que la drosophile, le ver et l'amibe. De plus, une seule protéine de type ERK7 est présente par génome. Cependant, les séquences apparentées sont assez divergentes. Ainsi, ERK7 montre 51% d'identité avec son homologue du poisson zèbre (*Danio rerio*). En comparaison, JNK de drosophile est plus de 75% homologue avec la forme humaine! On peut donc penser que la divergence des homologues de ERK7 durant l'évolution est une caractéristique de cette famille de MAPK. Pour ces raisons, le groupe de Rosner aurait pu nommer l'homologue humain ERK7. Néanmoins, comme nous allons voir plus loin, ERK7 et ERK8 ne semblent pas avoir exactement les mêmes propriétés.

1.1.5.6.2. Structure

ERK7 présente un domaine kinase en N-terminal et une extension C-terminale de 195 acides aminés ne possédant pas d'homologie évidente avec d'autres protéines (Figure 5). Le motif TEY (identique aux MAPK ERK1/2/5) est présent dans sa boucle d'activation. L'extension en C-terminal contient deux motifs riches en prolines. Ces motifs peuvent interagir avec les domaines SH3 ou WW (685). Ainsi, il est montré que ERK8 peut interagir avec le domaine SH3 de la tyrosine kinase c-SRC (4). L'extension en C-terminal semble importante (i) pour permettre une phosphorylation optimale de ERK7 *in vivo*; (ii) pour la localisation nucléaire; (iii) pour permettre l'interaction avec ses partenaires (voir plus loin) et (iv) pour son activité anti-proliférative.

1.1.5.6.3. Expression

ERK8 est un enzyme ubiquitaire. Le rein, le poumon et les testicules sont des organes présentant une expression élevée de ERK8 (4). L'expression du messager de ERK7 est similaire chez le rat. Le groupe qui identifia ERK7 publia une étude en 2004 montrant que cette MAPK est régulée au niveau de sa stabilité protéique (397). Ainsi, ERK7 semble constitutivement dégradée par le système ubiquitine-protéasome. La dégradation de ERK7 n'est pas dépendante de la présence de son extension C-terminale ou bien de son activité catalytique. L'extrémité N-terminale de ERK7 est plutôt impliquée dans son instabilité métabolique. En 2003, nous avons observé que ERK3 est régulée par un mécanisme similaire (voir chapitre 2). De manière intéressante, le groupe de Rosner suggère qu'un complexe SCF (voir section 1.2.4.4.2.3.) est responsable de l'ubiquitination et la dégradation de ERK7.

1.1.5.6.4. Régulation de l'activité de ERK7 (et ERK8)

ERK7 possède une activité kinasique *in vitro* (3). Comme les autres MAP kinases, cette activité dépend de la phosphorylation de la boucle d'activation. ERK7 phosphoryle certains substrats de MAP kinases comme la MBP, c-FOS et c-MYC. D'après sa séquence primaire, ERK7 devrait être une "proline-directed kinase". Néanmoins, aucune évidence ne confirme encore cette prédiction. L'homologue ERK8 semble avoir une spécificité de substrats plus stringente. En effet, le seul substrat *in vitro* identifié de ERK8 est la MBP (4).

ERK7 possède le motif TEY dans sa boucle d'activation. Contrairement aux MAP kinases décrites plus haut, ERK7 est constitutivement phosphorylée sur sa boucle d'activation (3). Ainsi, aucun signal n'a été découvert pouvant faire changer la phosphorylation activatrice. De manière surprenante, cette phosphorylation est le résultat d'une autophosphorylation. En effet, un mutant inactif de ERK7 n'est pas phosphorylé sur son motif TEY alors que la protéine de type sauvage l'est dans des expériences de transfection transitoire. ERK7 recombinante produite en bactérie est également doublement phosphorylée sur la boucle d'activation, démontrant que ERK7 est capable de s'autophosphoryler et ainsi s'autoactiver

(2). Il est possible que la régulation de ERK7 ressemble à celle de p38 α par TAB1 (voir section 1.1.5.3.4.). Ainsi, il est possible que l'autophosphorylation de ERK7 soit régulée par un cofacteur.

L'autophosphorylation de ERK7 est influencée par son extension C-terminale. Un mutant de ERK7 tronqué en C-terminal n'est presque pas activé, suggérant que l'extension joue un rôle positif important pour l'activité de ERK7 (2, 3). On ignore le mécanisme d'action du C-terminal.

De manière semblable à ERK7, un mutant inactif de ERK8 n'est pas phosphorylé *in vivo*, suggérant que ERK8 est capable de s'autophosphoryler (4). Une forme de ERK8 recombinante est également active. Néanmoins, le groupe de Rosner prédit l'existence d'une voie d'activation de ERK8 dépendante de c-SRC (4). En effet, ERK8 s'associe avec c-SRC *in vitro* et *in vivo*. Cette association serait médiée par deux motifs PxxP présents dans la queue C-terminal de ERK8. L'expression de formes oncogéniques de c-SRC entraîne la phosphorylation d'un mutant inactif de ERK8, suggérant qu'il y aurait une MAPKK de ERK8. ERK8 pourrait donc faire partie d'une des voies de signalisation activée par c-SRC. On ignore l'implication des motifs riches en proline de l'extension C-terminale dans l'activation de ERK8 par c-SRC.

Comme les autres MAP kinases, la phosphorylation de ERK7 est sensible à l'action des phosphatases à double spécificité de la famille MKP. Ainsi, MKP1 pourrait être un régulateur négatif de la phosphorylation et de l'activité biologique de ERK7 (et/ou ERK8) (3).

1.1.5.6.5. Membres de la voie ERK7 (et ERK8)

Contrairement aux voies décrites plus haut, la voie de signalisation ERK8 (et de ERK7) est très peu caractérisée. Le fait que ERK7 s'autoactive *in vivo* laisse supposer que cette MAPK ne requiert pas de MAPKK. L'étude de l'homologue humain ERK8 suggère que l'activation de celle-ci nécessiterait l'action d'une MAPKK activé par la tyrosine kinase c-SRC.

1.1.5.6.6. Fonctions de la voie ERK7

La fonction physiologique de ERK7 (et de ERK8) reste à déterminer. Le phénotype de son inactivation génique chez la souris est inconnu. Cependant, il existe quelques pistes.

1.1.5.6.6.1. Régulation négative de la prolifération cellulaire

Comme d'autres MAPK, ERK7 aurait une action sur le cycle cellulaire. En effet, la surexpression de ERK7 induit un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire (3). Un mutant de ERK7 dont il manque le C-terminal n'affecte pas le cycle cellulaire. L'absence d'effet de ce mutant tronqué pourrait être la conséquence de sa faible activité enzymatique. Cependant, une forme inactive de ERK7 (pleine longueur) est aussi efficace que la protéine sauvage pour stopper les cellules. L'effet de ERK7 sur le cycle cellulaire ne nécessite donc pas la phosphorylation de ces substrats putatifs. Le mutant tronqué est cytoplasmique, contrastant avec la localisation nucléaire de la protéine de type sauvage et ceci pourrait expliquer l'absence d'effet sur le cycle cellulaire. Sans étude de type "perte de fonction", il est présentement impossible de savoir si ERK7 a une action positive ou négative sur le cycle cellulaire. De plus, les cibles spécifiques de ERK7 dans ce phénomène sont inconnues.

1.1.5.6.6.2. Rôle dans le transport du chlore

Un criblage par double hybride utilisant l'extension C-terminale de ERK7 comme appât a permis d'identifier le canal chloreux CLIC3 comme une protéine d'interaction (584). CLIC3 semble associé à la membrane nucléaire par immunofluorescence. CLIC3 n'est pas un substrat *in vitro* de ERK7. Du fait que CLIC3 est une protéine transmembranaire, il est possible que le substrat GST-CLIC3 utilisé dans cette étude fût mal replié. L'effet de ERK7 sur l'état de phosphorylation de CLIC3 *in vivo* n'a pas été évalué. Plus important encore, l'effet de ERK7 sur l'activité de CLIC3 (et vice versa) n'a pas été testé.

1.1.5.6.6.3. Rôle dans la signalisation du récepteur à l'œstrogène

ERK7 semble être un régulateur important de la réponse aux estrogènes (274). Ainsi, l'expression du récepteur des oestrogènes, le ER α , est contrôlée notamment au niveau de sa stabilité protéique. La surexpression de ERK7 induit une dégradation accrue du récepteur ER α . Cette dégradation accrue est médiée par le système ubiquitine-protéasome. L'activité kinase de ERK7 est requise dans ce phénomène. Il est possible que ERK7 phosphoryle directement ER α le signalant ainsi pour la dégradation. Alternativement, ERK7 pourrait être responsable d'activer les enzymes de dégradation de ER α (telle une E3 ubiquitine ligase, voir section 1.2.4.4.) en les phosphorylant. L'étude future de cellules *Erk7*^{-/-} permettront de valider l'implication possible de ERK7 dans la dégradation du ER α .

1.1.5.7. La voie ERK3/4

ERK3 est une des premières MAPK identifiée moléculairement chez les mammifères. Cependant, elle appartient à une voie mal comprise (voir review (72, 483)).

1.1.5.7.1. Identification

ERK3 fut clonée par homologie de séquences avec ERK1 il y a plus de 15 ans! (81). Initialement clonée chez le rat, ERK3 était décrit comme une protéine de 543 acides aminés, soit environ 63 kDa. Quelques années plus tard, ERK3 fut cloné par le groupe de JS Flier et le nôtre à partir de banques de cDNA humains (482, 846). De façon surprenante, les isoformes clonées de ERK3 humain se sont avérées codant pour une protéine de plus grande taille. En alignant les séquences de ERK3, nous avons observé l'absence d'un nucléotide dans la séquence publiée de ERK3 de rat, entraînant un codon stop prématuré. L'addition du nucléotide restaure le cadre de lecture et génère une protéine pleine longueur. Benjamin Turgeon, un étudiant au doctorat travaillant également sur ERK3 au sein de notre équipe, a entrepris le reséquencage de ERK3 chez le rat. Il a pu confirmer que ERK3 est bien une protéine de 720/721 acides aminés chez les mammifères (732).

Une année après le clonage initial de ERK3 chez le rat, une séquence humaine homologue à ERK3 fut identifiée (240). Cette protéine est 70% homologue à ERK3, suggérant qu'elle est un orthologue et non l'homologue humain direct. Cette protéine de 557 acides aminés initialement connue sous le nom de p63^{MAPK} est maintenant nommée ERK4. Récemment, Justine Rousseau, une étudiante au doctorat travaillant sur ERK4, et Benjamin Turgeon ont remarqué une erreur de séquençage également dans la première séquence publiée de cette kinase. Comme ERK3, l'erreur dans la séquence de ERK4 change le cadre de lecteur et produit une protéine légèrement tronquée. La séquence révisée de ERK4 code pour une protéine de 587 acides aminés ayant un poids moléculaire de 65 kDa (Justine Rousseau, Benjamin Turgeon et Sylvain Meloche, données non publiées). Ces anecdotes montrent que certaines "vieilles" séquences pourraient contenir des erreurs de séquençage et/ou des artéfacts de clonage. Il est donc important de consulter des séquences plus récentes dans les banques de données.

1.1.5.7.2. Structure

ERK3 est une protéine de 721 acides aminés présente uniquement chez les vertébrés. Ainsi, aucun homologue de ERK3 n'a été trouvé chez la levure, le nématode ou la drosophile. Ce qui distingue structurellement ERK3 des autres MAPK est (i) la présence d'une longue extension en C-terminal, (ii) la présence de la séquence SEG dans la boucle d'activation au lieu du motif TXY et (iii) la présence de la séquence SPR en place du très conservé APE du sous-domaine VIII. Ces particularités font de ERK3 une MAPK atypique. Le C-terminal de ERK3 ne présente pas d'homologie avec d'autres protéines (à part ERK4). On ignore la fonction exacte de cette extension. Catherine Julien, durant sa maîtrise, a montré que la localisation subcellulaire de ERK3 est influencée par le C-terminal. En fait, le C-terminal possède une activité d'export nucléaire (voir section 1.1.8.5.). J'ai collaboré à ces travaux (331) (voir annexe I). Une étude récente montre également que le C-terminal de ERK3 est impliqué dans sa localisation au ERGIC (ER-Golgi Intermediate Compartment) (63). Enfin, durant ma thèse, j'ai découvert que le C-terminal de ERK3 est essentiel pour son activité sur le cycle cellulaire (voir chapitre 4).

Comme ERK3, ERK4 possède les motifs SEG et SPR. L'extension de ERK4 est toutefois moins longue que celle de ERK3. Il y a néanmoins une certaine homologie entre les 100 premiers acides aminés des extensions de ERK3 et ERK4. L'extension de ERK4 possède des régions riches en prolines qui pourrait être des ligands de domaines SH3. On ignore le rôle de l'extension de ERK4 sur sa fonction et son activité.

La structure tridimensionnelle de ERK3 est inconnue. On peut néanmoins modéliser le domaine kinase de ERK3 en se basant sur la structure de ERK2, la protéine de structure connue la plus apparentée à ERK3. Ces modèles théoriques suggèrent que ERK3 se replie de manière similaire aux MAPK classiques (voir section 6.3.).

1.1.5.7.3. Expression

ERK3 est exprimée de manière ubiquitaire tel que révélé par des analyses Northern blot (732, 846). On observe la plus grande expression dans le cerveau et le muscle squelettique. Le patron d'expression de ERK3 nous suggère néanmoins une possible implication de ERK3 dans le contrôle de la prolifération et/ou de la différenciation. Ainsi, le transcrit de ERK3 augmente significativement lors de la différenciation des cellules F9 en cellules musculaire et en cellule neuronales (81). Également, l'expression de ERK3 augmente au courant de la différenciation terminale des cellules Raji (365). Durant ma caractérisation de ERK3, j'ai également observé que son expression protéique est induite durant la différenciation cellulaire (voir chapitre 2). D'un autre côté, notre groupe a observé que l'abondance du messenger de ERK3 variait au cours du développement embryonnaire de la souris. En effet, le messenger de ERK3 augmente jusqu'au jour 11 pour diminuer par la suite, suggérant une implication possible de cette kinase dans le développement embryonnaire (732).

À l'instar de ERK3, ERK4 est une protéine ubiquitaire. La plus grande expression est observée dans le cerveau et le cœur (240). Les banques de données de type "expressed sequence tag" (EST) révèlent que ERK4 est également exprimée dans le poumon, l'intestin grêle, le rein et la rétine.

1.1.5.7.4. Régulation de l'activité de ERK3/4

L'activité enzymatique de ERK3 est difficile à mettre en évidence. ERK3 recombinante produite en bactérie n'est capable que de s'autophosphoryler et n'est pas active envers des substrats génériques (128). La même situation est observée pour les MAPK classiques, indiquant que ces enzymes nécessitent des modifications post-traductionnelles pour être actifs. En 1994, le groupe de JS Flier montra que ERK3 endogène immunoprécipitée de cellules HeLa est capable de phosphoryler l'histone H1 *in vitro* (846). Malheureusement, le design expérimental ne permet pas de savoir si l'activité observée origine bien de ERK3 ou plutôt d'une protéine kinase associée. À l'opposé, le groupe de MH Cobb n'a pu détecter d'activité spécifique de ERK3 envers de nombreux substrats génériques des MAPK tels MBP, histone H1, MAP2, c-JUN, TAL1, MYOD et ELK1 (128). Nous avons obtenu des résultats similaires (voir chapitre 4). Les raisons possibles de cette absence d'activité *in vitro* sont discutées à la section 6.3.

L'absence d'un essai biochimique spécifique ne facilite pas l'identification des signaux conduisant à l'activation de ERK3. Le groupe de JS Flier a montré que l'insuline, le sérum mais surtout le TPA (tétradecanoyl phorbol acétate) active ERK3 endogène (846). Nous n'avons pu reproduire ce résultat. L'étude de la phosphorylation activatrice est néanmoins possible. Depuis 1996, on sait que ERK3 est phosphorylée sur la sérine 189 présente dans sa boucle d'activation (128, 129). Jusqu'à maintenant, on ignorait la régulation de cette modification. Au cours de mes études doctorales, nous avons pu constater que la phosphorylation de la Ser189 est constitutive et semble peu influencée par les signaux extracellulaires (voir chapitre 4).

Contrairement aux MAPK classiques, l'expression de ERK3 varie beaucoup dépendant du contexte physiologique. L'activité de ERK3 pourrait ainsi être principalement régulée au niveau de son expression. En accord avec cette idée, j'ai découvert que l'expression de ERK3 est étroitement liée au système ubiquitine-protéasome (voir section 1.2, chapitres 2 et 3).

La régulation de ERK4 est encore moins bien caractérisée. Comme ERK3, les substrats de ERK4 restent à être identifiés. De plus, il n'est pas connu si la phosphorylation de la sérine

186 activatrice de ERK4 est régulée. On sait néanmoins que ce site est phosphorylé *in vivo* (J Rousseau, C Julien et S Meloche, données non publiées).

1.1.5.7.5. Membres de la voie ERK3/4

Tout comme ERK7, la voie ERK3/4 est mal définie. Une activité kinase liant fortement et spécifiquement le domaine kinase de ERK3 a été partiellement purifiée (129). Cette activité phosphoryle la sérine 189 de ERK3 (et potentiellement la serine 186 de ERK4) équivalant à la thréonine 183 de ERK2. L'identité de cette ERK3 kinase est actuellement inconnue. L'identification de la ERK3 kinase permettrait d'en savoir plus sur cette voie de signalisation. D'un autre côté, ERK3 pourrait s'associer avec la MAPKKK RAF-1 (356). On ignore les conséquences de cette interaction sur l'activité de ces deux protéines.

1.1.5.7.6. Fonctions de la voie ERK3/4

La fonction physiologique de ERK3 et ERK4 est présentement inconnue. Toutefois, les évidences disponibles suggèrent un rôle possible de cette voie dans la différenciation cellulaire et la réponse aux stress.

1.1.5.7.6.1. Implication potentielle dans la prolifération et/ou la différenciation cellulaire

Les données d'expression suggèrent un rôle de ERK3 dans la prolifération et/ou la différenciation. En effet, ERK3 est induite dans de nombreux modèles de différenciation cellulaire. Durant cette thèse, j'ai observé que ERK3 avait un effet négatif sur la prolifération cellulaire (voir chapitre 2). Dans ce sens, cette kinase pourrait faciliter la différenciation cellulaire. De manière similaire, le groupe de DL Crowe a observé que ERK3 avait des propriétés anti-prolifératives (152). En effet, la surexpression de ERK3 inhibe la prolifération des cellules de carcinomes squameux. L'activité de ERK3 sur le cycle cellulaire sera discutée plus en détail à la section 6.4.

1.1.5.7.6.2. Rôle essentiel pour la viabilité post-natale

L'inactivation du gène de *Erk3* chez la souris a été exécutée dans notre équipe par Benjamin Turgeon. Les données préliminaires indiquent que ERK3 est essentielle à la survie après la naissance (B Turgeon et S Meloche, données non publiées). Les souris déficientes en ERK3 meurent notamment de détresse respiratoire. Les conséquences de l'absence de ERK4 sont encore inconnues.

1.1.5.7.6.3. Résistance aux stress de la voie du protéasome

En 2000, le groupe de P Fürst a publié une étude sur la réponse transcriptionnelle suite à l'inhibition pharmacologique du protéasome (849). Parmi les gènes induits se trouvait ERK3. De manière intéressante, l'induction de ERK3 est dépendante de l'activité de la MAPK p38. Cette régulation transcriptionnelle de ERK3 par le système ubiquitine-protéasome est distincte de la régulation directe de la stabilité de ERK3 par ce système protéolytique que nous avons découvert. Les auteurs ont fait l'étrange observation que la surexpression de ERK3 protège les cellules de la mort cellulaire induite par l'inhibition du protéasome. On ignore comment ERK3 agit sur la survie cellulaire.

1.1.5.7.6.4. Activation de la MAPKAPK-5 (MK5/PRAK)

Récemment, trois groupes ont identifié MK5 comme étant une protéine d'interaction avec ERK3 (640, 651). Cette interaction fut trouvée par double hybride et par TAP-tagging. MK5 fait partie d'une famille de kinases activées par les MAPK. Cette famille comprend MNK1/2, MSK1/2, RSK1-4 et les MAPKAPK2/3/5 ou MK2/3/5 (620). Ces kinases sont activées par les MAPK par phosphorylation directe. MK5 fut initialement perçu comme étant un substrat de p38 α (518). Ainsi, dans certains essais, on peut détecter une interaction entre MK5 et p38. De plus, une activation non physiologique de p38 (induite par la surexpression d'un activateur constitutivement actif) conduit à une activation de MK5. Cependant, on estime maintenant que MK5 n'est probablement pas un substrat physiologique de p38. En effet, l'activation physiologique de la voie p38 n'induit pas l'activation de MK5 (658). Les deux études indépendantes montrent que ERK3 et MK5 s'associent *in vivo*. Cette association entraîne un changement de localisation des deux

protéines, qui se retrouvent maintenant cytoplasmiques et exclues du noyau. De manière intéressante, l'association de MK5 avec ERK3 semble augmenter l'expression de cette dernière. On ignore si cet effet de MK5 sur ERK3 est transcriptionnel ou post-transcriptionnel.

La conséquence la plus importante de la formation de ce complexe est l'activation et la phosphorylation de MK5. De manière intrigante, les deux études ne s'entendent pas sur la manière dont s'effectue la phosphorylation activatrice de MK5. Une étude, celle de SM Keyse, conclut que ERK3 est responsable de la phosphorylation de MK5 (651). À l'opposé, l'étude provenant du laboratoire de M Gaestel conclut que l'association de ERK3 avec MK5 induit cette dernière à s'autophosphoryler, entraînant son activation (640). En regardant attentivement les deux études, on peut se rendre compte qu'aucune ne répond vraiment à la question – à savoir est-ce que ERK3 phosphoryle directement MK5. Pour ce faire, il est impératif d'utiliser une forme de MK5 catalytiquement inactive, empêchant ainsi son autophosphorylation. En attendant ce résultat, il est encore trop tôt pour crier victoire dans la quête d'un substrat de ERK3! Indépendamment du mécanisme fin, il est clair à l'examen de ces deux études que ERK3 est un régulateur positif important de l'activité de MK5. Quelle est la pertinence physiologique de cette interaction? Les souris *Mk5* KO ne présentent à toute fin pratique aucun phénotype (658). Rappelons que les souris *Erk3* KO meurent à la naissance (B Turgeon et S Meloche, données non publiées). Il semble donc que MK5 ne soit pas l'effecteur majeur médiant l'activité biologique de ERK3. Alternativement, il se peut que l'activité de MK5 soit compensée par un autre gène, potentiellement MK2 ou MK3.

1.1.6. Régulation positive de l'activité des MAPK par phosphorylation

Les données génétiques et biochimiques indiquent que l'activité biologique et enzymatique des MAPK est strictement dépendante de la phosphorylation de la boucle d'activation. La phosphorylation de la thréonine ET de la tyrosine du motif TXY est essentielle pour la pleine activation des MAPK. L'analyse de la structure de ERK2 sous forme non-phosphorylée et di-phosphorylée nous permet de comprendre le mécanisme d'activation des MAPK.

En 1994, les groupes de MH Cobb et EJ Goldsmith ont décrit la première structure d'une MAPK, ERK2 sous forme non-phosphorylée (834). La structure de ERK2 ressemble à celle d'autres sérine/thréonine kinases. Les auteurs ont avancé deux hypothèses pour expliquer la faible activité de apo-ERK2. Tout d'abord, ERK2 a une conformation dite ouverte, correspondant à une ouverture des lobes. Dans cette configuration, les résidus catalytiques ne sont pas positionnés de manière optimale pour la catalyse. D'un autre côté, la tyrosine 185 du motif TXY occupe le site actif, empêchant les substrats d'y accéder (Figure 14B et C). Ainsi, cette observation explique le fait que ERK2, un sérine/thréonine kinase, s'autophosphoryle préférentiellement sur la Tyr185 *in vitro* (797).

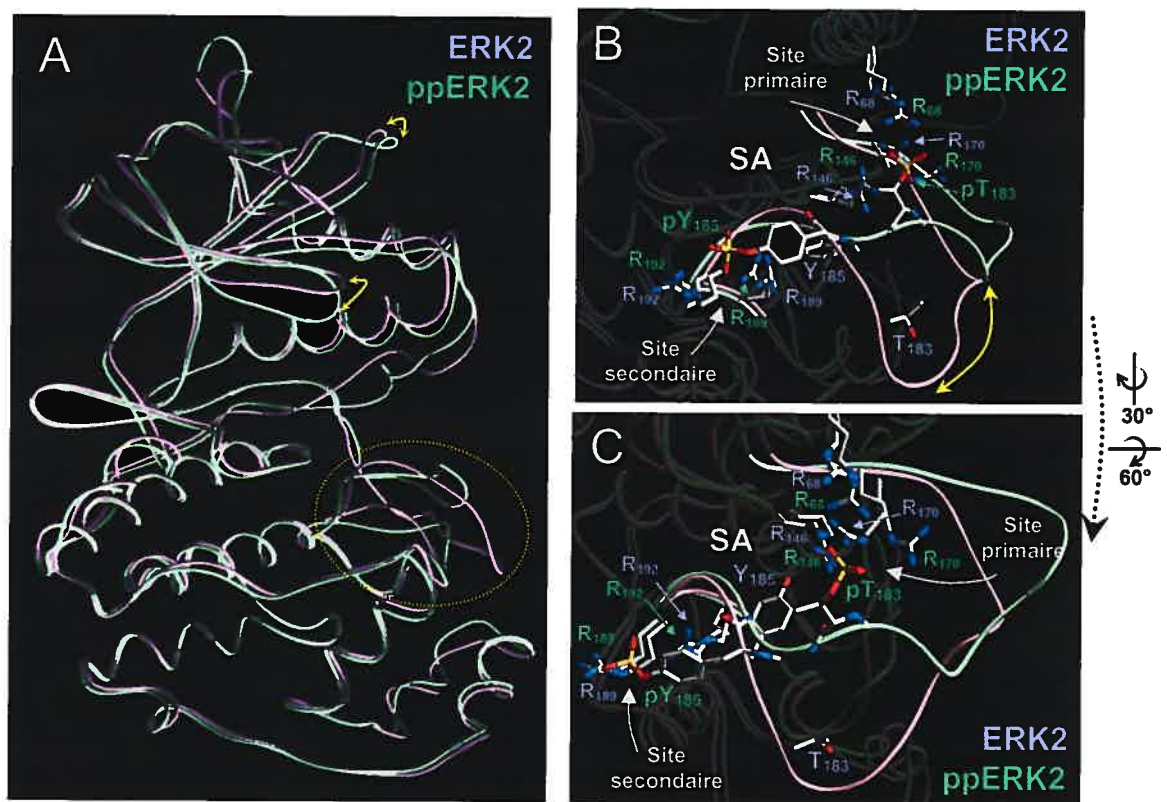


Figure 14: Mécanisme d'activation des MAPK par phosphorylation. (A) Superposition de ERK2 sous forme phosphorylée (en vert) ou non (en violet). Remarquez que la phosphorylation induit un rapprochement des lobes de ERK2 (flèches en jaune). La boucle d'activation subit également un réarrangement (encerclée en jaune). (B) et (C) Positions des arginines impliquées dans la liaison de la pT183 et la pY185. Notez que les deux sites de liaisons sont présents même en l'absence de phosphorylation. SA indique la position approximative du site actif. Adaptée de (106, 834). Figure faite à l'aide de SPDBV 3.7.

Trois années plus tard, ces mêmes chercheurs ont décrit la structure de ERK2 sous forme phosphorylée (106). La forme active de ERK2 est dans une configuration fermée, semblable à celle de la PKA (367, 841). Cette conformation provient d'un rapprochement des deux lobes (Figure 14A, en jaune). Comment la phosphorylation induit ce changement

conformationnel? Les MAPK font partie des protéines kinases que l'on nomme les kinases RD (325). Cette nomenclature origine de la présence d'une arginine (R146) juste avant l'acide aspartique catalytique (D147). Cette arginine est importante car elle forme un site de liaison intramoléculaire pour le phosphate de la Thr183 (Figure 14B et C). Ce site de liaison, nommé site RD ou primaire, comprend également deux autres arginine (R68 et R170, Figure 14). L'association de la pThr183 avec le site RD permet un rapprochement des deux lobes. De plus, la phosphorylation induit un changement conformationnel majeur de la boucle d'activation (Figure 14B, en jaune). La tyrosine 185 phosphorylée interagit avec un deuxième site basique constitué des arginines 189 et 192. Cette nouvelle position libère le site actif. En superposant les deux structures de ERK2, on observe que les sites primaire et secondaire de liaison du phosphate sont préformés en l'absence de phosphorylation.

La double phosphorylation a deux autres conséquences. Elle induit l'homodimérisation de ERK2 via une interface impliquant l'histidine 176 et les leucines L333, L336, L341 et L344 en C-terminal (106, 352). De manière intéressante, phospho-ERK2 peut dimériser avec une forme non-phosphorylée. Finalement, la phosphorylation, en remodelant la boucle d'activation, démasque un site hydrophobe permettant d'interagir avec le site d'arrimage de type FxF(P) (voir section 1.1.10.2.2.) (419). On estime que ces deux derniers effets de la phosphorylation jouent un rôle important dans l'import nucléaire de ERK2 (voir section 1.1.8.).

1.1.7. Régulation négative de l'activité des MAPK par déphosphorylation

Une étape de déphosphorylation est nécessaire à l'inactivation des MAPK. *In vivo*, cette étape est effectuée par une catégorie d'enzymes nommés collectivement protéine phosphatases. Les protéines phosphatases sont classées selon leur spécificité de substrat. Ainsi, il existe des phosphatases spécifiques aux phospho-sérines/thréonines, aux phospho-tyrosines et finalement les phosphatases à double spécificité. Les MAPK devant être doublement phosphorylées pour être actives, l'hydrolyse d'un seul phosphate est suffisante pour les inactiver. De cette façon, les MAP kinases sont sensibles aux trois catégories de phosphatases.

1.1.7.1. Sérine-thréonine phosphatases

Chez les mammifères, il existe plusieurs familles de sérine/thréonine phosphatases (PP), les plus étudiées étant PP1, PP2A, PP2B (ou calcineurine) et PP2C (143). Les PP sont des hydrolases métallo-dépendantes. Les mammifères possèdent un répertoire limité de PP comparativement au nombre de PK. La spécificité de ces enzymes provient de leur association avec une variété de sous-unités régulatrices. Par exemple, PP1 interagit avec son substrat lamine B via la sous-unité régulatrice AKAP149 (679). L'activité des PP est sensible à certaines toxines (225). Ainsi, l'acide okadaïque et la microcystine, provenant respectivement de certaines espèces de crustacés et de cyanobactéries, inhibent l'activité de PP1 et PP2A. Ces réactifs sont souvent utilisés pour mettre en évidence l'implication des PP dans des processus biologiques donnés.

In vitro, les MAPK sont sensibles à l'action des PP. Il en résulte une déphosphorylation spécifique du résidu thréonine de la boucle d'activation. Ainsi, PP2A peut déphosphoryler ERK1/2, JNK et p38 *in vitro* (239, 696). Grâce aux inhibiteurs pharmacologiques des PP, leur rôle dans le contrôle des MAPK *in vivo* a pu être montré. Par exemple, l'acide okadaïque induit et prolonge l'activation de ERK1 (614) et p38 (690).

Les kinases activatrices des MAPK, les MAPKK et MAPKKK, sont également régulées positivement par phosphorylation, principalement sur des sérines et thréonines. Il est donc possible que les inhibiteurs des PP agissent en amont des MAPK. Le groupe de RG Anderson a toutefois apporté des évidences fortes de l'implication de PP2A dans la régulation directe de la phosphorylation de ERK1/2 (761). Ainsi, il existe un complexe de haut poids moléculaire chez les fibroblastes humains pouvant spécifiquement déphosphoryler ERK1/2 sur les deux résidus de la boucle d'activation. Ce complexe est sensible à l'acide okadaïque, impliquant ainsi une PP. Des analyses biochimiques ont montré que ce complexe contient deux phosphatases : PP2A et la tyrosine-spécifique phosphatase HePTP. Il est à noter que ce complexe requiert la présence de cholestérol.

1.1.7.2. Tyrosine phosphatases

Les tyrosines phosphatases (PTP) sont des enzymes clés régulant, entre autres, la croissance et la prolifération (voir revue (721)). Chez les mammifères, il existerait une centaine de PTP. Les PTP peuvent être classés selon qu'elles soient transmembranaires (appelé récepteur-PTP) ou solubles. Ces enzymes contiennent un domaine d'environ 20 kDa possédant le motif [I/V]HCXXGXXR[S/T]. La cystéine de ce motif est un résidu catalytique essentiel impliqué dans l'attaque nucléophile du phosphate de la phosphotyrosine. Les données cristallographiques indiquent que la cystéine catalytique est située au fond d'une cavité pouvant parfaitement accueillir une tyrosine phosphorylée (840).

Chez les mammifères, les évidences indiquent que les PTP régulent négativement les MAPK. Ainsi, l'inhibition pharmacologique des PTP entraîne une forte induction de ERK1/2, p38, JNK et ERK5 (1, 418, 624). Parce que les PTP agissent négativement sur les récepteurs tyrosine kinases, il est concevable que l'effet des inhibiteurs des PTP résulte d'une activation des voies de signalisation en amont des MAPK. L'implication directe des PTP fut néanmoins révélée par l'observation d'interactions spécifiques entre celles-ci et les MAPK. Pulido et al. ont identifié ERK1/2 comme étant des protéines s'associant aux tyrosine phosphatases PTP-SL et STEP (580). Ces deux PTP déphosphorylent directement la tyrosine du motif TEY de ERK1/2. L'expression d'un mutant inactif de PTP-SL (C480S) prolonge l'activation de ERK2 en réponse au sérum, impliquant ainsi cette PTP dans l'inactivation de ERK2 *in vivo*. D'un autre côté la surexpression de PTP-SL diminue l'activation de ERK2. Les MAPK p38 α et ERK5 sont également susceptible d'être inactivées par ces PTP (98, 510).

Une observation intéressante faite par Pulido et al. est que l'association de ERK1/2 avec ces PTP n'est pas médiée par le domaine phosphatase. Plutôt, PTP-SL et STEP interagissent avec ERK1/2 via une séquence N-terminal au domaine PTP. Plus précisément, l'interaction nécessite un motif riche en acides aminés basiques et hydrophobes nommé KIM (pour Kinase Interaction Motif). Le KIM est présent chez les PTP interagissant avec les MAPK, soit PTP-SL, STEP et HePTP. Plusieurs groupes, notamment celui de E Nishida, ont identifié des séquences semblables au KIM dans d'autres molécules interagissant avec les MAPK, notamment les MAPKK, les MKP et les substrats (702). Le

motif KIM est en fait un site d'arrimage de MAPK et est discuté plus en détail à la section 1.1.10.

1.1.7.3. Phosphatases à double spécificité (MKP/DUSP)

La régulation négative des MAPK est principalement exécutée par une classe spécifique de phosphatases, les phosphatases à double spécificité (DUSP ou MKP) (voir (197)). Ces enzymes sont caractérisés par leur activité envers les résidus sérine-, thréonine- ET tyrosine- phosphorylés. Les DUSP sont retrouvées chez tous les organismes possédant des homologues de MAPK. Les MKP sont caractérisées par la présence d'un domaine de 200 acides aminés contenant la séquence HCXXXXXR. Mécanistiquement, les MKP ressemblent aux PTP dans le sens qu'elles possèdent une cystéine catalytique nucléophile.

La première DUSP identifiée est VH1 (245). Cette phosphatase, provenant du virus vaccinia, a été clonée par son homologie avec les PTP conventionnelles. Il a été observé de façon surprenante que VH1 possède une activité double spécificité *in vitro*. Un an plus tard, MKP1/DUSP1, un homologue de VH1 de mammifère, fut identifiée (116). MKP1, un gène induit par le sérum, fut testée sur différents substrats phosphorylés en sérine-thréonine et/ou tyrosine et ERK2 fut identifiée comme étant un substrat potentiel. De nombreuses autres protéines homologues à MPK1 et VH1 furent clonées par la suite (voir (197)). Les MKP peuvent être regroupées selon leur spécificité de substrat. Cependant, cette spécificité est déterminée à partir d'expérience *in vitro* ou de surexpression, ce qui ne peut représenter la réalité *in vivo*. Les MKP sont plutôt regroupées en quatre classes, selon leur structure primaire.

1.1.7.3.1. Classe I

Cette classe comprend DUSP3/VHR, DUSP13/SKRP4, DUSP14/MKP6, DUSP19/SKRP1, DUSP22/JSP1/VHX et DUSP26/SKRP3/MKP8. Les membres de cette classe sont de petites protéines d'environ 200-250 acides aminés ne possédant que le domaine DUSP (Figure 15). La spécificité de ces MKP a été caractérisée pour les MAPK classiques. Ainsi, ERK1 est préférentiellement déphosphorylée par DUSP3, p38 par DUSP26 et JNK par

DUSP13, 14, 19 et 22 (voir revue (197)). Il est intéressant de mentionner que DUSP19/SKRP1 joue un rôle d'échafaudage de la voie ASK1/JNK (voir section 1.1.9.2.2.3.). L'analyse du génome humain révèle la présence de membres additionnels à cette classe. Ainsi, les cellules humaines expriment DUSP18/LMWDSP20, DUSP21, DUSP25/VHZ, LOC285193 et FMDSP. On ignore encore les caractéristiques biochimiques de ces enzymes et leur activité envers les MAPK.

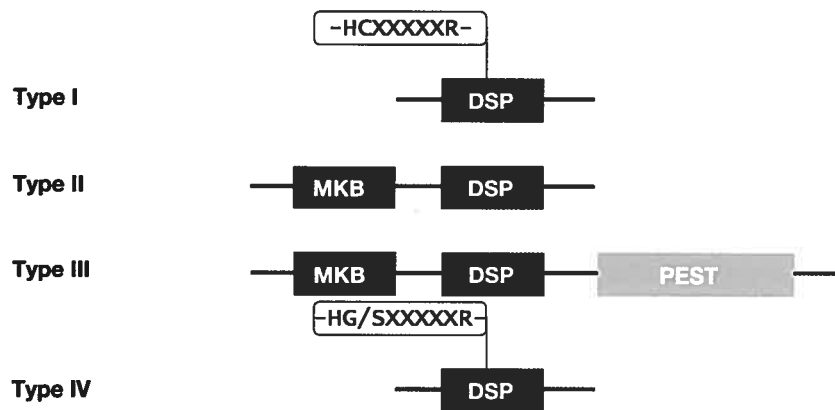


Figure 15: Les phosphatases à double spécificité MKP/DUSP peuvent être regroupées en 4 classes. Les MKP de la classe I ne possèdent que le domaine phosphatase (DSP). Les MKP de classe II sont caractérisées par un domaine liant les MAPK (MKB) alors que les classe III possèdent en plus un domaine riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine (PEST). La classe IV comprend uniquement des homologues de MKP inactifs. Ces derniers ne possèdent pas la cystéine catalytique tel qu'illustré. Adaptée de (197).

1.1.7.3.2. Classe II

Les membres de la seconde classe de MKP sont de plus grande taille (300-400 acides aminés), dû à la présence d'une extension en N-terminal du domaine DUSP (Figure 15). Cette classe comprend DUSP1/MKP1, DUSP2/PAC1, DUSP4/MKP2, DUSP5/hVH3, DUSP6/MKP3/PYST1, DUSP7/PYST2, DUSP9/MKP4 et DUSP10/MKP5. Comme pour la classe précédente, les MKP de classe II sont susceptibles d'inactiver une ou plusieurs MAPK. Ainsi, DUSP2, 4, 5, 6, 7, et 9 sont actives envers ERK1/2, DUSP1, 4, 7, 9 et 10 agissent sur JNK alors que DUSP1 et 10 inactivent p38 (voir (197)). L'extension N-terminale de ces MKP est moins conservée que le domaine catalytique. Cependant, on observe dans cette extension la présence d'une région commune aux membres de cette classe de MKP. Cette région, nommée MKB (pour MapK Binding domain) est impliquée dans l'interaction avec les MAPK (507). Le domaine MKB contient une séquence analogue au KIM présent chez les PTP.

1.1.7.3.3. Classe III

Cette classe ne comprend que deux membres : DUSP8/hVH5 et DUSP16/MKP7. Comme la classe II, DUSP8 et 16 possèdent un domaine MKB en N-terminal permettant d'interagir avec leur substrat. La classe III est caractérisée par la présence d'un domaine PEST en C-terminal du domaine DUSP. DUSP8 et 16 sont ainsi les MKP ayant le plus haut poids moléculaire (Figure 15). Les domaines PEST contiennent des signaux d'instabilité protéique ou dégrons (593). En accord avec cette idée, le domaine PEST s'est révélé impliqué dans l'instabilité protéique de DUSP16 (468). DUSP 8 et 16 déphosphorylent préférentiellement les MAPK du stress JNK et p38.

1.1.7.3.4. Classe IV

La dernière classe présente une forte homologie pour le domaine DUSP des MKP. Elle comprend trois membres : STYX, MK-STYX et une protéine prédite, CAH69958.1 (792). Ces protéines sont caractérisées par le fait qu'elles sont catalytiquement inactives. Ainsi, la cystéine catalytique est remplacée par une glycine (STYX et MK-STYX) ou une sérine (CAH69958.1) (Figure 15). De manière surprenante, l'introduction de la cystéine catalytique chez STYX lui rend son activité phosphatase, impliquant que la protéine native doit adopter une conformation de DUSP (791). On estime que les MKP de classe IV seraient capables de lier les résidus tyrosine (et potentiellement thréonine) phosphorylés, à l'instar des domaines SH2 et PTB. De plus, ces molécules pourraient être des dominants négatifs naturels des MKP.

1.1.7.3.5. Régulation de l'expression des MKP

Tel que mentionné plus haut, certaines MKP sont les produits de gènes précoces ("early-immediate genes"). Les MKP de classe II et III sont induites transcriptionnellement en réponse à des signaux extracellulaires spécifiques. Ainsi, les facteurs de croissance induisent l'expression de DUSP1, 2, 4, 5, 6, 8 et 9 (voir (197, 255)). Il semble donc que l'expression des MKP en réponse aux signaux extracellulaires constitue une boucle rétro-inhibitrice visant à diminuer l'activation des voies MAPK. En accord avec cette idée, la

suppression de DUSP6/MKP3 augmente la signalisation de ERK1/2 (348). L'expression des DUSP est également contrôlée par leur dégradation. Ainsi, MKP1 et MKP3 sont deux DUSP relativement instable et sont dégradées par le système protéolytique ubiquitine-protéasome (88, 466).

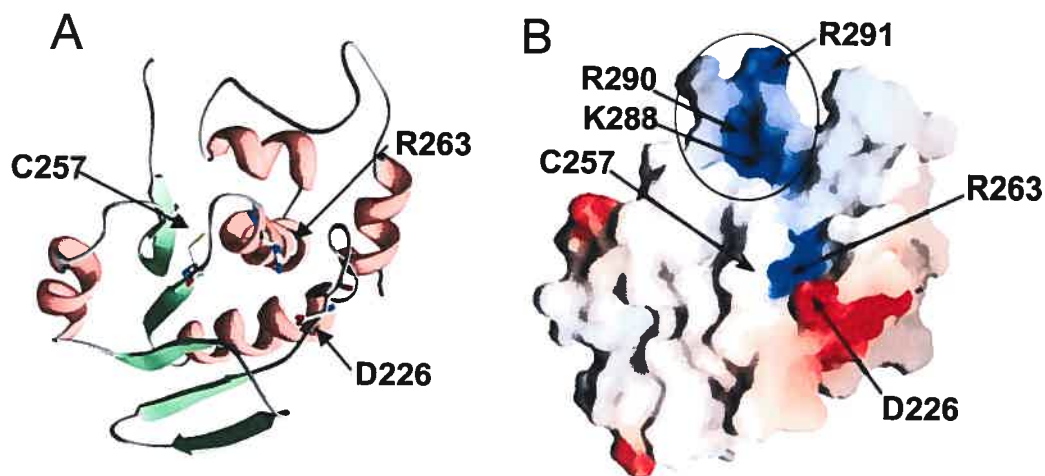


Figure 16: Domaine phosphatase DUSP de DUSP2/PAC1. (A) Structure en ruban montrant les résidus catalytiques. La cystéine 257 est le nucléophile, l'arginine 263 chélate le phosphate alors que l'acide aspartique 226 joue le rôle d'un acide général protonant le groupement hydroxyle du résidu phosphorylé. (B) Représentation du potentiel électrostatique du domaine DUSP. On remarque la présence du site très basique constitué des résidus K288, R290 et R291 (encadré en noir). Ce site permet la liaison d'un second groupement phosphorylé, par exemple la phospho-thréonine des MAPK. Adaptée de (196).

1.1.7.3.6. Relation structure/activité des MKP

In vitro, les DUSP des classes II et III ont une activité faible envers le pNPP (*p*-nitrophénylphosphate), un substrat chromogénique de PTP. De manière intéressante, il a été observé que l'association avec le substrat MAPK active grandement ces MKP (105). À l'opposé, les MKP de classe I sont constitutivement actives, leur activité n'étant pas augmentée par leur liaison aux MAPK (639, 828). Les données structurales permettent de comprendre ce phénomène. Le domaine DUSP adopte un repliement similaire à celui des PTP (Figure 16A). On remarque que la surface de DUSP2 possède un site très basique (Figure 16B). On estime que cette région pourrait être impliquée dans la liaison d'un substrat di-phosphorylé, comme une MAPK. Le site actif des MKP de classe I et II sont configurés différemment. Ainsi, le site de la MKP de classe I DUSP3/VHR est dans une configuration active, expliquant son activité constitutive (639, 828). Par contre, les résidus

catalytiques du site de DUSP2 (une classe II) sont mal positionnés. En particulier, l'Asp226 (qui joue le rôle d'acide général et qui protonne le groupement hydroxyle du résidu à déphosphoryler), n'est pas positionné de manière optimale (Figure 17). En attendant la structure d'un complexe MKP/MAPK, on peut supposer que cette interaction conduit à un réarrangement du site actif.

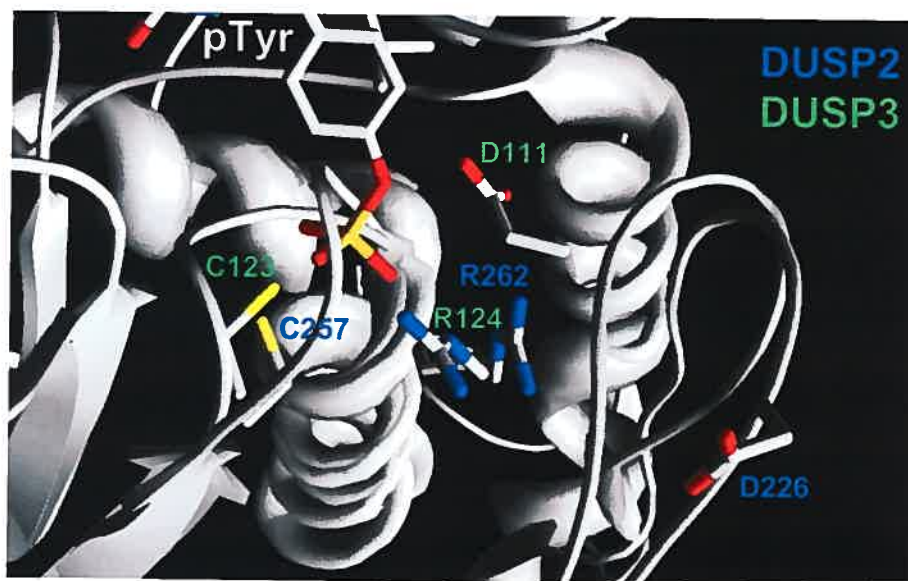


Figure 17: Le site actif de DUSP2 n'est pas dans une configuration active. Les structures de DUSP3 (Classe I) complexée avec un phospho-peptide p38 et de DUSP2 (classe II) sont superposées. Les résidus catalytiques sont montrés. Remarquez que l'Asp226 de DUSP2 est éloigné de l'oxygène O3 de la tyrosine phosphorylée. Adaptée de (196, 639, 828). Figure générée à l'aide de SPDBV 3.7.

1.1.7.3.7. Fonctions physiologiques

Il est facile d'imaginer une implication des DUSP dans des processus biologiques sous contrôle des MAPK. Par exemple, les expériences de cultures cellulaires pointent vers un rôle des DUSP dans la différenciation musculaire. L'expression de MKP1 et MKP3 varie durant la myogenèse (58, 505). De plus, la surexpression de MKP1 inhibe la formation des myotubes. La surexpression de MKP1 inhibe également l'hypertrophie des cardiomyocytes (215). Ces processus sont sous contrôle, entre autres, des voies p38 (413).

Des études développementales ont récemment impliqué DUSP6/MKP3 dans la formation des membres et l'élaboration ("patterning") du mésencéphale et du rhombencéphale chez le poulet et la souris respectivement. Les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) jouent un rôle essentiel dans ces processus. L'expression de DUSP6/MKP3 par ces facteurs ferait

partie d'une boucle de rétroaction négative (348). De manière intéressante, l'expression d'un dominant négatif de MKP3 affecte grandement le développement des membres chez le poulet (348).

D'autre part, un récent crible basé sur le RNAi a permis d'identifier les DUSP comme des régulateurs puissants de la survie cellulaire (453). Par exemple, la suppression de DUSP19 et 22 induit l'apoptose. Étant donné que ces MKP sont des régulateurs négatifs de la voie JNK, il est possible que leur suppression entraîne de l'apoptose JNK-dépendante (19, 830). À l'opposé, la diminution de l'expression de la DUSP de classe IV MK-STYX protège les cellules contre l'apoptose induite par des agents anti-néoplasiques. Ces données suggèrent donc que cette DUSP inactive se comporte comme un gène suppresseur de tumeurs. On ignore les cibles de MK-STYX.

Les données génétiques chez la souris indiquent que les DUSP ont des rôles redondants et spécifiques *in vivo*. L'inactivation de *Dusp1/Mkp1* n'entraîne aucun phénotype bien que cette DUSP ait été impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire (178). On peut imaginer que l'absence de phénotype est causée par la redondance de MKP1 avec les autres MKP. D'un autre côté, les cellules T isolées des souris *Dusp10/Mkp5* KO possèdent une plus grande activité JNK comparativement aux cellules normales (839). Cette hyperactivation de la voie JNK entraîne une réponse immunitaire innée amplifiée. Également, les cellules T *Dusp10*^{-/-} prolifèrent moins bien, diminuant ainsi l'immunité adaptative. Les expériences de surexpression avaient suggéré une certaine spécificité de cette MKP envers p38. Cependant, l'activation de p38 est normale dans les cellules T *Dusp10* KO. Il est donc possible que l'effet de DUSP5 sur p38 observé dans les expériences de surexpression soit artéfactuel et que cette MKP soit plutôt un régulateur physiologique de JNK.

La mutation de *Dusp9/Mkp4* entraîne un phénotype plus drastique. En effet, les souris *Dusp9* KO meurent *in utero* vers le jour embryonnaire 11 (135). La mort est probablement due à un défaut du développement placentaire. Un examen histologique révèle que le labyrinthe, une structure du placenta responsable de l'échange sanguin entre la mère et l'embryon est sous-développé chez les souris *Dusp9* KO. Les auteurs montrent que DUSP9/MKP4 est exprimée dans cette structure, suggérant ainsi que cette MKP agit de

manière "cell-autonomous". Des évidences génétiques chez la souris ont révélé un rôle de ERK2, ERK5, p38 α , MEK1 et MEKK3 dans le développement placentaire (voir plus haut). Les expériences de surexpression ont montré que DUSP9 peut déphosphoryler ERK1/2, JNK et dans une moindre mesure p38 (506). On pourrait donc s'attendre à une augmentation de la phosphorylation de ces MAPK. Néanmoins Christie et al n'ont pu mettre en évidence des changements d'activité de ERK1/2, JNK et p38. DUSP9/MKP4 semble donc agir sur le développement placentaire indépendamment des MAPK classiques. Cette DUSP pourrait agir sur la régulation des autres MAPK, telles ERK5 et/ou ERK7. Il est également possible que l'activité de DUSP9 passe par les MAPK classiques mais que la technique expérimentale utilisée (immunohistochimie à l'aide d'anticorps phosphospécifiques) ne soit pas assez sensible et précise pour détecter l'activité biologique de cette MKP *in vivo*.

1.1.8. Régulation de la localisation subcellulaire des MAPK

Les MAPK ne sont pas distribuées uniformément dans la cellule. Ainsi, une fraction significative de ERK1/2 est associée à la membrane plasmique (217), aux microtubules (599), à l'appareil de Golgi (722) et au noyau (123) dépendant du contexte cellulaire. Une localisation adéquate est essentielle pour la fonction *in vivo* des MAPK. Le ciblage des MAPK aux différents compartiments subcellulaires permet de restreindre l'accessibilité aux substrats. Les mécanismes moléculaires gouvernant la localisation des MAPK ont été étudiés chez la levure et les mammifères. Chez ces derniers, ERK1/2 sont les MAPK les mieux caractérisées (voir revue (376)).

1.1.8.1. Mécanismes d'import nucléaire de ERK1/2

En absence de signaux activateurs, ERK1/2 sont majoritairement cytoplasmiques (voir revue (576)). Parallèlement à leur phosphorylation, une fraction ("pool") transloque au noyau où il phosphoryle, entre autres, des facteurs de transcription. La prolifération et la transformation des fibroblastes de rongeurs nécessitent cette redistribution de ERK1/2 au noyau (93, 604). La translocation nucléaire est requise pour que les MAPK affectent l'expression génique. Le retrait des signaux mitogéniques entraîne une redistribution de ERK1/2 dans le cytoplasme. La phosphorylation (et/ou l'activation catalytique) régule-t-elle

la localisation des MAPK? Les données recueillies chez la levure *S pombe* mettent en cause la phosphorylation. Ainsi, un mutant de la MAPK Spc1p non-phosphorylable exprimé à partir de son promoteur endogène ne transloque pas au noyau (219). D'un autre côté, la translocation nucléaire d'un mutant catalytiquement inactif mais phosphorylable de la MAPK Hog1p chez *S cerevisiae* est normale, indiquant que la phosphorylation comme telle, et non l'activité enzymatique est importante pour la translocation nucléaire des MAPK chez les eucaryotes inférieurs (201). Les expériences menées sur les cellules de mammifères sont plus difficiles à interpréter. L'expression d'une forme constitutivement active de MEK1 induit la localisation nucléaire de ERK1/2, suggérant que la phosphorylation (et l'activation) est suffisante et essentielle pour ce processus (213). D'un autre côté, une forme non-phosphorylable de ERK2 est nucléaire tout comme la protéine de type sauvage (425).

La localisation nucléaire des protéines est souvent dépendante d'un signal de localisation nucléaire (NLS, voir revue (241)). Classiquement, les NLS sont des séquences riches en acides aminés basiques liant les importines α/β . Ce complexe interagit ensuite avec le complexe du pore nucléaire (NPC) et est transloqué au noyau. Ce transport actif est inhibé par l'agglutinine du germe de blé (WGA pour Wheat Germ Agglutinin), une lectine liant le NPC. L'interaction NLS/importine- β est sous le contrôle de la petite GTPase RAN. La forme à prédominance nucléaire RAN-GTP induit la dissociation de l'importine- β d'avec son cargo. On estime que l'hydrolyse du GTP lié à RAN fournit l'énergie au transport. ERK1/2 ne possèdent pas de séquences NLS, excluant un rôle du complexe importine α/β dans la régulation de leur localisation nucléaire.

Trois hypothèses ont été avancées pour expliquer la régulation du transport nucléaire de ERK1/2 (Figure 18) (376). Les protéines de moins de 60 kDa sont assez petites pour diffuser de manière passive au travers du pore. De manière basale, ERK1/2 sont associées avec MEK1/2 via des interactions de type arrimage (voir section 1.1.10.). Ce complexe est cytoplasmique du fait de la présence d'un signal d'export nucléaire (NES) sur MEK1/2 (212). La phosphorylation de ERK1/2 entraîne leur dissociation de MEK1/2 (213). ERK1/2 sous formes monomériques peuvent ainsi entrer par diffusion passive dans le noyau (Figure

18, I). Cependant, une fusion de ERK2 avec la GFP ou la β -galactosidase entre toujours au noyau, suggérant l'existence d'autres mécanismes d'import nucléaire (5).

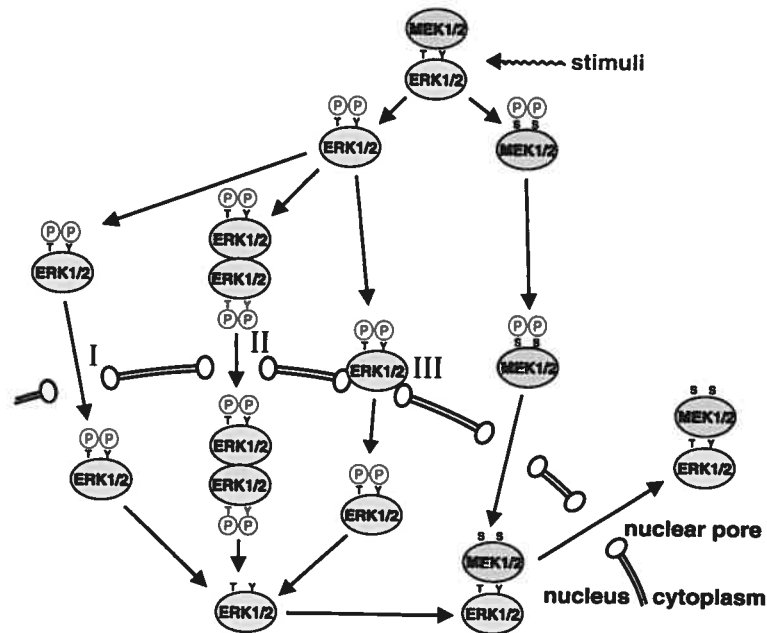


Figure 18: Mécanismes proposés pour le transport nucléaire régulé de ERK1/2. En l'absence de signaux activateurs, ERK1/2 sont complexées avec MEK1/2 dans le cytoplasme. Suite à un signal activateur, ERK1/2 sont phosphorylées par MEK1/2 et se dissocient de ces dernières. ERK1/2 peuvent ainsi entrer au noyau sous forme de monomère par diffusion passive (I). Phospho-ERK1/2 s'homodimérisent (avec un partenaire phosphorylé ou non), favorisant la translocation nucléaire (II). La phosphorylation de ERK1/2 augmente leur interaction avec les nucléoporines NUP153c et NUP214, permettant leur transport facilité au noyau. L'export du noyau de ERK1/2 se fait via l'association avec MEK1/2. Ces dernières contiennent un signal d'export nucléaire NES. Adaptée de (376).

Selon la seconde hypothèse, la translocation de ERK2 est dépendante de sa dimérisation. La structure cristalline de ERK2 sous forme phosphorylée a révélé que celle-ci s'homodimérise (352). ERK2 est capable d'interagir avec une forme phosphorylée (ou non) de ERK2. Les MAPK p38 α , ERK1 et JNK1 sont également capables de s'homodimériser. Dans certaines conditions expérimentales, la mutation de l'interface de dimérisation de ERK2 (mutant nommé HEL4A) diminue grandement l'entrée au noyau. Le mécanisme permettant au dimère de MAPK d'entrer au noyau est encore mal défini. Du fait que le dimère est trop volumineux pour entrer dans le noyau par diffusion passive, et parce que le transport de ERK2 peut être partiellement inhibé par la WGA, il fut suggéré que le transport des dimères est actif (Figure 18, II) (5). Toutefois, les évidences montrent clairement que le transport nucléaire de ERK2 ectopique et endogène ne requiert pas d'énergie, suggérant un import nucléaire non-classique (5).

Une troisième hypothèse a été émise pour expliquer la translocation nucléaire des fusions de ERK2. Deux études élégantes exécutées sur des cellules perméabilisées suggèrent que l'entrée de ERK2 au noyau se fait par un mécanisme de transport facilité (Figure 18, III) (471, 779). Comme le transport actif, le transport facilité requiert l'activité du NPC. À l'opposé, le transport facilité ne requiert pas d'énergie ou de facteurs cytosoliques. L'entrée au noyau de GFP-ERK2 est inhibée par le WGA, suggérant un rôle important des nucléoporines du NPC. Les nucléoporines NUP214 et NUP153c possèdent un domaine appelé "FG-repeat" riche en séquence phénylalanine et glycine. Cette séquence ressemble au domaine FxF(P) liant les MAPK (voir section 1.1.10.1.2.). Les données biochimiques indiquent clairement que ERK2 lie directement les domaines "FG-repeat" de NUP214 et NUP153c. Parce que la phosphorylation de ERK2 induit la formation du site de liaison du motif FxF(P) (419), on peut facilement comprendre comment l'activation de ERK2 conduit à sa translocation nucléaire.

Le transport facilité est engendré par le mouvement brownien et ainsi ne peut aller contre les gradients de concentration. L'accumulation nucléaire de ERK2 doit donc se faire via l'interaction avec des ancrs nucléaires. En 1998, Lenormand et al. ont émis l'hypothèse que la translocation nucléaire de ERK1/2 nécessite la synthèse de protéines de courte vie dont la fonction est de retenir ERK1/2 au noyau (424). L'identification de ces protéines est à faire. Certains candidats sont envisageables (voir section 1.1.8.3.).

1.1.8.2. Mécanismes d'export nucléaire de ERK1/2

À l'état basal, les MAPK ERK1/2 sont principalement cytoplasmiques. Les protéines cytoplasmiques contiennent souvent un signal d'export nucléaire (NES), une séquence riche en leucine qui est reconnue par l'exportine CRM-1 (voir revue (241)). L'association de CRM-1 avec un séquence NES se fait dans le noyau en présence de RAN-GTP. L'hydrolyse du GTP dans le cytoplasme entraîne la dissociation du complexe NES/CRM-1. La leptomycine B, un inhibiteur de CRM-1, conduit à une accumulation de ERK1/2 dans le noyau, suggérant que ces MAPK sont exportées activement du noyau (5). Les exportines jouent également un rôle dans l'export nucléaire des MAPK chez la levure (201). ERK1/2 ne possède pas de NES. On pense que l'association avec d'autres protéines contenant un

NES, notamment MEK1/2 est responsable de l'export CRM-1-dépendant. Une étude suggère également l'existence d'un mécanisme d'export CRM-1-indépendant. Ainsi, une construction GFP-ERK2 est efficacement exportée du noyau en absence d'ATP (471).

1.1.8.3. Implication des protéines d'interaction dans la localisation nucléaire de ERK1/2

L'inhibition de la synthèse protéique diminue l'accumulation nucléaire de ERK1/2 induite par les mitogènes, suggérant que des protéines néosynthétisées agissent comme ancrs de rétention nucléaire durant la stimulation (424). Récemment, il a été suggéré que la MKP DUSP5 soit l'une de ces ancrs (459). Ainsi, DUSP5 est induite par le sérum et possède un NLS fonctionnel. DUSP5 interagit spécifiquement avec ERK1/2 via son domaine D (voir section 1.1.10.1.1.) et sa surexpression induit l'accumulation de ERK1/2 au noyau. Cependant, Mandl et al., par une approche de type "perte de fonction", n'ont pas montré l'implication physiologique de DUSP5 dans l'accumulation de ERK1/2 endogènes en réponse au sérum. En se basant sur cette étude, on peut penser que d'autres DUSP nucléaires, induites et interagissant avec ERK1/2, comme DUSP2 et DUSP4, pourraient jouer le rôle d'ancre nucléaire.

D'autres produits de gènes précoces pourraient favoriser la rétention nucléaire de ERK1/2. Par exemple, c-FOS et FRA-1, des facteurs de transcription de la famille AP-1, sont des substrats de ERK1/2 et interagissent avec ces dernières avec leur site d'arrimage FxYP (voir section 1.1.10.1.2.). Il est ainsi concevable que ces facteurs de transcription participent à la localisation nucléaire de ERK1/2.

1.1.8.4. Implication des protéines d'interaction dans la localisation cytoplasmique de ERK1/2

Les données suggèrent fortement que la localisation cytoplasmique de ERK1/2 est dépendante de leur association avec des ancrs cytoplasmiques. Ces ancrs sont limitantes, ce qui explique pourquoi l'expression ectopique de ERK1/2 induit leur accumulation nucléaire. MEK1/2 sont des ancrs cytoplasmiques majeures de ERK1/2. À l'état basal, ERK1/2 sont associées avec MEK1/2 via des interactions de type arrimage. Le complexe

ERK/MEK est cytoplasmique dû à la présence d'une séquence NES dans le N-terminal de MEK1/2. Cette association est abolie par la phosphorylation de ERK1/2, expliquant en partie la relocalisation de celles-ci suite à une stimulation.

On soupçonne certains régulateurs négatifs de ERK1/2 d'être des ancrs cytoplasmiques. Par exemple, Brunet et al. ont montré que la MKP DUSP6 est capable de retenir ERK1/2 dans le cytoplasme (93). Similairement, les tyrosine phosphatases PTP-SL et HePTP peuvent jouer un rôle d'ancre cytoplasmique de ERK1/2 lorsque surexprimées (67). Cet effet des PTP requiert le domaine d'arrimage KIM. Le KIM contient un site potentiel pour la PKA, soit Arg-Arg-Gly-Ser (RRGS). Le groupe de Pulido a montré qu'effectivement, la PKA phosphoryle le KIM, détruisant ainsi l'interaction KIM/MAPK (67). L'AMPc, l'activateur de la PKA, facilite la localisation nucléaire de ERK1/2 et p38 lorsque PTP-SL est présente. Ce modèle permet d'expliquer l'effet positif de l'AMPc sur la localisation nucléaire de ERK1/2 observé dans certains types cellulaires.

La molécule SEF est également impliquée dans la localisation cytoplasmique de ERK1/2. Les évidences génétiques recueillies chez le poisson zèbre révèlent que SEF est un régulateur négatif de la voie RAS/ERK (216). Le patron d'expression de SEF est très similaire à celui de certains membres de la famille des facteurs de croissance des fibroblastes (FGF pour Fibroblast Growth Factor) d'où son nom : Similar Expression to Fgf genes. SEF est une protéine transmembranaire associée à la membrane plasmique, mais surtout à l'appareil de Golgi. Les études publiées proposent plusieurs mécanismes expliquant l'action inhibitrice de SEF sur la voie RAS/ERK. Premièrement, SEF diminue l'activité de ERK1/2 en agissant sur le récepteur du FGF, ce qui perturbe l'activation de RAS (385). SEF peut agir également sur MEK1/2 et empêcher directement la phosphorylation de ERK1/2 (578). Récemment, Torii et al. suggèrent que SEF n'agit pas sur la phosphorylation et l'activité des MAPK (722). SEF serait plutôt une ancre cytoplasmique puissante capable de séquestrer ERK1/2 vers la fraction membranaire. En accord avec ce modèle, la déplétion de SEF n'entraîne pas une hyperphosphorylation de ERK1/2 mais plutôt une accumulation nucléaire. Il s'ensuit une plus grande activation des gènes c-FOS, EGR-1 et JUNB, gènes cibles de la voie ERK1/2. Le mécanisme régulant l'interaction SEF/ERK1/2 reste à définir.

Une autre ancre cytoplasmique de ERK1/2 est la phosphoprotéine enrichie dans les astrocytes-15 (PEA-15). PEA-15 est une protéine contenant un domaine DED (death effector domain). Ce domaine médie des interactions protéine-protéine homotypiques avec d'autres protéines contenant des domaines DED tels FADD et procaspase 8 (voir revue (372)). Les astrocytes dérivés de souris *Pea-15* KO sont plus sensibles à l'apoptose induite par le TNF α , impliquant ainsi PEA-15 dans le contrôle de la survie cellulaire (364). PEA-15 interagit directement avec ERK1/2 (205). Parce que PEA-15 contient un NES, le complexe PEA-15-ERK1/2 est séquestré dans le cytoplasme. L'interaction entre ERK1/2 et la nucléoporine NUP153c est également inhibée *in vitro* par PEA-15 (778). Cette dernière est donc un régulateur négatif du transport nucléaire facilité de ERK1/2. De plus, la diminution de l'expression de PEA-15 entraîne une accumulation de phospho-ERK12 au noyau de cellules sénescentes (222). Également, l'interaction PEA-15-ERK1/2 est sensible à la voie PKC. Ainsi, la phosphorylation de PEA-15 sur les sérines 104 et 116 diminue son interaction avec les MAPK, facilitant leur accumulation nucléaire (390).

1.1.8.5. Localisation des MAPK atypiques

À l'opposé des MAPK classiques, la localisation de ERK3, ERK5 et ERK7 est influencée par leur extension C-terminale. Ainsi, ERK5 possède un NLS dans son C-terminal pouvant induire une localisation nucléaire chez une protéine hétérologue (807). Malgré cette séquence, ERK5 est cytoplasmique à l'état basal et devient nucléaire suite à son activation par une forme active de MEK5. Le mécanisme gouvernant la localisation de ERK5 reste à définir. On sait néanmoins que ERK5 est en équilibre dynamique entre le cytoplasme et le noyau. La leptomyicine B conduit à une accumulation de ERK5 au noyau, suggérant que sa localisation cytoplasmique est consécutive d'un export actif CRM-1-dépendant (99). ERK7 est constitutivement nucléaire (3). À l'instar de ERK5, la queue C-terminale de ERK7 semble possède une activité de ciblage nucléaire car sa délétion entraîne une localisation exclusivement cytoplasmique. On ignore si la localisation de ERK7 est régulée par des signaux extracellulaires.

Les premières études portant sur la localisation subcellulaire de ERK3 étaient basées sur une construction contenant un artéfact de clonage (128). La protéine étudiée était délétée du C-terminal (732). Le groupe de MH Cobb concluait (erronément) que ERK3 est

constitutivement nucléaire. Durant ma formation doctorale, j'ai collaboré avec Catherine Julien, une étudiante à la maîtrise, afin d'étudier la localisation subcellulaire de la forme pleine longueur de ERK3. ERK3 est localisée dans le cytoplasme et le noyau de cellules en phase exponentielle de croissance (331). Cette localisation n'est pas influencée par des mitogènes (sérum, LPA) ou des stress cellulaires (arsenite, H₂O₂). De par cette caractéristique, ERK3 se distingue des MAPK classiques.

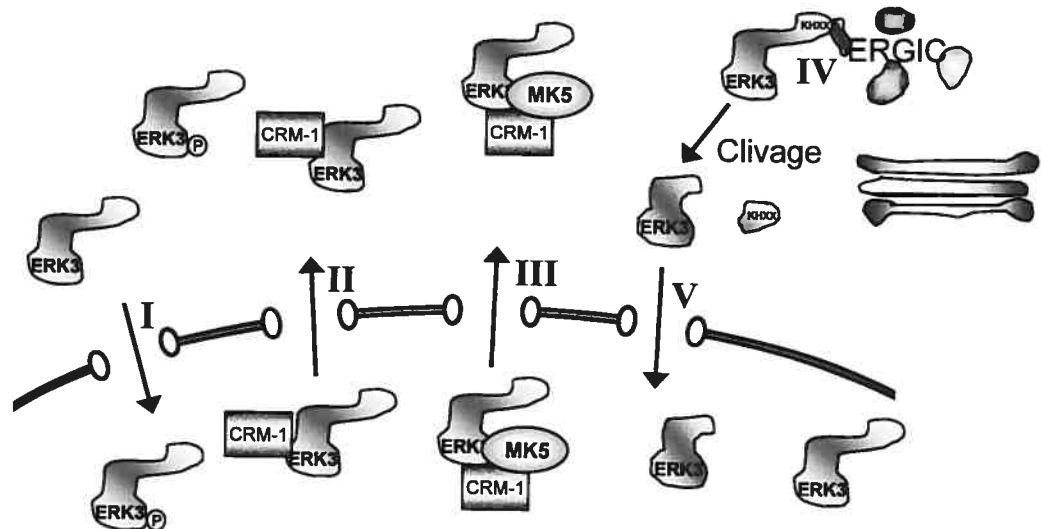


Figure 19: Régulation de la distribution nucléocytoplasmique de ERK3. ERK3 est constitutivement importée au noyau par transport actif (I). Parallèlement, ERK3 est exportée vers le cytoplasme par un mécanisme dépendant de l'exportine CRM-1 (II). ERK3 interagit directement avec l'exportine *in vitro*. Complexée avec MK5, ERK3 est également exclue du noyau par l'action de CRM-1 (III). Dans le cytoplasme, ERK3 peut interagir avec le compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (ERGIC) via son motif KHXX C-terminal. Un protéase inconnue cliverait le C-terminal de ERK3, générant une forme préférentiellement importée au noyau (IV).

Nos données indiquent que ERK3 est en équilibre dynamique entre le noyau et le cytoplasme (331). La leptomycine B entraîne une accumulation de ERK3 au noyau, suggérant que cette MAPK est activement exportée du noyau par un mécanisme dépendant de CRM-1 (Figure 19, II). Contrairement à ERK5 et ERK7, l'extrémité C-terminale de ERK3 possède une activité d'export nucléaire intrinsèque. Ainsi, sa délétion conduit à une accumulation de ERK3 au noyau. De plus, une région du C-terminal (nommé Domaine d'Export Nucléaire, DEN) entraîne un export nucléaire actif d'une protéine hétérologue. En fait, nous avons montré que ERK3 est la première MAPK pouvant lier directement CRM-1 *in vitro*. Deux études récentes indiquent que la localisation de ERK3 est influencée par sa protéine de liaison MK5 (640, 651). Ainsi, le complexe ERK3/MK5 est exclusivement cytoplasmique, conséquence d'un export dépendant de CRM-1 (Figure 19, III). MK5 possède un NES en C-terminal de son domaine kinase. On ignore si l'export du complexe

dépend du DEN ou du NES de MK5. De plus, les signaux régulant l'export du complexe sont mal définis.

La grande taille de ERK3 lui interdit l'entrée au noyau par diffusion passive, suggérant un mécanisme d'import actif. En accord avec cette idée, nous avons observé que l'import nucléaire de ERK3 est inhibé par le froid, une caractéristique du transport nucléaire actif (Figure 19, I) (331). Il semble que la phosphorylation de la boucle d'activation de ERK3 n'influence pas sa localisation. Ainsi, ERK3 S189A comme la protéine de type sauvage est localisée à la fois dans le noyau et le cytoplasme. Pour totalement exclure un rôle de cette phosphorylation dans l'import nucléaire de ERK3, il est nécessaire de faire des expériences d'import sur des cellules perméabilisées en utilisant des formes phosphorylées ou non de ERK3. On pourrait également évaluer la distribution de ERK3 S189A exprimée à des niveaux physiologiques dans des cellules *Erk3* KO.

Le groupe de I Sanchez a publié des données suggérant que ERK3 est associée au ERGIC (ER-Golgi Intermediate Compartment). Cette association dépend du motif KHXX présent à l'extrémité C-terminale de ERK3 (Figure 19, IV). Un clivage dans cette région entraînerait une relocalisation nucléaire durant le cycle cellulaire (63). La protéase responsable de ce clivage est inconnue (Figure 19, V). Malheureusement, aucune expérience de fractionnement subcellulaire ne confirme le rôle positif de ce clivage dans l'import nucléaire de ERK3.

1.1.9. Protéines d'échafaudages

Les cellules répondent adéquatement à leur environnement en utilisant un répertoire fini de voies de signalisation. Dans certains cas, une même protéine est sollicitée par plus d'une voie de signalisation. Ainsi, chez la levure, la MAPKK Ste7p est impliquée dans les voies de la conjugaison et de la croissance invasive (voir revue (186)) (voir Figure 20). D'où provient la spécificité des réponses physiologiques ? Les protéines d'échafaudages semblent être une partie de la réponse. Une protéine d'échafaudage est définie comme étant capable d'interagir (en même temps) avec au moins deux constituants d'une voie de signalisation (voir revue (375, 502)). Souvent, les protéines d'échafaudage (ou "scaffolding proteins") ne possèdent pas d'activité enzymatique. Les fonctions de ces protéines sont multiples. Ces

protéines permettent de confiner un signal dans une voie de signalisation précise, aidant à la spécificité de la réponse cellulaire et évitant ainsi les "cross-talks". Les protéines d'échafaudage permettent également une transmission plus efficace du signal; on parle de protéines d'échafaudage "catalytiques". On peut également penser que cette classe de protéines localise une voie de signalisation dans un endroit précis de la cellule (protéines d'échafaudage de localisation). Finalement, leur existence permet des points de régulation supplémentaires.

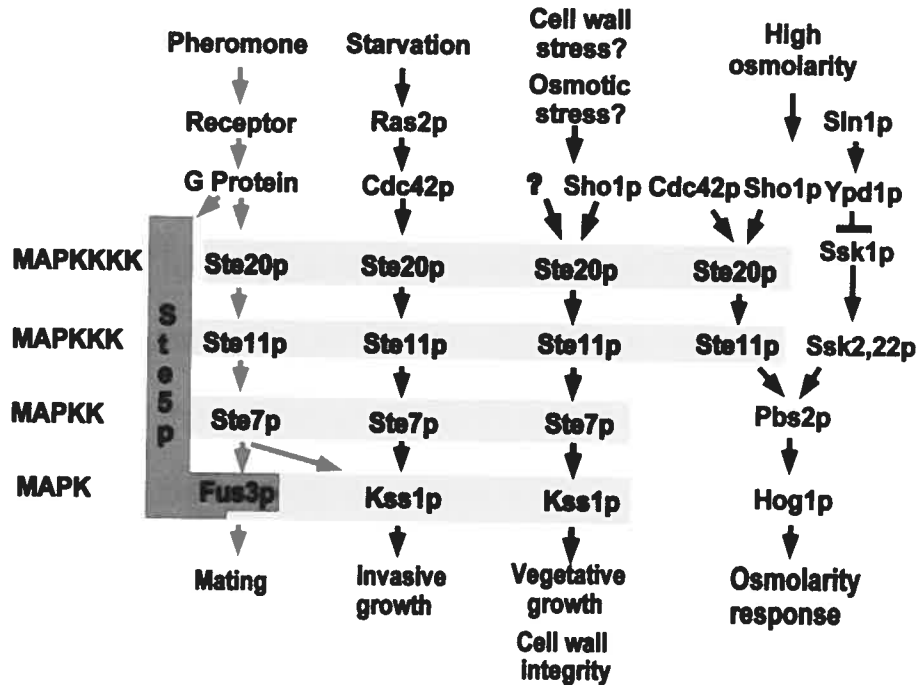


Figure 20: Ste5p, une protéine d'échafaudage de la voie de la conjugaison ("mating") chez *S. cerevisiae*. Ste5p est essentielle à la voie de la conjugaison. Elle interagit avec la MAPKKK Ste11p, la MAPKK Ste7p et la MAPK Fus3p. Notez que ces molécules sont utilisées par d'autres voies de signalisation. Tirée de (186).

1.1.9.1. Chez la levure

La première protéine d'échafaudage des MAPK fut identifiée chez la levure par approche génétique. Ste5p, comme son nom l'indique, est essentielle pour la voie de la conjugaison ("mating") en réponse à la phéromone facteur α (Figure 20) (186). Ste5p ne possède pas d'activité enzymatique. Des expériences de double hybride ont plutôt révélé que celle-ci interagit avec la MAPKKK Ste11p, la MAPKK Ste7p et la MAPK Fus3p. Ste5p lie également Ste4p, une protéine $G\beta$ activée par le récepteur des phéromones. Pbs2p est une autre protéine d'échafaudage chez la levure (574). Pbs2p est la MAPKK de la voie de l'osmoadaptation activée en réponse au choc osmotique. De plus, l'activité de Pbs2p requiert son interaction avec la MAPK (Hog1p) et la MAPKKK (Ste11p) de la voie. Pbs2p

interagit directement avec le domaine SH3 de l'osmorécepteur Sho1p. On voit ici que la MAPKKK Ste11p est requise pour ces deux voies MAPK. Ainsi, les protéines d'échafaudage semblent jouer des rôles importants dans la transmission spécifique du signal.

1.1.9.2. Chez les métazoaires

Il n'y a pas d'homologues directs de Ste5p ou Pbs2p chez les organismes multicellulaires. Néanmoins, les recherches menées depuis 10 ans ont permis d'identifier plusieurs protéines d'échafaudage telles KSR, CNK, MP1, SUR-8, β -arrestines, paxilline, IQGAP1, MEKK1/2, JIP1-4, CRKII, POSH, OSM et SKRP1 (voir revue (375, 502)). Voici une description des protéines d'échafaudage les mieux caractérisées.

1.1.9.2.1. Protéines adaptatrices de la voie Ras/ERK

1.1.9.2.1.1. KSR

En 1995, lors d'études génétiques conduites chez la drosophile et le nématode, trois groupes identifièrent un gène dont la mutation diminue l'effet d'un allèle actif de RAS (377, 689, 712). Génétiquement, KSR (pour Kinase Suppressor of activated Ras) est ainsi un régulateur positif de la voie RAS/MAPK. KSR est un gène essentiel agissant dans les processus biologiques dépendants de RAS tel le développement de l'œil chez la drosophile ou le développement vulvaire chez le ver (689, 712). KSR est requis pour une activation optimale des MAPK en réponse à RAS. Structuellement, KSR possède 5 régions conservées nommées CA1 à CA5 (Figure 21A). KSR ressemble beaucoup à la MAPKKK RAF et possède un domaine kinase en C-terminal. Cependant, on estime que la fonction de KSR *in vivo* se fait indépendamment de son activité phospho-transférerase putative (501). En effet, les homologues supérieurs de KSR possèdent une arginine à la position de la lysine conservée du sous-domaine II (712). Ce genre de mutation entraîne en général une kinase inactive. De plus, des mutants putativement inactifs se comportent comme la protéine de type sauvage chez le nématode et la drosophile (621, 680). Quelle est donc la fonction de KSR ? KSR a la capacité de lier les membres de la voie MAPK : RAF, MEK et ERK1/2 (680, 713). La surexpression de KSR inhibe la voie RAS/ERK1/2. À l'opposé, l'expression

de KSR à des niveaux physiologiques potentialise l'activation de ERK1/2 (102). Ces résultats sont compatibles avec l'hypothèse que KSR sert de protéine d'échafaudage essentielle à la voie RAS/ERK1/2.

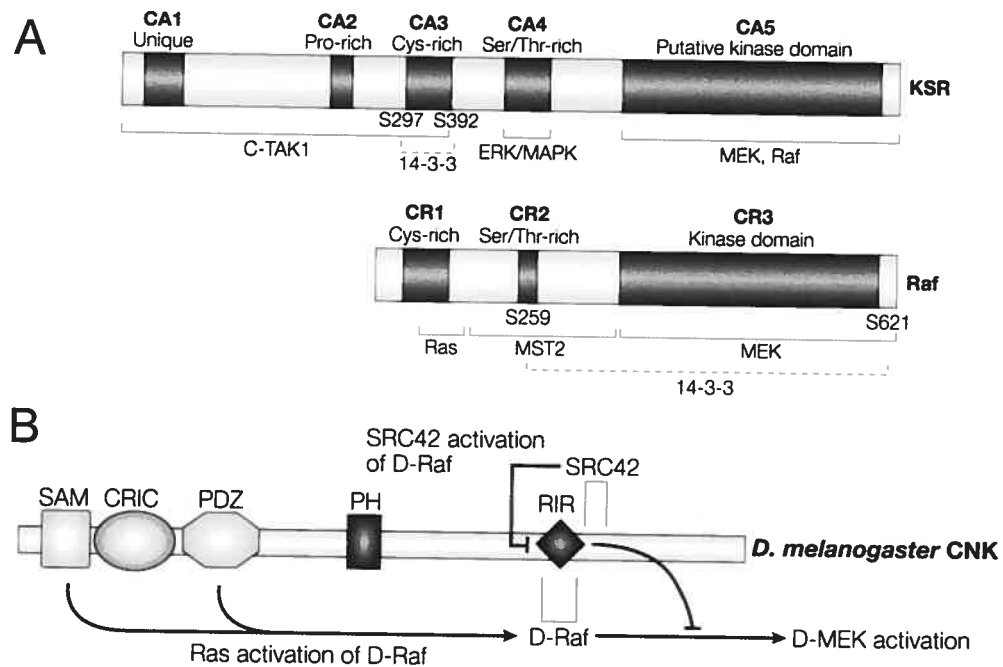


Figure 21: Protéines d'échafaudage de la voie RAS/ERK. (A) Structure de KSR et RAF. KSR possède 5 domaines conservés (CA1-5). Remarquez la similitude entre ces deux protéines. Les domaines d'interaction de même que les partenaires sont indiqués. (B) Structure de CNK. CNK possède en N-terminal un domaine SAM (sterile α motif), CRIC (conserved region in CNK) et PDZ (PDS95/DLG-1/ZO-1), un domaine PH (pleckstrin homology) dans la partie centrale et un domaine RIR (RAF inhibitory region) en C-terminal. Voir texte pour détails. Adaptée de (375, 502).

La fonction de KSR dans l'activation de ERK1/2 est conservée dans l'évolution. Les mammifères possèdent deux homologues de KSR. L'analyse du phénotype des souris *Ksr1* KO confirme son rôle de régulateur positif de la voie ERK1/2 (446). Les souris *Ksr1* KO sont viables, d'apparence normale et fertiles. Néanmoins, un examen plus approfondi indique que KSR1 est importante pour la différenciation terminale des cellules T et des adipocytes (379, 519). Ce défaut résulte d'une trop faible activation de la voie MAPK, confirmant le rôle de régulateur positif de KSR1. Ces souris sont également résistantes à certains cancers (446) indiquant que KSR1 participe à la tumorigenèse *in vivo*. KSR1 est aussi un régulateur de la survie des cellules épithéliales du colon (808). Cette fonction semble reliée à l'activité anti-apoptotique de ERK1/2. La fonction de KSR est essentielle chez le ver et la mouche. La viabilité de la souris *Ksr1* KO implique que KSR2 assure la majeure partie de l'activité KSR chez ces souris. L'étude de la souris *Ksr2* KO et du double KO *Ksr1/2* va nous révéler la redondance putative de ces deux molécules.

La régulation de l'activité de KSR commence à être comprise. En réponse aux mitogènes, KSR est recrutée à la membrane, présentant ainsi MEK à RAF. Dans les cellules quiescentes, KSR est inhibée par deux mécanismes (Figure 22). Premièrement, KSR est retenue dans le cytoplasme en liant directement les protéines 14-3-3 (508). Cette interaction requiert la phosphorylation de deux résidus de KSR : les sérines 297 et 392. Cette dernière est phosphorylée par c-TAK1 alors que la première l'est par une kinase inconnue. KSR est également inhibée par la protéine IMP (Impedes mitogenic signal progression). IMP est une E3 ubiquitine-ligase (voir la section 1.2.4.4.) identifiée pour sa capacité de lier un mutant actif de RAS (469). L'interaction de KSR avec IMP entraîne son hyperphosphorylation et sa séquestration dans la fraction insoluble au triton X-100, possiblement avec le cytosquelette. Une stimulation au EGF induit la déphosphorylation de la Ser392 par la sérine-thréonine phosphatase PP2A, perturbant l'interaction avec les protéines 14-3-3 (508). D'autre part, l'interaction entre RAS activée et IMP déclenche une réaction d'autoubiquitination conduisant à la dégradation protéasomale de la ligase (469).

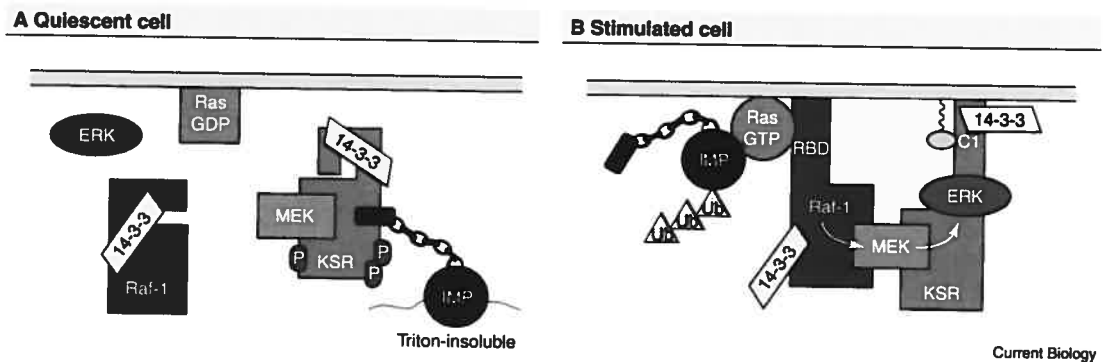


Figure 22: Régulation de KSR par IMP dans l'activation de la voie ERK1/2. (A) En l'absence de signal mitogénique, KSR est hyperphosphorylée et retenue dans la fraction insoluble au triton par IMP. (B) L'activation de RAS induit l'autoubiquitination de IMP, ce qui conduit à sa dégradation. KSR est maintenant libre de favoriser l'activation de MEK. Adaptée de (540).

En plus de sa localisation cellulaire, la stabilité protéique de KSR est également régulée. Une fois activées, ERK1/2 phosphorylent KSR sur trois résidus, notamment la Thr274. Il est à noter que la mutation des résidus Thr274 et Ser392 en alanine stabilise KSR1, indiquant que ces deux sites forment un phospho-dégron (592). Ce double mutant permet une plus grande activation de la voie ERK1/2. La phosphorylation de la Thr274 suivi par celle de la Ser392 révèle donc l'existence d'une boucle de rétroaction négative dégradant

les formes de KSR ayant participées à l'activation de la voie ERK1/2. Le domaine CA5 de KSR interagit avec HSP90 et CDC37, ce qui influence également sa demi-vie (680).

1.1.9.2.1.2. CNK

CNK (Connector eNhancer of Ksr) fut identifié en 1998 dans un crible génétique visant à trouver des interacteurs de KSR (715). CNK ne possède pas d'activité catalytique. CNK possède plutôt plusieurs domaines d'interaction protéique tels les domaines Sterile α -Motif (SAM), Conserved Region In Cnk (CRIC), PSD-95/Dlg/ZO1 (PDZ) et Pleckstrin Homology (PH) (Figure 21B). Les homologues de CNK présents chez les chordés possèdent en plus le domaine CRAC (Conserved Region Among Chordate). CNK de drosophile contient une région unique d'inhibition de RAF (Raf Inhibitory Region, RIR) (180).

CNK semble faciliter l'activation de RAF. De manière intéressante, le mécanisme moléculaire varie selon l'espèce. Les études épistasiques conduites chez la drosophile ont montré que dCNK agit en aval de RAS et en amont (ou en parallèle) de RAF (715). dCNK possède une activité positive et négative sur l'activation de RAF par RAS. Le N-terminal est responsable de l'action positive de dCNK et permet une activation accrue de la voie ERK par RAS (180). Les domaines SAM et CRIC sont essentiels pour cette activité. Le domaine C-terminal possède une région nommée RIR (Raf-Inhibitory Region) constituée d'une séquence d'interaction avec RAF, le RIM (Raf Interacting Motif) et le IS (Inhibitory Sequence). Comme son nom l'indique, cette région de dCNK régule négativement l'activité de RAF et est capable d'antagoniser l'activation de la voie. Une étude récente montre que le motif IS est régulé par l'activation des RTK (404). Ainsi, le RTK *sevenless* induit l'association de la kinase SRC SRC42 avec une région C-terminale du RIR. Une fois associée, SRC42 inactive le motif IS mais non le RIM, déréprimant RAF toujours associé à dCNK. L'association et l'activation de RAF ne requiert pas l'activité kinase de SRC42 mais plutôt ses domaines d'interaction protéine-protéine SH2 et SH3. Le mécanisme de "l'activation" de SRC42 par les RTK et de la dérèpression du motif IS de dCNK par SRC42 restent à définir.

Chez la drosophile, CNK est un gène essentiel. De manière surprenante, chez le ver *C. elegans*, l'unique gène cCNK n'est pas essentiel à la voie ERK et par le fait même à la viabilité (607). Néanmoins, les expériences indiquent que cCNK joue un rôle positif non-essentiel dans l'activation de RAF. Des expériences épistasiques suggèrent que CNK permet soit l'association membranaire ou l'oligomérisation de RAF ou le recrutement d'une kinase activatrice vers RAF.

Les mammifères possèdent trois homologues de CNK : CNK1, CNK2 (maguin1 : membrane-associated guanylate kinase interacting protein-1) et CNK3 (586). Cette dernière est très peu caractérisée. Les formes de mammifères ne possèdent pas le motif RIR. Néanmoins, CNK1 et 2 interagissent directement avec RAF-1 et B-RAF (407). De plus, c-SRC peut s'associer avec CNK1 et augmenter l'activité de RAF-1 (850). CNK2 a été montré important pour l'activation de la voie ERK1/2 en réponse au NGF dans les cellules PC12, confirmant la conservation de son rôle positif d'échafaudage (97).

Les données récentes indiquent toutefois que CNK chez les mammifères pourrait être impliqué dans des voies de signalisation autres que la voie RAS/ERK1/2. Ainsi, CNK1 (qui ressemble moins à dCNK que CNK2) interagit avec la petite GTPase RHO (310). RHO est un régulateur important des fibres de stress d'actine, mais aussi de la prolifération et la transformation cellulaire (voir revue (311)). CNK1 est impliqué dans l'activation transcriptionnelle du facteur répondant au sérum (ou Elk-1) par RHO. Ainsi, l'augmentation ou la diminution des niveaux de CNK1 interfère avec l'activité transcriptionnelle SRF-dépendante. À l'opposé, CNK1 n'influence pas la formation des fibres de stress induite par une forme active de RHO. CNK1 interagit également avec RALGDS, un effecteur de RAS (310). RALGDS est un échangeur nucléotidique (Guanine Exchange Factor, GEF) pour la petite protéine G RAL. Cette dernière est impliquée dans le transport vésiculaire, la formation de filopodia, la régulation transcriptionnelle et la transformation cellulaire (voir revue (198)). La surexpression de CNK1 ne semble pas affecter l'activation de RAL (97). Cependant, CNK potentialise l'effet du mutant RASV12G37 dans le développement de l'œil chez la drosophile (714). Ce mutant active principalement la voie RALGDS suggérant un rôle possible de CNK dans la voie RAL. D'un autre côté, CNK2 interagit avec DAL-1 (Differently expressed in Adenocarcinoma of Lung-1)/band 4.1b, une protéine soupçonnée être un gène suppresseur de tumeur et

également un régulateur du réseau d'actine (726). CNK2 forme aussi un complexe avec Densin-180 et PSD95 et pourrait jouer un rôle dans la polarité et la synaptogenèse neuronale (534). Les protéines CNK finalement agissent également sur les voies apoptotiques. En effet, CNK1 interagit via son N-terminal avec RASSF1A (586). Cette dernière est un gène suppresseur de tumeur ayant une activité pro-apoptotique. L'association de RASSF1A avec CNK1 augmente son activité pro-apoptotique via les kinases MST1/2 (586).

1.1.9.2.1.3. MP1

En 1998, Schaeffer et al. ont identifié MP1 (MEK1 Partner 1) en cherchant des protéines interagissant avec MEK1 par double hybride (631). MP1 interagit également avec ERK1 et possiblement avec MEK2. Structuellement, MP1 est une petite protéine ne possédant pas d'activité enzymatique. On pense qu'elle joue le rôle de protéine d'échafaudage spécifiquement pour la voie RAF-MEK1-ERK1. MP1 facilite la phosphorylation et l'activation de MEK1 par RAF *in vitro* (631). La surexpression de MP1 augmente l'activation de ERK1 *in vivo*. La diminution d'expression de MP1 par RNAi diminue la phosphorylation de ERK1 en réponse au EGF (707). On estime que l'activation des MAPK par MP1 se fait au niveau des endosomes. Ainsi, MP1 interagit directement avec une protéine associée aux endosomes tardifs, p14 (798). La suppression de p14 par RNAi entraîne la localisation de MP1 des endosomes vers le cytoplasme, indiquant que la première est responsable de la localisation de MP1 (707). De manière intéressante, le ciblage forcé du complexe p14-MP1-MEK1-ERK1 à la membrane plasmique au lieu des endosomes tardifs perturbe l'activation de la voie, suggérant que la localisation endosomique est importante pour l'activité de MP1 (707). Récemment, MP1 a été montré importante pour l'activation de la voie ERK1 par l'adhésion cellulaire via PAK1 (p21-activated kinase) (581).

MP1 semble faire partie d'un complexe adaptateur plus massif. Ainsi, MP1-p14 s'associent *in vivo* avec un nouvel adaptateur MORG1 (754). Ce dernier est capable de lier RAF, MEK, ERK et MP1. MORG possède les caractéristiques d'une protéine d'échafaudage : augmentation de signal transmis par son expression à des niveaux physiologiques et inhibition à des niveaux d'expression supra-physiologique. L'activité de MORG1 est

spécifique à certains signaux extracellulaires. Par exemple, l'activation de ERK1/2 est potentialisée par MORG1 en réponse au sérum et au LPA et non au EGF ou au PDGF.

1.1.9.2.1.4. SUR-8

SUR-8 (SUppressor of Ras-8) fut identifié génétiquement chez le ver comme un régulateur positif de la voie RAS/ERK (664). SUR-8 est une protéine conservée ne contenant que des répétitions riche en leucines (LRR), souvent impliquées dans les interactions protéine-protéine. SUR-8 interagit avec RAS et RAF et non avec MEK et ERK (433). On pense que SUR-8 agit en facilitant l'interaction de RAF avec RAS, favorisant son activation. La formation du complexe de SUR-8 avec RAS et RAF est inhibée par la protéine de la famille LAP (LLR And PDZ), Erbine (154). Erbine, une protéine à LRR, est ainsi un régulateur négatif de la voie RAS/ERK en agissant sur la protéine d'échafaudage SUR-8.

1.1.9.2.2. Protéines adaptatrices des voies MAPK de stress.

1.1.9.2.2.1. Les JIP

Les protéines interagissant avec les JNK (JIP) sont 4 protéines d'échafaudage de la voie JNK, mais également de la voie p38 (502). Selon leur structure primaire, les JIP peuvent être divisées en deux groupes : JIP1 et 2 et JIP3 et 4. En plus de leur implication dans les voies MAPK, cette famille de protéines adaptatrices interagit avec les kinésines (414, 746). Les kinésines sont des moteurs dépendants de l'ATP impliquées dans le transport de cargo le long des microtubules, laissant supposer un rôle de protéines cargo pour les JIP (voir revue (467)). L'interaction de JIP1/2 avec la kinésine entraîne leur accumulation dans les cônes de croissance axonales. Les JIP sont également présents sous formes de dimères *in vivo* (820).

1.1.9.2.2.1.1. JIP1/2.

JIP1/2 sont structurellement similaires et possèdent un domaine SH3 et un domaine PTB (phospho-Tyrosine Binding domain). L'expression de JIP1/2 à des niveaux physiologiques potentialise l'activation de la voie JNK (414, 820). JIP2 peut également augmenter

l'activation de p38 α et δ (95, 637). Au contraire, la surexpression de JIP1/2 inhibe la transmission du signal pour la voie JNK (171). On pense que ce résultat est artéfactuel et est en accord avec leur rôle proposée de protéine adaptatrice. JIP1/2 lient directement JNK, MKK7 et les MAPKKK de la famille mixed-lineage kinase (MLK) (780, 820). JIP2 lie également certains membres de la voie p38 (MKK3, p38 α et δ). De manière intéressante, JIP1/2 recrute la MKP DUSP16 (MKP7), une DUSP spécifique pour JNK et p38, suggérant que ces protéines adaptatrices ont un rôle positif et négatif dans l'activation des MAPK, dépendant du contexte (788). De manière intéressante, JIP1/2 s'associent avec d'autres protéines en plus des voies MAPK. Ainsi, JIP1/2 lient les facteurs d'échange nucléotidique p190RHOGEF (486), TIAM1 et RAS-GRF1 (95), le précurseur de la protéine amyloïde (APP) (472) et des membres de la famille des récepteurs de lipoprotéines de faible densité, notamment APOER2 et Mégaline (681).

L'activité de JIP1 est régulée par la voie AKT. AKT (ou PKB) est une protéine kinase en aval de la PI₃K et impliquée dans la survie cellulaire (voir revue (545)). Dans les neurones, des signaux excitotoxiques (comme une forte concentration de glutamate) libèrent AKT1 de JIP1, favorisant l'activation de JNK (354). Les souris déficientes en *Jip1* confirment le rôle de cette protéine dans l'activation de la voie. En effet, l'activation de JNK en réponse à des stress excitotoxiques est perturbée dans les neurones de souris *Jip1* KO (781). La localisation subcellulaire des membres de la voie JNK est également perturbée par l'absence de *Jip1* (781). JIP1 joue donc un rôle de protéine de localisation.

1.1.9.2.2.1.2. JIP3/4.

La structure primaire de JIP3/4 diffère de celle de JIP1/2 et consiste en un domaine de type coiled-coil (308, 502). JIP3 lie directement JNK, MKK7 et les membres de la famille MLK (349). JIP3 lie également la MAPKKK MEKK1 et la MAPKK MKK4 (308). JIP4 quant à elle interagit avec MKK4 et MEKK3 (414). JIP4 interagit également avec la voie p38 α et facilite son activation dans des expériences de surexpression (350). Des expériences de surexpression suggèrent que JIP3 est spécifiquement requis pour l'activation de la voie JNK par l'adhésion cellulaire et le récepteur TLR4 (474). Les données génétiques obtenues chez

C elegans et *D melanogaster* indiquent que les homologues de JIP3 fonctionnent comme protéine adaptatrice dans le transport de cargo dépendant de la kinésine (84, 101).

1.1.9.2.2.2. OSM

OSM (pour "Osmosensing Schaffold for Mekk3") a été identifié par double hybride en utilisant MEKK3 comme appât (734). La structure primaire de OSM indique la présence d'un seul domaine, le domaine PTB. Des expériences de type "perte de fonction" révèle que OSM est essentielle pour l'activation de p38 par l'hyperosmolarité. OSM ne possède pas d'activité catalytique mais est capable d'interagir avec l'actine, la petite GTPase RAC, la MAPKKK MEKK3 et la MAPKK MKK3. p38 ne semble pas interagir directement avec OSM. OSM et MEKK3 sont recrutés dans les bordures en brosse des cellules Cos7 induites par l'hyperosmolarité. Cette structure de la membrane plasmique est dépendante de la réorganisation de cytosquelette d'actine induite par les GTPases RAC et CDC42. Ainsi, en plus de participer à l'activation de p38, OSM semble jouer un rôle de protéine adaptatrice de localisation recrutant la voie p38 à certains domaines membranaires.

1.1.9.2.2.3. SKRP1

La DUSP de classe I SKRP1 (ou DUSP19) est capable d'inactiver JNK par déphosphorylation *in vitro* (voir section 1.1.7.3.) (830). De manière surprenante, les évidences *in vivo* indiquent plutôt que SKRP1 joue un rôle positif dans l'activation de JNK (831). Cette propriété de SKRP1 requiert son activité catalytique (118). Le (ou les) substrat de SKRP1 impliqué dans cette activité n'est pas encore connu. On estime que SKRP1 régule la liaison de JNK à la MAPKK MKK7 et la MAPKKK ASK1 (831). *SKRP1* n'est pas un gène essentiel chez la souris (118). Cependant, l'activation de la voie JNK en réponse au TNF α et au TGF- β est diminuée chez les souris déficientes en SKRP1, confirmant le rôle positif de cette phosphatase pour la voie JNK *in vivo*.

1.1.9.2.3. Protéines d'échafaudage pour les voies MAPK atypiques

Il n'y a présentement aucune protéine adaptatrice impliquée pour les voies ERK5, ERK3/4, ERK8 et NLK. Compte tenu de l'importance qualitative et quantitative de ces protéines

pour les voies MAPK classiques, on peut facilement imaginer l'existence de protéines adaptatrices pour les voies atypiques. Il est possible que certaines protéines déjà identifiées participent à la signalisation des MAPK atypiques. Il se peut également que certaines de ces MAPK soient elles mêmes protéines d'échafaudage. Ainsi, le groupe de M Gaestel suggère que ERK3 est une protéine d'échafaudage agissant sur la localisation et l'activité enzymatique de MK5/PRAK (640). Vu qu'une protéine d'échafaudage doit lier au moins deux autres protéines, ERK3 semble plutôt jouer le rôle de cofacteur ou sous-unité régulatrice de MK5.

1.1.10. Site d'arrimage ("docking site")

Une notion importante dans l'étude des kinases est leur spécificité de substrat. Pour les kinases capables de phosphoryler des peptides *in vitro*, comme les MAPK, il est possible de caractériser leur spécificité à l'aide d'une banque de peptides dégénérés. Grâce à cette méthode, le groupe de Cantley a trouvé la séquence PxS/TP comme étant préférentiellement phosphorylée par ERK1 (673). *In vivo*, ce motif n'est pas toujours phosphorylé par les MAPK. De plus, de nombreux sites de phosphorylation de ERK1/2 ne possèdent pas de proline en position -2 (P-2). D'autres déterminants régulent probablement la sélection des sites de phosphorylation. De nombreuses évidences pointent vers l'existence de sites d'arrimage (docking sites) sur les substrats spécifiquement phosphorylés par les MAPK (voir revue (704)). Ces sites d'arrimage peuvent être situés en amont et/ou en aval du site de phosphorylation et sont essentiels à la phosphorylation par les MAPK *in vivo*. De plus, ces mêmes sites d'arrimage sont présents sur d'autres protéines interagissant avec les MAPK, tels les MAPKK et les phosphatases PTP et DUSP. On estime maintenant que les interactions de type "arrimage" jouent un rôle primordial pour la spécificité et la durée du signal, ainsi que pour la localisation subcellulaire des MAPK.

1.1.10.1. Séquences présentes chez les partenaires des MAPK

Deux types de séquences d'arrimage ont été identifiés sur les protéines interagissant avec les MAPK. En voici la description par ordre chronologique d'identification.

1.1.10.1.1. Domaine D

Les premières indications de l'existence de sites d'arrimage pour les MAPK proviennent de l'étude du couple c-JUN/JNK. En effet, la MAPK JNK1 a initialement été identifié par sa capacité de lier et de phosphoryler le facteur AP-1 c-JUN (280). Quelques années plus tard, la région responsable de cette interaction fut identifiée (333). Cette région, nommée domaine D ou δ , s'est révélée riche en acides aminés hydrophobes et basiques (Figure 23). Durant les années 1996 à 99, des évidences biochimiques ont indiqué que les MAPK interagissent de manière stable également avec leurs régulateurs positifs (MAPKK) et négatifs (PTP et DUSP).

Classe	Interacteur	Domaine D	Cible
MAPKK	MEK1	MPKKKP--TPIQLNP ¹³	ERK1/2
	MEK3	¹⁸ KGKKRN--PGLKING ³⁰	p38
	MEK7	²¹ EARRRI-DLNLDISP ³⁴	JNK
PTP	PTP-SL	²²⁶ QERRGS-NVSLTLDM ²³⁹	} ERK1/2, p38 et ERK5
	HePTP	¹⁸ QERRGS-NVALMLDV ³¹	
	STEP	⁴⁴ QERRGS-NVSLTLDM ⁵⁷	
MKP	DUSP6	⁶² MLRRLQK-GNLPVVRP ⁷⁵	ERK1/2
	DUSP9	⁵⁰ LLRRLRR-GSLSVRG ⁶³	ERK1/2
	DUSP10	²⁰⁰ ISRRLQOGKITVRG ²¹⁵	p38, JNK
FT	c-JUN	³⁰ NPKILKQSMTLNLF ⁴⁴	JNK
	MEF2A	²⁶⁷ NSRKPDR---VVIPP ²⁷⁸	P38, ERK5
	ELK-1	³¹⁰ PQRKPRD-LELPLSP ³²³	ERK1/2, p38
MAPKAPK	MNK1	⁴⁰³ LARRR----ALAQAG ⁴¹³	ERK1/2, p38
	MK2	³⁸³ LLKRRKKARALEAAA ³⁹⁷	p38
	RSKB	⁷²⁷ LAKRRK--QKLSAT ⁷³⁹	p38

Figure 23: Alignement des domaines D présents chez différentes classes d'interacteurs de MAPK. Les résidus positifs sont soulignés en turquoise alors que les ceux à caractère hydrophobe sont en jaune. Les interacteurs décrits sont les homologues humains. MAPKK: Mitogen Activated Protein Kinase Kinase, PTP: Phospho-Tyrosine Phosphatase, MKP: Map Kinase Phosphatase, FT, Facteur de Transcription et MAPKAPK: MAPK Activated Protein Kinase. Adaptée de (704).

Le domaine D peut être situé à différents endroits sur les partenaires des MAPK. Pour les régulateurs (positifs et négatifs) des MAPK, le domaine D est toujours situé en N-terminal (Figure 24). La localisation du domaine D varie selon la classe de substrats. Ainsi, les facteurs de transcription ont généralement un domaine D en N-terminal du domaine de transactivation de la transcription contenant les sites de phosphorylation des MAPK. À l'opposé, les kinases en aval des MAPK possèdent leur domaine D en C-terminal de leur

domaine kinase. Le domaine D est donc assez éloigné du site de phosphorylation présent dans leur boucle d'activation (Figure 24).

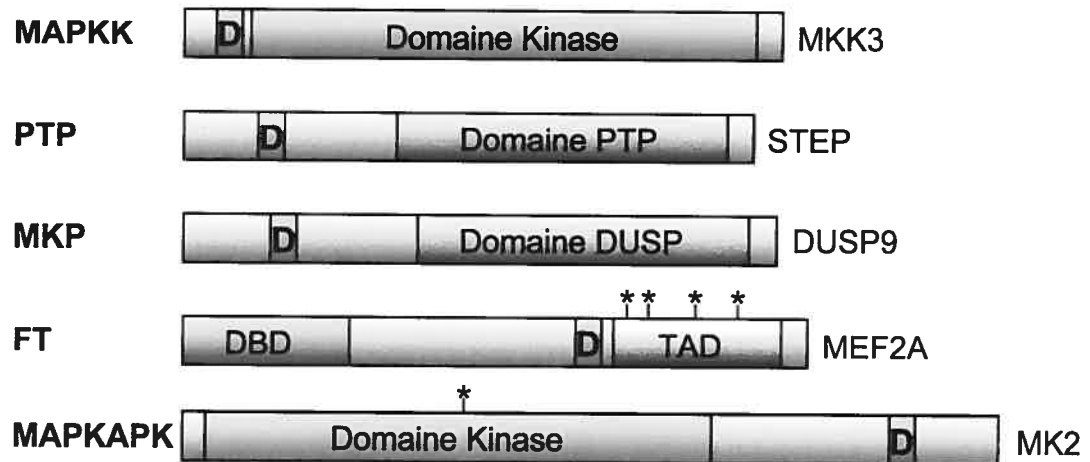


Figure 24: Localisation du domaine D chez les interacteurs des MAPK. Les astérisques marquent la position des sites phosphorylés par les MAPK. PTP: PhosphoTyrosine Phosphatase; FT: Facteur de Transcription; DUSP: DUAL SPecificity phosphatase; DBD: Dna Binding Domain et TAD: TransActivation Domain. Adaptée de (704).

Le domaine D est essentiel pour l'interaction et la phosphorylation d'un nombre croissant de substrats des MAPK ERK1/2, JNK, p38 et ERK5. En plus, le domaine D est responsable d'une certaine spécificité d'interaction. Par exemple, le facteur de transcription à boîte ETS SAP1A est un substrat de p38 β 2 alors que son homologue ELK1 ne l'est pas (41). En introduisant deux mutations dans le domaine D de ELK1 afin qu'il ressemble plus à celui de SAP1A, on obtient un substrat 3 fois plus phosphorylé par p38 β 2. De la même façon, un mutant de c-JUN, substrat de JNK, dont le domaine D est remplacé par celui de MEF2A, un substrat de p38 α , devient un excellent substrat de p38 α et n'est plus phosphorylé par JNK (814). Dans ce dernier cas, le domaine D est responsable en grande partie de la spécificité de la réaction de phosphorylation.

Le domaine D joue finalement un rôle dans la localisation des MAPK. Ainsi, la localisation cytoplasmique des ERK1/2 est assurée par l'interaction avec ses activateurs MEK1/2. La séquence NES de MEK1/2 permet au complexe MEK/ERK une localisation cytoplasmique. La mutation du domaine D de MEK1 diminue sa capacité de relocaliser au cytoplasme ERK1/2 (803).

Le fait que les activateurs, les phosphatases et les substrats interagissent avec les MAPK via un domaine D similaire implique que ces molécules compétitionnent pour le même site de liaison sur les MAPK. En accord avec cette idée, des peptides-domaines D inhibent l'interaction entre les MAPK et leurs partenaires *in vitro*. Par exemple, l'interaction de MEF2A avec p38 α est inhibée le peptide-domaine D de MEF2A, mais également par le peptide-domaine D de SAP1A (814). L'ensemble des données génétiques, biochimiques et cristallographiques prouve l'existence d'une surface sur les MAPK liant le domaine D (voir section 1.1.10.2.1.).

On ignore encore si les autres MAPK ERK3/4, NLK et ERK8 reconnaissent des séquences de type domaine D pour lier leurs partenaires.

Classe d'interacteur	Nom	Domaine FxF(P)
FT ETS	CeLIN1 HsELK1	³⁴¹ I ³⁴¹ SPHLASQSPFRSPLVTPKNLGLGELGSSGRTPGLGESQVFQFP ³⁸⁵ ³⁵² LTPSLLPHTHTLTPVLLTPSSLPPSIHFWSTLSP ³⁵² IAPRSPAKLSFQFP ³⁹⁹
Protéines d'échafaudage	DmKSR HsKSR1	⁴⁶⁷ SPSSSCTSS ⁴⁶⁷ TPSSPALFQQRERELDQAGSSSSANLLPTPSLQKHQPSQFNFPN ⁵¹⁹ ⁴²⁸ DSSSNPSSSTSS ⁴²⁸ TPSSPAPFLTSSNPSSATTPPNPSPGQRDSRFSPD ⁴⁷⁵
FT GATA	HsGATA-3 HsGATA-4	¹¹⁰ SPWNLSPFSKTSIHGSPGPLSVYPPASSSSLSGGHASP ¹¹⁰ HLFTFP ¹⁵⁵ ⁷⁰ SPGGAASGASPGTQQGS ⁷⁰ PGWSQAGATGAA ⁷⁰ YTPPPVSP ¹² PRFS ¹² PG ¹²
PDE	HsPDE4B HsPDE4D	⁶²¹ PDAQDILD ⁶²¹ TLEDNREWYQSTIQ ⁶²¹ SPSPAPDDPEEGRQGGTEK ⁶²¹ QFEL ⁶⁶⁷ ⁴⁰¹ PDAQDILD ⁴⁰¹ TLEDNRN ⁴⁰¹ WYQSMIPQ ⁴⁰¹ SPSPPLDEQNRDCQGLMEK ⁴⁰¹ QFEL ⁴⁴⁷
MKP	HsDUSP1 HsDUSP4	²⁹⁸ SIISP ²⁹⁸ NFSFMGQLLQFESQVLP ²⁹⁸ APHC ²⁹⁸ SAEAGSP ²⁹⁸ AMAVLDRGTST ²⁹⁸ TTVFNFP ³⁴⁶ ³¹⁸ SPNFSFMGQLLQFESQV ³¹⁸ LATSCAAEAAS ³¹⁸ PSGPLRERGKTPAT ³¹⁸ PTSQFVFSFP ³⁷⁰
Nucléopore	HsNup 214 HsNup 153	¹⁹¹⁵ TSNTSNLFGNSGAKTFGGF ¹⁹¹⁵ ASSSFG ¹⁹¹⁵ EQKPTGTFSSGGGS ¹⁹¹⁵ VASQGF ¹⁹¹⁵ SS ¹⁹⁶³ ¹⁰³⁶ TIVTSENKSSFNLT ¹⁰³⁶ GIETKSASVAF ¹⁰³⁶ TCKTSEAKKEEM ¹⁰³⁶ PATKGGFS ¹⁰³⁶ FGN ¹⁰⁸⁶

Figure 25: Alignement des domaines FxF(P) des interacteurs des MAPK ERK1/2. En turquoise sont soulignés les acides aminés formant le motif d'interaction. Les sites de phosphorylation (potentiels et/ou vérifiés) en N-terminal du motif sont soulignés en jaune. Ce: *C. elegans*; Dm: *D. melanogaster*; Hs: *H. sapiens*, PDE: phosphodiesterase, FT: Facteur de transcription, MKP: MAPK phosphatase. Adaptée de (704).

1.1.10.1.2. Motif FxF(P) (ou domaine DEF)

C'est une étude génétique conduite chez le nématode *C. elegans* qui a permis d'identifier un second site d'arrimage chez les substrats de ERK1/2 (309). Chez le nématode, le facteur de transcription LIN-1 est négativement régulé par la voie RAS/MAPK. Biochimiquement, LIN-1 est directement phosphorylé par ERK en C-terminal, de manière similaire à son homologue de mammifère ELK1. Des mutations ont été trouvées dans le C-terminal de LIN-1 dans un crible génétique visant à identifier des mutants insensibles à la voie

RAS/ERK. Certaines de ces mutations sont faciles à rationaliser. Ainsi, deux mutations introduisent un codant stop prématuré entraînant la perte des sites de phosphorylation ERK. Cependant, la majorité des mutations identifiées est située en C-terminal de ces sites de phosphorylation indiquant l'importance de cette région. L'alignement des homologues de la famille ETS révèle que ces mutations sont regroupées sur un motif hautement conservé (Figure 25). Ce site consiste en la séquence FxF(P), la proline n'étant pas absolument conservée. Le motif FxF(P) est également appelé domaine DEF pour Docking for ERK FXF (arrimage pour ERK sur FXF) (309).

Contrairement au domaine D, le motif FxF(P) n'est trouvé que sur les substrats de ERK1/2. Ainsi, ce motif d'arrimage est présent sur les facteurs de transcription ELK1 et SAP1A, GATA-3 et GATA-4, c-FOS mais aussi sur les molécules de signalisation KSR1, A-RAF, PD4D et MKP1/DUSP1 et MKP2/DUSP4 (309, 704). Dans tous les cas, le motif FxF(P) est situé en C-terminal des sites de phosphorylation, près de ceux-ci (Figure 25). Les évidences montrant que le motif FxF(P) joue le rôle de site d'arrimage sont nombreuses. La mutation des deux phénylalanines en alanines diminue grandement la capacité de LIN-1 d'interagir et d'être phosphorylé *in vitro* par ERK2 (309). À l'opposé, l'ajout d'un domaine DEF génère un substrat plus spécifique pour ERK2. De plus, des peptides contenant le motif FxF(P) inhibent la phosphorylation *in vitro* des substrats contenant ce motif, suggérant fortement l'existence d'un site unique d'interaction sur les MAPK (221, 309). Récemment, une élégante étude basée sur la protection de l'échange de deutérium et la spectrométrie de masse a permis d'identifier ce site sur ERK2 (voir section 1.1.10.2.2.).

Tout comme le domaine D, le motif FxF(P) joue un rôle dans la localisation de ERK1/2 (voir section 1.1.8.1.). ERK1/2 sont cytoplasmiques dans des cellules non-stimulées et sont redistribuées au noyau à la suite d'une stimulation. Cette relocalisation se fait en partie via l'interaction directe de ERK1/2 avec les nucléoporines. Ces dernières possèdent des séquences riches en phénylalanine et glycine appelées "FG-repeat" qui sont fonctionnellement équivalentes au motif FxF(P) (471, 779).

Les données biochimiques suggèrent que le motif FxF(P) n'est utilisé que par les MAPK ERK1/2 et p38 α et non par les autres p38 et JNK (221). On ignore si les MAPK ERK3/4, ERK5, ERK7 et NLK utilisent ce type d'interaction pour lier leurs substrats.

1.1.10.2. Séquences présentes chez les MAPK responsables de l'association avec les sites d'arrimages

Les MAPK interagissent avec les deux motifs décrits ci-dessus via deux surfaces indépendantes (Figure 26). Les évidences indiquent que les molécules possédant un domaine D interagissent avec un site unique présent sur la surface des MAPK. Une combinaison d'approches génétique, biochimique, de biologie moléculaire et structurale a permis d'identifier et de délimiter une telle surface sur les MAPK. Cette surface est composée des domaines CD et ED et du sillon d'arrimage (docking groove). D'autre part, le groupe de N Ahn a récemment montré que le motif FxF(P) interagit avec une surface distincte sur les MAPK nommé poche hydrophobe.

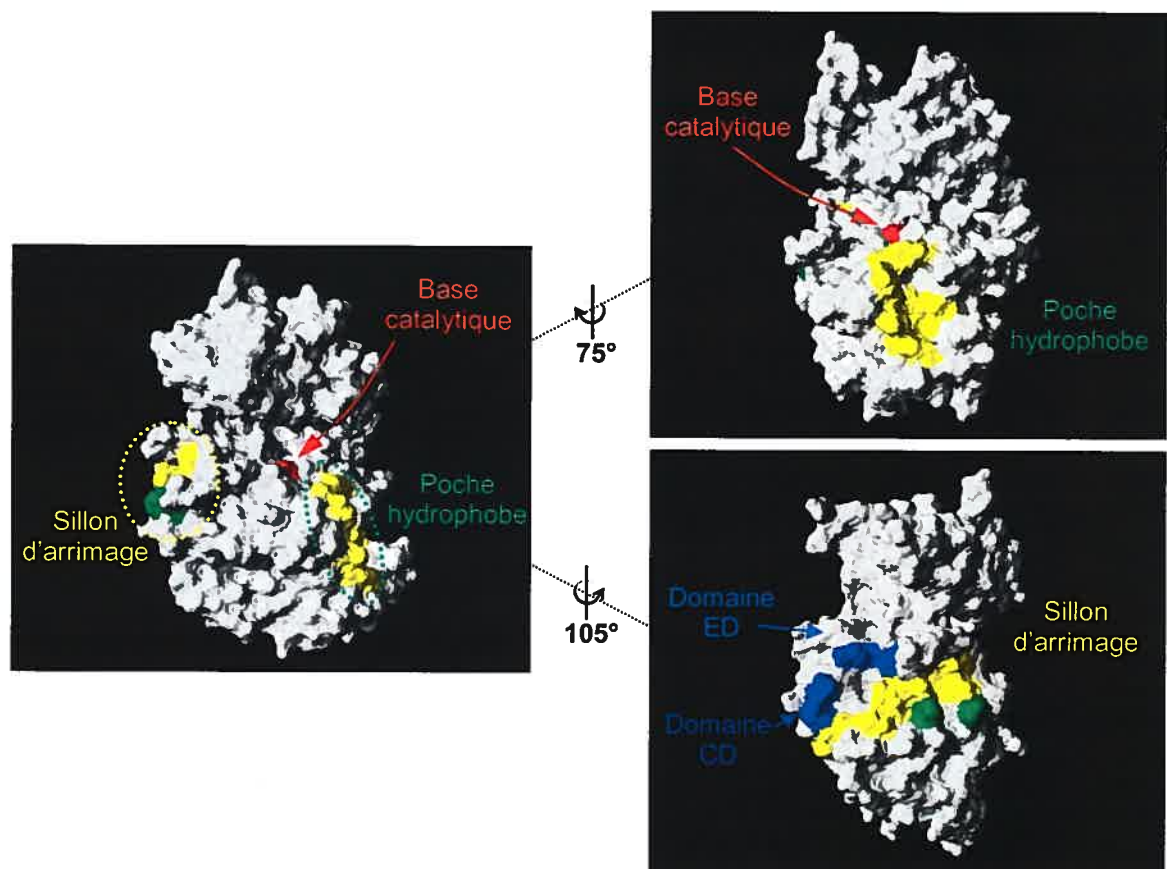


Figure 26: Les MAPK possèdent deux surfaces distinctes liant les sites d'arrimages. Les MAPK interagissent avec le domaine D et le motif FxF(P) via le sillon d'arrimage et la poche hydrophobe respectivement. Ces régions, de même que les domaines CD et ED sont soulignées sur ERK2. Le site actif (base catalytique) est également montré. Figure générée à l'aide de SPBDV 3.7.

1.1.10.2.1. Séquences interagissant avec le domaine D

1.1.10.2.1.1. Domaine CD

L'étude de la voie Sevenless de la morphogénèse de l'œil de la drosophile a grandement contribué à la compréhension des interactions de type "arrimage" chez les MAPK. Cette voie de signalisation est analogue à la voie EGFR-RAS-ERK1/2 chez les mammifères. L'activation du RTK Sevenless génère un signal essentiel pour la différenciation de la cellule R7 de l'œil chez la drosophile (263). Lors de la recherche de suppresseurs du phénotype induit par l'absence de boss, le ligand de sevenless, un mutant de type gain-de-fonction a été identifié chez la MAPK rolled (94). Dans ce mutant, l'acide aspartique 334 est remplacé par une asparagine. Biochimiquement, ce mutant, appelé sevenmaker, n'est pas intrinsèquement plus actif (80). L'activité accrue de rolled^{sem} est plutôt la conséquence d'une insensibilité relative aux phosphatases, telle MKP1 (80). Également, un mutant de ERK2 ressemblant à rolled^{sem} (D319N) interagit moins bien avec MKP3 (105).

En 2000, le groupe de Nishida a produit une importante étude sur les sites d'arrimage (702). Ils ont tout d'abord remarqué que les sites identifiés sur les partenaires sont riches en acides aminés basiques (Figure 23). La mutation des charges positives des interacteurs (MAPKK, MKP et MAPKAKP) diminue grandement leur association avec les MAPK. Ce résultat implique que ces molécules interagissent avec une région chargée négativement sur les MAPK. L'analyse de la structure tridimensionnelle des MAPK ERK2 et p38 α indique que l'Asp319 fait partie d'une région chargée négativement, comprenant également un ou deux autres résidus acides (voir Figure 27, 29 et 31). Le remplacement des charges négatives de ERK2 inhibe son interaction avec MEK1, MNK1 et MKP3. Des mutations similaires chez p38 et JNK empêchent l'interaction avec certains partenaires. De plus, la présence de peptides mimant le domaine D inhibe l'interaction entre la MAPK et son partenaire, suggérant que tous les domaines D interagissent avec la même surface sur les MAPK. Du fait que cette région négative est importante pour l'association des MAPK avec différents partenaires, elle fut nommée domaine CD (pour Common Docking) (Figure 27).

ERK1	<u>330</u> LEQYYDPTDEPVAE ³⁴³
ERK2	<u>311</u> LEQYYDPSDEPIAE ³²⁴
ERK5	<u>347</u> LAKYHDPDDEPDCP ³⁶¹
p38α	<u>308</u> FAQYHDPDDEPVAD ³²¹
p38β	<u>318</u> FSQYHDPEDPEPQVQ ³²⁹
p38γ	<u>311</u> FESLHDTPEDEPQVQ ³²⁴
p38δ	<u>308</u> FEPFRDTEETEAEQ ³²¹
JNK1	<u>321</u> INVWYDPSEAEAPP ³³⁴
JNK2	<u>321</u> ITVWYDPAEAEAPP ³³⁴
JNK3	<u>359</u> INVWYDPSEVEAPP ³⁷²
ERK3	<u>316</u> MSIYSFPMDEPISS ³²⁹
ERK4	<u>312</u> MSPYSCPEDEPTSQ ³²⁵
ERK8	<u>304</u> VQRFHCPSDEWARE ³¹⁷
NLK	<u>415</u> LDEGRLRYHTCMCC ⁴³⁰

*

Figure 27: Alignement du domaine CD des MAPK chez l'homme. Les résidus chargés négativement formant le domaine CD sont soulignés en turquoise. Notez que ce domaine est partiellement conservé chez ERK3, 4 et 8 alors qu'il ne l'est pas du tout chez NLK. Chez cette dernière, les évidences génétiques révèlent néanmoins que cette région est impliquée dans la liaison au substrat. L'astérisque souligne un résidu essentiel pour l'interaction NLK/TCF4.

Tel qu'illustré à la Figure 27, le domaine CD est une caractéristique conservée chez les MAPK. Le domaine CD de ERK1/2, ERK5, p38 et JNK possède deux ou trois résidus acides. Les MAPK plus atypiques ERK3, ERK4 et ERK8 ne possède pas l'acide équivalent à l'Asp316 de ERK2. Chez cette dernière, la mutation de l'Asp316 n'influence que modestement la fonctionnalité de son domaine CD comparativement à la perte de l'Asp319 (702). Il est ainsi possible que les MAPK atypiques possèdent un domaine CD fonctionnel et pertinent physiologiquement. Malheureusement, il n'existe aucune donnée génétique ou biochimique indiquant que ces MAPK médient des interactions de type arrimage. Par alignement de séquence, le domaine CD de NLK n'est pas aisé à identifier (Figure 27). NLK ne possède aucun résidu acide dans son domaine CD putatif. Néanmoins, les données génétiques obtenues chez *C. elegans* (et confirmées par la suite chez les mammifères) indiquent que la Cys425, présente dans le domaine CD putatif de NLK, est essentielle pour l'activité biologique de celle-ci. La mutation de cette cystéine inhibe l'interaction de NLK avec son substrat TCF-4 (307). Ainsi, la région de NLK équivalente au motif CD est aussi impliquée dans l'interaction avec les substrats.

1.1.10.2.1.2. Domaine ED

Le domaine CD n'est pas le seul déterminant des MAPK important pour l'interaction avec le domaine D. Ainsi, l'interaction de MAPKAPK-3 (MK3) n'est pas sensible à la mutation du domaine CD de p38 α (703). Pourtant, la mutation des charges positives du domaine D

de MK3 empêche complètement son interaction avec p38 α , suggérant la présence de charges négatives pertinentes en plus du domaine CD. Tanoue et al. ont ainsi remarqué la présence d'autres charges négatives à proximité du domaine CD (voir Figure 29) en examinant la structure cristalline de p38 α (703). Le groupe de E Nishida a nommé ce site ED à cause de la présence d'un résidu acide glutamique (E) et aspartique (D) chez p38 α (Figure 28). La mutation du site ED, en concomitance avec le motif CD inhibe complètement l'interaction entre p38 α et MK3, confirmant sa pertinence. Le site ED est présent chez tous les membres de la famille p38 (Figure 28). À l'opposé, ERK1/2 possède deux thréonines en place de leur site ED putatif. Par une élégante série d'expériences, Tanoue et al. ont montré que cette différence entre p38 α et ERK1/2 explique en partie leur spécificité d'interaction (703). Par exemple, l'introduction du site ED classique présent chez p38 α dans ERK2 permet son association avec MK3 alors que ERK2 de type sauvage n'interagit pas avec cette MAPKAPK. Par alignement de séquences, les MAPK JNK, ERK5 et ERK8 possèdent un des deux résidus de ce site. On peut penser que cette région joue un rôle dans l'interaction de ERK5 et des JNK avec leurs interacteurs, malgré l'absence d'évidences publiées à ce sujet.

ERK1	⁸⁸ EIQILLRFR-HENVIGIRDIL ¹⁰⁷	¹⁶⁸ KPSNLLIN-TTCDLKICDFG ¹⁸⁶
ERK2	⁷¹ EIKILLRFR-HENIIGINDII ⁹⁰	¹⁵¹ KPSNLLLN-TTCDLKICDFG ¹⁶⁹
ERK5	¹⁰² ELKILKHFK-HDNIIA IKDIL ¹²¹	¹⁷⁴ KPSNLLVN-ENCELKIGDFG ¹⁹²
p38α	⁷¹ ELRLLKHKM-K-HENVIGLLDVF ⁹⁰	¹⁵² KPSNLAVN-EDCELKILDFG ¹⁷⁰
p38β	⁷¹ ELRLLKHLK-HENVIGLLDVF ⁹⁰	¹⁵² KPSNVAVN-EDCELRILDFG ¹⁷⁰
p38γ	⁷⁴ ELRLLKHM-R-HENVIGLLDVF ⁹³	¹⁵⁵ KPGNLAVN-EDCELKILDFG ¹⁷³
p38δ	⁷² ELLLLKHM-Q-HENVIGLLDVF ⁹¹	¹⁵² KPGNLAVN-EDCELKILDFG ¹⁷⁰
ERK3	⁶⁵ EIKIIRRLD-HDNIVKVFEIL ⁸⁴	¹⁵⁴ KPANLFINTEDLVKIGDFG ¹⁷³
ERK4	⁶⁵ EIKIIRRLD-HDNIVKVVEVL ⁸⁴	¹⁵¹ KPANIFISTEDLVKIGDFG ¹⁷⁰
JNK1	⁷³ ELVLMKCVN-HKNIIGLLNVF ⁹²	¹⁵³ KPSNIVVK-SDCTLKILDFG ¹⁷¹
JNK2	⁷³ ELVLLKCVN-HKNIISLLNVF ⁹²	¹⁵³ KPSNIVVK-SDCTLKILDFG ¹⁷¹
JNK3	¹¹¹ ELVLMKCVN-HKNIISLLNVF ¹³⁰	¹⁹¹ KPSNIVVK-SDCTLKILDFG ²⁰⁹
ERK8	⁶⁰ EITLLQEFGDHPNIIISLLDVI ⁸⁰	¹³⁹ KPSNVLLD-ANCTVKLCDFG ¹⁵⁷
NLK	¹⁷³ ELKMLCFFK-HDNVLSALDIL ¹⁹²	²⁵⁴ KPGNLLVN-SNCVLKICDFG ²⁷²

Figure 28: Alignement du domaine ED étendu des MAPK chez l'homme. Les résidus chargés négativement formant le domaine ED sont soulignés en turquoise. NLK et les JNK ne possèdent qu'un seul résidu acide alors que les domaines ED des p38 en contiennent 4.

Des études génétiques et biochimiques suggèrent que le site ED comprend des résidus supplémentaires. En 1999, un second allèle codant pour un mutant de type "gain de fonction" de la MAPK a été identifié chez la drosophile (434). Dans ce mutant, l'acide glutamique 175 de rolled est remplacé par une asparagine. Le résidu correspondant chez ERK2 (D160) est situé très près du site ED (voir Figure 31). Comme chez le mutant

sevenmaker, on pense que la mutation D160N inhibe l'interaction avec les phosphatases et des données biochimiques ont confirmé cette hypothèse. Ainsi, ERK2 D160N a environ 18 fois moins d'affinité pour MKP3 comparativement à la protéine de type sauvage (835). L'acide aspartique 160 est présent (ou substitué en acide glutamique) chez les MAPK ERK1/2, ERK5 et les p38 (Figure 28). De leur côté, Zhang et al. ont identifié un dernier résidu chargé négativement impliqué dans la liaison avec les domaines D (835). Ainsi, en analysant la structure de ERK2, ils ont remarqué que l'acide glutamique 79 est situé à proximité du site ED. La mutation de ce résidu diminue l'interaction de ERK2 avec MKP3 et ELK1 d'un facteur 5,8 et 6,7 fois respectivement. L'acide glutamique 79 est conservé chez tous les homologues de MAPK, à l'exception des JNK (Figure 28). Collectivement, je vais nommer ces différents acides aminés négatifs le "domaine ED étendu".

Le domaine ED étendu est présent chez toutes les MAPK de mammifères (Figure 28). Sa composition exacte varie considérablement. Les données du groupe de Nishida suggèrent que cette variation pourrait être à l'origine, en partie, de la spécificité des interactions MAPK. Il manque néanmoins beaucoup d'informations biochimiques afin de confirmer ou d'infirmier cette hypothèse. Comme on peut le voir, les MAPK ERK3 et ERK4 possèdent également le site ED. On peut ainsi penser que certaines de leurs interactions requièrent ce domaine.

1.1.10.2.1.3. Sillon d'arrimage ("Docking groove")

Les domaines D présents sur les protéines interagissant avec les MAPK sont riches en acides aminés basiques et hydrophobes (voir Figure 23). On vient de voir que ces résidus positifs interagissent avec deux régions acides sur les MAPK. Tous comme les résidus positifs, les résidus hydrophobes sont également très importants. Ainsi, la mutation des résidus hydrophobes du domaine D diminue fortement l'interaction des MAPK ERK2, p38 α , p38 β 2, JNK1 et JNK3 avec leurs activateurs et/ou substrat (41, 164, 803, 814). Une élégante étude cristallographique a permis de comprendre le rôle de ces résidus hydrophobes. Ainsi, le groupe de Goldsmith a réussi à cristalliser p38 α avec un peptide-domaine D de MKK3b et MEF2A (112). Dans les deux cristaux, on voit clairement l'association des peptides-domaines D avec p38 α (Figure 29A). La liaison est surtout

médiée par des interactions hydrophobes. De manière surprenante, les résidus positifs des peptide-domaines ne sont pas ordonnés et n'interagissent donc pas avec les domaines CD ou ED. Ceci pourrait être dû aux conditions de cristallisation. Plus récemment, la structure de la MAPK de levure Fus3p avec différents peptide-domaines D montre l'interaction directe des charges positives du domaine D avec les charges négatives des domaines CD et ED de la MAPK (598).

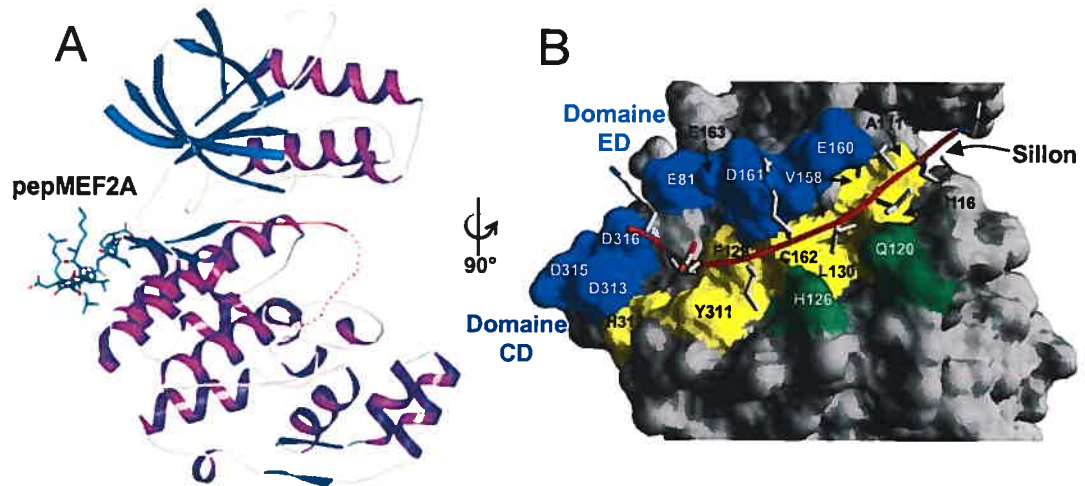


Figure 29: Identification d'un sillon liant les domaines D chez p38 α . (A) Structure de p38 α cocristallisé avec le peptide-domaine D de MEF2A. (B) Détails de l'interaction. Le domaine D de MEF2A (KPDLRVVIPP, en rouge) s'insère dans un sillon hydrophobe composé des résidus A111, I116, F129, L130, V158, C162, Y311 et H312. La glutamine 120 et l'histidine 126 font des ponts hydrogènes avec le peptide (en vert). Les domaines CD (D313, D315 et D316, en bleu) et ED (E81, E160, D161 et E163, en bleu) sont également montrés. Adaptée de (112). Figure générée à l'aide de SPDBV 3.7.

La structure de p38 α /domaine D révèle la présence d'un sillon hydrophobe sur la MAPK dans lequel le peptide-domaine D s'insère (Figure 29B). Les résidus hydrophobes du domaine D sont essentiels à cette association. Un résidu glutamine et histidine sont également sollicités pour fournir des ponts hydrogène avec la chaîne- α du domaine D. Le sillon hydrophobique va donc du site CD au domaine ED. Des expériences de mutagenèse dirigée ont confirmé l'implication de ce sillon dans l'interaction de p38 α avec MKK3b et MEF2A (112). Il est important d'ajouter que le domaine CD est généralement précédé de deux résidus hydrophobes contribuant également au sillon (803) (Figure 30). Ce sillon fut nommé sillon d'arrimage ou docking groove (112).

ERK1	125	METDLYK-LLKSQQ-LSNDHICYFLYQT ¹⁵⁰	171	NLLLN-TTCDLKICD ¹⁸⁴	330	LEQYYDPTD ³⁴³
ERK2	108	METDLYK-LLKTOH-LSNDHICYFLYQT ³¹	154	NLLLN-TTCDLKICD ¹⁶⁷	313	LEQYYDPSD ³²⁴
ERK5	140	MESDLHQ-IIHSQP-LTLEHVRYFLYQL ⁶⁵	187	NLLVN-ENCELKIGD ¹⁹⁰	347	LAKYHDPDD ³⁶¹
p38α	109	MGADLNN-IVKQK-LTDDHVQFLIYQT ³⁴	155	NLAVN-EDCELKILD ¹⁶⁸	308	FAQYHDPDD ³²¹
p38β	109	MGADLNN-IVKQA-LSDEHVQFLVYQL ³⁴	155	NVAVN-EDCELRILD ¹⁶⁸	316	FSQYHDPED ³²⁹
p38γ	112	MGTDLGK-LMKHEK-LGEDRIQFLVYQM ³⁷	158	NLAVN-EDCELKILD ¹⁷¹	311	FESLHDTED ³²⁴
p38δ	110	MQTDLQK-IMGME--FSEEKIQYLVYQM ³⁴	155	NLAVN-EDCELKILD ¹⁶⁸	308	FEPFRDTEE ³²¹
ERK3	111	METDLAN-VL-EQGPLEEHARLFMYQL ³⁶	157	NLFINTEDLVLKIGD ¹⁷¹	316	MSIYSFPM ³²⁹
ERK4	108	METDLAR-LL-EQGTLAEEHAKLFMYQL ³³	154	NIFISTEDLVLKIGD ¹⁶⁸	312	MSPYSCPED ³²⁵
JNK1	111	MDANLCQ-VIQME--LDHERMSYLLYQM ³⁷	156	NIVVK-SDCTLKILD ¹⁶⁹	321	INVWYDPSE ³³⁴
JNK2	111	MDANLCQ-VIHME--LDHERMSYLLYQM ³⁵	156	NIVVK-SDCTLKILD ¹⁶⁹	321	ITVWYDPAE ³³⁴
JNK3	149	MDANLCQ-VIQME--LDHERMSYLLYQM ⁷³	194	NIVVK-SDCTLKILD ²⁰⁷	359	INVWYDPSE ³⁷²
ERK8	95	MDTDLNA-VIRKGGLLQDVHRSIFYQL ²¹	142	NVLLD-ANCTVKLCD ¹⁵⁵	304	VQRFHCPSD ³¹⁷
NLK	210	MQSDLHKIIVSQP-LSSDHVKVFLYQT ²³⁶	257	NLLVN-SNCVLKICD ²⁷⁰	415	LDEGRLRYH ⁴³⁰

Figure 30: Alignement des résidus formant le sillon d'arrimage (docking groove). Les acides aminés hydrophobes sont soulignés en turquoise. En plus des interactions hydrophobes, le domaine D lie les MAPK à l'aide de ponts hydrogènes avec la glutamine 120 et l'histidine 126 chez p38 α (en jaune).

Par alignement de séquences, on peut facilement voir que les résidus constituant le sillon d'arrimage sont hautement conservés chez tous les membres des MAPK, y compris ERK3 (Figure 30). Pour mieux comprendre le sillon d'arrimage putatif de ERK3, j'ai construit un modèle tridimensionnel de cette MAPK en me basant sur la structure de ERK2 sous forme non-phosphorylée (Figure 31).

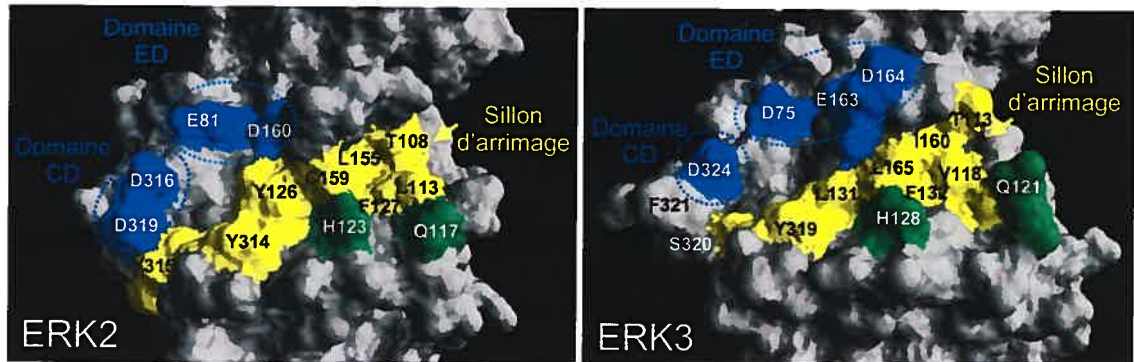


Figure 31: Domaines CD et ED et sillon d'arrimage proposés de ERK2 et ERK3. (A) Les résidus impliqués dans l'association avec le domaine D sont identifiés chez ERK2. Les Asp316 et 319 forment le domaine CD (en bleu). Les Glu81 et Asp160 participe au domaine ED étendu (en bleu). Les résidus T110, L113, Y126, F127, L155, C159, Y314 et Y315 participent au sillon d'arrimage (en jaune). La Gln117 et l'His123 sont importants pour les interactions polaires avec le domaine D (en vert). (B) ERK3 fut modélisée sur la structure de ERK2 sous forme non-phosphorylée. Les domaines d'interaction putatifs de ERK3 avec le domaine D sont illustrés. Figure générée à l'aide de SPDBV 3.7.

On peut voir que les domaines CD et ED et le sillon d'arrimage présumés de ERK3 ressemblent beaucoup à ceux observés chez ERK2. Il serait donc possible que cette MAPK atypique lie certains de ses partenaires via cette surface. Récemment, plusieurs groupes de recherche dont le notre ont montré que ERK3 interagit avec la MAPKAPK MK5/PRAK (640, 651). La mutation du domaine D de MK5 n'affecte pas son interaction avec ERK3 alors qu'elle empêche complètement son interaction avec p38 α . L'extrémité C-terminale de

MK5 semble plutôt importante pour son association avec ERK3. L'identification de protéines d'interaction supplémentaires de ERK3/4 va éclaircir ce sujet.

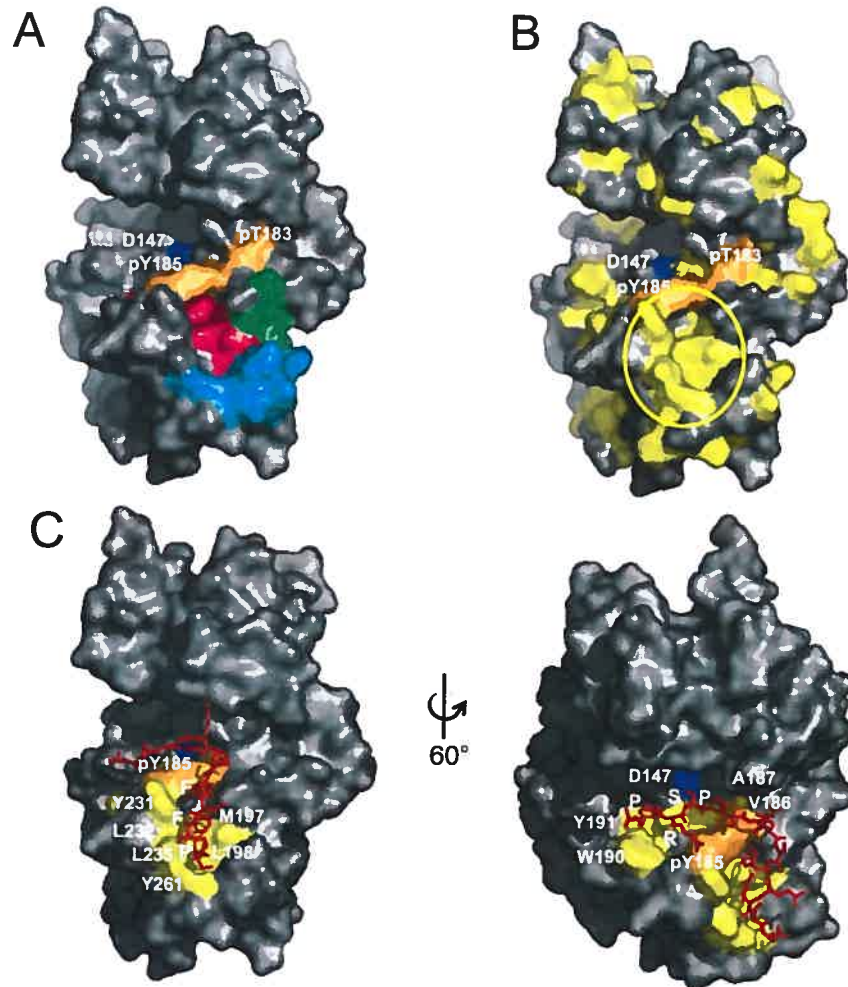


Figure 32: Identification d'une poche hydrophobe interagissant avec le motif FxF(P) sur ERK2. (A) Les trois peptides (vert, bleu pâle et rose) montrant la plus grande protection en présence du peptide ELK1 sont illustrés. (B) Les résidus à caractère hydrophobe présent à la surface de ERK2 sont soulignés en jaune. On remarque une région (entourée en jaune) se superposant avec la région identifiée en A. (C) Un peptide de ELK1 contenant le site de phosphorylation en plus du domaine DEF (PRSPAKLSFQFPS, en rouge) est modélisé sur la poche hydrophobe de ERK2. Notez que les deux Phe s'insèrent dans la poche alors que le site phosphorylable est près du site actif (D147). Adaptée de (419).

1.1.10.2.2. Séquence interagissant avec le motif FxF(P): la poche hydrophobe

En plus du domaine D, certaines MAPK interagissent avec leur substrat via la séquence FxF(P). Afin de déterminer la surface impliquée dans cette interaction, le groupe de N Ahn a entrepris des expériences de spectrométrie de masse couplées à l'échange de protons (419). Ces expériences sont basées sur le fait que la chaîne- α des protéines échange continuellement des protons avec le solvant aqueux. Le blocage d'une surface à cause d'une

interaction protéine-protéine perturbe la cinétique de cet échange. Grâce à la précision des spectromètres de masse modernes, il est possible d'observer l'échange de deutérons chez les peptides tryptiques issus de la protéine d'intérêt. L'incubation de ERK2 et p38 α avec des peptides-domaine D protège le sillon d'arrimage de l'échange deutéronique, confirmant la fiabilité de la méthodologie. L'utilisation d'un peptide contenant la séquence FxF(P) de ELK1 a révélé la présence d'une région riche en acides aminés hydrophobes (Figure 32). Cette surface est distincte du sillon d'arrimage et fut nommé simplement poche hydrophobe (hydrophobic pocket for FxF binding). Afin de tester cette région, les auteurs ont tout d'abord modélisé le domaine DEF de ELK1 sur la surface de ERK2. On observe que les deux phénylalanines s'insèrent dans la poche hydrophobe. De manière intéressante, la sérine phosphorylée se place tout près du site actif de l'enzyme (Figure 32C). La mutation des résidus hydrophobes tapissant cette région a confirmé son rôle dans la liaison des motifs FxF(P).

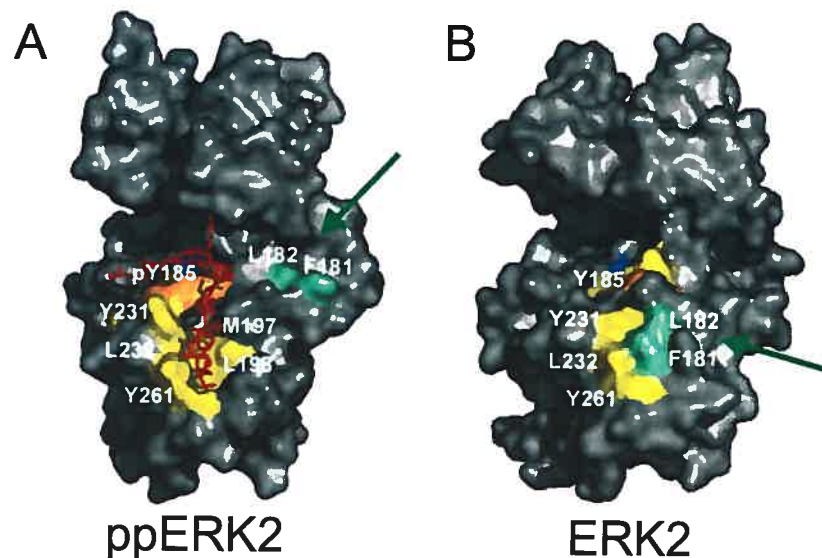


Figure 33: La poche hydrophobe est masquée chez la forme non-phosphorylée de ERK2. (A) La Phe181 et la Leu182 (flèche verte) sont éloignées de la poche hydrophobe (en jaune) dans la structure de ERK2 di-phosphorylée. (B) Ces deux résidus occupent partiellement la poche chez ERK2 inactif. Tirée de (419).

En étudiant les structures de ERK2 sous forme phosphorylée et non-phosphorylée, les auteurs ont remarqué que la poche hydrophobe n'est fonctionnelle que lorsque ERK2 est active. En effet, la Phe181 et la Leu182 occupent partiellement la poche dans la structure de ERK2 non-phosphorylée. Ces deux résidus sont repositionnés loin de la poche par la

double phosphorylation (Figure 33). Des expériences biochimiques de type "pull-down" ont confirmé cette idée (419).

Les données publiées par le groupe d'AD Sharrocks montrent que le motif FxF(P) est reconnu par ERK1, ERK2 mais également p38 α (221). En effet, la mutation du motif FxF(P) de SAP1A diminue sa phosphorylation par p38 α *in vivo*. De plus, un peptide-domaine FxF(P) de SAP1A agit comme inhibiteur compétitif sur l'activité de p38 α *in vitro*. À l'opposé, les MAPK p38 β , p38 δ et JNK2 ne semblent pas affectées par le motif FxF(P).

		* *								
ERK1	199	GFLTEYVATR	WYRAPEIMLNSKGY	222	245	FPGKHYLDQLNHI	257	272	IINMKARNYLQSLP	285
ERK2	180	GFLTEYVATR	WYRAPEIMLNSKGY	203	228	FPGKHYLDQLNHI	240	255	IINLKARNYLLSLP	268
ERK5	216	YFMTEYVATR	WYRAPELMLSLHEY	239	262	FPGKNYVHQLQLI	274	289	VGAERVRAYIQSLP	302
p38α	177	DEMTGYVATR	WYRAPEIMLNWMHY	200	223	FPGTDHIDQLKLI	235	250	ISSESARNYIQSLI	263
p38β	177	EEMTGYVATR	WYRAPEIMLNWMHY	200	223	FPGSDYIDQLKRI	235	250	ISSEHARTYIQSLP	263
p38γ	180	SEMTGYVVTR	WYRAPEVILNWMRY	203	224	FKGSDHLDQLKEI	236	253	LQSDEAKNYMKGLP	266
p38δ	177	AEMTGYVVTR	WYRAPEVILSWMHY	200	223	FKGKDYLDQLTQI	235	250	LNDKAAKSYIQSLP	263
JNK1	180	FMMTPYVVTR	YYRAPEVIL-GMGY	202	225	FPGTDHIDQWNKI	237	252	L-NLKARNYLLSLP	264
JNK2	180	FMMTPYVVTR	YYRAPEVIL-GMGY	202	225	FQGTDHIDQWNKI	237	252	L-QPTVRNYVENRP	264
JNK3	218	FMMTPYVVTR	YYRAPEVIL-GMGY	240	263	FGRDYIDQWNKI	275	290	L-QPTVRNYVENRP	302
ERK3	186	GHLSEGLVTK	WYRSPRLLSPNNY	209	232	FAGAHELEQMQLI	244	259	LLS-VIPVYIRNDM	271
ERK4	183	GYLSEGLVTK	WYRSPRLLSPNNY	206	229	FAGAHELEQMQLI	241	256	LLR-VMPSFVSSWT	268
ERK8	172	QAVTEYVATR	WYRAPEVLLSSHRY	195	218	FPGTSTLHQLLELI	230	245	LGGCRASVLHQLG	258
NLK	283	RHMTQEVVTR	QYYRAPEILMGSRHY	308	329	FQAQSPIQQLDLI	341	356	ACEGAKAHIL-RGP	368

Figure 34: Alignement des régions impliquées dans la formation de la poche hydrophobe liant le motif FxF(P) des MAPK chez l'homme. Les résidus tapissant ce sillon sont soulignés en turquoise. On peut voir que ces acides aminés sont bien conservés dans la famille MAPK. Les séquences de ERK3/4 sont beaucoup plus divergentes. En jaune sont les résidus impliqués dans le masquage de la poche hydrophobe tel que révélé par la structure de ERK2 non-phosphorylé. Les sites de phosphorylations sont marqués d'un astérisque.

Par alignement de séquences, on peut voir que les résidus constituant la poche hydrophobe sont très conservés chez la majorité des MAPK humaines (Figure 34). Il est ainsi possible qu'il y ait d'autres séquences à caractère hydrophobe impliquées dans l'interaction MAPK/substrat.

ERK3/4 sont les MAPK dont la poche hydrophobe est la moins bien conservée. Notamment, la tyrosine phosphorylée du motif TXY est toujours remplacée par une glycine chez les homologues et les orthologues de ERK3. J'ai modélisé la structure de ERK3 en me basant sur la structure de ERK2 di-phosphorylée et j'ai souligné les résidus impliqués dans sa poche hydrophobe putative (Figure 35). On peut remarquer que cette région de ERK3 n'est que partiellement conservée comparativement à ERK2. On ignore si cette région joue un rôle dans la biologie de ERK3.

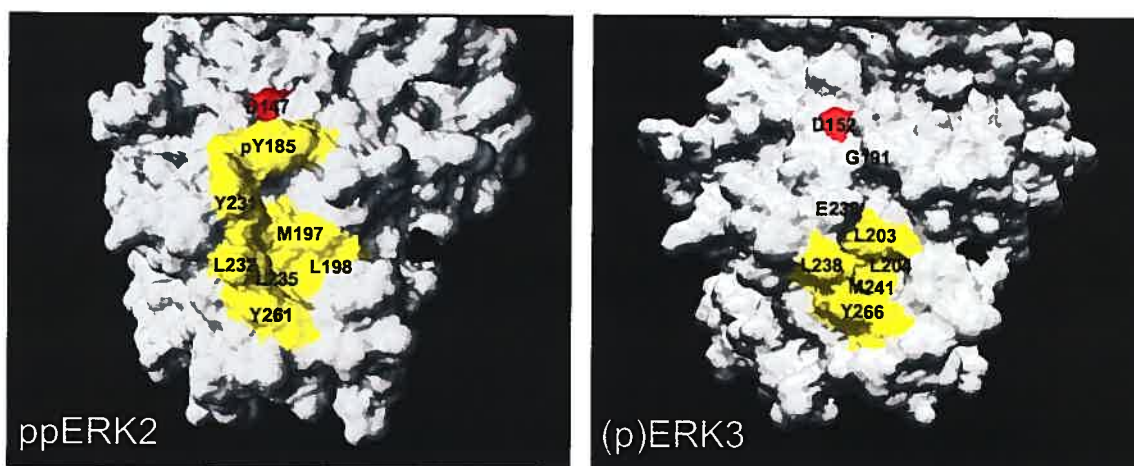


Figure 35: Poche hydrophobe de ERK2 et ERK3. (A) Les résidus hydrophobes de ERK2 (sous forme phosphorylée) impliqués dans la liaison au motif FxF(P) sont soulignés en jaune (pY185, M197, L198, Y231, L232, L235 et Y261). La base catalytique est indiquée en rouge. (B) ERK3 fut modélisée sur la structure de ERK2 sous forme di-phosphorylée. La poche hydrophobe potentielle de ERK3 est illustrée. On remarque que celle-ci n'est que partiellement formée comparativement à celle de ERK2. Figure générée à l'aide de SPDBV 3.7.

1.2 LE SYSTÈME UBIQUITINE-PROTEASOME

1.2.1. Historique et Prix Nobel

Les protéines cellulaires originent de l'activité biosynthétique des ribosomes. Pendant longtemps, les biologistes ont pensé que les protéines étaient métaboliquement stables *in vivo*. Selon cette vision, la régulation de la concentration intracellulaire (ou expression) d'une protéine est principalement contrôlée par l'activation transcriptionnelle de son gène. Depuis le début des années 80, on réalise que le contrôle de la stabilité métabolique des protéines permet un niveau supplémentaire de régulation (743). La voie ubiquitine-protéasome est une voie majeure de régulation de la stabilité protéique chez les eucaryotes. Ce système permet de contrôler très finement la concentration cellulaire d'une protéine et par conséquent son activité, dans le temps et l'espace.

Le système ubiquitine-protéasome joue de nombreux rôles essentiels à la vie des eucaryotes (voir revue (275, 563)). Par exemple, cette voie est essentielle pour la division cellulaire, la réparation de l'ADN et l'expression génique. Conséquemment, cette voie est excessivement conservée de la levure jusqu'à l'homme. Chez ce dernier, en plus de jouer un rôle essentiel dans de multiples processus biologiques, la voie ubiquitine-protéasome est également impliquée dans certaines maladies. En particulier, les cancers peuvent originer de la

perturbation de la voie ubiquitine/protéasome (voir revue (460)). En 2004, pour souligner l'importance physiologique de cette voie, le prix Nobel de chimie a été attribué aux découvreurs de celle-ci : Avram Hershko, son étudiant Aaron Ciechanover et leur collaborateur Irwin Rose (752). La limite de trois récipiendaires par prix Nobel ne permet pas toujours de reconnaître le travail de tous les contributeurs. Ainsi, les travaux exceptionnels d'Alexander Varshavsky ont eu un impact important sur la caractérisation physiologique et le clonage moléculaire des composants de cette voie (44).

1.2.2. Une protéolyse nécessitant une protéase, un signal de dégradation et de l'énergie

Les expériences menées par MV Simpson en 1953 ont pour la première fois suggéré l'idée que la dégradation protéique intracellulaire requiert de l'énergie (666). Vers la fin des années 70, A Hershko, A Ciechanover et I Rose ont entrepris de comprendre ce phénomène par une approche biochimique. Ils confirmèrent que la dégradation de certaines protéines (Rnase A, lysosyme, α -globine) par un extrait de réticulocytes est dépendante de l'ATP (137). En fractionnant l'extrait sur une colonne échangeuse d'ions DEAE, il fut constaté que la dégradation protéique nécessite au moins deux composants de nature protéique. Ainsi, les fractions I (ne liant pas la colonne) et II (l'éluat à 0,5M NaCl) ne peuvent seules entraîner la dégradation protéique mais sont actives une fois combinées (137, 277).

La fraction II contient entre autre une protéase neutre maintenant connue sous le nom de 26S protéasome (voir revue (753)). Les études subséquentes ont montré que le 26S protéasome nécessite de l'ATP pour son fonctionnement. L'élément actif de la fraction I est une petite protéine thermorésistante (137). Cette dernière, nommé APF-1 (ATP-dépendant Proteolysis Factor-1) est attachée de manière covalente sur le substrat (276). Cette réaction de conjugaison nécessite également de l'ATP. La conjugaison de l'APF-1 est le signal de dégradation reconnu par la protéase, le 26S protéasome. APF-1 s'est révélé être identique à l'ubiquitine, une protéine ubiquitaire déjà connue (785). Subséquemment, Hershko et ses collaborateurs ont découvert que la conjugaison de l'ubiquitine ou ubiquitination nécessite l'activité de trois protéines : les E1, E2 et E3 (278). Durant la deuxième moitié de la décennie 80, les évidences s'accumulèrent montrant que ce nouveau système protéolytique joue un rôle essentiel dans la biologie des eucaryotes. Ainsi, le système ubiquitine-

protéasome est notamment impliqué dans le cycle cellulaire, la survie, la réponse aux stress, la réparation de l'ADN, la traduction ribosomale et la transcription (202-204, 234, 286, 315).

1.2.3. Le 26S protéasome

1.2.3.1. Découverte du protéasome

Le protéasome a été identifié bien avant son implication dans la protéolyse intracellulaire dépendante de l'ATP. En 1968, des expériences de microscopie électronique à transmission ont montré la présence de structures cylindriques dans un lysat d'érythrocyte (261). Parallèlement à la découverte du rôle de l'ubiquitination dans la dégradation protéique, plusieurs groupes reportèrent l'identification d'un complexe de haut poids moléculaire possédant une activité protéolytique (153, 602). Ce complexe, identifié dans plusieurs tissus et espèces, possède la forme d'un cylindre (265, 366). En 1988 (20), ce complexe protéolytique fut nommé protéasome car il fut constaté que cette PROTÉase est identique au complexe proSOME, une présumée ribonucléoprotéine (636).

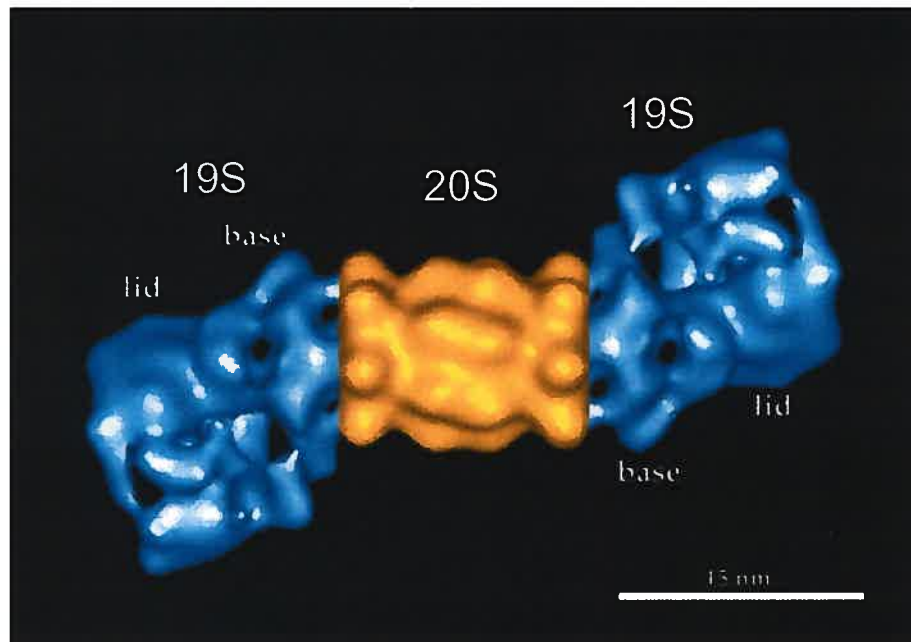
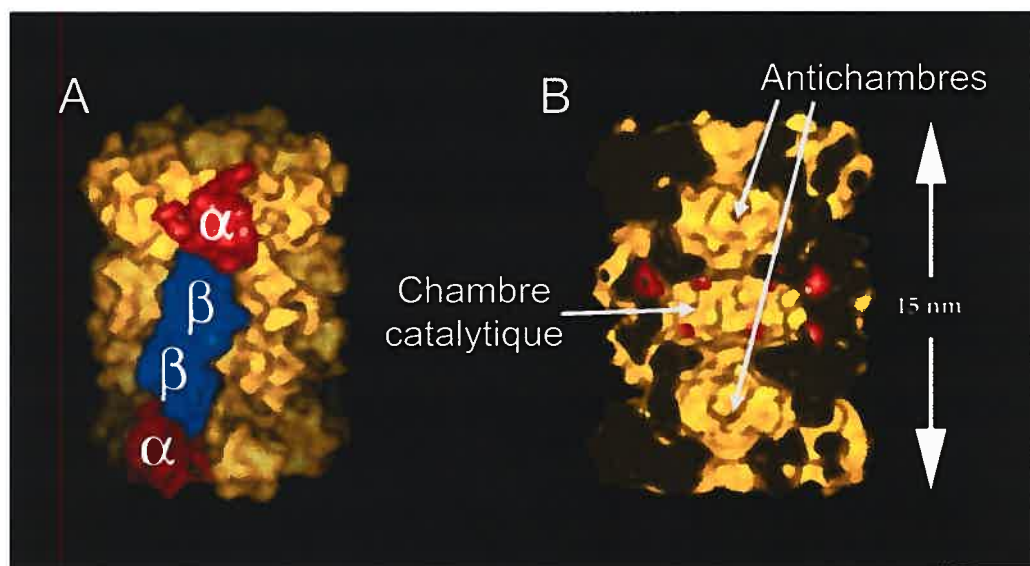


Figure 36: Modèle tridimensionnel du 26S protéasome basé sur des données de microscopie électronique et de cristallographie chez *Drosophila* et *Thermoplasma*. Le 19S protéasome (en bleu) est attaché aux extrémités du 20S protéasome (en orange). La position approximative de la base (base) et du couvercle (lid) du 19S protéasome est indiquée. Tirée de (753).

Chez les eucaryotes, le protéasome est responsable de la dégradation des protéines conjuguées avec l'ubiquitine. Pour ce faire, le protéasome possède deux sous-complexes distincts, le 20S protéasome et le 19S protéasome. La combinaison de ces sous-complexes génère le 26S protéasome (Figure 36) (558). Le 20S protéasome est en forme de cylindre et possède l'activité protéolytique. Le 19S protéasome contrôle ce qui entre dans les entrailles du 20S protéasome. Le protéasome existe également chez les archaebactéries mais non chez les eubactéries (699). Chez les archaebactéries, telle *Thermoplasma acidophilum*, il n'y a pas de couvercle (19S protéasome) et le 20S protéasome est plus simple. Contrairement aux eucaryotes, le protéasome des archaebactéries n'est pas essentiel à la viabilité (156).



1.2.3.2. Le 20S protéasome

1.2.3.2.1. Structure

Le 20S protéasome est un complexe d'environ 700 kDa en forme de cylindre de 15 x 10 nm (243). Quelle que soit l'espèce, le 20S protéasome est constitué de 28 sous-unités de petites tailles. Ces sous-unités sont de deux types distincts mais apparentés : α et β . 7 sous-unités de chaque type s'assemblent pour former un anneau. 2 anneaux de sous-unités α s'associe

avec 2 anneaux β selon l'ordre $\alpha\beta\beta\alpha$ générant ainsi le 20S protéasome (Figure 37A). La structure cristallographique du 20S protéasome indique la présence d'un espace à l'intérieur du cylindre séparé par deux cloisons (Figure 37B). La chambre centrale est le siège de l'hydrolyse et est tapissée par les sous-unités β catalytiques. Les deux compartiments aux extrémités du protéasome, les "antichambres", ont un rôle obscur. L'entrée du tunnel est bloquée par la portion N-terminale des sous-unités α (243). On pense que cette région doit subir des changements conformationnels dépendant du 19S protéasome permettant l'ouverture et le passage des substrats.

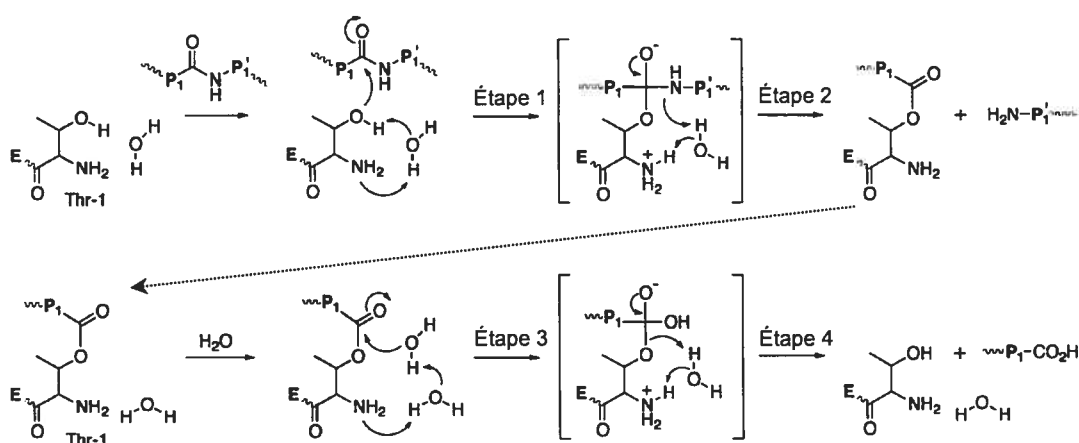


Figure 38: Mécanisme proposé de l'hydrolyse catalysée par le 20S protéasome. Tirée de (511).

1.2.3.2.2. Activité enzymatique

Biochimiquement, le 20S protéasome possède trois types d'activité protéolytiques : une activité semblable à la chymotrypsine (chymotrypsin-like), une semblable à la trypsine (trypsin-like) et une semblable aux caspases (caspase-like), aussi appelée activité hydrolase post-glutamyle peptidique (post-glutamyl peptide hydrolyzing activity, PGPH) (783). Ainsi, le protéasome clive ses substrats en C-terminal des résidus hydrophobes volumineux (tyrosine et phenylalanine), basiques (arginine et lysine) et acides (acide aspartique et glutamique). Trois sous-unités β sur les 7 formant les anneaux centraux du 20S protéasome sont responsables de l'activité catalytique. Le protéasome appartient à la famille des hydrolases N-terminal nucléophile (176). Le groupe hydroxyle de la Thr1 est le nucléophile attaquant le carbone du groupement carbonyle du substrat (voir mécanisme proposé à la

Figure 38). La dégradation par le protéasome engendre des peptides de 7 à 9 résidus en moyenne (774). On pense que cette caractéristique provient de la configuration de la chambre catalytique. Les produits issus de la dégradation par le protéasome sont ensuite clivés en acides aminés par des peptidases intracellulaires. Les peptides peuvent également être transloqués dans la lumière du réticulum endoplasmique, où ils sont présentés à la surface cellulaire via les molécules du MHC (voir revue (550)).

Le protéasome joue un rôle majeur dans la réponse immunitaire acquise. De manière intéressante, dans certaines conditions, comme en réponse à l'interféron γ (IFN γ), l'activité catalytique du protéasome change (218). L'IFN γ induit l'expression de LMP2, MECL-1 et LMP7. Ces trois protéines sont très similaires aux sous-unités β et sont incorporées dans les protéasomes, formant ce que l'on appelle l'immunoprotéasome (550). L'immunoprotéasome est plus actif contre les résidus basiques et hydrophobes mais moins contre les résidus acides (218). On pense que l'immunoprotéasome aide la réponse immunitaire en produisant un répertoire différent de peptides immunogéniques.

In vitro, le 20S protéasome ne dégrade pas les protéines natives (480). Les données cristallographiques indiquent que l'entrée du protéasome est encombrée par le N-terminal des sous-unités α (243). De plus, une protéine, même ubiquitinée, n'est pas dégradée par le 20S protéasome. La dégradation d'un substrat ubiquitiné requiert l'association du 20S protéasome avec le 19S protéasome. Néanmoins, le 20S protéasome est capable de dégrader des substrats ne possédant pas de structure tertiaire, tel l'inhibiteur de cdk p21^{WAF1} (439). Ce résultat indique que le 20S protéasome dégrade des substrats dénaturés (sans structure secondaire et tertiaire) de manière endoprotéolytique.

1.2.3.2.3. Les inhibiteurs du protéasome

Comme de nombreuses protéases, l'activité du 20S protéasome est sensible à certaines molécules (voir revue (511)). Grâce à ces inhibiteurs, le rôle *in vivo* du protéasome dans de nombreux processus biologiques a pu être démontré. Il existe plusieurs inhibiteurs structurellement distincts qui peuvent être classés selon leur caractère peptidomimétique et

selon leur groupement électrophile. Dans tous les cas, ces inhibiteurs interagissent avec le groupement nucléophile de la Thr1 des sous-unités β catalytiques (200).

1.2.3.2.3.1. Inhibiteurs analogues de peptides.

1.2.3.2.3.1.1. Peptides aldéhydes.

Les premières substances identifiées comme étant actives contre la protéasome sont les inhibiteurs des protéases dépendantes du calcium, les calpaines (Figure 39A) (538). Ces inhibiteurs de synthèse sont des analogues de peptides hydrophobes. La fonction aldéhyde qu'ils possèdent en C-terminal est essentielle pour leur activité. En se basant sur cette structure, plusieurs autres inhibiteurs furent créés, telle la série des MG (609). Le MG-132 illustré à la Figure 26B a été utilisé pour la caractérisation de ERK3 (voir chapitres 2 et 3). On pense que les régions hydrophobes de ces inhibiteurs interagissent avec le site semblable à la chymotrypsine (chymotrypsin-like) du protéasome. L'aldéhyde interagirait avec la thréonine catalytique (444). Ces inhibiteurs inactivent également l'activité PGPH (caspase-like). Ce type d'inhibiteur est peu spécifique et réversible.

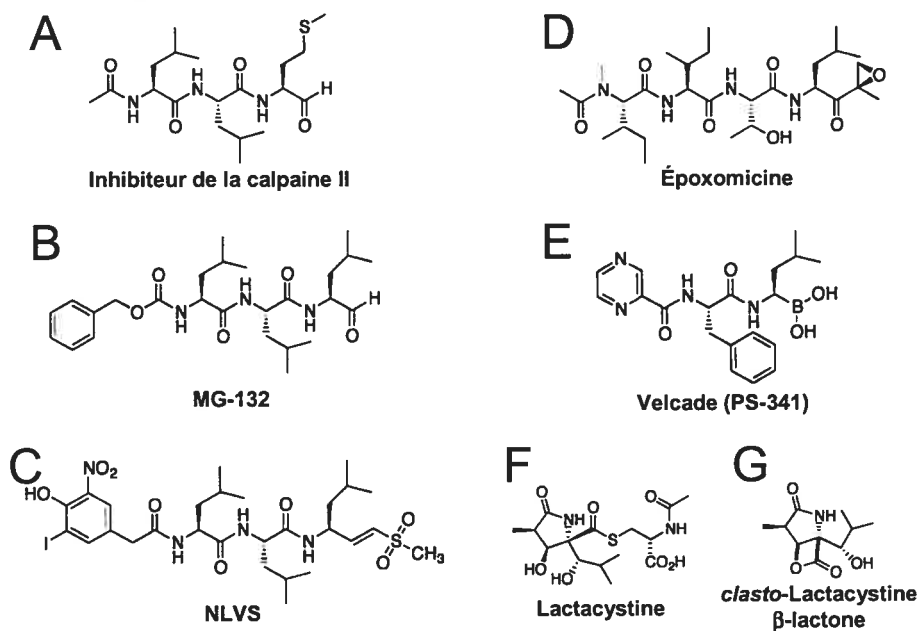


Figure 39: Structure des inhibiteurs du protéasome. Voir texte pour détails. Tirée de (511).

1.2.3.2.3.1.2. Peptides acides boroniques.

Cette classe d'analogues de peptides hydrophobes utilise la fonction acide boronique afin d'inhiber le protéasome (Figure 39E) (6). On pense que le bore interagit de manière non-covalente mais stable avec l'oxygène de la Thr1. L'interaction se fait via l'orbitale-p vide du bore et un des deux doublets d'électrons libres de l'oxygène de la Thr1. Cette classe comprend le premier inhibiteur du protéasome utilisé chez l'homme, le Velcade (ou PS-341, Figure 39E) (549). Velcade est très spécifique pour le protéasome. Il est efficace contre certains cancers, notamment le myélome multiple (755).

1.2.3.2.3.1.3 Autres inhibiteurs peptidomimétiques

Les peptides hydrophobes ayant une fonction susceptibles aux attaques nucléophiles sont actifs contre le protéasome (Figure 39C et D). Ainsi, l'époxomycine (possédant une fonction α',β' -époxykétonne) et le 4-Hydroxy-5-iodo-3-nitrophenylacetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinyl vinyl sulfone (NLVS, possédant une fonction vinyl sulfone) modifient la thréonine N-terminale des chaînes β catalytiques du protéasome (voir (511)).

1.2.3.2.3.2. Inhibiteurs non-peptidiques.

1.2.3.2.3.2.1. Lactacystine.

Le champignon microscopique *Streptomyces lactacystinaeus* sécrète une substance pouvant induire la croissance des neurites chez la lignée cellulaire de neuroblastome Neuro-2a (536). Cette substance, la lactacystine, a ensuite été identifiée comme un inhibiteur spécifique du protéasome (Figure 39F) (200). Chez les cellules Neuro-2a de même que chez les cellules de phéochromocytome PC12, l'inhibition du protéasome active la voie ERK1/2, une voie suffisante pour la croissance des neurites (266). En solution, la lactacystine se transforme spontanément en *clasto*-lactacystine β -lactone, le produit actif (Figure 39G). Structuellement, la lactacystine n'est pas un analogue peptidique mais plutôt bicyclique sous sa forme active. L'inhibition résulte de l'estérification de la Thr1 (200). Cependant, les données récentes suggèrent que cette classe d'inhibiteurs agit sur d'autres

protéases cellulaires (226). De plus, la complexité de sa synthèse a limité son développement. J'ai utilisé ces composés durant mon étude sur ERK3 (voir chapitres 2 et 3).

1.2.3.2.3.2.2. Gliotoxine.

Également sécrétée par une levure, la gliotoxine inhibe l'activité du protéasome (389). La structure de la gliotoxine contient un bicycle essentiel pour son activité. La liaison S-S de la gliotoxine doit être sous forme oxydée pour être active.

1.2.3.3. Le 19S protéasome.

Le 20S protéasome n'est pas capable par lui-même de dégrader les protéines ubiquitinées. Il nécessite son association avec le 19S protéasome. Également connu sous le nom de PA700, le 19S protéasome se fixe à l'extrémité du 20S protéasome formant ainsi le 26S protéasome observé *in vivo* (Figure 36, plus haut) (voir revue (753)). Il est composé de 17 sous-unités chez la levure (20 chez l'homme) et a un poids de 875 kDa (233). Le 19S protéasome est responsable de la dépendance de l'ATP du 26S protéasome. Afin qu'une protéine ubiquitinée soit dégradée, le 19S protéasome doit exécuter les fonctions suivantes : (i) le recrutement du substrat ubiquitiné, (ii) la dénaturation du substrat, (iii) l'ouverture du 20S protéasome, (iv) la translocation du substrat vers l'intérieur, (v) le recyclage de l'ubiquitine et (vi) l'activation catalytique du 20S protéasome. Dans certaines conditions salines *in vitro*, le 19S protéasome peut être dissocié en 2 sous-complexes : le couvercle et la base (232).

1.2.3.3.1. La base du 19S protéasome

La base du 19S protéasome contient 9 sous-unités. Six de ces sous-unités (S7/Rpt1p, S4/Rpt2p, S6/Rpt3p, S10b/Rpt4p, S6'/Rpt5p, et S8/Rpt6p) partagent un domaine d'environ 200 acides aminés de la famille des ATPases AAA (692). On pense que ces ATPases jouent plusieurs rôles : (i) faciliter la formation du 26S protéasome à partir du 19S et 20S sous-complexes (160); (ii) contrôler l'ouverture du 20S protéasome (243); (iii) dénaturer le substrat (450) et (iv) faciliter sa translocation (408). Les 6 ATPases s'assemblent en un

complexe en forme d'anneau s'associant avec l'anneau de sous-unités α du 20S protéasome (232). Le décalage de phase entre la base hexamérique et le 20S protéasome heptamérique suggère chez certains que la base et le 20S protéasome tourne l'un par rapport à l'autre (753). Cette rotation pourrait faire partie intégrante de la dégradation médiée par le 26S protéasome. Chez la levure, les sous-unités ATPasiques de la base sont des gènes essentiels (voir (753)). D'un autre côté, l'expression de mutant inactif des différentes ATPases permet la survie et entraîne des phénotypes variés et non identiques. Les évidences indiquent donc que les ATPases ne sont pas équivalentes et présentent des fonctions spécifiques. Par exemple, Rpt2p serait impliquée dans l'ouverture du 20S protéasome (373).

Trois autres protéines s'associent aux ATPases et font partie de la base : S1/Rpn2p, S2/Rpn1p de même que S5a/Rpn10p. S1 et S2 sont deux protéines apparentées (729). Chacune possède une séquence riche en leucine (leucine rich repeat, LRR). Ce domaine est en général impliqué dans des interactions protéine-protéines (voir revue (369)). Ces deux protéines sont essentielles chez la levure. Elles interagissent avec l'anneau d'ATPases via deux sous-unités : S1 liant S10b et S2 liant S4 (601, 784). Récemment, S2 fut identifié comme un récepteur majeur des protéines polyubiquitinées du protéasome (749). S2 ne lie pas directement les chaînes de polyubiquitine mais interagit avec les protéines réceptrices Rad23p et Dsk2p. Ce sont elles qui lient directement l'ubiquitine via leur domaine UBA (voir section 1.2.5.2.). Elles lient S2 via leur domaine semblable à l'ubiquitine Ubl. L'inactivation de S2 entraîne une accumulation de protéines ubiquitinées, confirmant son rôle dans la dégradation (250).

La sous-unité S5a est également intéressante. *In vitro*, cette protéine de 50 kDa lie les chaînes de polyubiquitines (169). Spécifiquement, S5a lie les chaînes de polyubiquitine reliée par la lysine 6, 11 ou 48. Des expériences structure-fonction ont identifié les domaines C-terminals de S5a, nommés PUbS1 et 2 (PolyUbiquitin Site-1 and 2) ou Ubiquitin Interacting Motif (UIM), comme étant responsable de la liaison à l'ubiquitine (voir section 1.2.5.) (209). Le N-terminal n'est pas impliqué dans cette interaction. S5a est également retrouvée à l'état monomérique non associé au protéasome. Basée sur ces données, l'hypothèse que S5a serait un récepteur majeur des protéines ubiquitinées et dynamiquement impliquée dans leur recrutement au 26S protéasome a été émise. Les données génétiques chez la levure n'ont pas confirmé cette idée (738). Les cellules

déficientes S5a (Rpn10p) sont quasi-normales. La majorité des substrats du protéasome est dégradée et ne s'accumule pas. La délétion de S5a entraîne néanmoins une sensibilité aux analogues d'acides aminés et une stabilisation du substrat artificiel de la voie UFD (pour Ubiquitin-fusion-dégradation, voir section 1.2.4.5.) ubiquitine-Pro- β -galactosidase. Des expériences de complémentation montrent que la région N-terminale de S5a est importante pour sa fonction *in vivo*, et non les domaines UIM (209). L'association du couvercle avec la base du 19S protéasome est affaiblie par l'absence de S5a. Ainsi, on pense que la fonction principale de S5a est de permettre une certaine cohésion du 19S protéasome. Il y a donc redondance dans les récepteurs des chaînes de polyubiquitines (voir section 1.2.5.).

1.2.3.3.2. Le couvercle (lid) du 19S protéasome

Un complexe constitué du 20S protéasome et de la base du 19S protéasome est incapable de dégrader les substrats polyubiquitinés. Il lui manque le couvercle. Ce sous-complexe du 19S protéasome est composé de 8 sous-unités : S3/Rpn3p, Rpn5p, S9/Rpn6p, S10a/Rpn7p, S11/Rpn9p, S12/Rpn8p, S13/Rpn11p et S14/Rpn12p (753). Cinq de ces protéines possèdent un domaine PINT/PCI (S3/Rpn3p, Rpn5p, S9/Rpn6p, S10a/Rpn7p et S11/Rpn9p) alors que S12/Rpn8p et S13/Rpn11p possèdent un domaine MPN. Ces domaines ne sont retrouvés que chez deux autres complexes multiprotéiques : le COP9/signalosome et le complexe eIF3 (pour Eukaryotic Initiation Factor 3) (22, 771). Ces deux complexes sont structurellement semblables au couvercle du protéasome. Le COP9/signalosome est impliqué dans la régulation des ubiquitine ligases SCF, E3 multimériques à domaine RING (voir section 1.2.4.4.2.3.). Le complexe eIF3 quant à lui facilite le recrutement de l'ARNm et de l'ARNt^{Met} sur le ribosome 40S (voir revue (224)).

La majorité des sous-unités du couvercle est essentielle chez la levure (voir (753)). De plus, la sous-unité S12/Rpn8p est essentielle pour le développement embryonnaire chez la souris (674). Chez la levure, l'inactivation des sous-unités du couvercle entraîne l'accumulation de protéines ubiquitinées (753). Malgré leur importance évidente, le rôle spécifique des sous-unités du couvercle est mal compris.

Trois groupes de recherche ont identifié la sous-unité S13/Rpn11p comme étant responsable de la déubiquitination du substrat par le 26S protéasome (476, 748, 816). Ainsi,

Rpn11p possède un domaine JAMM (pour JAB1/MPN/Mov34) ressemblant aux métalloprotéases. Ce domaine, observé chez tous les organismes vivants (147), est caractérisé par le motif (EX_nHS/THX₇SXXD). Des données biochimiques et structurales ont confirmé que ces résidus participent à la coordination d'un ion de zinc (15). Cette disposition ressemble à celles de l'endoprotéase à Zn de *Streptomyces caespitosus* (ScNP pour *Streptomyces caespitosus* zinc endoprotease) et de la thermolysine. Les sous-unités à domaine JAMM sont inactives sous forme de monomère. Le motif JAMM est également présent chez la sous-unité Csn5/JAB1 du COP9/Signalosome (voir section 1.2.7.2.).

La mutation du domaine JAMM de Rpn11p est incompatible avec la vie. *In vitro*, les protéasomes possédant une sous-unité Rpn11p mutante ne sont pas capables de débubiquitiner un substrat modèle. Les évidences indiquent donc que la majeure partie de l'activité de débubiquitination du protéasome est assurée par Rpn11p (476, 748, 816).

1.2.4. Ubiquitination

La très grande majorité des substrats du protéasome requiert la conjugaison de plusieurs molécules d'ubiquitine pour leur dégradation. La conjugaison de l'ubiquitine ou ubiquitination est l'étape la plus régulée générant ainsi la spécificité du système ubiquitine-protéasome (voir revue (563, 564)). Des expériences de purification biochimique exécutées par A Hershko et ses collaborateurs ont permis d'identifier les médiateurs de l'ubiquitination. L'ubiquitination est une réaction dépendante de l'ATP nécessitant l'activité de trois classes de protéines : une E1, E2 et E3 (Figure 40) (278). La E1 ou enzyme d'activation de l'ubiquitine est la protéine située la plus en amont dans le système. Cette enzyme active l'ubiquitine dans une réaction dépendante de l'ATP. L'ubiquitine est ensuite transférée sur une des E2 ou enzymes de conjugaison de l'ubiquitine. La réaction finale de transfert de l'ubiquitine sur le substrat est catalysée par les E3 ou ubiquitine ligases. Cette dernière classe d'enzymes est très variée et est responsable de la spécificité de l'ubiquitination. Une E4 ou enzyme de polymérisation de l'ubiquitine est impliquée dans l'ubiquitination de certains substrats. Après la caractérisation biochimique initiale du système de conjugaison de l'ubiquitine, de nombreuses évidences génétiques ont révélé que ce système joue un rôle vital dans plusieurs processus biologiques tels la division cellulaire, le métabolisme de l'ADN, la méiose ou l'endocytose. Par exemple, l'inactivation de

l'enzyme E1 induit un arrêt du cycle cellulaire (203) alors que l'inactivation de la E2 Rad6p affecte la réparation de l'ADN (315).

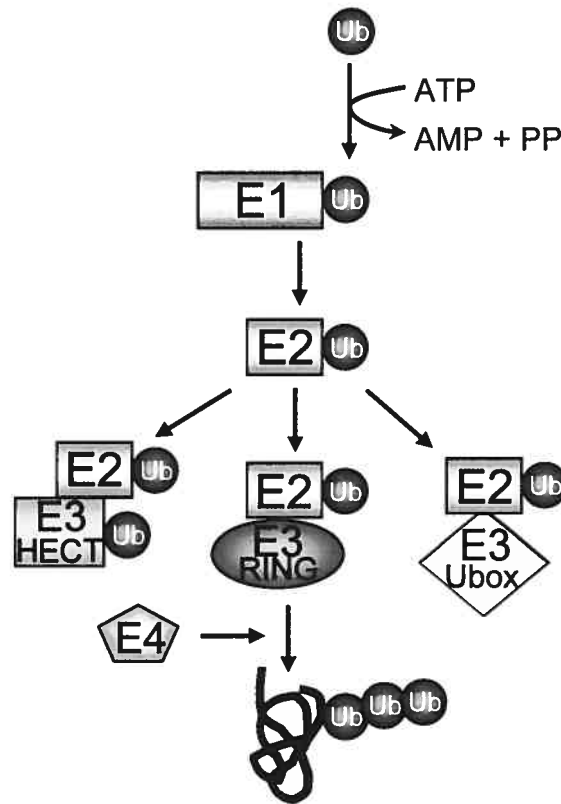


Figure 40: La réaction d'ubiquitination. L'ubiquitine est activée par l'action de la E1 ou enzyme d'activation de l'ubiquitine. L'activation de l'ubiquitine requiert de l'ATP et génère un intermédiaire thioester entre une cystéine de la E1 et le C-terminal de l'ubiquitine. L'ubiquitine est ensuite transférée sur une E2 ou enzyme de conjugaison de l'ubiquitine. Avec l'aide d'une E3 ou ubiquitine-ligase, l'ubiquitine est transféré sur le substrat. Dans certains cas, la polyubiquitination nécessite l'activité d'une E4 ou enzyme de polymérisation de l'ubiquitine. Voir le texte pour plus de détails.

1.2.4.1. Ubiquitine

L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés très conservée dans l'évolution. En effet, il n'y a que 3 substitutions entre la forme humaine et celle de la levure. L'ubiquitine est produite sous forme de précurseurs pouvant contenir plusieurs copies d'ubiquitine (Figure 41A) (743). Ce précurseur est mûré par les enzymes de déubiquitination (DUB, voir section 1.2.6.).

1.2.4.1.1. Structure

La structure tridimensionnelle de l'ubiquitine est très simple, expliquant probablement sa thermostabilité (Figure 41B) (751). L'ubiquitine possède un C-terminal flexible et une

surface hydrophobe constituée des acides aminés Leu8, Ile44 et la Val70. Cette surface est impliquée dans la conformation des chaînes reliées par la Lys48 (voir section 1.2.4.6.2.1.). Le mode de repliement de l'ubiquitine se retrouve chez d'autres protéines, comme par exemple le domaine de liaison à RAS de RAF (RBD pour Ras Binding Domain) (515), la E1 (voir section 1.2.4.2.) ou les protéines semblables à l'ubiquitine (voir section 1.2.7.).

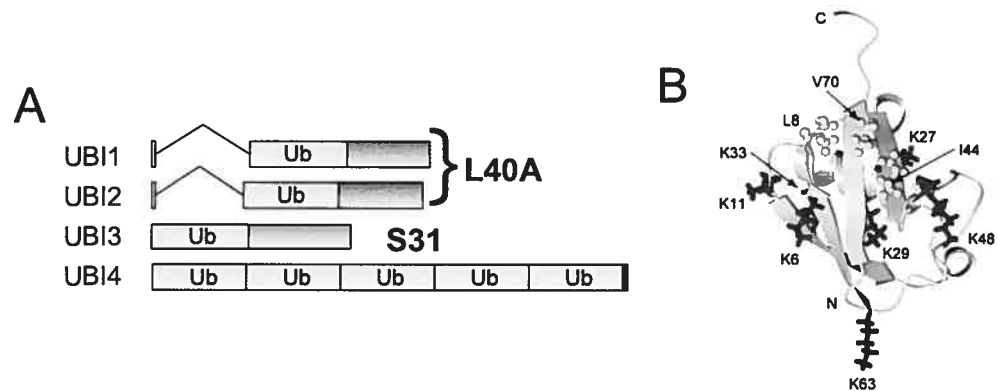


Figure 41: L'ubiquitine. (A) Schéma illustrant l'organisation des gènes de l'ubiquitine chez la levure. Notez que l'ubiquitine est exprimée sous forme de précurseurs nécessitant l'action des enzymes de déubiquitination afin de révéler la glycine C-terminal. L40A et S31 sont deux protéines ribosomales. (B). Structure de l'ubiquitine. L'ubiquitine possède un feuillet β et deux hélices α . La leucine 8, l'isoleucine 44 et la valine 70 sont trois résidus hydrophobes importants pour la fonction de l'ubiquitine. De plus, les 7 lysines permettant la polyubiquitination sont montrées. Tirée de (565, 743).

L'ubiquitine est conjuguée via son C-terminal sur un groupement amine du substrat (136, 236). Ce groupement amine est généralement l'amine- ϵ d'une lysine (voir section 1.2.4.7.).

1.2.4.2. E1 ou enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1)

Autant chez la levure que chez l'homme, il n'existe qu'une seule enzyme responsable d'activer l'ubiquitine nécessaire pour la totalité des réactions d'ubiquitination (479, 829). La E1 ou enzyme d'activation de l'ubiquitine (Ubiquitin Activation Enzyme) lie tout d'abord l'ATP suivi de l'ubiquitine et les fait réagir afin de produire un adduit ubiquitine-adénylate (Figure 42, 1) (249). Cette réaction libère une molécule de pyrophosphate (PP_i). L'intermédiaire est ensuite transféré sur une cystéine catalytique (Figure 42, 2). Ce faisant, le premier site de la E1 est de nouveau libre et peut reformer un intermédiaire adénylate (Figure 42, 3). La E1 peut donc lier deux molécules d'ubiquitines. L'ubiquitine est ensuite transférée vers une des nombreuses E2 dans une réaction ne nécessitant pas d'énergie (Figure 42, 4).

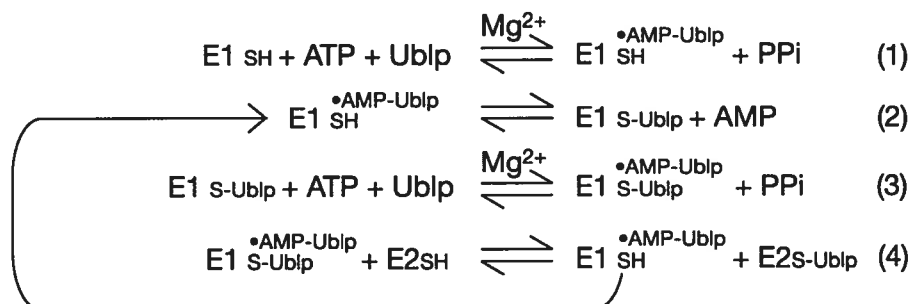


Figure 42: Réaction catalysée par la E1 ou enzyme d'activation de l'ubiquitine. (1), la E1 fait réagir l'ATP avec l'ubiquitine formant l'adduit AMP-Ublp et libérant le PPi. (2), l'ubiquitine est ensuite transférée via son C-terminal sur la cystéine catalytique de la E1, générant un intermédiaire thioester. (3), la E1 reforme un nouvel adduit adénylate de l'ubiquitine. La E1 peut ainsi lier deux molécules d'ubiquitines en même temps. (4) l'ubiquitine est finalement transférée sur une E2 ou enzyme de conjugaison de l'ubiquitine. Tirée de (757).

Chez la levure, la E1 est une enzyme essentielle pour la viabilité (479). Durant les années 80, plusieurs groupes ont entrepris d'étudier le cycle cellulaire chez les mammifères par une approche génétique, à l'instar de la levure (524, 832). Les lignées cellulaires *ts20* et *tsBN75* sont ainsi caractérisées par une prolifération thermosensible. De façon intéressante, l'enzyme E1 s'est révélé mutée dans ces lignées (133, 525). Cette observation montra très clairement le rôle du système de conjugaison de l'ubiquitine dans la progression du cycle cellulaire des mammifères. De nos jours, ces lignées cellulaires sont utilisées en tant que test génétique afin d'évaluer le rôle du système de conjugaison de l'ubiquitine dans la dégradation d'une protéine d'intérêt (voir chapitres 2 et 3).

1.2.4.2.1. Structure

Les données structurales proviennent de l'étude d'un orthologue de la E1, l'enzyme d'activation de la protéine semblable à l'ubiquitine (ULP pour Ubiquitin-Like Protein) NEDD8 (voir section 1.2.7.) (757). Contrairement à la E1 de l'ubiquitine, l'enzyme d'activation de NEDD8 est un hétérodimère formé de APP-BP1 et UBA3 (Figure 43A). Le complexe APP-BP1/UBA3 présente un long sillon tapissé de résidus catalytiques hautement conservé (Figure 43B). Ce repliement est similaire à celui de la protéine procaryotique MoeB, le précurseur des E1 eucaryotiques (405). La structure de la E1 avec ses substrats NEDD8 et ATP montre que NEDD8 s'insère dans ce sillon (756). De plus, on observe que la glycine C-terminale de NEDD8 est près du phosphate α de l'ATP. La séquence en C-terminal de NEDD8 est importante pour expliquer la spécificité de APP-BP1/UBA3 pour celle-ci. L'alanine 72 de NEDD8 interagit par des liaisons de type Van der

Waals avec la chaîne aliphatique de l'arginine 190 de UBA3. La E1 de NEDD8 ne lie pas l'ubiquitine car celle-ci possède une arginine à la position 72, entraînant une répulsion électrostatique avec l'arginine 190 de UBA3. Le remplacement de l'arginine 190 par une glutamine permet au complexe APP-BP1/UBA3 de lier l'ubiquitine, confirmant la pertinence de ces déterminants pour la spécificité.

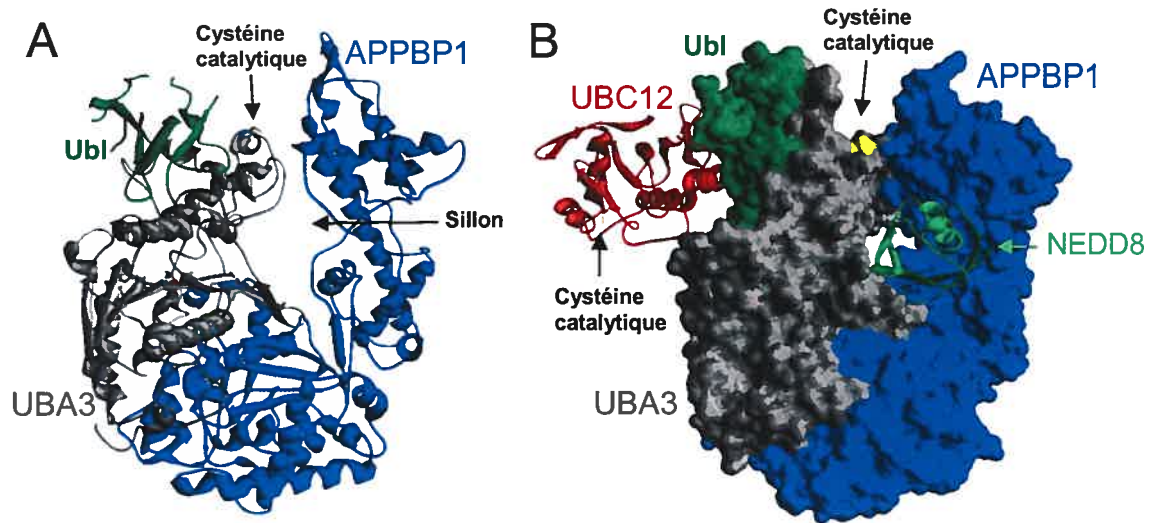


Figure 43: Structure de APP-BP1/UBA3, la E1 de la voie NEDD8. (A) Structure en ruban de APP-BP1 (en bleu)/UBA3 (en gris). Notez la présence d'un long sillon contenant la cystéine catalytique. Le domaine ressemblant à l'ubiquitine Ubl est souligné en vert. (B) Modèle de APP-BP1/UBA3 complexée avec la E2 UBC12 et son substrat NEDD8. La E2 (en rouge) interagit avec le domaine Ubl de UBA3 (en vert foncé). Il est intéressant d'observer que les deux cystéines catalytiques sont éloignées par plus de 50 Å. NEDD8 (en vert pâle) s'insère dans le sillon à l'interface de UBA3 et APPBP1. Adaptée de (298, 756). Figure générée par SPDBV 3.7.

La cystéine catalytique est située à environ 35 Å du C-terminal de NEDD8. De plus, le complexe APP-BP1/UBA3-NEDD8-ATP ne présente qu'un seul site de liaison pour la ULP. On postule que des changements conformationnels importants se font durant le cycle catalytique de l'activation de NEDD8. Ces changements entraîneraient un rapprochement de la cystéine et du C-terminal de NEDD8, et potentiellement la formation du deuxième site de liaison de NEDD8.

Le C-terminal de UBA3 se replie de façon semblable à l'ubiquitine (Figure 43A, domaine identifié Ubl). Récemment, la structure de UBA3 complexé avec la E2 UBC12 a été déterminée (298). Dans cette structure, la E2 interagit avec UBA3 via le Ubl. La cystéine catalytique de la E2 est à plus de 50 Å de celle de la E1 (Figure 43B). Comme pour le transfert de l'intermédiaire adénylate vers la cystéine de la E1, le transfert vers la E2 nécessite un changement conformationnel.

1.2.4.3. E2 ou enzyme de conjugaison de l'ubiquitine

Le rôle de la E1 est de transférer l'ubiquitine vers les enzymes de conjugaison de l'ubiquitine ou UBC ou E2. Les E2 sont caractérisées par un domaine de 150 acides aminés (563). Certaines E2 présentes aussi des extensions en N et/ou C-terminal que l'on pense importantes pour médier des interactions protéines-protéines possiblement avec les E1 et E3. Les E2 possèdent une cystéine catalytique qui reçoit l'ubiquitine de la E1. La levure possède 13 UBC alors que les humains en expriment plus de 100 (284). Cette diversité peut s'expliquer de plusieurs façons. Les E2 ont des fonctions spécifiques mais aussi redondantes. Par exemple, chez la levure, la dégradation du facteur de transcription MAT2 α p requiert 4 E2, notamment Ubc6p et Ubc7p (121). À l'opposé, la dégradation de l'inhibiteur de CDK Sic1p nécessite exclusivement la E2 Cdc34p (644).

La diversification des E2 permet une régulation et une spécificité de substrat accrues. UBCH10 en est un bon exemple (589). La cycline A est dégradée en mitose et en début de phase G1 par la E3 APC/C (voir section 1.2.4.4.2.3.). La dégradation de Cycline A2 est dépendante de la présence de UBCH10. Durant la progression dans la phase G1, UBCH10 est dégradée par une réaction d'autoubiquitination. Cela permet l'accumulation de Cycline A2 malgré le fait que la ligase APC/C soit toujours active à cause de la présence d'autres UBC. Cet exemple montre que les E2 influencent la sélectivité de la ligase et que ces enzymes peuvent être régulées.

1.2.4.3.1. Structure

Les E2 possèdent un domaine globulaire muni d'une cavité contenant la cystéine catalytique (Figure 44A) (300). Le complexe d'une E2 liée covalamment avec l'ubiquitine, étudié par RMN, indique que la E2 interagit minimalement avec l'ubiquitine. Seuls les résidus entourant la cystéine catalytique interagissent avec le C-terminal de l'ubiquitine. Il semble donc que la spécificité d'interaction entre la E2 et l'ubiquitine soit dictée par la E1 (756). Les données structurales ne permettent pas de comprendre le mécanisme de transfert de l'ubiquitine médié par les E2. Ainsi, la cavité catalytique ne semble pas contenir les bases générales impliquées dans la déprotonation du nucléophile (soit la cystéine d'une E3 à domaine HECT ou l'amine- ϵ du substrat) et dans la stabilisation de la charge négative du

groupement carbonyle de la glycine 76 de l'ubiquitine (563). Il se peut que ces fonctions soient supportées par les E3. Il se peut aussi que la liaison d'une E2 à une E3 réarrange certains résidus critiques. Les complexes E2/E3 indiquent que les E2 interagissent avec les ligases avec une surface spécifique (Figure 44B) (300, 843).

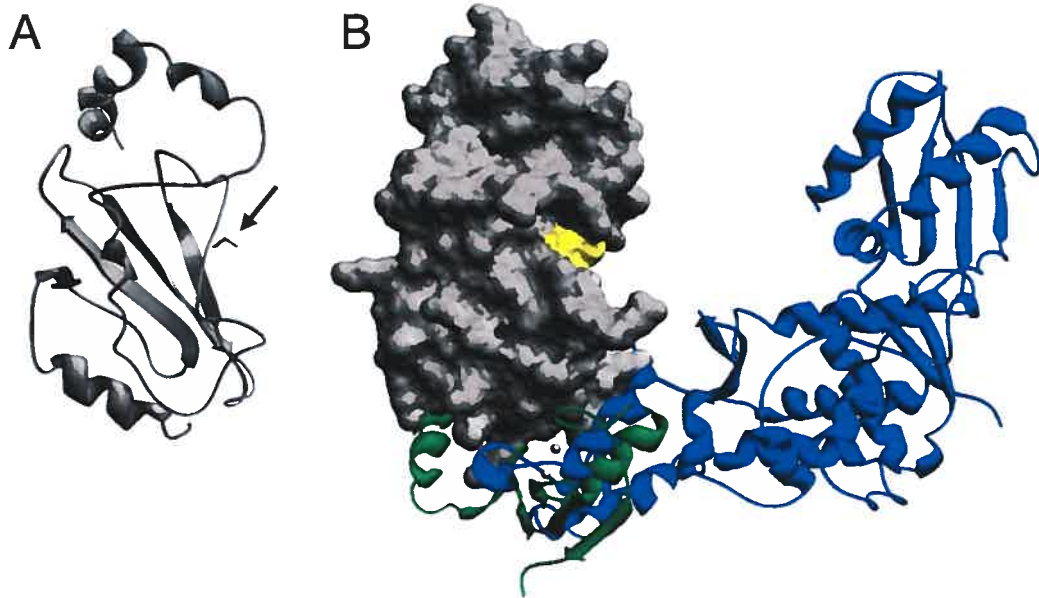


Figure 44: L'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2. (A) Structure en ruban de UBCH7. La cystéine catalytique y est indiquée (flèche). (B) UBCH7 interagissant avec les E3 ubiquitine-ligases de différentes classes avec la même surface. La structure du domaine HECT de E6-AP (en bleu) et du domaine RING de c-CBL (en vert) sont superposées en prenant comme référence UBCH7. La surface de UBCH7 (en gris) est montrée de même que la cystéine catalytique (en jaune). Adaptée de (300, 843). Figure générée à l'aide de SPDBV 3.7.

1.2.4.4. E3 ou ubiquitine ligase

Les E3 ou ubiquitines ligases sont les enzymes responsables de la spécificité de la réaction d'ubiquitination. Ces enzymes interagissent à la fois avec une E2 et le substrat. En général, l'association E3/substrat est régulée. Les E3 sont classées en trois groupes : les ligases à domaine HECT, à domaine RING ou à boîte U (revue dans (563, 564)). Ces domaines interagissent spécifiquement avec les E2. Les séquences des E3 autres que ces domaines servent à lier directement ou indirectement le substrat. Les E3 sont ainsi monomériques ou font partie de complexes multiprotéines. Les ligases reconnaissent un motif, un signal précis sur leur substrat généralement nommé dégron. L'activité des dégrons peut-être constitutive ou régulée par modification post-traductionnelle ou par association avec des cofacteurs.

Les E3 forment une classe de protéines qui s'est diversifiée et spécialisée durant l'évolution : les humains pourraient exprimer plus d'un millier de E3 (284). Ces protéines régulent des processus fondamentaux tels la division cellulaire ou la suppression tumorale. Leur dérèglement peut entraîner des pathologies graves. Grâce à des évidences génétiques, biochimiques et structurales, le fonctionnement de cette famille de protéines est de mieux en mieux compris. Néanmoins, on ignore encore les détails mécanistiques de la réaction d'ubiquitination catalysée par ces enzymes.

1.2.4.4.1. Ligase à domaine HECT

L'infection des cellules par le virus HPV (Human Papilloma Virus) entraîne la dégradation du gène suppresseur de tumeur p53 (634). Cet effet dépend de la protéine virale E6. *In vivo*, E6 induit la formation d'un complexe contenant p53 et une protéine cellulaire, E6-AP (pour E6 Associated Protein). Cette dernière est responsable de la dégradation de p53 (632). E6-AP contient un domaine d'environ 350 acides aminés qui est aussi présent chez d'autres protéines, autant chez la levure que chez l'homme. Ce domaine, nommé HECT (pour Homologous to E6-AP Carboxy-Terminus) est responsable de la réaction d'ubiquitination (301). Les domaines HECT possèdent une cystéine conservée faisant un lien thioester avec l'ubiquitine, à l'instar de la E1 et les E2 (633). Les ligases à domaine HECT possèdent des domaines d'interaction protéine-protéines dans leur région N-terminale importants pour lier leur substrat. Les dégrons reconnus par les ligases à domaine HECT sont variés. Par exemple, les ligases de levure Ufd4p et Rsp5p cible respectivement une protéine possédant une ubiquitine en N-terminal et certains événements de phosphorylation (281, 370).

1.2.4.4.1.1. Structure

La structure du domaine HECT de E6-AP associé avec la E2 UBCH7 est connue (300). Le domaine HECT se replie en forme de L (Figure 45A). Le bras court du L (ou lobe C-terminal) est formé d'un feuillet β et d'hélices α alors que le bras long (ou lobe N-terminal) est plus riche en hélice α . La cystéine catalytique se situe à la jonction des deux bras. La E2 UBCH7 siège à l'extrémité du bras long. Une surface hydrophobe de UBCH7 lie un sillon hydrophobe du domaine HECT. Des liaisons de type polaire stabilisent également cette

interaction. La même surface de UBCH7 interagit avec le domaine RING de c-CBL (voir Figure 44B et section 1.2.4.4.2.2.2.). Ainsi, une E2 ne peut interagir avec deux E3 en même temps. Les résidus identifiés à l'interface permettent aussi de comprendre la sélectivité de la E3 envers UBCH7. On remarque également que la cystéine de la E2 est à plus de 40 Å de la cystéine du domaine HECT. La structure ne permet pas de comprendre le mécanisme catalytique ni d'identifier les résidus catalytiques clés.

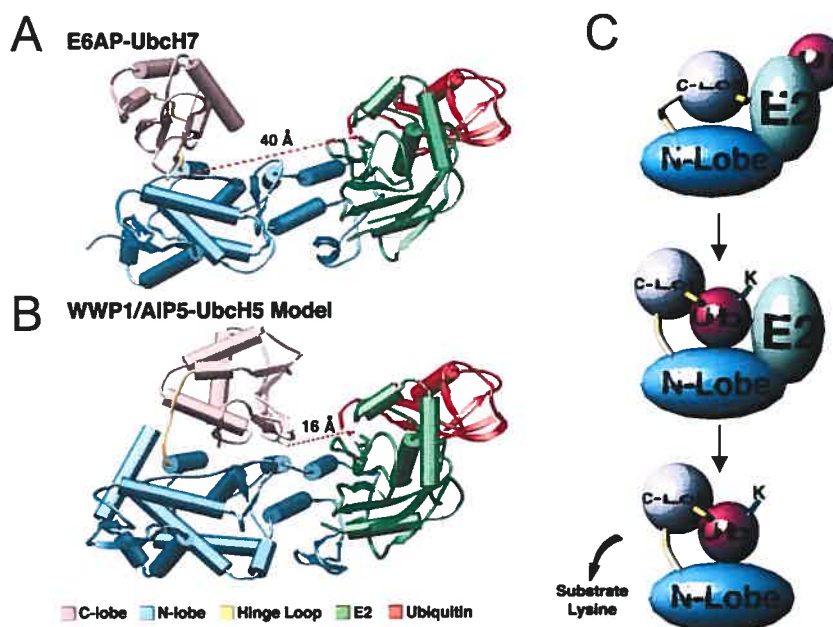


Figure 45: Structure des E3 à domaine HECT E6-AP et WWP1/AIP5. (A) Structure cristallographique du domaine HECT de E6-AP et de la E2 UBCH7. Une molécule d'ubiquitine a été modélisée sur la E2. Notez que les deux cystéines catalytiques sont séparées par 40Å. (B). Modèle du domaine HECT de WWP1/AIP5 associé à la E2 UBCH5. On remarque que les cystéines sont plus près dans ce modèle. Cette différence originerait d'une rotation au niveau du hinge loop (en jaune). (C) Mécanisme proposé de l'ubiquitination catalysée par le domaine HECT. La rotation du lobe C-terminal permettrait de faire le relai entre la E2 et le substrat. Voir texte pour plus de détails. Tirée de (745).

Récemment, une deuxième structure d'un domaine HECT a été résolue (745). Étonnamment, le domaine HECT de la ligase WWP1/AIP5 n'a pas la forme d'un L mais plutôt celle d'un T inversé (Figure 45B). La différence entre les deux structures origine de la rotation du lobe C-terminal par rapport au lobe N-terminal. Cette rotation est rendu possible grâce à la présence d'une boucle (nommé Hinge Loop) très flexible unissant les deux lobes. La cystéine de WWP1 est à 14 Å seulement de celle de la E2 dans un modèle WWP1/UBCH5. Le groupe de JP Noel propose que la réaction d'ubiquitination nécessite une mobilité du lobe C-terminal. En effet, des mutations rigidifiant cette boucle diminue l'autoubiquitination de WWP1. Le lobe C-terminal catalyserait l'ubiquitination du substrat en transportant l'ubiquitine de la E2 vers celui-ci (Figure 45C).

1.2.4.4.1.2. E6-AP

Bien que E6-AP participe à la dégradation de p53 dans les cellules infectées par HPV, cette activité n'est pas sa fonction physiologique. E6-AP est une protéine importante pour les fonctions cérébrales car sa mutation entraîne le syndrome d'Angelman (362). Ce syndrome héréditaire est caractérisé, entre autre, par un grave retard mental (787). On ignore exactement le ou les substrats de E6-AP responsables de ce phénotype. On connaît certains substrats physiologiques de E6-AP. Les tyrosine kinases c-SRC et BLK, le facteur de la réparation par excision nucléotidique HHR23A et la protéine des origines de réplication MCM7 sont des substrats décrits (262, 394, 395, 529). Les signaux ou dégrons reconnus par E6-AP sont encore mal définis. On sait néanmoins que E6-AP interagit avec MCM7 via un motif nommé la boîte L2G (394).

1.2.4.4.2. Ligase à domaine RING

Le domaine RING (pour Really Interesting New Gene) fut identifié chez la protéine RING1. En 1993, le groupe de PS Freemont remarqua la présence d'un motif riche en cystéine chez la protéine Ring1 (pour Really Interesting New Gene-1) (443). Ce motif, trouvé également chez plusieurs autres protéines fut nommé domaine RING. Le domaine RING ressemble aux doigts de zinc. Les évidences confirmèrent que le domaine RING lie deux atomes de zinc (443). À l'époque, les doigts de zinc étaient surtout connus comme des motifs de liaison à l'ADN et les données préliminaires indiquèrent que le domaine RING est capable de lier l'ADN *in vitro*.

Ce n'est que 5 ans après sa découverte que l'on remarqua que le domaine RING se retrouve dans de nombreuses protéines impliquées dans l'ubiquitination. Par exemple, E3 α , la ligase de la voie du "N-end rule" (voir section 1.2.4.4.2.2.1.) et une sous-unité de la ligase mitotique APC/C sont pourvues d'un domaine RING. En 1999, plusieurs laboratoires ont indépendamment montré qu'une E3 ligase multimérique très importante, le complexe SCF, possède une sous-unité contenant un domaine RING, RBX1. Biochimiquement, le domaine RING interagit directement avec les E2 (442). D'un autre côté, les protéines à domaines

RING peuvent s'autoubiquitiner *in vitro* en présence d'une E2 (322). Basé sur ces données, le domaine RING fut identifié comme une nouvelle classe de E3, au même titre que le domaine HECT (voir revue (321)).

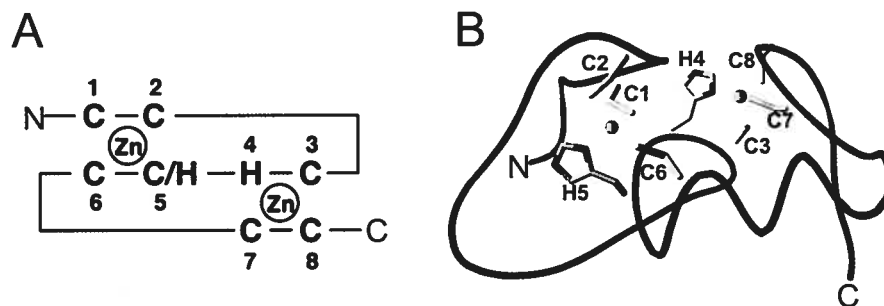


Figure 46: Ubiquitine ligase à domaine RING. (A) Le domaine RING comporte deux doigts de zinc entrelacés. (B) Structure du domaine RING de c-CBL. Les 8 ligands des deux ions Zn^{2+} sont montrés. Tirée de (563, 843). Figure réalisée à l'aide de SPDBV 3.7.

1.2.4.4.2.1. Structure

Les domaines RING sont définis selon la séquence consensus : $CX_2CX_{(9-39)}CX_{(1-3)}HX_{(2-3)}C/HX_2CX_{(4-48)}CX_2C$ (321). Comme on peut le voir en examinant la séquence consensus des domaines RING, la disposition des résidus cystéines et histidines est importante. L'homme exprime potentiellement près de 1000 protéines à domaines RING mais on ignore si toutes ces protéines sont des E3 fonctionnelles. Les structures cristallines et en solution indiquent que ce motif forme deux doigts de zinc entrelacés (Figure 46A et B) (843). Quatre résidus cystéine et histidine coordonnent un ion zinc. Certains domaines RING, comme celui de RBX1, sont dit atypiques et possèdent un troisième doigt de zinc (786). Les doigts de zinc forment un sillon hydrophobe recrutant les E2. La structure du complexe de la ligase c-CBL et de la E2 UBCH7 indique que la E2 utilise la même surface hydrophobe pour interagir avec les domaines RING et HECT (voir Figure 44B). En dehors de cette interface, aucun acide aminé du domaine RING ne vient près du centre catalytique de la E2. Aucune évidence n'indique que le domaine RING forme un lien thioester avec l'ubiquitine comme le domaine HECT. La fonction première du domaine RING serait de recruter la E2 près de son substrat. Ce type de mécanisme se nomme catalyse par proximité (76). On pense toutefois que le domaine RING régule positivement l'activité des E2. Par exemple, le complexe minimal de la ligase SCF, Culline-1 et RBX-1, stimule l'activité d'autoubiquitination de la E2 Cdc34 *in vitro* (649). On suppose que la liaison avec le domaine RING entraîne des changements allostériques chez la E2.

1.2.4.4.2.2. Ligases RING monomériques

Les E3 ligases à domaine RING sont monomériques ou bien multimériques. Les E3 monomériques possèdent une région interagissant directement avec le substrat en plus du domaine RING. À l'opposé, les E3 multimériques doivent s'associer avec d'autres protéines afin d'interagir avec leur substrat.

1.2.4.4.2.2.1. E3 α /Ubr1p

E3 α est la première E3 identifiée (42). Cette enzyme est responsable de l'ubiquitination des substrats du "N-end rule" (voir revue (742)). Des expériences menées chez la levure par l'équipe de Varshavsky ont montré que l'identité du résidu N-terminal d'une protéine affecte sa demi-vie (28). Le N-end rule a été défini en se basant sur le substrat chimérique artificiel ubiquitine-Xaa- β -gal. Cette chimère est clivée par les enzymes de déubiquitination (voir section 1.2.6.) générant le substrat Xaa- β -gal. Quatre types d'acide aminé déstabilisant ont été identifiés (Figure 47). Les acides aminés de type 1 et 2 sont basiques (R/K/H) et hydrophobe volumineux (L/I/F/Y/W) respectivement. Ces résidus sont dit primaires car ils interagissent directement avec deux sites distincts sur E3 α . *In vitro*, des dipeptides contenant un résidu déstabilisant en N-terminal sont de très bons inhibiteurs compétitifs de E3 α (597). Les résidus acides (D/E) forment le troisième type de déterminant déstabilisant. Ces acides aminés sont appelés secondaires car ils ne lient pas directement E3 α . Les acides glutamique et aspartique sont plutôt rendus déstabilisants par l'addition d'une arginine, un résidu déstabilisant. Cette addition se fait indépendamment des ribosomes, via l'activité de l'arginine N-transférase Atel1p et l'ARNt-Arg (39). Finalement, l'asparagine (N) et la glutamine (Q) sont les résidus déstabilisants tertiaires. Ceux-ci sont rendus déstabilisants par l'action de désaminases les transmutant en acide asparatique et glutamique respectivement, substrat à leur tour de l'arginine N-transférase Atel1p (34). Les dégrons du N-terminal (ou N-dégrons) ont ainsi été les premiers dégrons caractérisés moléculairement. La levure possède deux ligases homologues responsables du N-end rule : Ubr1p (E3 α) et Ubr2p (E3 β) (742). Il semble que cette voie se soit diversifiée durant l'évolution car les mammifères possèdent 7 homologues de UBR (706).

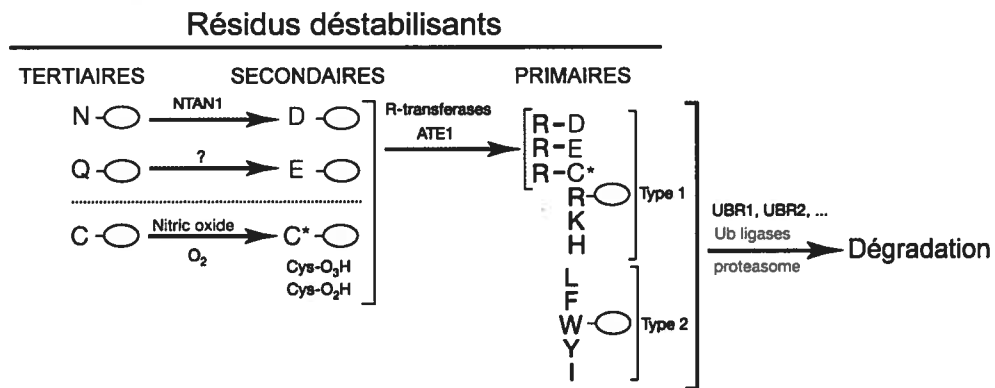


Figure 47: La voie du "N-end rule". La demi-vie des protéines intracellulaires est affectée par la nature du résidu en N-terminal. Les acides aminés positifs et hydrophobes sont directement reconnus par les ligases Ubr1/2. Ils sont ainsi dit primaires. Les acides aminés négatifs sont rendus déstabilisants par l'action de ATE1. Cette dernière additionne une arginine en N-terminal des protéines possédant un résidu E ou D en N-terminal. Les acides glutamique et aspartique sont ainsi appelés secondaires. La glutamine et l'asparagine en N-terminal sont susceptibles de subir une désamination, les transformant en acide glutamique et aspartique respectivement. Ces résidus déstabilisants sont nommés tertiaires. La cystéine comme telle n'est pas un acide aminé déstabilisant. Cependant, lorsque oxydée (par l'action de l'oxyde nitrique), la cystéine est perçue comme un acide aminé déstabilisant secondaire et est additionnée d'une arginine en N-terminal par ATE1. Voir texte pour plus de détails. Adaptée de (297).

Très peu de protéines cytoplasmiques sont reconnues par la voie "N-end rule". Toutes les protéines sont synthétisées avec une méthionine en position 1. La nature du deuxième résidu dicte l'hydrolyse ou non de la Met1 par les MAP (Methionine Amino-Peptidases, voir revue (230)). Une protéine ayant un acide aminé possédant une chaîne latérale de petite taille (Gly, Ser, Thr, Ala, Cys, Val et Pro) en position 2 est un substrat des MAP et ne possède plus la méthionine initiatrice. On peut voir que les protéines ayant un résidu déstabilisant en position 2 garderont leur méthionine, un acide aminé stabilisant. Les protéines sont donc "naturellement immunisées" contre la voie "N-end rule".

Néanmoins, les données génétiques indiquent que cette voie de dégradation est importante. Chez la levure, la E3 α /Ubrp1 est synthétiquement létale avec Sln1p, un osmosenseur. Ainsi, on pense que la voie "N-end rule" est impliquée dans la régulation des voies en aval de l'osmosenseur Sln1p (544). De plus, la délétion de *Ubr1* inhibe l'importation de di- et tri-peptides chez la levure (11). Chez les mammifères, la voie "N-end rule" s'est diversifiée et joue des rôles divers. En effet, la délétion de *Ubr1* cause le syndrome autosomal récessif Johanson-Blizzard chez l'homme (833). Cette maladie génétique est caractérisée par des malformations faciales, un retard mental et une dysfonction du pancréas (227). La délétion de *Ubr1* chez la souris entraîne un phénotype similaire (400). La délétion de *Ubr2* chez la souris entraîne un phénotype dépendant du sexe de l'animal. Ainsi, les males *Ubr2* KO sont atteints de stérilité alors que les femelles meurent *in utero* (399).

Quels sont les substrats physiologiques de la voie "N-end rule"? Pour être un substrat de cette voie, une protéine nécessite une modification post-traductionnelle. Par exemple, le clivage endoprotéolytique permet de révéler un nouveau résidu en N-terminal. Chez la levure, la cohésion de la chromatine est assurée par le complexe cohésine. Durant la transition métaphase vers anaphase, la cohésine (ou SCC) est clivée dans sa région centrale par la protéase séparase/Esp1p (voir revue (735)). Le nouveau fragment C-terminal de la cohésine est très instable et rapidement dégradé. Le groupe d'A Varshavsky a montré que la dégradation du fragment de la cohésine se fait par la voie "N-end rule" (588). En effet, le fragment de la cohésine possède une arginine déstabilisatrice en N-terminal. L'expression d'un mutant de la cohésine possédant un résidu stabilisant en N-terminal entraîne un blocage du cycle cellulaire, démontrant l'importance de sa dégradation par la voie "N-end rule". Le fragment C-terminal de la cohésine est ainsi le premier substrat physiologique de cette voie. De manière similaire, le clivage endoprotéolytique de l'inhibiteur de l'apoptose DIAP1 par les caspases génère une protéine instable à cause de la présence d'un résidu déstabilisant tertiaire asparagine (175). Ainsi, la voie "N-end rule" joue un rôle important dans la régulation de l'apoptose chez les métazoaires.

Une étude récente a identifié les régulateurs de la signalisation des protéines G, RGS4, 5 et 16 (Regulator of G protein Signaling) comme étant les premiers substrats de la voie "N-end rule" (297) identifiés chez les mammifères. Contrairement aux substrats SCC et DIAP1, le N-détron de RGS4 n'est pas généré par clivage endoprotéolytique. RGS4 possède plutôt une cystéine en N-terminal (après l'élimination de la méthionine initiatrice par les MAP). Cette cystéine devient déstabilisante à la suite de l'oxydation de sa fonction sulfhydryle en acide sulfurique (Figure 38). Cette réaction utilise l'oxyde nitrique comme agent oxydant (297). Une fois oxydée, la cystéine ressemble à un résidu déstabilisant secondaire (D/E) et est reconnue par l'arginine transférase ATE1. Par conséquent, la délétion de *Ate1* induit une inhibition de l'ubiquitination de RGS4/5 et leur accumulation. On pense ainsi que le défaut angiogénique observé chez les souris *Ate1* KO pourrait s'expliquer par une trop grande expression de RGS4, ce qui diminuerait l'activité des protéines $G_{q/i}$ (398). Une analyse du génome humain indique la présence d'environ 350 protéines ayant une cystéine en position 2 et pouvant être assujetties à ce type de régulation par la voie "N-end rule".

1.2.4.4.2.2.2. c-CBL

c-CBL est impliquée dans la régulation négative de nombreux récepteurs tyrosines kinases (RTK) tels le récepteur de l'EGF et du PDGF (322). Pour ce faire, c-CBL lie le récepteur activé via son domaine SH2 N-terminal atypique nommé TKB (Tyrosine Kinase Binding domain) et recrute une E2 via son domaine RING C-terminal (427). c-CBL entraîne ensuite la monoubiquitination du récepteur et son internalisation, favorisant l'arrêt du signal mitogénique. La mutation ou la délétion du domaine RING produit un mutant dominant négatif de c-CBL aux propriétés oncogéniques (322). Comme son nom l'indique, il existe une forme oncogénique de c-CBL appelé v-CBL dont le domaine RING est absent. La structure de c-CBL complexée avec la E2 UBCH7 et un phosphopeptide du récepteur EGFR est connue (843). La structure cristallographique suggère que c-CBL joue le rôle d'une plateforme permettant le rapprochement du substrat et de la E2.

1.2.4.4.2.3. Ligases RING multimériques

Ces dernières années, les ligases à domaine RING multimériques ont fait l'objet de nombreuses études. Un nombre significatif de ces complexes à activité E3 possède un homologue de la culline. Par exemple, la Culline-1 rentre dans la composition des complexes SCF. Un cousin des cullines est également un constituant essentiel de la ligase mitotique APC/C. Ces ligases entraînent généralement la dégradation protéasomale de leurs substrats. Les complexes de remodelage de la chromatine Polycomb Group (PcG) incorporent également des sous-unités à domaine RING. Contrairement aux complexes basés sur les cullines, on pense que les complexes polycomb n'induisent pas la dégradation des protéines qu'ils ubiquitinent (voir section 1.2.4.6.1.). Les ligases à domaine RING multimériques sont ainsi impliquées dans de nombreux processus biologiques et sont très conservées dans l'évolution. Je vais discuter uniquement des complexes à bases de cullines à cause de leur importance physiologique et du fait de leur caractérisation détaillée.

1.2.4.4.2.3.1. Identification des complexes SCF

Le premier complexe SCF à être identifié est SCF^{cdc4} chez la levure (199). Chez cet organisme, l'entrée en phase S nécessite l'activité Cdc28p, la protéine kinase dépendante

des cyclines (CDK). Cdc28p est inhibée en phase G1 par un inhibiteur protéique nommé Sic1p (644). Les cellules doivent dégrader cet inhibiteur afin de permettre l'entrée en phase S. Des études génétiques ont montré que la dégradation de Sic1p nécessite plusieurs gènes : Cdc4p, Cdc53p, Cdc34p et Skp1p (31, 644). En 1996-97, une série d'études indépendantes montra que ces protéines s'associent *in vivo* et sont impliquées dans l'ubiquitination de Sic1p (31, 199, 470). Cdc53p est homologue à Cul-1, une protéine contrôlant le cycle cellulaire initialement identifié chez le nématode (360). Cdc34p est une E2. Skp1p fait le pont entre Cdc53p et Cdc4p, une protéine à boîte F. Comment la E2 est recrutée au complexe ? En 1999, la protéine à domaine RING RBX1 (ou ROC1 ou HRT1) fut identifiée biochimiquement par sa capacité d'interagir avec Cdc53p et Cdc34p (337, 649). Ce complexe est maintenant appelé SCF^{cdc4} pour SKP1-Culline-1-protéine à boîte F. Des complexes SCF ont ensuite été trouvés chez tous les eucaryotes.

1.2.4.4.2.3.2. SKP1/Culline-1/RBX1 forment un complexe SCF de base

La particularité distinguant le complexe SCF des autres ligases est le fait que sa spécificité pour le substrat origine de son association avec un récepteur. Tous les complexes SCF actifs possèdent en commun les sous-unités SKP1/Culline-1/RBX1. Culline-1 joue le rôle de plateforme interagissant avec SKP1 en N-terminal et la E2 Cdc34/UBCH3 en C-terminal. L'interaction avec la E2 se fait via la protéine à domaine RING RBX1. Ce complexe minimal n'est capable que d'autoubiquitination et ne peut réagir sur un substrat (649). La petite protéine SKP1 sert à recruter les protéines réceptrices des substrats. Pour ce faire, SKP1 interagit avec un motif hydrophobe nommé boîte F (31). La délétion de SKP1 entraîne une stabilisation des substrats des complexes SCF chez la levure, indiquant que cette protéine est essentielle pour la formation d'un complexe SCF fonctionnel (31).

1.2.4.4.2.3.3. Protéines à boîte F

Le couple boîte F/SKP1 fut trouvé par le groupe de SJ Elledge en 1996 (31). SKP1 fut identifié comme suppresseur d'un mutant hypomorphe de Cdc4p. SKP1 interagit directement avec Cdc4p mais aussi avec la cycline F et SKP2 via un motif d'environ 40 acides aminés. Cette séquence étant identifié initialement chez la cycline F humaine, ce

motif fut nommé boîte F. Le nombre de Protéines à Boîte F (PBF) exprimé varie énormément selon les espèces. En effet, la levure code pour 11 membres alors que les hommes en exprimeraient plus de 70 (Figure 48) (318). De manière surprenante, le ver *C. elegans* aurait plus de 300 PBF, indiquant que cette classe de protéines s’est énormément adaptée durant l’évolution (806). Six PBF sont conservées chez le ver, la drosophile et l’homme (318). Ces PBF formeraient les complexes SCF de base essentiels pour la vie des métazoaires. Les PBF possèdent en plus de leur boîte F des séquences responsables de la liaison au substrat. Basées sur ces domaines d’interaction, les PBF peuvent être classées en quatre familles.

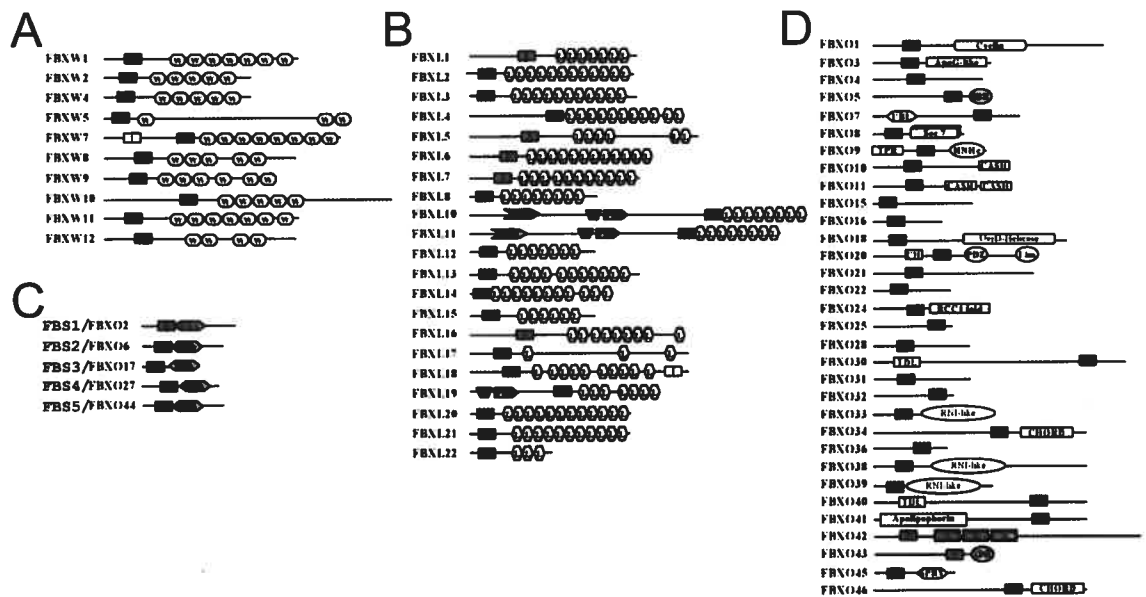


Figure 48: Les protéines à boîtes F (PBF) chez l'homme. Les PBF sont regroupées selon qu'elle possèdent un domaine WD40 (W) en A, des répétitions riche en leucine LRR (L) en B, un domaine liant le sucre SBD (FBA) en C ou d'autres séquences en D. Les PBF possèdent également d'autres domaines: transmembranaire (T), "In Between Ring" (IBR), "Carbohydrate binding and Sugar Hydrolases" (CASH), "Kelch repeat" (K), "Calponin Homology" (CH), "cupin metalloenzyme family" (Jmjc), "PSD-95/Dlg/ZO-1" (PDZ), "Lin-11/Isi-1/Mec-3" (Lim), "HNH nuclease family" (HNHc), "zinc binding domain" (CHORD), "tetratricopeptide repeat" (TPR), "structurally similar to ApaG" (ApaG-like), "apolipoprotein III-like fold" (Apolipoprotein), "ubiquitin-like fold" (Ubl), "Traf-domain like" (TDL), "similar to RNase inhibitor" (RNI-like), "regulator of chromatin condensation-1 fold" (RCC1). Remarquez que le domaine de liaison au sucre SBD (pour Sugar Binding Domain) est identifié ici comme FBA (pour F-Box Associated domain). Adaptée de (318).

1.2.4.4.2.3.3.1. Les PBF à domaine WD40 ou

Fbw

SCF^{cdc4}, le premier complexe SCF identifié, lie son substrat Sic1p via le domaine WD40 de Cdc4p. Ces domaines consistent en général de 7 répétitions d’un motif de 40 acides aminés. Ces répétitions se terminent souvent par les résidus Trp et Asp, d’où le nom de WD40 (voir revue (124)). Ce domaine se plie en forme de beigne déformé dont une face permet les

interactions protéine-protéines (voir Figure 49 et 50). Il y aurait 10 protéines de cette classe chez l'homme (318) (Figure 48A). Des données fonctionnelles sont disponibles pour quatre Fbw humaines : β -TrCP1/2, hCDC44 et dactyline. β -TrCP1 et hCDC4 sont deux des six PBF conservées du ver jusqu'à l'homme. Tous les substrats connus de cette classe de PBF interagissent avec le domaine WD40 de manière phospho-dépendantes. Néanmoins, les domaines WD40 peuvent médier des interactions protéine-protéines indépendantes de la phosphorylation (124).

1.2.4.4.2.3.3.1.1. β -TrCP1/2.

Les PBF β -TrCP1/2 sont impliquées dans de nombreux processus. Premièrement, ces protéines sont des régulateurs importants de deux facteurs de transcriptions : β -caténine (264) et NF- κ B (818). Ainsi, à l'état basal, β -caténine est phosphorylée entre autre par GSK3 (789). β -caténine doublement phosphorylée sur le motif DpSGIHpS est reconnue par β -TrCP1/2, ubiquitinée et dégradée par le protéasome. En réponse au ligand de la famille WNT, il y a inhibition de la phosphorylation de β -caténine, ce qui entraîne une accumulation de cette protéine. β -caténine entre au noyau où elle interagit avec les facteurs de transcription de la famille TCF/LEF et augmente la transcription de gènes cibles, notamment celui de la cycline D1 (voir revue (103)). D'un autre côté, l'activité du facteur de transcription NF- κ B est inhibée par son association avec son inhibiteur I κ B. En réponse à certains activateurs tels le TNF α , I κ B est dégradé, ce qui résulte en une activation du facteur NF- κ B. Moléculairement, le TNF α induit l'activation de la kinase IKK (pour I κ B Kinase) phosphorylant I κ B sur le motif DpSGLDpS. β -TrCP1/2 reconnaissent ce motif et sont responsables de la dégradation de I κ B, libérant ainsi le facteur NF- κ B.

β -TrCP1/2 jouent également un rôle clé dans plusieurs transitions du cycle cellulaire (voir revue (107)). Premièrement, durant les phases S et G2, β -TrCP1/2 dégradent CDC25A (100), une phosphatase activatrice de CDK1. Ceci empêche l'entrée prématurée en phase M (déclenchée par une trop grande activité CDK1) et assure ainsi l'intégrité du génome. La kinase CHK1 est impliquée dans la phosphorylation déstabilisatrice de CDC25A en réponse à un dommage à l'ADN (319). À la transition G2/M, les kinases mitotiques (CDK1 et les polo-like kinases, PLK) phosphorylent la kinase inhibitrice de CDK1, WEE1, créant

un phospho-dégron reconnu par β -TrCP1/2. Ceci facilite l'établissement de la phase M (767). Ensuite, CDK1 et PLK1 phosphorylent la PBF EMI-1 (voir section 1.2.4.4.2.3.3.4.), la rendant susceptible à l'ubiquitination par $SCF^{\beta\text{-TrCP1/2}}$ (504). EMI-1 est un inhibiteur de l'ubiquitine ligase APC/C (595). β -TrCP1/2 permettent ainsi la progression de la phase M et l'entrée en phase G1 en favorisant l'activation de l'APC/C. Le rôle de β -TrCP1 dans le contrôle du cycle cellulaire a été confirmé par l'analyse des souris $\beta\text{-TrCP1 KO}$ (246). De plus, la surexpression de β -TrCP1 favorise l'apparition de tumeur chez la souris, suggérant que cette ligase est impliquée dans la tumorigenèse *in vivo* (393).

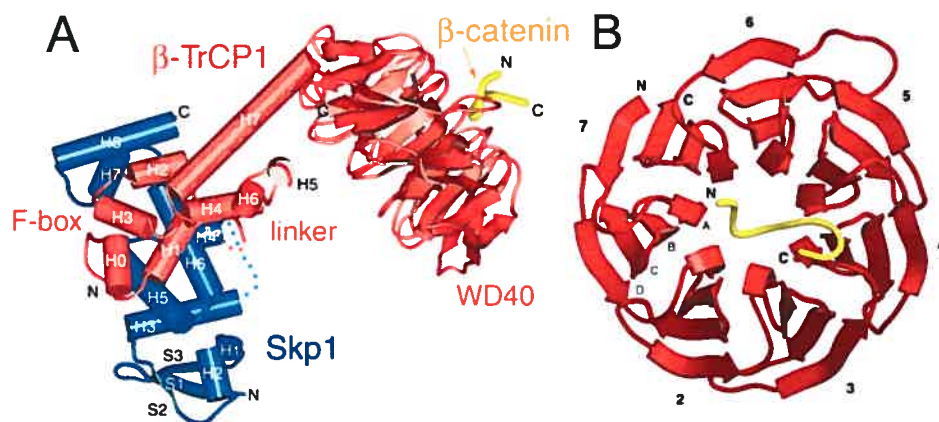


Figure 49: Structure du complexe SKP1/ β -TrCP1/ β -caténine. Représentation en ruban du complexe en A. Le domaine WD40 avec son ligand sont montrés en B. Le phosphopeptide issu de β -caténine interagit avec une face de l'anneau formé par les 7 répétitions WD40. Le peptide β -caténine interagit avec la partie centrale. Tirée de (795).

La structure de β -TrCP1 liant un phospho-dégron permet de comprendre sa spécificité (Figure 49) (795). β -TrCP1 est constituée d'une boîte F interagissant avec SKP1 et de sept répétitions WD40 formant un anneau, les deux domaines étant unis par une hélice α . Un peptide correspondant au phospho-dégron de β -caténine (DpSGIHpS) interagit avec la partie centrale du domaine WD40. L'acide aspartique de même que les deux sérines phosphorylées forment de nombreux ponts hydrogènes avec plusieurs résidus conservés de β -TrCP1, notamment trois arginines. L'hélice α reliant la boîte F au domaine WD40 doit être rigide. Des mutations perturbant cette rigidité affectent l'activité d'ubiquitination de $SCF^{\beta\text{-TrCP1}}$ sans affecter la liaison au substrat. On pense que cette hélice α est essentielle pour le bon positionnement du substrat par rapport à la E2.

1.2.4.4.2.3.3.1.2. hCDC4/FBW7

hCDC4 est une des rares PBF conservées de la levure jusqu'à l'homme. Les données indiquent que hCDC4 est un gène suppresseur de tumeur. Ainsi, chez la souris, mCDC4 est haploinsuffisant pour la suppression tumorale (464). De plus, on retrouve des mutations inactivatrices dans le gène codant *hCDC4* chez les cancers ovariens (494). Les substrats caractérisés de hCDC4 expliquent son activité anti-tumorale. Tout comme β -TrCP1/2, hCDC4 affecte l'activité de nombreux facteurs de transcription. Ainsi, des évidences biochimiques et génétiques indiquent que hCDC4 est un régulateur négatif de la stabilité protéique de c-MYC (805), c-JUN (516) et Notch4 (528). De manière intéressante, tous ces facteurs ont des propriétés oncogéniques. D'un autre côté, SCF^{cdc4} est impliqué dans la dégradation de la cycline E (371). Cette cycline est exprimée à la transition G1/S et s'associe avec CDK2, facilitant l'entrée dans la phase de la synthèse de l'ADN. Vers la fin de la phase S et durant les phase G2 et M, cycline E devient phosphorylée sur la Thr380 et est dégradée par SCF^{cdc4}. hCDC4 contribue ainsi à limiter l'activité de CDK2, une enzyme aux propriétés pro-prolifératives. D'autre part, hCDC4 induit l'ubiquitination et la dégradation de la préséniline (430). Cette protéase est impliquée dans la maturation de APP1. Des mutations dans préséniline sont associées à certaines formes précoces de la maladie d'Alzheimer, impliquant potentiellement le complexe SCF^{cdc4} dans certaines maladies neurodégénératives (647).

Chez la levure, Cdc4p a au contraire un rôle essentiel positif dans le cycle cellulaire. L'activité de Cdc4p consiste à dégrader l'inhibiteur de cdk Sic1p (644). La dégradation de Sic1p nécessite sa phosphorylation par les CDK de la phase G1 (Cdc28p/Cln2p) (747). Contrairement à cycline E, Sic1p nécessite la phosphorylation d'au moins 6 sites pour être reconnu par Cdc4p (514). Des expériences biochimiques basées sur l'utilisation de phospho-peptides indiquent que le phospho-dégron de cycline E est un ligand de haute affinité de Cdc4p alors que les différents phospho-dégrons de Sic1p n'interagissent que faiblement avec Cdc4p. Le phospho-dégron de cycline E, GLLpTPPQSG est riche en acides aminés hydrophobes. L'introduction de résidus basiques en C-terminal du site de phosphorylation, rendant le motif semblable au phospho-dégron de faible affinité de Sic1p, abolit l'association avec Cdc4p. De plus, l'introduction d'un phospho-dégron de haute affinité dans la séquence de Sic1p rend ce dernier instable et plus sensible à l'ubiquitination

par SCF^{cdc4}. Il s'ensuit une instabilité génomique caractéristique des cellules dépourvues en Sic1p. À partir de ces observations, le groupe de M Tyers a proposé un modèle de la régulation de Sic1p (786). La nécessité de six événements de phosphorylation pour induire la dégradation de Sic1p implique que sa dégradation se fait d'une manière "switch-like", ce qui est observé *in vivo*. À l'opposé, un mutant de Sic1p contenant le phospho-détron de cycline E est dégradé selon une courbe de type Michealis-Menten, entraînant une entrée en phase S prématurée. Finalement, on peut également prédire la présence de charges positives sur Cdc4p responsable de la diminution d'interaction avec les phospho-détrons de Sic1p.

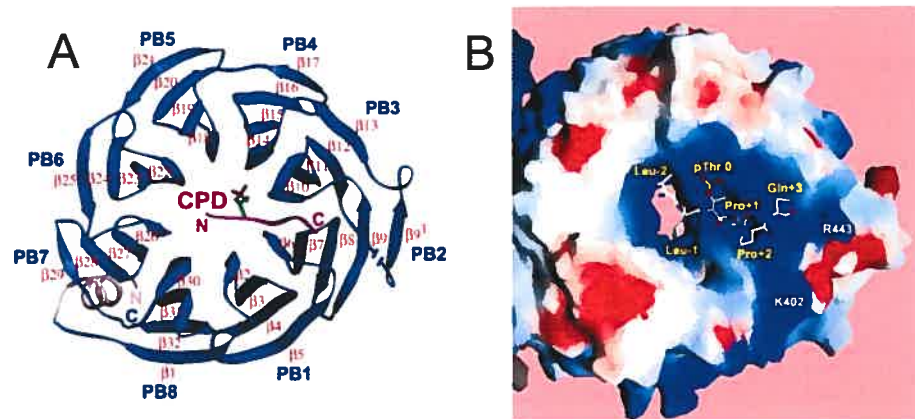


Figure 50: Structure du complexe SKP1/Cdc4p/CPD. (A) Le domaine WD40 de Cdc4p interagissant avec le phospho-détron issu de la cycline E (CPD pour Cdc4 Phospho-Degron). Contrairement aux autres domaines WD40 cristallisés, le domaine de Cdc4p possède 8 répétitions. Il en résulte une ouverture plus importante en son centre. Tout comme β -TrCP1, Cdc4p lie son phospho-détron dans sa partie centrale. (B) Représentation du potentiel électrostatique du domaine WD40 de Cdc4p. On remarque en bleu la présence d'une surface fortement positive. Tirée de (537).

La structure de Cdc4p de levure déterminée par les groupes de M Tyers et F Sichert est unique pour une protéine à répétition WD40 (537). En effet, Cdc4p possède un domaine constitué de 8 répétitions WD40 contrairement aux 7 répétitions observées chez les autres protéines à domaine WD40 cristallisées. L'anneau ainsi formé possède une cavité centrale légèrement plus grande (Figure 50A). De manière similaire à β -TrCP1, la partie centrale du domaine WD40 est responsable de la liaison avec le peptide phospho-détron de cycline E. Telle que prévu, la structure révèle la présence d'une surface basique interagissant avec les résidus C-terminal du site de phosphorylation du substrat (Figure 50B en bleu). La mutation de ces résidus basiques engendre un mutant de Cdc4p capable de lier avec plus d'affinité Sic1p de type sauvage. Surtout, ce mutant peut interagir avec une forme hypophosphorylée de Sic1p. À l'instar de β -TrCP1, le linker entre le domaine WD40 et la boîte F doit être rigide pour l'activité de Cdc4p *in vivo*.

Dactyline est une Fbw suscitant de plus en plus d'intérêt. Elle fut découverte lors du clonage positionnel du gène responsable du syndrome "split hand and foot malformation" (SHFM) (663). Ce syndrome est caractérisé par un défaut du "patterning" des membres et des doigts. On ne connaît pas le(s) substrat(s) de dactyline impliqué(s) dans cette voie.

1.2.4.4.2.3.3.2. Les PBF à domaine LRR ou Fbl

L'homme possède 21 PBF contenant 3 à 12 répétitions de 25 acide aminés riche en leucine (LRR pour Leucine Rich Repeat, Figure 48B) (318). Ce domaine se replie en forme de lame incurvée (voir Figure 51A). Les séquences LRR permettent en général des interactions protéine-protéine (voir revue (369)). Très peu de membres de la famille Fbl (pour F-box protein with LRR) sont caractérisés. FBL2 est conservé du nématode jusqu'à l'homme, suggérant un rôle important pour cette PBF (318). Néanmoins, on ignore sa fonction et ses substrats.

1.2.4.4.2.3.3.2.1. SKP2

SKP2 (FBL1), la première Fbl identifiée, est la mieux caractérisée (546). SKP2 possède 10 LRR se repliant en forme de lame incurvée (Figure 51A) (638). SKP2 est un proto-oncogène souvent surexprimé dans les tumeurs humaines (70). La surexpression de SKP2 favorise la transformation *in vitro* et la tumorigenèse chez la souris (244, 411). L'inactivation de SKP2 par RNAi entraîne l'arrêt de la prolifération et l'apoptose d'un nombre significatif de lignées tumorales, suggérant que SKP2 est un "addictive oncogene" (316). SKP2 est la seule Fbl dont on connaît les substrats. De manière intéressante, SKP2 est impliquée dans la dégradation de nombreux régulateurs négatifs de la prolifération tels p130, p21, p27 et p57, mais également de régulateurs positifs du cycle cellulaire tels cycline E, E2F1 et c-MYC (voir (107)). On pense que la dégradation de ses substrats requiert en général leur phosphorylation.

L'inhibiteur de CDK p27 est le substrat le plus caractérisé de SKP2. L'inactivation de SKP2 chez la souris induit une accumulation de cet inhibiteur (513). La dégradation de p27 nécessite sa phosphorylation sur une thréonine en C-terminal, la thréonine 187 (730). Les

études biochimiques ont montré que p27 est plus efficacement ubiquitiné par SCF^{skp2} s'il est associé à la kinase CDK2/cycline A (497). Un complexe CDK2/cycline A inactif est aussi efficace pour stimuler l'ubiquitination de pT187-p27 qu'une kinase de type sauvage (847). Ainsi, le complexe CDK2/cycline A joue deux rôles : (i) phosphoryler la thréonine 187 de p27 ce qui génère un phospho-dégron et (ii) permettre la "présentation" adéquate de p27 au complexe SCF^{skp2}. D'un autre côté, des études génétiques ont indiqué que la petite sous-unité adaptatrice CKS1 joue un rôle essentiel dans l'ubiquitination de p27 par SCF^{skp2} (676). Des homologues de CKS1 sont présents de la levure jusqu'à l'homme et sont fortement associés au complexe CDK. Les protéines CKS semblent favoriser la phosphorylation *in vivo* des substrats des CDK par un mécanisme encore mal défini (567). De manière intéressante, les souris *Cks1* KO ont un phénotype très similaire à celui des souris *Skp2* KO, soit une petite taille due à l'accumulation de p27. *In vitro*, CKS1 s'associe avec SKP2 et augmente grandement l'activité du complexe SCF^{skp2} envers p27 (668).

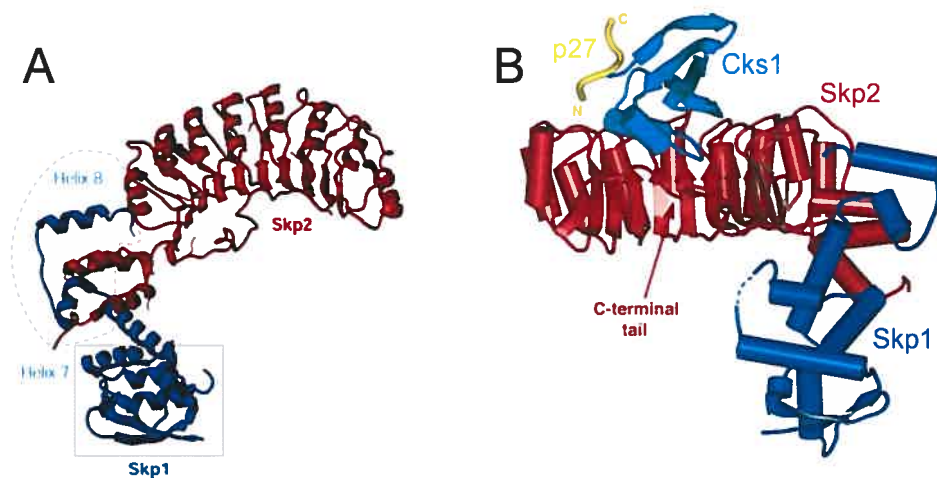
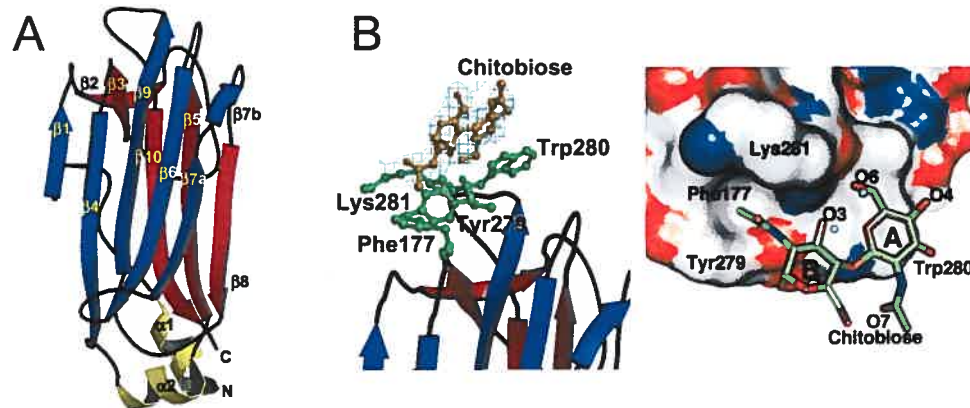


Figure 51: Structure de SKP2/SKP1. (A) Les 10 répétitions riche en leucine (LRR) de SKP2 se replient en lame incurvée. (B) Structure de SKP2/SKP1 (rouge et bleu respectivement) liant son ligand phospho-p27 (jaune) à l'aide du cofacteur Cks1 (turquoise). Le phosphopeptide p27Kip1 interagit directement avec SKP2 et Cks1. Tirée de (107, 258).

Quel est le rôle de CKS1? Induit-il un changement allostérique chez SKP2 facilitant la reconnaissance de pT187-p27 ou participe-t-il directement à la liaison de pT187-p27. Une étude cristallographique récente nous éclaire sur le sujet. Le groupe de Pavletich a déduit la structure d'un complexe contenant SKP1, SKP2, CKS1 et le phospho-dégron de p27 (Figure 51B) (258). En comparant la nouvelle structure avec leur précédente ne contenant que SKP1 et SKP2, on peut tout d'abord affirmer que CKS1 n'induit pas de changement conformationnel chez SKP2. Les données montrent plutôt que CKS1 participe directement à la liaison de p27. Le phospho-dégron de p27 interagit directement avec SKP2 et CKS1. Les études cristallographiques précédentes avaient montré la présence d'un site de liaison

d'anion sur CKS1 (21). Comme certains le prédisaient (668), ce site de CKS1 lie bien la thréonine phosphorylée de p27. De manière intéressante, seul un autre résidu de p27, l'acide glutamique 185, fait des contacts appréciables avec SKP2/CKS1. Le résidu E185 s'enfonce dans une cavité à l'interface de SKP2 et CKS1 et fait des contacts polaires avec les deux protéines. La mutation de l'acide glutamique 185 en n'importe quel autre acide aminé, même en acide aspartique, détruit l'interaction. Comme on peut s'en douter, cet acide glutamique est toujours conservé chez les homologues de p27.



1.2.4.4.2.3.3.3. Les PBF à domaine SBD ou

Fbs

Une troisième classe de PBF a été récemment identifiée (824, 825). Cette famille est caractérisée par la présence d'un domaine de liaison au sucre (Sugar Binding Domain, SBD). Ce domaine, comme son nom l'indique, lie la portion glycosylée des protéines revenant du réticulum endoplasmique. Ainsi, les protéines ne passant pas le contrôle de qualité du réticulum endoplasmique sont rétrotransloquées vers le cytoplasme par le système ERAD (ER Associated Degradation system) (569). Les PBF FBS1 et 2 reconnaissent la portion sucrée de ces protéines via leur domaine SBD et les ciblent vers la dégradation protéasomale. Le SBD est un domaine globulaire ellipsoïde riche en feuillets β (Figure 52A) (493). Une extrémité constitue l'interface d'interaction avec le chitobiose, un sucre présent chez les protéines N-glycosylées (Figure 52B). Il existerait 5 membres de cette famille chez l'homme (318) (Figure 48C). On ignore la spécificité d'interaction des Fbs autres que FBS1 et 2.

1.2.4.4.2.3.3.4. Les autres PBF ou Fbo

La première PBF identifiée est la cycline F (FBO1) (30, 31). Cette cycline appartient à la dernière classe de PBF, caractérisée par l'absence de domaines WD40, LRR ou SBD (318). Cette classe est pour l'instant appelée Fbo (pour F-Box protein with Other domains). La trentaine de membres de cette classe présente néanmoins des domaines intéressants tels PDZ, Ubl (Ubiquitin-like) ou hélicase. Trois membres de cette classe, FBO10, FBO25 et FBO45 sont conservés du ver jusqu'à l'homme (318) (Figure 48D). On ignore la fonction et les substrats de ces importantes PBF.

Récemment, les premiers substrats physiologiques de cette classe ont été identifiés. FBO4 est une PBF ne contenant pas de domaine reconnaissable autre que sa boîte F. Cette PBF fut identifiée comme une protéine interagissant avec TRF1 par double hybride (420). TRF1 et son isoforme court PIN2 sont des inhibiteurs de la télomérase. Le groupe de Zhou a montré que SCF^{Fbo4} est capable d'ubiquitiner TRF1/PIN2 *in vitro*. Également, FBO4 est un régulateur de la stabilité de TRF1/PIN2 *in vivo*. Ainsi, FBO4 joue indirectement un rôle dans le contrôle de la longueur des télomères via l'abondance de TRF1/PIN2. FBO4 interagit aussi avec α -cristalline, une protéine de choc thermique (heat-shock protein, HSP) impliquée dans la myopathie liée à la desmine (161). On ignore si cette interaction entraîne l'ubiquitination et la dégradation de l' α -cristalline.

Récemment, la PBF NIPA fut identifiée comme un régulateur négatif de cycline B (43). Les données indiquent que le complexe SCF^{NIPA} serait responsable de la dégradation de la cycline B en fin G1 et durant la phase S. La surexpression de NIPA diminue l'activité de CDK1/cycline B et inhibe partiellement l'entrée en phase M (qui dépend de l'activité de cette kinase). À l'opposé, la réduction de NIPA par RNAi stabilise la cycline B en phase S et G2, entraînant une entrée en phase M prématurée. L'activité de NIPA est négativement contrôlée par sa phosphorylation en phase G2/M. Une fois phosphorylée sur sa sérine 354, NIPA n'est plus capable d'interagir avec SKP1 et cycline B. De manière intéressante, NIPA n'était pas répertoriée comme une PBF car sa boîte F est divergente (318). Néanmoins, NIPA lie SKP1 de manière dépendante de sa boîte F et forme un complexe

SCF^{NIPA} actif envers son substrat cycline B. Il se peut donc qu'il y ait plusieurs autres PBF chez l'homme possédant une boîte F méconnaissable.

Les substrats des autres Fbo sont inconnus mais des données fonctionnelles sont néanmoins disponibles pour certains membres. FBO32 ou Atrogine-1/MAFBX est une PBF dont l'expression est grandement augmentée lors de l'atrophie musculaire (238). De plus, son inactivation entraîne une résistance à l'atrophie musculaire en réponse aux facteurs de transcription de la famille FOXO (71). On pense donc que FBO32 joue un rôle de médiateur dans l'atrophie musculaire. FBO5/EMI-1 est essentiel pour la division cellulaire. En effet, cette protéine aide à inactiver la ligase APC à l'entrée de la phase S (595). Cette activité de EMI-1 ne dépend pas de son association avec SKP1, donc ne dépend pas de la capacité de EMI-1 d'induire l'ubiquitination de substrats putatifs. De manière surprenante, la stabilité de EMI-1 est régulée par l'activité d'une autre PBF, β -TrCP1. Ainsi, durant la mitose, la ligase SCF ^{β -TrCP1} reconnaît et ubiquitine EMI-1 une fois que cette dernière est phosphorylée sur deux résidus sérines. Les données indiquent que cette phosphorylation est médiée par PLK1 (257). Le rôle précis de cycline F/FBO1 est encore mal défini. Néanmoins, l'analyse des souris *cycline F* KO révèle que cette cycline est essentielle pour le développement placentaire (711). De plus, la cycline F facilite la progression dans la phase G1 en réponse au sérum chez les MEF. Finalement, FBO7 semble avoir des propriétés pro-prolifératives. Ainsi, sa surexpression facilite la prolifération en favorisant la formation des complexes CDK6/cycline D1 (406).

1.2.4.4.2.3.4. Structure des complexes SCF

La structure partielle du complexe SCF fut décrite 5 années après son identification (842). Cette structure remarquable comprend 4 polypeptides : la boîte F de SKP2, SKP1, Culline-1 et RBX1. On observe que la culline joue le rôle de protéine d'échafaudage permettant de recruter le substrat et la E2. Ainsi, le N-terminal de Culline-1 lie SKP1 et donc les PBF alors que son C-terminal est responsable d'interagir avec RBX1 et donc la E2. Culline-1 est très riche en hélices α , ce qui la rend très rigide. L'introduction de mutations diminuant la rigidité de Culline-1 perturbe grandement son activité de ligase. La surexpression d'un

mutant tronqué en C-terminal de Culline-1 ne liant que SKP1 agit comme un dominant-négatif, confirmant son rôle de protéine d'échafaudage (568).

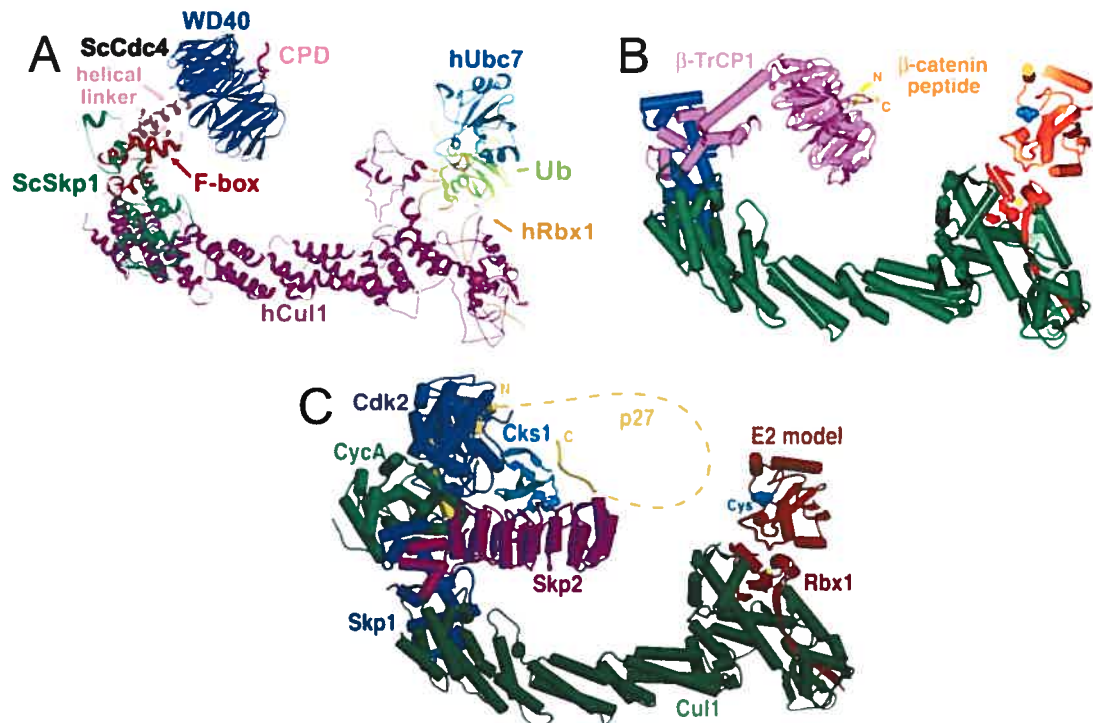


Figure 53: Modèle de complexes SCF complets. SCF^{cdc4} (A), SCF^{β-TrCP1} (B) et SCF^{skp2} (C) sont illustrés. Notez que les substrats sont situés à environ 50 Å de la cystéine de la E2 modélisée. Tirée de (258, 537, 795).

Basé sur cette structure, plusieurs groupes ont reconstruit un complexe SCF complet *in silico*. Par exemple, le groupe de F Sicheri a proposé un modèle du complexe SCF^{cdc4} (Figure 53A) (537). Le complexe SKP1/Cdc4p/phospho-dégron cycline E fut superposé sur le complexe boîte F de SKP2/SKP1/Culline-1/RBX1 en prenant le tandem SKP1/boîte F comme référence. De plus, la E2 fut introduite dans leur modèle en superposant les domaines RING des complexes boîte F/SKP1/Culline-1/RBX1 et c-CBL/UBCH7. La caractéristique la plus frappante que l'on remarque dans ce modèle est que la cystéine catalytique de la E2 est située à plus de 50 Å du phospho-peptide. Un complexe théorique SCF^{β-TrCP1}/β-caténine indique aussi une distance de plus de 50 Å entre le substrat et la E2 (Figure 53B) (795). Comment les complexes SCF catalysent l'ubiquitination de leur substrat? Une étude indique que la E2 Cdc34p est relâchée durant la réaction d'ubiquitination (158). De plus, les données indiquent que ce relâchement est essentiel pour la catalyse. Ainsi, on pense que la culline recrute les différents participants et favorise leur réaction par un mécanisme de catalyse par proximité. Le relâchement de la E2 permettrait le rapprochement de celle-ci au substrat. Néanmoins, on ignore encore comment une E2,

même située près du substrat, catalyse le transfert sur un résidu lysine. On ignore également d'où provient l'exceptionnelle spécificité de l'ubiquitination médiée par les complexes SCF. Comment la culline, SKP1, la PBF, RBX1 et autres cofacteurs ne sont pas ubiquitinés alors qu'ils se trouvent si près de la E2 ?

Le groupe de Pavletich a aussi tenté de construire *in silico* le complexe SCF^{SKP2} avec son substrat p27 (258). Le complexe comprend la sous-unité essentielle CKS1 de même que CDK2/cycline A associés à un fragment N-terminal de p27. Pour ce faire, ils ont utilisé CKS1 comme protéine référence. Remarquablement, ces 8 protéines peuvent former un complexe sans interférence stérique (Figure 53C). De plus, ce mégacomplexe existe *in vitro* tel que démontré par des expériences de fractionnement sur tamis moléculaire (258). En plus d'induire la phosphorylation de p27, CDK2/cycline A joue un rôle non-catalytique dans l'ubiquitination de p27. Le modèle suggère que CDK2/cycline A permet un positionnement optimal de p27 dans l'espace.

1.2.4.4.2.3.5. Complexes contenant un homologue de culline (SCF-like complex)

Les mammifères expriment 6 homologues de cullines autre que Culline-1 (voir revue (561)). Les données indiquent que ces cullines forment chacune un complexe semblable au complexe SCF. Ainsi, toutes les cullines lie RBX1 ou RBX2 via leur C-terminal. Leur N-terminal est impliqué dans le recrutement des substrats via des protéines adaptatrices. Dépendant de la culline, la nature des protéines liant le substrat varie. Les complexes SCF-like jouent des rôles importants notamment dans le développement embryonnaire (Culline-3), l'angiogenèse (Culline-2/pVHL), la suppression tumorale (Culline-5/SOCS) ou la réparation de l'ADN (Culline-4/DDB1).

1.2.4.5. E4 ou enzyme de polymérisation de l'ubiquitine

1.2.4.5.1. E4 à boîte U

En 1995, le groupe de Varshavsky rapporta la caractérisation de 5 gènes impliqués dans la voie UFD (pour Ubiquitin-Fusion Degradation) (324). Cette voie est responsable de la

dégradation de substrats artificiels possédant une ubiquitine fusionnée en N-terminal. Un de ces gènes, Ufd4p, possède un domaine de E3 HECT et est soupçonné d'ubiquitiner directement le substrat modèle. En accord avec cette hypothèse, la construction UbiVal76- β -gal est moins ubiquitinée et est stabilisée dans les cellules déficientes en *Ufd4*. En plus, les données biochimiques suggèrent qu'un autre gène identifié, Ufd2p, est également impliqué dans l'ubiquitination du substrat modèle *in vivo*. De manière intéressante, Ufd2p ne possède pas de domaine RING ou HECT.

En 1999, le groupe de S Jentsch a entrepris d'élucider le rôle de Ufd4p et Ufd2p par une série d'expériences biochimiques *in vitro* (370). Ainsi, ils montrèrent que Ufd4p, en présence de E1 et E2, est capable d'induire l'ubiquitination du substrat modèle ubiquitine-GST. Néanmoins, Ufd4p ne catalyse la conjugaison que de 2 à 3 molécules d'ubiquitine sur le substrat. Cette ubiquitination n'est pas suffisante pour cibler vers le 26S protéasome. De manière surprenante, l'addition de Ufd2p à la réaction entraîne une polyubiquitination de haut poids moléculaire. Ufd2p, en présence de E1 et E2 mais en absence de E3 (Ufd4p) n'est pas capable d'induire la conjugaison d'ubiquitine sur le substrat. Basé sur les caractéristiques biochimiques uniques de Ufd2p, le groupe de Jentsch a défini une nouvelle classe d'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine, les E4 ou enzyme de polymérisation de l'ubiquitine. Une E4 est un facteur facilitant la formation d'une longue chaîne d'ubiquitines sur le substrat seulement en présence d'une E3 (voir revue (293)). La nécessité d'une E3 implique que les E4 ne soient capables de conjuguer une molécule d'ubiquitine que sur l'ubiquitine et non sur un substrat directement. Les auteurs ont identifié un motif de 100 acides aminés présent chez Ufd2 et d'autres protéines qu'ils ont nommé boîte U. L'analyse du génome humain indique que nous exprimons 11 protéines à boîte U (PBU).

D'autres études ont confirmé la pertinence des enzymes E4 dans l'ubiquitination de substrats physiologiques. Par exemple, la forme active du facteur de transcription de levure Spt23p est trouvée sous forme monoubiquitinée au noyau. Les données suggèrent que Ufd2p reconnaît cette forme monoubiquitinée et entraîne la polyubiquitination et la dégradation de Spt23p (voir (293)).

1.2.4.5.2. Activité E3 ligase de la boîte U

En 2001, le groupe de Nakayama a suggéré pour la première fois la possibilité que la boîte U pourrait former une troisième classe de E3-ubiquitine ligase (267). En effet, ils montrèrent que les protéines contenant une boîte U sont capables d'autoubiquitination *in vitro*. La mutation de résidus conservés entraîne la perte de cette activité. D'autres études montrèrent que la boîte U, comme le domaine RING, est capable de lier directement certaines E2 (579).

CHIP (Carboxy terminus of Hsp70-interacting protein) est la PBU la plus caractérisée (voir revue (478)). Celle-ci interagit avec les protéines de choc thermique HSC70 et HSP90 via ses trois répétitions tétratricopeptide (TPR). L'association de CHIP avec les chaperones lui confère sa spécificité de substrat. Ces complexes sont impliqués dans la dégradation du récepteur ERBB2, de la NO synthase et de TAU. On pense également que CHIP pourrait être impliqué dans la résistance au stress. Très récemment, CHIP fut montré capable de polymériser des chaînes d'ubiquitine via la lysine 63. Cette activité requiert l'association de CHIP avec la E2 hétérodimérique UBC13-UEV1A (837). Ainsi, la boîte U ne cible pas toujours vers le protéasome.

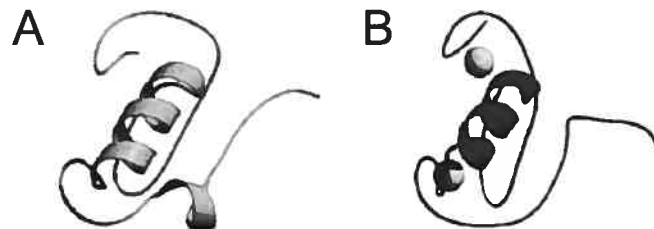


Figure 54: La boîte U et le domaine RING sont structurellement similaires. (A) Structure en solution de la boîte U de la protéine de levure Prp19p. (B) Domaine RING de la ligase c-CBL. Adaptée de (564).

1.2.4.5.3. Structure de la boîte U

La structure en solution de la boîte U de la protéine Prp19p révèle que celle-ci se replie de manière similaire au domaine RING (Figure 54) (531). La boîte U ne coordonne pas d'ions de Zn^{2+} . Comment la structure de la boîte U est-elle stabilisée ? La boîte U possède tout d'abord un centre hydrophobe. De plus, de nombreux ponts hydrogènes et salins internes facilitent le repliement. Comme c'est le cas pour le domaine RING, la mutation des résidus stabilisateurs de la boîte U perturbe son repliement. Également, la boîte U possède un sillon

hydrophobe à sa surface interagissant avec les E2, tel que révélé par la structure de la PBU CHIP et la E2 UBC13 (837).

1.2.4.6. Topologie de l'ubiquitination

On distingue trois modes de conjugaison de l'ubiquitine. L'addition d'un seul monomère d'ubiquitine sur le substrat se nomme monoubiquitination (Figure 55, type I). L'ubiquitine peut-être additionnée en plusieurs copies sur un substrat selon deux topologies. La multimonoubiquitination consiste à la conjugaison de monomères d'ubiquitine sur plusieurs sites du substrat (Figure 55, type II). D'un autre côté, un substrat polyubiquitiné possède une chaîne d'ubiquitines polymérisées (Figure 55, type III). Cette polymérisation se fait via l'une des sept lysines internes de l'ubiquitine. Comme nous allons le voir dans les sections suivantes, la topologie de l'ubiquitination dicte son effet sur le substrat.

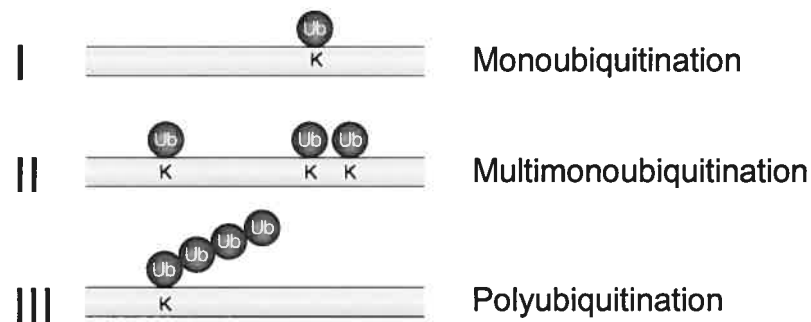


Figure 55: Trois types d'ubiquitination observés *in vivo*. Voir le texte pour plus de détails. Tirée de (284).

1.2.4.6.1. Monoubiquitination

La monoubiquitination n'est pas un signal de dégradation reconnu par le 26S protéasome (voir revue (282)). Cette modification post-traductionnelle est plutôt impliquée dans la réparation de l'ADN, la transcription de même que l'endocytose. La monoubiquitination affecte également la localisation subcellulaire.

1.2.4.6.1.1. Réparation de l'ADN

PCNA (pour Proliferating Cell Nuclear Antigen) est une protéine essentielle durant la réplication de l'ADN (456). Cette protéine est également impliquée dans la réparation de l'ADN. En réponse aux rayons UV, PCNA devient monoubiquitinée sur sa Lys164. La E2 Rad6p et la E3 Rad18p sont impliquées génétiquement dans cette modification (287). Le mutant K164R de PCNA interfère avec la réparation de l'ADN, indiquant que la (mono)ubiquitination de PCNA est essentielle pour ce processus (259). La E2 hétérodimérique Ubc13p/Mms2 et la E3 Rad5p peuvent générer la polymérisation sur la Lys164 d'une chaîne de polyubiquitine liée par la lysine interne 63 (voir section 1.2.4.6.2.2.) (287). Cette modification facilite la réparation de type "error-free bypass" (également appelé "template switching"). De manière intéressante, la Lys164 de PCNA est également un site d'attachement de la molécule ubiquitin-like SUMO (voir section 1.2.7.1.) (259).

1.2.4.6.1.2. Transcription

Les histones sont des protéines sujettes à de multiples modifications post-traductionnelles. En effet, les histones peuvent être phosphorylées, acétylées, méthylées, sumoylées, ribosylées et bien sûr ubiquitinées (voir revue (559)). L'ensemble de ces modifications affecte l'organisation de la chromatine selon les règles du code des histones (ou histone code, voir revue (149)). Par exemple, la combinaison de l'acétylation de la Lys8 de l'histone H4, de la Lys14 de l'histone H3 et la phosphorylation de la Ser10 de l'histone H3 est souvent associée aux régions transcriptionnellement actives. À l'opposée, l'absence de l'acétylation des histones H3 et H4 en combinaison avec la méthylation de la Lys9 de l'histone H3 corrélient avec la répression transcriptionnelle.

Chez la levure, l'histone H2B est monoubiquitinée sur la Lys123 via l'activité de la E2 Rad6p (606). Cette ubiquitination induit la méthylation des lysines 4 et 79 de l'histone H3, favorisant la répression transcriptionnelle (688). Une levure exprimant une histone H2B non-ubiquitable ne peut sporuler, indiquant que cette modification est essentielle pour la méiose (606). Récemment, plusieurs études ont montré l'implication du complexe du groupe Polycomb (PcG) hPRC1L (pour human Polycomb repressive complex 1-like) dans

l'ubiquitination de l'histone H2A sur la Lys119 chez l'homme (760). Ce complexe hPRC1L comporte plusieurs sous-unités à domaine RING jouant le rôle de E3 ligases. La monoubiquitination de l'histone H2A joue un rôle essentiel dans l'inactivation du chromosome X chez la femme (157).

1.2.4.6.1.3. Endocytose

La monoubiquitination des récepteurs membranaires est un signal puissant d'internalisation chez la levure et les mammifères (voir revue (283)). Dans certains cas, le récepteur est multimonoubiquitiné en réponse à son ligand, comme c'est le cas du récepteur EGF (503). La monoubiquitine est reconnue par les protéines de la famille Epsine (pour Eps15-interacting proteins) de même que par EPS15 (pour EPidermal growth factor receptor Substrate 15) (57, 119). Les Epsines possèdent un domaine ENTH (permettant de lier les phospholipides), deux domaines UIM (permettant de lier l'ubiquitine, voir section 1.2.5.) et un motif d'interaction avec la clathrine. EPS15 lie les Epsines et possède trois domaines UIM. Ainsi, ces protéines favorisent le recrutement des récepteurs monoubiquitinés vers les fosses tapissées de clathrines ("clathrin coated pits"), conduisant à l'internalisation des récepteurs vers les endosomes. Les ubiquitine ligases c-CBL et NEDD4 sont des exemples de E3 impliquées dans l'internalisation des protéines membranaires (voir revue (617, 662)).

Les mammifères possèdent également trois complexes protéiques impliqués dans le transport ("trafficking") des vésicules intracellulaires : ESCRT-I, ESCRT-II et ESCRT-III (pour Endosomal Sorting Complex Required for Transport) (voir revue (347)). Ces complexes sont impliqués dans la formation des corps multivésiculaires (MVB pour MultiVesicular Bodies). Ce sont ces derniers qui fusionnent avec les lysosomes, entraînant ainsi leur dégradation. La monoubiquitination est un signal important de ciblage vers les MVB. Les complexes ESCRT-I et ESCRT-II possèdent respectivement TSG101 et VPS36, sous-unités liant directement l'ubiquitine (346, 487). Finalement, le ciblage des MVB vers les lysosomes requiert les facteurs HRS/VPS27 et STAM/HSE1 (62, 441). Ces protéines ressemblent aux Epsines dans le sens qu'elles interagissent avec les phospholipides et possèdent des domaines UIM. L'enzyme de débiquitination Doa4 est responsable du recyclage de l'ubiquitine impliquée dans le transport vésiculaire (17).

1.2.4.6.1.4. Localisation subcellulaire

L'ubiquitine-ligase MDM2 est impliquée dans l'ubiquitination du gène suppresseur de tumeur et facteur de transcription p53 (revue (488)). De manière intéressante, l'activation transcriptionnelle du gène de MDM2 est dépendante de l'activité de p53. Ainsi, en absence de stress génotoxiques, l'expression de MDM2 est faible mais suffisante pour inactiver p53. Dans ces conditions, MDM2 induit principalement la monoubiquitination de p53 (431). Cette modification entraîne une localisation cytoplasmique de p53, localisation incompatible avec son activité de facteur de transcription. En réponse aux dommages à l'ADN, p53 est modifié et son association avec MDM2 est détruite. Il s'en suit une déubiquitination de p53 (probablement médiée par son enzyme de déubiquitination spécifique HAUSP (431)) et une relocalisation de p53 au noyau. L'induction du gène cible MDM2 favorise une polyubiquitination de p53 et sa dégradation protéasomale, permettant le retour vers l'état basal (89).

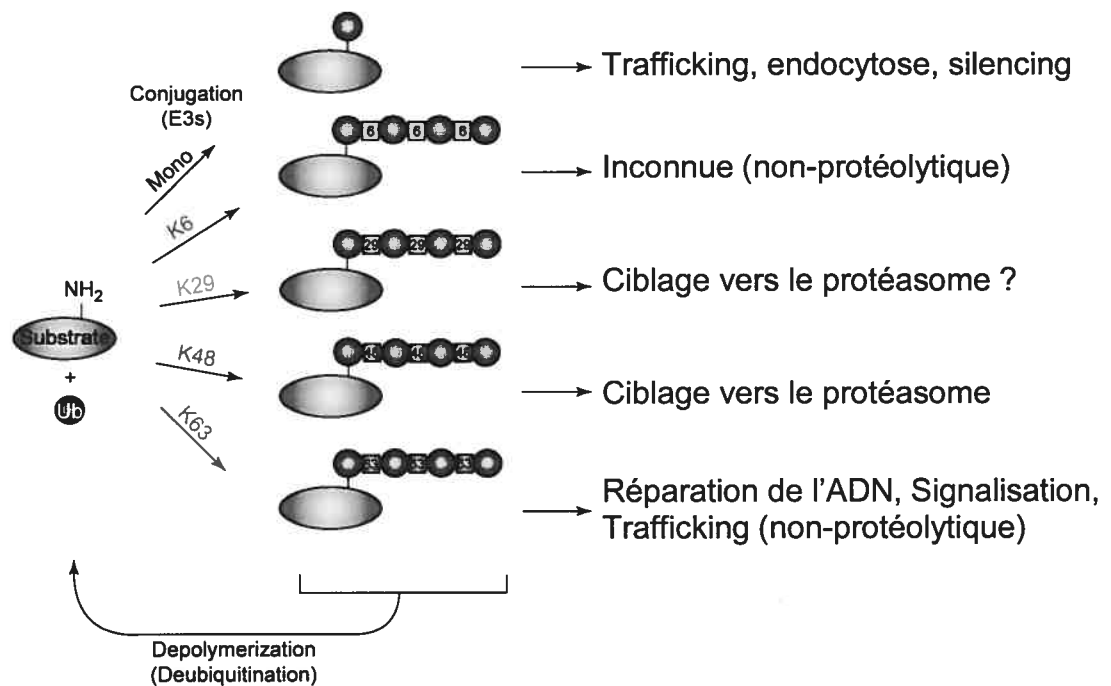


Figure 56: Différents modes d'ubiquitination. Voir texte pour plus de détails Tirée de (565).

1.2.4.6.2. Polyubiquitination

Dans la majorité des cas, l'ubiquitine additionnée sur un substrat forme de longues chaînes d'ubiquitines polymérisées. C'est la fameuse traînée ("smear") de haut poids moléculaire

observée par immunoblot (voir chapitre 2 et 3). Cette polymérisation se fait par l'addition d'un nouveau monomère sur une molécule d'ubiquitine déjà associée au substrat. Tout dépendant du site d'acceptation de l'ubiquitine, les conséquences seront différentes (Figure 56). L'ubiquitine possède 7 lysines situées aux positions 6, 11, 27, 29, 33, 48 et 63. Récemment, les données protéomiques obtenues chez la levure indiquent que toutes les lysines de l'ubiquitine sont utilisées par les E3 ligases *in vivo* (555). La fréquence de conjugaison des lysines varie beaucoup : $Lys48 > 63 \approx 11 \gg 33 > 27 > 6$. La Lys29 est ubiquitinée seulement lorsque la Lys33 l'est. On comprend mal quels sont les déterminants contrôlant la topologie des chaînes de polyubiquitine. La nature des enzymes de conjugaison de l'ubiquitine y joue un rôle prépondérant.

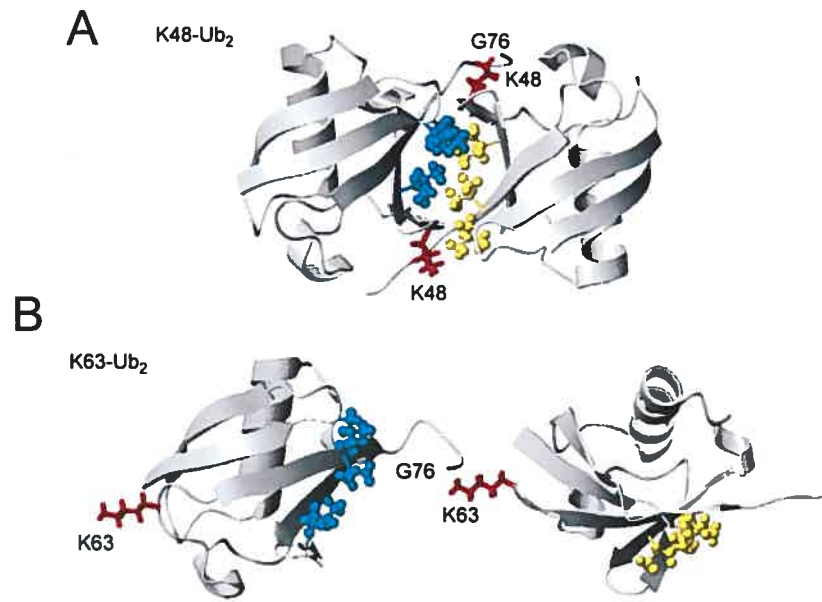


Figure 57: Structure en solution de l'ubiquitine sous forme dimérique. (A) Deux molécules d'ubiquitine reliées par la lysine 48. On remarque une structure compacte, avec la surface hydrophobique constituée de L8, I44 et V70 à l'interface de deux monomère. (B) Dimère d'ubiquitine relié par la lysine 63. La structure est déployée et diverge de la première. Tirée de (565).

1.2.4.6.2.1. Lysine 48

La polymérisation de l'ubiquitine via la Lys48 constitue le signal reconnu par le protéasome (117). Chez la levure, la Lys48 est le site de conjugaison le plus fréquent (555). Les données structurales indiquent que deux ubiquitines reliées via la Lys48 forment un complexe compact (Figure 57A). La surface hydrophobique composé des résidus Leu8, Ile44 et Val70 se situe à l'interface (565, 741). Une chaîne d'ubiquitine mutée en ces positions n'est pas reconnue par le protéasome, indiquant que cette surface hydrophobique

est importante pour la conformation de la chaîne (47). Une chaîne d'ubiquitine liée par la Lys48 doit contenir un minimum de 4 copies d'ubiquitine afin d'être reconnue efficacement par le protéasome (719). Il existe des domaines protéiques reconnaissant sélectivement les chaînes liées par la Lys48 (voir section 1.2.5.).

En 2004, les groupes de R Deshaies et RW King ont identifié une nouvelle classe d'inhibiteurs du système ubiquitine-protéasome (750). Ces composés, nommés ubistatines, n'inhibent pas directement l'activité protéolytique du 20S protéasome comme le font les inhibiteurs MG-132 ou Velcade (voir section 1.2.3.2.3.). Ces inhibiteurs empêchent plutôt le recrutement du substrat polyubiquitiné vers le protéasome. Les ubistatines lient directement les chaînes de polyubiquitine conjuguées via la Lys48 et induisent un changement de conformation les rendant non compétentes pour la dégradation. Les ubistatines affectent minimalement les chaînes liées par les lysines 63 et 29.

1.2.4.6.2.2. Lysine 63

La polymérisation via la Lys63 est la deuxième plus fréquente, après la Lys48 (555). Les chaînes utilisant la Lys63 ne constituent pas un signal de dégradation. Ainsi, la dégradation protéasomale est normale chez une levure exprimant le mutant K63R de l'ubiquitine (675). Par contre, cette levure est hypersensible aux dommages à l'ADN, suggérant que la polyubiquitination spécifique de la Lys63 joue un rôle dans la réparation de l'ADN. On sait maintenant que le facteur PCNA est une cible de l'ubiquitination via la Lys63 (287). Cette modification permet une réparation sans erreur du dommage à l'ADN ("error-free mode of lesion bypass"). La structure d'un dimère d'ubiquitine relié par la Lys63 diffère grandement d'un dimère relié par la Lys48 (Figure 57B) (740). Cette observation permet de comprendre pourquoi le site de polymérisation de l'ubiquitine entraîne des conséquences variées.

En plus de la réparation de l'ADN, la polymérisation via la Lys63 joue un rôle important dans la signalisation et le trafic vésiculaire. Ainsi, la E3 ubiquitine ligase TRAF2 est essentielle pour la transmission des signaux pro-inflammatoire du TNF α (693). L'activation du récepteur du TNF α induit l'autopolyubiquitination via la lysine 63 de TRAF2. Cette chaîne est spécifiquement reconnue par les protéines TAB1-3 (pour TAK1 Binding protein-

1-3) via leur domaine NFZ ce qui conduit à l'activation des voies pro-inflammatoire NF- κ B et JNK (338). De manière intéressante, les enzymes de déubiquitination CYLD1 et A20 déconjugent ces chaînes, inhibant la signalisation du TNF α (voir section 1.2.6.).

D'autre part, la monoubiquitination est suffisante pour l'internalisation de nombreuses protéines membranaires. Néanmoins, un dimère d'ubiquitine conjugué par la lysine 63 génère un signal plus efficace d'endocytose, notamment pour l'internalisation des perméases à nutriments (220).

1.2.4.6.2.3. Lysine 29

La dégradation du substrat artificiel ubiquitine-G76V- β -galactosidase (UbiVal76- β -gal) chez la levure nécessite les protéines de la voie UFD (pour ubiquitin-fusion degradation) (324). Cette voie reconnaît l'ubiquitine comme signal d'ubiquitination (ou dégron) (voir section 1.2.4.5.). La première molécule d'ubiquitine conjuguée l'est directement sur l'ubiquitine en N-terminal de la β -galactosidase. La mutation de la Lys29 de ce substrat entraîne sa stabilisation *in vivo*, suggérant que la conjugaison via la lysine 29 est un signal de ciblage au protéasome (324). La modélisation d'un dimère d'ubiquitine lié via la Lys29 révèle néanmoins une structure ouverte semblable au dimère lié via la Lys63 (565). Une étude systématique par spectrométrie de masse a confirmé la présence de conjugaison de l'ubiquitine via la lysine 29 (555). De manière intrigante, l'ubiquitine conjuguée par la Lys29 l'est toujours également sur la Lys33. On ignore la fonction physiologique de cette structure branchée. De plus, on ignore si la Lys29 est impliquée dans la dégradation protéasomale de substrats physiologiques.

1.2.4.6.2.4. Lysine 6

Le gène suppresseur de tumeur BRCA1 est impliqué dans la réparation de l'ADN (voir revue (678)). Avec son partenaire BARD1, BRCA1 possède une activité ubiquitine-ligase. Les chaînes d'ubiquitines générées par ce complexe sont liées via la Lys6 (522). Ces chaînes sont reconnues par le protéasome, mais n'entraînent pas la dégradation des protéines associées. L'ubiquitination via la Lys6 pourrait donc entraîner une stabilisation du

substrat. Ce complexe est également responsable de l'ubiquitination observée aux foci de réparation de l'ADN. La surexpression d'un mutant de l'ubiquitine K6R inhibe l'ubiquitination aux foci de réparation, suggérant que ce type d'ubiquitination joue un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN (500).

1.2.4.6.2.5. Autres lysines

Bien qu'observée *in vivo*, la conjugaison sur les lysines 11, 27 et 33 reste encore mal comprise. On ignore le rôle et la régulation de ce type de polymérisation de l'ubiquitine. On peut souligner que la conjugaison sur la Lys11 est aussi fréquente que celle sur la Lys63 (555).

1.2.4.7. Site d'ubiquitination

1.2.4.7.1. Lysine

C'est le groupe de Hershko qui montra pour la première fois la nature covalente de la liaison entre l'ubiquitine et les substrats du protéasome (276). La stabilité chimique de ce lien suggéra à ces scientifiques que l'ubiquitine est reliée par une liaison amide (identique à la liaison peptidique) avec le substrat. Parce que l'ubiquitine est activée via son C-terminal par la E1, le substrat doit fournir un groupement amine pour la formation du lien amide (nommé dans ce cas-ci isopeptidique).

Du fait de leur abondance et de leur stochiométrie d'ubiquitination élevées (jusqu'à 10%, voir (282)), les histones H2A et H2B furent les premières protéines dont le site d'ubiquitination fut identifié (236, 717). Les techniques biochimiques "classiques" (digestions enzymatiques et chimiques, chromatographies, cartes peptidiques et dégradation d'Edman) ont permis d'identifier la lysine comme donneur du groupement amine.

Avec l'avènement de la biologie moléculaire, l'identification des sites d'ubiquitination s'est faite par mutagenèse dirigée. Par exemple, la substitution des 6 lysines N-terminale de l'inhibiteur de NF- κ B I κ B α par des arginines (un résidu non ubiquitinable) a permis de cartographier 2 sites essentiels pour l'ubiquitination : les lysines 21 et 22 (37). Également,

la mutation de la lysine 6 de SOCS3 stabilise grandement la protéine *in vivo*, suggérant que ce résidu est le site d'ubiquitination majeur (630). Néanmoins, ce type d'identification ne constitue pas une preuve biochimique directe du site d'attachement de l'ubiquitine. Il se peut que la mutation entraîne des changements conformationnels incompatibles avec l'ubiquitination. L'inhibition de l'ubiquitination à la suite de mutations K → R peut ainsi être artéfactuelle.

Ces dernières années, le développement (et la démocratisation) des spectromètres de masse et de la protéomique a facilité l'identification de nouvelles protéines ubiquitinées (361). De plus, cette technique permet de détecter directement la conjugaison de l'ubiquitine sur le substrat. Grâce à cette approche, le groupe de SP Gygi a confirmé que la lysine est le site majeur d'attachement de l'ubiquitine chez la levure (555).

La position des sites d'ubiquitination varie selon les substrats. Par exemple, p53 est ubiquitiné sur plusieurs lysines en C-terminal par MDM2 (611). D'un autre côté, Sic1p peut être ubiquitiné sur n'importe laquelle de ses 6 lysines en N-terminal (560). On ignore quel déterminant influence la sélection des lysines comme site d'attachement. Il est probable que le positionnement des substrats par la E3 joue un rôle déterminant. Malgré la caractérisation de plus en plus poussée des protéines ubiquitinées, on ignore encore le site d'ubiquitination de la majorité d'entre elles.

1.2.4.7.2. N-terminal

Pendant longtemps, on pensa que seules les lysines pouvaient recevoir l'ubiquitine. En 1998, le groupe de A Ciechanover suggéra pour la première fois qu'une protéine peut-être ubiquitinée sur l'amine- α du N-terminal (87). K Breitschopf et collègues ont voulu identifier le site d'ubiquitination de MYOD, un facteur de transcription bHLH aux propriétés myogéniques. De manière surprenante, la mutation de tous les résidus lysines en arginines affecte minimalement l'ubiquitination et la dégradation de MYOD *in vitro* et *in vivo*. Parce que les auteurs pensaient que l'ubiquitination nécessite absolument un groupement amine, ils ont émis l'hypothèse que MYOD est ubiquitinée sur son N-terminal. En conséquence, le blocage chimique du N-terminal inhibe l'ubiquitination et la dégradation de MYOD *in vitro*. Au contraire, le blocage chimique des lysines n'affecte pas

la dégradation de MYOD. De plus, l'addition d'un épitope Myc hexamérique (Myc₆) en N-terminal stabilise MYOD *in vitro* et *in vivo*. Le groupe de A Ciachanover conclua donc à l'ubiquitination en N-terminal de MYOD *in vivo*.

Basé sur des approches similaires, 9 autres protéines ubiquitinées en N-terminal ont été décrites : les protéines virales E7 (596), LMP1 (24) et LMP2A (304), l'inhibiteur de CDK p16^{INK4a} (55), le gène suppresseur de tumeur p14^{Arf} (396), les inhibiteurs de la différenciation à boîte HLH Id1 (727) et Id2 (192) et le facteur de "licensing" des origines de réplication CDT1 (648). Jusqu'à tout récemment, il n'existait aucune preuve biochimique directe prouvant l'existence de l'ubiquitination en N-terminal *in vivo*. Durant ma formation doctorale, j'ai identifié deux nouvelles protéines ubiquitinées en N-terminal : ERK3 et l'inhibiteur de CDK p21^{WAF1}. Nous apportons pour la première fois une preuve biochimique directe que ce type d'ubiquitination existe *in vivo* (voir chapitre 3). En utilisant les approches classiques, le groupe de M Pagano a également observé de manière indépendante l'implication de l'ubiquitination en N-terminal de p21^{WAF1} pour sa dégradation protéasomale (69).

1.2.4.7.3. Cystéine (et sérine)

Très récemment, K Cadwell et L Coscoy ont suggéré que l'ubiquitination d'un substrat peut se faire sur le résidu cystéine, et dans une moindre mesure sur des sérines (104). La ligase MIR1 est une protéine codée par le virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV). MIR1 est impliquée dans l'internalisation et la dégradation du complexe d'histocompatibilité majeur MHC1 en ubiquitinant directement la sous-unité HLA.B7. La queue cytoplasmique de HLA.B7 contient 2 lysines. De manière surprenante, la mutation de ces deux lysines n'affecte pas l'internalisation de HLA.B7 induite par l'expression de MIR1. Le N-terminal de cette protéine est extracellulaire, empêchant physiquement celui-ci d'être le site d'attachement de l'ubiquitine. Une série de mutants ponctuels révèle que la cystéine semble un site d'ubiquitination majeur de HLA.B7 par MIR1. Le lien thioester ainsi formé entre la cystéine et le C-terminal de l'ubiquitine est identique au lien chimique entre l'ubiquitine et la E1, les E2 et les E3 à domaine HECT. La forme ubiquitinée de HLA.B7 est sensible aux conditions alcalines *in vitro*, une caractéristique d'une liaison thioester. La présence unique

de sérines dans la queue de HLA.B7 permet une internalisation partielle de celle-ci, suggérant qu'une liaison de type ester peut exister entre l'ubiquitine et un substrat. Malheureusement, les auteurs ne fournissent pas de preuves biochimiques directes que MIR1 induit l'ubiquitination de HLA.B7 sur les cystéines (ou les sérines). On ignore également si ce type d'ubiquitination est produit par des ligases cellulaires.

1.2.4.8. Dégradation par le protéasome de manière ubiquitine-indépendante

La dégradation des protéines par le 26S protéasome requiert absolument leur polyubiquitination via la Lys 48. Certains substrats du protéasome semblent néanmoins être dégradés de manière indépendante de l'ubiquitine (voir revue (295)). L'inhibiteur de CDK p21^{WAF1} (655), le récepteur des cellules T TCR α (826), l'inhibiteur de NF- κ B I κ B α (386), les facteurs de transcription AP1 c-JUN (314) et c-FOS (78), la protéine neuronale α -synucléine (720), la thymidylate synthase (206) de même que l'ornithine décarboxylase (ODC) (142) sont des substrats proposés de cette voie de dégradation protéasomale indépendante de l'ubiquitine. L'assignation de plusieurs de ces protéines à cette voie repose principalement sur deux critères : (i) la dégradation protéasomale d'un mutant sans lysine et/ou (ii) la dégradation *in vitro* par le protéasome en absence d'ubiquitine. Comme nous allons le voir plus loin (voir section 6.1.2.2.), ces critères ne permettent pas d'exclure une implication de l'ubiquitine dans le ciblage vers le protéasome *in vivo*.

Comment ces protéines sont-elles reconnues par le protéasome en absence d'ubiquitination? L'ODC est le seul substrat caractérisé de cette voie. L'ODC est impliquée dans la synthèse des polyamines, substance essentielle et présente chez tous les organismes vivants (voir revue (142)). Parce que la surabondance de polyamines est toxique, les cellules ont développé une voie de rétroaction négative induisant la dégradation de l'ODC. En effet, de hauts niveaux de polyamines stimulent la traduction de l'antizyme, une protéine de liaison de l'ODC (473). De manière intéressante, les polyamines produisent un changement du cadre de lecture lors de la traduction de l'ARNm de l'antizyme, ce qui permet sa traduction. Le complexe ODC/antizyme interagit directement avec le protéasome, où seul l'ODC est dégradée (836). *In vitro*, une chaîne de polyubiquitine

inhibe la dégradation de l'ODC, suggérant que l'ubiquitine et le complexe ODC/antizyme lie un site commun sur le protéasome.

La dégradation protéasomale de l'inhibiteur de CDK p21^{WAF1} a fait l'objet de nombreuses études. Un mutant sans lysine (donc supposément non-ubiquitinable) de p21^{WAF1} possède une demi-vie similaire à la protéine de type sauvage, suggérant que l'ubiquitination de cette protéine n'est pas requise pour sa dégradation (655). Comme nous venons de le voir, l'ubiquitination d'une protéine peut se faire de manière indépendante des lysines *in vivo*. D'un autre côté, le 20S protéasome est capable de dégrader p21^{WAF1} *in vitro* en l'absence d'ubiquitination (69, 439). Isolé, p21^{WAF1} est une protéine sans structure tertiaire, la rendant ainsi susceptible au 20S protéasome (388). L'association de p21^{WAF1} avec ses cibles physiologiques, principalement les CDK, lui impose une conformation tridimensionnelle. Le 20S protéasome n'est pas capable de dégrader p21^{WAF1} complexé avec CDK2/cycline E (69). Contrairement à l'ODC, le mécanisme permettant la dégradation de p21^{WAF1} de manière indépendante de l'ubiquitine est mal défini. p21^{WAF1} peut interagir directement avec une sous-unité α du protéasome (723). Cependant, un mutant de délétion de p21^{WAF1} ne s'associant plus avec la sous-unité $\alpha 7$ est quand même dégradé par le protéasome, suggérant l'existence d'autres mécanismes responsables de son ciblage vers le protéasome (69). Finalement, le fait que l'inhibition pharmacologique du protéasome induit l'accumulation de formes ubiquitinées de p21^{WAF1} ne cadre pas avec le modèle "ubiquitine-indépendant" (111, 458, 619, 655). Dans le cadre de mon étude sur l'ubiquitination en N-terminal de ERK3, j'ai évalué l'implication de ce type d'ubiquitination dans le contrôle de la dégradation protéasomale de p21^{WAF1}. Nous avons montré que p21^{WAF1} n'est pas un substrat atypique du protéasome mais nécessite plutôt une ubiquitination en N-terminal pour être dégradé *in vivo* (voir chapitre 3).

1.2.5. Domaines de liaison à l'ubiquitine

L'ubiquitination serait sans conséquence sans l'existence de domaines reconnaissant spécifiquement l'ubiquitine. Jusqu'à présent, 9 domaines distincts sont connus pouvant lier l'ubiquitine (voir revue (284)). Certains domaines sont spécifiques à la monoubiquitination alors que d'autres reconnaissent les chaînes de polyubiquitine avec plus d'affinité. Comme

on pourrait s'y attendre, la topologie de la chaîne (soit avec quelle lysine se fait la polymérisation) influence l'interaction. Ces domaines se retrouvent sur des protéines aux fonctions diverses : métabolisme de l'ADN, transduction du signal, etc. Les domaines de liaison à l'ubiquitine se retrouvent également chez les protéines impliquées dans l'endocytose, chez les enzymes de déubiquitination de même que les récepteurs du protéasome. Finalement, certains de ces domaines semblent également capables de lier les protéines semblables à l'ubiquitine (ubiquitine-like protein, ULP).

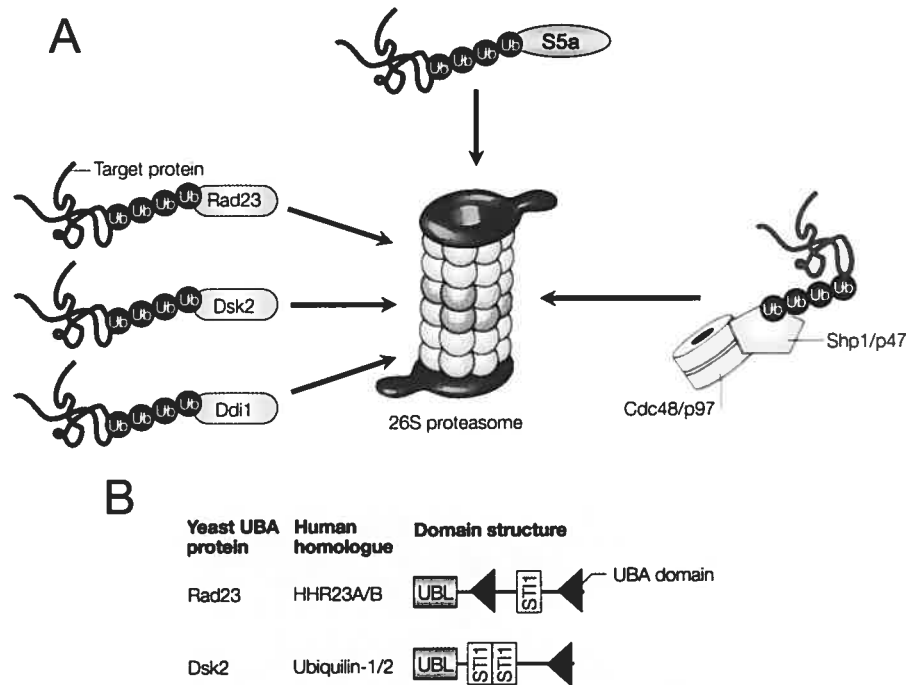


Figure 58: Ciblage des protéines ubiquitinées vers le 26S protéasome. (A) Les protéines Rad23p, Dsk2p et Ddi1p lient à la fois les chaînes de polyubiquitines via leur domaine UBA et le protéasome via leur domaine Ubl. Les protéines polyubiquitinées peuvent également être recrutées vers le 26S protéasome par l'intermédiaire de SHP1/p47 et CDC48/p97. La sous-unité du 19S protéasome S5a lie la polyubiquitine via ses deux domaines UIM. (B) Organisation structurelle de Rad23p et Dsk2p. UBL: Ubiquitin-like fold; ST11: heat shock chaperonin-binding motif. Tirée et adaptée de (284, 772).

1.2.5.1. Le domaine UIM

La sous-unité de la base du 19S protéasome S5a est la première protéine découverte pouvant lier les chaînes de polyubiquitines (169). Cette interaction se fait via un petit motif de 20 acides aminés, le "ubiquitin-interacting motif" (UIM) (289). Les domaines UIM sont conservés chez tous les homologues de S5a. Que reconnaît ce domaine? L'ubiquitine possède une surface hydrophobe constituée de la leucine-8, l'isoleucine-44 et la valine-70 (751). Une chaîne d'ubiquitine formée sur un mutant LIV-AAA ne lie pas S5a et n'est pas dégradé *in vitro* (47). Récemment, Wang et al. ont montré que les UIM de S5a interagissent

directement avec la surface hydrophobe de l'ubiquitine (762). L'analyse du génome humain révèle que le domaine UIM se retrouve chez plus de 70 protéines différentes. S5a et d'autres protéines semblables peuvent faciliter le recrutement des protéines ubiquitinées vers le protéasome (Figure 58). VPS27, une protéine impliquée dans le transport vésiculaire et liant la monoubiquitine, possède également deux motifs UIM (62).

1.2.5.2. Le domaine UBA

Le domaine UBA (pour UBiquitin Associated domain) a été identifié par approche bioinformatique. Ainsi, ce domaine se retrouve souvent chez les protéines impliquées dans les réactions d'ubiquitination et de déubiquitination (288). Ce domaine d'environ 50 acides aminés est présent chez presque 100 protéines humaines. Le domaine UBA est entre autre retrouvé chez les protéines impliquées dans le recrutement des substrats ubiquitinés vers le protéasome. Ainsi, les évidences génétiques pointent vers un rôle des protéines Rad23p (Radiation gene 23), Dsk2p (Dominant Suppressor of Kar2) et Ddi1p (Dna Damage molecule-1) dans la présentation des substrats polyubiquitinés vers le protéasome (Figure 58) (749). En plus de leur domaine UBA, ces protéines possèdent un domaine UBL (pour UBiquitin-Like) leur permettant d'interagir directement avec le protéasome via la sous-unité Rpn1p/S2 (voir section 1.2.5.). La protéine SHP1/p47 est elle aussi impliquée dans le ciblage vers le protéasome (600). Ainsi, elle lie les protéines ubiquitinées par son domaine UBA et le protéasome via l'ATPase CDC48/p97. Cette dernière est capable d'interagir directement avec le protéasome.

1.2.5.3. Les autres domaines

Les domaines CUE, GAT, GLUE, NZF, PAZ, UEV et VHS ont été identifiés par double hybride ou par approches biochimiques (284). Bien que moins bien caractérisés, ces domaines ne semblent pas impliqués dans des fonctions protéolytiques. Par exemple, le domaine UEV de la E2 MMS2 lui confère une spécificité pour la polymérisation de l'ubiquitine sur la Lys63 (739). Le domaine UEV ressemble structurellement à la E2. Il ne catalyse pas le transfert d'ubiquitine car il lui manque la cystéine catalytique. Le domaine NZF de TAB2 et TAB3 leur permettent d'interagir avec une chaîne d'ubiquitine lié via la

Lys63 et d'activer par la suite la voie NF- κ B (338). Plus de 100 protéines humaines possèdent un de ces motifs.

1.2.6. Enzyme de déubiquitination (DUB)

La maturation et le recyclage de l'ubiquitine sont médiés par les enzymes de déubiquitination (DUB pour DeUBitinating enzyme) (voir revue (29)). De plus, ces enzymes régulent directement le niveau d'ubiquitination de certains substrats. Les DUB sont toutes des cystéines protéases. Néanmoins, elles peuvent être structurellement divisées en trois classes: les hydrolases du C-terminal de l'ubiquitine (UCH pour Ubiquitin C-terminal Hydrolases), les protéases spécifiques à l'ubiquitine (UBP ou USP pour Ubiquitin Specific Protease) et les protéases à domaine OTU (pour Ovarian Tumor). L'homme exprime plus d'une centaine de DUB, un répertoire suggérant que cette classe d'enzyme joue un rôle important dans la physiologie de l'ubiquitination (435). Il faut aussi rappeler que le couvercle du protéasome possède une activité de déubiquitination non reliée aux DUB (voir section 1.2.3.3.2.).

1.2.6.1. Les UCH

Les UCH sont des enzymes de petite taille (25-28 kDa) et constituent près de 20 % de l'effectif des DUB chez l'homme (16). Ces enzymes font partie de la famille des protéases à cystéine papaine (328). L'ubiquitine conjuguée avec des peptides ou autres petites molécules via son C-terminal est un très bon substrat des UCH *in vitro* (566). Les UCH sont peu actives sur des protéines repliées ubiquitinées (409). Dans ce cas, la déubiquitination se fait plutôt par les UBP. Les UCH sont efficacement inhibées par les agents alkylants (tel le *N*-éthylmaleimide, NEM) et l'ubiquitine-aldéhyde (279, 613).

La levure possède une seule UCH, Yuh1p. Son inactivation n'entraîne pas de phénotype, indiquant une redondance possible avec les UBP (33). Chez les mammifères, les évidences génétiques révèlent plutôt que les UCH sont importantes pour l'homéostasie du système nerveux central. La mutation "gracile axonal dystrophy" (*gad*) est due à une délétion du gène codant pour UCH-L1 chez la souris (627). Ce syndrome récessif est caractérisé par une neurodégénérescence (353). De manière intéressante, des mutations de UCH-L1 sont

retrouvé dans certains cas de maladie de Parkinson familiale précoce (426). Biochimiquement, la perte de UCH-L1 est associée à une diminution de la quantité d'ubiquitine libre dans le cerveau et à l'opposé, sa surexpression entraîne une augmentation de l'expression de l'ubiquitine dans les cellules neuronales (543). Ainsi, cette enzyme semble jouer un rôle dans l'homéostasie des niveaux d'ubiquitine dans les neurones.

1.2.6.2. Les USP ou UBP

Les USP sont de plus grandes tailles que les UCH (50-300 kDa) et représente près de 80% des DUB chez l'homme (16). Les USP sont également des cystéines protéases inhibées par les agents alkylants et l'analogue ubiquitine-aldéhyde. Biochimiquement, les UBP sont actives contre les protéines natives ubiquitinées. Les USP possèdent des séquences impliquées dans la liaison au substrat. Par alignement de séquence et protéolyse limitée, le groupe de Y Shi a récemment délimité un domaine de 350 acides aminés présent chez toutes les USP (296). La structure de ce domaine s'apparente à une main. La paume et le pouce contiennent les résidus catalytiques alors que les doigts lient l'ubiquitine.

La USP CYLD1 fait l'objet de nombreuses études. Cette protéine est considérée comme un gène suppresseur de tumeur. En effet, sa mutation est associée à la cylindromatose familiale, une prédisposition autosomale dominante à des tumeurs de la peau (61). D'autres mutations sont également responsables du syndrome de Brooke-Spiegler et du trichoépithéliome multiple familial, deux maladies génétiques caractérisées par des tumeurs de la peau (83). Quel est le mécanisme d'action de CYLD1 ? Deux groupes de recherche ont indépendamment identifié CYLD1 comme régulateur négatif de la voie NF- κ B (92, 384). L'activation de la kinase IKK (essentielle pour induire la dégradation de l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B) par le TNF α nécessite l'ubiquitination de TRAF2. Cette dernière est une E3 ligase qui catalyse son autopolyubiquitination via la lysine 63 de l'ubiquitine. TRAF2 polyubiquitinée n'est donc pas reconnue par le protéasome, mais induit plutôt l'activation de la kinase IKK (voir Figure 10). De manière intéressante, CYLD1 interagit avec TRAF2 et est capable de la déubiquitiner *in vitro* et *in vivo*, diminuant ainsi la signalisation induite par le TNF α . L'effet anti-tumoral de CYLD1 semble donc lié à sa capacité de diminuer l'activité des facteurs NF- κ B, facteurs aux propriétés anti-apoptotique (159).

1.2.6.3. Les protéases à domaine OTU

A20 est un gène cible de NF- κ B. On estime que A20 fait partie d'un mécanisme de rétroaction négative de la voie NF- κ B (60). Les souris déficientes en A20 développent un syndrome inflammatoire sévère partiellement dû à la suractivation de la voie NF- κ B (415). A20 possède en N-terminal un domaine OTU, domaine initialement trouvé chez la protéine Ovarian Tumor chez la drosophile (457). En 2003, les groupes de J Chroboczek et PJ Kilshaw ont découvert indépendamment que le domaine OTU possède une activité de déubiquitination (36, 191). Les protéines à domaines OTU se retrouvent chez tous les règnes du vivant de même que les virus (457). Il y aurait près de 10 protéines possédant un domaine OTU chez l'homme. Comme les UCH et les USP, les protéases à domaines OTU sont inhibées par les agents alkylants et l'ubiquitine-aldéhyde (36).

L'activité biochimique de A20 ressemble ainsi à celle de CYLD1 car elle déconjugue les chaînes de polyubiquitine liées par la lysine 63 (775). Ces substrats seraient TRAF2/6 et RIP, une kinase importante pour la signalisation du TNF α . En plus de son activité DUB, A20 est également une E3 malgré le fait qu'elle ne présente pas de domaine HECT, RING ou boîte U. Son activité ligase dépend de la présence de multiples doigts de zinc en C-terminal (775). A20 entraîne l'ubiquitination et la dégradation protéasomale des protéines qu'elle déubiquitine, notamment RIP, arrêtant ainsi la signalisation du TNF α . Ainsi, un mutant de A20 ne possédant pas le domaine OTU arrive néanmoins à diminuer l'activité NF- κ B (190).

1.2.7. Les protéines ressemblant à l'ubiquitine

Les organismes eucaryotes expriment des protéines semblables à l'ubiquitine (ou Ubiquitin-Like Protein, ULP) (voir revue (772)). Nous en exprimons au moins 11 : SUMO-1/2/3/4, NEDD8, ISG15, FAT10, FUB1, URM1, ATG8/12. Certains de ces homologues de l'ubiquitine sont conservés de la levure jusqu'à l'homme. Bien que ces protéines possèdent une homologie de séquence faible face à l'ubiquitine, elles adoptent le repliement de l'ubiquitine. Comme on peut le voir sur la Figure 59, les structures de l'ubiquitine, de

SUMO-1 et NEDD8 se superposent (46, 751, 777). À l'instar de l'ubiquitine, ces ULP possèdent un système de conjugaison (et de déconjugaison) leur permettant d'être conjuguées sur des substrats spécifiques. Ces protéines sont impliquées dans de nombreux processus fondamentaux dont la division cellulaire, la réparation de l'ADN ou la régulation des E3 ligases à base de cullines. Je vais discuter brièvement des deux ULP les mieux caractérisées : SUMO et NEDD8.

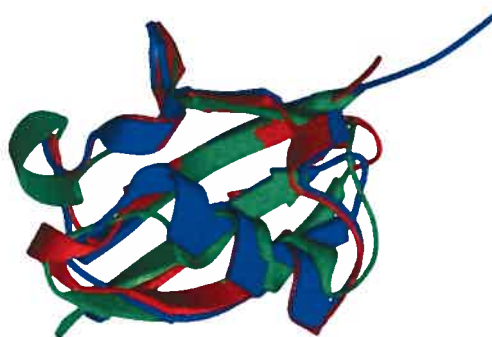


Figure 59: L'ubiquitine, SUMO-1 et NEDD8 se replient de manière similaire. Les structures de l'ubiquitine (en bleu), de SUMO-1 (en vert) et de NEDD8 (en rouge) sont superposées. Figure tirée de (772).

1.2.7.1. SUMO

SUMO (pour Small Ubiquitin-like Modifier) fut identifiée tout d'abord chez les mammifères par son interaction covalente avec la protéine inactivatrice de la GTPase RAN RANGAP-1 (455, 475). La levure possède un homologue de SUMO, Smt3p, alors que les vertébrés expriment 4 homologues de SUMO: SUMO-1-4 (269). SUMO-4 a été récemment identifiée et n'est pas encore bien caractérisée (73). SUMO2/3 sont très homologues et forment une sous-famille distincte de SUMO-1. L'hétérodimère AOS1/UBA2 est la E1 tandis que UBC9 est la E2 catalysant la sumoylation (168). Contrairement à l'ubiquitine, le site d'attachement de SUMO suit en général la séquence consensus ϕ KxE, où ϕ est un acide aminé à chaîne latérale large et hydrophobe (610). SUMO-2/3 contiennent cette séquence autour de leur Lys11, permettant la polysumoylation. De manière intéressante, la E2 UBC9 peut catalyser la sumoylation sans l'aide de E3 *in vitro*. Néanmoins, des E3 ligases spécifiques à la voie de SUMO ont été caractérisées.

SUMO est impliquée dans de nombreux processus. Chez la levure, la mutation de la E1 ou de la E2 de SUMO entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, indiquant que cette

voie est importante pour la phase M (652). On estime que ce phénotype est une conséquence d'un défaut au niveau de la topoisomérase. En effet, Smt3p (l'homologue de SUMO chez *S cerevisiae*) est conjuguée à la topoisomérase TOP2 (27). L'expression d'un mutant de TOP2 ne pouvant être sumoylé perturbe la dynamique de la chromatine. Chez la grenouille, l'inhibition de la sumoylation de la topoisomérase empêche la ségrégation des chromosomes (25). La mutation de la voie SUMO prévient l'activation de la ligase multimérique APC durant la mitose, expliquant l'arrêt du cycle cellulaire observé (172).

La sumoylation est également impliquée dans la réparation de l'ADN. Par exemple, la délétion de la DUB spécifique de SUMO *Ulp2* entraîne une hypersensibilité à certains dommages à l'ADN (432). De plus, un mutant de *Ubc9* présente un défaut dans la réparation de l'ADN par recombinaison (454). Le facteur de processivité PCNA est essentiel pour la réplication mais aussi la réparation de l'ADN. PCNA est sumoylé sur la Lys164, un site sujet également à l'ubiquitination (287). On comprend mal comment cette modification essentielle de PCNA affecte sa fonction.

La localisation subcellulaire de certaines protéines est dépendante de la voie SUMO. Par exemple, la modification de PML et SP100 par sumoylation est essentielle pour leur localisation dans les corps nucléaires PML (183). De manière similaire, la mutation du site de sumoylation du corépresseur CTBP empêche sa localisation nucléaire. CTBP est retenu dans le cytoplasme par son association avec l'oxyde nitrique synthase neuronale (neuronal Nitric Oxyde Synthase, nNOS) (438). La sumoylation inhibe donc cette interaction. La E3 ligase de la voie SUMO RANBP2 est responsable de sumoyler RANGAP-1. Cette modification permet à cette dernière d'être recrutée au complexe du pore nucléaire (NPC pour Nuclear Pore Complex) (330).

La transcription est également influencée par sumoylation. Ainsi, la sumoylation des facteurs de transcription p53, HSF1/2 et NFAT augmente leur activité transcriptionnelle (291, 710). Cependant, dans certains cas, la sumoylation peut favoriser la répression transcriptionnelle. Par exemple, le récepteur des androgènes (AR), le facteur adipogénique C/EBP β 1 et le substrat de ERK1/2 ELK1 répriment davantage leurs gènes cibles lorsqu'ils sont sumoylés (184, 575, 815).

1.2.7.2. NEDD8

Tous les homologues de cullines sont conjugués à l'ULP NEDD8 (294). Les données génétiques chez la levure *S pombe* et les mammifères indiquent que cette modification joue un rôle positif dans l'activité des complexes SCF (530, 542). En effet, la neddylation augmente l'activité catalytique des complexes SCF *in vitro* (570). La conjugaison de NEDD8 s'apparente à la conjugaison de l'ubiquitine et nécessite l'activité d'une E1 et E2. L'hétérodimère APP-BP1/UBA3 forme la E1 activant NEDD8 de manière ATP-dépendante. NEDD8 est ensuite transférée sur la E2 UBC12. La neddylation des cullines se fait sur une lysine conservée et située près du site de liaison de RBX1 (voir (166)). De manière surprenante, RBX1 est essentiel à la neddylation des cullines *in vivo*, suggérant que les complexes SCF s'autoneddylent (335). L'inactivation de ce système de conjugaison entraîne une diminution drastique de l'activité des complexes à base de cullines (530).

In vivo, la neddylation n'est jamais totale, suggérant une activité de déneddylation. Durant les années 1990, des études développementales sur la plante *Arabidopsis thaliana* ont permis d'identifier un complexe protéique appelé COP9/Signalosome (voir revue (260, 642)). La présence ou non de lumière durant la germination de cette plante influence grandement sa morphologie. La lumière produit une plante courte aux larges feuilles alors que la noirceur génère une plante étiolée aux petites feuilles. Les plantes possédant une mutation dans n'importe laquelle des 8 sous-unités du COP9/Signalosome sont toujours courtes et à grande feuilles, même en absence de lumière. De manière intéressante, la mutation du COP9/Signalosome perturbe l'activité des complexes SCF et entraîne une accumulation de leurs substrats (643). De plus, le COP9/Signalosome interagit *in vivo* avec les complexes SCF chez la levure et la plante (451, 643). Le signalosome est structurellement similaire au couvercle du 19S protéasome (voir section 1.2.3.3.). Le couvercle du protéasome joue entre autre le rôle de recycler les chaînes de polyubiquitines en déconjuguant le substrat. À partir de ces informations, les groupes de R Deshaies et XW Deng ont émis l'hypothèse que la fonction du COP9/Signalosome est de déneddyler les cullines (451, 643). En accord avec cette idée, la mutation du COP9/Signalosome entraîne l'hyperneddylation des cullines chez la levure et la plante. Cette activité dépend de la présence d'un motif JAMM (pour JAB1/MPN/MOV34) chez la sous-unité Csn5p (147). À

l'instar du couvercle du protéasome, la mutation du motif JAMM du signalosome inhibe son activité de déconjugaison *in vitro* et inactive le complexe *in vivo*.

Les données génétiques indiquent à la fois que la neddylation et la déneddylation sont essentielles pour l'activité des complexes SCF *in vivo*. Il semble donc que les cullines subissent des cycles de neddylation/dénéddylation et que ces cycles soient essentiels (146).

Il existe une lignée cellulaire exprimant une E1 de NEDD8 thermosensible (530). Ainsi, la lignée *ts41* dérivée de cellules d'ovaire d'hamster chinois (CHO) prolifère seulement à la température permissive (34°C). À 39°C (la température restrictive), les cellules arrêtent de se diviser mais la réplication de l'ADN n'est pas affectée. Il s'ensuit de nombreux cycles d'endoréplication de l'ADN. En 2000, le groupe de RL. Neve montra que le gène APP-BP1 pouvait compléter le défaut de prolifération des cellules *ts41* (126). Deux années plus tard, le groupe de WG Kealin observa que la neddylation des cullines est inhibée chez les cellules *ts41* à la température restrictive. Ainsi, les substrats des ligases à base de cullines p27^{KIP1}, HIF1 α et I κ B α sont stabilisés (530). Les cellules *ts41* sont maintenant utilisées comme test génétique afin d'évaluer la participation des ligases à base de cullines dans la dégradation d'une protéine d'intérêt.

1.2.8. Implication du système ubiquitine-protéasome dans le contrôle des MAPK

1.2.8.1. ERK1/2

Un stress osmotique chronique entraîne la mort cellulaire des fibroblastes en cultures (449). Ce traitement entraîne également une perte d'expression des MAPK ERK1/2. La réduction de l'expression de ERK1/2 est due à une dégradation accrue médiée par le système ubiquitine-protéasome. La MAPKKK MEKK1 serait responsable de l'ubiquitination de ERK1/2 et de leur dégradation. L'expression d'une forme résistante à l'ubiquitination prévient l'apoptose suite au stress osmotique. La dégradation des ERK1/2 fait donc partie d'un mécanisme pro-apoptotique visant à éliminer les signaux anti-apoptotiques de la voie ERK1/2. Cependant, la pertinence physiologique d'un traitement chronique hyperosmotique reste à démontrer. De plus, le rôle de MEKK1 doit être clarifié car ERK1/2 sont toujours dégradées par un traitement au sorbitol dans les cellules *Mekk1* KO (449).

D'un autre côté, il semble que l'ubiquitination régule la localisation de ERK1c (9). ERK1c est une isoforme de ERK1 résultant d'un épissage alternatif entraînant un C-terminal différent. Contrairement à ERK1, ERK1c est monoubiquitinée et localisée au Golgi. Aebersold et al. suggèrent que la monoubiquitination de ERK1c est responsable de sa localisation au Golgi. Cependant, parce que le site d'ubiquitination de ERK1c est inconnu, il est impossible de générer un mutant non-ubiquitinable et d'évaluer l'impact de cette mutation sur la localisation. Il semble que la localisation de ERK1c au Golgi entraîne la fragmentation de cet organelle. On peut se demander la pertinence physiologique de cet effet spécifique à ERK1c sachant que l'inactivation de *Erk1* chez la souris n'affecte pas la viabilité (547).

1.2.8.2. ERK7

Contrairement à ERK1/2, l'expression et l'activité de ERK7 sont principalement dépendantes du système ubiquitine-protéasome (397). Ainsi, ERK7 est une protéine ayant une courte demi-vie, conséquence de sa dégradation constitutive. Une étude de chimère entre ERK2, une MAPK stable, et ERK7 a permis de définir une séquence présente chez cette dernière impliquée dans le contrôle de la stabilité protéique. Ce dégron correspond aux 20 premiers acides aminés en N-terminal de ERK7. Ainsi, la mutation de cette séquence stabilise l'expression de ERK7 alors que son addition sur une protéine hétérologue comme la EGFP entraîne sa dégradation. La dégradation de ERK7 serait dépendante d'un complexe SCF (voir section 1.2.4.4.2.3.). On ignore quelles voies de signalisation sont sollicitées lors de la dégradation de ERK7. Vu que la surexpression de ERK7 inhibe l'entrée en phase S (3), il semble que ce mécanisme de régulation vise à diminuer l'activité anti-proliférative de ERK7.

1.2.8.3. ERK3

De nombreux facteurs de transcription sont régulés par le système ubiquitine-protéasome. Ainsi, l'inhibition du protéasome par des agents pharmacologiques entraîne des perturbations significatives du transcriptome (848). Pour en savoir plus, le groupe de Fürst a analysé l'effet de différents inhibiteurs du protéasome par puce à ADN ("microarray"). Ils

ont trouvé que ERK3 est induite en réponse à l'inhibition du protéasome (849). L'induction de ERK3 est dépendante de l'activité de la MAPK p38. La transcription du gène *Mapk6* pourrait être soumise à l'action d'un activateur transcriptionnel instable activé par p38. ERK3 semble jouer un rôle protecteur face aux inhibiteurs du protéasome. Ainsi, la surexpression de ERK3 inhibe partiellement l'apoptose consécutive à l'inhibition du protéasome. Le mécanisme par lequel ERK3 agit sur la survie cellulaire est encore inconnu.

1.3. OBJECTIFS DE CETTE THÈSE

1.3.1. Objectif général

ERK3 était très peu caractérisée lorsque j'ai débuté mes études graduées dans le laboratoire du Dr Sylvain Meloche. En effet, on ignorait sa régulation de même que sa fonction *in vivo*. Dans le but d'obtenir des indices sur la fonction biologique de ERK3, j'ai entrepris de caractériser moléculairement les mécanismes de régulation affectant cette MAP kinase.

1.3.2. Objectifs spécifiques

1.3.2.1. Étudier la régulation de la phosphorylation de ERK3

Les MAPK sont des enzymes dont l'activité biologique est grandement influencée par leur état de phosphorylation. Un aspect de mon projet vise donc à étudier la phosphorylation de ERK3. Ceci implique de (i) identifier les sites de phosphorylation de ERK3 *in vivo*; (2) étudier la régulation des sites identifiés et (3) étudier l'effet de cette phosphorylation sur "l'activité" de ERK3. Pour atteindre ce dernier objectif, il est nécessaire de caractériser l'activité kinase de ERK3 *in vitro*. Les résultats de cette étude sont présentés au chapitre 4.

1.3.2.2. Étudier la régulation de l'expression de ERK3

Les MAPK ne sont généralement pas régulées au niveau de leur expression. Néanmoins, il est possible que les MAPK atypiques, comme ERK3, soient régulées par des mécanismes "non conventionnels". Les mécanismes régulant l'expression de ERK3, spécialement au

niveau protéique ont été caractérisés. Les données portant sur cet objectif sont présentées aux chapitres 2 et 3.

1.3.2.3. Analyser l'effet de ERK3 sur la prolifération et/ou différenciation cellulaire

Les données publiées laissent penser que ERK3 pourrait être impliquée dans le contrôle de la différenciation et/ou la prolifération cellulaire. L'effet de ERK3 sur la prolifération cellulaire fut évalué. Les résultats sont présentés aux chapitres 2 et 4.

CHAPITRE 1:

Développement de nouveaux vecteurs pour procaryotes permettant une expression plus efficace des protéines pleines longueurs.

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Philippe Coulombe
BIM, biologie moléculaire

2. Description de l'article

Titre de l'article: "Dual-tag prokaryotic vectors for enhanced expression of full-length recombinant proteins"

Publié dans: "Analytical Biochemistry", Volume 310, pages: 219-222 (2002).

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Philippe Coulombe inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Régulation de la MAPK atypique ERK3 par le système ubiquitine-protéasome".

Dr Sylvain Meloche
Coauteur



Signature

_____ Date

2.1. MISE EN SITUATION

L'étude de la régulation de ERK3 nécessite un anticorps spécifique, réactif manquant à mon arrivée au laboratoire. La partie C-terminale de ERK3 (366-721) fut choisie comme immunogène car cette région est très spécifique à ERK3. Cet antigène est injecté en combinaison avec un adjuvant à des lapins, générant ainsi un antiserum polyclonal. Afin d'obtenir des quantités suffisantes de cet immunogène, nous avons créé un OGM (organisme génétiquement modifié). Ainsi, une souche de *E coli* transgénique fut construite surexprimant ERK3₃₆₅₋₇₂₁ humain. Traditionnellement au laboratoire, on fusionne la glutathione S-transférase (GST) en N-terminal de l'antigène. Cette protéine recombinante est ainsi facilement purifiée par chromatographie d'affinité en utilisant la glutathione comme ligand. Il arrive quelquefois que la production soit insuffisante. Par exemple, il se peut que la protéine recombinante soit insoluble et non active. Il arrive également que la protéine soit instable ou dégradée par les protéases endogènes. Finalement, la production de la protéine hétérologue peut être inefficace à cause du biais d'usage des codons (339). Malgré le fait que le code génétique soit complètement conservé de la bactérie jusqu'à l'homme, la fréquence d'utilisation des codons varie d'une espèce à l'autre. Nous avons eu des difficultés à produire la protéine GST-ERK3₃₆₅₋₇₂₁ (voir section 2.2.). La protéine pleine longueur était très minoritaire et il y avait de nombreux produits tronqués en C-terminal.

Dans le but d'obtenir une protéine pleine longueur, nous avons construit un nouveau système d'expression chez *E coli*. Ce système permet l'expression d'une protéine possédant des motifs facilitant la purification à ses deux extrémités. En effet, les protéines produites à partir des vecteurs pHGST que nous avons développés possèdent un épitope HIS₆ en N-terminal et GST en C-terminal. La séquence HIS₆ permet une purification d'affinité sur colonne de Ni²⁺ (708). Le nouveau système a permis de purifier la forme pleine longueur plus facilement et plus efficacement. Nous avons ainsi pu produire l'anticorps anti-ERK3. Ce réactif a facilité la caractérisation de la régulation de ERK3 (voir section 3.2. et 4.2.). Le vecteur pHGST a également permis la production de substrat dans l'optique de mesurer l'activité kinase de ERK3 (voir section 5.2.).

2.2. ARTICLE 1:

Dual-Tag Prokaryotic Vectors for Enhanced Expression of Full-Length Recombinant Proteins

Philippe Coulombe and Sylvain Meloche

Institut de recherches cliniques de Montréal and Departments of Pharmacology and Molecular Biology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H2W 1R7

Running title: Dual-tag vectors for protein purification

Category: Notes & Tips

Corresponding author: Dr. Sylvain Meloche
Institut de recherches cliniques de Montréal
110 Pine Avenue West
Montreal (Quebec) H2W 1R7
Canada
Tel.: (514) 987-5783
Fax: (514) 987-5536
E-mail: melochs@ircm.qc.ca

Article publié dans: **Analytical Biochemistry**, Volume 310, p. 219-222 (2002).

The ability to express and purify proteins in large amounts through recombinant DNA technology has enabled significant advances in biomedical sciences. Several commercially available or home-made vectors allow expression and easy purification of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Generally, such vectors are designed to produce fusion proteins containing a molecular tag at the N-terminal end. Calmodulin, streptavidin, maltose binding protein, thioredoxin, hexahistidine (His₆) and glutathione *S*-transferase (GST) are examples of tags chosen for their high binding affinity towards specific ligands (7). However, this procedure also has inherent limitations. In some cases, proteins overexpressed in *E. coli* form insoluble aggregates that are difficult to solubilize or are found mainly as truncated forms (1). Purification of recombinant fusion proteins sometimes requires several chromatography steps and renaturation protocols. These problems are particularly evident for large proteins, where yields of purification are frequently very low and preclude further analysis or use of the recombinant protein. Although several procedures have been developed to improve protein solubility in *E. coli* (1,2,6,8), less progress has been made to overcome the problem of truncated protein expression due to proteolysis, intrinsic instability or premature translation termination caused by codon usage bias (4). Here we describe the construction of novel dual-tag prokaryotic expression vectors that allow for enrichment in full-length recombinant proteins and facilitate their subsequent purification by sequential chromatography on metal and glutathione affinity columns.

Extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3) is a member of the MAP kinase family of serine/threonine kinases (5). In the course of our studies on this enzyme, we experienced problems in producing good yields of full-length GST fusion constructs of ERK3 using conventional prokaryotic expression systems. To circumvent these problems, we created a novel set of dual-tag prokaryotic expression vectors, pHGST.1 and pHGST.2T, that were engineered to produce N-terminal His₆- and C-terminal GST-tagged fusion proteins (Fig. 1). In theory, the sequential purification of recombinant proteins on glutathione and metal affinity resins should: 1) allow for enrichment in full-length protein; and 2) facilitate the purification process and increase the purity of the final product. pHGST vectors were constructed by first subcloning the two annealed oligonucleotides 5' CTA GCA TGA ATT CGG GAT CCA TGG GTC GAC TCG AGC TCG GAA 3' and 5' AGC TTT CCG AGC TCG AGT CGA CCC ATG GAT CCC GAA TTC ATG 3' into the *Nhe*I/*Hind*III sites of pRSET-A (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Canada) to generate pRSET-MCS.

The GST coding sequence was amplified by PCR using pGEX-KG (3) as template with the following oligonucleotides: 5' GCC GAG CTC TCC CCT ATA CTA GGT TAT TGG 3' and 5' CCC AAG CTT TTA ATC CGA TTT TGG AGG ATG GTC 3'. The amplicon was then digested SstI/HindIII and subcloned into the SstI/HindIII sites of pRSET-MCS to yield pHGST.1. The pHGST.2T vector was obtained by ligation of the following annealed oligonucleotides into NcoI/XhoI-digested pHGST.1: 5' CAT GGC GGC CGC CTC GAG TCT GGT TCC GCG TGG ATC CGG GGG TAT TTC CGG TGG TGG TA 3' and 5' TCG ATA CCA CCA CCG GAA ATA CCC CCG GAT CCA CGC GGA ACC AGA CTC GAG GCG GCC GC 3'. pHGST.2T was designed to harbor a thrombin cleavage site upstream of the GST gene, thus allowing removal of the GST moiety from the fusion protein upon thrombin treatment (Fig. 1B).

We wanted to produce a GST fusion protein of the C-terminal extremity of ERK3 (ERK3₃₆₅₋₇₂₁) for antibody production purposes. To this end, we first engineered a N-terminal GST fusion construct of ERK3 by subcloning the PCR amplified coding sequence of ERK3 (amino acids 365 to 721) into the EcoRI site of pGEX-KG, generating pGEX-KG-E3₃₆₅₋₇₂₁. The GST-ERK3₃₆₅₋₇₂₁ fusion protein was then expressed and purified as described in Fig. 2. The 75-kDa full-length fusion protein was hardly detectable by Coomassie blue staining and truncated proteins of ~32-50 kDa accounted for the majority of the purified species (Fig. 2, left panel). We next tested the usefulness of the novel pHGST.1 vector by expressing the same ERK3₃₆₅₋₇₂₁ protein as a C-terminal GST fusion construct. The ERK3₃₆₅₋₇₂₁ coding sequence was amplified by PCR and ligated in frame into the EcoRI site of pHGST.1. The His₆-ERK3₃₆₅₋₇₂₁-GST fusion protein was then expressed and purified as described above. Interestingly, we observed that full-length His₆-ERK3₃₆₅₋₇₂₁-GST protein now represents the major protein product after a single affinity chromatography step on glutathione-agarose (Fig. 2, middle panel). Thus, it is likely that the poor expression of GST-E3₃₆₅₋₇₂₁ fusion protein results from either premature translation termination or intrinsic instability of the protein. Using the pHGST.1 vector, we routinely obtained yields of 2 mg/l of full-length recombinant protein.

Finally, we also exploited the use of the pHGST vectors to purify the full-length ERK3 protein, a hard-to-express recombinant protein with a molecular weight of ~105 kDa. The entire coding sequence of ERK3 was amplified by PCR and ligated in frame into the EcoRI

site of pHGST.1, generating pHGST.1-E3₁₋₇₂₁. The His₆-ERK3-GST fusion protein was expressed in *E. coli* and purified by metal affinity chromatography as described in Fig. 2. Analysis by SDS-gel electrophoresis revealed the presence of multiple <100 kDa protein bands co-purifying with full-length His₆-ERK3-GST (~130 kDa), indicative of a large pool of C-terminal truncated ERK3 species (Fig. 2, right panel). When the same bacterial lysate was subjected to glutathione affinity chromatography, two major protein species were observed, including the full-length His₆-ERK3-GST, with much less truncated or degradation products. To further enrich for the full-length His₆-ERK3-GST protein, the bacterial extract was subjected to sequential purification on nickel-agarose and glutathione-agarose columns. As shown in Fig. 2 (right panel), this procedure yielded a highly purified ERK3 fusion protein.

E. coli is a very popular and convenient host for producing recombinant proteins. High-yield purifications are often observed with conventional expression systems. However, as observed in this study, protein truncation and degradation are major limitations (Fig. 2, left). The use of vectors allowing the expression of recombinant proteins flanked with two distinct tags greatly facilitates the affinity purification of full-length proteins. A number of dual-tag expression vectors have been introduced on the market. The pQE-100 DoubleTag vector from Qiagen generates a fusion proteins containing a N-terminal His₆ tag and C-terminal Tag-100 epitope. However, since the Tag-100 epitope is recognized only by a commercial monoclonal antibody, the purification of recombinant proteins with this system becomes relatively complex and expensive. The Novagen pET-41 and pET-42 series of expression vectors incorporate multiple tags including His₆, S-Tag and GST. In these two series of vectors, the His₆ affinity tag is placed at both ends of the recombinant protein, thus precluding efficient enrichment in full-length protein. The pHGST vectors were specifically designed for enhanced full-length expression of recombinant proteins. His₆ and GST were chosen as affinity tags because they are well characterized and allow the easy purification of fusion proteins by chromatography on immobilized metal- and glutathione-affinity supports. The insertion of the GST at the C-terminus of the protein of interest, instead of the usual N-terminal configuration of pGEX derivatives (1-3) was found to markedly decrease the amount of truncated species (see Fig. 2). In addition to ERK3, we now have used pHGST vectors to successfully purify other protein kinases and cell cycle regulators to high purity levels (data not shown), clearly demonstrating their general utility. We believe

that this set of vectors will prove useful to overcome the problem of inefficient expression of full-length recombinant proteins in *E. coli*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank G. Rodier and S. Pelletier for critically reading of the manuscript. P.C. is recipient of a fellowship from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). S.M. is an Investigator of the CIHR. This work was supported by a grant from the CIHR.

REFERENCES

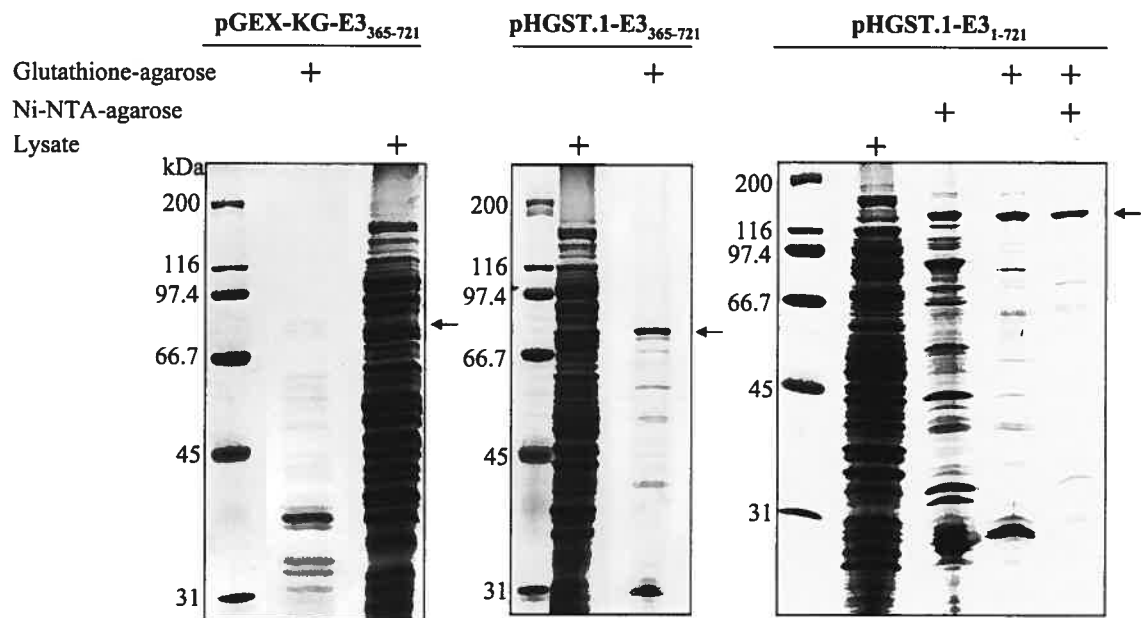
1. **Frangioni, J.V., and Neel, B.G.** 1993. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione *S*-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal. Biochem.* **210**: 179-187.
2. **Frorath, B., Abney, C.C., Berthold, H., Scanarini, M., and Northemann, W.** 1992. Production of recombinant rat interleukin-6 in *Escherichia coli* using a novel highly efficient expression vector pGEX-3T. *BioTechniques* **12**: 558-563.
3. **Guan, K., and Dixon, J.E.** 1991. Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: An improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione *S*-transferase. *Anal. Biochem.* **192**: 262-267.
4. **Kane, J.F.** 1995. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**: 494-500.
5. **Meloche, S., Beatty, B.G., and Pellerin, J.** 1996. Primary structure, expression and chromosomal locus of a human homolog of rat ERK3. *Oncogene* **13**: 1575-1579.
6. **Seow, H.F., Mucha, M.J., Hurst, L., Rothel, J.S., and Wood, P.R.** 1997. Expression of ovine interleukin-2 cDNA in *Escherichia coli*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **56**: 107-117.
7. **Thorner, J., Emr, S.D., and Abelson, J.N.** 2000. *in* *Methods in Enzymology*. Vol. **326**: Applications of chimeric genes and hybrid proteins. Part A: Gene expression and protein purification, Academic Press, Toronto.
8. **Yu, L., Deng, K., and Yu, C.** 1995. Cloning, gene sequencing, and expression of the small molecular mass ubiquinone-binding protein of mitochondrial ubiquinol-cytochrome *c* reductase. *J. Biol. Chem.* **270**: 25634-25638.

LEGENDS TO FIGURES

FIG. 1. The dual-tag pHGST prokaryotic expression vectors. **(A)** Schematic representation of pHGST vectors. T7, viral T7 RNA polymerase promoter; RBS, ribosome binding site; His₆, hexahistidine tag; MCS, multiple cloning site; GST, glutathione *S*-transferase from *Schistosoma japonicum*; pUC ori: origin of replication derived from pUC vectors; f1 ori, origin of replication derived from filamentous bacteriophage f1; Amp^R, β-lactamase. **(B)** Multiple cloning sites in the linker regions of pHGST.1 and pHGST.2T vectors. Note that pHGST.2T contains a recognition site for thrombin cleavage followed by a flexible linker for efficient GST removal.

FIG. 2. Expression and purification of full-length recombinant ERK3 fusion proteins using pHGST vectors. **Left panel**, pGEX-KG-E3₃₆₅₋₇₂₁ was transformed in *E. coli* BL21(DE3)pLysS strain. After overnight growth at 37 °C, the culture was diluted 50-fold in LB medium and grown at 37 °C for 2 h. The culture was cooled to room temperature and grown for another 2 h. Then, IPTG (200 μM) was added to the medium and the cells were grown overnight. The cells were harvested by centrifugation and resuspended in 50 ml TB buffer (PBS, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% sarcosyl) per liter of culture. Bacterial cells were lysed by four freeze/thaw cycles and sonication. The clarified lysate was then incubated with glutathione-agarose beads for 2 h at 4 °C. The beads were washed 4 times with PBS-1% Triton X-100. **Middle panel**, His₆-ERK3₃₆₅₋₇₂₁-GST was expressed and purified as described above. **Right panel**, His₆-ERK3-GST was expressed and purified as described above. For metal affinity chromatography, the bacterial lysate was diluted 2-fold in PBS-1% Triton X-100 supplemented with 15 mM imidazole, and then incubated with Ni-NTA-agarose beads for 2 h at 4 °C. The beads were washed as above. For sequential affinity purification, His₆-tagged proteins were eluted from Ni-NTA-agarose resin by incubation for 15 min in PBS-1% Triton X-100 containing 250 mM imidazole, and then incubated with glutathione-agarose beads as described above. Aliquots of lysates and purified proteins were separated by SDS-gel electrophoresis and visualized by Coomassie blue staining. Arrows indicate the position of full-length recombinant protein.

FIGURE 2



CHAPITRE 2:

Régulation de la MAPK ERK3 par le système ubiquitine protéasome

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Philippe Coulombe
BIM, biologie moléculaire

2. Description de l'article

Titre de l'article: "Rapid turnover of Extracellular signal-Regulated Kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of Mitogen-Activated Protein Kinase regulation during cellular differentiation"


Publié dans: "Molecular and Cellular Biology", Volume 23, pages: 4542-4558 (2003).

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Philippe Coulombe inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Régulation de la MAPK atypique ERK3 par le système ubiquitine-protéasome".

Dr Sylvain Meloche

Coauteur


Signature

Date

Dr Geneviève Rodier

Coauteur



Signature

Date

2006-4-23

Dr Stéphane Pelletier

Coauteur

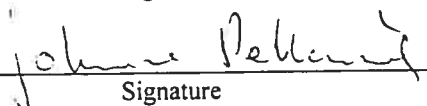

Signature

Date

2006-4-14

Johanne Pellerin

Coauteur


Signature

Date

2006-4-24

3.1. MISE EN SITUATION

L'activité enzymatique de ERK3 de même que sa régulation sont très peu caractérisées. Nous avons généré des vecteurs d'expression de mammifères afin de surexprimer cette kinase. De manière surprenante, nous avons remarqué que ERK3 ectopique est très faiblement exprimée. Cette faible expression est due à une instabilité métabolique. Par une combinaison d'approches génétiques, biochimiques et pharmacologiques, nous avons identifié le système ubiquitine-protéasome comme étant responsable de la dégradation de ERK3. La forme endogène de ERK3 se comporte de manière identique. ERK3 est ainsi la première MAP kinase étant régulée de cette manière. Peu de temps après notre publication, le groupe de Marsha Rich Rosner a montré que la MAPK atypique ERK7 est elle aussi dégradée par le système ubiquitine-protéasome (398).

Une série de chimères entre la MAPK ERK1 (stable) et ERK3 (instable) a révélé la présence de deux dégrons dans le N-terminal de ERK3. La dégradation de ERK3 est constitutive dans les cellules en prolifération. Durant la différenciation neuronale et musculaire, ERK3 s'accumule, en partie par une diminution de sa dégradation. Finalement, l'expression de mutants stables de ERK3 induit un arrêt du cycle cellulaire. Ces résultats indiquent que ERK3 est régulée de manière différente des autres MAPK.3.2.

ARTICLE 2:


Rapid Turnover of Extracellular Signal-Regulated Kinase 3 by the Ubiquitin-Proteasome Pathway Defines a Novel Paradigm of Mitogen-Activated Protein Kinase Regulation during Cellular Differentiation

**Philippe Coulombe^{1,2}, Geneviève Rodier¹, Stéphane Pelletier^{1,3}, Johanne Pellerin¹,
and Sylvain Meloche^{1,2,3} ***

¹ Institut de recherches cliniques de Montréal and Departments of ²Molecular Biology and ³Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada H2W 1R7

Manuscript information: Abstract: 215 words
Total length: 67,405 characters (incl. spaces)
Materials and Methods: 1,677 words
Introduction, Results and Discussion section: 4,691 words

Running title: ERK3 regulation by the ubiquitin/proteasome pathway

* Corresponding author: Dr. Sylvain Meloche
Institut de recherches cliniques de Montréal
110 Pine Avenue West
Montreal (Quebec) H2W 1R7
Canada
Tel.: (514) 987-5783
Fax: (514) 987-5536


Article publié dans: **Molecular and Cellular Biology**, Volume 23, p. 4542-4558 (2003).

ABSTRACT

MAP kinases are stable enzymes that are mainly regulated by phosphorylation and subcellular targeting. Here we report that ERK3, unlike other MAP kinases, is an unstable protein that is constitutively degraded in proliferating cells with a half-life of 30 min. The proteolysis of ERK3 is executed by the proteasome and requires ubiquitination of the protein. Contrary to other protein kinases, the catalytic activity of ERK3 is not responsible for its short half-life. Instead, analysis of ERK1/ERK3 chimeras revealed the presence of two destabilization regions (NDR1 and 2) in the N-terminal lobe of ERK3 kinase domain that are both necessary and sufficient to target ERK3 and heterologous proteins for proteasomal degradation. To assess the physiological relevance of the rapid turnover of ERK3, we monitored the expression of the kinase in different cellular models of differentiation. We observed that ERK3 markedly accumulates during differentiation of PC12 and C2C12 cells into the neuronal and muscle lineage, respectively. The accumulation of ERK3 during myogenic differentiation is associated with the time-dependent stabilization of the protein. Terminal skeletal muscle differentiation is accompanied by cell cycle withdrawal. Interestingly, we found that expression of stabilized forms of ERK3 causes G₁ arrest in NIH 3T3 cells. We propose that ERK3 biological activity is regulated by its cellular abundance through the control of protein stability.

INTRODUCTION

Protein kinases are signaling molecules whose activity must be tightly regulated. Indeed, deregulation of protein kinase expression and/or activity has been implicated in various human diseases such as cancer (11), insulin resistance syndromes (19), inflammatory disorders (21,22) and congenital malformations (53). The activity of protein kinases is controlled by multiple mechanisms that include extracellular ligands, second messengers, phosphorylation, subcellular localization, protein-protein interactions and regulated proteolysis.

Mitogen-activated protein (MAP) kinases are among the most intensively studied families of protein kinases. These evolutionary conserved enzymes have been shown to participate in pathways controlling embryogenesis, cell proliferation, differentiation, cell survival, and adaptation (4,23,38,55). All the MAP kinases characterized so far are stable proteins whose expression is generally not limiting for activity. The biological activity of MAP kinases is mainly regulated by their phosphorylation state and subcellular localization (8,47). MAP kinases are enzymatically activated by phosphorylation of two residues within the activation loop motif Thr-Glu-Tyr, catalyzed by a family of dual-specificity protein kinases (37). The amplitude and duration of MAP kinase activation, which are controlled by the activity of MAP kinase kinases and phosphatases, play an important role in determining the final biological response (25,29). The targeting of MAP kinases to specific subcellular locations is also a key determinant of their biological activity (3,25,43).

Extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3) was cloned originally by virtue of its homology to the MAP kinase ERK1 (2). The ERK3 protein is nearly 50% identical to ERK1/2 in the kinase domain and has similar lengths of inserts between conserved subdomains, indicating that ERK3 belongs to the MAP kinase family of protein kinases (2,27,57). However, ERK3 presents structural features that are distinct from other MAP kinases. Notably, ERK3 displays the sequence Ser-Glu-Gly instead of the highly conserved Thr-Xaa-Tyr motif in the activation loop. Moreover, ERK3 has a unique C-terminal extension that is absent in classical MAP kinases. The impact of these features on ERK3 function is unknown.

The physiological functions of ERK3 remain to be established. *ERK3* mRNA is detected in every adult tissues examined, although the relative levels of expression vary considerably between tissues (2,52). Interestingly, expression of *ERK3* mRNA is acutely regulated during mouse development, suggesting a possible role of the kinase during embryogenesis (52). Another study reported that *ERK3* mRNA is upregulated during *in vitro* differentiation of P19 embryonal carcinoma cells toward the neuronal or muscle lineage (2). However, nothing is known about the regulation of ERK3 protein and kinase activity. Here we report that, unlike other MAP kinases, ERK3 is an unstable protein that is rapidly and constitutively degraded by the ubiquitin-proteasome pathway in exponentially proliferating cells. Neither kinase activity nor the C-terminal extension of ERK3 is required for the high turnover of the enzyme. Instead, we have identified two degradation domains in the N-terminal lobe of the kinase that are both necessary and sufficient to target ERK3 for ubiquitination and degradation by the proteasome. Importantly, we show that ERK3 half-life increases during muscle differentiation, leading to accumulation of the protein. We also show that expression of stabilized forms of ERK3 inhibits S phase entry in fibroblasts. We propose that ERK3 biological activity is mainly controlled by regulated protein turnover.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and antibodies

MG-132 and lactacystin were obtained from Biomol and Boston Biochem, respectively. E-64 and Z-VAD-FMK were supplied by Calbiochem. Leupeptin was from ICN. 5-bromo-2-deoxy-uridine (BrdU) was from Roche Diagnostics. Nerve growth factor 2.5S was from Invitrogen. Commercial antibodies were obtained from the following suppliers: polyclonal anti-ERK3 (sc-156), anti-Cdk2 (sc-163) and polyclonal anti-Myc (Santa-Cruz Biotechnology); monoclonal antibody (mAb) anti-p21 (PharMingen); polyclonal anti-green fluorescent protein (GFP) (Affinity BioReagents); biotinylated goat anti-rabbit IgG and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin (Vector Laboratories); HRP-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit IgG (Biorad); monoclonal anti-BrdU (Calbiochem); fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated donkey anti-rabbit and rhodamine-conjugated donkey anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch). MAb 12CA5 to influenza HA was a gift from M. Dennis (SignalGene). Anti-Myc mAb was prepared in-house from 9E10 hybridoma producing cells. Polyclonal antibody to the C-terminus of ERK3 (E3-CTE4) was obtained by immunization of rabbits with purified His₆-E3₃₆₅₋₇₂₁-glutathione *S*-transferase (GST) fusion protein expressed in *E. coli* (7). The ERK3 phospho-Ser189-specific antibody was generated in collaboration with Cell Signaling Technology by immunizing rabbits with the synthetic phospho-Ser189 peptide CSHKGHL(p)SEGLVTKW coupled to keyhole limpet haemocyanin. The antibody was purified by protein A and peptide affinity chromatography.

Plasmid constructs and mutagenesis

All recombinant ERK3 DNA constructs were derived from the human cDNA sequence (27). Point mutations were introduced into ERK3 cDNA using the Altered Sites *in vitro* mutagenesis system (Promega). pcDNA3-HA was constructed by inserting the HA sequence from pcDNA I NEO (28) into the HindIII/EcoRI sites of pcDNA3 (Invitrogen Life Technologies). pcDNA-HA-ERK1 was constructed by subcloning the coding sequence of hamster ERK1 (28) into EcoRI-digested pcDNA3-HA. pcDNA-HA-ERK3 was constructed by first inserting an EcoRI site at the initiator ATG codon of ERK3 cDNA by site-directed mutagenesis, followed by subcloning of the ERK3 coding sequence into the

EcoRI site of pcDNA3-HA. Expression vectors for HA-tagged p38 β 2 (J. Han, Scripps Research Institute) and JNK2 (J. Woodgett, Ontario Cancer Institute) were constructed by amplifying the respective coding sequences by PCR, followed by subcloning into the EcoRI/XbaI (p38 β 2) or XhoI/XbaI (JNK2) sites of pcDNA3-HA. pREP10-HA-ERK5 was kindly provided by C. Prody (University of Toronto). The K49A/K50A (KD) and S189A mutants of ERK3 were obtained by site-directed mutagenesis and subcloned into pcDNA3-HA vector. HA-ERK3₁₋₃₆₅ Δ was generated by PCR using pcDNA3-HA-ERK3 as template and subcloned into the EcoRI/XbaI sites of pcDNA3. To construct the GST-tagged ERK3 expression vector, the GST coding sequence from pGEX-KG (13) was amplified by PCR and inserted into the EcoRI/XbaI sites of pcDNA3-HA to generate pcDNA3-HA-GST; the coding sequence of ERK3 wild-type and S189A was then amplified by PCR to remove the stop codon and subcloned into the EcoRI site of pcDNA3-HA-GST. pcDNA3-HA-ERK1-GST was constructed similarly by subcloning the PCR amplified ERK1 coding sequence into the EcoRI site of pcDNA3-HA-GST. Retroviral expression vectors for HA-ERK1 and HA-ERK3 were constructed by subcloning the inserts into the BamHI/EcoRI sites of pBabe-puro (30). pMT 123 vector encoding HA-tagged ubiquitin was kindly provided by Dirk Bohmann (51). To generate chimeras between ERK1 and ERK3, specific regions of the two proteins were amplified by PCR while introducing restriction sites that allow conservation of the reading frame. The two inserts were then ligated simultaneously into pcDNA3-HA vector. To construct expression vectors for EGFP fusion proteins, the EGFP coding sequence from pEGFP-C2 (Clontech) was amplified by PCR and inserted into the EcoRI/XbaI sites of pcDNA3-HA to generate pcDNA3-HA-EGFP; the coding region of ERK3₁₋₃₆₅ or ERK3₁₋₁₁₂ was then amplified by PCR and subcloned into the EcoRI site of pcDNA3-HA-EGFP. pcDNA3-HA-ERK1-EGFP and pcDNA3-HA-ERK1₁₋₁₁₆-EGFP were constructed using a similar strategy. Myc₆-EGFP was constructed by inserting EGFP into EcoRI/XbaI of pCS3MT (gift of Andrew Jan Waskiewicz). To construct the bicistronic expression vector, poliovirus IRES (40) and Myc₆-EGFP were amplified by PCR and cloned into XbaI/ApaI digested-pcDNA3 generating pcDNA3-IRES-EGFP. The indicated coding sequences were then subcloned into the HindIII/EcoRI sites of pcDNA3-IRES-EGFP. All mutations were confirmed by DNA sequencing. Sequence of the primers used for PCR and details about the cloning strategies are available upon request.

Cell culture, transfections and infections

Human embryonic kidney 293 cells were cultured in minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum plus antibiotics. COS-7, Balb/c 3T3 and NIH 3T3 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10 % calf serum and antibiotics. Rat1 cells were cultured and transfected as described (46). PC12 cells were maintained on poly-L-lysine-coated dishes in DMEM containing 10% heat-inactivated horse serum, 5% fetal bovine serum, and antibiotics. To induce neuronal differentiation, PC12 cells were plated on collagen type VII (Sigma) and stimulated with NGF (100 ng/mL) for the times indicated. C2C12 myoblasts were cultured in DMEM supplemented with 20% fetal bovine serum and antibiotics (growth medium (GM)). Muscle differentiation of C2C12 cells was induced by replacing GM medium with differentiation medium (DM; DMEM, 10 mM HEPES, pH 7.4, 2% calf serum) when cells reached confluence.

HEK 293 cells were transiently transfected by the calcium phosphate precipitation method with 6-9 μg of plasmid DNA per 60-mm dish. Cells were harvested 48 h post-transfection unless otherwise indicated. COS-7 and NIH 3T3 cells were transfected using the LipofectAMINE reagent according to the manufacturer's specifications (Invitrogen). Retroviral infection of A31 and *ts20* cells was performed using the pCL-Ampho packaging vector (Imgenex Corporation). Briefly, HEK 293 cells were co-transfected with pBabe-puro constructs and pCL-Ampho. After 48 h, the virus-containing medium was collected, supplemented with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polybrene (Sigma), and incubated with sub-confluent A31 or *ts20* cells for 24 h at 34°C (permissive temperature). The medium was changed and after an additional period of 24 h, infected *ts20* and A31 cells were selected for 2 days in complete medium containing 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin, respectively. The cells were either kept at 34°C or shifted to 39°C for the indicated times.

Immunoblot analysis, immunoprecipitation and immunofluorescence

Cell lysis, immunoprecipitation and immunoblot analysis was performed as described previously (49). The concentration of primary antibodies used for immunoblotting was: anti-HA mAb 12CA5 (1:2,500); commercial anti-ERK3 antibody (1:1,000); E3-CTE4 serum (1:1,000); anti-GFP antibody (1:1,000); anti-phospho-ERK3(S189) (1:1000). For detection of ectopically expressed ERK3 constructs, cell lysates (750 μg protein) were

subjected to immunoprecipitation with 2 μ l of anti-HA mAb pre-adsorbed on protein A-Sepharose beads. Immunoprecipitated proteins were resolved by SDS-gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes. The blocked membrane was first incubated for 1 h with anti-ERK3 or anti-GFP primary antibody. After extensive washing, the membrane was incubated for 1 h with biotinylated anti-rabbit IgG (1:700) followed by a third incubation of 1 h with HRP-conjugated streptavidin (1:20,000). Immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence. For detection of Ser189-phosphorylated ERK3, GST-tagged or endogenous ERK3 protein was isolated from cell extracts (750 μ g protein) by glutathione-agarose pull down or immunoprecipitation with antibody E3-CTD4, respectively. Precipitated proteins were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and analyzed by immunoblotting.

For BrdU incorporation studies, NIH 3T3 were seeded at 40,000 cells/well onto poly-L-lysine coated glass coverslips placed in 6-well-plates, and transfected with expression plasmids (1 μ g DNA) using LipofectAMINE reagent. After 24 h, the cells were serum-starved for 24 h and stimulated with 10% serum for 20 h in the presence of 10 μ M BrdU. The cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde/PBS for 20 min at 37°C. After quenching in 0.1M glycine for 5 min, the cells were permeabilized by incubation in 0.1% Triton X-100 for 5 min at room temperature. Non-specific sites were blocked in PBS, 1% bovine serum albumin for 60 min at 37°C. The transfected proteins were detected by staining with anti-Myc as primary antibody and FITC-conjugated anti-rabbit IgG as secondary reagent. Then, DNA was denatured with HCl 2 N for 10 min at room temperature. Staining for BrdU incorporation was performed by incubating cells for 1 h at 37°C with anti-BrdU antibody, followed by incubation with rhodamine-conjugated anti-mouse IgG as secondary reagent. DAPI staining was performed to visualize the nuclei. Cell samples were analyzed by fluorescence microscopy (Leica DM RB). The results are expressed as the percentage of transfected cells showing nuclear labeling for BrdU.

***In vivo* ubiquitination assay**

HEK 293 cells were co-transfected with expression vectors for HA-ERK3-GST (4 μ g) and HA-ubiquitin (2 μ g). After 48 h, the cells were treated with 25 μ M MG-132 for 12 h. The cells were lysed in Triton X-100 lysis buffer supplemented with 10 mM N-ethyl maleimide (NEM; Sigma), and the clarified lysates were further incubated for 10 min with 2.5 mM

dithiothreitol to quench any free NEM. Cell lysates (750 μg protein) were then incubated for 2 h at 4°C with 20 μl of glutathione-agarose resin. The bound proteins were washed 4 times in lysis buffer and resolved by SDS-gel electrophoresis. Ubiquitin-containing conjugates were detected by immunoblotting with mAb 12CA5 as described.

Biosynthetic labeling experiments and *in vitro* translation

Biosynthetic labeling experiments were carried out as described previously (49). To assess the rate of biosynthesis of HA-ERK1 and HA-E3₁₋₇₃-E1₈₇₋₃₆₉, transfected HEK 293 cells were starved of methionine/cysteine for 30 min. Then, ³⁵S-labeled methionine/cysteine (300 $\mu\text{Ci/ml}$) was added to the medium and the cells were incubated for 5 min at 37°C. The cells were lysed in Triton X-100 lysis buffer and HA-tagged proteins were immunoprecipitated as described above. The labeled proteins were separated by SDS-gel electrophoresis and detected by fluorography. To determine the turnover rate of HA-ERK1 and HA-E3₁₋₇₃-E1₈₇₋₃₆₉ proteins, transfected HEK 293 cells were pulse-labeled for 2 h at 37°C with 100 $\mu\text{Ci/ml}$ of ³⁵S-labeled methionine/cysteine, and then chased for the indicated times in complete medium containing 100 $\mu\text{g/ml}$ methionine and 150 $\mu\text{g/ml}$ cysteine. Labeled HA-tagged proteins were detected as described. *In vitro* transcription/translation was performed using TNT Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) according to the manufacturer's instructions. The reaction products were detected by fluorography using Amplify (Amersham).

Statistical analysis

The results are expressed as the mean \pm SEM. Statistical significance between experimental groups was determined by one-way ANOVA followed by Bonferroni analysis using Graph Pad Software version 2.01. *p* values lower than 5% were considered significant.

Modelling of ERK3 structure

The ternary structure of ERK3 was modeled using the SWISS-MODEL server (14,39), based on the structure of unphosphorylated rat ERK2 protein (pdb number 1ERK_) (56). The model contains amino acids 3 to 346 of human ERK3.

RESULTS

ERK3 is a highly unstable protein

To get insights into the regulation of ERK3, we constructed several expression vectors encoding N-terminal hemagglutinin (HA)-tagged human ERK3 cDNA. The constructs were transiently transfected into HEK 293 cells and the expression of ERK3 was analyzed by immunoblotting with anti-HA antibody. Surprisingly, the expression of ERK3 (apparent molecular mass 105 kDa) was undetectable in HEK 293 cells, whereas similar constructions of the other MAP kinase family members ERK1, p38 β 2, JNK2 and ERK5 yielded high protein levels (Fig. 1A). The failure to ectopically express ERK3 was also observed in other cell types, such as Rat1, COS-7, NIH 3T3 or BHK cells (data not shown). Identical results were obtained using the mouse ERK3 cDNA (data not shown). *In vitro* transcription/translation of ERK3 expression vector in the presence of ^{35}S -methionine confirmed the integrity of the plasmid and showed that ERK3 and ERK1 constructs are translated with comparable efficiency (Fig. 1B). We also tested the possibility that ERK3 might be present in the insoluble fraction obtained from the cell lysis procedure. However, no expression of ERK3 could be detected in either the soluble or insoluble fraction of transfected HEK 293 cells (data not shown). Notably, the overexpressed ERK1 protein was found in both fractions.

One possible explanation for the above findings is that ectopically expressed ERK3 is rapidly degraded in cells. To test this hypothesis, we measured the half-life of ectopic ERK3 after shutting off protein synthesis with cycloheximide. In order to detect the expression of HA-tagged ERK3, the protein was enriched by immunoprecipitation with anti-HA monoclonal antibody (mAb), followed by immunoblotting analysis with a commercial polyclonal antibody to ERK3 coupled to a biotin-streptavidin amplification system. Using this sensitive approach, HA-ERK3 was detected in transfected HEK 293 cells as a ~ 105-kDa band (Fig. 1C). Cycloheximide-chase experiments indicated that HA-ERK3 is a highly unstable protein with a half-life of approximately 30 min in exponentially growing HEK 293 cells (Fig. 1C, upper panel). By contrast, HA-ERK1 has an apparent half-life greater than 2 h (Fig. 1C, lower panel). We also tried to determine the half-life of HA-ERK3 by pulse-chase analysis, but the level of expression was too low to yield a detectable signal (data not shown).

To confirm that the observed instability of HA-ERK3 is an intrinsic property of the protein, we generated a rabbit polyclonal antibody against the C-terminus of ERK3 (E3-CTE4). This antibody detects an endogenous protein of 105 kDa in HEK 293, NIH 3T3, Rat1, HeLa and Balb/c 3T3 cell lysates (Fig. 1D and data not shown). Incubation of the antiserum with the immunogen ERK3 C-terminus fusion protein, but not with ERK3 N-terminus, completely abolishes the immunoreactivity, thus confirming the specificity of the antibody (Fig. 1D). By cycloheximide-chase, we found that endogenous ERK3 is also unstable with a half-life comparable to that measured for transfected HA-ERK3 (Fig. 1E).

ERK3 is ubiquitinated *in vivo* and is degraded by the 26S proteasome

We used various pharmacological inhibitors to address the role of known proteolytic systems in mediating the observed rapid ERK3 degradation. Two inhibitors of the proteasome, the peptide-aldehyde MG-132 (45) and the Streptomyces metabolite lactacystin (9), were found to significantly increase the steady-state level of transfected ERK3 (Fig. 2A, upper panel). In contrast, inhibitors of cathepsins (E-64 and leupeptin), calpains (E-64), or caspases (Z-VAD-FMK) had no effect on HA-ERK3 expression. No change in the abundance of HA-ERK1 protein was observed under these conditions (Fig. 2A, lower panel). Similarly, treatment of HEK 293 cells with MG-132 or lactacystin resulted in the accumulation of endogenous ERK3 protein as revealed by immunoblot analysis (Fig. 2B). Cycloheximide-chase experiments confirmed that proteasome inhibitors act by increasing ERK3 stability. The half-life of ERK3 increased from 30 min to greater than 2 h upon MG-132 treatment (Fig. 2C). These results indicate that ERK3 is actively degraded by the proteasome.

Efficient degradation of proteins by the proteasome generally requires the conjugation of multiple molecules of ubiquitin to the substrate (17,18). We thus sought to determine whether ERK3 is ubiquitinated *in vivo*. To this end, we engineered C-terminal GST-tagged versions of HA-ERK3 and HA-ERK1 as a mean to specifically purify the kinases from cell extracts. *In vitro* translation experiments confirmed that the GST-tagged ERK3 and ERK1 constructs are translated with similar efficiency (Fig. 3A, left panel). However, when the two constructs were transfected into HEK 293 cells, no detectable expression of ERK3-GST could be observed using standard immunoblotting conditions, whereas ERK1-GST

was expressed to high levels (Fig. 3A, middle panel). The weak expression of ERK3-GST was detected using a biotin-streptavidin amplification system (data not shown). To verify the *in vivo* ubiquitination status of ERK3, HEK 293 cells were co-transfected with ERK3-GST and HA-tagged ubiquitin followed by treatment with MG-132. The GST fusion kinases were then purified from cellular extracts and analyzed by anti-HA immunoblotting. High-molecular weight immunoreactive species were detected only in cells transfected with both ERK3-GST and HA-ubiquitin, and not in cells transfected with ERK1-GST (Fig. 3A, right panel). These results strongly suggest that ERK3 is polyubiquitinated *in vivo*.

In rare cases, such as p21^{Cip1} (50), ubiquitination is not necessary for proteasomal degradation. To test the importance of ubiquitin conjugation in targeting ERK3 to the proteasome, we used the *ts20* cell line that harbors a temperature-sensitive allele of the ubiquitin-activating enzyme E1 (6). For these experiments, *ts20* and parental A31 cells were infected with retroviruses encoding HA-ERK3 or HA-ERK1. As shown in Fig. 3B (upper panel), the ectopic HA-ERK3 protein significantly accumulated when *ts20* cells were shifted to the nonpermissive temperature (39°C), whereas no change in expression was observed in A31 cells expressing a normal E1. In contrast, the expression of HA-ERK1 was unaffected by inactivation of E1 at the nonpermissive temperature (Fig. 3B, lower panel). The steady-state level of endogenous ERK3 expression also markedly increased when *ts20* cells were incubated at 39°C (Fig. 3C, upper panel). No temperature-dependant upregulation of ERK3 was observed in A31 cells. To unambiguously demonstrate that the increase of endogenous ERK3 expression observed at the restrictive temperature results from stabilization of the protein, we measured its half-life by cycloheximide-chase experiments. The half-life of ERK3 increased from approximately 30 min at 34°C to more than 2 h at 39°C (Fig. 3C, lower panel). We conclude from these results that a functional ubiquitin-conjugating system is required for efficient degradation of ERK3 by the proteasome.

Ser189 phosphorylation, kinase activity and C-terminal extension of ERK3 are not involved in its constitutive degradation

We next carried out experiments to identify signals in ERK3 that are important for degradation. ERK3 displays the sequence S¹⁸⁹EG in its activation loop instead of the conserved TXY motif. In agreement with previous findings (5), we observed by *in vivo*

labeling experiments that ERK3 is phosphorylated on Ser189 in living cells (P. Coulombe and S. Meloche, unpublished data). To further study the regulation of ERK3 phosphorylation on Ser189, we developed a phospho-specific antibody to this residue. The specificity of the antibody is illustrated in Fig. 4A, which confirms that ERK3 is phosphorylated on Ser189 in proliferating HEK 293 cells. We next evaluated the impact of Ser189 phosphorylation on ERK3 degradation. No change in the steady-state level of ERK3 expression was observed for the S189A mutant, suggesting that activation loop phosphorylation does not influence ERK3 stability (Fig. 4, A-C). To investigate the contribution of ERK3 kinase activity on its stability, we generated a catalytically inactive mutant by changing two lysine residues present in subdomain II to alanine (KD, kinase-dead). Transient transfections into HEK 293 cells showed that ERK3 KD is expressed at levels similar to the wild-type protein (Fig. 4, B and C). This suggests that the kinase activity of ERK3 is not required for the high turnover rate of the protein.

ERK3 possesses a unique C-terminal extension that is not found in ERK1 or other classical MAP kinases. We therefore tested the hypothesis that sequences contained within this region might have a role in regulating ERK3 stability. As shown in Fig. 4C, deletion of the C-terminal extension of ERK3 (ERK3₁₋₃₆₅Δ) did not increase its expression to detectable levels. *In vitro* assays confirmed that the deletion mutant of ERK3 was translated efficiently (Fig. 4D). These results argue that the major determinants of ERK3 stability are contained within the first 365 amino acids of the kinase.

Mapping of the regions conferring ERK3 instability

To identify the regions that target ERK3 for rapid degradation, we generated a series of chimeras between ERK1 (E1) and ERK3 (E3) (Fig. 5A). These chimeric constructs were subcloned into pcDNA3-HA vector and transiently expressed in HEK 293 cells. We found that a chimera containing the first 73 amino acids of ERK3 was expressed at low level compared to ERK1 or to a chimera containing amino acids 318 to 365 of ERK3 (Fig. 5B, upper panel). Although no difference was observed in the *in vitro* translation rates of the constructs (Fig. 5B, lower panel), it is still possible that the weak expression of the chimera containing the N-terminal region of ERK3 is due to a reduction in *de novo* biosynthesis. To exclude this possibility, pulse labeling experiments were performed in transfected cells.

The results clearly indicated that the rate of synthesis of HA-E3₁₋₇₃-E1₈₇₋₃₆₉ was similar to that of HA-ERK1 (Fig. 5C). Thus, the N-terminal region of ERK3 must regulate the turnover of the protein. Indeed, pulse-chase experiments confirmed that the half-life of HA-E3₁₋₇₃-E1₈₇₋₃₆₉ (1.2 h) is more than 15-fold less than that of HA-ERK1 (> 20 h) (Fig. 5D). This difference is likely responsible for the marked differences in steady-state levels of the proteins observed by immunoblotting. In a complementary experiment, we replaced the first 199 amino acids of ERK3 by the equivalent residues of ERK1. Although wild-type HA-ERK3 and HA-E1₁₋₂₀₁-E3₁₉₉₋₇₂₁ were translated with comparable efficiency *in vitro*, the HA-E1₁₋₂₀₁-E3₁₉₉₋₇₂₁ chimera is expressed to much higher levels than HA-ERK3 when transiently transfected into HEK 293 cells (Fig. 5E). This enhanced expression results from the stabilization of the protein. As revealed by cycloheximide-chase experiments, the HA-E1₁₋₂₀₁-E3₁₉₉₋₇₂₁ chimera has a half-life of 4 to 6 h, which is at least 8 times longer than wild-type ERK3 (Fig. 5F). These data indicate the presence of a functional degradation domain in the N-terminal extremity of ERK3.

To define more precisely this degradation domain, we constructed additional chimeras between ERK1 and ERK3. We first engineered ERK1 chimeras containing N-terminal ERK3 sequences of increasing length (Fig. 6A). Substitution of the first 15 or 38 amino acids of ERK1 by the equivalent residues of ERK3 resulted in a 2-3-fold reduction in protein expression. This finding suggests the presence of a destabilization signal in the first 15 amino acids of ERK3. A chimeric kinase containing the first 73 amino acids of ERK3 was expressed 4 to 6-fold less than the HA-E3₁₋₃₈-E1₅₁₋₃₆₉ chimera, thereby indicating the presence of an additional destabilization signal located between residues 38 and 73 of ERK3. A chimeric protein containing the N-terminal 177 amino acids of ERK3 was expressed at levels comparable to HA-E3₁₋₇₃-E1₈₇₋₃₆₉ chimera. Expression of HA-ERK3₁₋₃₆₅Δ was barely detectable under these conditions. In the complementary approach, we generated ERK3 chimeras containing N-terminal sequences of ERK1 (Fig. 6B). Chimeras containing the first 19 or 64 amino acids of ERK1 were expressed at similar levels and were slightly stabilized as compared to HA-ERK3₁₋₃₆₅Δ. This is consistent with the loss of a destabilization signal present in the very first amino acids of ERK3. Substitution of the first 81 or 198 amino acids of ERK3 by the corresponding sequences of ERK1 further stabilized the protein yielding expression levels that were 4 to 6 times higher than HA-E1₁₋₆₄-E3₅₃₋₃₆₅

chimera. These last results confirm the existence of a second destabilization motif present between residues 53 and 82 of ERK3. Notably, the destabilization regions identified by these two independent series of chimeras were found to overlap (Fig. 6, A and B). Because of their critical role in regulating ERK3 protein stability, these two regions were named N-terminal Degradation Region 1 and 2 (NDR1/2).

To further analyze the NDR1 and NDR2, we generated a structural model of ERK3₁₋₃₆₅Δ based on the X-ray crystal structure of unphosphorylated ERK2 (see Materials and Methods). In this theoretical model comprising amino acids 3 to 346 of ERK3, the enzyme adopts a structure highly similar to that of ERK2 with a N-terminal lobe rich in beta strands and a C-terminal lobe rich in alpha helices (Fig. 6C). The predicted structure of ERK3 reveals that the two degradation regions identified by chimera analysis are both found within ERK3 N-terminal lobe. Interestingly, the NDR1 and NDR2 are located on the same side of the molecule (Fig. 6C, highlighted in yellow). A surface representation of ERK3 structure clearly shows that NDR1 and NDR2 are juxtaposed and could define a putative interaction domain (Fig. 6D).

The N-terminal lobe of ERK3 is sufficient to target proteins for proteasomal degradation

The results presented above suggest that NDR1/NDR2 form a transferable degradation signal that is independent of the kinase C-terminal lobe. To test this hypothesis, we constructed fusion proteins between ERK3 and the stable heterologous protein EGFP (Fig. 7A). Immunoblot analysis indicated that EGFP alone is expressed at high levels in transfected HEK 293 cells (Fig. 7B). Addition of the first 365 amino acids of ERK3 to EGFP almost completely abolished expression of the fusion protein, whereas the equivalent fusion of ERK1 had no significant effect. Fusion of only the N-terminal lobe of ERK3 (residues 1-112) was sufficient to downregulate EGFP expression, while the equivalent sequence in ERK1 had little effect. Cycloheximide-chase experiment confirmed that the N-terminal lobe of ERK3 increases the degradation rate of EGFP. The E3₁₋₁₁₂-EGFP fusion protein has a half-life of less than 30 min in transfected cells as compared to a half-life of more than 2 h for E1₁₋₁₁₆-EGFP hybrid protein (Fig. 7D). Results with pharmacological inhibitors indicated that the N-terminal lobe of ERK3 targets proteins for degradation by

the proteasome. Indeed, treatment with MG-132 and lactacystin increased the steady-state level of E3₁₋₁₁₂-EGFP, while E-64 had no effect (Fig. 7E). Under these conditions, the expression of E1₁₋₁₁₆-EGFP was not significantly modified by these protease inhibitors. These results demonstrate that the N-terminal lobe of ERK3 is a transferable degradation signal that is sufficient to efficiently target proteins to the proteasome.

ERK3 is stabilized and accumulates to high levels during muscle differentiation

To establish the physiological relevance of the short half-life of ERK3, it is important to identify stimuli that cause the accumulation of the kinase in cells. To address this question, we first examined the expression of ERK3 in growth-arrested and proliferating cells. No change in the steady-state levels of endogenous ERK3 protein could be observed during cell cycle progression (data not shown). Treatment with DNA damaging agents, CoCl₂ (hypoxia-mimetic) or tumor necrosis factor α had no effect either on ERK3 turnover.

Because of the importance of MAP kinase pathways in cell differentiation and lineage commitment (23,38,54), we also monitored the expression of ERK3 in different cellular models undergoing differentiation. The pheochromocytoma cell line PC12 differentiates into a sympathetic neuron-like phenotype, characterized by neurite outgrowth and other cellular changes (12), in response to neurotrophic factors (Fig. 8A). C2C12 is a myogenic cell line derived from muscle satellite cells (1) that form post-mitotic, multinucleated myotubes when grown in low serum (Fig. 8B). In both of these cellular models, differentiation was accompanied by a dramatic and time-dependent accumulation of ERK3 protein (Fig. 8, C and D). In C2C12 cells, ERK3 upregulation paralleled that of the cell cycle inhibitor p21^{Cip1}, a marker of skeletal muscle differentiation (15,36) (Fig. 8D). Most importantly, cycloheximide-chase experiments revealed that ERK3 accumulation results in large part from its time-dependent stabilization during the differentiation process. The half-life of ERK3 changed from ~15 min in undifferentiated C2C12 myoblasts to 1 h by the fifth day of differentiation to more than 2 h in fully differentiated cells (Fig. 8E). Immunoblot analysis with anti-phospho-ERK3(S189) specific antibody indicated that ERK3 is phosphorylated in the activation loop in differentiated C2C12 cells, suggesting that the kinase is active.

Expression of stabilized forms of ERK3 inhibits S phase entry

Cellular differentiation is accompanied by cell cycle arrest in the G1 phase. We thus evaluated the impact of ERK3 expression on cell cycle progression. For these experiments, we constructed a bicistronic vector expressing Myc-tagged EGFP downstream of the poliovirus IRES to enable detection of transfected cells (Fig. 9A). Transfected NIH 3T3 fibroblasts were synchronized in G0 by serum starvation, and then stimulated with serum in the presence of BrdU to monitor S phase entry. As expected, overexpression of p27^{Kip1}, used as control, strongly inhibited entry of cells into S phase (Fig. 9B) (42). Under these conditions, ectopically expressed wild-type ERK3 had little effect on cell cycle progression (Fig. 9, B and C). Using the information gained from our chimera analysis, we next tested the effect of stabilized forms of ERK3 (see Fig. 6B). Two chimeric constructs were made in which part of ERK3 N-terminal lobe is replaced by the corresponding ERK1-derived sequences (Fig. 9A). Immunoblot analysis confirmed that the two chimeric proteins are expressed at high levels compared to wild-type ERK3 (Fig. 9D). Ectopic expression of the stabilized forms of ERK3 markedly decreased the number of BrdU-positive cells (Fig. 9, B and C). No morphological change typical of apoptosis or cell death was observed under these conditions. These results suggest that ERK3 can act as a negative regulator of G1 phase progression.

DISCUSSION

Regulated intracellular proteolysis is now recognized as a versatile and efficient mechanism to control gene expression. The regulation of protein turnover can have a significant impact on the activity of the corresponding target gene and is associated with either a decrease or an increase in protein stability. For example, the inhibitors of NF- κ B (I κ B) and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} are expressed to high levels in resting cells, but are rapidly degraded in response to cytokines or cell cycle progression, respectively (34,35). On the opposite, the tumor suppressor gene product p53 and the transcription factor hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) are both constitutively degraded in unstimulated cells. But upon specific stimuli, genotoxic stress for p53 (33) or hypoxia for HIF-1 (48), the proteins accumulate as a result of the inhibition of protein degradation, thereby allowing them to exert their biological functions. Here we report that the atypical MAP kinase homologue ERK3 is a highly unstable protein, with a half-life of approximately 30 min that is constitutively degraded in exponentially proliferating cells. This is the first documented example of a MAP kinase family member whose activity is acutely regulated by protein turnover. Interestingly, Lu *et al.* (24) recently reported that prolonged exposure to sorbitol induces polyubiquitination of the MAP kinases ERK1/2 and promotes their degradation by a mechanism dependent on the PHD domain of MEKK1. In agreement with the results presented here, no ubiquitination of ERK1/2 was observed in response to serum or other stress stimuli, such as UV radiation or anisomycin. In contrast to ERK3 which is rapidly degraded in proliferating cells, ubiquitination of ERK1/2 (and possibly other MAP kinases) may represent an alternative feedback mechanism for downregulating kinase activity upon a persistent stress stimulus.

Protein degradation by the ubiquitin-proteasome system is involved in the regulation of many important cellular processes including signal transduction, transcription, cell cycle progression and class I major histocompatibility complex antigen presentation (10,26). Using a combination of pharmacological, biochemical and genetic approaches, we found that the ubiquitin-proteasome pathway is responsible for the rapid degradation of ERK3. Treatment with MG-132 and lactacystin, two structurally unrelated proteasome inhibitors, markedly increased the steady-state levels of ERK3 protein without changing the levels of

ERK1. Importantly, we showed that MG-132 treatment markedly increases the half-life of endogenous ERK3, clearly demonstrating that ERK3 is a direct substrate of the proteasome.

Targeting of proteins to the proteasome generally requires the attachment of a multi-ubiquitin chain to the substrate (17,18). However, there are examples like ornithine decarboxylase (32) and p21^{Cip1} (50), where it has been demonstrated that ubiquitination is not necessary for degradation by the proteasome. Our results clearly indicate that ERK3 is ubiquitinated *in vivo* and that ubiquitination is a required step for efficient degradation by the proteasome. This conclusion is supported by the following observations. First, co-transfection experiments of ERK3 with HA-tagged ubiquitin revealed the accumulation of high molecular weight HA-ubiquitin conjugates in MG-132-treated cells. These slowly migrating HA-immunoreactive species were not observed in cells transfected with ERK1. Second, the half-life of endogenous ERK3 protein was markedly increased at the nonpermissive temperature in cells bearing a thermolabile allele of the ubiquitin-activating enzyme E1. Third, fusion of the degradation domain of ERK3 to the heterologous protein EGFP was sufficient to promote its ubiquitination (data not shown) and to target it for proteasomal degradation (Fig. 7D).

A role for the proteasome in the regulation of ERK3 expression was recently reported by Zimmermann *et al.* who showed, using a microarray-based differential cDNA hybridization technology, that *ERK3* mRNA is upregulated by various proteasome inhibitors (58). Proteasome inhibition also resulted in the accumulation of ERK3 protein. It was concluded that proteasome inhibitors influence ERK3 expression mainly at the transcriptional level. However, the authors of this study did not evaluate the half-life or the ubiquitination status of ERK3. While our study do not exclude a role of the proteasome in the transcriptional activation of *ERK3* gene, the experiments presented here clearly demonstrate the importance of this proteolytic system in directly controlling ERK3 protein stability in proliferating cells.

It is interesting to note that for most protein kinases shown to be unstable, destabilization of the kinase is linked to enzymatic activation. For example, activation of the serine/threonine kinases PKC α (20) and GRK2 (41) by their specific activators bryostatin and isoproterenol, respectively, leads to their proteasomal degradation. Similarly, the turnover of many

receptor and soluble tyrosine kinases is also regulated by their phosphotransferase activity. Ligand activated platelet-derived growth factor (PDGF) β receptor (31) or constitutively-activated v-Src (16) are both ubiquitinated and targeted to the 26S proteasome. The activation-dependent destabilization of the enzyme seems to be part of a negative feedback regulatory loop aimed at decreasing overall protein kinase activity. By contrast, our findings indicate that the control of ERK3 stability is independent of its kinase activity and of activation loop phosphorylation.

From the results of mutagenesis analysis, we concluded that the destabilizing signal is contained within the first 365 amino acids of ERK3. To further define the degradation domain of ERK3, we examined the stability of a series of chimeric kinases made between the stable ERK1 kinase and ERK3. We were able to delimit two regions in the N-terminal lobe of ERK3 kinase domain that contribute to protein instability. These two regions correspond to the first 15 amino acids of ERK3 (NDR1) and parts of kinase subdomains II and III (NDR2, residues 53 to 73). As one would expect, primary sequence analysis revealed that these two regions display low identity to the corresponding ERK1 sequences. Close inspection of the sequences did not reveal any obvious resemblance with known degradation motifs. Interestingly, in a recent study aimed at defining structural determinants controlling subcellular localization and MEK recognition, Robinson *et al.* observed that a chimera containing the N-terminal lobe of ERK3 and the C-terminal lobe of ERK2 is expressed at low level compared to wild-type ERK2 (44). This observation is in agreement with the results presented here. Despite the fact that NDR1/2 are not contiguous in the primary sequence, a theoretical model of the structure of ERK3₃₋₃₄₆ revealed that the two regions lie on the same side of the molecule in close proximity. We postulate that the NDR1/NDR2 form a docking site for assembly of an E3 ubiquitin-protein ligase. In support of this hypothesis, we showed that ERK3 N-terminal lobe is sufficient to target heterologous proteins for degradation by the proteasome. It remains to be determined whether NDR1/2 activity is regulated by post-translational modifications or, alternatively, if the assembly of the ERK3-E3 complex is regulated by interacting proteins. The ERK3-specific E3 ligase may also be subject to direct regulation.

Our results provide strong evidence for the physiological relevance of ERK3 rapid turnover. We found that the stability of ERK3 increases with time during *in vitro* myogenic

differentiation of C2C12 cells, resulting in a marked upregulation of the protein. The accumulation of ERK3 is concomitant to the induction of 21^{Cip1} protein and exit from the cell cycle, suggesting that ERK3 may contribute in some way to cell cycle withdrawal. In agreement with this idea, BrdU incorporation studies revealed that expression of stabilized forms of ERK3, but not unstable wild-type ERK3, inhibits the induction of S phase in fibroblasts. This is the first biological effect of ERK3 described to date. All these observations suggest that unidentified cellular ERK3-specific E3 ligase(s) is able to repress the cell cycle inhibitory activity of ERK3 by promoting its ubiquitination and degradation by the proteasome. We thus propose that the biological activity of ERK3 is mainly regulated by its cellular abundance through the control of protein degradation by the ubiquitin/proteasome pathway (Fig. 10). This model is reminiscent of the regulation mode of the transcription factors p53 and HIF-1 α .

ACKNOWLEDGMENTS

We thank D. Bohmann, R. Davis, J. Han, H. Ozer, C. Prody, J. Woodgett and P. Jolicoeur for reagents. This work was supported by a grant (MOP-38010) to S.M. from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). P.C. and S.P. are recipient of a studentship from the CIHR and Heart and Stroke Foundation of Canada, respectively. G.R. is recipient of a fellowship from the National Cancer Institute of Canada. S.M. is an Investigator of the CIHR.

REFERENCES

1. **Blau, H. M., G. K. Pavlath, E. C. Hardeman, C. P. Chiu, L. Silberstein, S. G. Webster, S. C. Miller, and C. Webster.** 1985. Plasticity of the differentiated state. *Science* **230**:758-766.
2. **Boulton, T. G., S. H. Nye, D. J. Robbins, N. Y. Ip, E. Radziejewska, S. D. Morgenbesser, R. A. DePinho, N. Panayotatos, M. H. Cobb, and G. D. Yancopoulos.** 1991. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**:663-675.
3. **Brunet, A., D. Roux, P. Lenormand, S. Dowd, S. Keyse, and J. Pouyssegur.** 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.
4. **Chang, L. and M. Karin.** 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**:37-40.
5. **Cheng, M., T. G. Boulton, and M. H. Cobb.** 1996. ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. *J.Biol.Chem.* **271**:8951-8958.
6. **Chowdary, D. R., J. J. Dermody, K. K. Jha, and H. L. Ozer.** 1994. Accumulation of p53 in a mutant cell line defective in the ubiquitin pathway. *Mol.Cell Biol.* **14**:1997-2003.
7. **Coulombe, P. and S. Meloche.** 2002. Dual-tag prokaryotic vectors for enhanced expression of full-length recombinant proteins. *Anal.Biochem.* **310**:219-222.
8. **English, J., G. Pearson, J. Wilsbacher, J. Swantek, M. Karandikar, S. Xu, and M. H. Cobb.** 1999. New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp.Cell Res.* **253**:255-270.
9. **Fenteany, G., R. F. Standaert, W. S. Lane, S. Choi, E. J. Corey, and S. L. Schreiber.** 1995. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* **268**:726-731.
10. **Glickman, M. H. and A. Ciechanover.** 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* **82**:373-428.
11. **Goodfellow, P. J.** 1994. Inherited cancers associated with the RET proto-oncogene. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **4**:446-452.
12. **Greene, L. A. and A. S. Tischler.** 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **73**:2424-2428.
13. **Guan, K. L. and J. E. Dixon.** 1991. Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal.Biochem.* **192**:262-267.
14. **Guex, N. and M. C. Peitsch.** 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**:2714-2723.
15. **Halevy, O., B. G. Novitch, D. B. Spicer, S. X. Skapek, J. Rhee, G. J. Hannon, D. Beach, and A. B. Lassar.** 1995. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* **267**:1018-1021.
16. **Harris, K. F., I. Shoji, E. M. Cooper, S. Kumar, H. Oda, and P. M. Howley.** 1999. Ubiquitin-mediated degradation of active Src tyrosine kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:13738-13743.

17. **Hershko, A. and A. Ciechanover.** 1998. The ubiquitin system. *Annu.Rev.Biochem.* **67:425-79**.:425-479.
18. **Hochstrasser, M.** 1996. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu.Rev.Genet.* **30:405-39**.:405-439.
19. **Kahn, C. R., D. Vicent, and A. Doria.** 1996. Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus. *Annu.Rev.Med.* **47:509-31**.:509-531.
20. **Lee, H. W., L. Smith, G. R. Pettit, A. Vinitsky, and J. B. Smith.** 1996. Ubiquitination of protein kinase C-alpha and degradation by the proteasome. *J.Biol.Chem.* **271:20973-20976**.
21. **Lee, J. C., S. Kumar, D. E. Griswold, D. C. Underwood, B. J. Votta, and J. L. Adams.** 2000. Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology* **47:185-201**.
22. **Levitzi, A.** 1999. Protein tyrosine kinase inhibitors as novel therapeutic agents. *Pharmacol.Ther.* **82:231-239**.
23. **Lewis, T. S., P. S. Shapiro, and N. G. Ahn.** 1998. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv.Cancer Res.* **74:49-139**.:49-139.
24. **Lu, Z., S. Xu, C. Joazeiro, M. H. Cobb, and T. Hunter.** 2002. The PHD Domain of MEKK1 Acts as an E3 Ubiquitin Ligase and Mediates Ubiquitination and Degradation of ERK1/2. *Mol.Cell* **9:945-956**.
25. **Marshall, C. J.** 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80:179-185**.
26. **Mayer, R. J.** 2000. The meteoric rise of regulated intracellular proteolysis. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **1:145-148**.
27. **Meloche, S., B. G. Beatty, and J. Pellerin.** 1996. Primary structure, expression and chromosomal locus of a human homolog of rat ERK3. *Oncogene* **13:1575-1579**.
28. **Meloche, S., G. Pages, and J. Pouyssegur.** 1992. Functional expression and growth factor activation of an epitope-tagged p44 mitogen-activated protein kinase, p44mapk. *Mol.Biol.Cell* **3:63-71**.
29. **Meloche, S., K. Seuwen, G. Pages, and J. Pouyssegur.** 1992. Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol.Endocrinol.* **6:845-854**.
30. **Morgenstern, J. P. and H. Land.** 1990. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res.* **18:3587-3596**.
31. **Mori, S., C. H. Heldin, and L. Claesson-Welsh.** 1992. Ligand-induced polyubiquitination of the platelet-derived growth factor beta-receptor. *J.Biol.Chem.* **267:6429-6434**.
32. **Murakami, Y., S. Matsufuji, T. Kameji, S. Hayashi, K. Igarashi, T. Tamura, K. Tanaka, and A. Ichihara.** 1992. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* **360:597-599**.
33. **Oren, M.** 1999. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J.Biol.Chem.* **274:36031-36034**.
34. **Pagano, M., S. W. Tam, A. M. Theodoras, P. Beer-Romero, G. Del Sal, V. Chau, P. R. Yew, G. F. Draetta, and M. Rolfe.** 1995. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* **269:682-685**.
35. **Palombella, V. J., O. J. Rando, A. L. Goldberg, and T. Maniatis.** 1994. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* **78:773-785**.

36. **Parker, S. B., G. Eichele, P. Zhang, A. Rawls, A. T. Sands, A. Bradley, E. N. Olson, J. W. Harper, and S. J. Elledge.** 1995. p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* **267**:1024-1027.
37. **Payne, D. M., A. J. Rossomando, P. Martino, A. K. Erickson, J. H. Her, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, M. J. Weber, and T. W. Sturgill.** 1991. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.* **10**:885-892.
38. **Pearson, G., F. Robinson, G. T. Beers, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, and M. H. Cobb.** 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr.Rev.* **22**:153-183.
39. **Peitsch, M. C.** 1996. ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem.Soc.Trans.* **24**:274-279.
40. **Pelletier, J. and N. Sonenberg.** 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**:320-325.
41. **Penela, P., A. Ruiz-Gomez, J. G. Castano, and F. Mayor, Jr.** 1998. Degradation of the G protein-coupled receptor kinase 2 by the proteasome pathway. *J.Biol.Chem.* **273**:35238-35244.
42. **Polyak, K., M. H. Lee, H. Erdjument-Bromage, A. Koff, J. M. Roberts, P. Tempst, and J. Massague.** 1994. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* **78**:59-66.
43. **Robinson, M. J., S. A. Stippec, E. Goldsmith, M. A. White, and M. H. Cobb.** 1998. A constitutively active and nuclear form of the MAP kinase ERK2 is sufficient for neurite outgrowth and cell transformation. *Curr.Biol.* **8**:1141-1150.
44. **Robinson, M. J., B. E. Xu, S. Stippec, and M. H. Cobb.** 2002. Different domains of the mitogen-activated protein kinases ERK3 and ERK2 direct subcellular localization and upstream specificity in vivo. *J.Biol.Chem.* **277**:5094-5100.
45. **Rock, K. L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, and A. L. Goldberg.** 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78** :761-771.
46. **Rodier, G., A. Montagnoli, L. Di Marcotullio, P. Coulombe, G. F. Draetta, M. Pagano, and S. Meloche.** 2001. p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis. *EMBO J.* **20**:6672-6682.
47. **Schaeffer, H. J. and M. J. Weber.** 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol.Cell Biol.* **19**:2435-2444.
48. **Semenza, G. L.** 2001. HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* **107**:1-3.
49. **Servant, M. J., P. Coulombe, B. Turgeon, and S. Meloche.** 2000. Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J.Cell Biol.* **148**:543-556.
50. **Sheaff, R. J., J. D. Singer, J. Swanger, M. Smitherman, J. M. Roberts, and B. E. Clurman.** 2000. Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol.Cell* **5**:403-410.

51. **Treier, M., L. M. Staszewski, and D. Bohmann.** 1994. Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell* **78**:787-798.
52. **Turgeon, B., M. K. Saba-El-Leil, and S. Meloche.** 2000. Cloning and characterization of mouse extracellular-signal-regulated protein kinase 3 as a unique gene product of 100 kDa. *Biochem.J.* **346 Pt 1**:169-175.
53. **Webster, M. K. and D. J. Donoghue .** 1997. FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing. *Trends Genet.* **13**:178-182.
54. **Weston, C. R. and R. J. Davis.** 2002. The JNK signal transduction pathway. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **12**:14-21.
55. **Widmann, C., S. Gibson, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson.** 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* **79**:143-180.
56. **Zhang, F., A. Strand, D. Robbins, M. H. Cobb, and E. J. Goldsmith.** 1994. Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* **367**:704-711.
57. **Zhu, A. X., Y. Zhao, D. E. Moller, and J. S. Flier.** 1994. Cloning and characterization of p97MAPK, a novel human homolog of rat ERK-3. *Mol.Cell Biol.* **14**:8202-8211.
58. **Zimmermann, J., N. Lamerant, R. Grossenbacher, and P. Furst.** 2001. Proteasome- and p38-dependent regulation of ERK3 expression. *J.Biol.Chem.* **276**:10759-10766.

LEGENDS TO FIGURES

FIG. 1. ERK3 is an unstable protein. (A) HEK 293 cells were transiently transfected with the indicated constructs and cell lysates were analyzed by immunoblotting with anti-HA mAb. (B) Expression vectors for HA-ERK3 and HA-ERK1 were translated *in vitro* in the presence of ³⁵S-methionine/cysteine and analyzed by fluorography. (C) HEK 293 cells were transfected with HA-ERK3 and HA-ERK1. After 48 h, the cells were treated with cycloheximide (100 μg/ml) for the indicated times. HA-ERK3 protein was immunoprecipitated with anti-HA mAb, and detected by immunoblotting with a commercial anti-ERK3 antibody coupled to a biotin/streptavidin amplification system (upper panel). HA-ERK1 was analyzed as in A (lower panel). (D) Specificity of anti-ERK3 antibody. The polyclonal anti-ERK3 antibody E3-CTE4 was incubated in the absence (lane 1) or presence of the immunogen His₆ERK3₃₆₅₋₇₂₁GST (lane 2) or ERK3 N-terminus (lane 3) prior to immunoblotting analysis of HEK 293 cell lysate. (E) HEK 293 (upper panel) and NIH 3T3 (lower panel) cells were treated with cycloheximide (100 μg/ml) for the indicated times. Endogenous ERK3 was detected by immunoblotting with a polyclonal antibody to the C-terminus of ERK3 (E3-CTE4).

FIG. 2. ERK3 is degraded by the proteasome. (A) HEK 293 cells transfected with empty vector, or expression vectors for HA-ERK3 and HA-ERK1. After 48 h, the cells were treated for a period of 12 h with various protease inhibitors: MG-132 (25 μM), E-64 (25 μM), Leupeptin (0.1 mM), lactacystin (20 μM) and Z-VAD-FMK (25 μM). Expression of HA-ERK3 protein was detected by immunoprecipitation with anti-HA mAb, followed by immunoblotting with anti-ERK3 antibody coupled to a biotin/streptavidin amplification system. Expression of ERK1 was analyzed by immunoblotting with anti-HA mAb. (B) HEK 293 cells were treated for 12 h with the indicated protease inhibitors. Endogenous ERK3 expression was detected by immunoblotting with E3-CTE4 antibody. (C) HEK 293 cells were treated with DMSO (0.1%) or MG-132 (25 μM). After 30 min, cycloheximide was added to the medium for the times indicated. Expression of endogenous ERK3 was detected as in B.

FIG. 3. A functional ubiquitin-conjugating system is required for ERK3 proteolysis. (A)

ERK3 is ubiquitinated *in vivo*. Left panel, *in vitro* translation of expression vectors encoding HA-ERK3GST and HA-ERK1GST in the presence of ^{35}S -methionine/cysteine. The products were detected by fluorography. Central panel, HEK 293 cells were transfected with HA-ERK3GST and HA-ERK1GST expression constructs. After 48 h, GST-tagged proteins were precipitated with glutathione-agarose beads and analyzed by immunoblotting with anti-HA mAb. Right panel, HEK 293 cells were co-transfected with GST-tagged expression vectors together with HA-Ubiquitin. After 48 h, the cells were treated with MG-132 (25 μM) for an additional 12 h and GST-tagged proteins were precipitated with glutathione-agarose beads. Immunoreactive ubiquitin conjugates were detected by immunoblotting with anti-HA mAb. **(B)** Parental Balb/c 3T3 (A31) and E1 mutant *ts20* cells were infected with retroviruses encoding HA-ERK3 or HA-ERK1. Three days after selection in puromycin-containing medium, the infected cells were shifted or not at the restrictive temperature (39°C) for the times indicated. Expression of ectopic ERK3 and ERK1 proteins was detected as in Fig. 1E. **(C)** Upper panel, A31 and *ts20* cells were incubated at the permissive or restrictive temperature for the indicated times. Endogenous ERK3 expression was detected by immunoblotting with E3-CTE4 antibody. Lower panel, *ts20* cells were incubated at the permissive or restrictive temperature for 12 h. Then, the cells were treated with cycloheximide for the indicated times. Expression of endogenous ERK3 protein was monitored with E3-CTE4 antibody.

FIG. 4. Role of Ser189 phosphorylation, kinase activity and C-terminal extension on the stability of ERK3. **(A)** ERK3 is phosphorylated on Ser189. HEK 293 cells were transfected with GST fusion constructs of ERK3 wild-type or S189A mutant. GST-tagged proteins were purified from lysates with glutathione-agarose beads and analyzed by immunoblotting with anti-phospho-ERK3(S189) (upper panel) or E3-CTD4 antibody (lower panel). **(B)** HEK 293 cells were transfected with the indicated expression constructs. Ectopically-expressed ERK3 proteins were detected by immunoprecipitation with anti-HA mAb, followed by immunoblotting with anti-ERK3 antibody coupled to a biotin/streptavidin amplification system. **(C)** HEK 293 cells were transfected with the indicated expression constructs and cell lysates were analyzed by immunoblotting with anti-HA mAb. **(D)** The same expression constructs were translated *in vitro* in the presence of ^{35}S -methionine/cysteine and analyzed by fluorography.

FIG. 5. A signal located in the N-terminus of ERK3 regulates its stability. **(A)** Schematic representation of the constructs used in these experiments. **(B)** Upper panel, HEK 293 cells were transfected with the indicated expression constructs and cell lysates were analyzed by immunoblotting with anti-HA mAb. Lower panel, *in vitro* translation of the same constructs visualized by fluorography. **(C)** Synthesis of ERK1 and E3₁₋₇₃-E1₈₇₋₃₆₉ proteins. HEK 293 cells were transfected with the indicated constructs and pulse-labeled with ³⁵S-methionine/cysteine for 5 min. The HA-tagged proteins were immunoprecipitated with anti-HA mAb and analyzed by fluorography. **(D)** Turnover of ERK1 and E3₁₋₇₃-E1₈₇₋₃₆₉ proteins. Transfected HEK 293 cells were pulse-labeled for 2 h with ³⁵S-methionine/cysteine, and then chased for the indicated times in complete medium. The HA-tagged proteins were immunoprecipitated with anti-HA mAb and visualized with a PhosphorImager apparatus. **(E)** Upper panel, HEK 293 cells were transfected with the indicated expression constructs and lysates were analyzed by immunoblotting with anti-HA mAb. Lower panel, *in vitro* translation of the same constructs visualized by fluorography. **(F)** HEK 293 cells were transfected with an expression vector encoding HAERK1₁₋₂₀₁-ERK3₂₀₁₋₇₂₁ chimera. After 48 h, the cells were treated with cycloheximide for the indicated times and expression of the protein was detected by immunoblotting with anti-HA mAb.

FIG. 6. The N-terminal lobe of ERK3 kinase domain contains two regions that control protein stability. **(A)** Left panel, schematic representation of the constructs. NDR, N-terminal lobe Degradation Region. Upper right panel, HEK 293 cells were transfected with the indicated expression constructs and cell lysates were analyzed by immunoblotting with anti-HA mAb. Lower right panel, *in vitro* translation of the same constructs as visualized by fluorography. **(B)** Same as in A. **(C)** Ribbon diagram of ERK3 structure (amino acids 3 to 346) modelled from the X-ray structure of unphosphorylated ERK2. The N-terminal lobe is in green and the C-terminal lobe in red. NDR1 and NDR2 are in yellow. **(D)** Surface representation of ERK3. NDR1 and NDR2 are in yellow.

FIG. 7. The N-terminal lobe of ERK3 kinase domain is sufficient to target proteins for rapid proteasomal degradation. **(A)** Schematic representation of the constructs used. **(B)** HEK 293 cells were transfected with the indicated expression constructs and cell lysates were analyzed by immunoblotting with anti-GFP antibody. **(C)** The same expression

constructs were translated *in vitro* in the presence of ^{35}S -methionine/cysteine and analyzed by fluorography. **(D)** HEK 293 cells were transfected with expression vectors encoding HAERK3₁₋₁₁₂-EGFP and HAERK1₁₋₁₁₆-EGFP. After 48 h, the cells were treated with cycloheximide for the indicated times. The HAERK3₁₋₁₁₂-EGFP protein was detected by immunoprecipitation with anti-HA mAb, followed by immunoblotting with anti-GFP antibody coupled to a biotin/streptavidin amplification system (upper panel). HAERK1₁₋₁₁₆-EGFP was detected by immunoblotting with anti-GFP antibody (lower panel). **(E)** Transfected HEK 293 cells were treated for 12 h with the following protease inhibitors: MG-132 (25 μM), E-64 (25 μM) and lactacystin (20 μM). Expression of EGFP-tagged proteins was detected as in D.

FIG. 8. Induction of ERK3 expression during cellular differentiation. **(A)** PC12 cells were stimulated or not with NGF for 4 days. Phase-contrast micrographs show the outgrowth of neurites in NGF-treated cells. **(B)** C2C12 cells were grown in growth medium (GM) for 2 days or in differentiation medium (DM) for 7 days. Phase-contrast micrographs showing the formation of myotubes in DM. **(C)** PC12 cells were treated with NGF for the indicated times. The expression of endogenous ERK3 was analyzed by immunoblotting with E3-CTE4 antibody. **(D)** C2C12 cells were incubated in GM or DM for the indicated times. The expression of endogenous ERK3, p21^{Cip1} and Cdk2 was analyzed by immunoblotting. **(E)** The half-life of ERK3 was evaluated by cycloheximide-chase experiments in proliferating (day 1) and differentiating (day 5 and 9) C2C12 myoblasts. **(F)** ERK3 is phosphorylated on Ser189 in differentiated muscle cells. Endogenous ERK3 was immunoprecipitated from differentiated C2C12 cells (day 9) with either pre-immune serum (PI) or E3-CTE4 antibody **(I)**. Phosphorylation of ERK3 was monitored by immunoblotting with anti-phospho-Ser189 specific antibody.

FIG. 9. Stable forms of ERK3 inhibit S phase entry in NIH 3T3 fibroblasts. **(A)** Schematic representation of chimeric constructs used in these experiments. NDR1 and NDR2 regions are highlighted. **(B)** NIH 3T3 cells were transfected with the indicated constructs. The cells were serum-starved and then stimulated with 10% serum for 20 h in the presence of BrdU. The percentage of transfected cells (Myc-positive) that incorporated BrdU was evaluated by fluorescence microscopy. ns, not significantly different; ‡, $p < 0.01$ compared to vector;

§, $p < 0.01$ compared to wild-type ERK3. (C) Representative example of the results shown in B. (D) NIH 3T3 cells were transfected or not with the indicated constructs. After 44 h, cell lysates were prepared and analyzed by immunoblotting with E3-CTE4 antibody (upper panel) and 9E10 mAb (lower panel).

FIG. 10. Model of ERK3 regulation by proteasome-mediated degradation.

FIGURE 1

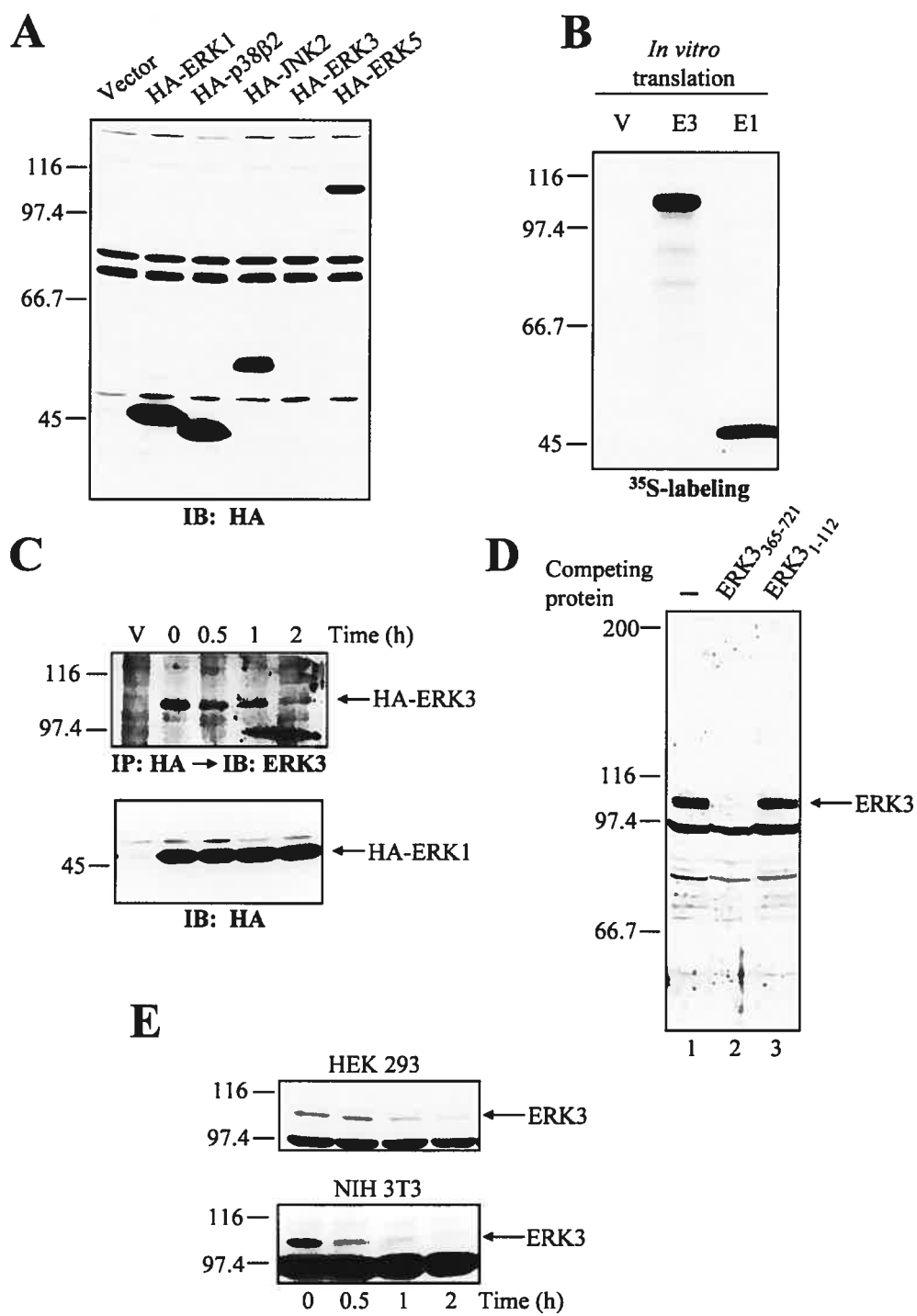


FIGURE 2

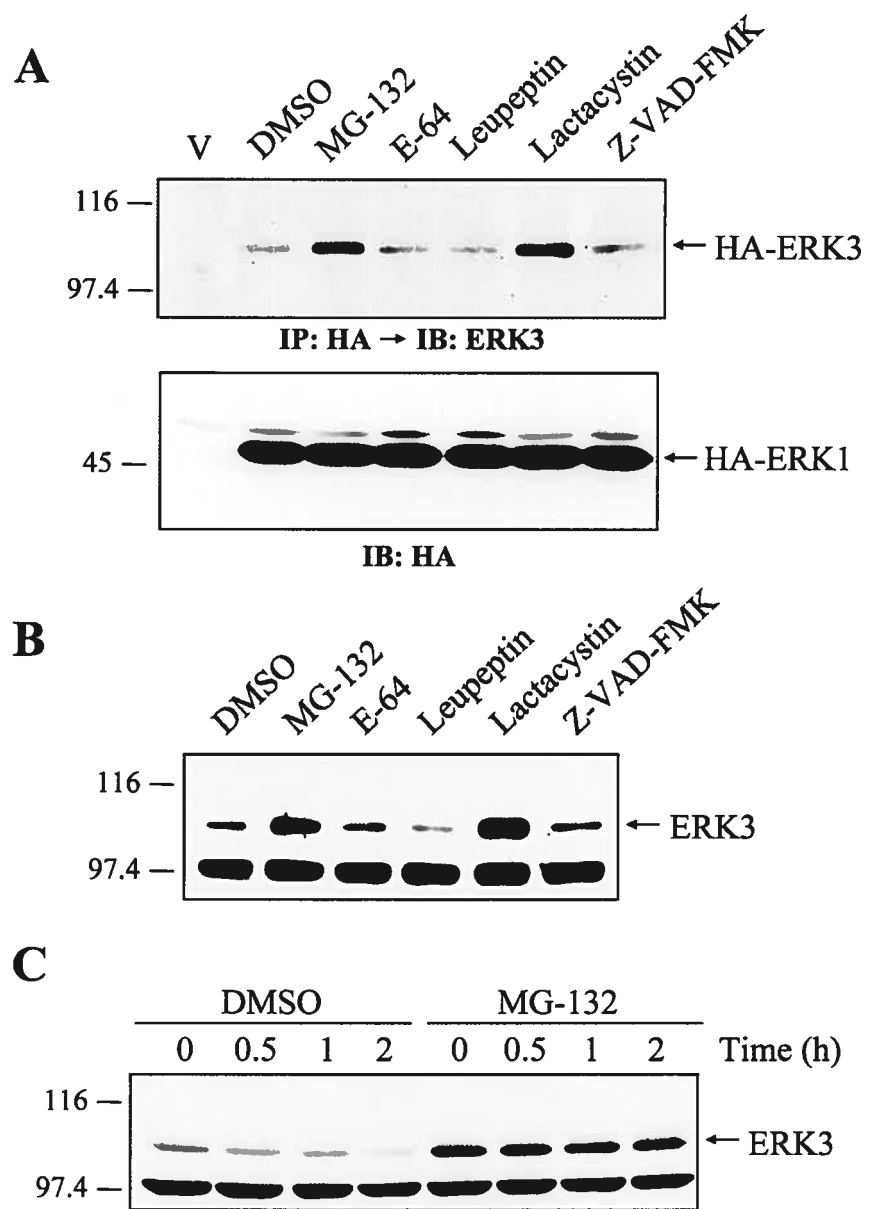


FIGURE 3

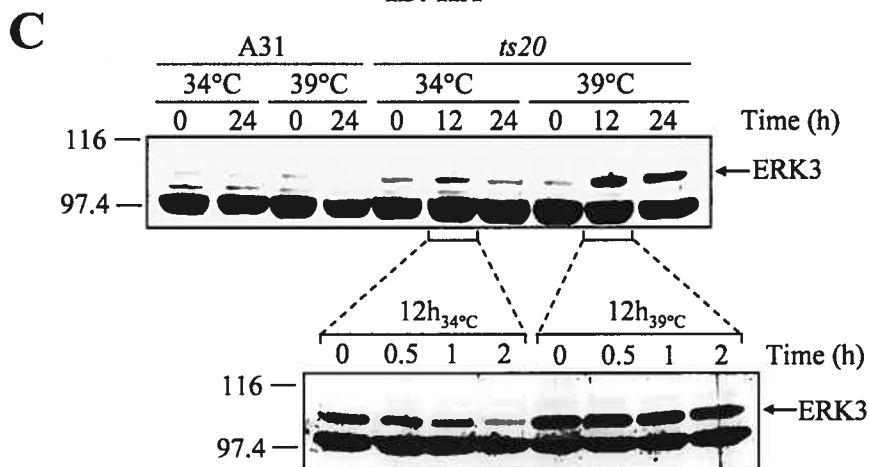
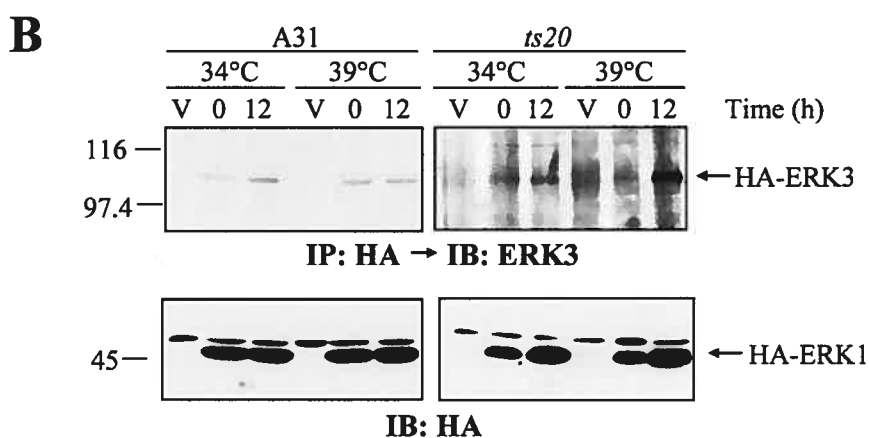
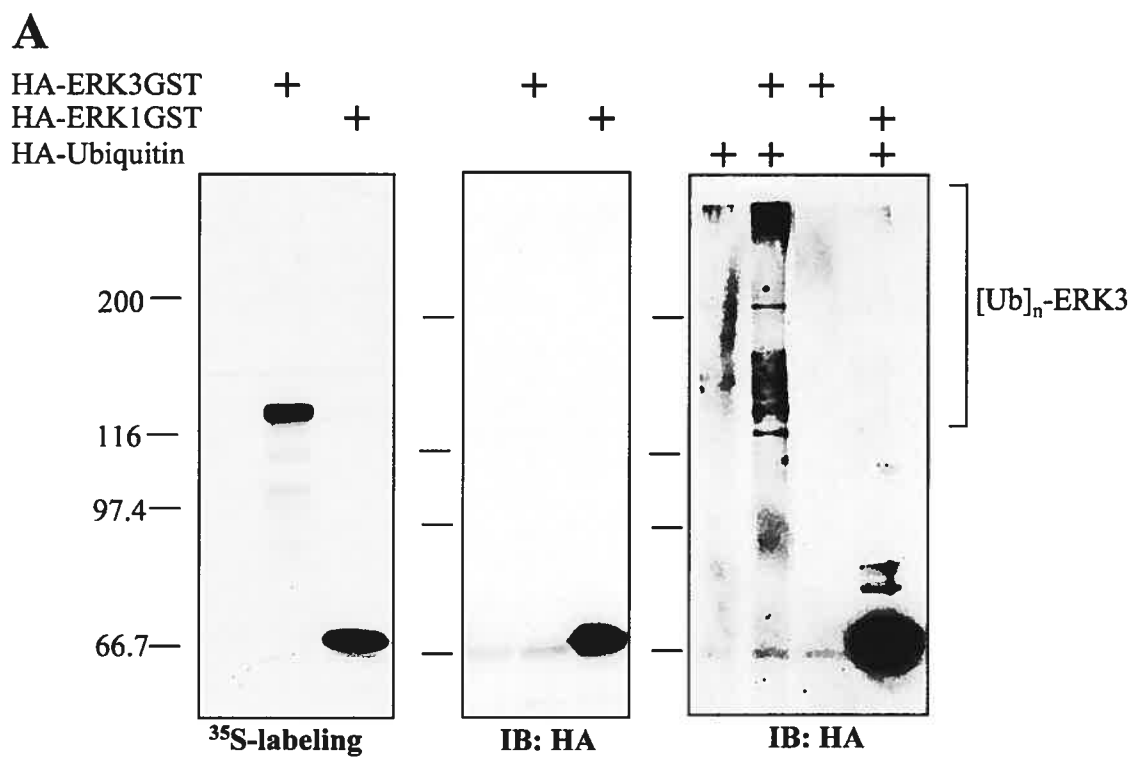


FIGURE 4

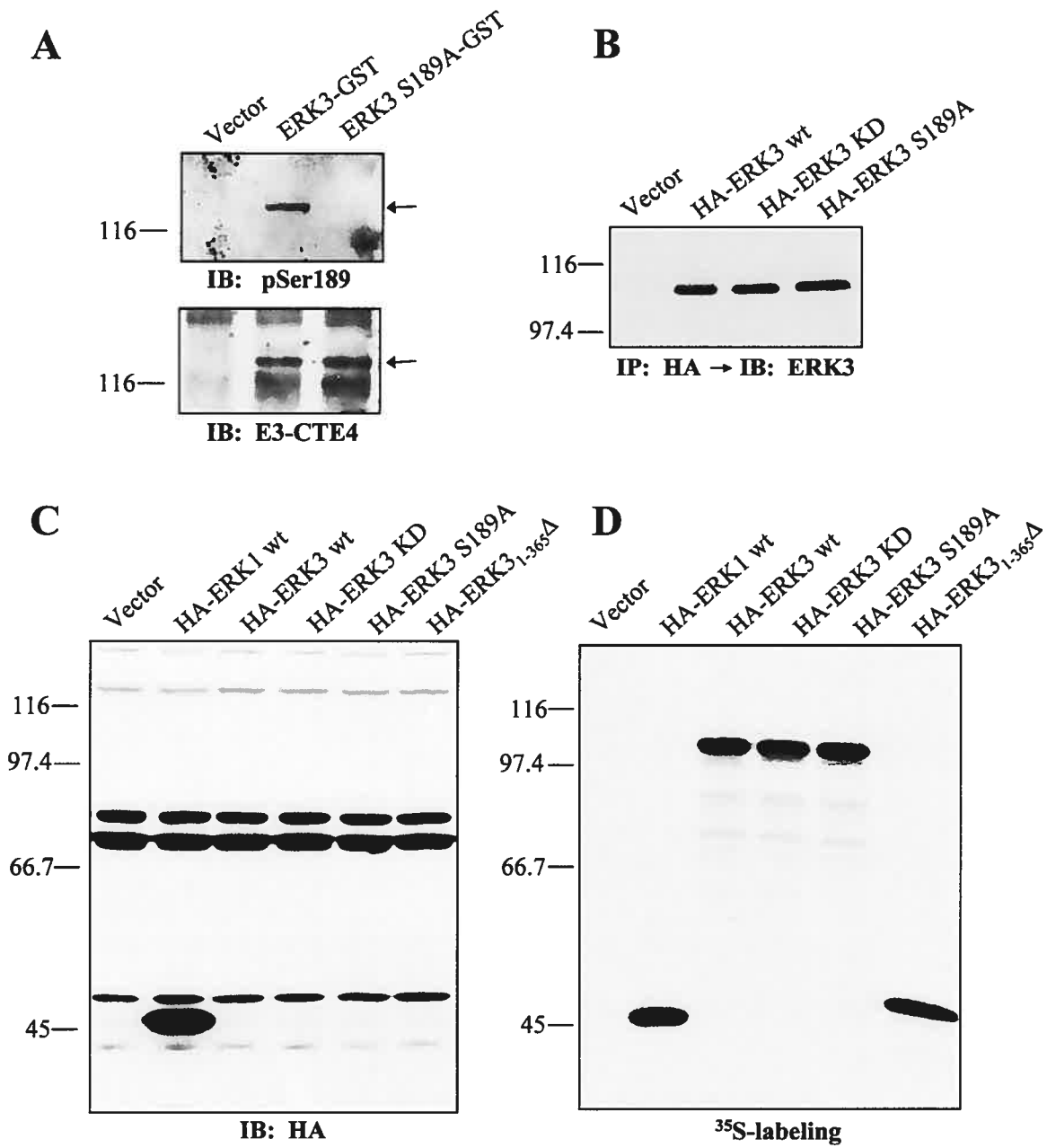


FIGURE 5

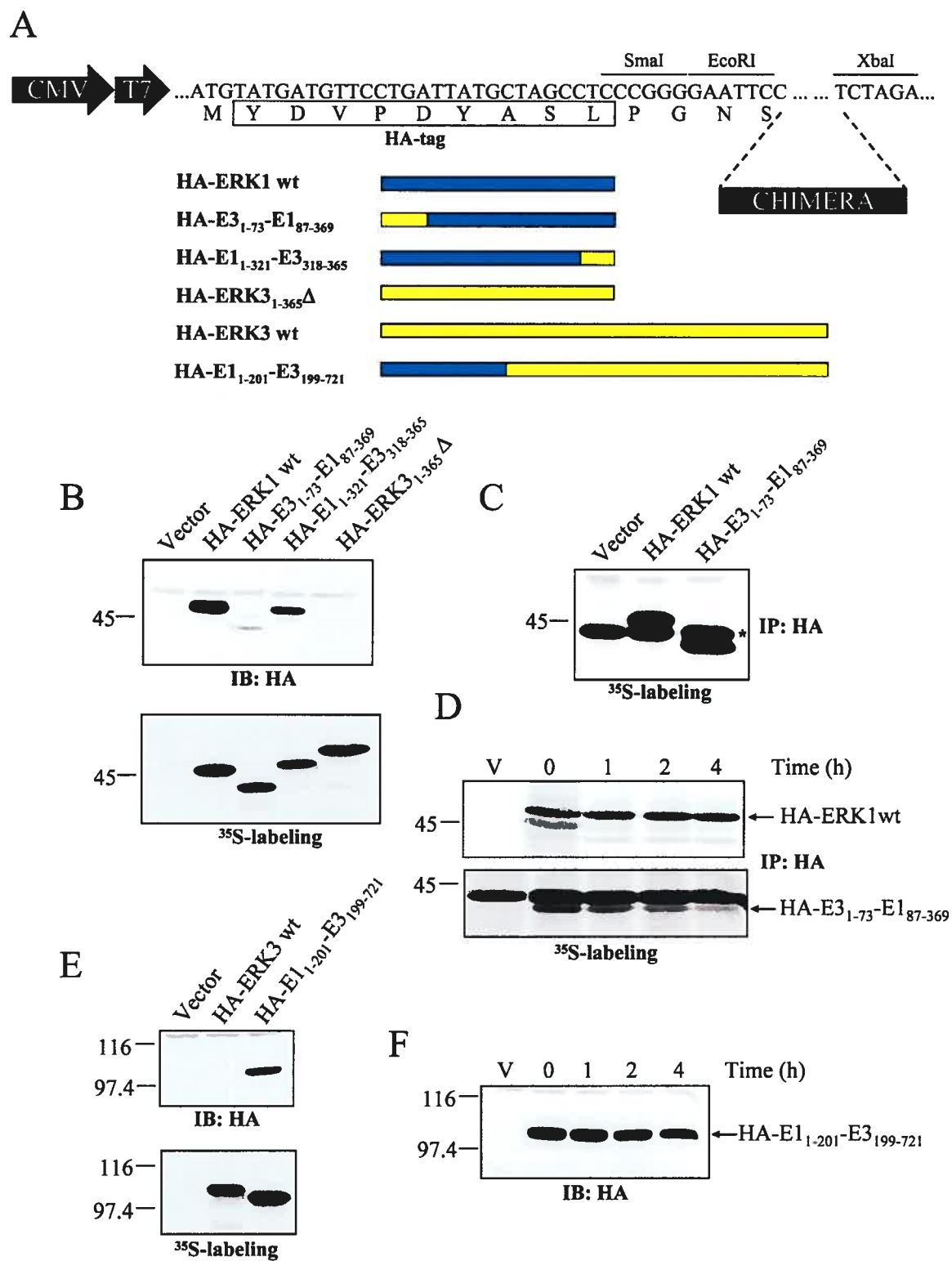


FIGURE 6

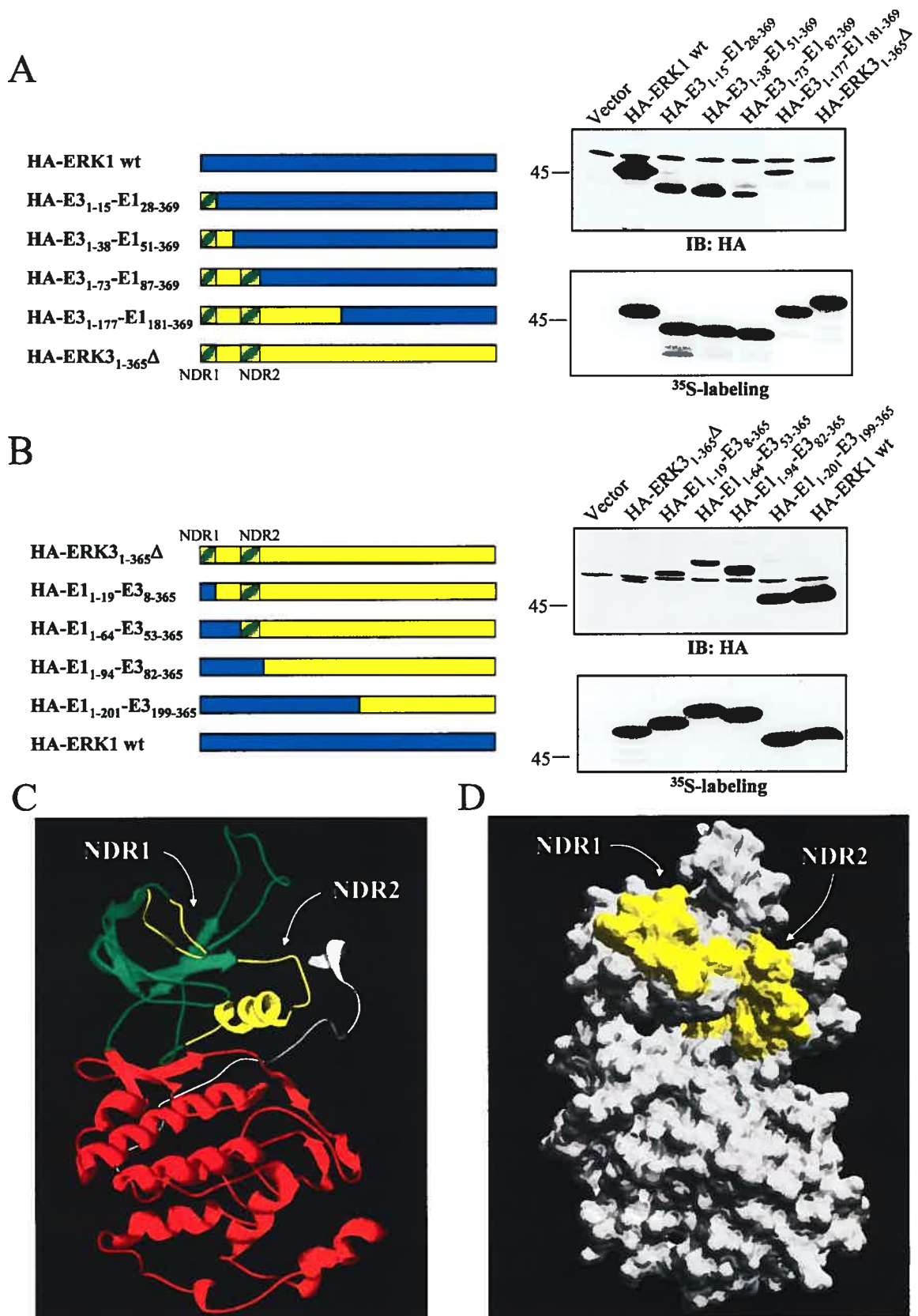


FIGURE 7

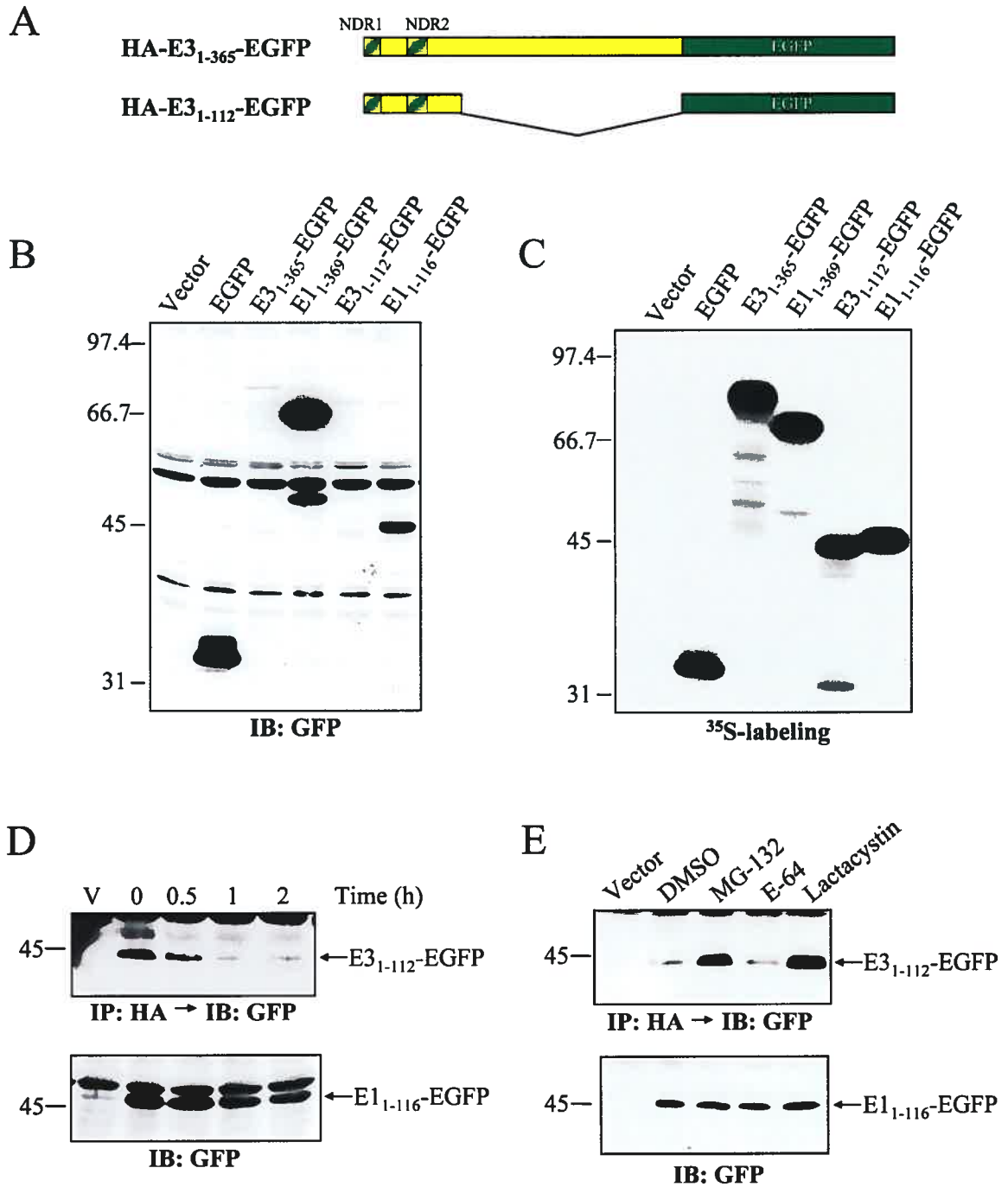


FIGURE 8

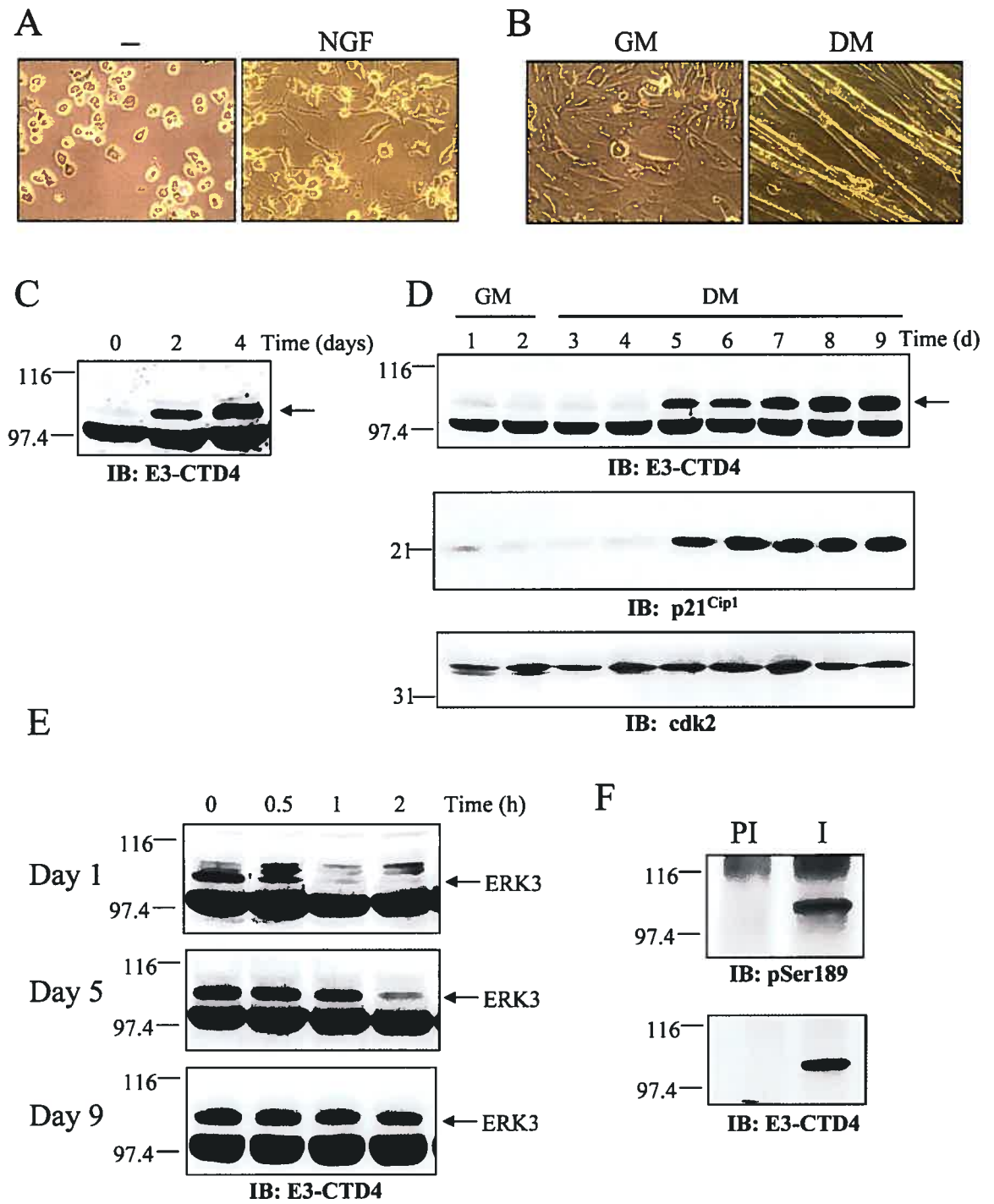


FIGURE 9

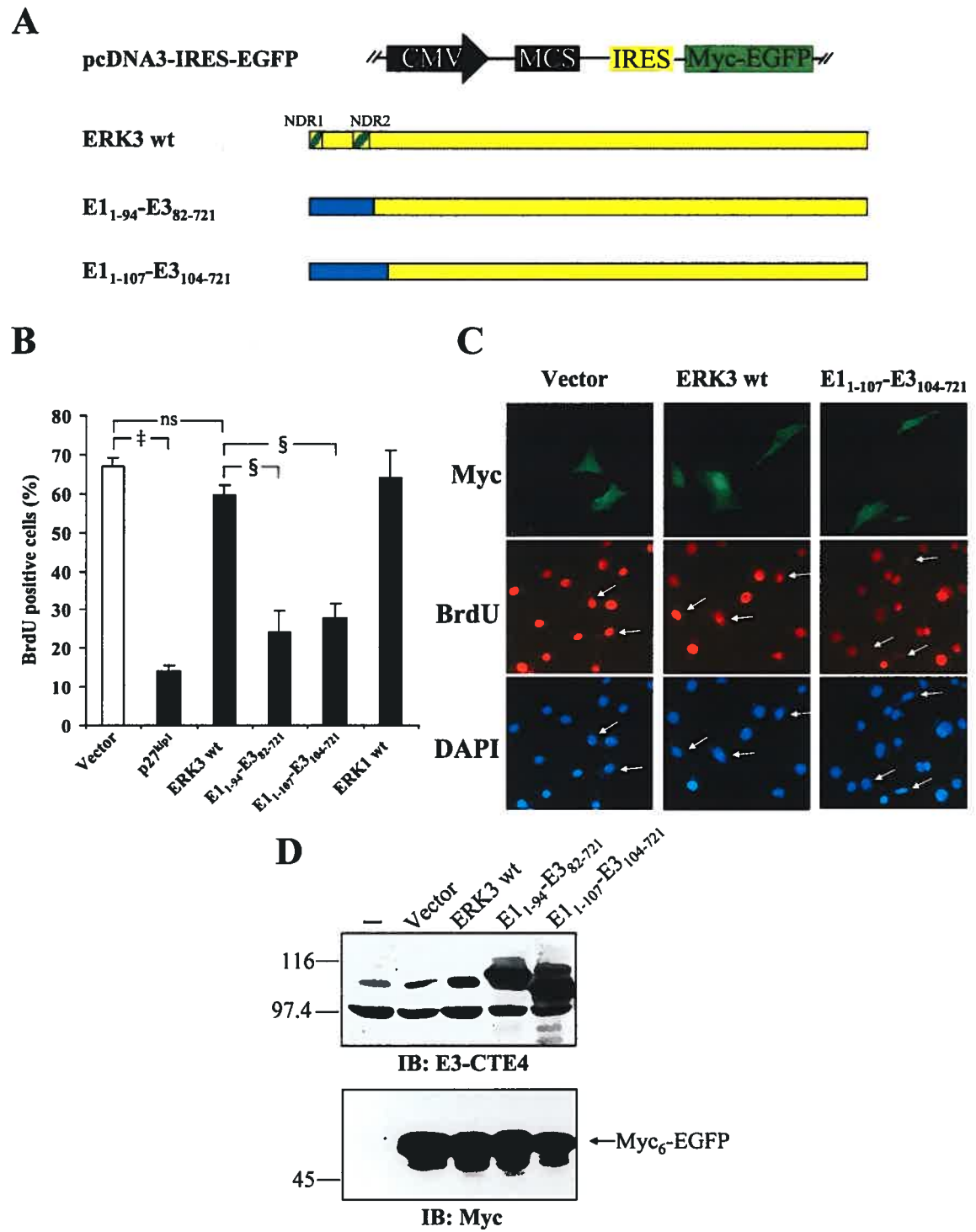
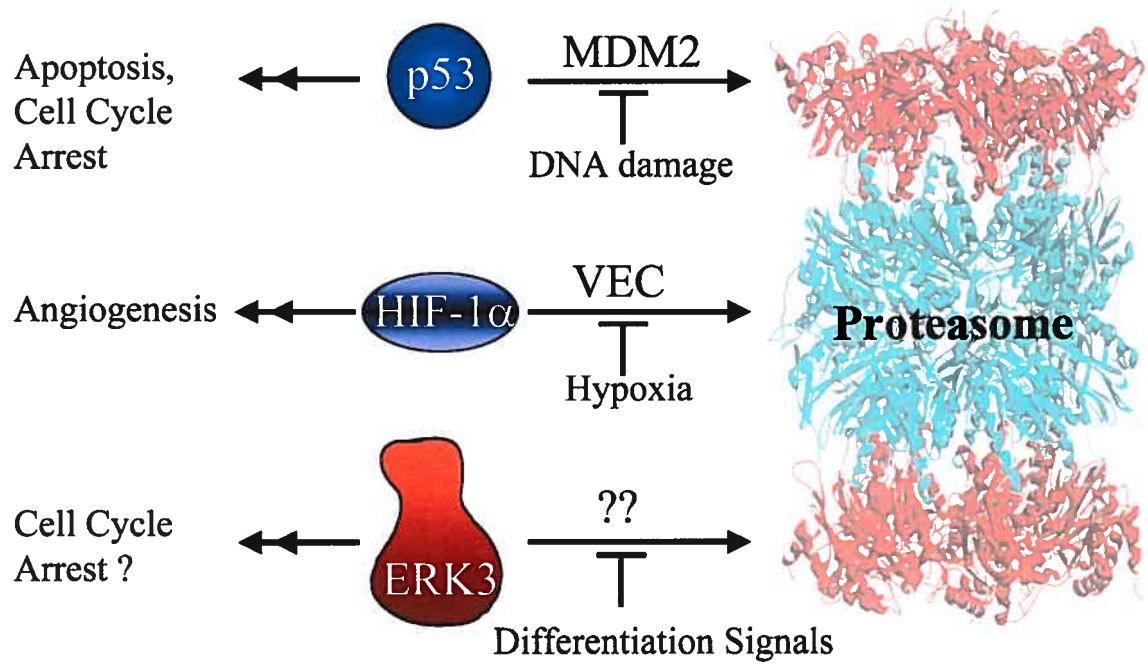


FIGURE 10



CHAPITRE 3:

**La MAPK ERK3 et l'inhibiteur de CDK p21^{WAF1} sont ubiquitinées en N-terminal
*in vivo***

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Philippe Coulombe
BIM, biologie moléculaire

2. Description de l'article

Titre de l'article: "N-Terminal Ubiquitination of Extracellular Signal-Regulated Kinase 3 and p21 Directs their Degradation by the Proteasome"

Publié dans: "Molecular and Cellular Biology", Volume 24, pages: 6140-6150 (2004).

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Philippe Coulombe inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Régulation de la MAPK atypique ERK3 par le système ubiquitine-protéasome".

Dr Sylvain Meloche

Coauteur

Signature

Date

Dr Éric Bonneil

Coauteur

Signature

Date

Dr Pierre Thibault

Coauteur

Signature

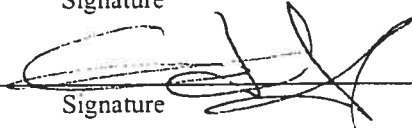
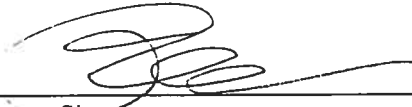
Date

Dr Geneviève Rodier

Coauteur

Signature

Date



10 Avril 2006

20 avril 2006.

20 avril 2006

4.1. MISE EN SITUATION

ERK3 est constitutivement ubiquitinée dans des cellules en prolifération (voir chapitre 2). Nous avons caractérisé cette régulation plus en détails en identifiant le site d'ubiquitination de ERK3. En général, les protéines sont ubiquitinées via les résidus lysines (voir section 1.2.4.7.). Par mutagenèse dirigée, il est possible de remplacer successivement les lysines d'une protéine par des arginines, un résidu également basique mais non ubiquitinable. La stabilisation d'un mutant $K \rightarrow R$ est un indicateur que cette lysine est le site d'attachement de l'ubiquitine. De manière surprenante, un mutant de ERK3 ne possédant aucune lysine est toujours ubiquitinée et dégradée par le protéasome *in vivo*. Ce résultat suggère que le groupement amine- α du N-terminal de ERK3 est son site de polyubiquitination *in vivo*. En accord avec cette idée, l'addition de certains épitopes en N-terminal stabilise ERK3 en interférant avec son ubiquitination.

Tous ces résultats sont compatibles avec l'hypothétique ubiquitination en N-terminal de ERK3, cependant, ils ne constituent pas une preuve biochimique directe de cette ubiquitination. Une revue de la littérature révèle l'absence de preuve directe de l'ubiquitination des protéines candidates à l'ubiquitination en N-terminal. Des expériences de spectrométrie de masse furent conduites sur ERK3 ubiquitinée *in vivo* afin d'identifier directement son ubiquitination. La spectrométrie de masse permet de mesurer la masse avec grande précision de peptides tryptiques issus de ERK3 ubiquitinée. Il est également possible de fragmenter ces peptides, permettant leur séquençage. Grâce à cette approche expérimentale, nous avons pour la première fois montré l'existence de l'ubiquitination en N-terminal *in vivo*.

En se basant sur l'expérience acquise avec ERK3, nous avons décidé d'analyser l'ubiquitination de l'inhibiteur de cdk p21^{WAF1}. Comme ERK3, p21^{WAF1} est constamment dégradé par le protéasome *in vivo*. L'inhibition pharmacologique du protéasome entraîne une accumulation de p21^{WAF1} sous forme ubiquitinée, suggérant que son ubiquitination est importante pour sa dégradation protéasomale. Tout comme ERK3, une forme de p21 sans lysine (OK) est toujours dégradée par le protéasome *in vivo*. N'ayant pu détecter l'ubiquitination du mutant OK *in vivo*, les groupes de Bruce E. Clurman et James M. Roberts ont conclu à la dégradation protéasome indépendante de l'ubiquitine pour p21^{WAF1}.

Comme c'est le cas pour ERK3, l'addition d'épitopes en N-terminal de p21^{WAF1} stabilise la protéine *in vivo*. De plus, nos données génétiques et biochimiques indiquent clairement que p21^{WAF1} OK est ubiquitiné et requiert l'ubiquitination pour être dégradé par le protéasome. Ces données suggèrent fortement que la dégradation de p21^{WAF1} nécessite son ubiquitination en N-terminal. En accord avec cette conclusion, l'ubiquitination en N-terminal de p21^{WAF1} ectopique fut détectée par spectrométrie de masse.

4.2. ARTICLE 3:

N-Terminal Ubiquitination of Extracellular Signal-Regulated Kinase 3 and p21 Directs their Degradation by the Proteasome

Philippe Coulombe^{1,2}, Geneviève Rodier¹, Eric Bonneil⁴, Pierre Thibault^{1,4}, and Sylvain Meloche^{1,2,3,*}

¹Institut de recherche en immunovirologie et oncologie and Departments of
²Molecular Biology and ³Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Quebec,
Canada H3C 3J7; Caprion Pharmaceuticals, 7150 Alexander Fleming, Montreal,
Quebec, Canada H4S 2C8

Manuscript information: Abstract: 156 words
Total length: 60,587 characters (incl. spaces)
Materials and Methods: 1,077 words
Introduction, Results and Discussion section: 4,909 words

Running title: N-terminal ubiquitination of ERK3 and p21

*Corresponding author: Dr. Sylvain Meloche
Institut de recherche en immunovirologie et oncologie
Université de Montréal
C.P. 6128, Succ. Centre-ville
Montreal (Quebec) Canada H3C 3J7
Tel.: (514) 343-6966 Fax: (514) 343-6954
[REDACTED]

Article publié dans: **Molecular and Cellular Biology**, Volume 24, p. 6140-6150 (2004).

ABSTRACT

Extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3) is an unstable MAP kinase homologue that is constitutively degraded by the ubiquitin-proteasome pathway in proliferating cells. Here we show that a lysine-less mutant of ERK3 is still ubiquitinated *in vivo* and requires a functional ubiquitin conjugation pathway for its degradation. Addition of N-terminal sequence tags of increasing size stabilizes ERK3 by preventing its ubiquitination. Importantly, we identified a fusion peptide between the N-terminal methionine of ERK3 and the C-terminal glycine of ubiquitin *in vivo* by tandem mass spectrometry analysis. These findings demonstrate that ERK3 is conjugated to ubiquitin via its free NH₂ terminus. We found that large N-terminal tags also stabilize the expression of the cell cycle inhibitor p21, but not that of substrates ubiquitinated on internal lysine residues. Consistent with this observation, lysine-less p21 is ubiquitinated and degraded in a ubiquitin-dependent manner in intact cells. Our results suggests that N-terminal ubiquitination is a more prevalent modification than originally recognized.

INTRODUCTION

The ubiquitin/proteasome proteolytic pathway is an evolutionary conserved regulatory system that controls a host of cellular processes including transcription, cell cycle progression, differentiation and development, tumor suppression, and immune responses (17). Malfunctioning of the system, as a result of either loss of function mutations or abnormal activity, has been implicated in the pathogenesis of cancer and of many other human diseases (17, 28). Proteins targeted for degradation by the 26S proteasome are generally tagged with multiple copies of ubiquitin, which serve as a recognition signal for the 19S regulatory particle. The formation of ubiquitin conjugates is a highly regulated process that requires the sequential action of three enzymes (20). The last step, which is catalyzed by a large family of E3 ubiquitin ligases, confers specificity to the reaction.

For most proteins, the first ubiquitin molecule is attached via an isopeptide bond formed between its C-terminal glycine residue and the ϵ -NH₂ group of an internal lysine of the substrate. The polyubiquitin chain is then synthesized by the successive conjugation of ubiquitin molecules to an internal lysine of the previously conjugated ubiquitin. There is no consensus about the positioning of internal lysines that are conjugated to ubiquitin, although a number of studies have highlighted the importance of specific lysine residues. For example, study of Sic1 ubiquitination has revealed that some lysines are more efficiently ubiquitinated than others and, most importantly, that only 6 N-terminal lysines out of 20 support efficient degradation by the 26S proteasome (31). Structural analysis of β -catenin ubiquitination by SCF ^{β -TrCP} has shown that the position of the lysine upstream of the β -TrCP binding site greatly influences the rate of ubiquitin ligation (45). The sites of lysine ubiquitination have been mapped for some well characterized protein substrates such as p53 (34), SOCS3 (36) or I κ B α (1, 37). Replacement of these specific lysines stabilizes the mutant protein, suggesting that they are at least necessary for degradation. However, for the majority of proteasome substrates, the precise ubiquitination site(s) has not been characterized.

Alternative modes of substrate recognition and targeting have also been described. In the case of the transcriptional activator MyoD, the free α -NH₂ terminus of the protein serves as conjugation site for ubiquitin (7). For a small number of proteins, such as ornithine decarboxylase (13), the cell cycle inhibitor p21 (40) and α -synuclein (41), it has been suggested that degradation by the proteasome occurs in an ubiquitin-independent manner. However, although purified recombinant p21 and α -synuclein can be efficiently degraded by the proteasome *in vitro* (25), it remains unclear if degradation of these substrates *in vivo* is independent of a functional ubiquitin system. The observation that p21-ubiquitin conjugates are formed *in vivo* is also intriguing (8, 26, 35, 40).

Extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3) is a distantly related member of the mitogenactivated protein (MAP) kinase superfamily (30, 43). Although the exact physiological functions of ERK3 remain to be established, accumulating evidence point to a role for the kinase in the control of cell differentiation. ERK3 transcripts are up-regulated during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells into neuronal or muscle cells (6). ERK3 protein also markedly accumulates during differentiation of C2C12 myoblasts into muscle cells, with kinetics parallel to that of p21 (14). Notably, overexpression of ERK3 in fibroblasts causes cell cycle arrest. Unlike conventional MAP kinases, ERK3 is a highly unstable protein that is constitutively degraded by the ubiquitin-proteasome pathway in proliferating cells (14). We have identified two degrons in the N-terminal lobe of the kinase domain that are both necessary and sufficient to promote ERK3 degradation.

To further understand the mechanism of ERK3 degradation, we have mapped the ubiquitination site(s) of the protein. We report here that ERK3 is ubiquitinated and degraded by the proteasome in a lysine-independent fashion. We show that addition of N-terminal sequence tags of increasing size efficiently inhibit N-terminal but not lysine-dependent ubiquitination of protein substrates. In the course of these studies, we also found that proteasome degradation of p21 is independent of the presence of lysine residues but dependent on a functional ubiquitination pathway. Our results suggest that N-terminal ubiquitination may be a more widespread phenomenon than originally anticipated.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and antibodies

The source of reagents has been described (14). TNF α was obtained from R&D Systems. Polyclonal anti-HA antibody was from Santa-Cruz Biotechnology. The polyclonal antibody to the C-terminus of ERK3 (E3-CTE4) was described previously (14).

Plasmid constructs and mutagenesis

Mutations were introduced into human ERK3 (27) and human p21 (16) cDNAs using the Altered Sites *in vitro* mutagenesis system (Promega). pcDNA3-HA-ERK3, HA-ERK3 Δ and HA-ERK1 have been described (14). To construct the C-terminal His₆-tagged expression vectors, two oligonucleotides coding for His₆ tag sequence were inserted into the EcoRI/XbaI sites of pcDNA3-HA. The coding sequences of ERK3 Δ , ERK3 Δ -0K, p21 and p21-0K were subcloned in frame into the EcoRI site. To construct the N-terminal His₆-tagged ERK3, two oligonucleotides encoding the sequence MRGSHHHHHHGIS were introduced downstream of a Kozak sequence. Myc₆-ERK3 was constructed by first subcloning the Myc₆ tag sequence derived from pCS3MT (gift from A.J. Waskiewicz) into the BamHI/EcoRI sites of pcDNA3 to yield pcDNA3-Myc₆. The ERK3 coding sequence was then subcloned into pcDNA3-Myc₆. EGFP-ERK3 was constructed by first inserting the EGFP sequence (Clontech) into the KpnI/EcoRI sites of pcDNA3. The ERK3 coding sequence was then subcloned into the EcoRI site of the resulting vector. To construct Myc_n-ERK3 expression vectors, a pair of oligonucleotides coding for a unique Myc epitope was sequentially cloned into the EcoRI/XbaI sites of pcDNA3-Koz, which was designed to contain a Met initiator codon into a consensus Kozak sequence. ERK3-EGFP was constructed by first subcloning the EGFP coding sequence into pcDNA3-Koz. Then, the full-length ERK3 was ligated in frame upstream of EGFP. GST-tagged ERK3-EGFP and EGFPERK3 were constructed by subcloning the GST sequence, derived from pGEX-KG (18), into the EcoRI/XbaI sites of the respecting pcDNA3 vectors. To generate the M₅HA expression vector, the sixth Myc epitope was first replaced by a HA-tag by inserting a set of oligonucleotides into the NcoI/EcoRI sites of pCS3MT. Then, the resulting M₅HA tag was subcloned into the BamHI/EcoRI sites of pcDNA3 to yield pcDNA3-M₅HA. The coding sequences of hamster ERK1, human ERK3, human SOCS3 (gift from A.

Yoshimura), human p53 (gift from G. Ferbeyre), human I κ B α (gift from J. Hiscott) and human p21 were subcloned into the EcoRI/XbaI sites of pcDNA3-M₅HA. pMT123 vector encoding HA-tagged ubiquitin was kindly provided by Dirk Bohmann (42). All mutations were confirmed by DNA sequencing. Sequence of the primers used for PCR and details about the cloning strategies are available upon request.

Cell culture and transfections

Human embryonic kidney 293 (HEK 293), A31 and *ts20* cells were cultured as described previously (14). HEK 293 cells were transfected by the calcium phosphate co-precipitation method. A31 and *ts20* cells were transfected using Lipofectamine reagent (Invitrogen).

Protein biochemistry methods and immunofluorescence

Cell lysis, protein precipitation and immunoblot analysis was performed as described (14,39). Protein concentrations were measured using the BCA assay (Pierce) and equal amounts of lysate proteins were subjected to SDS-gel electrophoresis. *In vivo* phosphorylation analysis and immunofluorescence studies were based on techniques previously described (33). *In vitro* transcription/translation was carried out using the TNT Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) according to the manufacturer's instructions. The reaction products were detected by fluorography with Amplify (Amersham).

***In vivo* ubiquitination assays**

HEK 293 cells were co-transfected with the indicated expression vectors (4 μ g) together with HA-tagged ubiquitin (2 μ g). After 36 h, the cells were treated with 25 μ M MG-132 for 12 h. For purification of C-terminal His₆-tagged proteins, the cells were lysed in buffer lacking EDTA and supplemented with 20 mM imidazole and 10 mM N-ethyl maleimide (NEM). Cell lysates (750 μ g protein) were incubated with 20 μ l of Ni-NTA agarose beads (Qiagen) for 2 h at 4°C with constant agitation. The beads were washed three times with lysis buffer without NEM. Proteins were separated by SDS-gel electrophoresis and detected by immunoblotting with anti-HA monoclonal antibody 12CA5. C-terminal GST-tagged proteins were purified using glutathionconjugated agarose beads (Pharmacia). The cells

were lysed in Triton X-100 lysis buffer supplemented with 10 mM NEM, and the clarified lysates were further incubated for 10 min with 2.5 mM dithiothreitol to quench free NEM. Cell lysates (750 µg protein) were incubated for 2 h at 4°C with 20 µl of glutathion-agarose resin. The bound proteins were washed 4 times in lysis buffer and resolved by SDS-gel electrophoresis.

Mass spectrometry analysis

Twenty 10-cm culture dishes of HEK 293 cells were transfected with expression vectors encoding ERK3Δ or p21 tagged at the N-terminus with HA and at the C-terminus with GST. After 36 h, the cells were treated with 25 µM MG-132 for 12 h. The cells were lysed in NEM containing buffer and the transfected proteins were precipitated with glutathion-agarose beads. The purified proteins (4 µg) immobilised on beads were resuspended in 50 mM ammonium bicarbonate (pH 8.1). Modified trypsin (Promega) was then added at an enzyme:substrate ratio of 1:25 and the samples were incubated overnight at 37°C. Supernatants were collected and the beads were washed three times with 100 µl of 50 mM ammonium bicarbonate prior to evaporation in a Speedvac. The protein digests were reconstituted in 40 µl of aqueous formic acid (0.2%) containing 5% acetonitrile, and 10 µL was loaded on the chromatographic system. All mass spectrometry (MS) analyses were conducted on a Waters CapLC coupled to a QTOFTM Ultima via a nanoLC interface (Waters). The on-line 2D-LC-MS chromatographic system comprised a home made strong cation exchange (SCX) column 5 mm x 360 µm (PolyLC), a 300 µm x 5 mm Waters Symmetry C 18 pre-column and a 150 µm x 10 cm home-made Jupiter C 18 (Phenomenex) analytical column. After sample injection, peptides were eluted sequentially from the SCX column with 20 µL salt plugs of ammonium acetate of increasing concentration, ranging from 0, 60, 70, 80, 100, 150, 200, 400, 1000 mM at pH 3.0. Peptides eluted from the SCX column were retained on the C18 pre-column and subsequently separated on the analytical column using a linear gradient of 10-60% 0.2% formic acid in acetonitrile over 63 min. The mass spectrometer was operated in a data-dependent acquisition mode whereby the instrument cycled through a survey scan (1s) and a product ion spectrum (2s). Collisional activation of selected precursors was obtained using nitrogen as a target gas with collision energies ranging from 30-80 eV (laboratory frame of reference) scaled according to m/z and charge of the precursor ion. Fragment ions formed in the RF-only quadrupole were

recorded by a time-of-flight mass analyzer. Mascot (Matrix Science) database searches of the acquired MS-MS spectra were performed against the NCBI non-redundant protein database.

RESULTS

***In vivo* degradation of ERK3 by the proteasome is independent of lysines**

To further characterize the mechanism of ERK3 ubiquitination and to possibly obtain stable mutants, we decided to map the ubiquitination site(s) of the kinase. We previously showed that ERK3 ubiquitination is confined within the first 365 amino acids of the protein (14). We thus used this truncated ERK3 mutant (ERK3 Δ) as a backbone to substitute the 16 lysines residues by arginine (Fig. 1A). The impact of the mutations on the stability of ERK3 was estimated from the steady-state levels of the ectopically expressed protein. An initial series of 9 double, triple or quadruple lysine mutants of ERK3 Δ were transiently transfected in HEK 293 cells and analyzed by immunoblotting. All these constructs were expressed at levels similar to the wild-type protein, suggesting that none of the individual lysines is absolutely essential for ERK3 ubiquitination *in vivo* (data not shown). To test the possible redundancy of these lysines, we then analyzed the different mutants in combination. The progressive elimination of up to 14 of the 16 putative lysine ubiquitination sites had no significant impact on ERK3 steady-state levels (data not shown). We finally constructed a lysine-less (0K) mutant of ERK3 Δ in an attempt to completely abolish ubiquitination. Surprisingly, we observed that ERK3 Δ -0K was expressed at a level comparable to wild-type ERK3, which is much lower than that of the stable ERK1 protein (Fig. 1B). All three constructs were translated with similar efficiency *in vitro* (Fig. 1B, lower panel). To determine whether the weak expression of ERK3 Δ and ERK3 Δ -0K was due to rapid turnover of the proteins, we measured their half-life by cycloheximide-chase experiments (Fig. 1C). We found that both ERK3 Δ and ERK3 Δ -0K are rapidly degraded with a half-life of approximately 45 min in exponentially proliferating cells, a value similar to the half-life of the full length ERK3 protein (14).

To exclude the possibility that the rapid degradation of ERK3 Δ -0K is due to misfolding of the mutated protein, we compared the *in vivo* phosphorylation status of wild-type ERK3 Δ with that of various mutants. ERK3 has been previously shown to be phosphorylated on the activation loop Ser-189 in intact cells (9, 14). Metabolic labeling experiments confirmed that the truncated ERK3 Δ is also phosphorylated *in vivo* (Fig. 1D). Replacement of Ser-189 by alanine almost completely suppressed ^{32}P incorporation, indicating that Ser-189 is the

major phosphorylation site of ERK3. The catalytically inactive mutant ERK3 Δ -KD was phosphorylated to the same extent as the wild-type protein, consistent with the idea that phosphorylation of Ser-189 is executed by a cellular ERK3 kinase (10). MAP kinase kinases are remarkably specific enzymes that recognize their targets only in the native conformation (38). In agreement with this, deletion of the extreme C-terminal end of ERK3 kinase domain (ERK3 Δ_{1-296}) is sufficient to abolish its phosphorylation by ERK3 kinase (Fig. 1D). Importantly, we observed that ERK3 Δ -0K is phosphorylated *in vivo*, albeit to a lesser extent than the wild-type protein (Fig. 1D). We conclude from these results that ERK3 Δ -0K mutant is correctly folded.

As previously reported for the native ERK3 protein (14), treatment with the structurally unrelated proteasome inhibitors MG-132 and lactacystin β -lactone induced the accumulation of both ERK3 Δ and the lysine-less mutant (Fig. 2A). Cycloheximide-chase experiments further confirmed that incubation with MG-132 strongly stabilizes ERK3 Δ and ERK3 Δ -0K proteins (Fig. 2B). These results indicate that ERK3 is actively degraded by the proteasome *in vivo* in the complete absence of lysine residues.

Lysine-less ERK3 is ubiquitinated and requires a functional ubiquitin pathway for its efficient degradation *in vivo*

Since previous reports have suggested that some proteins may be targeted to the proteasome without ubiquitination (44), we sought to evaluate the role of the ubiquitin pathway in ERK3 Δ -0K turnover. To this end, we measured the steady-state levels of ERK3 Δ and ERK3 Δ -0K in the *ts20* cell line that harbors a temperature-sensitive ubiquitin-activating enzyme E1 (11). As shown in Fig. 3A, both ERK3 Δ and ERK3 Δ -0K accumulated when *ts20* cells were shifted to the restrictive temperature (39°C). No change in expression was observed in parental A31 cells. Thus, degradation of a lysine-less mutant of ERK3 is still dependent on a functional ubiquitin conjugation pathway.

The above findings prompted us to ask whether ERK3 Δ -0K is ubiquitinated *in vivo*. To address this question, C-terminal His₆-tagged constructs of ERK3 were co-transfected with HA-tagged ubiquitin and the kinase was purified from cell lysates with Ni-agarose beads. Ubiquitination was monitored by immunoblotting with anti-HA antibody. A ladder of high

molecular weight bands corresponding to polyubiquitinated species of ERK3 was clearly detected for both ERK3 Δ and the lysine-less ERK3 Δ -0K mutant (Fig. 3B). ERK1 was used as negative control and show no specific polyubiquitin adducts under these conditions.

Addition of large N-terminal sequence tags stabilizes ERK3 through inhibition of N-terminal ubiquitination

With the exception of E1, E2 and HECT-type E3 enzymes that transiently become conjugated to monoubiquitin via an internal cysteine residue, ubiquitination of substrates absolutely requires an acceptor amino group (17, 20, 32). Moreover, the thiol ester bond formed between ubiquitin and cysteine is labile and highly sensitive to the reducing conditions of Laemmli's sample buffer (15, 21). Thus, the only possible conjugation site of ERK3 Δ -0K to ubiquitin is the free N-terminal NH₂ of the kinase. In the case of MyoD, it was clearly shown that chemical blocking of the α -NH₂ group completely stabilizes the protein in an *in vitro* degradation assay (7). Notably, these authors reported that addition of a 6 x Myc epitope tag at the N-terminus of MyoD also results in the stabilization of the protein by a mechanism poorly understood. To further test this idea, we generated a series of constructs of the full-length ERK3 (containing all 45 lysine residues) containing different tags at their N-terminus. As we previously observed (14), addition of small (\leq 0.5 kDa) epitope tags does not influence ERK3 expression. The His₆- (10 residues) and HA-(13 residues) tagged ERK3 constructs were expressed at levels similar to the untagged ectopic protein (Fig. 4A). Note that in these experimental conditions, these short epitope-tagged proteins are expressed at levels comparable to the endogenous ERK3 protein. Interestingly, addition of a 6 x Myc epitope or EGFP (yielding fusion proteins of 120 and 130 kDa, respectively) dramatically enhanced ERK3 expression (Fig. 4A, upper panel), without influencing the rate of *in vitro* translation (lower panel). This result suggested that the observed differences in steady-state levels likely reflect changes in the half-lives of the protein constructs. Indeed, cycloheximide-chase experiments confirmed that EGFP-ERK3 is at least 10 times more stable than His₆-ERK3 (Fig. 4B). Treatment with MG-132 induced a marked accumulation of His₆-ERK3, whereas it had little effect on the expression of EGFP-ERK3 (Fig 4C). Since Myc₆ and EGFP do not show significant sequence homology, the similar impact of the two tags suggests that the size of the sequence tag influences ERK3 protein stability. To directly test this idea, we constructed ERK3 versions containing 1, 3, 5 or 7 Myc epitope tags tandemly arrayed at the N-terminus. Results of this

experiment confirmed that the size of the tag has a strong influence on ERK3 accumulation; addition of 3 repeats of the Myc epitope was sufficient to increase the expression of the kinase (Fig. 4D). Cycloheximide-chase experiments clearly showed that these differences in steady-state expression result from changes in protein turnover (Fig. 4E). We conclude that addition of large N-terminal tags (larger than 5 kDa) is sufficient to stabilize ERK3. The presence of a large N-terminal tag also stabilized the lysine-less mutant of ERK3 (Fig. 4F), further substantiating the idea that N-terminal ubiquitination of ERK3 Δ -0K is necessary for its degradation by the proteasome. The stabilization of ERK3 Δ -0K by the 6 x Myc tag provides additional evidence that this mutant is properly folded *in vivo*.

To better understand the mechanism by which fusion of large sequence tags stabilizes ERK3 protein, we tested whether the position of the tag is important. We found that addition of EGFP to the C-terminus of ERK3 is completely inefficient in stabilizing the protein, again highlighting the importance of the N-terminal domain in the regulation of ERK3 degradation (Fig. 5A). We also compared the ubiquitination status of the two fusion proteins made between ERK3 and EGFP. Addition of EGFP to the N-terminus of ERK3 drastically inhibited the ubiquitination of the kinase (Fig. 5B), suggesting that the stabilizing effect of large N-terminal tags results in part from their ability to interfere with N-terminal ubiquitination.

The stabilizing effect of large N-terminal tags is specific to N-terminal ubiquitinated proteins

We next wanted to determine if the addition of large N-terminal tags specifically stabilizes N-terminal ubiquitinated proteins or also affects proteins ubiquitinated on internal lysine residues. To this end, we constructed a dual set of tagged vectors: one vector expresses the target protein with a single HA epitope tag at the N-terminus, while the second vector contains a larger tag of 5 x Myc epitopes placed upstream of the HA epitope sequence (Fig. 6A). Transfection of cells with each of the two vectors, followed by simple HA immunoblot analysis, will reflect the steady-state levels of the tagged proteins and should reveal whether addition of a larger N-terminal tag has a stabilizing effect. We first validated our assay using the stable ERK1 protein and ERK3. ERK1, which is not ubiquitinated

under these conditions, was expressed at the same extent with both vectors (Fig. 6B). In contrast, expression of ERK3 was greatly augmented by addition of the larger N-terminal tag (Fig. 6C).

We next tested our approach on additional substrates known to be ubiquitinated on internal lysines: p53, SOCS3 and I κ B α . p53 is ubiquitinated by MDM2 on C-terminal lysines, notably lysines 370, 372, 373, 381, 382 and 386 (34). SOCS3 and I κ B α are ubiquitinated on lysine 6 and on lysines 21 and 22, respectively (1, 36, 37). Mutation of these specific lysines is sufficient to stabilize the corresponding protein. Both SOCS3 and p53 are constitutively ubiquitinated in exponentially proliferating cells (26, 36). Addition of a large N-terminal tag did not result in the accumulation of either protein under these conditions (Fig. 6, D and E). In the case of I κ B α , degradation of the protein is induced by proinflammatory stimuli like tumor necrosis factor (TNF) α (2). We found that TNF α induces the degradation of both HA- and Myc₅HA-tagged I κ B α to a similar extent (Fig. 6F). In all of these examples, the proteins were *in vitro* translated with similar efficiency regardless of the N-terminal tag (Figs. 6B-F, lower panels). Importantly, the subcellular localization of the proteins tested was not affected by the nature of the tag (data not shown). These results suggest that stability of proteins ubiquitinated on lysine residues is not affected by the presence of large N-terminal tags.

We made the hypothesis that this assay could be used as a mean to identify proteins ubiquitinated on the N-terminus. As mentioned, the cyclin-dependent kinase inhibitor p21, like MyoD and ERK3, is degraded by the proteasome in a lysine-independent manner (40). The precise ubiquitination site of the protein has not been characterized, despite the fact that p21 is known to be polyubiquitinated *in vivo*. We recently observed that differentiation of C2C12 myoblasts into muscle cells is accompanied by a time-dependent accumulation of ERK3, which results in large part from the stabilization of the protein (14). Interestingly, the up-regulation of ERK3 shows a striking parallel to that of p21, a known marker of muscle differentiation (19, 29). These observations prompted us to test the impact of adding a large N-terminal tag on the expression of p21. Immunoblot analysis revealed that Myc₅HA-tagged p21 is expressed at levels at least 10 times higher than HA-p21 (Fig. 6G). Cycloheximide-chase experiments confirmed that the accumulation of p21 upon addition of

the large N-terminal tag results from stabilization of the protein (Fig. 6H). These results suggests that p21 is ubiquitinated on the NH₂ terminus *in vivo* and that this site is important for its efficient degradation.

N-terminal ubiquitination of p21 is necessary for its degradation *in vivo*

To investigate the role of the ubiquitin pathway in the proteasome-mediated degradation of p21 *in vivo*, we monitored by immunoblot analysis the steady-state levels of endogenous p21 in *ts20* and parental A31 cells. We found that p21 accumulates to very high levels when *ts20* cells are grown at the restrictive temperature (Fig. 7A). Because p21 is a direct transcriptional target of p53, the up-regulation of p21 may be a consequence of the accumulation of p53 in *ts20* cells as previously documented (11). To directly test the importance of ubiquitination in regulating the turnover of p21, we measured the half-life of the protein by cycloheximide-chase experiments in *ts20* cells grown at the permissive or restrictive temperature. Inactivation of the E1 enzyme clearly stabilized the endogenous p21 protein (Fig. 7B). The half-life of p21 is ~15-30 min in exponentially proliferating *ts20* cells cultured at 34°C, and increases to more than 4 h when the temperature is shifted to 39°C. The ectopically expressed p21 protein also accumulated at the restrictive temperature in *ts20* cells (Fig. 7C). These results indicate that degradation of p21 is dependent on a functional ubiquitin conjugation pathway.

Results presented in Fig. 6 suggest that p21 might be ubiquitinated on its N-terminus in intact cells. If this is indeed the case, a lysine-less version of p21 should accumulate to the same extent as the wild-type protein in *ts20* cells grown at 39°C. We thus constructed a lysine-less mutant of p21 by replacing all 6 lysines by arginine residues. In A31 and HEK 293 cells, p21-0K was expressed at steady-state levels comparable to the wild-type protein (Fig. 7, C and D). Moreover, the p21-0K mutant similarly accumulated to high levels in *ts20* cells grown at the restrictive temperature (Fig. 7C), thereby indicating that degradation of lysine-less p21 is also dependent on ubiquitination. We next sought to determine if p21 is ubiquitinated in a lysine-independent fashion *in vivo*. Cotransfection experiments with HA-ubiquitin confirmed previous observations (26, 40) that p21 is polyubiquitinated in intact cells (Fig. 7D). Importantly, we also detected the presence of high molecular weight immunoreactive species (~66-200 kDa) of p21-0K, indicative of polyubiquitin conjugates.

Together, our results are consistent with the idea that N-terminal ubiquitination of p21 targets the protein for proteasomal degradation.

Identification of N-terminal ubiquitin conjugates of ERK3 and p21 by mass spectrometry

To unequivocally demonstrate that ERK3 and p21 are ubiquitinated at the N-terminus, we analyzed whole tryptic digests of purified HA-ERK3 Δ -GST and HA-p21-GST fusion proteins (Fig. 8A) by tandem mass spectrometry. A two-dimensional separation approach using on-line strong cation exchange (SCX) and reverse-phase chromatography was devised in order to simplify the peptide distribution obtained from the nanoLC-MS analyses. Approximately 3,500 MS-MS spectra were acquired for each set of the 9 SCX salt fractions. These MS-MS analyses enabled the identification of ERK3 Δ and p21 fusion proteins with sequence coverage of 37% and 42%, respectively. Both proteins comprised an N-terminus HA peptide sequence that could not be identified directly from the database search. Rather, manual identification of the peptide bearing the desired HA sequence was facilitated by searching the list of MS-MS spectra for characteristic y-type fragment ion series. More specifically, the presence of two prolines in the expected HA-containing tryptic peptide MYDVPDYASLPGNYR gave rise to abundant y5 and y9 fragment ions at m/z 606.3 and 1252.6, respectively. The search of all MS-MS spectra containing these characteristic ions revealed several peptide candidates all comprising the N-terminus methionine residue. Importantly, the tryptic HA peptide was detected under three distinct forms: unmodified free amine (M: 1759.6 Da), N α -acetylated (M: 1801.6 Da) and conjugated to a short Gly-Gly ubiquitin tag (M: 1855.6 Da) at the N-terminus. The later peptide corresponded to a dehydrated form whereby the amine of the terminal glycine is cyclized to the carboxylic group of the neighboring aspartate residue. This condensation is possibly a reaction by-product of the tryptic digestion during which the free amine of the diglycine ubiquitin tag is formed. This assignment was supported by the MS-MS spectrum of the doubly-charged precursor ion at m/z 928.8, where a distinct b5 ion at m/z 506.1 was assigned to the cyclized GGMVD fragment ion (Fig. 8B). It is noteworthy that this ion was unique to the cyclized diglycine HA peptide and was not observed for either the N α -acetylated or the free amine form of the same peptide (data not shown). Rationalization of the MS-MS spectrum of the cyclized diglycine HA peptide is shown in Fig. 8B along with

the y-type fragment ion series. Essentially the same spectra were obtained for ERK3 and p21. These data provide the first direct evidence for N-terminal ubiquitination of a protein substrate.

DISCUSSION

We demonstrate that the atypical MAP kinase homologue ERK3 and the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 are ubiquitinated on their NH₂ terminus. With the transcriptional activator MyoD (7), ERK3 and p21 are the second and third example of a mammalian protein ubiquitinated in that fashion. This conclusion is based on the following evidences. First, lysine-less versions of both proteins are degraded by the proteasome with kinetics similar to the wild-type protein *in vivo*. In contrast, lysine-less mutants of cyclin E (12) or Sic1 (31) are very stable *in vivo*, indicating that these proteins require internal lysine(s) for efficient ubiquitination and degradation. Second, *in vivo* degradation of ERK3 and p21 lysine-less mutants is absolutely dependent on a functional ubiquitin conjugation pathway. Third, we clearly detect polyubiquitin conjugates of lysine-less ERK3 and p21 proteins. Fourth, we show that addition of N-terminal tags of increasing size stabilizes ERK3 and p21 by specifically interfering with their ubiquitination. Finally, and most importantly, we demonstrate the existence of a fusion peptide between the N-terminal methionine of ERK3 and p21 constructs and the C-terminal glycine of ubiquitin in intact cells.

Recent studies have shown that positioning of the ubiquitin attachment site is critical for efficient polyubiquitination and proteasome recognition. Petroski and Deshaies have shown that the context of the ubiquitin acceptor site in Sic1 affects the targeting property of the polyubiquitin chain (31). Ubiquitination of C-terminal Sic1 lysines occurs slowly, while producing substrates poorly recognized by the 26S proteasome. In contrast, the 6 N-terminal lysine residues are more efficiently ubiquitinated *in vitro* and assemble ubiquitin chains that are more competent for degradation by the proteasome. Interestingly, these authors also showed that a single polyubiquitin chain can support efficient proteasomal degradation *in vitro*. The results presented here suggest that the N-terminal amine of ERK3 and p21 is both necessary and sufficient to sustain efficient degradation by the proteasome in intact cells. Accordingly, lysine-less mutants of ERK3 and p21 have half-lives similar to their wild-type counterparts. Our findings further substantiate the idea that a single ubiquitin chain is sufficient to efficiently target a protein substrate to the proteasome *in vivo*.

A recent structural study has also highlighted the importance of ubiquitin acceptor site positioning. The X-ray structure of the ternary complex Skp1/ β -trcp1/ β -catenin has revealed that the amino group, provided by a lysine in this case, must be properly placed to be efficiently ubiquitinated by SCF ^{β -trcp1} (45). For example, displacing the lysine acceptor by 19 residues can decrease the apparent *in vitro* ubiquitination rate by a factor of 3. Here, we show that addition of sequence tags at the N-terminus affects greatly the ubiquitination status and stability of ERK3 and p21 *in vivo*. Most importantly, we show that the size of the tag and not its primary sequence is important for this effect. Small tags comprising less than 13 residues have a minimal impact, whereas tags larger than 5 kDa very efficiently inhibit protein ubiquitination and degradation. The observation that 3 Myc epitopes is sufficient to stabilize ERK3 is in good agreement with the results of Sheaff et al. (40) who showed that addition of 3 x Myc tag stabilizes expression of p21 by about 3 fold. Thus, our results support the notion that the E3 ligase active site has a limited range of action and that displacing the NH₂ acceptor site can greatly influence the rate of catalysis. Alternatively, the presence of large N-terminal tags may sterically interfere with the binding of the E3 to the substrate. More detailed *in vitro* studies with purified E3 ligases will allow to discriminate between these possibilities.

It has been previously reported that the cell cycle inhibitor p21 is degraded by the proteasome in a ubiquitin-independent manner (3, 23, 40). This conclusion was based mainly on two sets of arguments. First, the apparent lack of involvement of the ubiquitin conjugation pathway in regulating p21 turnover based on the fact that a lysine-less mutant of p21 was degraded at the same rate as wild-type p21 in intact cells. In addition, Sheaff et al. (40) reported that overexpression of a ubiquitin mutant (UbR7) that stabilizes cyclin E expression had no apparent effect on the steady-state levels of p21. However, the half-life of p21 was not measured in UbR7transfected cells and it is not known if this mutant ubiquitin is used by all classes of E3 ligases with similar efficiency *in vivo*. Here, we used a robust genetic approach with an E1 temperature-sensitive cell line to evaluate the importance of the ubiquitin conjugation pathway in the *in vivo* degradation of p21. We unambiguously demonstrate that both endogenous and ectopically expressed wild-type or lysine-less p21 are degraded in a ubiquitin-dependent manner. The second evidence for ubiquitin-independent degradation of p21 was the inability to detect ubiquitin conjugates of

a lysine-less p21 mutant *in vivo*. In contrast to these studies, we clearly detected polyubiquitin conjugates of this mutant. Why polyubiquitination of p21-0K was not detected earlier? Our results reveal the presence of two apparent populations of ubiquitinated species of ERK3 and p21 with “high” molecular and “low” molecular weight ubiquitin adducts (Figs. 3 and 7). However, we notice the absence of low molecular weight ubiquitin conjugates for both the ERK3-0K and p21-0K mutants, whereas higher molecular weight adducts are detected. Thus, the lack of detection of low molecular weight ubiquitination species could lead to the wrong conclusion that a lysine-less mutant is not ubiquitinated *in vivo* (see figure 7D, middle panel for example).

The physiological significance of N-terminal ubiquitination remains to be established. In the case of ERK3, accumulating evidence suggest that N-terminal ubiquitination plays a critical role in regulating the effect of the kinase on cell proliferation. In a recent study, we showed that expression of stable ERK3 chimeras (in which ERK3 degrons were replaced by analogous ERK1 sequences) strongly inhibits S-phase entry in fibroblasts (14). In contrast, expression of unstable wild-type ERK3 protein had no significant effect on cell cycle progression. Notably, we observed that ectopic expression of Myc₆-ERK3 also potently inhibits entry of cells into S phase (24). These observations, together with the findings reported here, suggest that N-terminal ubiquitination is essential to repress the negative regulatory effect of ERK3 on cell cycle progression. However, our results do not exclude the possibility that ubiquitination of internal lysine residues may contribute in some way to the regulation of ERK3 or p21. Indeed, the absence of low molecular weight ubiquitin adducts in lysine-less mutants suggests that these ubiquitin chains are normally conjugated to internal lysine residues. Based on their apparent size, these conjugates may contain 1-5 ubiquitin molecules; although it is not known if these adducts occur on one or multiple lysine(s). Based on the fact that lysine-less mutants of ERK3 and p21 have half-lives very similar to the wild-type protein, we conclude that these low molecular weight ubiquitin conjugates play a minor role if any in proteasomal targeting. Modification by mono or short ubiquitin species may serve other function than proteolysis, such as regulation of subcellular localization (22).

During the course of this work, Pagano and co-workers (4) have independently shown that p21 is ubiquitinated on its NH₂ terminus *in vivo*. In agreement with the findings reported here, these authors have shown that p21 degradation is dependent on a functional ubiquitin system and that addition of a 6 x Myc tag stabilizes the protein. However, contrary to what we observed for ERK3, they suggested that the stabilization effect of the 6 x Myc tag does not result from inhibition of p21 ubiquitination. This discrepancy may be intrinsic to the studied proteins or may result from differences in experimental procedures. The identification of additional proteins ubiquitinated on the NH₂ terminus will help clarify this issue.

One of the key questions that need to be addressed is the identity of the ubiquitin ligase(s) responsible for the polyubiquitination of ERK3 and p21. In the case of p21, different E3 ligases have been implicated in the regulation of its degradation. The SCF^{Skp2} ligase was found to catalyze the ubiquitination of p21 *in vitro* and to participate in the degradation of p21 specifically during S phase of the cell cycle (5). SCF^{Skp2} was also implicated in the rapid degradation of p21 in response to low doses of UV light (3). Consistent with these findings, treatment of cells with antisense oligonucleotides to Cul1, Skp1 or Skp2 leads to the accumulation of p21 (46), and physical complexes of Skp2 and p21 can be found in intact cells (3). However, p21 half-life is unchanged in asynchronous Skp2^{-/-} MEFs (3) and the inhibitor is also unstable in post-mitotic cells in the absence of Skp2 expression. These observations argue that additional ubiquitin ligases contribute to the proteasomal degradation of p21, that may be specific to the cell cycle phase or cellular context. The ring-finger MDM2 is another E3 ligase that binds to p21 and has been shown to promote its degradation by the proteasome (23).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank D. Bohmann, G. Ferbeyre, J. Hiscott, H. Ozer, B. Vogelstein, A.J. Waskiewicz and A. Yoshimura for reagents. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). P.C. is recipient of a studentship from the National Cancer Institute of Canada. G.R. is recipient of the Anna D. Barker Fellowship of the American Association for Cancer Research. S.M. holds a Canada Research Chair in Cellular Signaling.

REFERENCES

1. **Baldi, L., K. Brown, G. Franzoso, and U. Siebenlist.** 1996. Critical role for lysines 21 and 22 in signal-induced, ubiquitin-mediated proteolysis of I kappa B-alpha. *J. Biol. Chem.* **271**:376-379.
2. **Beg, A. A., T. S. Finco, P. V. Nantermet, and A. S. Baldwin, Jr.** 1993. Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Mol. Cell Biol.* **13**:3301-3310.
3. **Bendjennat, M., J. Boulaire, T. Jascur, H. Brickner, V. Barbier, A. Sarasin, A. Fotedar, and R. Fotedar.** 2003. UV irradiation triggers ubiquitin-dependent degradation of p21(WAF1) to promote DNA repair. *Cell* **114**:599-610.
4. **Bloom, J., V. Amador, F. Bartolini, G. DeMartino, and M. Pagano.** 2003. Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitylation. *Cell* **115**:71-82.
5. **Bornstein, G., J. Bloom, D. Sitry-Shevah, K. Nakayama, M. Pagano, and A. Hershko.** 2003. Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J. Biol. Chem.* **278**:25752-25757.
6. **Boulton, T. G., S. H. Nye, D. J. Robbins, N. Y. Ip, E. Radziejewska, S. D. Morgenbesser, R. A. DePinho, N. Panayotatos, M. H. Cobb, and G. D. Yancopoulos.** 1991. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**:663-675.
7. **Breitschopf, K., E. Bengal, T. Ziv, A. Admon, and A. Ciechanover.** 1998. A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein EMBO J. **17**:5964-5973.
8. **Cayrol, C., and B. Ducommun.** 1998. Interaction with cyclin-dependent kinases and PCNA modulates proteasome-dependent degradation of p21. *Oncogene* **17**:2437-2444.
9. **Cheng, M., T. G. Boulton, and M. H. Cobb.** 1996. ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**:8951-8958.
10. **Cheng, M., E. Zhen, M. J. Robinson, D. Ebert, E. Goldsmith, and M. H. Cobb.** 1996. Characterization of a protein kinase that phosphorylates serine 189 of the mitogen-activated protein kinase homolog ERK3. *J. Biol. Chem.* **271**:12057-12062.
11. **Chowdary, D. R., J. J. Dermody, K. K. Jha, and H. L. Ozer.** 1994. Accumulation of p53 in a mutant cell line defective in the ubiquitin pathway. *Mol. Cell Biol.* **14**:1997-2003.
12. **Clurman, B. E., R. J. Sheaff, K. Thress, M. Groudine, and J. M. Roberts.** 1996. Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev.* **10**:1979-1990.
13. **Coffino, P.** 2001. Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:188-194.
14. **Coulombe, P., G. Rodier, S. Pelletier, J. Pellerin, and S. Meloche.** 2003. Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol. Cell Biol.* **23**:4542-4558.

15. **Deffenbaugh, A. E., K. M. Scaglione, L. Zhang, J. M. Moore, T. Buranda, L. A. Sklar, and D. Skowyra.** 2003. Release of ubiquitin-charged Cdc34-S-Ub from the RING domain is essential for ubiquitination of the SCF(Cdc4)-bound substrate Sic1. *Cell* **114**:611-622.
16. **el Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein.** 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**:817-825.
17. **Glickman, M. H., and A. Ciechanover.** 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* **82**:373-428.
18. **Guan, K. L., and J. E. Dixon.** 1991. Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal. Biochem.* **192**:262-267.
19. **Halevy, O., B. G. Novitch, D. B. Spicer, S. X. Skapek, J. Rhee, G. J. Hannon, D. Beach, and A. B. Lassar.** 1995. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* **267**:1018-1021.
20. **Hershko, A., and A. Ciechanover.** 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:425-479.
21. **Hershko, A., H. Heller, S. Elias, and A. Ciechanover.** 1983. Components of ubiquitinprotein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* **258**:8206-8214.
22. **Hicke, L.** 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:195-201.
23. **Jin, Y., H. Lee, S. X. Zeng, M. S. Dai, and H. Lu.** 2003. MDM2 promotes p21waf1/cip1 proteasomal turnover independently of ubiquitylation. *EMBO J.* **22**:6365-6377.
24. **Julien, C., P. Coulombe, and S. Meloche.** 2003. Nuclear export of ERK3 by a CRM1dependent mechanism regulates its inhibitory action on cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* **278**:42615-42624.
25. **Liu, C. W., M. J. Corboy, G. N. DeMartino, and P. J. Thomas.** 2003. Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science* **299**:408-411.
26. **Maki, C. G., and P. M. Howley.** 1997. Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol. Cell Biol.* **17**:355-363.
27. **Meloche, S., B. G. Beatty, and J. Pellerin.** 1996. Primary structure, expression and chromosomal locus of a human homolog of rat ERK3. *Oncogene* **13**:1575-1579.
28. **Pagano, M., and R. Benmaamar.** 2003. When protein destruction runs amok, malignancy is on the loose. *Cancer Cell* **4**:251-256.
29. **Parker, S. B., G. Eichele, P. Zhang, A. Rawls, A. T. Sands, A. Bradley, E. N. Olson, J. W. Harper, and S. J. Elledge.** 1995. p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* **267**:1024-1027.
30. **Pearson, G., F. Robinson, G. T. Beers, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, and M. H. Cobb.** 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* **22**:153-183.
31. **Petroski, M. D., and R. J. Deshaies.** 2003. Context of multiubiquitin chain attachment influences the rate of Sic1 degradation. *Mol. Cell* **11**:1435-1444.
32. **Pickart, C. M.** 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:503-533.

33. **Rodier, G., A. Montagnoli, L. Di Marcotullio, P. Coulombe, G. F. Draetta, M. Pagano, and S. Meloche.** 2001. p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis. *EMBO J.* **20**:6672-6682.
34. **Rodriguez, M. S., J. M. Desterro, S. Lain, D. P. Lane, and R. T. Hay.** 2000. Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell Biol.* **20**:8458-8467.
35. **Rousseau, D., D. Cannella, J. Boulaire, P. Fitzgerald, A. Fotedar, and R. Fotedar.** 1999. Growth inhibition by CDK-cyclin and PCNA binding domains of p21 occurs by distinct mechanisms and is regulated by ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* **18**:4313-4325.
36. **Sasaki, A., K. Inagaki-Ohara, T. Yoshida, A. Yamanaka, M. Sasaki, H. Yasukawa, A. E. Koromilas, and A. Yoshimura.** 2003. The N-terminal truncated isoform of SOCS3 translated from an alternative initiation AUG codon under stress conditions is stable due to the lack of a major ubiquitination site, Lys-6. *J. Biol. Chem.* **278**:2432-2436.
37. **Scherer, D. C., J. A. Brockman, Z. Chen, T. Maniatis, and D. W. Ballard.** 1995. Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:11259-11263.
38. **Seeger, R., N. G. Ahn, J. Posada, E. S. Munar, A. M. Jensen, J. A. Cooper, M. H. Cobb, and E. G. Krebs.** 1992. Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J. Biol. Chem.* **267**:14373-14381.
39. **Servant, M. J., P. Coulombe, B. Turgeon, and S. Meloche.** 2000. Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J. Cell Biol.* **148**:543-556.
40. **Sheaff, R. J., J. D. Singer, J. Swanger, M. Smitherman, J. M. Roberts, and B. E. Clurman.** 2000. Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol. Cell* **5**:403-410.
41. **Tofaris, G. K., R. Layfield, and M. G. Spillantini.** 2001. alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome. *FEBS Lett.* **509**:22-26.
42. **Treier, M., L. M. Staszewski, and D. Bohmann.** 1994. Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell* **78**:787-798.
43. **Turgeon, B., B. F. Lang, and S. Meloche.** 2002. The protein kinase ERK3 is encoded by a single functional gene: genomic analysis of the ERK3 gene family. *Genomics* **80**:673-680.
44. **Verma, R., and R. J. Deshaies.** 2000. A proteasome howdunit: the case of the missing signal. *Cell* **101**:341-344.
45. **Wu, G., G. Xu, B. A. Schulman, P. D. Jeffrey, J. W. Harper, and N. P. Pavletich.** 2003. Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP1) ubiquitin ligase. *Mol. Cell* **11**:1445-1456.
46. **Yu, Z. K., J. L. Gervais, and H. Zhang.** 1998. Human CUL-1 associates with the SKP1/SKP2 complex and regulates p21(CIP1/WAF1) and cyclin D proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:11324-11329.

LEGENDS TO FIGURES

FIG. 1. A lysine-less mutant of ERK3 is unstable. (A) Schematic representation of ERK3 Δ constructs showing the position of lysines mutated in this study. (B) HEK 293 cells were transfected with the indicated constructs. After 48 h, cell lysates were analyzed by immunoblotting with anti-HA antibody. Two different exposures of the gel are shown (upper panels). The same constructs were translated *in vitro* in the presence of ^{35}S -labeled amino acids and analyzed by fluorography (lower panel). (C) HEK 293 cells transfected with the different ERK3 constructs were treated with cycloheximide (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for the indicated times. Ectopically expressed ERK3 was detected by HA immunoblotting. (D) HEK 293 cells were transfected with Myc₆-tagged ERK3 Δ , ERK3 Δ kinase-dead (KD), ERK3 Δ Ser189Ala (S189A), ERK3 Δ -0K or ERK3 Δ ₁₋₂₉₆. The cells were metabolically labeled with ^{32}P i and the transfected ERK3 proteins were immunoprecipitated with anti-Myc antibody. Phosphorylation was revealed by autoradiography (upper panel). Aliquots of cell lysates were analyzed by immunoblotting to monitor expression of the ectopic proteins (lower panel).

FIG. 2. ERK3 is degraded by the proteasome in a lysine-independent manner. (A) HEK 293 cells were transfected with HA-tagged ERK3 Δ or ERK3 Δ -0K constructs. After 36 h, the cells were treated for 12 h with the protease inhibitors MG-132 (25 μM), E-64 (25 μM), lactacystin β -lactone (20 μM) or vehicle (DMSO 0.1%). Ectopically expressed ERK3 was detected by HA immunoblotting. (B) HEK 293 cells were transfected as above. After 44 h, the cells were pretreated with DMSO or MG-132 for 30 min. Then, cycloheximide was added for a period of 4 h. Cell lysates were analyzed by HA immunoblotting.

FIG. 3. Lysine-less ERK3 is ubiquitinated *in vivo* and requires a functional ubiquitin conjugation pathway for its efficient degradation. (A) Parental Balb/c 3T3 (A31) and E1-thermosensitive mutant (ts20) cells were transfected with the indicated ERK3 constructs or empty vector (V). After 24 h, the cells were maintained at the permissive temperature (34°C) or shifted to the restrictive temperature (39°C) for the indicated times. Ectopically expressed ERK3 was detected by HA immunoblotting. (B) HEK 293 cells were cotransfected with expression vectors encoding ERK1, ERK3 Δ , or ERK3 Δ -0K together

with HA-tagged ubiquitin. The protein kinase constructs contain a N-terminal HA-tag and a C-terminal His₆ affinity tag. After 36 h, the cells were treated with MG-132 for 12 h. His₆-tagged proteins were purified from cell lysates with nickel-agarose beads and analyzed by immunoblotting with anti-HA antibody (upper panel). Asterisks mark non-specific bands. Total cell lysates were analyzed for global ubiquitination activity by HA immunoblotting (lower panel).

FIG. 4. Addition of large N-terminal tags stabilizes ERK3 expression. **(A)** HEK 293 cells were transfected with the indicated constructs. After 48 h, endogenous and ectopic ERK3 were detected by immunoblotting using antibody E3-CTD4, which specifically recognizes ERK3 C-terminus (upper panel). The asterisk marks a non-specific band. The same constructs were translated *in vitro* in the presence of ³⁵S-labeled amino acids and analyzed by fluorography (lower panel). **(B)** HEK 293 cells were transfected with ERK3 constructs or empty vector (V). After 48 h, the cells were treated with cycloheximide for the indicated times. His₆-ERK3 was purified from cell lysates with nickel-agarose beads and detected by immunoblotting with antibody E3-CTD4 (upper panel). EGFP-ERK3 was analyzed by immunoblotting using anti-GFP antibody (lower panel). **(C)** HEK 293 cells were transfected as in B and treated with MG-132 (25 μM) for 12 h. **(D)** N-terminal tags larger than >5 kDa enhance ERK3 expression. HEK 293 cells were transfected with ERK3 constructs tagged at their N-terminus with an increasing number of copies of the Myc epitope. After 48 h, endogenous and transfected ERK3 were detected by immunoblotting with E3-CTD4 antibody (upper panel). The same constructs were *in vitro* translated and detected by fluorography (lower panel). **(E)** The half-lives of ectopically expressed Myc₁-ERK3 (upper panel) and Myc₃-ERK3 (lower panel) were evaluated by cycloheximide-chase. **(F)** The half-lives of Myc₆-ERK3Δ (upper panel) and Myc₆-ERK3Δ-0K (lower panel) were evaluated as in E.

FIG. 5. The presence of a large N-terminal tag inhibits ERK3 ubiquitination. **(A)** HEK 293 cells were transfected with ERK3 constructs fused to the EGFP sequence at the N-terminal or C-terminal extremity. The transfected proteins were detected by immunoblotting with anti-GFP antibody (upper panel). The same constructs were *in vitro* translated and detected by fluorography (lower panel). **(B)** HEK 293 cells were cotransfected with the indicated

ERK3-EGFP fusion constructs together with HA-ubiquitin. The ERK3 constructs contain the GST sequence at the C-terminus to allow for specific and quantitative recovery of the transfected proteins. After 36 h, the cells were treated with MG-132 for 12 h. Transfected proteins were purified from cell lysates with glutathion-agarose beads and comparable amounts of ERK3EGFP fusion proteins were analyzed. Ubiquitin conjugates were detected by anti-HA immunoblotting (upper panel). The membrane was reprobbed with anti-EGFP antibody to confirm that an equivalent amount of ERK3 fusion proteins was loaded on the gel (middle panel). Total cell lysates were analyzed for global ubiquitination activity by HA immunoblotting (lower panel).

FIG. 6. Addition of large N-terminal tags stabilizes expression of ERK3 and p21, but not that of proteins ubiquitinated on internal lysine residues. (A) Schematic representation of the constructs used in these experiments. Note that proteins expressed from these two vectors are tagged with a single HA epitope. (B-E) HEK 293 cells were transfected with empty vector, or with either HA- or M₅HA-tagged expression vectors encoding ERK1 (B), ERK3 (C), SOCS3 (D), and p53 (E). After 48 h, the HA-tagged proteins were detected by immunoblotting with anti-HA antibody (upper panel). Asterisk denotes a non-specific band. The same constructs were translated *in vitro* (IVT) and analyzed by anti-HA immunoblotting (lower panel). (F) HEK 293 cells were transfected with the same vectors encoding IκBα. After 24 h, the cells were serum-starved for 24 h, and then treated or not with TNFα (50 ng/mL) for 30 min in the presence of cycloheximide. HA-tagged proteins were detected as in B. (G) HEK 293 cells were transfected with HA- or M₅HA-tagged p21. After 48 h, the expression of ectopic p21 was monitored by HA immunoblotting. (H) HEK 293 cells transfected with p21 expression vectors were treated with cycloheximide for the indicated times. HA-tagged proteins were detected as in B.

FIG. 7. Degradation of lysine-less p21 is dependent on a functional ubiquitin conjugation pathway. (A) Parental A31 and E1-mutant ts20 cells were cultured at 34°C or 39°C for the indicated times. Expression of endogenous p21 was monitored by immunoblotting with anti-p21 antibody. (B) Half-life of endogenous p21 was measured by cycloheximide-chase experiments in ts20 cells grown for 12 h at the permissive or restrictive temperature. (C) A31 or ts20 cells were transfected with the indicated p21 constructs or empty vector (V).

The p21 constructs contain a N-terminal HA-tag and a C-terminal His₆ tag. After 24 h, the cells were maintained at 34°C or 39°C for the indicated times. Ectopically expressed p21 proteins were purified from cell lysates with nickel-agarose beads and analyzed by immunoblotting with anti-HA antibody. **(D)** HEK 293 cells were cotransfected with the indicated p21 expression vectors together with HA-tagged ubiquitin. After 36 h, the cells were treated with MG-132 for 12 h. His₆-tagged proteins were purified from cell lysates with nickel-agarose beads. Half of the purified material was separated on a 7.5% gel (upper panel), while the other half was loaded on a 12% gel (middle panel). Ubiquitin conjugates were detected by HA immunoblotting. The arrow indicates the position of the non-ubiquitinated p21 protein. Asterisk marks a non-specific band. Total cell lysates were analyzed for global ubiquitination activity by HA immunoblotting (lower panel).

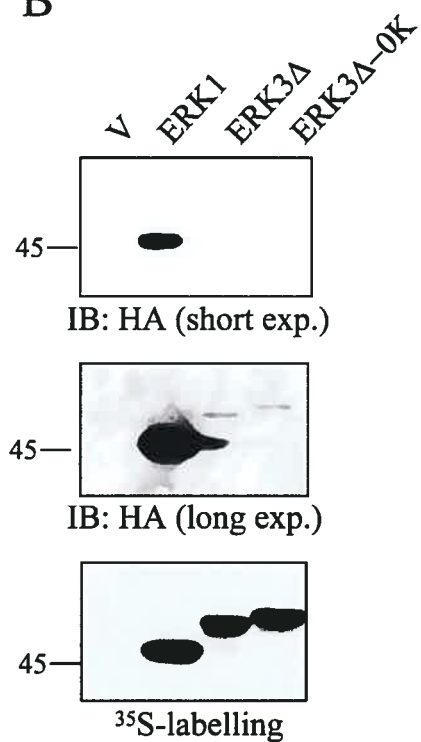
FIG. 8. Identification of N-terminally ubiquitinated ERK3 and p21 by MS/MS. **(A)** Schematic representation of the constructs used in this study. The ERK3 Δ and p21 fusion proteins are tagged with a N-terminus HA peptide, which upon tryptic digestion releases the sequence **MYDV****PDYAS**LPGN Δ YR (bold-type characters identify HA peptide) together with an extra diglycine derived from the C-terminus of ubiquitin. **(B)** HEK 293 cells were transfected with the indicated constructs and treated for 12 h with MG-132. The transfected proteins were purified from cell lysates with glutathion-agarose beads and analyzed by LC-MS/MS. The fragmentation pattern of the ubiquitinated N-terminus HA peptide is shown. The tandem mass spectrum of the doubly-protonated precursor ion at m/z 928.8 shows a series of y-type fragment ions arising from peptide cleavage with charge retention at the C-terminus, thus confirming the expected HA peptide sequence containing the methionine residue. The cyclization of the amine of the terminal glycine to the neighboring aspartate residue is supported by a characteristic b5 fragment ion at m/z 506.1 corresponding to the cleavage of the amide bond with charge retention at the N-terminus.

FIGURE 1

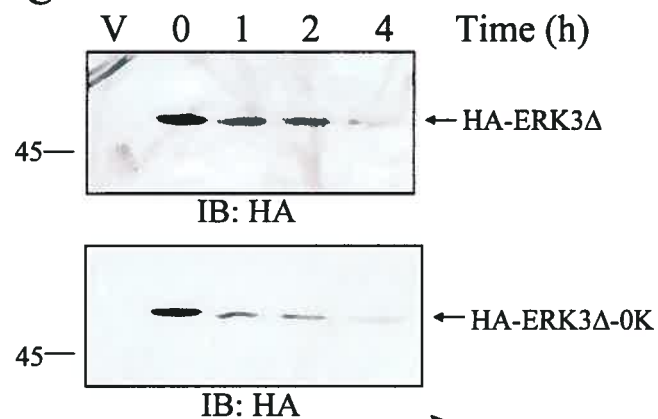
A



B



C



D

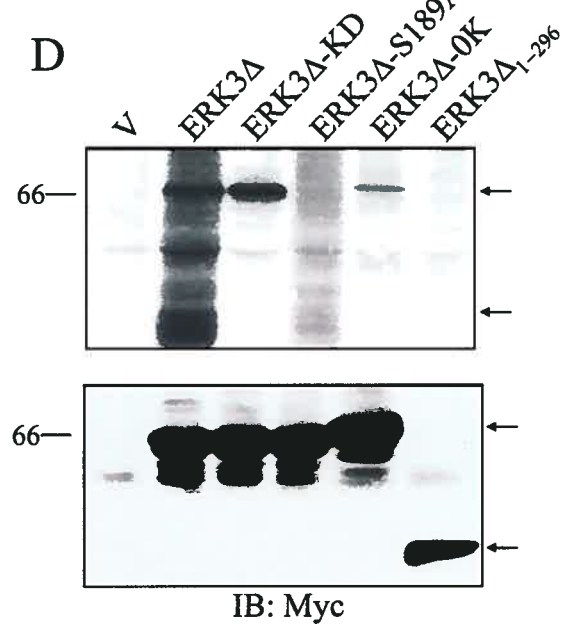


FIGURE 2

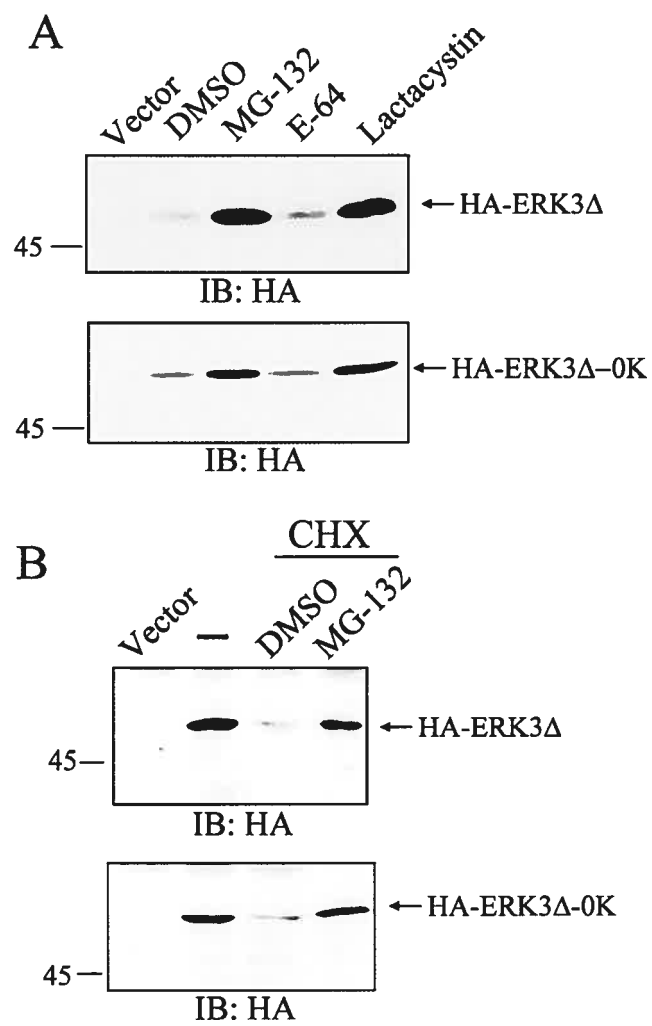


FIGURE 3

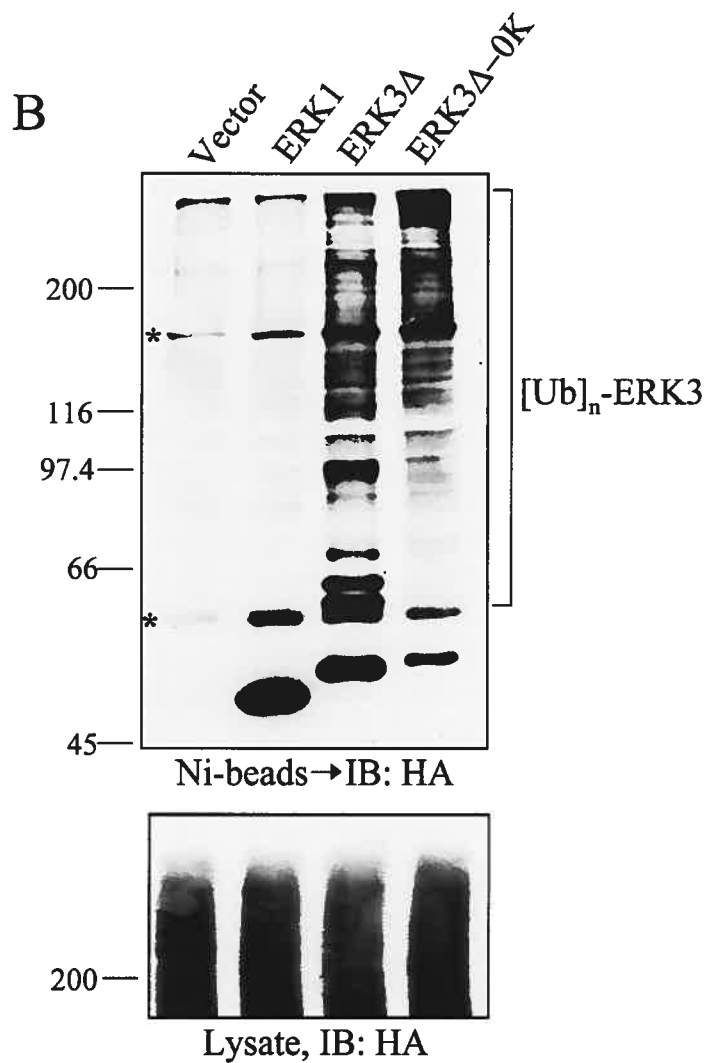
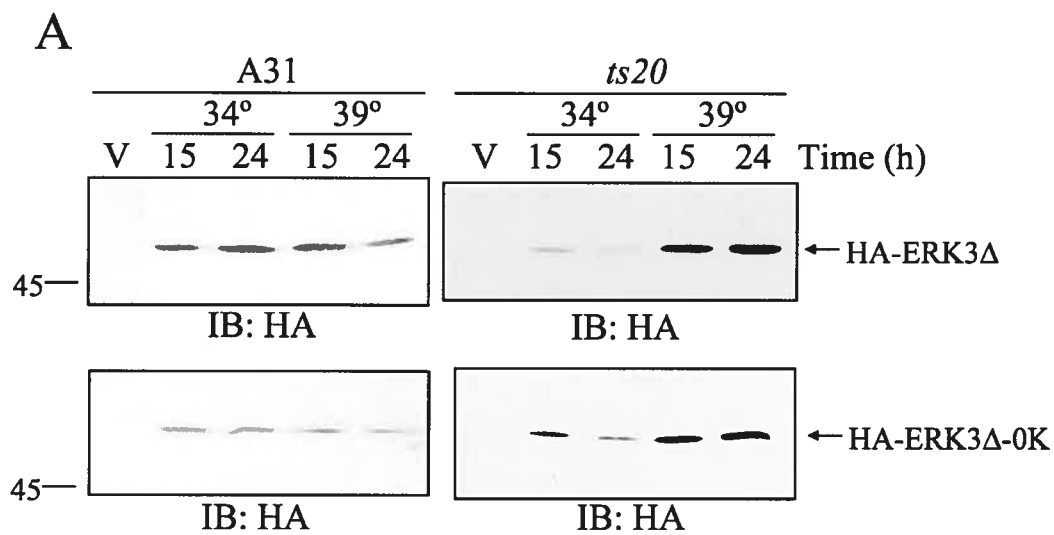


FIGURE 4

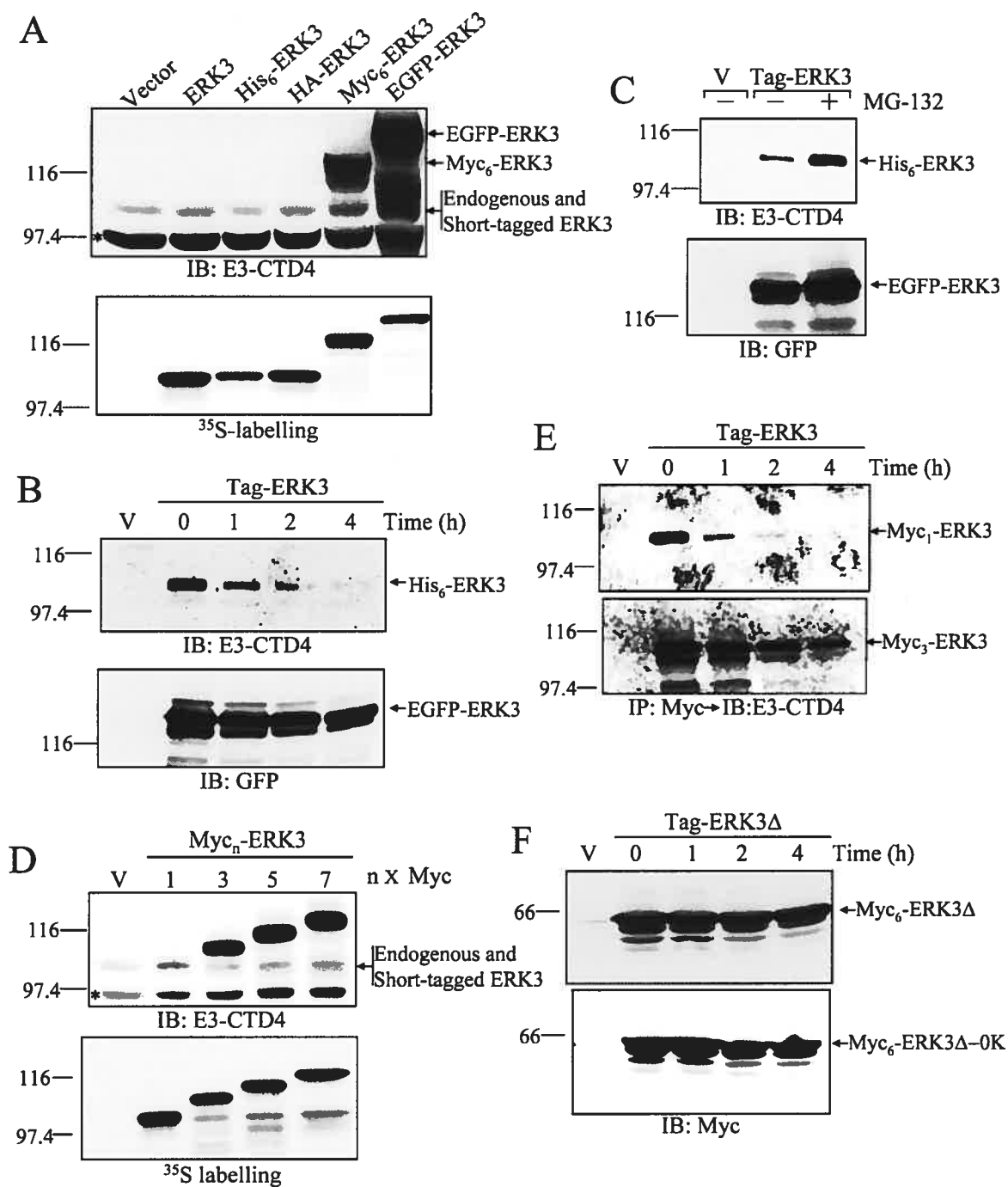


FIGURE 5

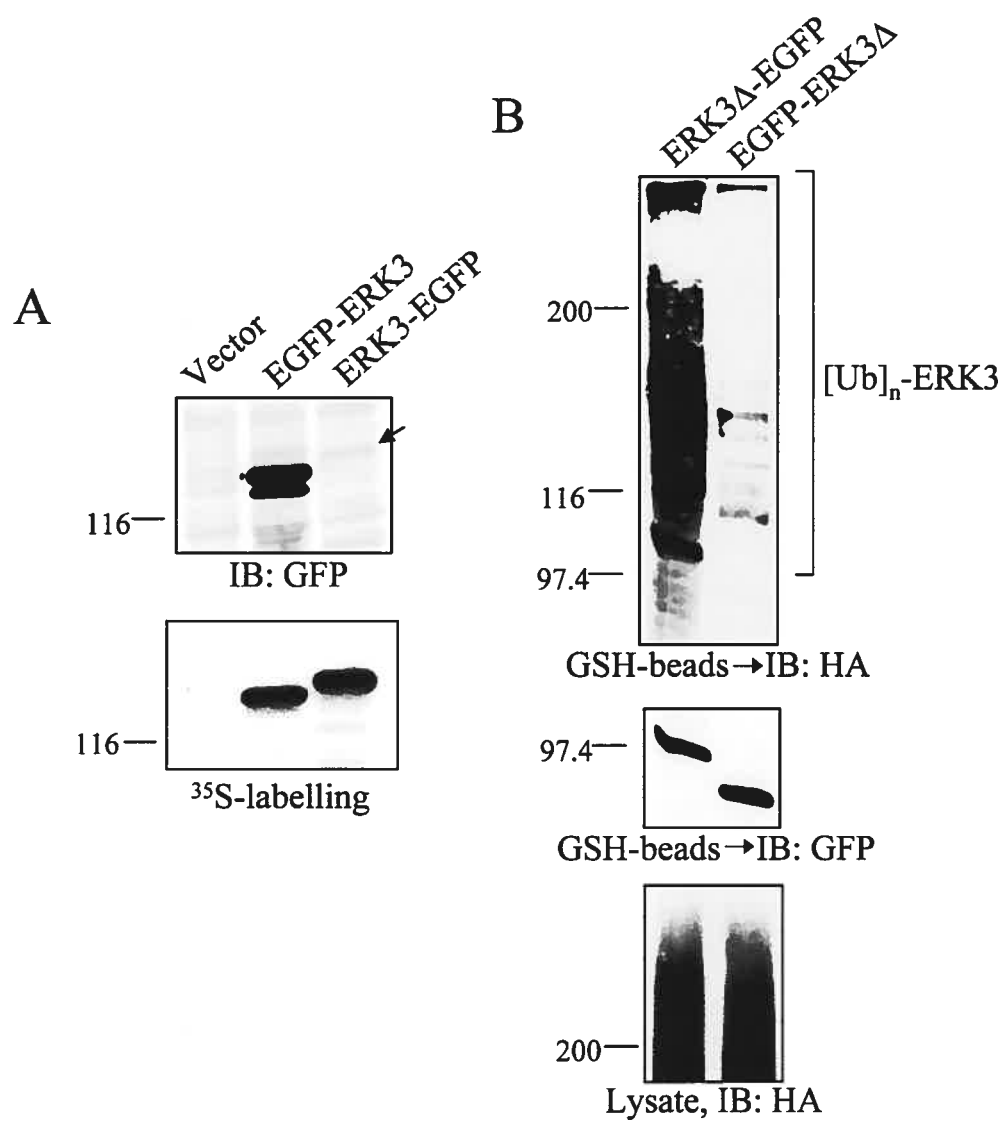


FIGURE 6

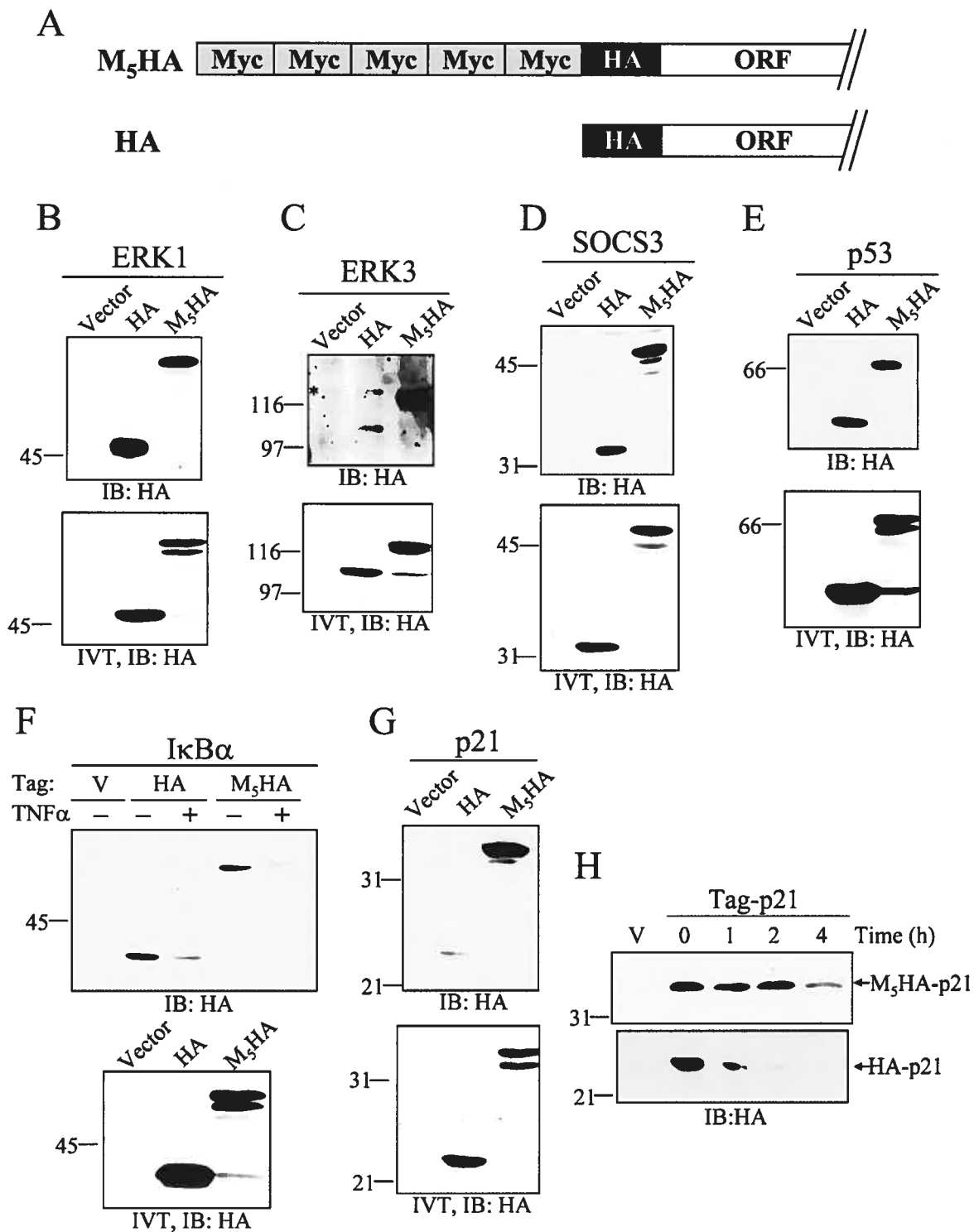


FIGURE 7

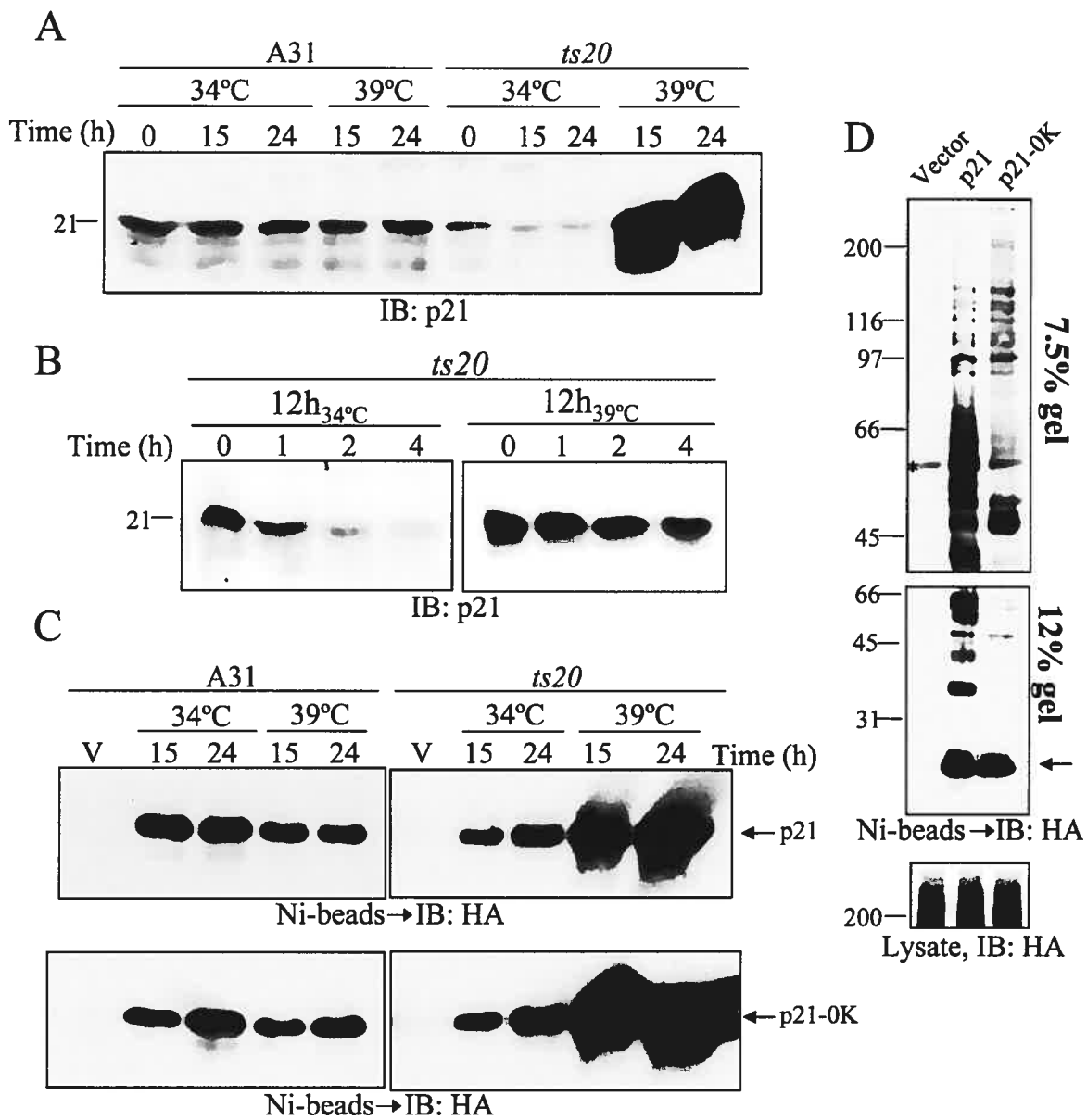
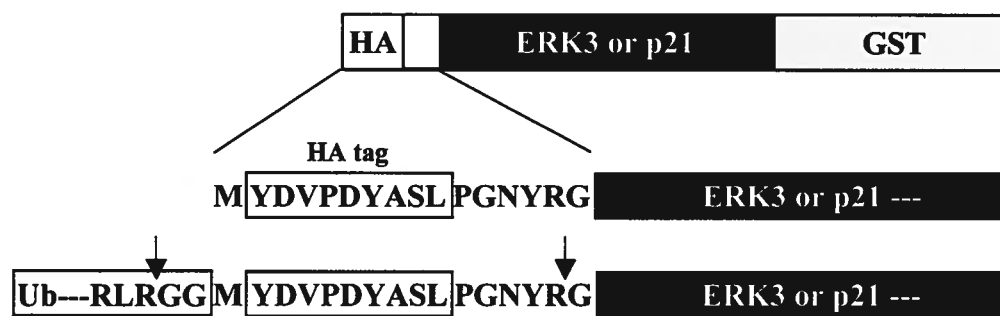
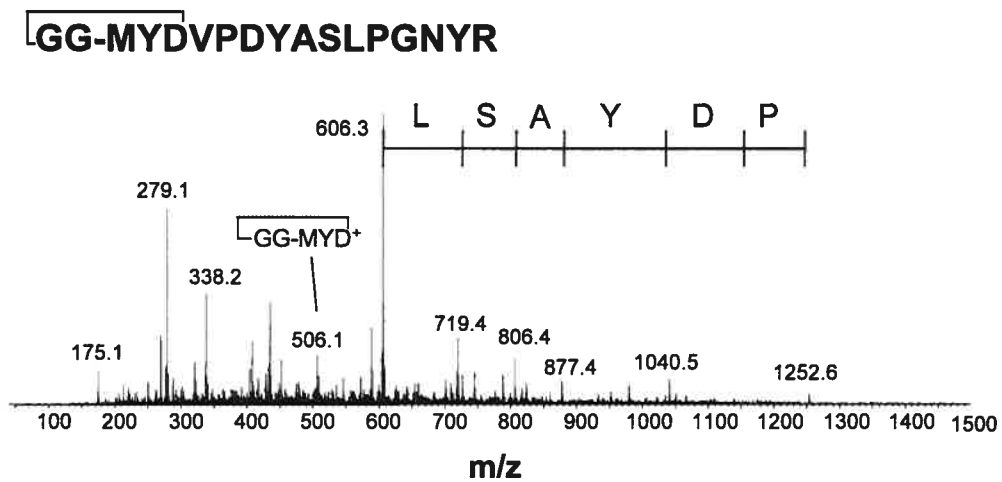


FIGURE 8

A



B



CHAPITRE 4:

Étude de la phosphorylation de ERK3 *in vivo*

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Philippe Coulombe
BIM, biologie moléculaire

2. Description de l'article

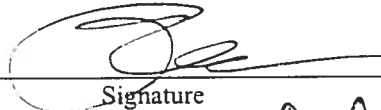
Titre de l'article: "ERK3 is constitutively phosphorylated on the activation loop and displays kinase independent cell cycle arresting activity"

Article à soumettre à: "Journal of Biological Chemistry".

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

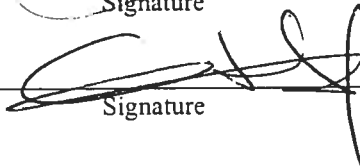
À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Philippe Coulombe inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Régulation de la MAPK atypique ERK3 par le système ubiquitine-protéasome".

Dr Sylvain Meloche
Coauteur


Signature

Date

Dr Geneviève Rodier
Coauteur


Signature

2006-4-23
Date

5.1. MISE EN SITUATION

Les MAPK sont des enzymes fortement régulées par phosphorylation. Les MAPK possèdent deux résidus conservés dans leur boucle d'activation essentiels pour leur activité. Selon le contexte physiologique, le motif TXY est doublement phosphorylé entraînant l'activation catalytique des MAPK. Très peu d'informations sont disponibles sur la phosphorylation de ERK3 et son impact sur son activité biologique. ERK3 possède la sérine 189 en position de la thréonine du motif TXY; la tyrosine est remplacée par une glycine. La sérine 189 est le seul site de phosphorylation connu de ERK3 *in vivo*. Malheureusement, on ignore si cette modification est régulée par des signaux extracellulaires, à l'instar des autres MAPK. De plus, ERK3 possède une extension en C-terminal unique riche en résidus phosphorylables (S/T/Y).

Similairement, l'activité enzymatique de ERK3 est peu caractérisée. ERK3 purifiée de cellules de mammifère n'est pas actif contre des substrats génériques de MAPK. Cette absence d'activité peut être causée par une trop faible phosphorylation de la boucle d'activation. Il se peut également que ERK3 possède une spécificité stringente et ne phosphoryle que quelques substrats, comme c'est le cas pour la MAPK atypique NLK.

Nous avons entrepris la caractérisation de la phosphorylation de ERK3. Par une combinaison d'approches biochimiques complémentaires, nous avons premièrement confirmé la phosphorylation de ERK3 sur la Ser189 *in vivo*. Contrairement aux autres MAPK, la phosphorylation de la boucle d'activation de ERK3 est constitutive et n'est pas influencée par des signaux extracellulaires activateurs des MAPK. Par la suite, nous avons identifié la Ser386 comme étant un nouveau site de phosphorylation. Cette sérine est localisée dans l'extension C-terminale et est conservée chez tous les homologues de ERK3. ERK3 phosphorylée sur la boucle d'activation n'est pas active contre plusieurs substrats de MAPK. L'absence d'activité de ERK3 ne semble pas résulter d'une absence de phosphorylation activatrice. De manière intéressante, l'activité négative de ERK3 sur la progression de la phase G1 n'est pas dépendante de sa phosphorylation ou de son activité catalytique. Le C-terminal est plutôt requis pour cet effet de ERK3. Les données suggèrent donc que l'action de ERK3 sur le cycle cellulaire ne requiert pas la phosphorylation de ses substrats putatifs mais nécessite possiblement des interactions faite par son C-terminal.

5.2. ARTICLE 4:

ERK3 is Constitutively Phosphorylated on the Activation Loop *In Vivo* and Displays Kinase-Independent Cell Cycle Arresting Activity

Philippe Coulombe^{1,2}, Geneviève Rodier¹ and Sylvain Meloche^{1,2,3,4}

¹ Institut de recherche en immunologie et oncologie (IRIC) and Departments of
²Molecular Biology and ³Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada
H3C 3J7

⁴ Corresponding author: Dr Sylvain Meloche
Institut de recherche en immunologie et oncologie(IRIC)
Université de Montréal
C.P. 6128, Succ. Centre-ville
Montreal, Quebec, Canada
H3C 3J7
Phone : (514) 343-6966
Fax : (514) 343-6954
[REDACTED]

Article en préparation

ABSTRACT

Humans express 14 members of the MAP kinases family that play important roles in a variety of biological processes including proliferation, development or angiogenesis. ERK3 is an ill defined member of a subfamily of human MAP kinases. Accumulating evidence point to a putative role for ERK3 in controlling cell proliferation and differentiation. Indeed, ERK3 expression is upregulated in numerous differentiation models. Additionally, ERK3 overexpression inhibits cell proliferation. MAP kinases are enzymes regulated mainly by activation loop phosphorylation. In addition to the known implication of the ubiquitin-proteasome pathway in controlling ERK3 activity, phosphorylation could also play an important role in its regulation. Here, we found that full length ERK3 is phosphorylated on two major sites *in vivo*, Ser189 and Ser386. Contrary to classical MAP kinases, activation loop Ser189 of ERK3 is constitutively phosphorylated and insensitive to many common MAP kinases activating stimuli. On the other hand, Ser386 phosphorylation was not found to significantly affect Ser189 phosphorylation or ERK3 subcellular localization. Activation loop phosphorylated-ERK3 is not active toward generic or consensus MAP kinases substrates in standard *in vitro* kinase assay. Intriguingly, ERK3 inhibitory effect on cell cycle progression does not require its kinase activity or its phosphorylation. In contrast, ERK3 C-terminal extension is shown to be essential for this activity. ERK3 is thus a MAP kinase homologue with unique modes of regulation. Like a growing number of kinase domain containing proteins, ERK3 may have kinase-dependent and independent activities.

INTRODUCTION

Protein kinases are enzymes whose activity is highly regulated. Protein kinase activity can be controlled in numerous ways. Indeed, subcellular localization, second messengers, protein-protein interactions and post-translational modifications are examples of described mechanisms (20, 35, 41, 46). Other protein kinases seem constitutively active. In that setting, their function can be regulated by kinase or substrate availability (21, 31).

Phosphorylation is a common post-translational modification involved in the regulation of protein kinases (45). Phosphorylation can have both positive and negative effects on protein kinase activity. For instance, Tyr15-phosphorylated cdk1 is inactive because it has a blocked ATP binding site (44). Positive phosphorylation has been described for a number of kinases. Such phosphorylation events can occur throughout the kinase, but a common theme is the phosphorylation of the activation loop (45). The activation loop is an important segment located in the kinase domain C-terminal lobe, between subdomain VII and VIII, that often contains conserved serine, threonine and/or tyrosine residues that can be reversibly phosphorylated. This phosphorylation is either the results of autophosphorylation *in cis* or phosphorylation *in trans* by upstream activating kinase(s) (3).

MAP kinases are evolutionary conserved enzymes involved in many fundamental biological processes. Indeed, strong genetic, biochemical and pharmacological evidence point to their involvement in cell proliferation, survival, motility and differentiation for instance (11, 46). MAP kinases are classical examples of kinases solely regulated by phosphorylation. Indeed, MAP kinases contain a highly conserved TXY motif in their activation loop that is doubly phosphorylated *in trans* by upstream activating kinases called MAP kinase kinases (MAPKK/MKK/MEK) (51, 52). This phosphorylation is generally triggered by specific stimuli. For example, the MAP kinases ERK1/2 are strongly phosphorylated in response to mitogens (7). Crystallographic data has revealed the important role of activation loop phosphorylation for the activity of the protein. Indeed, pTEpY ERK2 structure indicates that phosphorylation induces several conformational change compatible with enzymatic activity (10, 59). First, the N- and C-terminal lobes are

brought closer together. Second, catalytic residues are perfectly aligned only in ppERK2. Lastly, phosphorylation induces the formation of the substrate binding site (34).

Human expresses 14 MAP kinase homologues (36). ERK3 and its related kinase ERK4 define a subfamily found exclusively in vertebrates (38). Accumulating evidence point to a role for ERK3 in regulating cellular proliferation and/or differentiation. ERK3 transcript is upregulated at day 11 of murine embryonic development (58), a period related to organogenesis. ERK3 mRNA and protein levels are elevated in terminally differentiated and growth arrested cells. Indeed, ERK3 mRNA was shown to be upregulated in P19 embryonic carcinoma cells differentiated into neuron or skeletal myotubes (7). Also ERK3 protein levels rise in differentiated PC12 and C2C12 cells (17). Lastly, ERK3 is elevated in growth arrested Raji cells (29). Interestingly, ERK3 possesses growth inhibitory activity when overexpressed. Stable forms of ERK3 inhibit S-phase entry in response to serum in NIH 3T3 cells (17, 27). Additionally, overexpression of ERK3 inhibits human squamous carcinoma cell growth (18). The only known ERK3 binding protein is the MAPK Activated Protein Kinase 5 (MAPKAPK5 or MK5/PRAK). ERK3 association with MK5 induces the activation of the latter (50, 54). The biological significance of this complex is presently under intense investigations.

The regulation of ERK3 activity is poorly understood. We know that the ubiquitin/proteasome pathway plays a major role in regulating ERK3 expression. Several groups have shown that the ubiquitin/proteasome system controls negatively ERK3 transcription (61) and protein stability (16, 17, 40). In fact, ERK3 belongs to a growing class of molecules ubiquitinated on their N-terminus (14, 16). As a member of the MAP kinase family, phosphorylation is likely to regulate ERK3 activity. ERK3 possesses the sequence SEG instead of the highly conserved TXY motif found in other MAP kinases (7, 37, 60). ERK3 is known to be phosphorylated *in vivo* (12, 16, 17). However, the biological relevance and the regulation of this phosphorylation event are currently unknown.

Here, we report on ERK3 phosphorylation status *in vivo*. We observed that ERK3 is phosphorylated on numerous sites *in vivo*, including the activation loop Ser189. Activation loop phosphorylation is constitutive and is minimally influenced by classical MAP kinase activators. We also identify Ser386 as another major phosphorylation site *in vivo*. Ser386 is,

among others, a consensus site for MK5. Surprisingly, putatively active Ser189-phosphorylated ERK3 does not phosphorylate generic and consensus MAP kinase substrates. We finally found that the inhibitory action of ERK3 on the cell cycle is kinase activity- and Ser189/386 phosphorylation-independent. ERK3 mode of regulation thus differs greatly from classical MAP kinases. ERK3 may thus possess kinase-dependent and independent functions.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and antibodies

The source of the reagents has been described (16, 17, 47, 53). Leptomycin B (LMB) was a gift from M Yoshida. Fetal bovine serum (FBS) and calf serum (CS) were purchased from Invitrogen. Sorbitol, PMA, anisomycin, hydrogen peroxide, vanadate were from Sigma. Myelin basic protein (MBP), histone H1, casein and 5-bromo-2-deoxy-uridine (BrdU) was from Roche Diagnostics. Commercial antibodies were obtained from the following suppliers: monoclonal anti-phospho-ERK1/2 (E10), anti-phospho-tyrosine (PY100) and anti-phospho-p38 (28B10) from Cell Signaling Technologies; polyclonal anti-HA (sc-805) and anti-myc (Y-11) from Santa-Cruz Biotechnology; HRP-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit IgG from Biorad; monoclonal anti-BrdU from Calbiochem; FITC-conjugated donkey anti-rabbit and rhodamine-conjugated donkey anti-mouse from Jackson Laboratories. Monoclonal antibody 12CA5 to influenza HA was a gift from M. Dennis (SignalGene). Anti-myc mAb was prepared in-house from 9E10 hybridoma producing cells. Polyclonal antibody to the C-terminus of ERK3 (E3-CTE4) is described (17). Polyclonal anti-phospho-Ser189 is produced in collaboration with Cell Signaling Technologies.

Plasmid constructs and mutagenesis

pcDNA3 myc₆ERK3 wild type (WT), Kinase-Dead (KD, K49K-AA) Ser189Ala (S189A), Δ398 and Δ365 are described (17, 27). Ser386Ala (S386A), Ser386Glu (S386E), Asp152Ala (DA) and Ser199ProArg-AlaProGlu (APE) mutants of ERK3 were generated using the Altered Sites *in vitro* mutagenesis system (Promega). The mutant cDNAs were subcloned into the EcoRI site of pcDNA3-myc₆. Substrate-peptide GST fusion proteins were constructed using pHGST.1 (15). Annealed oligonucleotides coding the different substrates were subcloned into the EcoRI/SstI sites. Following oligonucleotides were used: substrate A: 5' AAT TCA GGC GGC CGC CCT TTT TCC CCT CCC CGA GGT GAG CT 3' and 5' C ACC TCG GGG AGG GGA AAA AGG GCG GCC GCC TG 3'; substrate B: 5' AAT TCA GGT GGG GTA CCA TTT TCC CCT GAT CGA GGT GAG CT 3' and 5' C ACC TCG ATC AGG GGA AAA TGG TAC CCC ACC TG 3'; substrate C: 5' AAT

TCA GGT GGG ATC CTT TTT TCC GAA GAT CGA GGT GAG CT 3' and 5' C ACC TCG ATC TTC GGA AAA AAG GAT CCC ACC TG 3'.

Cell culture and transfections

HEK 293 cells were cultured in MEM supplemented with 10% FBS. NIH 3T3 and Rat1 cells were grown in DMEM high glucose plus 10% CS and MEM plus 10% CS. HEK 293 and Rat1 cells were transfected with phosphate calcium method and fugene 6 (Roche) respectively. For agonist stimulation experiments, cells were incubated overnight in serum-free medium 24h after the transfection as described (27, 53). The medium was change 30 min prior to stimulation. The cells were stimulated for the indicated amount of time, rinsed in ice-cold PBS and frozen in liquid nitrogen.

Immunofluorescence

Indirect immunofluorescence and BrdU incorporation experiments were done as described previously (17, 27). Briefly, Rat1 cells were seeded at 40,000 cells/well onto poly-L-lysine coated glass coverslips placed in 6-well-plates, and transfected with expression plasmids (1 µg DNA). After 24 h, the cells were serum-starved for 24 h and stimulated with 10% serum for 20 h in the presence of 10 µM BrdU. The cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde/PBS for 20 min at 37°C. After quenching in 0.1M glycine for 5 min, the cells were permeabilized by incubation in 0.1% Triton X-100 for 5 min at room temperature. Non-specific sites were blocked in PBS, 1% bovine serum albumin for 60 min at 37°C. DNA was denatured with HCl 2 N for 10 min at room temperature. Transfected proteins and BrdU staining was performed by incubating cells for 1 h at 37°C with anti-myc and anti-BrdU antibody, followed by incubation with FITC-conjugated anti-rabbit IgG and rhodamine-conjugated anti-mouse IgG as secondary reagent respectively. DAPI staining was performed to visualize the nuclei. Cell samples were analyzed by fluorescence microscopy (Leica DM RB). The results are expressed as the percentage of transfected cells showing nuclear labeling for BrdU.

Protein biochemistry methods

Cell lysis, immunoprecipitation and immunoblot analysis were performed as described previously (17, 47, 53). For immunoblotting, 50 µg of lysate were separated by SDS-

PAGE. After transfer to nitrocellulose, proteins were detected with HRP-conjugated secondary antibody and ECL (Amersham). For immunoprecipitation, 750 μ g of lysate were incubated with 12CA5 (HA), 9E10 (myc) or CTD4.2 (ERK3) antibody coated on protein A-agarose () for 2-4h at 4°C. immunoprecipitated proteins were detected by immunoblot or autoradiography. Substrate peptide GST recombinant fusion proteins were produced in *E. coli* strain BL21 pLys(DE3). Induction and purification were done as described (15). Proteins were eluted with 50 mM glutathione/100 mM Tris pH=8.0. Eluates were dialyzed in PBS at 4°C overnight. Protein purity and yield were evaluated by SDS-PAGE. Kinase assay were performed as described (25). Immunoprecipitated ERK1 or ERK3 were washed once in kinase buffer. One typical reaction contains: 50 μ M ATP, 5 μ Ci [γ -³²P]ATP, 0.25 mg/mL substrate in 20 mM HEPES pH=7.4, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT. The reaction is stopped with loading buffer and run on SDS-PAGE. Substrate phosphorylation was detected by autoradiography.

***In vivo* labeling experiments**

In vivo labeling experiments were performed as previously described (16, 47, 53). Briefly, 24h post-transfection, cells were kept exponentially growing (Figs. 1 and 3) or incubated in serum-free medium overnight (Fig. 2). 40h after the transfection, cells were incubated in phosphate-free medium. Dialyzed serum was added to log-phase cells. Cells were then incubated in 0.5 mCi/mL ³²P for 5 hours, at which point serum-starved cells were stimulated as indicated. Phospho-ERK3 was purified by immunoprecipitation as described above and detected by SDS-PAGE followed by transfer to PVDF membrane and autoradiography. Phosphopeptide mapping and phosphoaminoacid were performed as described (47).

RESULTS

ERK3 is phosphorylated *in trans* on Ser189 *in vivo*

³²P *in vivo* labeling experiments were performed to evaluate the phosphorylation status of full length human ERK3. Ectopic ERK3 expression is very weak due to a high turnover rate mediated by the ubiquitin-proteasome system (17). We recently showed that ERK3 N-terminal ubiquitination is perturbed by the presence of large N-terminal tags (16). In labeling experiments, we use a stabilized myc₆-tagged form of ERK3 to facilitate detection. As previously observed (12, 16), we found that ERK3 is a phospho-protein *in vivo* (Fig. 1A). Peptide mapping analysis reveals that ERK3 is phosphorylated on 2 major sites in exponentially growing HEK 293 cells (Fig. 1B). The two major phosphopeptides contain phospho-serine residues as indicated by phosphoaminoacid analysis (Supplementary Fig. 1C). ERK3 phosphorylation does not depend on its own phosphotransferase activity. Indeed, ERK3 in which lysines 49 and 50 of subdomain II are mutated to alanine (ERK3 KD) demonstrates a phosphorylation pattern similar to the wild type protein (Fig. 1A and 1B). Another inactive mutant of ERK3 (lacking the catalytic base Asp152 of subdomain VIb) is also phosphorylated to the same extent (data not shown). The serine 189 contained in the activation loop and corresponding to threonine 185 in ERK2 (Fig. 1D), is known to be phosphorylated *in vivo* (12, 16, 17). This serine and its surrounding residues are highly conserved in ERK3 homologues and also in ERK4 (Fig. 1D). We confirm that Ser189 is one of the two major phosphorylation sites of ERK3 (Fig. 1B, spot 2). Ser189 phosphorylation is also confirmed using an affinity-purified Ser189 phosphospecific antibody (Fig. 1C). This antibody recognizes wild type and kinase-dead ERK3 but not the S189A mutant.

ERK3 Ser189 phosphorylation is constitutive

As mentioned above, MAP kinase activation loop is reversibly phosphorylated in response to specific stimuli. We thus evaluated the regulation of ERK3 Ser189 phosphorylation by documented MAP kinase stimuli. Data indicates that Ser189 phosphorylation is constitutive and does not change in response to classical MAP kinase agonists (Fig. 2). In serum-starved cells, ERK3 is phosphorylated on Ser189 (Fig. 2A), whereas, in the same conditions, the MAP kinases ERK1/2 and p38s are not phosphorylated (Fig. 2B and 2C).

Stimulation with bovine serum and PMA (strong activator of the MAP kinases ERK1/2 and ERK5) does not influence ERK3 Ser189 phosphorylation (Fig. 2A and 2B). Similarly, ERK3 phosphorylation is not influenced by stress signals. Indeed osmotic (sorbitol), oxidative (H_2O_2) and apoptotic (anisomycin) signals, potent activators of p38s and JNKs, do not affect Ser189 phosphorylation (Fig. 2A, 2C and data not shown). The tyrosine-phosphatases inhibitor pervanadate was the only treatment that increases ERK3 phosphorylation (Supplementary Fig. 1). By phosphopeptide mapping and phospho amino acid analysis, we determined that ERK3 is phosphorylated on two novel tyrosine residues in response to pervanadate (Supplementary Fig. 1). The physiological relevance of this phosphorylation is currently under intense investigation.

ERK3 is phosphorylated on Ser 386 *in vivo*

We hypothesized that other phosphorylation sites might control ERK3 activity. Additional *in vivo* labeling experiments were thus conducted to characterize these putative sites. C-terminal truncated mutants of ERK3 show that the second major phosphorylation site is located between residue 365 and 398. Indeed, ERK3 $\Delta 398$ retains spot 1 and 2 whereas ERK3 $\Delta 365$ only possesses spot 2, corresponding to Ser189 (Fig. 3A and B). Close inspection of the phosphopeptide map of ERK3 $\Delta 398$ reveals that spot 1 migrated toward the anode (Fig. 3B). This indicates that spot 1 for this mutant have either one additional negative charge (i.e. one more phosphorylation site) or lacks one positive charge. ERK3 $\Delta 398$ lacks Arg399 (Fig. 3C). Thus, ERK3 $\Delta 398$ extreme C-terminal tryptic peptide will have one positive charge less than the corresponding peptide of the wild type protein (Fig. 3C). Because spot 1 contains phosphoserine exclusively (Supplementary Fig. 1C), we decided to mutate the only serine in the tryptic fragment 384-399, serine 386. Peptide mapping analysis clearly shows that Ser386 is the second major phosphorylation site of full-length ERK3. Indeed, spot 1 is missing from the peptide map of ERK3 S386A (Fig. 3E). This phosphorylation site is conserved in all ERK3 homologues (Fig. 3C). Interestingly, this site is not found in ERK4, even though there is extensive sequence homology upstream and downstream of the site.

Effect of Ser386 phosphorylation on ERK3

Data from Fig. 3 suggest that phosphorylation of ERK3 on Ser189 and Ser386 are independent processes. To further test this idea, we evaluated the effect of Ser386 phosphorylation on Ser189 phosphorylation. Our results suggest that Ser386 affects minimally Ser189 phosphorylation. Indeed, ERK3 S386A (non phosphorylable) and S386E (phosphomimetic) mutants are phosphorylated on Ser189 comparably to the wild type protein (Fig. 4A). Subcellular localization can be regulated by phosphorylation. For example, activation loop phosphorylation of the MAP kinase ERK2 augments its affinity for one of its nuclear transporter (34). Also, AKT phosphorylation of the transcription factor FHLR induces its nuclear export and cytoplasmic retention (6). We recently showed that ERK3 is present in both the cytoplasm and the nucleus (27). The exportin CRM1 was found to be responsible for ERK3 active nuclear export. Additionally, the localization pattern was found to be independent of ERK3 kinase activity and ser189 phosphorylation. We thus performed immunofluorescence studies with the non-phosphorylable S386A and the phosphomimetic S386E mutant of ERK3. Results clearly show that Ser386 phosphorylation does not affect the subcellular localization of ERK3. Both mutants are localized in both the cytoplasm and the nucleus, like the wild type protein (Fig. 4C). Also, like wild type ERK3, both mutants are sensitive to leptomycin B treatment (Fig. 4C). Leptomycin B is an inhibitor of CRM1 activity and induces nuclear accumulation of protein exported to the cytoplasm in a CRM1-dependant manner (32).

***In vitro* kinase activity of ERK3**

ERK3 *in vitro* kinase activity is mysterious. Despite almost 15 years since its cloning, a robust *in vitro* kinase assay for ERK3 is still missing. We now have a source of putatively active, activation loop phosphorylated ERK3 (see Fig. 1). Ectopic ERK3 immunoprecipitated from exponentially growing HEK 293 was used to phosphorylate a panel of generic protein kinase substrates. We found that ERK3 did not phosphorylate any of them. Indeed, as shown in Fig. 5A, no specific phosphorylation of MBP by ERK3 was observed. In contrast, activated ERK1 readily phosphorylates this substrate (Fig. 5A). ERK3 did not phosphorylate histone H1, casein or c-jun either (data not shown). Moreover, Ser386 phosphorylation does not influence ERK3 *in vitro* kinase activity toward the tested substrates as shown in Fig. 5B by the use of mutants S386A and S386E. ERK3 purified from bovine serum, sorbitol, anisomycin or pervanadate treated cells did not exhibit

protein kinase activity on the substrates mentioned above (Fig. 5C and data not shown). Removing ERK3 unique C-terminal extension did not render it more active *in vitro* toward the tested substrates precluding the possibility that the C-terminal extension could mask ERK3 kinase domain (data not shown).

The lack of classical protein kinase activity for ERK3 might be the consequence of certain substitution(s) present in its kinase domain. Indeed, ERK3 possesses an intriguing substitution characteristic of its MAP kinase subfamily. Downstream of the activation loop is located the SPR signature. In all the MAP kinases homologues (and in nearly all protein kinases), the sequence APE is found (Supplementary Fig. 2A). Crystallographic studies have shown that the glutamic acid form a salt bridge with an invariant arginine present in subdomain XI (24, 30, 56). This E/R interaction is essential for proper C-terminal lobe folding. Because the C-terminal lobe is responsible for substrate binding, mutating the glutamic acid diminish protein kinase activity by lowering the kinase/substrate interaction (22). We thus generated the APE mutant of ERK3 and tested it on the panel of generic substrates. Unfortunately, this mutation do not result in enhanced *in vitro* kinase activity (Supplementary Fig 2B).

As another attempt to experimentally show ERK3 protein kinase activity, we utilized a recently described algorithm called PREDIKIN designed specifically to predict protein kinase substrate specificity (8). The method developed by the Kobe's group is based on the study of crystal structures, molecular modeling and the sequences of both kinases and substrates. Brinkworth et al. identified 20 residues in kinase domain susceptible to interact with a substrate (8). This method generated two possible substrate specificities for ERK3 (Table I). Assigning ERK3 as a CGMC (CDK, MAPK, GSK3 and CLK) kinase (which it is) generated the consensus B, a proline-directed substrate, while ignoring this constraint yielded substrate C (Table I). We also analyzed ERK1 as a positive control (substrate A, Table I). We prepared GST fusion proteins containing the potential substrate peptide (see materials and methods, Fig. 5D). As shown in Fig. 5E, activated ERK1 specifically phosphorylated its predicted substrates and not GST alone. Also, ERK1 was able to phosphorylate the proline-directed substrate of ERK3 (substrate B, Fig. 5E). On the contrary, Ser189-phosphorylated ERK3 isolated from exponentially growing HEK293 cells was inactive against all the candidate peptides tested (Fig. 5F).

ERK3 inhibitory action on cell cycle progression is kinase activity independent

Stable forms of ERK3 are known to inhibit S-phase entry in response to mitogens (17, 27). In light of the findings presented here, we wanted to identify the important molecular determinant of ERK3 involved for this action. Mutants generated in this study were tested for their cell cycle inhibitory activity in immortalized rodent fibroblasts. As previously observed, full length wild type ERK3 significantly reduced the proportion of BrdU-positive cells compared to EGFP in response to bovine serum (Fig. 6A and B). Surprisingly, putatively inactive ERK3 mutants, ERK3 KD (lacking subdomain II lysines), ERK3 DA (lacking the putative catalytic base D152) and ERK3 S189A (lacking activation loop phosphorylation), are as effective as the wild type protein in inhibiting S-phase entry (Fig. 6A and B and data not shown). ERK3's effect on the cell cycle thus does not necessitate its putative kinase activity. We next evaluated the contribution of Ser386 in the growth suppressive activity of ERK3. As shown in Fig. 6, phosphorylation of Ser386 does not affect ERK3 ability to diminish BrdU incorporation. Surprisingly, we observed that ERK3 C-terminal extension is essential for ERK3 activity. Indeed, expression of ERK3 Δ 365 was almost as inactive as EGFP (Fig. 6C). ERK3 may thus belong to an emerging class of kinases believed to have kinase-independent functions.

DISCUSSION

MAP kinases are enzymes known to be mainly regulated by reversible phosphorylation. Here, we confirm that ERK3 is subjected to phosphorylation *in vivo*. ERK3 possesses a SEG sequence in its activation loop. Ser189 corresponds to ERK2 Thr185 of the TXY motif. Like other MAP kinases, ERK3 is phosphorylated on activation loop Ser189 (this study, (12, 16, 17)). *In vivo* labeling experiment and phosphospecific antibody clearly revealed that ERK3 are constitutively phosphorylated on Ser189. Indeed, serum-starved as well as mitogens or stress stimulated cells contain similar amount of pSer189-ERK3. In contrast, the same treatments induce strong activation of classical MAP kinases. ERK3 seems to be regulated differently from "classical" MAP kinases. Tyrosine phosphatases inhibition results in increased ERK3 total phosphorylation. Phosphopeptide mapping reveals the presence of two additional phospho-tyrosine sites. For MAP kinases, phospho-tyrosine is usually observed in the activation loop. ERK3 contains a glycine residue in place of the conserved TXY tyrosine and therefore it is unlikely that ERK3's tyrosine phosphorylation is located in its activation loop. Accordingly, preliminary results indicate that ERK3 is tyrosine phosphorylated in its C-terminus (Coulombe P and Meloche S, unpublished data). The function and regulation of ERK3 tyrosine phosphorylation is currently under investigation.

In vivo labeling experiments also confirmed that Ser189 is phosphorylated *in trans* by another cellular kinase dubbed ERK3 kinase (13). The identity of this kinase is elusive. Skeletal muscle extract possess high amount of ERK3 kinase. Also, this kinase binds ERK3 kinase domain tightly and requires its integrity for mediating Ser189 phosphorylation (12, 16). We now show that ERK3 kinase is constitutively active. Some activation loop kinases are known to be constitutively active. The cdk activating kinase CAK is responsible to phosphorylate the conserved threonine present in cyclin dependant kinases cdk. Studies indicate that CAK is active in all cell cycle phase and is thus not limiting (55).

The functional implication of Ser386 phosphorylation is obscure. The results presented here indicate that this novel phosphorylation site is not involved in regulating ERK3 Ser189 phosphorylation, subcellular localization or anti-proliferative activity. Like Ser189, Ser386 phosphorylation is constitutive and minimally influenced by extracellular signals. The use

of a phosphospecific antibody directed against Ser386 will facilitate the study of its regulation. The kinase involved in Ser386 phosphorylation is not known. Based on consensus site specificity, Ser386 could be a substrate for PKA or PKG (57). Also, Ser386 loosely fits a MK5 consensus site (43). It was recently shown that ERK3 associates and activates MK5 (50, 54). ERK3 complexed with MK5 is then phosphorylated *in trans* on unknown site(s) by MK5. Ser386 could thus be the site of MK5 phosphorylation. Additional experiments are needed to test this hypothesis.

We could not detect specific protein kinase activity of ERK3 on generic and consensus MAP kinase substrates. We show that this lack of kinase activity is not due to the absence of Ser189 phosphorylation. Several possibilities could explain the apparent low *in vitro* kinase activity of ERK3. ERK3 might require additional post-translational modifications apart for Ser189 phosphorylation. Here, we observe that Ser386 or tyrosine phosphorylations are not limiting modifications in our *in vitro* assay. Also, other modifications, like ubiquitination, might play a role. Similarly, ERK3 might need the presence of a binding partner. MK5-complexed ERK3 may thus acquire significant protein kinase activity. Similarly, PDK1 associated with the kinase PRK2 displays altered substrate specificity (5). More simply, ERK3 might have a very restricted substrate repertoire. Like some other kinases, ERK3 might phosphorylate only its physiological substrates. For example, the MAPKK MEK1/2 only phosphorylate ERK1/2 *in vitro* (51). Similarly, the MAPK homologue NLK is not active against the generic kinase substrates MBP or histone H1 but potently phosphorylates its physiological substrates ELK4 or c-Myb (9, 26, 28).

Our data show that ERK3 affects the cell cycle in a kinase independent manner. Indeed, wild type, kinase-dead (KK49AA) and non-activatable (S189A) ERK3 are equally efficient to inhibit BrdU incorporation. Like ERK3, other cell cycle kinases have been shown to affect the cell cycle in a kinase independent manner. Indeed, overexpression of wild type as well as kinase inactive Aurora A and B kinases and polo-like kinase 1 (PLK1) inhibits mitosis progression, which results in tetraploidization (39). Based on these results, it is possible to conclude that these molecules could be negative regulators of the cell cycle working in a kinase-independent fashion. However, genetic data clearly show that Aurora A/B and PLK1 act in a positive manner on cell cycle progression (19, 23). It is believed that the overexpressed wild type kinases are not properly activated and act in a dominant-

negative fashion (39). Loss of function experiments are thus necessary to determine whether ERK3 is a positive or negative regulator of the cell cycle. Data show nevertheless that ERK3 C-terminal extension is essential for the cell cycle arresting activity of ERK3. This part of the protein might be responsible for interacting with ERK3 limiting target(s). One other possibility is that the C-terminal extension is important for proper subcellular localization of ERK3. Indeed, we recently showed that full length ERK3 is localized in both the nucleus and the cytoplasm (27). More importantly, this unique distribution is important for ERK3 cell cycle inhibitory activity. Interestingly, ERK3 Δ 365 is significantly more nuclear (27). Thus, the impaired activity of ERK3 Δ 365 could be due to improper subcellular localization.

Accumulating evidence indicates the presence of evolutionary conserved kinase (or kinase-like) domain containing proteins having functions partially (or totally) independent of their intrinsic kinase activity. For instance, JAK family kinases possess a conserved pseudokinase domain essential for their proper function (48, 49). This pseudokinase domain lacks the catalytic base and is thus inactive. Also, KSR is now recognized as being essential for efficient ras/ERK signaling (42). KSR contains a putatively functional kinase domain related to Raf. Interestingly, subdomain II lysine is substituted by an arginine in mammalian KSR homologues. It is thought that this mutation creates a nonproductive binding mode for ATP. The binding and scaffolding activities of KSR are believed to play a major role for its cellular function. Interestingly, the functional kinase Raf-1 was also shown to possess kinase independent function *in vivo* (4). Based on the presented data here, ERK3 might also have kinase-independent function(s).

Our present data permit us to draw a certain parallel between the MAP kinase homologues ERK3 and ERK7. Indeed, these atypical MAP kinases have unique C-terminal extension not present in classical MAP kinases (2, 60). Also, both kinases are degraded by the ubiquitin/proteasome pathway (17, 33). Sequence found in the N-terminal of the two proteins has been shown to be important for controlling their *in vivo* ubiquitination status. Similarly, both kinases are constitutively phosphorylated on the activation loop (this study, (2)). Finally, ERK3 and ERK7 anti-proliferative activities are kinase-independent but require the presence of an intact C-terminal extension (this study, (2)). Other aspect of their

regulation distinguishes them. Contrary to ERK3, ERK7 activation loop phosphorylation is mediated by autophosphorylation *in cis* (1, 2). Moreover, ERK7 is active *in vitro* whereas ERK3 is not using similar substrates (this study, (2)). Nevertheless, the possibility that ERK3 and ERK7 are regulated by and/or acts on similar signaling pathway(s) is appealing.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M Yoshida for reagent. This work was supported by a grant (MOP-38010) to SM from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). P.C. is recipient of a studentship from the National Cancer Institute of Canada (NCIC). G.R. is a recipient of a fellowship from the National Cancer Institute of Canada. SM is an Investigator of the CIHR.

REFERENCES

1. **Abe, M. K., K. T. Kahle, M. P. Saelzler, K. Orth, J. E. Dixon, and M. R. Rosner.** 2001. ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family. *J Biol Chem* **276**:21272-9.
2. **Abe, M. K., W. L. Kuo, M. B. Hershenson, and M. R. Rosner.** 1999. Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol Cell Biol* **19**:1301-12.
3. **Adams, J. A.** 2003. Activation loop phosphorylation and catalysis in protein kinases: is there functional evidence for the autoinhibitor model? *Biochemistry* **42**:601-7.
4. **Baccarini, M.** 2005. Second nature: biological functions of the Raf-1 "kinase". *FEBS Lett* **579**:3271-7.
5. **Balendran, A., A. Casamayor, M. Deak, A. Paterson, P. Gaffney, R. Currie, C. P. Downes, and D. R. Alessi.** 1999. PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2. *Curr Biol* **9**:393-404.
6. **Biggs, W. H., 3rd, J. Meisenhelder, T. Hunter, W. K. Cavenee, and K. C. Arden.** 1999. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:7421-6.
7. **Boulton, T. G., S. H. Nye, D. J. Robbins, N. Y. Ip, E. Radziejewska, S. D. Morgenbesser, R. A. DePinho, N. Panayotatos, M. H. Cobb, and G. D. Yancopoulos.** 1991. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**:663-75.
8. **Brinkworth, R. I., R. A. Breinl, and B. Kobe.** 2003. Structural basis and prediction of substrate specificity in protein serine/threonine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:74-9.
9. **Brott, B. K., B. A. Pinsky, and R. L. Erikson.** 1998. Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:963-8.
10. **Canagarajah, B. J., A. Khokhlatchev, M. H. Cobb, and E. J. Goldsmith.** 1997. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**:859-69.
11. **Chen, Z., T. B. Gibson, F. Robinson, L. Silvestro, G. Pearson, B. Xu, A. Wright, C. Vanderbilt, and M. H. Cobb.** 2001. MAP kinases. *Chem Rev* **101**:2449-76.
12. **Cheng, M., T. G. Boulton, and M. H. Cobb.** 1996. ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. *J Biol Chem* **271**:8951-8.
13. **Cheng, M., E. Zhen, M. J. Robinson, D. Ebert, E. Goldsmith, and M. H. Cobb.** 1996. Characterization of a protein kinase that phosphorylates serine 189 of the mitogen-activated protein kinase homolog ERK3. *J Biol Chem* **271**:12057-62.
14. **Ciechanover, A., and R. Ben-Saadon.** 2004. N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol* **14**:103-6.

15. **Coulombe, P., and S. Meloche.** 2002. Dual-tag prokaryotic vectors for enhanced expression of full-length recombinant proteins. *Anal Biochem* **310**:219-22.
16. **Coulombe, P., G. Rodier, E. Bonneil, P. Thibault, and S. Meloche.** 2004. N-Terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome. *Mol Cell Biol* **24**:6140-50.
17. **Coulombe, P., G. Rodier, S. Pelletier, J. Pellerin, and S. Meloche.** 2003. Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol Cell Biol* **23**:4542-58.
18. **Crowe, D. L.** 2004. Induction of p97MAPK expression regulates collagen mediated inhibition of proliferation and migration in human squamous cell carcinoma lines. *Int J Oncol* **24**:1159-63.
19. **Eckerdt, F., J. Yuan, and K. Strebhardt.** 2005. Polo-like kinases and oncogenesis. *Oncogene* **24**:267-76.
20. **Galetic, I., M. Andjelkovic, R. Meier, D. Brodbeck, J. Park, and B. A. Hemmings.** 1999. Mechanism of protein kinase B activation by insulin/insulin-like growth factor-1 revealed by specific inhibitors of phosphoinositide 3-kinase--significance for diabetes and cancer. *Pharmacol Ther* **82**:409-25.
21. **Gebauer, F., and J. D. Richter.** 1997. Synthesis and function of Mos: the control switch of vertebrate oocyte meiosis. *Bioessays* **19**:23-8.
22. **Gibbs, C. S., and M. J. Zoller.** 1991. Rational scanning mutagenesis of a protein kinase identifies functional regions involved in catalysis and substrate interactions. *J Biol Chem* **266**:8923-31.
23. **Giet, R., C. Petretti, and C. Prigent.** 2005. Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends Cell Biol* **15**:241-50.
24. **Goldsmith, E. J., and M. H. Cobb.** 1994. Protein kinases. *Curr Opin Struct Biol* **4**:833-40.
25. **Gopalbhai, K., and S. Meloche.** 1998. Repression of mitogen-activated protein kinases ERK1/ERK2 activity by a protein tyrosine phosphatase in rat fibroblasts transformed by upstream oncoproteins. *J Cell Physiol* **174**:35-47.
26. **Ishitani, T., J. Ninomiya-Tsuji, S. Nagai, M. Nishita, M. Meneghini, N. Barker, M. Waterman, B. Bowerman, H. Clevers, H. Shibuya, and K. Matsumoto.** 1999. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature* **399**:798-802.
27. **Julien, C., P. Coulombe, and S. Meloche.** 2003. Nuclear export of ERK3 by a CRM1-dependent mechanism regulates its inhibitory action on cell cycle progression. *J Biol Chem* **278**:42615-24.
28. **Kanei-Ishii, C., J. Ninomiya-Tsuji, J. Tanikawa, T. Nomura, T. Ishitani, S. Kishida, K. Kokura, T. Kurahashi, E. Ichikawa-Iwata, Y. Kim, K. Matsumoto, and S. Ishii.** 2004. Wnt-1 signal induces phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK. *Genes Dev* **18**:816-29.
29. **Kleines, M., A. Gartner, K. Ritter, and L. Schaade.** 2000. Early steps in termination of the immortalization state in Burkitt lymphoma: induction of genes involved in signal transduction, transcription, and trafficking by the ganglioside IV(3)NeuAc-nLcOse(4)Cer. *Biochim Biophys Acta* **1492**:139-44.
30. **Knighton, D. R., J. H. Zheng, L. F. Ten Eyck, V. A. Ashford, N. H. Xuong, S. S. Taylor, and J. M. Sowadski.** 1991. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**:407-14.

31. **Knippschild, U., A. Gocht, S. Wolff, N. Huber, J. Lohler, and M. Stoter.** 2005. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal* **17**:675-89.
32. **Kudo, N., B. Wolff, T. Sekimoto, E. P. Schreiner, Y. Yoneda, M. Yanagida, S. Horinouchi, and M. Yoshida.** 1998. Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res* **242**:540-7.
33. **Kuo, W. L., C. J. Duke, M. K. Abe, E. L. Kaplan, S. Gomes, and M. R. Rosner.** 2004. ERK7 expression and kinase activity is regulated by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **279**:23073-81.
34. **Lee, T., A. N. Hoofnagle, Y. Kabuyama, J. Stroud, X. Min, E. J. Goldsmith, L. Chen, K. A. Resing, and N. G. Ahn.** 2004. Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Mol Cell* **14**:43-55.
35. **Lincoln, T. M., N. Dey, and H. Sellak.** 2001. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* **91**:1421-30.
36. **Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, and S. Sudarsanam.** 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**:1912-34.
37. **Meloche, S., B. G. Beatty, and J. Pellerin.** 1996. Primary structure, expression and chromosomal locus of a human homolog of rat ERK3. *Oncogene* **13**:1575-9.
38. **Meloche, S., B. Turgeon, P. Coulombe P and G. Rodier G.** 2004. The atypical ERK3 subfamily of mitogen-activated protein kinases. In: Pandalai SG, ed. *Recent Research Developments in Cell Biology*, 1. Kerala: Transworld Research Network, 71-81.
39. **Meraldi, P., R. Honda, and E. A. Nigg.** 2002. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *Embo J* **21**:483-92.
40. **Mikalsen, T., M. Johannessen, and U. Moens.** 2005. Sequence- and position-dependent tagging protects extracellular-regulated kinase 3 protein from 26S proteasome-mediated degradation. *Int J Biochem Cell Biol* **37**:2513-20.
41. **Morgan, D. O.** 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* **374**:131-4.
42. **Morrison, D. K.** 2001. KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? *J Cell Sci* **114**:1609-12.
43. **New, L., Y. Jiang, M. Zhao, K. Liu, W. Zhu, L. J. Flood, Y. Kato, G. C. Parry, and J. Han.** 1998. PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *Embo J* **17**:3372-84.
44. **Nigg, E. A., P. Gallant, and W. Krek.** 1992. Regulation of p34cdc2 protein kinase activity by phosphorylation and cyclin binding. *Ciba Found Symp* **170**:72-84; discussion 84-96.
45. **Nolen, B., S. Taylor, and G. Ghosh.** 2004. Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell* **15**:661-75.
46. **Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, and M. H. Cobb.** 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**:153-83.
47. **Rodier, G., A. Montagnoli, L. Di Marcotullio, P. Coulombe, G. F. Draetta, M. Pagano, and S. Meloche.** 2001. p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis. *Embo J* **20**:6672-82.

48. **Saharinen, P., and O. Silvennoinen.** 2002. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *J Biol Chem* **277**:47954-63.
49. **Saharinen, P., K. Takaluoma, and O. Silvennoinen.** 2000. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol* **20**:3387-95.
50. **Schumacher, S., K. Laass, S. Kant, Y. Shi, A. Visel, A. D. Gruber, A. Kotlyarov, and M. Gaestel.** 2004. Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *Embo J* **23**:4770-9.
51. **Seger, R., N. G. Ahn, J. Posada, E. S. Munar, A. M. Jensen, J. A. Cooper, M. H. Cobb, and E. G. Krebs.** 1992. Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J Biol Chem* **267**:14373-81.
52. **Seger, R., D. Seger, F. J. Lozeman, N. G. Ahn, L. M. Graves, J. S. Campbell, L. Ericsson, M. Harrylock, A. M. Jensen, and E. G. Krebs.** 1992. Human T-cell mitogen-activated protein kinase kinases are related to yeast signal transduction kinases. *J Biol Chem* **267**:25628-31.
53. **Servant, M. J., P. Coulombe, B. Turgeon, and S. Meloche.** 2000. Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biol* **148**:543-56.
54. **Seternes, O. M., T. Mikalsen, B. Johansen, E. Michaelsen, C. G. Armstrong, N. A. Morrice, B. Turgeon, S. Meloche, U. Moens, and S. M. Keyse.** 2004. Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *Embo J* **23**:4780-91.
55. **Tassan, J. P., S. J. Schultz, J. Bartek, and E. A. Nigg.** 1994. Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). *J Cell Biol* **127**:467-78.
56. **Taylor, S. S., and E. Radzio-Andzelm.** 1994. Three protein kinase structures define a common motif. *Structure* **2**:345-55.
57. **Tegge, W., R. Frank, F. Hofmann, and W. R. Dostmann.** 1995. Determination of cyclic nucleotide-dependent protein kinase substrate specificity by the use of peptide libraries on cellulose paper. *Biochemistry* **34**:10569-77.
58. **Turgeon, B., M. K. Saba-El-Leil, and S. Meloche.** 2000. Cloning and characterization of mouse extracellular-signal-regulated protein kinase 3 as a unique gene product of 100 kDa. *Biochem J* **346 Pt 1**:169-75.
59. **Zhang, F., A. Strand, D. Robbins, M. H. Cobb, and E. J. Goldsmith.** 1994. Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* **367**:704-11.
60. **Zhu, A. X., Y. Zhao, D. E. Moller, and J. S. Flier.** 1994. Cloning and characterization of p97MAPK, a novel human homolog of rat ERK-3. *Mol Cell Biol* **14**:8202-11.
61. **Zimmermann, J., N. Lamerant, R. Grossenbacher, and P. Furst.** 2001. Proteasome- and p38-dependent regulation of ERK3 expression. *J Biol Chem* **276**:10759-66.

LEGENDS TO FIGURES

FIG. 1. ERK3 is phosphorylated *in trans* on serine 189 *in vivo*. (A) HEK 293 cells were transfected with indicated myc₆-tagged ERK3 constructs. Ectopic ERK3 were immunoprecipitated from ³²P labeled cells. Phosphorylation was detected by autoradiography (upper panel). Identical cell lysates were analyzed for ERK3 expression by immunoblot (lower panel). (B) Phosphopeptide mapping of ERK3 purified as described in A. Major phosphopeptides are numbered. The arrowhead indicates the loading site. Note the disappearance of spot 2 in ERK3 S189A map (arrow). (C) Lysates from exponentially growing cells transfected with the indicated constructs were analyzed by immunoblotting using Ser189 phospho-specific (upper panel) or myc (lower panel) antibodies. (D) Sequence alignment surrounding Ser189 between ERK3 homologues, human ERK4 and ERK2. Asterisk indicates phosphorylation.

FIG. 2. Serine 189 phosphorylation is constitutive. (A) HEK 293 cells were transfected with myc₆ERK3 WT and serum starved overnight. ³²P-labelled cells were stimulated with 10% fetal bovine serum (FBS), 200 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 400 mM sorbitol (Sorbitol) or 200 μM hydrogen peroxide (H₂O₂) for 10 minutes. Phosphorylation of immunoprecipitated ERK3 was detected by autoradiography (upper panel). Equal ERK3 expression was confirmed by immunoblotting on cell lysate (lower panel). (B) Cells were transfected as described in A. Serum starved cells were then stimulated with 10% calf serum for the indicated times. ERK3 Ser189 phosphorylation (upper panel), total expression (middle panel) and ERK1/2 TEY phosphorylation (lower panel) were analyzed by immunoblot. (C) Same as in C. except that cells were stimulated with 400 mM sorbitol instead. phosphoTGY-p38 was monitored by immunoblot (lower panel).

FIG. 3. ERK3 is phosphorylated on serine 386 *in vivo*. (A) *In vivo* ³²P labeling experiment were performed on the indicated constructs. Phosphorylation of the immunoprecipitated proteins was detected by autoradiography. (B) Phosphopeptide analysis of phosphorylated ERK3 described in A. The major spot are numbered. Note that spot 1 move to the left for the Δ398 mutant whereas it disappears in the Δ365 map (arrow). The arrowhead indicates the loading point. (C) Sequence surrounding S386 in ERK3 homologues and human ERK4.

Asterisk indicates phosphorylation. Arrows highlight tryptic cleavage site. ERK3 Δ 398 end point is also illustrated. The predicted tryptic peptide containing phosphoSer386 from WT and Δ 398 ERK3 are shown (lower part). **(D)** *In vivo* phosphorylation of the indicated ERK3 constructs was determined by *in vivo* ^{32}P labeling experiments as described in A. **(E)** Phosphopeptide analysis of the protein described in D. Note the alternative disappearance of spot 1 and 2 in S386A and S189A maps.

FIG. 4. Effect of serine 386 phosphorylation on ERK3 subcellular localization and serine 189 phosphorylation status. **(A)** HEK 293 cells were transfected with the indicated myc₆-tagged ERK3 constructs. Ser189 phosphorylation (upper panel) and total expression (lower expression) were monitored by immunoblot. **(B)** Rat1 cells were transiently transfected with myc₆-tagged wild type ERK3 (WT), the non-phosphorylatable (S386A) or the phosphomimetic (S386E) mutants. Subcellular localization was evaluated by indirect immunofluorescence microscopy (upper panels). The nuclei were visualized with DAPI staining (lower panels). When indicated, cells were treated with leptomycin B (LMB, 1 ng/mL) for 8 hours. Note that Ser386 mutants are localized identically to wild type ERK3.

FIG. 5. Generic and predicted substrates are poorly phosphorylated by ERK3 *in vitro*. **(A)** HEK 293 cells were transfected with ERK1 or an empty vector. Serum starved cells were stimulated with 10% calf serum (CS) for 10 min. ERK1 activity was measured in an immunoprecipitation/kinase assay using MBP as a substrate (autoradiography, upper panel). ERK1 expression was detected by immunoblot (lower panel). **(B)** HEK 293 cells were transfected with the indicated ERK3 constructs. ERK3 *in vitro* kinase assay were performed as in A. **(C)** ERK3 WT expressing HEK 293 cells were serum starved overnight. Cells were then stimulated with 10% calf serum (CS), 200 nM PMA (PMA), 400 mM sorbitol (sorb) or 200 μM hydrogen peroxide (H_2O_2) for 15 min. ERK3 kinase activity was evaluated as in A. **(D)** Schematic representation of the peptide/GST fusion used as substrate in E and F. **(E)** HEK 293 cells were transfected with HA-ERK1. ERK1 was activated by treating cells with 10% calf serum (CS) for 10 min. Kinase assay was performed on immunoprecipitated ERK1 with the peptide/GST fusion described in Table I. Peptide A: RPFSPPR; peptide B: VPFSPDR; peptide C: ILFSEDR. Substrate phosphorylation was activity was detected by autoradiography (upper panel). Equal amount of substrate was

evaluated by coomassie staining (middle panel). ERK1 expression was confirmed by HA-immunoblotting (lower panel). (F) HEK 293 cells were transfected with myc6-tagged ERK3 WT (+) or an empty vector (-). ERK3 was immunoprecipitated from exponentially growing cells and subjected to an *in vitro* kinase assay using the peptide/GST fusion described in F and in Table I.

FIG. 6. ERK3 inhibitory effect on cell cycle is independent of its kinase activity but require it C-terminal extension. (A) Rat1 cells were transfected with the indicated constructs. Serum starved cells were then stimulated with 10% calf serum for 20 hours and BrdU (10 μ M), at which point, cells were fixed and process for immunofluorescence microscopy. The percentage of transfected cells (myc-positive) that were in S-phase (BrdU-positive) is indicated. Error bars is standard deviation. (B) Representative results from A. Nuclei were stained with DAPI.

SUPPLEMENTARY FIG. 1. Tyrosine phosphorylation of ERK3. (A) HEK 293 cells were transfected with myc₆ERK3 wild type. Serum-starved cells labeled with ³²P_i were stimulated for 10 minutes with 10% calf serum (CS), 400 mM sorbitol (Sorbitol) or 100 μ M pervanadate (PV). Ectopic ERK3 was immunoprecipitated and analyzed by autoradiography (upper panel). In an identical experiment, cell lysates of stimulated cells were monitored by immunoblot to confirm equal ERK3 expression (lower panel). (B) Phosphopeptide mapping of ERK3 purified from unstimulated cells (CTL) or pervanadate-stimulated cells as described in A. Major phosphopeptides are numbered. The arrowhead indicates the loading site. Note the presence of two additional spots (3 and 4). (C) Phosphoaminoacid analysis of the spot identified in B, right panel. The migration of cold phospho-serine (pSer), -threonine (pThr) and -tyrosine (pTyr) residues is indicated. (D) HEK 293 cells were transfected with myc₆ERK3 wild type or an empty vector. Serum starved cells were stimulated for 10 minutes with 100 μ M pervanadate (PV). ERK3 was immunoprecipitated and analyzed with an anti-phospho-tyrosine antibody (upper panel). ERK3 expression was evaluated by immunoblotting cell lysate using an anti-myc antibody (lower panel).

SUPPLEMENTARY FIG. 2. Reversion of the SPR motif to APE does not rescue the lack of ERK3 protein kinase activity. **(A)** Alignment of subdomain VIII of MAP kinases containing the conserved APE motif. Note that ERK3 and ERK4 possess the SPR motif instead. **(B)** HEK 293 cells were transfected with the indicated constructs or an empty vector. Ectopic ERK3 was immunoprecipitated from exponentially growing cells. Purified ERK3 were submitted to an in vitro kinase assay using MBP (first panel from the top) or histone H1 (second panel from the top) as substrates. Identical lysates were monitored for ERK3 Ser189 phosphorylation (third panel from the top) and expression (lowest panel) by immunoblotting.

FIGURE 1

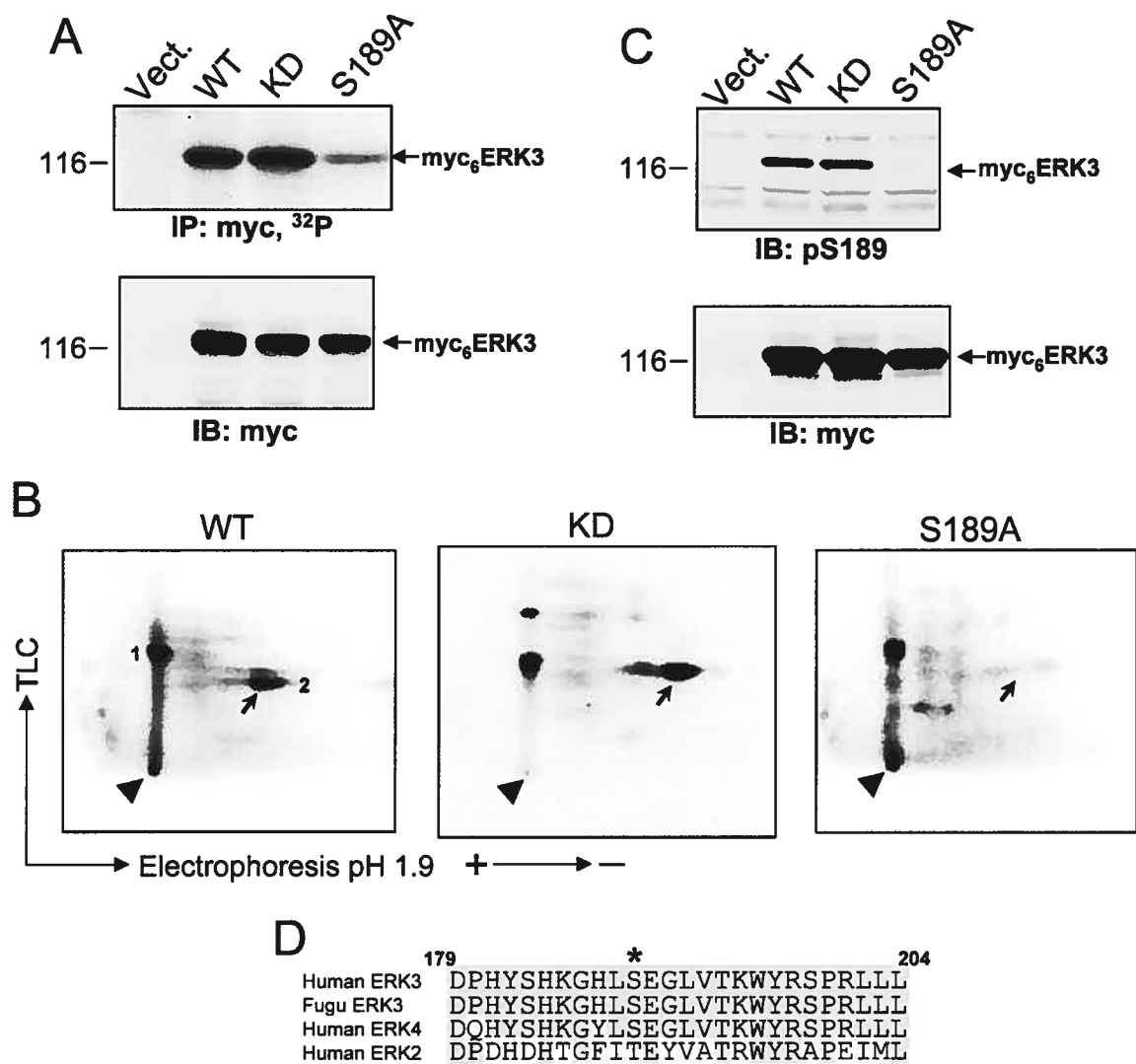


FIGURE 2

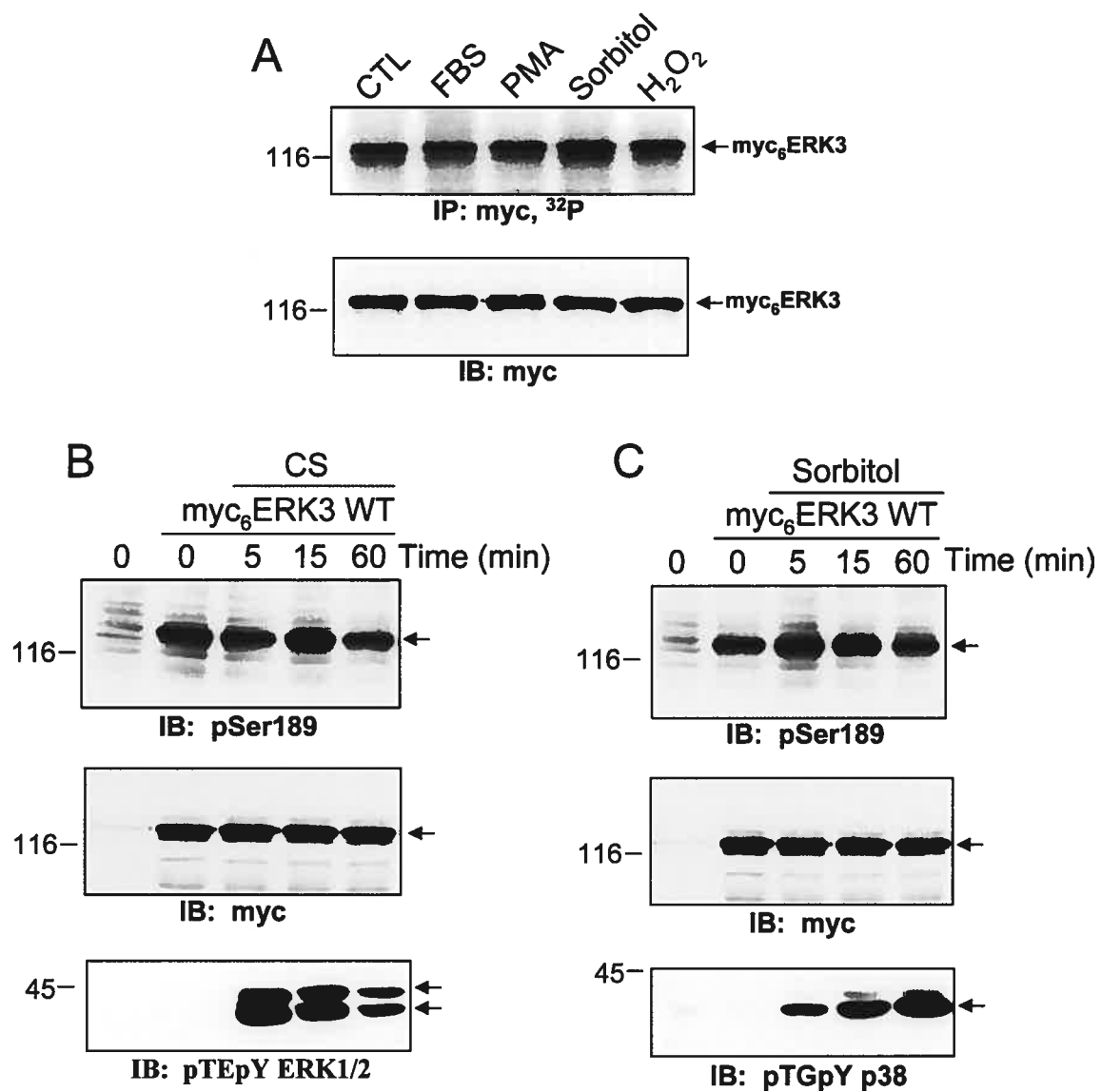


FIGURE 3

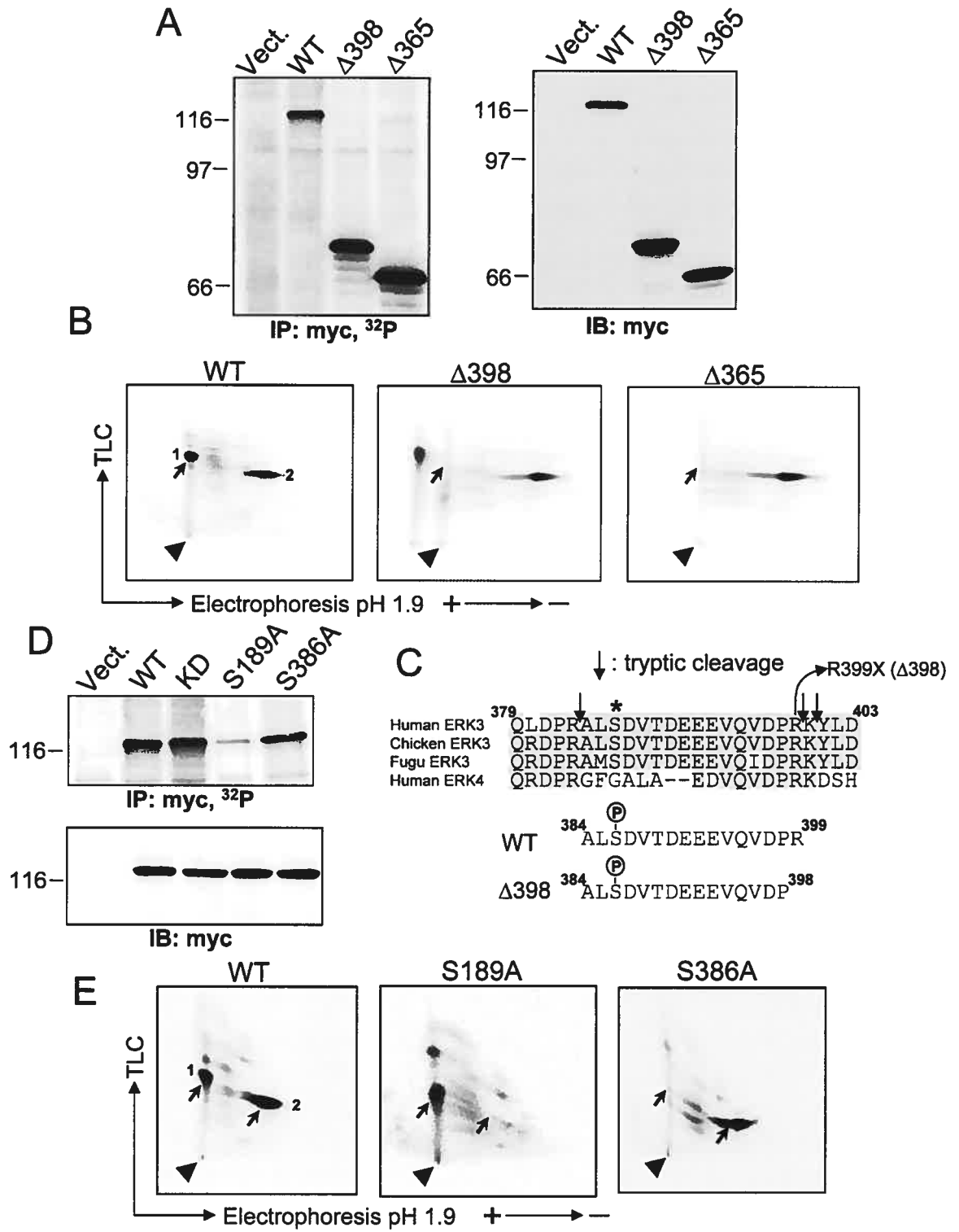


FIGURE 4

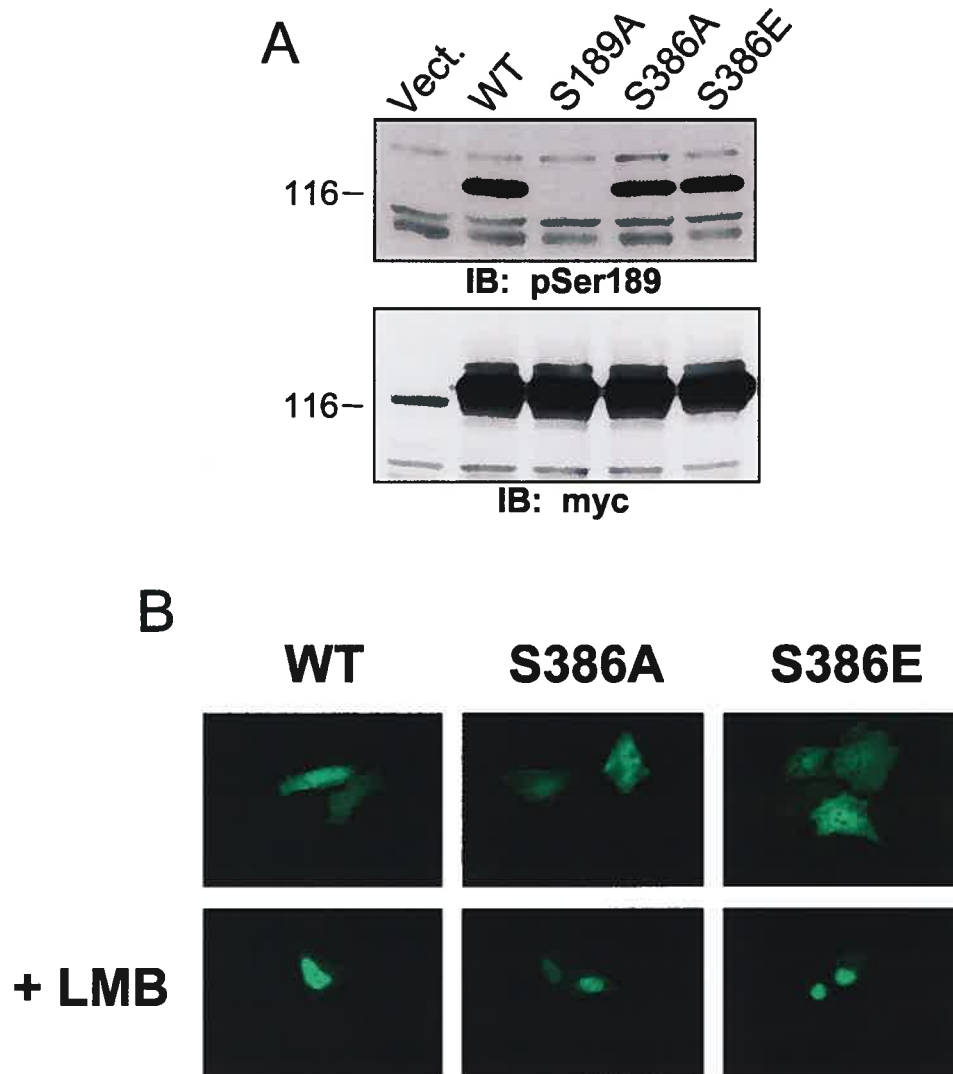


FIGURE 5

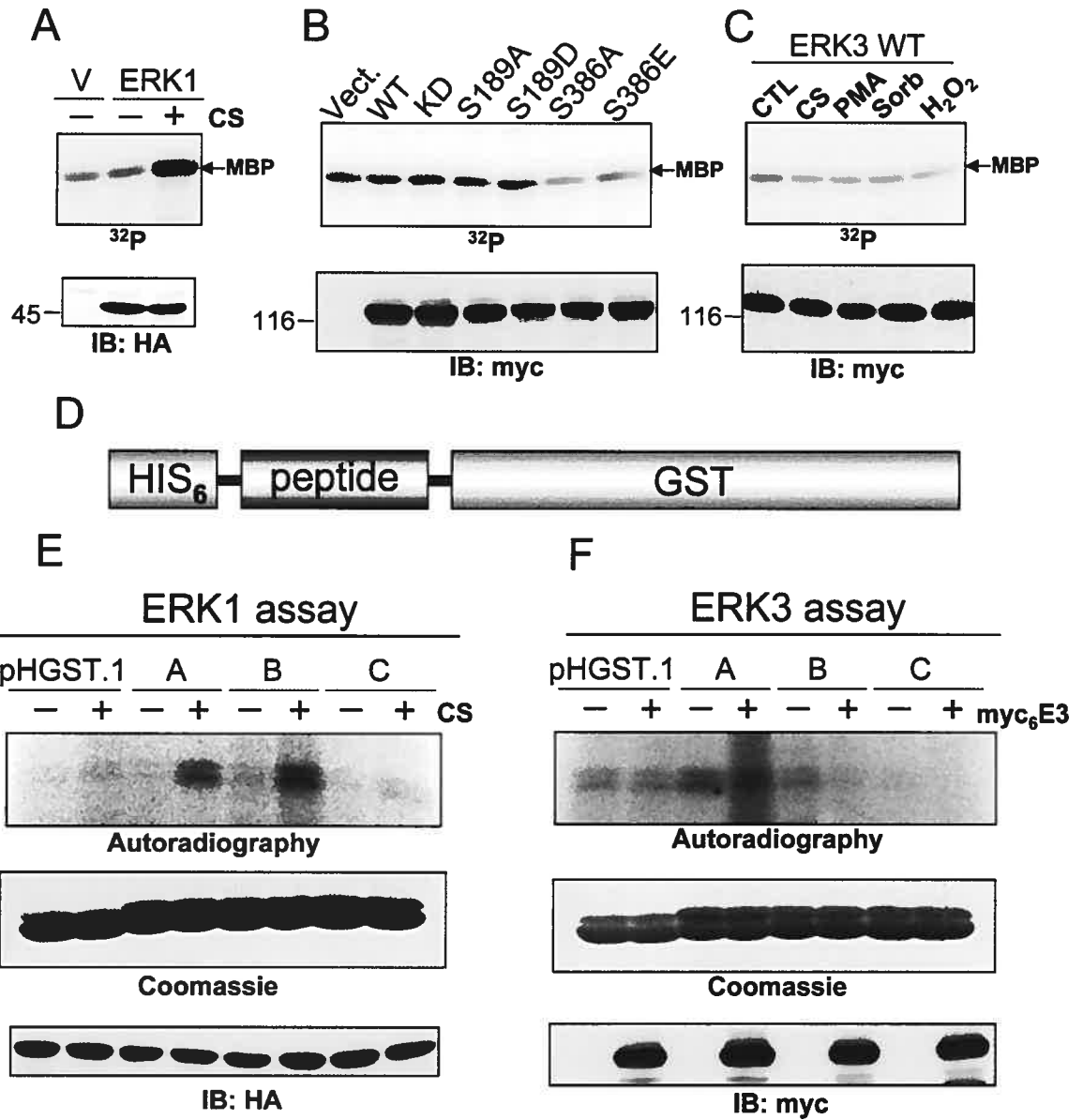


FIGURE 6

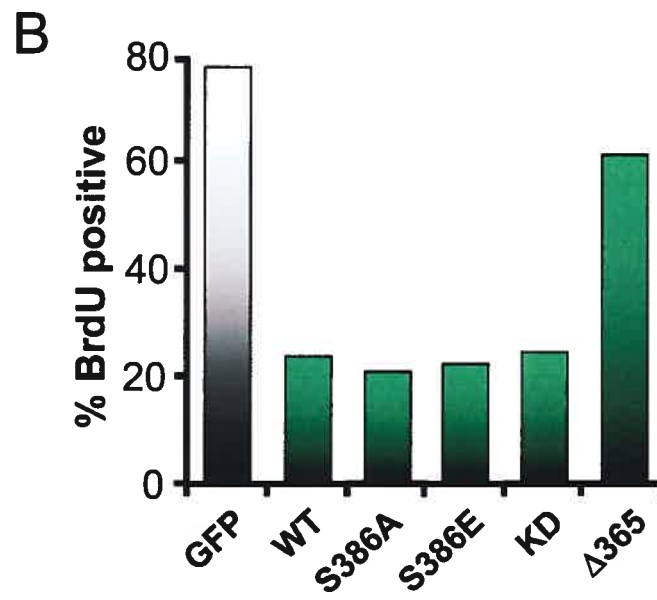
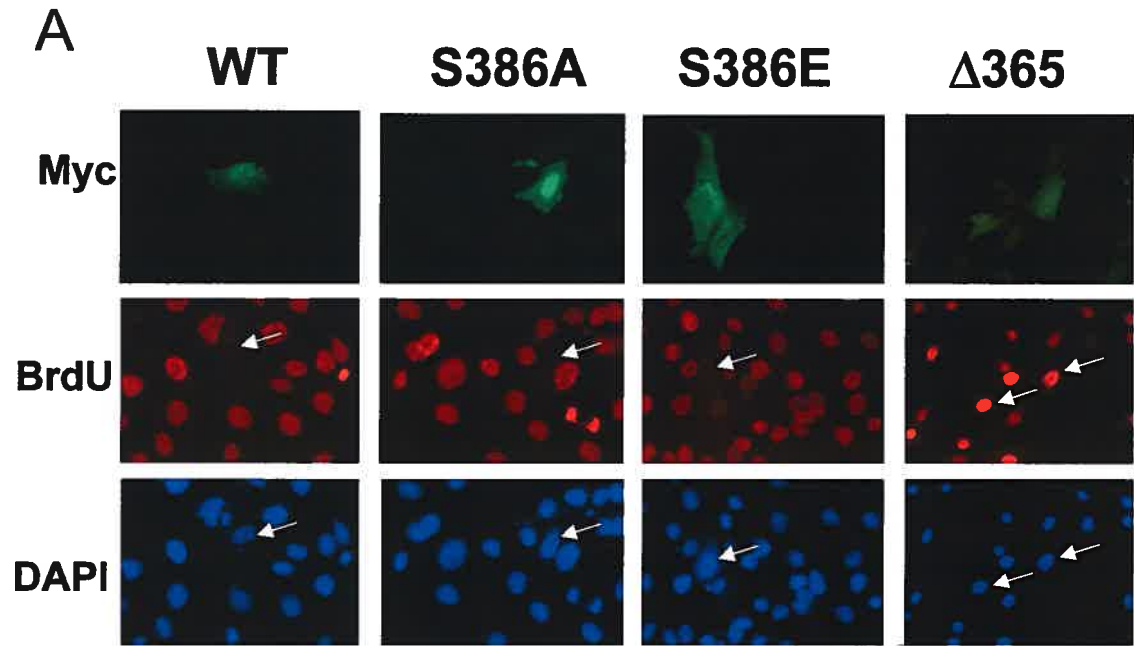
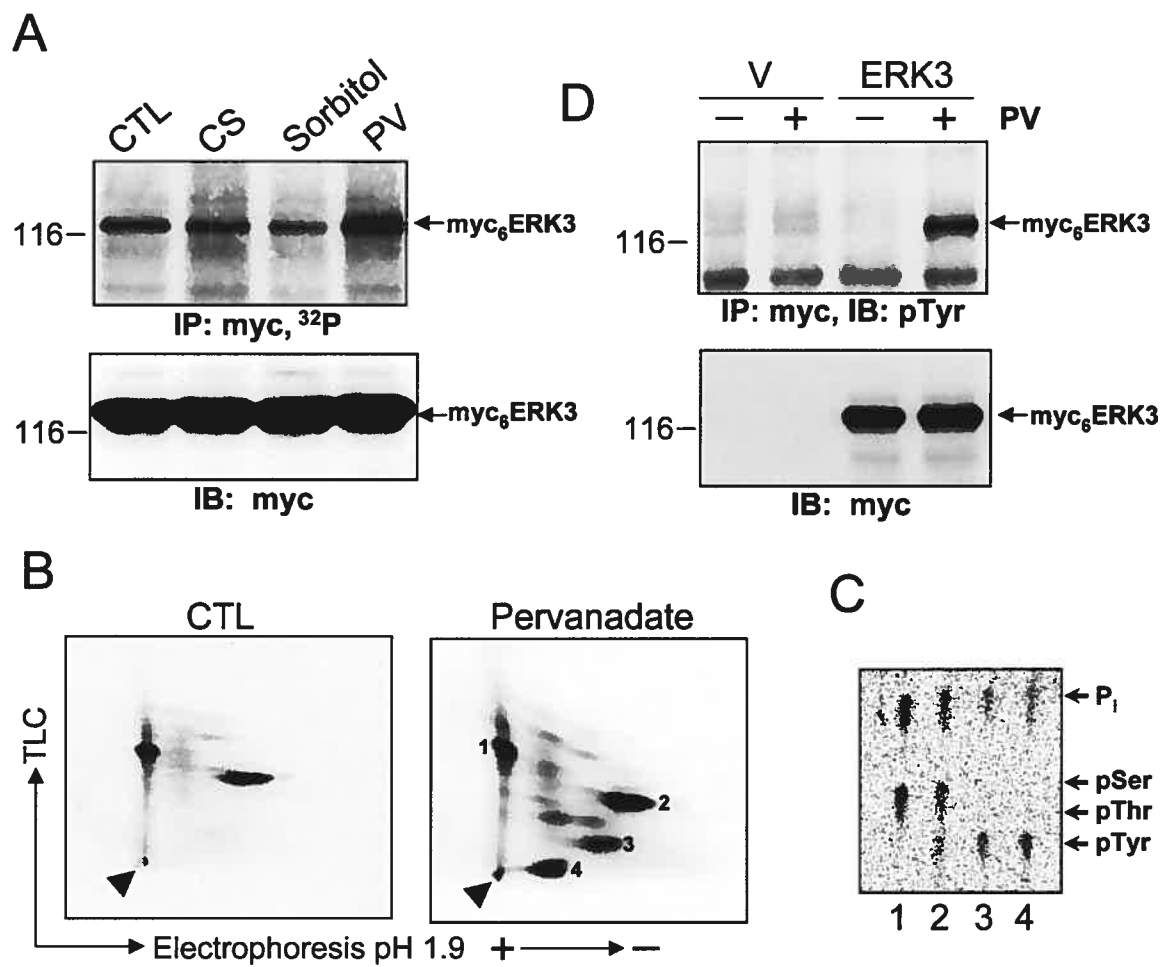


Table I: Predicted substrate specificity of ERK1 and ERK3

Name	Kinase	Predicted specificity						Chosen substrate
A	ERK1	[RKF]	-	[PVALS]	-[FML]-[ST]-P-	[PFLI]-[RKQSL]	RPFSPPR	
B	ERK3	[VLIMFC]	-	[PVALS]	-[FML]-[ST]-P-	[DE] -[RKQSL]	VPFSPDR	
C	ERK3	[AGVLIMPFTC]	-	[AGVLIFYCR]	-[FML]-[ST]-E-	[X] -[X,RKHQ]	ILFSEDR	

SUPPLEMENTARY FIGURE 1

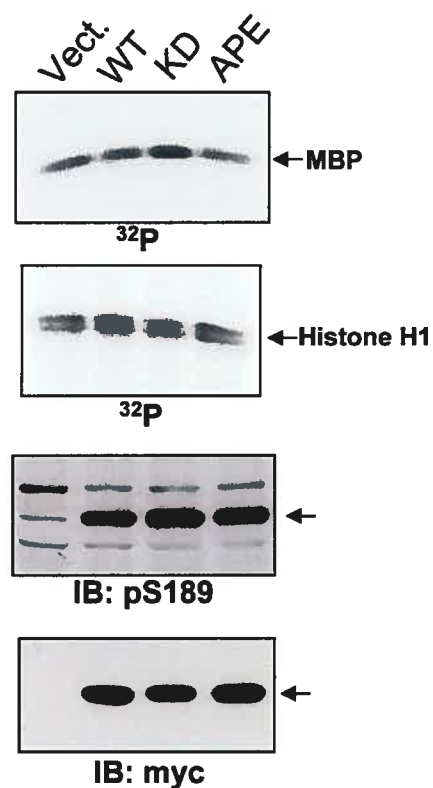


SUPPLEMENTARY FIGURE 2

A

ERK1	¹⁹⁹ GFLTEYVATRWR YRAPE IML ²¹⁷
ERK2	¹⁸⁰ GFLTEYVATRWR YRAPE IML ¹⁹⁸
ERK5	²¹⁶ YFMTEYVATRWR YRAPE LML ²³⁴
p38α	¹⁷⁷ DEMTGYVATRWR YRAPE IML ¹⁹⁵
p38β	¹⁷⁷ EEMTGYVATRWR YRAPE IML ¹⁹⁵
p38γ	¹⁸⁰ SEMTGYVVTRWR YRAPE VIL ¹⁹⁸
p38δ	¹⁷⁷ AEMTGYVVTRWR YRAPE VIL ¹⁹⁵
JNK1	¹⁸⁰ FMMPYVVTRY YRAPE VIL ¹⁹⁸
JNK2	¹⁸⁰ FMMPYVVTRY YRAPE VIL ¹⁹⁸
JNK3	²¹⁸ FMMPYVVTRY YRAPE VIL ²³⁶
ERK8	¹⁷² QAVTEYVATRWR YRAPE VLL ¹⁹⁰
NLK	²⁸³ RHMTQEVV TQYYRAPE ILM ³⁰¹
ERK3	¹⁸⁶ GHLSEGLVTKWY RS PRLLL ²⁰⁴
ERK4	¹⁸³ GHLSEGLVTKWY RS PRLLL ²⁰¹

B



DISCUSSION

6.1. Modes de régulation de ERK3

6.1.1. Phosphorylation

Nos résultats confirment que ERK3 est une phospho-protéine *in vivo*. Nous avons identifié deux sites de phosphorylation majeurs: les sérines 189 et 386. Ces sites sont conservés chez tous les homologues de ERK3 et sont également présents chez ERK4. ERK3 peut également être phosphorylée sur des résidus tyrosine.

6.1.1.1. Sérine 189

6.1.1.1.1. Régulation

ERK3 se distingue des MAPK classiques par la séquence SEG dans sa boucle d'activation au lieu du motif TXY. Le motif SEG est conservé chez tous les homologues de ERK3/4, suggérant qu'il est important pour l'activité et/ou la régulation de cette kinase. Nos expériences indiquent que la S189 est constitutivement phosphorylée. Ainsi, la phosphorylation de la S189 de ERK3 est observée dans les cellules quiescentes et n'est pas stimulée en réponse à plusieurs signaux extracellulaires activant les MAPK classiques. Il est néanmoins possible que d'autres stimuli non testés affectent cette phosphorylation.

La phosphorylation de la MAPK atypique ERK7 ressemble à celle de ERK3. Ainsi, ERK7 est constitutivement phosphorylée sur le motif TEY de sa boucle d'activation (3). Comme ERK3, cette phosphorylation n'est pas affectée par des stimuli des MAPK classiques (sérum, EGF, PMA, acide okadaïque). ERK7 se distingue par contre de ERK3 par son mécanisme de phosphorylation. Ainsi, un mutant inactif de ERK7 n'est pas phosphorylé, suggérant que cette MAPK s'autophosphoryle et s'autoactive *in vivo*. ERK7 produite chez l'organisme procaryote *E coli* est phosphorylée et active, démontrant que ERK7 seule s'autophosphoryle (2). À l'opposé, différents mutants inactifs de ERK3 sont phosphorylés sur la S189 au même degré que la protéine de type sauvage, suggérant fortement que cette phosphorylation est exécutée *en trans* par une kinase cellulaire.

6.1.1.1.2. La ERK3 kinase

L'identité de la kinase "activatrice" de ERK3 n'est pas connue. Toutefois en 1996, le groupe de MH Cobb reporta la purification partielle d'une kinase phosphorylant ERK3 sur la S189 (129). Malheureusement, la "ERK3 kinase" n'a pu être purifiée en quantité suffisante pour son identification moléculaire. Néanmoins, les données recueillies suggèrent que cette kinase possède des caractéristiques similaires aux MAPKK connues. En effet, comme les MAPKK, la ERK3 kinase est très spécifique et ne phosphoryle que ERK3 *in vitro* (129). Nous avons vu à la section 1.1.10. que les MAPKK interagissent et forment des complexes avec les MAPK. Cette association nécessite le domaine D de la MAPKK et le sillon d'arrimage de la MAPK (voir les sites d'arrimage, section 1.1.10.). De manière similaire, la ERK3 kinase interagit spécifiquement avec le domaine kinase de ERK3 (129). Bien que ERK3 soit probablement munie d'un sillon d'arrimage, on ignore si la ERK3 kinase possède un domaine D. Un moyen d'évaluer la pertinence du sillon d'arrimage et/ou des domaines CD et ED de ERK3 serait de les muter et de voir la conséquence sur sa phosphorylation en S189 *in vivo*. Si la mutation du site d'arrimage de ERK3 empêche sa phosphorylation sur la S189, alors les kinases possédant un domaine D seraient des candidats de la ERK3 kinase intéressants à tester.

Les MAPKK sont finalement caractérisées par le fait qu'elles phosphorylent la boucle d'activation de leurs substrats uniquement dans le contexte du domaine kinase. Ainsi, MEK1 n'est pas active envers un peptide correspondant au motif TEY de ERK1/2, indiquant que la MAPKK reconnaît des déterminants tridimensionnels présents chez son substrat (645). Nous avons montré qu'un mutant de ERK3 de taille équivalente à ERK1 (ERK3 Δ_{1-365}) est phosphorylé sur la S189 *in vivo*, indiquant que cette construction est reconnue par la ERK3 kinase. Par contre, un mutant légèrement plus petit (ERK3 Δ_{1-296}) n'est pas du tout phosphorylé sur la S189 (alors qu'il conserve bien sûr le site de phosphorylation) (chapitre 3). Ce résultat suggère que la ERK3 kinase reconnaît le domaine kinase de ERK3 dans sa conformation native, comme le font les MAPKK.

Il existe des candidats pour la ERK3 kinase. Ainsi, un crible en double hybride conduit dans notre laboratoire a permis d'identifier CDC7 comme une protéine interagissant spécifi-

quement avec le domaine kinase de ERK3. CDC7 est une kinase conservée de la levure jusqu'à l'homme impliquée dans la progression de la phase S (voir revue (355)). Nous avons confirmé biochimiquement l'association de ERK3 avec CDC7 (données non montrées). D'un autre côté, grâce à l'approche "TAP-tag", nous avons identifié MAKAPK5 (MK5) et NEK2 comme étant deux kinases copurifiant avec le domaine kinase de ERK3. La fonction de MK5 est inconnue (658) alors que NEK2 est une kinase impliquée dans la transition G2/M (448). Nous n'avons pas eu la chance de tester l'implication de ces trois kinases dans la phosphorylation de la Ser189. Dans cette optique, on pourrait utiliser des mutants dominants-négatifs et/ou des siRNA contre ces kinases et observer l'effet sur la phosphorylation de la S189 *in vivo*. La capacité de ces kinases à phosphoryler *in vitro* la S189 de ERK3 pourrait également être testée.

6.1.1.1.3. Impact de la phosphorylation de la Ser189

Que peut-on prédire des conséquences de la phosphorylation de ERK3 sur la Ser189 d'un point de vue structural ? La S189 phosphorylée, correspondant à la thréonine du TXY, devrait interagir avec le site primaire (ou RD) de liaison du phosphate. Cette interaction devrait entraîner un réarrangement de la boucle d'activation et un rapprochement des lobes du domaine kinase, tels qu'observés dans le cas de ERK2 (106). Par homologie de séquence, ERK3 posséderait le site primaire de liaison du phosphate. En modélisant la structure de ERK3 sur celle de phospho-ERK2, on peut observer ce site présumé. Le site RD de ERK3 comprend trois arginines comme celui de ERK2 (Figure 60A). De manière intéressante, ERK3 semble posséder le deuxième site de liaison du phosphate. En effet, l'arginine 192 de ERK2 est présente chez ERK3 (R198) alors que l'arginine 189 est substituée en lysine (K195), un résidu également basique. J'ai calculé le potentiel électrostatique de la surface de ERK2 et du modèle de ERK3 afin de faciliter l'observation des sites de liaison du phosphate; ces sites sont en effet très basiques et chargés positivement (247). Cette technique permet de visualiser clairement les deux sites de liaison présents sur ERK2 (Figure 60B). Le modèle prédit la présence de ces deux sites également chez ERK3 (Figure 60C). Du fait que ERK3 possède une glycine à la place de la tyrosine phosphorylée des MAPK classiques, on ignore la fonction du second site de liaison putatif du phosphate. Le rôle possible de ce site potentiel sera discuté à la section 6.3.

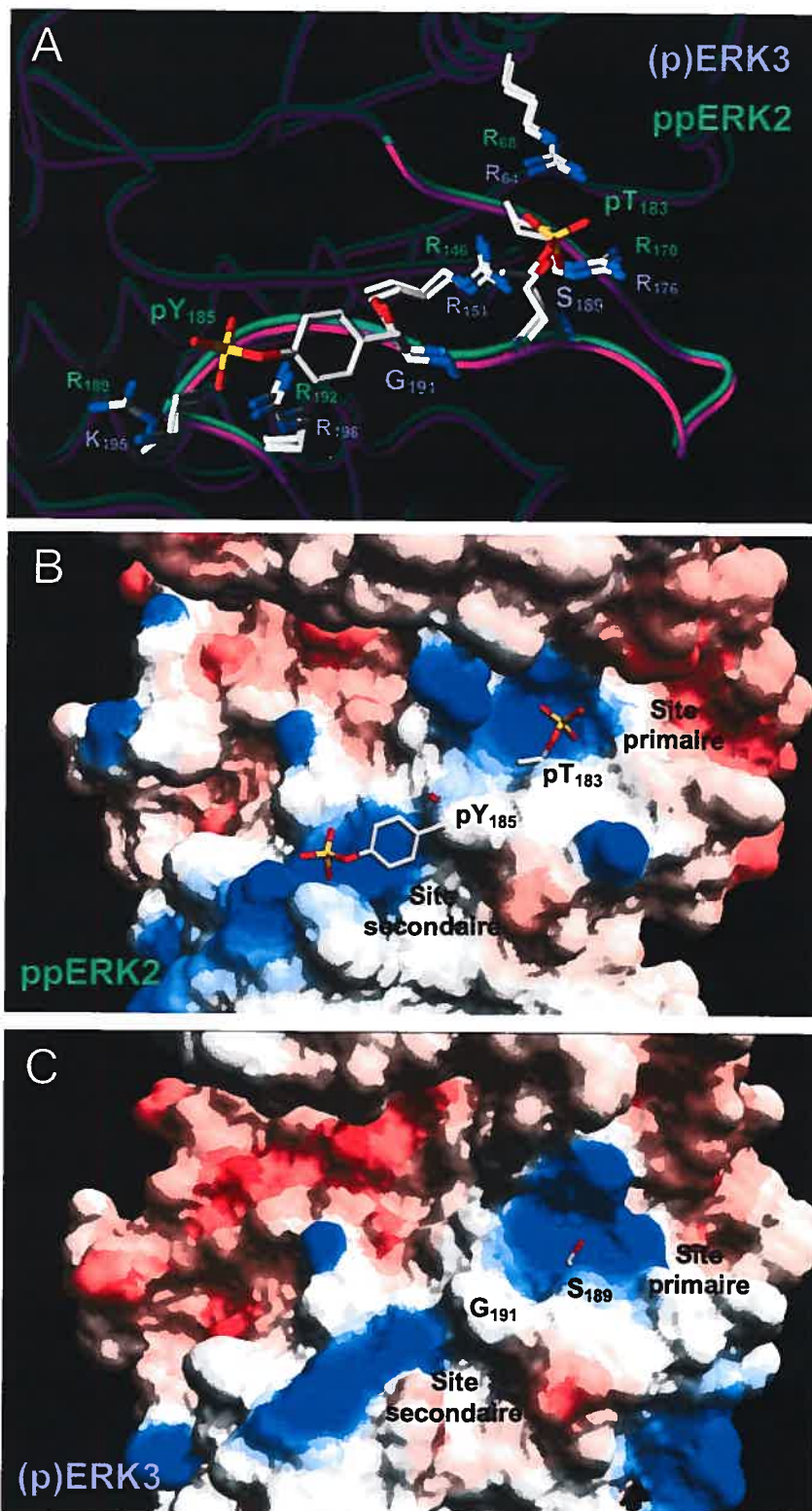


Figure 60: Modèle de l'activation de ERK3 par phosphorylation. (A) La structure de ERK3 fut modélisée sur celle de ERK2 sous forme phosphorylée. Les deux structures sont superposées et les boucles d'activation sont soulignées. Les arginines de ERK2 (en vert) interagissant avec la phospho-thréonine 183 et phospho-tyrosine 185 sont montrées. Les résidus basiques constituant ces deux sites de liaison du phosphate sont conservés chez ERK3 (en violet). (B) Le potentiel électrostatique de la surface de ERK2 est illustré. Les zones chargées positivement sont bleutées alors que celles à caractère négatif sont colorées en rouge. Le site primaire liant la phospho-Thr183 et le site secondaire liant la phospho-Tyr185 sont clairement visibles. (C) Potentiel électrostatique prédit de la surface de ERK3. On remarque la présence des deux sites basiques. La Ser189 est montrée. Modélisation faite à l'aide de SPDBV 3.7.

La fonction de la phosphorylation de la Ser189 reste à définir. Par analogie avec les autres MAPK, cette phosphorylation serait nécessaire pour l'activation catalytique de ERK3. L'absence de substrat pour ERK3 nous empêche de tester directement cette hypothèse. Nous savons toutefois que la phosphorylation de la S189 n'affecte pas la stabilité, la localisation subcellulaire et l'effet anti-prolifératif de ERK3 lors de sa surexpression.

6.1.1.2. Autres sites

Par une combinaison d'approches (marquage métabolique, cartographie de phosphopeptides et mutagenèse dirigée), nous avons identifié un second site de phosphorylation de ERK3, la S386. La régulation et le rôle de cette phosphorylation restent à caractériser. La phosphorylation de la S189, la stabilité protéique, la localisation et l'activité de ERK3 sur le cycle cellulaire ne sont pas affectées significativement par la phosphorylation de la S386. La production d'un anticorps phospho-spécifique contre cette sérine devrait faciliter grandement l'étude de sa régulation. La kinase de la S386 est inconnue. Les trois kinases interagissant avec ERK3 sont des candidats potentiels. Par homologie de séquence, ERK4 semblerait également posséder ce site de phosphorylation.

L'inhibition des tyrosine-phosphatases entraîne la phosphorylation de ERK3 sur au moins deux résidus tyrosine. Les données préliminaires indiquent que cette phosphorylation est située dans l'extension C-terminale. Grâce aux approches expérimentales maîtrisées au laboratoire du Dr Meloche, l'identification des sites de phosphorylation en tyrosine de ERK3 ne devrait pas poser de problèmes. Pour l'instant, on ignore la fonction de cette phosphorylation. Plus important encore, la pertinence physiologique de cette modification reste à démontrer. La phosphorylation en tyrosine des kinases peut être associée à leur activation (comme pour RAF-1 ou les MAPK classiques) ou à leur inhibition (CDK1) (170, 521). Il est concevable que cette modification post-traductionnelle de ERK3 lui permette d'interagir avec certaines molécules possédant un domaine SH2 ou PTB (685). La purification de ERK3 munie d'un TAP-tag en présence d'inhibiteurs de PTP permettrait d'identifier ces partenaires présumés.

6.1.2. Ubiquitination

6.1.2.1. NDR1/2, les dégrons de ERK3

ERK3 est constitutivement dégradée par le système ubiquitine-protéasome. Les substrat de ce système possèdent un motif nommé dégron qui est responsable de leur reconnaissance par le système de conjugaison de l'ubiquitine. Le mutant de délétion ERK3 Δ_{1-365} est instable *in vivo* comme la protéine pleine longueur, indiquant que le dégron de ERK3 se situe dans les premiers 365 acides aminés. Grâce à une série de chimères entre ERK3 et ERK1 (qui est stable), nous avons identifié deux régions dans la partie N-terminal de ERK3 contrôlant sa stabilité protéique. Ces dégrons furent nommés NDR1/2 pour "N-terminal Degradation Region 1 and 2".

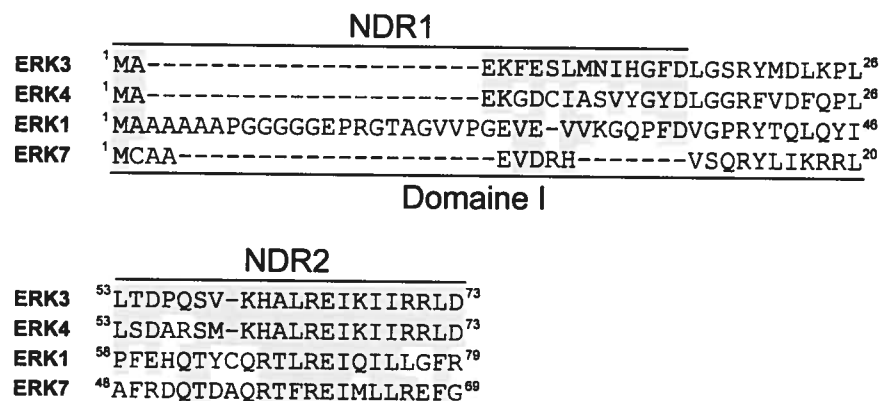


Figure 61: Alignement des dégrons NDR1/2 de ERK3 avec les séquences homologues de ERK1, ERK4 et ERK7. Les résidus identiques et similaires avec les NDR de ERK3 sont soulignés. Le motif important pour l'ubiquitination de ERK7 (Domaine I) est souligné. NDR: N-terminal Degradation Region.

Les 15 premiers acides aminés forment le NDR1 alors que le NDR2 correspond aux résidus 53 à 73 de ERK3 (Figure 61). Par alignement de séquence, on peut voir que les NDR ne sont pas observés chez ERK1, expliquant possiblement sa stabilité métabolique. Afin de mieux délimiter et caractériser les NDR, on pourrait faire un "alanine-scan", soit muter systématiquement chaque acide aminé des NDR en alanine (en solo ou en duo/trio) et observer l'effet sur la stabilité de ERK3. D'autre part, les résultats préliminaires obtenus par Justine Rousseau au laboratoire montrent que ERK4 est une protéine métaboliquement stable, comme les MAPK classiques. Ainsi, malgré sa grande homologie de séquence avec

ERK3, ERK4 ne semble pas posséder les NDR. Les résidus des NDR qui diffèrent entre ces deux protéines sont ainsi potentiellement des déterminants de l'instabilité de ERK3.

En modélisant le domaine kinase de ERK3 en se basant sur la structure de ERK2 non-phosphorylée, nous avons observé que les deux NDR sont très près physiquement (chapitre 2). Il est donc possible que cette surface soit reconnue par une ubiquitine ligase. En examinant la séquences des NDR, on ne voit pas de similarités avec d'autres dégrons connus comme la boîte D ou KEN (557).

ERK7 est une MAPK atypique constitutivement dégradée par le système ubiquitine-protéasome (397). Comme ERK3, la dégradation de ERK7 dépend d'un motif présent dans son N-terminal. Par une série de chimère entre ERK2 et ERK7, le groupe de MR Rosner a montré que les 20 premiers acides aminés de ERK7 (dégron nommé Domaine I) sont essentiels et suffisants pour sa dégradation protéasomale (397). Comme on peut le voir à la Figure 61, il y a très peu d'homologie entre le NDR1 de ERK3 et le domaine I de ERK7. Il est ainsi peu probable que ces deux kinases soient reconnues par la même ubiquitine ligase.

6.1.2.2. Ubiquitination sur l' α -amine (N-terminal)

Nous avons démontré que ERK3 est ubiquitinée sur son amine N-terminale (ou α -amine). De plus, cette modification est nécessaire pour la dégradation de ERK3. Cette conclusion est basée sur une série d'observations. Premièrement, un mutant tronqué de ERK3 de la taille de ERK1 (ERK3 Δ_{1-365}) est ubiquitiné et dégradé par le protéasome *in vivo* de manière similaire à la protéine pleine longueur, indiquant que le site (ou les sites) d'ubiquitination est présent dans les 365 premiers acides aminés de ERK3. La mutation des 16 lysines de ERK3 Δ_{1-365} (le mutant OK) n'affecte pas son ubiquitination et dégradation. Ce résultat est compatible avec l'idée que ERK3 est ubiquitinée en N-terminal. Néanmoins, il est également possible que ERK3 soit ubiquitinée sur des résidus cystéine et/ou sérine, comme proposé pour HLA.B7 (104). D'un autre côté, la dégradation de ERK3 Δ_{1-365} OK requiert un système de conjugaison de l'ubiquitine fonctionnel. Bien qu'en accord avec l'ubiquitination en N-terminal, un résultat similaire aurait pu être observé si ERK3 était ubiquitinée sur une cystéine/sérine. Nous avons également montré que l'ajout d'un épitope de plus de 25 acides

aminés en N-terminal stabilise ERK3 en empêchant sa polyubiquitination *in vivo*. Cet effet stabilisateur a également été observé pour la protéine ubiquitinée en N-terminal HPV-58 E7 (55). La dégradation de protéines ubiquitinées sur des lysines (SOCS3, p53 et I κ B- α) n'est pas significativement affectée par la présence d'épitopes en N-terminal, suggérant une certaine spécificité de l'effet stabilisateur pour l'ubiquitination en N-terminal. La ligase de ERK3 étant inconnue, il est présentement impossible de savoir par quel mécanisme les gros épitopes en N-terminal inhibent l'ubiquitination de ERK3. On présume que les gros épitopes diminuent l'efficacité de l'ubiquitination en perturbant le positionnement du groupement α -amine du substrat. Alternativement, il se peut qu'une fusion N-terminal empêche l'interaction de ERK3 avec sa ubiquitine ligase spécifique. De ce fait, on ne peut exclure la possibilité que la ligase de ERK3 serait spécifique envers les résidus cystéines ET que son association avec son substrat (ERK3) soit inhibée par la présence d'un épitope de grande taille en N-terminal. Dans ce cas purement hypothétique, l'effet stabilisateur des gros tags en N-terminal ne serait pas révélateur d'une ubiquitination en N-terminal.

Par des approches identiques, un petit groupe de protéines "ubiquitinées en N-terminal" a été décrit dans la littérature: MYOD (87), E7 de HPV-16 (596), LMP1 (24), LMP2A (304), ID1 (727), ID2 (192), p16^{INK4A} (55), p21^{WAF1} (69), p14^{ARF} (396) et CDT1 (648). Comme on vient de voir, il n'est pas exclu que ces protéines soient ubiquitinées sur des résidus cystéine et/ou sérine. À l'aide de la spectrométrie de masse, nous avons pu, pour la première fois, montrer directement l'ubiquitination en N-terminal d'une protéine. En effet, le peptide tryptique correspondant à l'ajout de l'ubiquitine au N-terminal de la fusion HA-ERK3-GST fut détecté. Plus important encore, l'ubiquitination en N-terminal a été observé pour ERK3 de type sauvage (donc contenant toutes ses lysines), indiquant que cette modification n'est pas un artéfact du à l'absence d'autres sites accepteur de l'ubiquitine. Deux mois et demi plus tard (et peu de temps avant de recevoir son Prix Nobel (752)) A Ciechanover reporta la détection directe de l'ubiquitination en N-terminal de HPV-16 E7 par spectrométrie de masse (55). Toutefois, le groupe de Ciechanover utilisa un substrat ubiquitiné *in vitro* alors que nous avons analysé ERK3 (et p21^{WAF1}, voir section 6.2.3.) ubiquitinée *in vivo*. L'ensemble de ces résultats démontre donc l'existence de l'ubiquitination en N-terminal chez les mammifères.

Une étape importante dans l'étude de l'ubiquitination de ERK3 serait l'identification de sa E3. Plusieurs approches ont été utilisées avec succès par le passé pour l'identification d'ubiquitine ligases. Tout d'abord, l'activité d'ubiquitination d'un substrat peut être purifiée biochimiquement. Récemment, le groupe de K Nakayama identifia une nouvelle ligase pour p27^{KIP1} (KPC1/2) de cette manière (336). Pour l'appliquer à ERK3, cette technique nécessite d'avoir un essai d'ubiquitination *in vitro* robuste, ce qui nous manque présentement.

La génétique chez la levure facilite également l'identification des ubiquitine ligases. Par exemple, le facteur de transcription humain c-MYC est dégradé par le système ubiquitine-protéasome autant chez l'homme que la levure. En utilisant différentes levures mutantes en certaines E3 et en complétant avec des ligases humaines, le groupe de WP Tansey a identifié le complexe SCF^{SKP2} comme ligase spécifique de c-MYC (357). Il est intéressant de remarquer qu'il n'y a pas d'homologue direct de c-MYC chez *S cerevisiae*, malgré le fait que cette protéine soit reconnue par les ligases endogènes de levure. Comme c-MYC, il n'y a pas d'homologue direct de ERK3 chez la levure. Nous avons construit des vecteurs d'expression de ERK3 chez la levure et nous avons évalué son expression. Nos données préliminaires indiquent que ERK3 n'est pas instable et ne serait pas reconnue par le système de conjugaison de l'ubiquitine chez la levure (P Coulombe, P-L Tanguay et S Meloche, données non publiées).

L'association E3/substrat est quelquefois assez forte pour permettre la purification du complexe. Ainsi, la protéine à boîte F (PBF) β -TrCP1 fut identifiée par son interaction avec le phospho-dégron de I κ B- α , son substrat (818). Notre expérience de TAP-tagging n'a pas pour l'instant permis d'identifier de ligase. Par contre, les protéines isolées du criblage en double hybride devraient être considérées comme des ligases potentielles. Ce crible fut exécuté par Josée Noel, une ancienne agente de recherche. Le domaine kinase de ERK3 fut utilisé comme appât; la protéine pleine longueur possède une activité transcriptionnelle chez la levure. Bien qu'aucun partenaire ne possède un domaine caractéristique d'une E3 (HECT, RING ou boîte U), ces protéines pourraient faire partie d'ubiquitine ligases

multimériques inconnues. L'effet de la surexpression et de la suppression par RNAi de ces interacteurs sur la stabilité de ERK3 devrait être analysé.

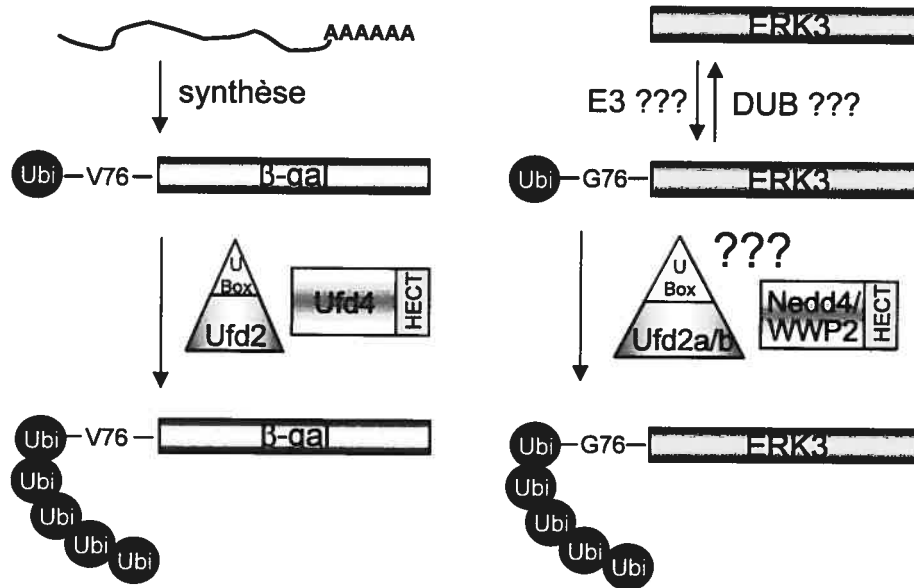


Figure 62: Rôle possible de la voie UFD dans l'ubiquitination de ERK3. (A) Le substrat de la voie UFD Ubi-V76- β -galactosidase est polyubiquitiné chez la levure par l'action de Ufd2p et Ufd4p. (B) ERK3 pourrait être monoubiquitinée par une E3 ligase inconnue. ERK3 monoubiquitinée en N-terminal est identique aux substrats de la voie UFD et pourrait être reconnue par les homologues de Ufd2p et Ufd4p.

Finalement, les protéines de la voie UFD (Ubiquitin Fusion Degradation) pourraient être impliquées dans l'ubiquitination de ERK3. En effet, la voie UFD induit la polyubiquitination et la dégradation des protéines possédant une ubiquitine en N-terminal (323). Une chimère ubiquitine-V76- β -galactosidase est ainsi instable chez la levure alors que l'enzyme seul est stable. Il est important que la glycine76 de l'ubiquitine soit mutée en alanine ou valine afin d'empêcher la déubiquitination de la chimère par les DUB cellulaires. Le groupe d'A Varshavsky a identifié génétiquement *Ufd2* et *Ufd4* comme étant impliquées dans l'ubiquitination du substrat modèle (324). Ces protéines possèdent respectivement une boîte U et un domaine HECT, signature moléculaire de protéines à activité ubiquitine ligase. Il existe de nombreux homologues de ces protéines chez les mammifères (370). Nos données biochimiques indiquent qu'il doit exister *in vivo* un intermédiaire de ERK3 monoubiquitinée en N-terminal (Figure 62). Cette forme de ERK3 serait engendrée par une E3 encore indéterminée. On remarque que ERK3 monoubiquitinée en N-terminal est identique aux substrats artificiels de la voie UFD (Figure 62). Ainsi, il est concevable que cette forme soit reconnue et polyubiquitinée par les homologues de Ufd2p et Ufd4p. Il est intéressant de noter que WWP2, NEDD4 et AIP4, des homologues directs de Ufd4p, semblent impliquées dans l'ubiquitination de LMP2A, un substrat potentiel de la N-

ubiquitination (303). L'implication de ces ligases dans l'ubiquitination de ERK3 pourrait être testée.

6.1.2.3. Ubiquitination sur une ϵ -amine (lysine)

L'ubiquitination en N-terminal de ERK3 est à la fois essentielle et suffisante pour sa dégradation protéasomale. Néanmoins, nos évidences biochimiques suggèrent l'existence de formes de ERK3 oligoubiquitinée sur résidus lysines. En effet, des formes contenant ≤ 5 copies d'ubiquitine sont détectées par immunobuvardage (chapitre 3). Ces espèces immunoréactives sont éliminées par la mutation des lysines de ERK3, suggérant que leur conjugaison se fait sur ces résidus. Si tel est le cas, la réintroduction de lysines spécifiques chez ERK3 Δ_{1-365} OK devrait faire réapparaître les formes oligoubiquitinées. La spectrométrie de masse pourrait également détecter l'ubiquitination sur des lysines directement. Pour l'instant, nous n'avons pas observé directement les adduits de l'ubiquitine sur une ou des lysines de ERK3. On ignore si cette ubiquitination affecte l'activité biologique de ERK3.

6.2. Ubiquitination versus acétylation en N-terminal

6.2.1. La maturation du N-terminal chez les eucaryotes

Le N-terminal des protéines est soumis à une maturation durant la traduction. Tout d'abord, la méthionine initiatrice est clivée par les MAP (Methionine AminoPeptidases) selon la nature du second résidu (ou "penultimate residue") (85). Les protéines possédant un acide aminé dont la chaîne latérale est petite (soit G, A, S, T, C, V et P) voient leur Met1 clivée. Les autres protéines gardent la Met1. Toujours pendant leur traduction, les protéines sont ensuite soumises à l'action des NAT (N-terminal Acetyl-Transferases) (573). En utilisant l'acétyl-CoA comme cofacteur, ces enzymes acétylent le groupement α -amine dépendant de la séquence du N-terminal. Le résidu en position 1 est très important, de même que les 2-4 suivants. Trois classes de NAT sont connues et se distinguent par leur spécificité de substrats (Figure 63A). Les protéines possédant en N-terminal un acide aminé à petite chaîne (A, S, T, G) ou une méthionine suivie de résidus acides (MD-, ME-) ou

hydrophobes (MM-, ML-, MI-, MF-, MY-) sont susceptibles à la N-acétylation. La présence d'une charge positive en position 2 inhibe en général cette acétylation. La maturation du N-terminal des protéines est un phénomène conservé de la levure jusqu'à l'homme.

L'acétylation du N-terminal est une modification très fréquente. Ainsi, on estime que 85 % des protéines intracellulaires sont acétylées en N-terminal chez les eucaryotes supérieurs (556). Dans la majorité des cas, on ignore la fonction de cette modification. Souvent, son inhibition n'a aucune répercussion. L'inactivation des NAT chez la levure ne compromet pas la viabilité, suggérant que la N-acétylation n'est pas une modification essentielle pour la fonction de la majorité des protéines (572). Par contre, il existe quelques exemples montrant un rôle de la N-acétylation dans les interactions protéine/protéine. Par exemple, la N-acétylation de la tropomyosine est essentielle pour son association avec la tropomoduline (736).

A			
	NatA	NatB	NatC
	S-	ME-	MI-
	A-	MD-	ML-
	T-	MN-	MW-
	G-	MM-	MF-
	C-		MY-
	V-		

B			
Protéines N-ubiquitinées	Séquence du N-terminal	N-acétylation prédite	N-acétylation observée <i>in vivo</i>
ID1	MKVASQS	MKVASQS	?
ID2	MKAFSPV	MKAFSPV	?
HPV16 E7	MHGNNPT	MHGNNPT	?
p19 ^{ARF}	MGRRFLV	GRRFLV	GRRFLV
p16 ^{INK4a}	MEPAAGS	Ac-MEPAAGS	?
MYOD	MELLSPP	Ac-MELLSPP	?
LMP1	MERDLSE	Ac-MERDLSE	?
LMP2a	MVPMGAG	Ac-VPMGAG	?
CDT1	MEQRRVT	Ac-MEQRRVT	?
p21 ^{WAF1}	MSNPGDV	Ac-SNPGDV	Ac-SNPGDV
ERK3	MAEFES	Ac-AEFES	?
HA	MYDVPDY	Ac-MYDVPDY	Ac-MYDVPDY

Figure 63: L'acétylation en N-terminal des protéines chez les mammifères. (A) Spécificité des trois classes de N-acétyl transférases (Nat). (B) Maturation du N-terminal des protéines ubiquitinées en N-terminal. Adaptée de (573).

L'acétylation en N-terminal ne doit pas être confondue avec l'acétylation du groupement ϵ -amine des lysines. Cette acétylation est catalysée par une famille non-apparentée aux NAT,

les HAT (Histone Acetyl-Transférases) (voir revue (359)). L'acétylation sur les lysines est surtout connue pour ses effets transcriptionnels. En effet, l'acétylation des histones régule fortement la conformation de la chromatine. L'acétylation sur les lysines est une modification post-traductionnelle réversible. Deux classes distinctes d'enzymes catalysent la déacétylation des histones: les HDAC (Histone DeAcetylases) et les Sirtuines (68, 716).

6.2.2. L'acétylation en N-terminal est-elle irréversible ?

Les données biochimiques indiquent clairement que l'ubiquitination et l'acétylation sont mutuellement exclusives (108). Une amine acétylée est réfractaire à l'ubiquitination. Une protéine ubiquitinée en N-terminal doit donc avoir son α -amine libre (à un moment ou un autre). Les protéines ne subissant pas la N-acétylation sont dans cette situation. Le résidu positif en position 2 de HPV16 E7 (MHG-), ID1 (MKV-), ID2 (MKA-) et p19^{ARF} (GRR-) rendrait ces dernières insensibles aux NAT et ainsi susceptible à la N-ubiquitination (Figure 63B). Le groupe de CJ Sherr a confirmé que p19^{ARF} n'est pas N-acétylé lorsque traduit dans un lysat de réticulocyte (396). Par contre, on ignore encore la nature du N-terminal de E7, ID1 et ID2 *in vivo*.

De manière surprenante, la majorité des protéines décrites comme étant ubiquitinées en N-terminal sont potentiellement N-acétylées (Figure 63B). Le groupe de Roberts a confirmé par spectrométrie de masse que p21^{WAF1} endogène est complètement acétylé en N-terminal à l'équilibre (125). Par une approche similaire, nous avons observé que les constructions HA-ERK3 et HA-p21^{WAF1} (commençant par MYD-) sont N-acétylés à environ 80 % (données non montrées). Le dogme veut que la N-acétylation soit une modification irréversible (572, 573). Les protéines N-acétylées ne devraient donc pas être susceptibles à l'ubiquitination en N-terminal. Ainsi, la majorité de HA-ERK3 néosynthétisée étant N-acétylée et réfractaire à l'ubiquitination en N-terminal, cette protéine devrait avoir une demi-vie beaucoup plus longue que celle observée (30 minutes)! En effet, 80 % de HA-ERK3 devrait être métaboliquement stable. Paradoxalement, nos résultats de spectrométrie de masse montrent également la liaison du C-terminal de l'ubiquitine avec l'amine- α de la Met1 de HA-ERK3 et HA-p21^{WAF1}. Ainsi, 10 % des peptides correspondant au N-terminal

possèdent une diglycine, un signe indicateur de l'ubiquitination. Les 10 % restants ont leur α -amine libre.

Comment une protéine N-acétylée peut-elle être soumise à l'ubiquitination en N-terminal? Je pense que nos données suggèrent fortement que la N-acétylation n'est pas une modification irréversible. Il est possible que l'amine primaire d'une protéine N-acétylée soit régénérée par une activité déacétylase du N-terminal ou NDAC (pour N-terminal DeAcetylase). Aucune évidence ne suggère toutefois l'existence d'une activité NDAC chez les mammifères. D'un autre côté, l'irréversibilité de la N-acétylation n'est pas démontrée de façon rigoureuse non plus! Il se peut que la N-acétylation observée d'une protéine soit la résultante d'un équilibre (steady state) entre une réaction d'acétylation et une de déacétylation. C'est le modèle de la "N-acétylation à l'équilibre" (Figure 64A).

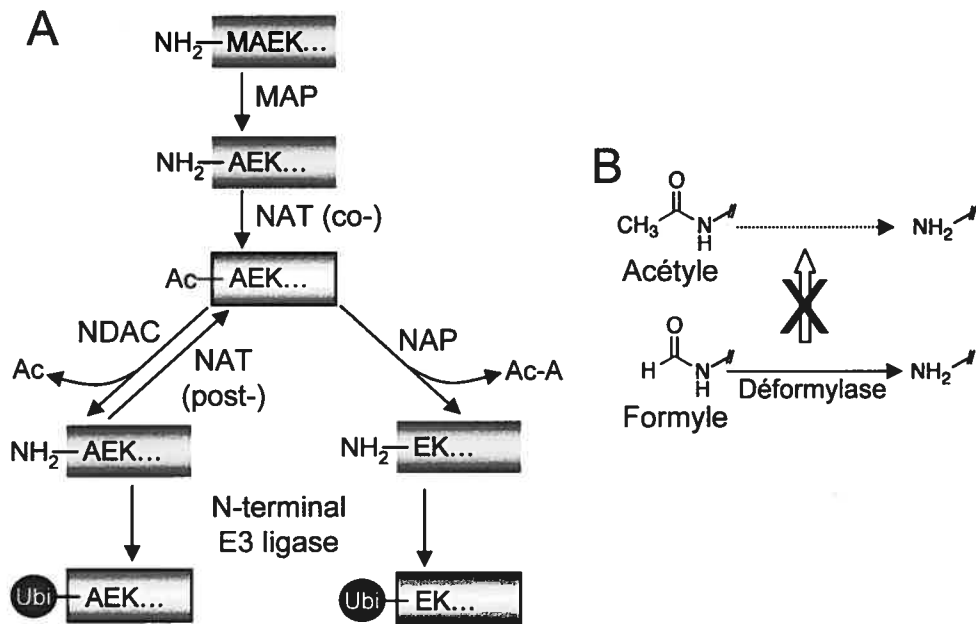


Figure 64: Modèle de la régulation de la N-acétylation chez les mammifères. (A) ERK3 devrait voir sa méthionine initiatrice clivée par les MAP (Méthionine Amino Protease). Ensuite, l'Ala2 serait acétylée par NATa de manière co-traductionnelle. La forme N-acétylée de ERK3 pourrait être déacétylée par une déacétylase du N-terminal (NDAC). Alternativement, le N-terminal de ERK3 serait clivé par une N-Acetyl Protéase (NAP). Le nouveau groupement amine ainsi généré serait susceptible à l'ubiquitination en N-terminal. (B) La déformylase clive la formylation en N-terminal chez les procaryotes et les mitochondries. Cet enzyme n'a pas d'activité contre le groupement acétyle.

Bien qu'aucune NDAC ne soit connue, des enzymes similaires existent de la bactérie jusqu'à l'homme. Chez les procaryotes (et les mitochondries), la méthionine initiatrice est formylée. Le groupement formyle est similaire à l'acétyle, un groupement méthyle en moins (Figure

64B). Un enzyme, la déformylase, hydrolyse le lien amide entre le formyle et le N-terminal. Les déformylases ne sont pas actives envers le groupement acétyle; elles n'ont pas d'activité NDAC (230).

L'activité NDAC pourrait être mise en évidence par un essai enzymatique. Ainsi, il serait possible de mesurer la libération d'acétyle radiomarqué d'une protéine N-acétylée *in vitro* induite par un extrait acellulaire. Un tel essai permettrait la purification biochimique par chromatographie de la NDAC. L'activité NDAC pourrait également être mise en évidence *in vivo* par une approche de type "pulse-chase". Cet essai consiste à incuber les cellules avec de l'acétate isotopiquement plus lourd pendant un certain temps ("pulse"), puis avec un excès d'acétate léger ("chase"). Des échantillons sont retirés à la fin du "pulse" et durant le "chase". Par spectrométrie de masse, on peut différencier précisément la proportion du N-terminal possédant un acétate lourd. En mesurant cette proportion durant le chase, on pourra savoir si l'acétate en N-terminal est labile ou non. Une approche similaire basée sur l'utilisation d'acétate radiomarqué a été utilisée pour l'étude de l'acétylation (sur les lysines) des histones (769). Si la N-acétylation est irréversible, alors la proportion du peptide N-terminal possédant l'acétate lourd devrait rester constant. À l'opposé, une diminution de ce rapport serait un indicateur d'une déacétylation *in vivo*. Dans cette expérience, il est primordial d'inhiber le protéasome afin de s'assurer qu'une baisse de signal ne soit pas simplement la conséquence d'une dégradation protéique.

Pour que ce modèle de la "N-acétylation à l'équilibre" soit possible, il est nécessaire que les NAT puissent agir de manière post-translationnelle. On sait que ces enzymes acétylent le N-terminal de polypeptide en synthèse possédant moins de 50 résidus (voir (181)). Si les NAT ne sont actives que sur ces protéines naissantes, alors l'activité NDAC hypothétique entraînerait la déacétylation à l'équilibre des protéines, ce qui n'est pas observé *in vivo*. L'activité des NAT sur les protéines natives est mal caractérisée. Les études portant sur l'actine montrent que cette protéine peut être N-acétylée même lorsque sa synthèse est complétée (622, 623). Il est ainsi possible que d'autres protéines soient également sujettes à la N-acétylation post-translationnelle. Des expériences de N-acétylation *in vitro* sur des protéines non N-acétylées (produites chez *E coli* ou par traduction *in vitro* en absence d'acétyl-CoA) menées avec des lysats cellulaires pourraient révéler une activité NAT post-translationnelle. *In vivo*, des expériences de marquage métabolique seraient intéressantes.

Ainsi, l'incorporation d'acétate marqué sur la protéine d'intérêt pourrait révéler l'activité NAT post-traductionnelle. La détection de l'acétate peut se faire par spectroscopie de masse en utilisant un acétate plus lourd. Pour que l'expérience soit convaincante, il est important d'inhiber la synthèse protéique, source importante de N-acétylation. Ainsi, l'incorporation d'acétate en N-terminal en l'absence de synthèse protéique serait un résultat très intéressant.

D'un autre côté, le groupement α -amine pourrait être généré chez une protéine N-acétylée par l'action d'une aminoprotéase (NAP pour N-Acetyl Amino Protease). Cet enzyme hypothétique enlèverait un ou quelques acides aminés d'une protéine N-acétylée, générant un nouvel α -amine (Figure 64A). Si tel était le cas, alors les formes N-ubiquitinées manqueraient au moins un acide aminé en N-terminal. Nos données indiquent toutefois que l'ubiquitination de HA-ERK3 et HA-p21^{WAF1} n'est pas accompagnée d'un clivage de leur N-terminal. L'ubiquitine est rattachée à la Met1. Il est important d'avoir plus de données de spectrométrie de masse sur la N-ubiquitination d'autres protéines, notamment les protéines possédant un N-terminal natif, pour se faire une idée plus précise de ce processus.

La maturation de l'actine implique l'action d'une NAP, la ANAP (pour Actin N-Acetyl amino Peptidase) (656). ANAP reconnaît la séquence Ac-MD- et Ac-CD- de l'actine et clive le résidu acétylé en position 1 générant un acide aspartique en N-terminal. Ce dernier est ensuite N-acétylé. La spécificité de ANAP est mal caractérisée. Il est concevable qu'il puisse exister une activité NAP *in vivo*. Un essai enzymatique *in vitro* couplé à la spectrométrie de masse pourrait mettre en évidence cette activité.

6.2.3. La dégradation de p21 se fait-elle sans ubiquitination ?

On estime que l'ubiquitination est LE signal essentiel pour le ciblage vers la dégradation protéasomale. Quelques protéines sont néanmoins décrites comme étant dégradées par le protéasome de manière ubiquitine-indépendante (295). L'ornithine décarboxylase (ODC) est l'exemple le mieux caractérisé. Le recrutement de ODC vers le protéasome se fait via la protéine antizyme qui peut lier à la fois le protéasome et ODC. En accord avec ce mode de ciblage, ODC n'est pas polyubiquitinée *in vivo*.

En l'an 2000, le groupe de J Roberts reporta l'identification d'un substrat additionnel du protéasome ne nécessitant pas l'ubiquitination: l'inhibiteur de CDK p21^{WAF1} (655). Cette conclusion était "supportée" par plusieurs observations. Premièrement, la mutation des lysines de p21^{WAF1} n'empêche pas sa dégradation par le protéasome *in vivo*. Comme on vient de voir, l'ubiquitination d'une protéine peut se faire de manière indépendante des lysines (N-terminal et cystéine/sérine). Contrairement à l'ODC, p21^{WAF1} est une protéine ubiquitinée *in vivo* (69, 111, 458, 619, 655 et chapitre 3). La mutation des lysines de p21^{WAF1} entraîne la disparition des formes oligoubiquitinées (≤ 4 copies d'ubiquitines). Selon le groupe de J Roberts, ce résultat suggère fortement que la dégradation protéasomale de p21^{WAF1}-0K ne requiert pas son ubiquitination, car la protéine ne serait pas du tout ubiquitinée (655). Bien sûr, il faut toujours garder en tête que l'absence d'évidence n'est pas évidence d'absence. De manière intéressante, notre analyse de l'ubiquitination de p21^{WAF1} a permis d'observer deux formes d'ubiquitination: une polyubiquitination de haut poids moléculaire (> 97 kDa) et une oligoubiquitination (entre 31 et 97 kDa). Comme J Roberts, nous avons également observé que le mutant sans lysine de p21^{WAF1} n'est pas oligoubiquitinée comparativement à la protéine de type sauvage. De manière identique à ERK3, l'oligoubiquitination de p21^{WAF1} semble conjuguée sur les lysines. Par contre, la polyubiquitination de p21^{WAF1} n'est pas dépendante de résidus lysines. p21^{WAF1}-0K se comporte donc comme la protéine sauvage en ce qui a trait à sa dégradation protéasomale et à son ubiquitination *in vivo*. Le groupe de M Pagano a également observé la polyubiquitination de p21^{WAF1}-0K (69). Ces observations ne permettent donc pas d'affirmer que sa dégradation protéasomale se fait de manière ubiquitine-indépendante!

Le groupe de J Roberts testa également l'implication directe de l'ubiquitination de p21^{WAF1} dans sa dégradation en bloquant la conjugaison de l'ubiquitine (655). Pour ce faire, il employa un dominant négatif de l'ubiquitine ne possédant pas de lysine (mutant 7R) et, par conséquent, ne permettant pas la polyubiquitination. L'expression de l'ubiquitine-7R n'induit pas la stabilisation de p21^{WAF1}, suggérant que sa dégradation ne nécessite pas sa polyubiquitination. À l'opposé, cycline E (un substrat du protéasome ubiquitiné sur résidus lysines (140)) est stabilisée par le dominant négatif de l'ubiquitine. Malheureusement, l'ubiquitine-7R n'est pas très bien caractérisée. En particulier, on ignore si elle entraîne l'inactivation de TOUTES les E3 ligases cellulaires *in vivo*. De plus, M Pagano a montré que l'expression de l'ubiquitine-7R doit être très forte pour compétitionner avec les hauts

niveaux d'expression de l'ubiquitine endogène (69). Ainsi, Bloom et collègues ont montré que la forte expression du dominant négatif de l'ubiquitine stabilise p21^{WAF1}, suggérant que sa polyubiquitination est nécessaire pour sa dégradation.

Pour tester le rôle de l'ubiquitination de p21^{WAF1} sur sa stabilité de manière plus stringente, nous avons utilisé une approche génétique. En effet, la demi-vie et l'expression de p21^{WAF1} furent analysées chez des cellules exprimant une enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1) thermosensible, les *ts20*. À la température restrictive, la E1 est inactivée ce qui empêche l'ubiquitination *de novo* de TOUTES les protéines normalement ubiquitinées. Si l'ubiquitination est nécessaire à la dégradation protéasomale d'une protéine, alors celle-ci devrait être stabilisée et s'accumuler à la température non-permissive. C'est exactement ce que nous avons observé pour p21^{WAF1}! De manière indépendante, le groupe de M Pagano a observé un résultat identique en utilisant une lignée thermosensible pour la E1 différente de la nôtre (69). Plus récemment, le groupe de J Roberts ne parvint pas à reproduire ces résultats (125). Il observa une stabilisation de p27^{KIP1}, cycline D1, cycline E mais non de p21^{WAF1} à la température restrictive chez les lignées utilisées par M Pagano et nous. J Roberts n'a malheureusement pas discuté des raisons possibles de ces différences de résultats dans son papier. Il est probable que l'inactivation de la E1 ne fût pas complète lors de ses expériences. À l'autre extrémité, on ne peut complètement écarter la possibilité que la stabilisation de p21^{WAF1} que M Pagano et nous avons observé dans les cellules thermosensibles soit artéfactuelle et/ou indirecte.

Face à ces résultats divergents, d'autres approches expérimentales sont nécessaires pour faire avancer la question. Pagano et nous avons observé que Myc₆-p21^{WAF1} est stable *in vivo*. Les épitopes volumineux comme le Myc₆- inhibent la N-ubiquitination (voir chapitre 3). Nos résultats indiquent donc une corrélation entre la stabilisation de p21^{WAF1} et son absence d'ubiquitination. J Roberts n'explique pas comment l'épitope Myc₆- pourrait inhiber l'hypothétique dégradation protéasomale indépendante de l'ubiquitine de p21^{WAF1}.

Roberts montra que p21^{WAF1} est complètement N-acétylé *in vivo* par spectrométrie de masse (125). Du fait de "l'irréversibilité de la N-acétylation", Roberts conclua que p21^{WAF1} ne pouvait être N-ubiquitiné et serait donc probablement dégradé de manière ubiquitine-

indépendante. Comme on vient de le voir à la section précédente, je pense que l'irréversibilité de la N-acétylation est une question ouverte.

Des expériences supplémentaires sont donc nécessaires pour comprendre la dégradation protéasomale de p21^{WAF1}. Tout d'abord, il serait intéressant de détecter l'ubiquitination en N-terminal de p21^{WAF1} possédant un N-terminal natif. L'étude de la protéine endogène serait idéale mais techniquement difficile. Par spectrométrie de masse, la détection d'un peptide possédant le C-terminal de l'ubiquitine et le N-terminal natif de p21^{WAF1} révélerait que (i) cette protéine est susceptible à l'ubiquitination en N-terminal et (ii) suggérerait que l'acétylation est réversible. Cependant, ce résultat ne permettra pas de conclure définitivement que p21^{WAF1} nécessite son ubiquitination (sur le N-terminal) pour sa dégradation. Le seul moyen de montrer sans équivoque que p21^{WAF1} requiert son ubiquitination pour sa dégradation est de cibler sa ligase. Ainsi, une stabilisation de p21^{WAF1} suite à l'inactivation d'une ligase confirmerait cette idée. p21^{WAF1} semble soumis à l'action de plusieurs ligases. Le complexe SCF^{SKP2} ubiquitine p21^{WAF1} en phase S et en réponse aux rayons UV (56, 77). Cependant, la demi-vie de p21^{WAF1} dans les cellules en phase exponentielle de croissance est inchangée par l'inactivation de SKP2, suggérant qu'au moins une autre ligase de p21^{WAF1} existe (56). MDM2, la ligase de p53, est également impliquée dans la dégradation de p21^{WAF1} (320). On se sait pas si ces ligases ont la capacité d'ubiquitiner un substrat sur l' α -amine *in vitro* ou *in vivo*.

6.3. Activité kinase de ERK3

L'activité kinase de ERK3 est mystérieuse. Nous n'avons pu la détecter malgré de nombreuses tentatives. Il en est de même pour les groupes de MH Cobb et M Gaestel (128, 640). De plus, nous avons montré que l'effet de la surexpression de ERK3 sur le cycle cellulaire est indépendant de son activité catalytique (chapitre 4). Certaines protéines à domaines kinases ont des fonctions ne nécessitant pas leur activité phosphotransférase. KSR est un exemple classique de protéine kinase agissant de manière kinase-indépendante *in vivo* (501). Génétiquement, KSR est requise pour l'activation de la voie ERK1/2 par RAS. KSR possède un domaine kinase conservé essentiel pour son activité *in vivo*. De manière surprenante, la lysine du sous-domaine II (impliquée dans la liaison et le positionnement de l'ATP) est substituée en arginine dans le domaine kinase de KSR des

mammifères. Cette substitution inactive généralement l'activité kinase, suggérant que KSR n'a pas d'activité enzymatique. D'autres mutants catalytiquement inactifs de KSR sont toujours biologiquement actifs, confirmant que cette molécule agit indépendamment de son activité kinase (621). On estime que KSR agit entre autre comme protéine d'échafaudage facilitant l'interaction des molécules de la voie RAS/ERK. Les données récentes suggèrent également que RAF-1 exerce des fonctions qui ne nécessite pas son activité catalytique (527). On peut ainsi envisager pour ERK3 un rôle biologique ne dépendant pas de son activité kinase.

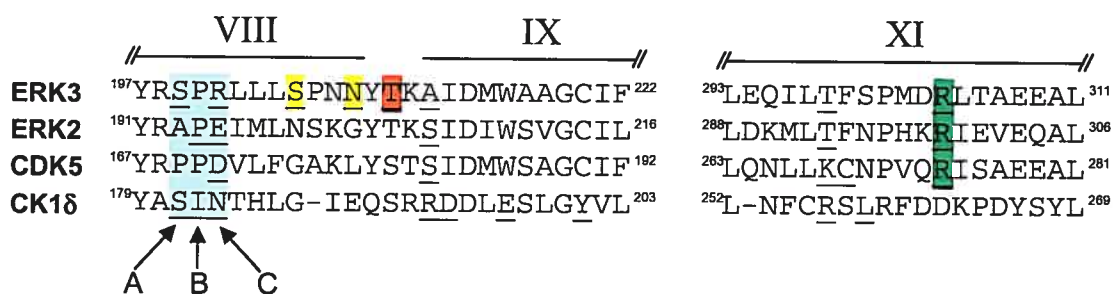


Figure 65: Alignement des sous-domaines VIII, IX et XI de ERK3, ERK2, CDK5 et CK1δ. Le motif SPR de ERK3 et les séquences homologues chez les autres kinases sont soulignées en turquoise. Ces résidus (nommés A, B et C) sont illustrés à la figure 66. L'arginine du sous-domaine XI interagissant avec le motif APE est soulignée en vert. Les structures cristallines de ERK2, CDK5 et CK1δ permettent d'identifier les résidus impliqués dans la stabilisation du C-terminal (souligné d'un trait). La modélisation de ERK3 suggère deux configurations possibles du réseau de ponts hydrogène; le mode 1 implique les S205/N208 (en jaune) alors que le second sollicite la T210 (en rouge, voir figure 67).

6.3.1. Motif SPR du sous-domaine VIII

ERK3 possède-t-elle une activité kinase ? Comme KSR, ERK3 contient des substitutions dans son domaine kinase qui pourrait l'inactiver. Tout d'abord, ERK3 et ERK4 sont les seules kinases chez l'homme qui possèdent la séquence SPR à la place du motif APE dans le sous-domaine VIII (Figure 65) (381). L'acide glutamique de ce sous-domaine est présent chez plus de 93 % des kinases chez l'homme, un niveau de conservation similaire à celui des résidus catalytiques. Les données structurales révèlent toutefois que ce résidu n'est pas impliqué dans la catalyse. Comme on peut le voir sur la structure de ERK2 (possédant le motif APE, Figure 65), l'acide glutamique 195 interagit de manière intra-moléculaire avec l'arginine 299 du sous-domaine XI (Figure 67) (106). Cette arginine interagit à son tour avec les sous-domaines IX (S206) et XI (T293). On voit que ces interactions polaires relient trois sous-domaines (VIII, IX et XI) du lobe C-terminal. La mutation de l'acide glutamique du sous-domaine VIII de PKA entraîne son inactivation (228). Ce mutant est caractérisé par un K_m élevé envers le substrat. Du fait que la liaison au substrat se fait via le

lobe C-terminal, on peut facilement supposer que le réseau de ponts hydrogènes auquel l'acide glutamique 195 participe joue un rôle important dans la stabilisation et/ou la conformation du C-terminal.

Bien qu'il soit fortement conservé, l'acide glutamique du sous-domaine VIII n'est pas présent chez toutes les kinases. L'acide aspartique et l'asparagine sont les deux résidus les plus fréquents après l'acide glutamique (381). Comment le C-terminal est-il stabilisé en présence de ces résidus alternatifs ? Les structures de CDK5 (possédant la séquence PPD) et de CK1 δ (SIN) nous renseignent à ce sujet (Figure 65) (705, 804). Premièrement, on remarque que les sous-domaines VIII de ERK2, CDK5 et CK1 δ se replient de manière identique (Figure 66). Donc, ce repliement peut se faire indépendamment de la présence d'un acide glutamique dans le sous-domaine VIII.

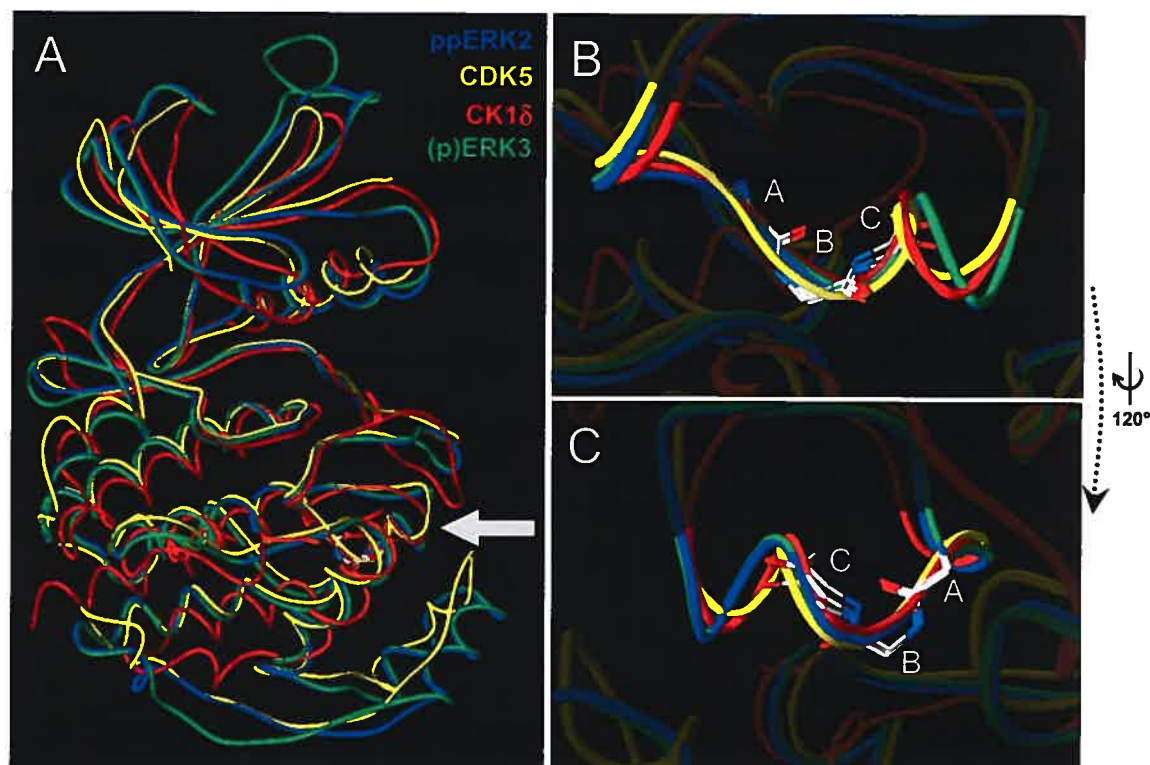


Figure 66: Repliement du sous-domaine VIII. (A) Superposition de la structure cristallographique du domaine kinase de phospho-ERK2, CDK5, CK1 δ . Le modèle du domaine kinase de ERK3 basé sur ERK2 est également illustrée. Le sous-domaine VIII comprenant le motif SPR de ERK3 est indiqué par une flèche. (B) et (C) Le sous-domaine VIII est souligné. On remarque qu'il est replié de manière similaire chez les quatre kinases. La chaîne α des résidus ABC du sous-domaine VIII (voir Figure 65) est montrée. Figure générée à l'aide de SPDBV 3.7.

En second lieu, les structures révèlent la présence également d'un réseau de ponts hydrogène unissant les sous-domaines VIII, IX et XI chez CDK5 et CK1 δ . Le réseau de CKD5 ressemble beaucoup à celui de ERK2. Ainsi, l'acide aspartique du motif PPD est

équivalent à l'acide glutamique de ERK2 et interagit avec l'arginine du sous-domaine XI. Cette dernière lie le sous-domaine IX et XI, à l'instar de l'arginine 299 de ERK2. À l'opposé, le réseau de ponts hydrogène du lobe C-terminal de CK1 δ est fondamentalement différent. Le sous-domaine XI de CK1 δ est très divergent et ne possède pas l'arginine présente chez les kinases possédant un E ou D dans le sous-domaine VIII (Figure 65). Il y a

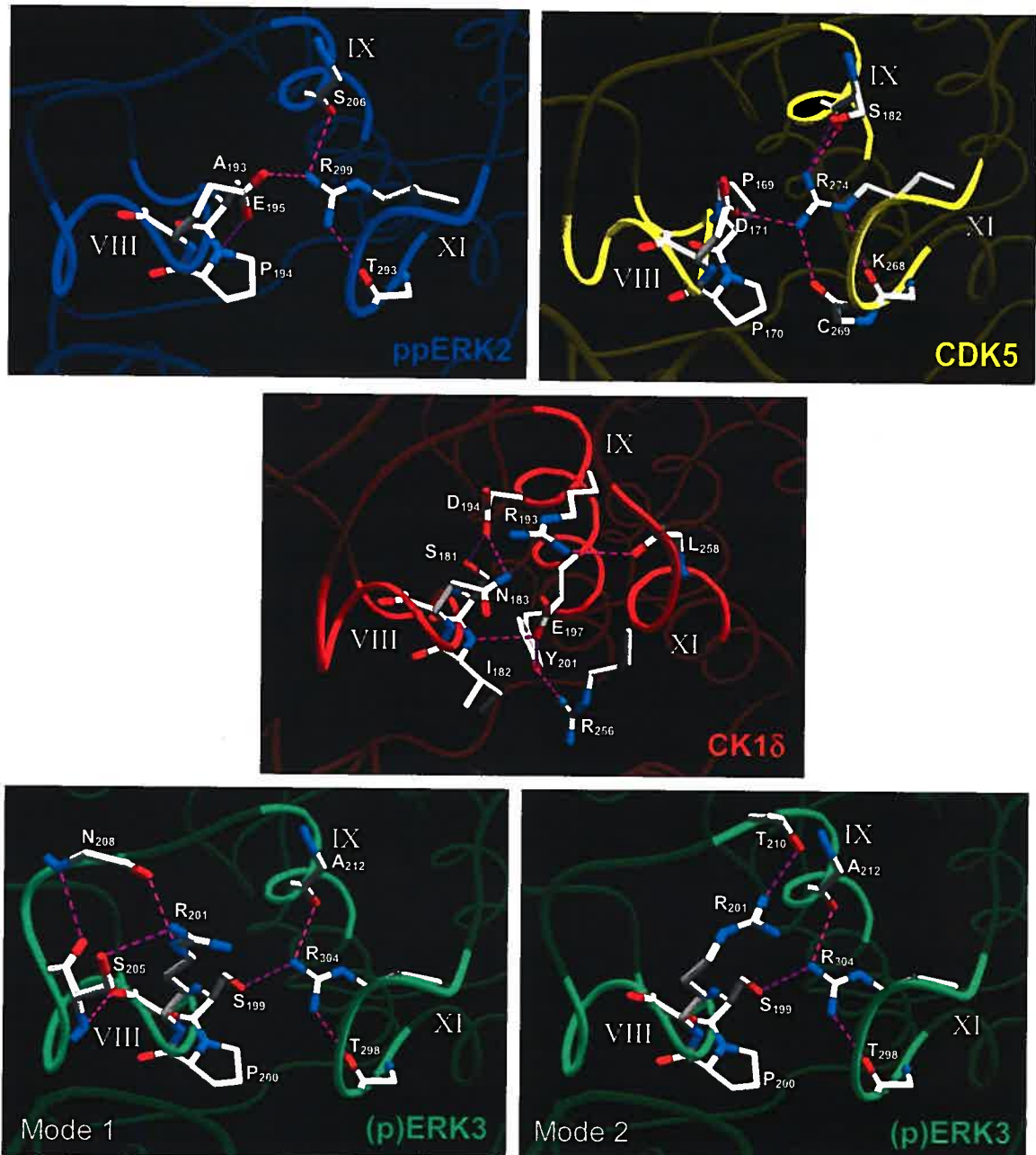


Figure 67: Stabilisation du lobe C-Terminal par un réseau de ponts hydrogènes unissant les sous-domaines VIII, IX et XI chez ppERK2, CDK5 et CK1 δ telle que révélée par les structures cristallines. La modélisation de ERK3 permet deux conformations distinctes de l'arginine 201 du motif SPR (Modes 1 et 2). Voir texte pour plus de détails. Les ponts hydrogène sont représentés par un trait pointillé violet. Figure faite à l'aide de SPDBV 3.7.

ainsi absence de lien direct entre les sous-domaines VIII et XI. Le sous-domaine XI de CK1 δ possède néanmoins une autre arginine (R256) plus en N-terminal liant la tyrosine 201 du sous-domaine IX. Ces deux sous-domaines sont également reliés par l'arginine 193 et la leucine 258. Le sous-domaine IX interagit également avec le motif SIN du sous-domaine VIII (Figure 67). Ainsi, la sérine 181 et l'asparagine 183 lient l'acide aspartique 194 du sous-domaine IX. La chaîne α de l'Ile182 fait un pont hydrogène avec l'acide glutamique 197 également présent dans le sous-domaine IX. Comme on peut le voir, ce réseau permet l'interaction des sous-domaines VIII, IX et XI. Les résidus impliqués dans ce réseau alternatif sont conservés chez les kinases possédant le motif SIN (381).

Que peut-on prédire sur le réseau de pont hydrogène du lobe C-terminal chez ERK3 ? Tout d'abord, la modélisation du domaine kinase de ERK3 suggère que son sous-domaine VIII se replie de manière similaire aux autres kinases cristallisées (Figure 66). ERK3 possède l'arginine du sous-domaine XI comme ERK2 et CDK5. La position de cette arginine serait semblable chez ces trois kinases. Cette configuration serait stabilisée par des ponts hydrogènes avec les sous-domaines IX et XI (Figure 67). L'Arg304 de ERK3 ne peut interagir avec le sous-domaine VIII via l'arginine 201; ces deux chaînes latérales se repoussent de par leur charge électrique identique. Le modèle prédit toutefois que l'arginine du sous-domaine XI fait un pont hydrogène avec la sérine 199 du motif SPR. La position de l'arginine du motif SPR est incertaine. La modélisation permet au moins deux conformations possibles pour l'Arg201. Premièrement, cette arginine pourrait interagir avec la sérine 205 et la chaîne α de l'asparagine 208 (Figure 67, mode 1). Cette interaction "intra-sous-domaine VIII" stabiliserait sa conformation. De manière analogue, le résidu équivalent chez ERK2 (E195) fait un pont hydrogène avec la proline 194 adjacente. Alternativement, l'Arg201 pourrait lier la Thr210 du sous-domaine IX (mode 2). Cette configuration ressemble beaucoup à celle de CK1 δ où le motif SIN interagit directement avec plusieurs résidus du sous-domaine IX.

Ainsi, on peut voir que les sous-domaines VIII, IX et XI de ERK3 sont potentiellement stabilisés par un réseau de ponts hydrogène à l'instar des autres kinases actives. L'absence apparente d'activité kinase *in vitro* de ERK3 (envers la gamme de substrats testés) ne serait probablement pas la conséquence d'un mauvais repliement de son lobe C-terminal. La

Malgré la présence d'un seul site de phosphorylation dans sa boucle d'activation, ERK3 semble posséder deux sites de liaison du phosphate (voir Figure 60). Le site primaire interagirait avec la phospho-S189 entraînant possiblement l'activation de la kinase. La glycine du SEG laisse le site secondaire putatif inoccupé. Quel pourrait être la fonction du site secondaire de ERK3 ? D'autres kinases de la superfamille CMGC (contenant ERK3) ont un site de liaison du phosphate "surnuméraire". Par exemple, GSK3 possède les sites primaire et secondaire à l'instar des MAPK (Figure 68A) (45). La boucle d'activation de GSK3 ne contient qu'un seul site de phosphorylation, la tyrosine du motif VSY. La structure cristalline de phospho-GSK3 confirme que la tyrosine s'associe avec le site de liaison secondaire, tel qu'observé chez ppERK2 (Figure 69A). Le site primaire n'interagit pas directement avec la boucle d'activation du fait de la présence de la Val en position du site de phosphorylation primaire. La structure révèle toutefois que le site primaire est fonctionnel et chélate un ion sulfate. Dans d'autres préparations cristallographiques, un ion phosphate est observé dans le site primaire de GSK3 (708).

De manière similaire, les kinases SRPK, comme la kinase de levure Sky1p, possèdent également un site de liaison du phosphate "superflu" (526). Ces kinases sont constitutivement actives et ne requièrent pas la phosphorylation de leur boucle d'activation pour leur activité. Cependant, ces kinases possèderaient un site de liaison du phosphate secondaire (Figure 68A). Les données structurales confirment cette prédiction. En effet, on observe un ion sulfate interagissant avec les arginines 568 et 571 chez Sky1p (Figure 69B) (526).

Biochimiquement, GSK3 et Sky1p sont spécifiques pour les substrats pré-phosphorylés. Par exemple, GSK3 est impliquée dans la phosphorylation et la dégradation de β -caténine, un effecteur de la voie WNT (103). Pour que cette phosphorylation ait lieu, β -caténine doit être phosphorylée sur la sérine 45 par la CK1 (571). Phospho-S45 β -caténine est reconnue par GSK3 et il en résulte une phosphorylation hiérarchique des T41, S37, S33 et S29 (Figure 68B). La phosphorylation des sérines 33 et 37 forme un phospho-dégron reconnu par la E3 SCR ^{β -TrCP1/2}, ce qui induit l'ubiquitination et la dégradation de β -caténine (795).

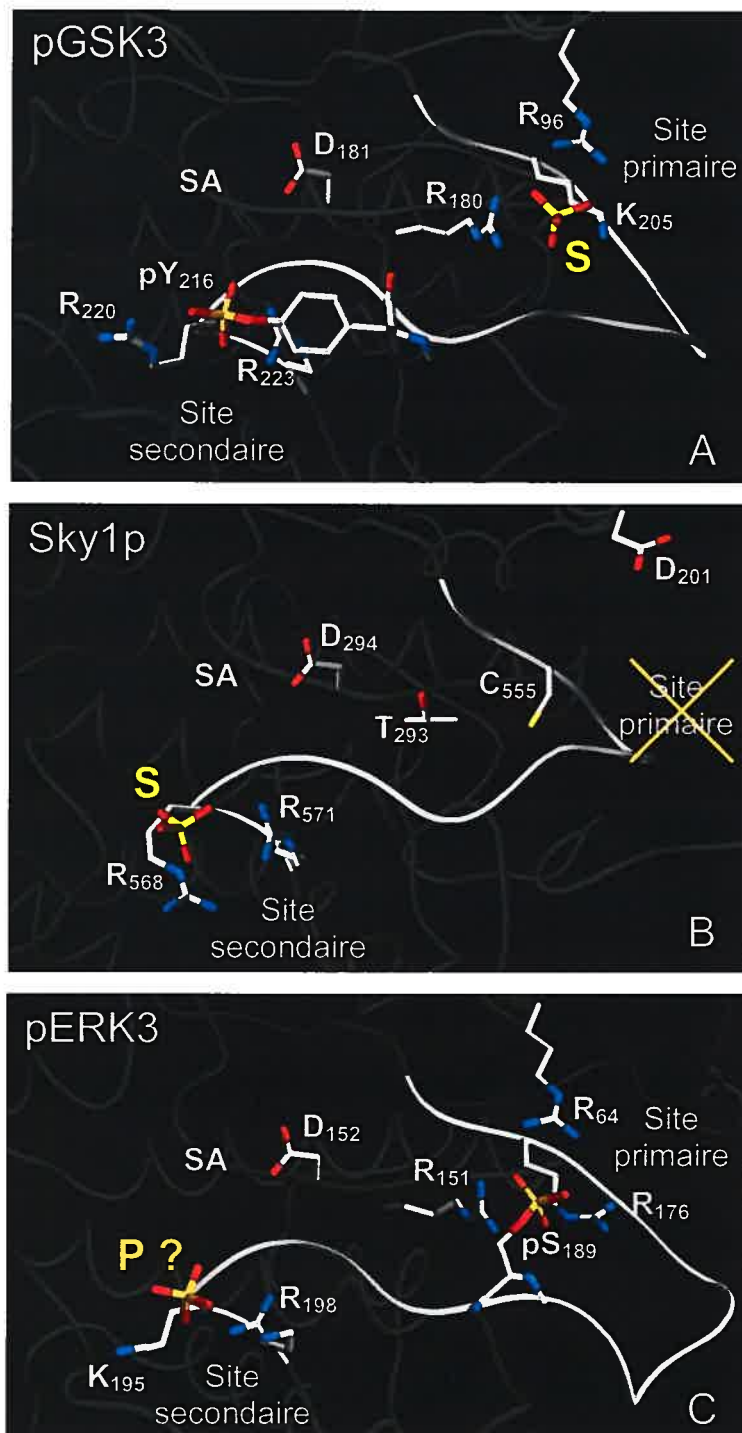


Figure 69: Organisation tridimensionnelle des sites de liaison du phosphate de GSK3, Sky1p et ERK3. (A) La structure de phospho-GSK3 révèle la présence de deux sites de liaison du phosphate chez cette kinase. GSK3 ne possède que le site secondaire de phosphorylation: la tyrosine 216. Ce résidu interagit avec le site de liaison secondaire. La structure cristalline révèle aussi que le site primaire est occupé par un ion sulfate (S). (B) Sky1p ne requiert pas la phosphorylation de sa boucle d'activation pour sa fonction. Cependant, cette kinase possède le site de liaison du phosphate secondaire. Un ion sulfate est observé dans la structure cristalline. (C) Le domaine kinase de ERK3 fut modélisé sur celui de phospho-ERK2. La position théorique de la phospho-S189 interagissant avec le site primaire est illustrée. Le site secondaire de liaison putatif de ERK3 pourrait avoir une certaine affinité pour le phosphate. Une position possible de ce ligand est montrée (P ?). Les résidus impliqués dans la formation des site de liaison du phosphate sont indiqués. Le site actif (SA) comprenant la base catalytique (D152 chez ERK3) est illustré également. Figure générée à l'aide de SPDBV 3.7.

Comme on peut le voir, GSK3 reconnaît le motif S/TXXXpS/T. Autrement dit, GSK3 phosphoryle un substrat pré-phosphorylé en position P+4 (soit le 4^e résidu en C-terminal du site phospho-accepteur). On estime que cette spécificité provient de son site primaire de liaison du phosphate. En effet, la mutation de l'arginine 96 (formant le site RD) diminue l'activité de GSK3 pour les substrats phosphorylés (207). Le site primaire joue donc un rôle essentiel dans la reconnaissance des substrats de GSK3. Par modélisation, le groupe de A.D. Reith a montré que le substrat RRHSSPHQpS peut interagir avec le site primaire de GSK3 (Figure 70A) (45). Le site de phosphorylation est positionné convenablement au site actif de l'enzyme.

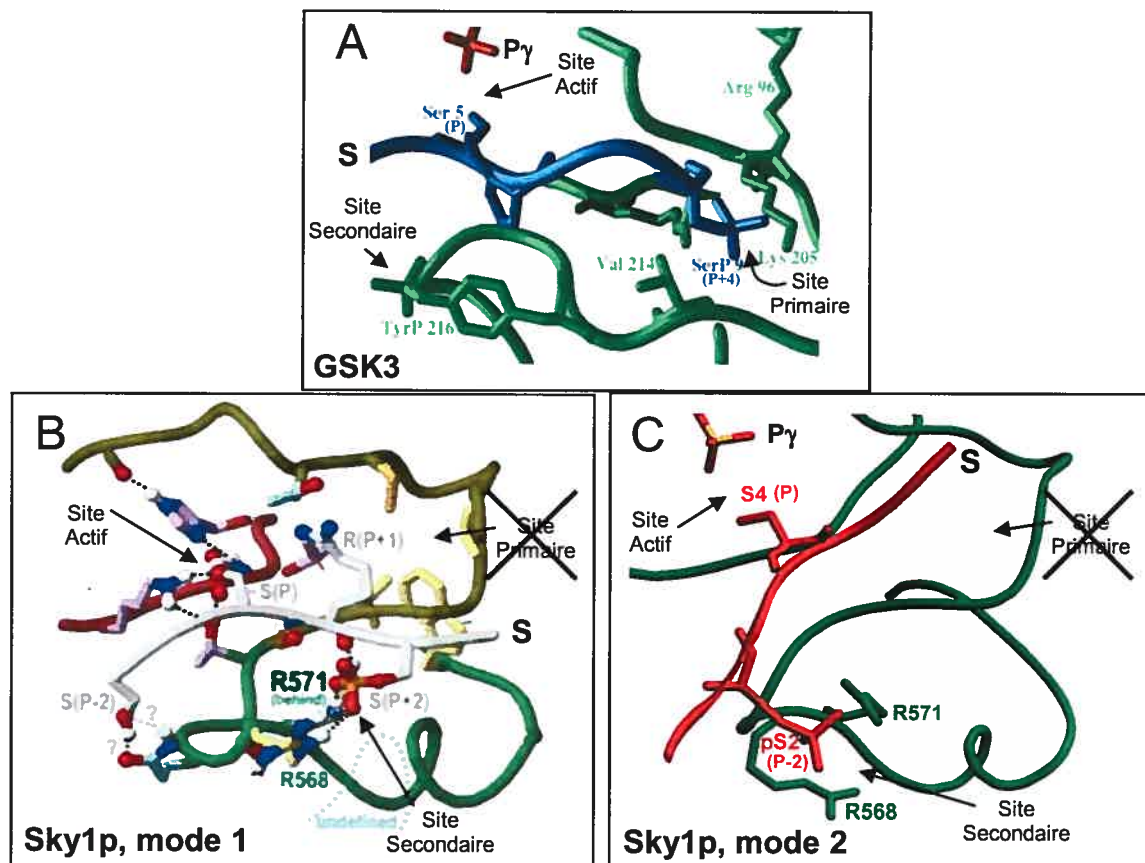


Figure 70: Modèle théorique de l'interaction de GSK3 et Sky1p avec leur substrat phosphorylé. (A) La phospho-sérine 9 (en P+4) du peptide RRHSSPHQpS (en bleu) interagit avec le site primaire de GSK3, ce qui positionne le site de phosphorylation (Ser5) près du site actif. Le phosphate gamma (Py) de l'ATP est montré. (B) et (C) Sky1p pourrait s'associer avec son substrat phosphorylé selon deux modes. Selon le premier, Sky1p lierait les substrats phosphorylés en P+2, comme le peptide SRSRpSR illustré (en gris). Alternativement, Sky1p interagirait avec un substrat phosphorylé en P-2. Ainsi, on voit en (C) l'association de Sky1p avec le peptide RpSRpSR (en rouge). Dans les deux cas, le site secondaire est impliqué dans la liaison au substrat. Aussi, le site accepteur du phosphate est situé au site actif. Adaptée de (45, 341, 526).

De manière similaire, on estime que le site secondaire de liaison du phosphate des kinases SRPK confère une spécificité envers les protéines pré-phosphorylées. Ainsi, les kinases SRPK médient la phosphorylation des facteurs SR, modifications essentielles pour leur rôle

dans l'épissage des ARNm (210). Les SRPK phosphorylent une répétition de sérines et d'arginines (SR), en collaboration avec les kinases Clk/Sty (744). Les données biochimiques indiquent que SRPK1 phosphoryle le facteur SR AF2 de manière processive, suggérant fortement une phosphorylation hiérarchique (Figure 68C) (23). Le mécanisme exact de la reconnaissance des phospho-substrats par les SRPK est encore débattu. Ainsi, les modélisations effectuées par le groupe de AF Neuwald suggèrent que Sky1p serait spécifique pour les substrats phosphorylés en P+2 (2^e résidu en C-terminal du site phospho-accepteur, Figure 70B) (341). À l'opposé, le groupe de G Ghosh propose que les SRPK sont plutôt actives envers les substrats phosphorylés en P-2 (2^e résidu en N-terminal du site phospho-accepteur, Figure 70C) (526). Dans les deux cas, le résidu phosphorylé du substrat interagit avec le site secondaire. Des essais enzymatiques *in vitro* avec différents phosphopeptides comme substrats permettraient de discriminer entre ces deux modes potentiels. La structure d'une SRPK complexée avec un phospho-substrat serait très informative également.

Ces exemples nous permettent de penser que ERK3 pourrait utiliser son site secondaire de liaison du phosphate pour interagir avec des substrats pré-phosphorylés (Figure 69C).

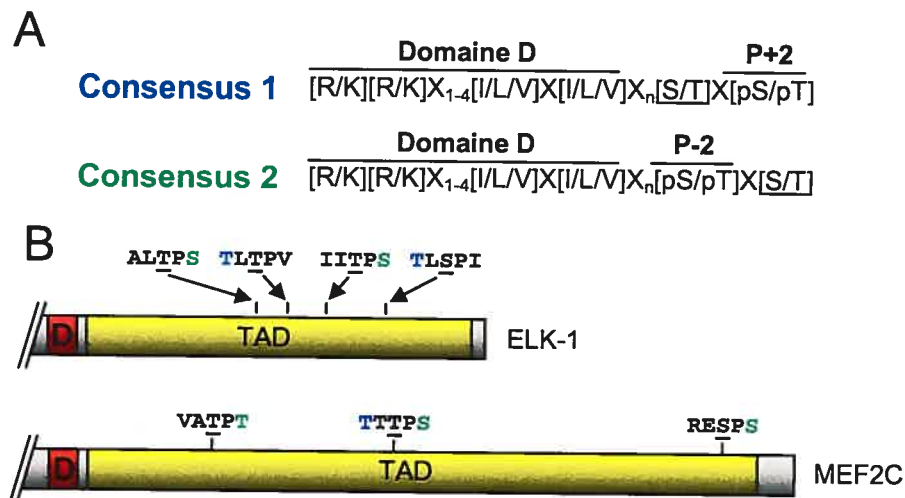


Figure 71: Spécificités et substrats proposés pour ERK3. (A) Les études de modélisation suggèrent que ERK3 pourrait reconnaître et phosphoryler les protéines répondant à ces deux consensus. On remarque la présence d'un domaine D en N-terminal. ERK3 pourrait être spécifique pour les substrats pré-phosphorylés en position P+2 (consensus 1) ou P-2 (consensus 2). (B) Les facteurs de transcription ELK-1, SAP-1, ELK-4, MEF2A, MEF2C et MEF2D sont des substrats potentiels de ERK3. Les sites théoriques phosphorylés par ERK3 sont illustrés pour ELK-1 et MEF2C. Le domaine d'arrimage (D en rouge) et de transactivation de la transcription (TAD, en jaune) sont indiqués. Les sites répondant au consensus 1 et 2 sont colorés en bleu et vert respectivement. Les sites de phosphorylation potentiels des MAPK ERK1/2 et p38 sont soulignés d'un trait noir.

6.3.3. Proposition de séquences consensus de substrats pour ERK3

À partir des différentes modélisations présentées dans cette thèse, on peut prédire une séquence consensus pour ERK3. Tout d'abord, ERK3 posséderait les domaines CD, ED et le sillon d'arrimage lui permettant l'association avec les domaines D (voir section 1.1.10.). Il est donc possible que ERK3 interagisse avec ses substrats via un site d'arrimage. Les séquences consensus proposées possèdent ainsi un domaine D minimal en N-terminal (Figure 71A). En second lieu, ERK3 aurait une spécificité semblable à Sky1p et potentiellement deux modes de reconnaissance des substrats possibles. Les substrats putatifs de ERK3 devraient avoir le motif S/TXpS/T (consensus 1) ou pS/TXS/T (consensus 2) en C-terminal du domaine D. De manière très intéressante, plusieurs facteurs de transcription substrats des MAPK ont ces caractéristiques (Figure 71B). Ainsi, ELK1, SAP1A, ELK4, MEF2A, MEF2C et MEF2D possèderaient plusieurs sites consensus ERK3, une fois phosphorylés par les MAPK ERK1/2 et p38 (221, 814). Cette hypothèse est relativement facile à tester par des essais enzymatiques *in vitro*.

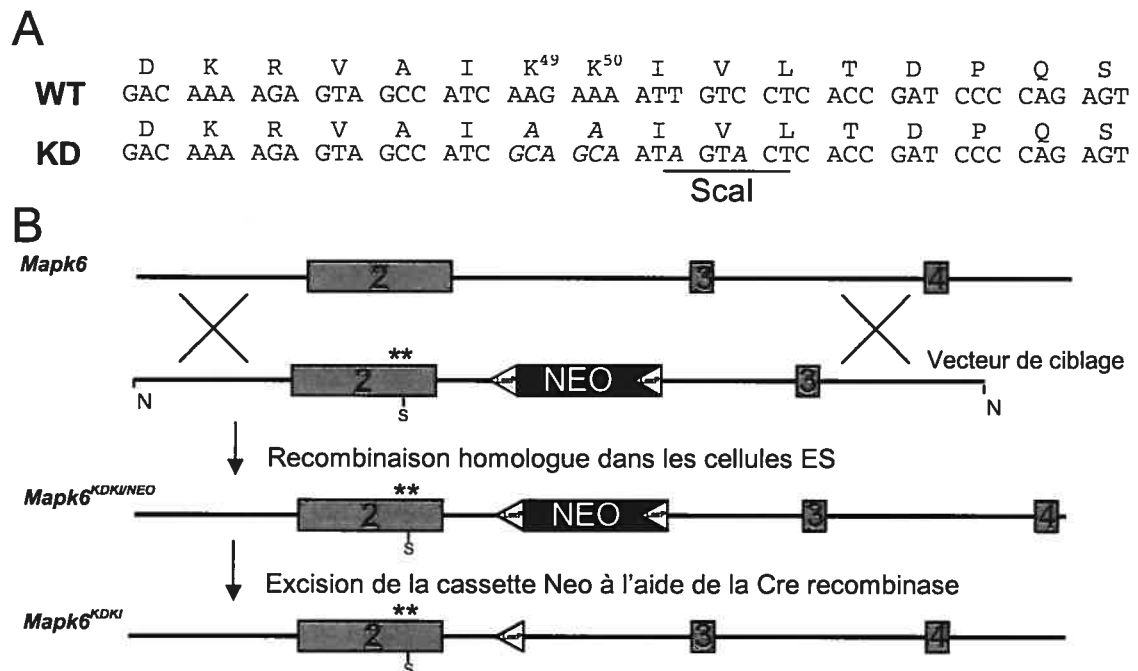


Figure 72: Stratégie pour générer des souris exprimant une forme catalytiquement inactive de ERK3. (A) La lysine 49 du sous-domaine II impliquée dans la liaison à l'ATP sera remplacée par une alanine. La lysine 50 sera également mutée pour prévenir toute compensation possible. Le site Scal est introduit sans perturber la séquence en acide aminé afin de faciliter l'identification des souris mutantes. (B) Schéma du vecteur de ciblage utilisé. Ce vecteur comprend le gène de résistance à la néomycine dans l'intron 2 du gène de ERK3 chez la souris (*Mapk6*). Cette cassette est flanquée de sites LoxP permettant son excision par la Cre recombinase. N : NotI

6.3.4. Génération de la souris ERK3^{KDKI}

Une approche de type "Knock-In" (KI) est envisagée pour tester l'importance de l'activité kinase pour la fonction *in vivo* de ERK3. Ainsi, l'effet de l'expression d'un mutant catalytiquement inactif (KD pour "kinase-dead") sera évalué chez la souris. Pour ce faire, la lysine du sous-domaine II est mutée en alanine directement dans l'exon 2 du gène *Mapk6* (Figure 72A). La sélection positive de l'évènement de recombinaison dans les cellules ES est effectuée à l'aide d'un gène de résistance à la néomycine (292). Cette cassette est flanquée de séquence LoxP permettant son excision par la Cre recombinase. Cette élimination est importante car le promoteur du gène NEO peut affecter l'expression du gène *Mapk6*.

J'ai construit le vecteur de ciblage pour générer les souris ERK3^{KDKI} (Figure 72B). Ce travail a été fait en collaboration avec Benjamin Turgeon. Le laboratoire du Dr Meloche a comme objectif de produire ces souris. Ce projet est cependant assez risqué. En effet, si les souris KI ont le même phénotype que les souris KO (mortalité à la naissance), alors nous aurons seulement prouvé que ERK3 est une kinase active... comme la majorité des protéines kinases! Ce résultat n'apporte pas forcément plus d'informations sur la biologie et les cibles de ERK3 *in vivo*. À l'opposé, l'absence de phénotype, ou un phénotype partiel, des souris KI montrerait de manière claire que ERK3 est une "protéine kinase" qui ne dépend pas, ou en partie, de son activité catalytique putative pour sa fonction biologique. Cette information amènerait des réserves quant à la recherche de "substrats" de ERK3. Il se peut également que certaines des fonctions de ERK3 nécessitent son activité enzymatique alors que d'autres non.

On pourrait également tester l'importance de l'activité kinase pour la fonction de ERK3 chez la grenouille. En effet, ERK3 est exprimée chez le xénope et présente les mêmes caractéristiques au niveau de son domaine kinase, soient les motifs SEG et SPR. Chez cet organisme, il est facile d'inhiber l'expression d'un gène par l'injection dans l'œuf fécondé d'oligonucléotides modifiés nommés morpholinos (273). Ces oligonucléotides lient l'ARNm complémentaire et inhibe leur traduction. Il est possible que l'inactivation de ERK3 chez la grenouille affecte le développement embryonnaire et la survie post-natale, comme c'est le cas chez la souris (voir plus loin). Dans cette éventualité, il serait

envisageable de faire des expériences de complémentation en injectant des ARNm synthétiques codant pour ERK3 de type sauvage. Si on observe une restauration de la viabilité, alors on pourrait également tester différents mutants de ERK3 (S189A, KD, Δ_{365} , etc.). Le phénotype des grenouilles exprimant une forme de ERK3 inactive nous révélera si l'activité enzymatique putative de ERK3 est nécessaire pour sa fonction biologique. L'avantage majeur de cette approche expérimentale est la rapidité avec laquelle on obtient les résultats. En effet, le développement embryonnaire chez la grenouille prend moins de 5 jours (329). De plus, la modification du gène n'est pas requise, contrairement à la souris, ce qui permet un plus grand nombre d'expériences dans un laps de temps donné.

6.4. Rôles biologiques de ERK3

6.4.1. ERK3, un régulateur négatif de la prolifération cellulaire ?

Nos évidences suggèrent que ERK3 pourrait être un régulateur négatif de la prolifération. Plus spécifiquement, nous avons observé que la surexpression de ERK3 inhibe l'incorporation de BrdU, un analogue de la thymidine. Les cellules surexprimant ERK3 sont donc incapables de progresser en phase S et semblent bloquées en phase G1. Cet effet a été observé chez deux lignées différentes de fibroblastes de rongeurs: NIH 3T3 et Rat1 (331 et chapitres 2 et 4).

L'activité anti-proliférative de ERK3 soulève plusieurs questions importantes. Tout d'abord, il serait intéressant de savoir par quel mécanisme ERK3 affecte le cycle cellulaire. On pourrait générer des lignées surexprimant différentes constructions de ERK3 de manière inductibles. Ces cellules permettraient de faire des expériences biochimiques (immunoblot, essai kinase, etc.) et génomiques (Puce à ADN) qui pourrait révéler les molécules de signalisation dont l'activité et/ou l'expression sont affectées par la présence de ERK3. On pourrait également tester l'effet anti-prolifératif de ERK3 chez différentes lignées cancéreuses mutantes dans différentes voies anti-tumorales. Par exemple, l'absence d'effet de ERK3 chez une lignée déficiente en p53 impliquerait ce gène suppresseur de tumeur dans la voie de signalisation de ERK3.

Nos évidences montrent également que l'activité anti-proliférative de ERK3 dépend de son extension C-terminale. On ignore la (ou les) cible importante interagissant avec ce domaine de ERK3. Récemment, le groupe de J Gu reporta l'identification de cycline D3 comme une protéine interagissant spécifiquement avec l'extension C-terminale par double hybride (686). Cette interaction fut également démontrée biochimiquement. Malheureusement, on ignore encore les conséquences de cette association. Du fait que ERK3 inhibe la progression de la phase G1, il serait très intéressant d'évaluer son effet sur l'activité des complexes CDK4/6/Cycline D. Ces complexes favorisent la progression vers la phase S en phosphorylant pRb (voir (539)). Il est possible que ERK3 régule négativement l'expression, l'activité et/ou l'association de ces complexes CDK (Figure 73). Cette hypothèse est relativement facile à tester par des approches biochimiques classiques. On pourrait également évaluer l'effet de la surexpression de cycline D3 sur l'activité de ERK3. Une restauration de la prolifération par cette cycline serait une indication qu'elle est impliquée dans la voie ERK3.

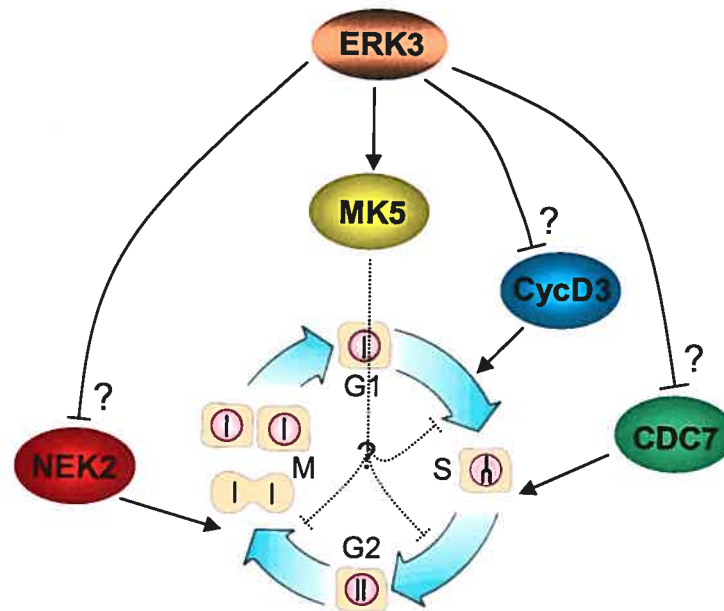


Figure 73: Cibles potentielles de ERK3 responsables de son activité anti-proliférative. Cycline D3, CDC7 et NEK2 sont des molécules interagissant avec ERK3 et ayant un rôle positif sur la progression du cycle cellulaire. ERK3 pourrait être un inhibiteur de ces molécules, ce qui conduirait à un arrêt de la prolifération. MK5 est une protéine kinase régulée positivement par ERK3. On ignore la fonction de MK5, mais il est possible que l'activité de cette kinase inhibe la progression dans le cycle cellulaire. Voir texte pour plus de détails.

ERK3 pourrait également agir sur le cycle cellulaire via les kinases d'interaction CDC7 et NEK2. Ces deux kinases sont des régulateurs positifs importants de la prolifération et la

division cellulaire. Il est concevable que ERK3 régule négativement CDC7 et/ou NEK2, perturbant la progression du cycle cellulaire. L'effet de ERK3 sur l'activité kinase de CDC7 et NEK2 pourrait être évalué.

Il est également possible que l'effet anti-prolifératif de ERK3 passe par son partenaire MK5. L'expression de ERK3 entraîne l'activation de MK5 (640, 651). De manière surprenante, le groupe de M Gaestel a montré que des mutants inactifs de ERK3 (S189A et KD) sont aussi capables d'induire l'activation de MK5 que ERK3 de type sauvage (640). Un mutant manquant l'extension C-terminale est à l'opposé incapable d'activer MK5. De manière frappante, ERK3 se comporte de manière identique dans notre essai d'incorporation de BrdU. Ainsi, les mutants inactifs de ERK3 sont aussi efficaces que la protéine de type sauvage pour inhiber l'incorporation de BrdU (chapitre 4). Par contre, le mutant ERK3 Δ_{1-365} est inactif. Il y a donc une corrélation parfaite entre l'inhibition de prolifération et l'activation de MK5. L'effet de l'activation constitutive de MK5 (suite à la surexpression de ERK3) sur le cycle cellulaire est inconnu. Pour tester l'implication de MK5 dans l'arrêt de prolifération induit par ERK3, on pourrait évaluer l'effet de la surexpression de ERK3 dans les cellules *Mk5* KO. L'absence d'effet de ERK3 dans ces cellules suggérerait fortement que MK5 est un effecteur de l'activité anti-proliférative de ERK3. On pourrait aussi faire des expériences de co-transfection de ERK3 avec un dominant-négatif de MK5 et voir l'effet sur l'incorporation de BrdU.

D'autres protéines kinases affectent le cycle cellulaire de manière kinase-indépendante. En effet, la surexpression des kinases PLK1 et Aurora A/B de type sauvage ou inactive inhibe la cytokynèse, entraînant une tétraploïdation (485). Ce résultat semble suggérer que ces trois kinases réguleraient négativement la terminaison de la mitose indépendamment de leur activité kinase. Cependant, les données génétiques montrent très clairement que PLK1 et Aurora A/B sont plutôt des régulateurs positifs essentiels du cycle cellulaire (voir (185, 229))! On pense que les formes de type sauvage surexprimées ne seraient pas activées et se comporteraient de manière dominante-négative (485). Ces résultats soulèvent des questions sur la pertinence physiologique de l'effet de ERK3 sur le cycle cellulaire. Il est ainsi possible que ERK3 soit plutôt un régulateur positif de la prolifération, et que la forme surexprimée de type sauvage se comporte comme un dominant négatif. Ce résultat pourrait s'expliquer entre autre par l'expression limitante de la ERK3 kinase.

Pour faire avancer cette question, il est nécessaire d'employer des approches de type "perte de fonction". Benjamin Turgeon a inactivé ERK3 (*Mapk6*) chez la souris. Les souris déficientes en ERK3 meurent à la naissance entre autre de détresse respiratoire. Ce phénotype est en cours de caractérisation. Les fibroblastes embryonnaires (MEF) isolés de souris *Erk3* KO présente un phénotype intéressant en culture. Ainsi, les résultats préliminaires suggèrent que l'absence de ERK3 augmente la prolifération (Benjamin Turgeon et Sylvain Meloche, données non-publiées). Il est néanmoins primordial de mieux caractériser la prolifération des cellules *Erk3* KO. Si ces résultats se confirment, ERK3 pourrait appartenir à une nouvelle voie de signalisation anti-proliférative. Les cibles potentielles trouvées dans les expériences de surexpression pourront être validées chez les cellules KO.

6.4.2. ERK3, un régulateur positif de la différenciation cellulaire ?

Du fait que ERK3 favoriserait la sortie du cycle cellulaire, cette MAPK pourrait avoir un rôle positif dans la différenciation cellulaire. En accord avec cette idée, l'expression de ERK3 est induite dans plusieurs modèles de différenciation cellulaire. L'implication de ERK3 dans ces processus biologiques est présentement purement théorique; nous n'avons aucune donnée à ce sujet. On pourrait tester l'effet de la surexpression de différentes constructions de ERK3 sur la différenciation des PC12 ou C2C12, deux modèles où ERK3 est induite. Certaines MAPK sont importantes pour la différenciation de ces cellules. Des constructions inductibles de ERK3 faciliteraient cette étude. D'un autre côté, on pourrait étudier la différenciation de certaines cellules isolées de souris *Erk3* KO en culture. Par exemple, l'adipogenèse et la myogenèse peuvent être étudiées *in vitro* à partir de cellules primaires (14, 379).

CONCLUSION

En conclusion, mes travaux ont mis en évidence de nouveaux modes de régulation d'une MAPK. Ainsi, ERK3 est régulée principalement au niveau de sa stabilité protéique par le système ubiquitine-protéasome. Cette dégradation est causée par la présence de deux dégrons dans la région N-terminale de ERK3. À l'opposé, ERK3 ne semble pas être soumise à une régulation fine au niveau de la S189. Contrairement aux autres MAPK, la phosphorylation de la boucle d'activation de ERK3 est constitutive et insensible aux signaux extracellulaires. La kinase et l'impact de la S189 restent à découvrir. ERK3 est également phosphorylée sur d'autres sites *in vivo*, notamment la S386.

Mes travaux ont prouvé pour la première fois l'existence de l'ubiquitination en N-terminal *in vivo*. Ainsi, par une approche de spectrométrie de masse, la N-ubiquitination de ERK3 fut observé. Nous avons également démontré que l'inhibiteur de CDK p21^{WAF1} est un nouveau substrat de ce type d'ubiquitination. Nos résultats suggèrent que p21^{WAF1} se comporte comme un substrat classique du protéasome et nécessite sa polyubiquitination pour sa dégradation protéasomale. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour développer cette idée.

Mes résultats de spectrométrie de masse obtenus en collaboration avec Pierre Thibault suggèrent l'existence d'une nouvelle voie de maturation du N-terminal des protéines chez les mammifères. En effet, le dogme stipule que la majorité des protéines voient leur N-terminal acétylé de manière irréversible. Au contraire, mes travaux prédisent l'existence d'enzymes pouvant régénérer le groupement amine en N-terminal, permettant ainsi la N-ubiquitination. Cette affirmation est testable par des approches biochimiques et de spectrométrie de masse.

Mes travaux suggèrent d'un autre côté que ERK3 pourrait être un régulateur positif de la différenciation cellulaire. Dans le même ordre d'idée, ERK3 possède des propriétés anti-prolifératives. Le mécanisme par lequel cette MAPK agit sur le cycle cellulaire reste à définir. Cycline D3 pourrait être une cible de ERK3. Plus important encore, le rôle physiologique de ERK3 dans ces processus cellulaires est inconnu.

Finalement, malgré l'absence d'évidence au sujet de l'activité kinase de ERK3, la modélisation de son domaine kinase suggèrent que celui-ci possède les attributs d'une enzyme fonctionnelle. De manière surprenante, ERK3 pourrait être une kinase spécifique pour les substrats pré-phosphorylés, soit une "phosphate-directed kinase". Des essais enzymatiques *in vitro* existent pouvant tester cette prédiction.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abe, J., M. Kusuhara, R. J. Ulevitch, B. C. Berk, and J. D. Lee.** 1996. Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem* **271**:16586-90.
2. **Abe, M. K., K. T. Kahle, M. P. Saelzler, K. Orth, J. E. Dixon, and M. R. Rosner.** 2001. ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family. *J Biol Chem* **276**:21272-9.
3. **Abe, M. K., W. L. Kuo, M. B. Hershenson, and M. R. Rosner.** 1999. Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol Cell Biol* **19**:1301-12.
4. **Abe, M. K., M. P. Saelzler, R. Espinosa, 3rd, K. T. Kahle, M. B. Hershenson, M. M. Le Beau, and M. R. Rosner.** 2002. ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem* **277**:16733-43.
5. **Adachi, M., M. Fukuda, and E. Nishida.** 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**:5347-58.
6. **Adams, J., M. Behnke, S. Chen, A. A. Cruickshank, L. R. Dick, L. Grenier, J. M. Klunder, Y. T. Ma, L. Plamondon, and R. L. Stein.** 1998. Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett* **8**:333-8.
7. **Adams, R. H., A. Porras, G. Alonso, M. Jones, K. Vintersten, S. Panelli, A. Valladares, L. Perez, R. Klein, and A. R. Nebreda.** 2000. Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell* **6**:109-16.
8. **Adler, V., C. C. Franklin, and A. S. Kraft.** 1992. Phorbol esters stimulate the phosphorylation of c-Jun but not v-Jun: regulation by the N-terminal delta domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:5341-5.
9. **Aebersold, D. M., Y. D. Shaul, Y. Yung, N. Yarom, Z. Yao, T. Hanoch, and R. Seger.** 2004. Extracellular signal-regulated kinase 1c (ERK1c), a novel 42-kilodalton ERK, demonstrates unique modes of regulation, localization, and function. *Mol Cell Biol* **24**:10000-15.
10. **Ahn, N. G., R. Seger, R. L. Bratlien, C. D. Diltz, N. K. Tonks, and E. G. Krebs.** 1991. Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. In vitro activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase. *J Biol Chem* **266**:4220-7.
11. **Alagramam, K., F. Naider, and J. M. Becker.** 1995. A recognition component of the ubiquitin system is required for peptide transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **15**:225-34.
12. **Allen, L. F., J. Sebolt-Leopold, and M. B. Meyer.** 2003. CI-1040 (PD184352), a targeted signal transduction inhibitor of MEK (MAPKK). *Semin Oncol* **30**:105-16.
13. **Allen, R. D., 3rd, T. P. Bender, and G. Siu.** 1999. c-Myb is essential for early T cell development. *Genes Dev* **13**:1073-8.
14. **Allen, R. E., and L. L. Rankin.** 1990. Regulation of satellite cells during skeletal muscle growth and development. *Proc Soc Exp Biol Med* **194**:81-6.
15. **Ambroggio, X. I., D. C. Rees, and R. J. Deshaies.** 2004. JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. *PLoS Biol* **2**:E2.
16. **Amerik, A. Y., and M. Hochstrasser.** 2004. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1695**:189-207.

17. **Amerik, A. Y., J. Nowak, S. Swaminathan, and M. Hochstrasser.** 2000. The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. *Mol Biol Cell* **11**:3365-80.
18. **Antoniw, J. F., and P. Cohen.** 1976. Specificities of the protein phosphatases involved in the regulation of glycogen metabolism in rabbit skeletal muscle. *Biochem Soc Trans* **4**:1030-2.
19. **Aoyama, K., M. Nagata, K. Oshima, T. Matsuda, and N. Aoki.** 2001. Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, LMW-DSP2, that lacks the cdc25 homology domain. *J Biol Chem* **276**:27575-83.
20. **Arrigo, A. P., K. Tanaka, A. L. Goldberg, and W. J. Welch.** 1988. Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* **331**:192-4.
21. **Arvai, A. S., Y. Bourne, M. J. Hickey, and J. A. Tainer.** 1995. Crystal structure of the human cell cycle protein CksHs1: single domain fold with similarity to kinase N-lobe domain. *J Mol Biol* **249**:835-42.
22. **Asano, K., H. P. Vornlocher, N. J. Richter-Cook, W. C. Merrick, A. G. Hinnebusch, and J. W. Hershey.** 1997. Structure of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits. Possible roles in RNA binding and macromolecular assembly. *J Biol Chem* **272**:27042-52.
23. **Aubol, B. E., S. Chakrabarti, J. Ngo, J. Shaffer, B. Nolen, X. D. Fu, G. Ghosh, and J. A. Adams.** 2003. Processive phosphorylation of alternative splicing factor/splicing factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:12601-6.
24. **Aviel, S., G. Winberg, M. Massucci, and A. Ciechanover.** 2000. Degradation of the epstein-barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *J Biol Chem* **275**:23491-9.
25. **Azuma, Y., A. Arnaoutov, and M. Dasso.** 2003. SUMO-2/3 regulates topoisomerase II in mitosis. *J Cell Biol* **163**:477-87.
26. **Baccarini, M.** 2005. Second nature: biological functions of the Raf-1 "kinase". *FEBS Lett* **579**:3271-7.
27. **Bachant, J., A. Alcasabas, Y. Blat, N. Kleckner, and S. J. Elledge.** 2002. The SUMO-1 isopeptidase Smt4 is linked to centromeric cohesion through SUMO-1 modification of DNA topoisomerase II. *Mol Cell* **9**:1169-82.
28. **Bachmair, A., D. Finley, and A. Varshavsky.** 1986. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* **234**:179-86.
29. **Baek, K. H.** 2003. Conjugation and deconjugation of ubiquitin regulating the destiny of proteins. *Exp Mol Med* **35**:1-7.
30. **Bai, C., R. Richman, and S. J. Elledge.** 1994. Human cyclin F. *Embo J* **13**:6087-98.
31. **Bai, C., P. Sen, K. Hofmann, L. Ma, M. Goebel, J. W. Harper, and S. J. Elledge.** 1996. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* **86**:263-74.
32. **Baillie, L., and T. D. Read.** 2001. Bacillus anthracis, a bug with attitude! *Curr Opin Microbiol* **4**:78-81.
33. **Baker, R. T., J. W. Tobias, and A. Varshavsky.** 1992. Ubiquitin-specific proteases of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of UBP2 and UBP3, and functional analysis of the UBP gene family. *J Biol Chem* **267**:23364-75.
34. **Baker, R. T., and A. Varshavsky.** 1995. Yeast N-terminal amidase. A new enzyme and component of the N-end rule pathway. *J Biol Chem* **270**:12065-74.

35. **Bakheet, T., M. Frevel, B. R. Williams, W. Greer, and K. S. Khabar.** 2001. ARE1: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic Acids Res* **29**:246-54.
36. **Balakirev, M. Y., S. O. Tcherniuk, M. Jaquinod, and J. Chroboczek.** 2003. Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. *EMBO Rep* **4**:517-22.
37. **Baldi, L., K. Brown, G. Franzoso, and U. Siebenlist.** 1996. Critical role for lysines 21 and 22 in signal-induced, ubiquitin-mediated proteolysis of I kappa B-alpha. *J Biol Chem* **271**:376-9.
38. **Ballif, B. A., and J. Blenis.** 2001. Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ* **12**:397-408.
39. **Balzi, E., M. Choder, W. N. Chen, A. Varshavsky, and A. Goffeau.** 1990. Cloning and functional analysis of the arginyl-tRNA-protein transferase gene ATE1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **265**:7464-71.
40. **Bardwell, A. J., M. Abdollahi, and L. Bardwell.** 2004. Anthrax lethal factor-cleavage products of MAPK (mitogen-activated protein kinase) kinases exhibit reduced binding to their cognate MAPKs. *Biochem J* **378**:569-77.
41. **Barsyte-Lovejoy, D., A. Galanis, and A. D. Sharrocks.** 2002. Specificity determinants in MAPK signaling to transcription factors. *J Biol Chem* **277**:9896-903.
42. **Bartel, B., I. Wunning, and A. Varshavsky.** 1990. The recognition component of the N-end rule pathway. *Embo J* **9**:3179-89.
43. **Bassermann, F., C. von Klitzing, S. Munch, R. Y. Bai, H. Kawaguchi, S. W. Morris, C. Peschel, and J. Duyster.** 2005. NIPA defines an SCF-type mammalian E3 ligase that regulates mitotic entry. *Cell* **122**:45-57.
44. **Baumeister, W., A. Bachmair, V. Chau, R. Cohen, P. Coffino, G. Demartino, R. Deshaies, J. Dohmen, S. Emr, D. Finley, R. Hampton, C. Hill, M. Hochstrasser, R. Huber, P. Jackson, S. Jentsch, E. Johnson, Y. T. Kwon, M. Pagano, C. Pickart, M. Rechsteiner, M. Scheffner, T. Sommer, W. Tansey, M. Tyers, R. Vierstra, A. Weissman, K. D. Wilkinson, and D. Wolf.** 2004. Varshavsky's contributions. *Science* **306**:1290-2.
45. **Bax, B., P. S. Carter, C. Lewis, A. R. Guy, A. Bridges, R. Tanner, G. Pettman, C. Mannix, A. A. Culbert, M. J. Brown, D. G. Smith, and A. D. Reith.** 2001. The structure of phosphorylated GSK-3beta complexed with a peptide, FRATtide, that inhibits beta-catenin phosphorylation. *Structure* **9**:1143-52.
46. **Bayer, P., A. Arndt, S. Metzger, R. Mahajan, F. Melchior, R. Jaenicke, and J. Becker.** 1998. Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* **280**:275-86.
47. **Beal, R., Q. Deveraux, G. Xia, M. Rechsteiner, and C. Pickart.** 1996. Surface hydrophobic residues of multiubiquitin chains essential for proteolytic targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:861-6.
48. **Beck, T. W., M. Huleihel, M. Gunnell, T. I. Bonner, and U. R. Rapp.** 1987. The complete coding sequence of the human A-raf-1 oncogene and transforming activity of a human A-raf carrying retrovirus. *Nucleic Acids Res* **15**:595-609.
49. **Behrens, A., W. Jochum, M. Sibilias, and E. F. Wagner.** 2000. Oncogenic transformation by ras and fos is mediated by c-Jun N-terminal phosphorylation. *Oncogene* **19**:2657-63.

50. **Behrens, A., M. Sibilio, and E. F. Wagner.** 1999. Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* **21**:326-9.
51. **Behrens, J.** 2000. Cross-regulation of the Wnt signalling pathway: a role of MAP kinases. *J Cell Sci* **113 (Pt 6)**:911-9.
52. **Beitel, G. J., S. G. Clark, and H. R. Horvitz.** 1990. *Caenorhabditis elegans* ras gene *let-60* acts as a switch in the pathway of vulval induction. *Nature* **348**:503-9.
53. **Belanger, L. F., S. Roy, M. Tremblay, B. Brott, A. M. Steff, W. Mourad, P. Hugo, R. Erikson, and J. Charron.** 2003. *Mek2* is dispensable for mouse growth and development. *Mol Cell Biol* **23**:4778-87.
54. **Bellon, S., M. J. Fitzgibbon, T. Fox, H. M. Hsiao, and K. P. Wilson.** 1999. The structure of phosphorylated p38gamma is monomeric and reveals a conserved activation-loop conformation. *Structure* **7**:1057-65.
55. **Ben-Saadon, R., I. Fajerman, T. Ziv, U. Hellman, A. L. Schwartz, and A. Ciechanover.** 2004. The tumor suppressor protein p16(INK4a) and the human papillomavirus oncoprotein-58 E7 are naturally occurring lysine-less proteins that are degraded by the ubiquitin system. Direct evidence for ubiquitination at the N-terminal residue. *J Biol Chem* **279**:41414-21.
56. **Bendjennat, M., J. Boulaire, T. Jascur, H. Brickner, V. Barbier, A. Sarasin, A. Fotedar, and R. Fotedar.** 2003. UV irradiation triggers ubiquitin-dependent degradation of p21(WAF1) to promote DNA repair. *Cell* **114**:599-610.
57. **Benmerah, A., C. Lamaze, B. Begue, S. L. Schmid, A. Dautry-Varsat, and N. Cerf-Bensussan.** 1998. AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis. *J Cell Biol* **140**:1055-62.
58. **Bennett, A. M., and N. K. Tonks.** 1997. Regulation of distinct stages of skeletal muscle differentiation by mitogen-activated protein kinases. *Science* **278**:1288-91.
59. **Bennett, B. L., D. T. Sasaki, B. W. Murray, E. C. O'Leary, S. T. Sakata, W. Xu, J. C. Leisten, A. Motiwala, S. Pierce, Y. Satoh, S. S. Bhagwat, A. M. Manning, and D. W. Anderson.** 2001. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:13681-6.
60. **Beyaert, R., K. Heyninck, and S. Van Huffel.** 2000. A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor-kappa B-dependent gene expression and apoptosis. *Biochem Pharmacol* **60**:1143-51.
61. **Bignell, G. R., W. Warren, S. Seal, M. Takahashi, E. Rapley, R. Barfoot, H. Green, C. Brown, P. J. Biggs, S. R. Lakhani, C. Jones, J. Hansen, E. Blair, B. Hofmann, R. Siebert, G. Turner, D. G. Evans, C. Schrandt-Stumpel, F. A. Beemer, A. van Den Ouweland, D. Halley, B. Delpech, M. G. Cleveland, I. Leigh, J. Leisti, and S. Rasmussen.** 2000. Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat Genet* **25**:160-5.
62. **Bilodeau, P. S., J. L. Urbanowski, S. C. Winistorfer, and R. C. Piper.** 2002. The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol* **4**:534-9.
63. **Bind, E., Y. Kleyner, D. Skowronska-Krawczyk, E. Bien, B. D. Dynlacht, and I. Sanchez.** 2004. A novel mechanism for mitogen-activated protein kinase localization. *Mol Biol Cell* **15**:4457-66.
64. **Biswas, S. C., and L. A. Greene.** 2002. Nerve growth factor (NGF) down-regulates the Bcl-2 homology 3 (BH3) domain-only protein Bim and suppresses its proapoptotic activity by phosphorylation. *J Biol Chem* **277**:49511-6.

65. **Black, B. L., and E. N. Olson.** 1998. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**:167-96.
66. **Blackshear, P. J., D. M. Haupt, H. App, and U. R. Rapp.** 1990. Insulin activates the Raf-1 protein kinase. *J Biol Chem* **265**:12131-4.
67. **Blanco-Aparicio, C., J. Torres, and R. Pulido.** 1999. A novel regulatory mechanism of MAP kinases activation and nuclear translocation mediated by PKA and the PTP-SL tyrosine phosphatase. *J Cell Biol* **147**:1129-36.
68. **Blander, G., and L. Guarente.** 2004. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* **73**:417-35.
69. **Bloom, J., V. Amador, F. Bartolini, G. DeMartino, and M. Pagano.** 2003. Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitinylation. *Cell* **115**:71-82.
70. **Bloom, J., and M. Pagano.** 2003. Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin Cancer Biol* **13**:41-7.
71. **Bodine, S. C., E. Latres, S. Baumhueter, V. K. Lai, L. Nunez, B. A. Clarke, W. T. Poueymirou, F. J. Panaro, E. Na, K. Dharmarajan, Z. Q. Pan, D. M. Valenzuela, T. M. DeChiara, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos, and D. J. Glass.** 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **294**:1704-8.
72. **Bogoyevitch, M. A., and N. W. Court.** 2004. Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. *Cell Signal* **16**:1345-54.
73. **Bohren, K. M., V. Nadkarni, J. H. Song, K. H. Gabbay, and D. Owerbach.** 2004. A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem* **279**:27233-8.
74. **Bonner, T. I., H. Oppermann, P. Seeburg, S. B. Kerby, M. A. Gunnell, A. C. Young, and U. R. Rapp.** 1986. The complete coding sequence of the human raf oncogene and the corresponding structure of the c-raf-1 gene. *Nucleic Acids Res* **14**:1009-15.
75. **Bonni, A., A. Brunet, A. E. West, S. R. Datta, M. A. Takasu, and M. E. Greenberg.** 1999. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* **286**:1358-62.
76. **Borden, K. L.** 2000. RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol* **295**:1103-12.
77. **Bornstein, G., J. Bloom, D. Sitry-Shevah, K. Nakayama, M. Pagano, and A. Hershko.** 2003. Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J Biol Chem* **278**:25752-7.
78. **Bossis, G., P. Ferrara, C. Acquaviva, I. Jariel-Encontre, and M. Piechaczyk.** 2003. c-Fos proto-oncoprotein is degraded by the proteasome independently of its own ubiquitinylation in vivo. *Mol Cell Biol* **23**:7425-36.
79. **Bost, F., M. Aouadi, L. Caron, P. Even, N. Belmonte, M. Prot, C. Dani, P. Hofman, G. Pages, J. Pouyssegur, Y. Le Marchand-Brustel, and B. Binetruy.** 2005. The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes* **54**:402-11.
80. **Bott, C. M., S. G. Thorneycroft, and C. J. Marshall.** 1994. The sevenmaker gain-of-function mutation in p42 MAP kinase leads to enhanced signalling and reduced sensitivity to dual specificity phosphatase action. *FEBS Lett* **352**:201-5.

81. **Boulton, T. G., S. H. Nye, D. J. Robbins, N. Y. Ip, E. Radziejewska, S. D. Morgenbesser, R. A. DePinho, N. Panayotatos, M. H. Cobb, and G. D. Yancopoulos.** 1991. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**:663-75.
82. **Boulton, T. G., G. D. Yancopoulos, J. S. Gregory, C. Slaughter, C. Moomaw, J. Hsu, and M. H. Cobb.** 1990. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* **249**:64-7.
83. **Bowen, S., M. Gill, D. A. Lee, G. Fisher, R. G. Geronemus, M. E. Vazquez, and J. T. Celebi.** 2005. Mutations in the CYLD gene in Brooke-Spiegler syndrome, familial cylindromatosis, and multiple familial trichoepithelioma: lack of genotype-phenotype correlation. *J Invest Dermatol* **124**:919-20.
84. **Bowman, A. B., A. Kamal, B. W. Ritchings, A. V. Philp, M. McGrail, J. G. Gindhart, and L. S. Goldstein.** 2000. Kinesin-dependent axonal transport is mediated by the sunday driver (SYD) protein. *Cell* **103**:583-94.
85. **Bradshaw, R. A., W. W. Brickey, and K. W. Walker.** 1998. N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and N alpha-acetyl transferase families. *Trends Biochem Sci* **23**:263-7.
86. **Brancho, D., N. Tanaka, A. Jaeschke, J. J. Ventura, N. Kelkar, Y. Tanaka, M. Kyuuma, T. Takeshita, R. A. Flavell, and R. J. Davis.** 2003. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev* **17**:1969-78.
87. **Breitschopf, K., E. Bengal, T. Ziv, A. Admon, and A. Ciechanover.** 1998. A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *Embo J* **17**:5964-73.
88. **Brondello, J. M., J. Pouyssegur, and F. R. McKenzie.** 1999. Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science* **286**:2514-7.
89. **Brooks, C. L., M. Li, and W. Gu.** 2004. Monoubiquitination: the signal for p53 nuclear export? *Cell Cycle* **3**:436-8.
90. **Brott, B. K., B. A. Pinsky, and R. L. Erikson.** 1998. Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:963-8.
91. **Brown, N. R., M. E. Noble, J. A. Endicott, and L. N. Johnson.** 1999. The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol* **1**:438-43.
92. **Brummelkamp, T. R., S. M. Nijman, A. M. Dirac, and R. Bernards.** 2003. Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature* **424**:797-801.
93. **Brunet, A., D. Roux, P. Lenormand, S. Dowd, S. Keyse, and J. Pouyssegur.** 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**:664-74.
94. **Brunner, D., N. Oellers, J. Szabad, W. H. Biggs, 3rd, S. L. Zipursky, and E. Hafen.** 1994. A gain-of-function mutation in *Drosophila* MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Cell* **76**:875-88.
95. **Buchsbaum, R. J., B. A. Connolly, and L. A. Feig.** 2002. Interaction of Rac exchange factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade. *Mol Cell Biol* **22**:4073-85.

96. **Buday, L., and J. Downward.** 1993. Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* **73**:611-20.
97. **Bumeister, R., C. Rosse, A. Anselmo, J. Camonis, and M. A. White.** 2004. CNK2 couples NGF signal propagation to multiple regulatory cascades driving cell differentiation. *Curr Biol* **14**:439-45.
98. **Buschbeck, M., J. Eickhoff, M. N. Sommer, and A. Ullrich.** 2002. Phosphotyrosine-specific phosphatase PTP-SL regulates the ERK5 signaling pathway. *J Biol Chem* **277**:29503-9.
99. **Buschbeck, M., and A. Ullrich.** 2005. The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *J Biol Chem* **280**:2659-67.
100. **Busino, L., M. Donzelli, M. Chiesa, D. Guardavaccaro, D. Ganoth, N. V. Dorrello, A. Hershko, M. Pagano, and G. F. Draetta.** 2003. Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage. *Nature* **426**:87-91.
101. **Byrd, D. T., M. Kawasaki, M. Walcoff, N. Hisamoto, K. Matsumoto, and Y. Jin.** 2001. UNC-16, a JNK-signaling scaffold protein, regulates vesicle transport in *C. elegans*. *Neuron* **32**:787-800.
102. **Cacace, A. M., N. R. Michaud, M. Therrien, K. Mathes, T. Copeland, G. M. Rubin, and D. K. Morrison.** 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**:229-40.
103. **Cadigan, K. M., and R. Nusse.** 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* **11**:3286-305.
104. **Cadwell, K., and L. Coscoy.** 2005. Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science* **309**:127-30.
105. **Camps, M., A. Nichols, C. Gillieron, B. Antonsson, M. Muda, C. Chabert, U. Boschert, and S. Arkinstall.** 1998. Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science* **280**:1262-5.
106. **Canagarajah, B. J., A. Khokhlatchev, M. H. Cobb, and E. J. Goldsmith.** 1997. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**:859-69.
107. **Cardozo, T., and M. Pagano.** 2004. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:739-51.
108. **Caron, C., C. Boyault, and S. Khochbin.** 2005. Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability. *Bioessays* **27**:408-15.
109. **Carroll, M. P., I. Clark-Lewis, U. R. Rapp, and W. S. May.** 1990. Interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mediate rapid phosphorylation and activation of cytosolic c-raf. *J Biol Chem* **265**:19812-7.
110. **Cavanaugh, J. E.** 2004. Role of extracellular signal regulated kinase 5 in neuronal survival. *Eur J Biochem* **271**:2056-9.
111. **Cayrol, C., and B. Ducommun.** 1998. Interaction with cyclin-dependent kinases and PCNA modulates proteasome-dependent degradation of p21. *Oncogene* **17**:2437-44.
112. **Chang, C. I., B. E. Xu, R. Akella, M. H. Cobb, and E. J. Goldsmith.** 2002. Crystal structures of MAP kinase p38 complexed to the docking sites on its nuclear substrate MEF2A and activator MKK3b. *Mol Cell* **9**:1241-9.

113. **Chang, L., and M. Karin.** 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**:37-40.
114. **Chao, T. H., M. Hayashi, R. I. Tapping, Y. Kato, and J. D. Lee.** 1999. MEKK3 directly regulates MEK5 activity as part of the big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) signaling pathway. *J Biol Chem* **274**:36035-8.
115. **Chardin, P., J. H. Camonis, N. W. Gale, L. van Aelst, J. Schlessinger, M. H. Wigler, and D. Bar-Sagi.** 1993. Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* **260**:1338-43.
116. **Charles, C. H., A. S. Abler, and L. F. Lau.** 1992. cDNA sequence of a growth factor-inducible immediate early gene and characterization of its encoded protein. *Oncogene* **7**:187-90.
117. **Chau, V., J. W. Tobias, A. Bachmair, D. Marriott, D. J. Ecker, D. K. Gonda, and A. Varshavsky.** 1989. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* **243**:1576-83.
118. **Chen, A. J., G. Zhou, T. Juan, S. M. Colicos, J. P. Cannon, M. Cabriera-Hansen, C. F. Meyer, R. Jurecic, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, F. Fletcher, T. H. Tan, and J. W. Belmont.** 2002. The dual specificity JKAP specifically activates the c-Jun N-terminal kinase pathway. *J Biol Chem* **277**:36592-601.
119. **Chen, H., S. Fre, V. I. Slepnev, M. R. Capua, K. Takei, M. H. Butler, P. P. Di Fiore, and P. De Camilli.** 1998. Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature* **394**:793-7.
120. **Chen, J., K. Fujii, L. Zhang, T. Roberts, and H. Fu.** 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**:7783-8.
121. **Chen, P., P. Johnson, T. Sommer, S. Jentsch, and M. Hochstrasser.** 1993. Multiple ubiquitin-conjugating enzymes participate in the in vivo degradation of the yeast MAT alpha 2 repressor. *Cell* **74**:357-69.
122. **Chen, R. H., C. Abate, and J. Blenis.** 1993. Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:10952-6.
123. **Chen, R. H., C. Sarnecki, and J. Blenis.** 1992. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* **12**:915-27.
124. **Chen, S., B. D. Spiegelberg, F. Lin, E. J. Dell, and H. E. Hamm.** 2004. Interaction of Gbetagamma with RACK1 and other WD40 repeat proteins. *J Mol Cell Cardiol* **37**:399-406.
125. **Chen, X., Y. Chi, A. Bloecher, R. Aebersold, B. E. Clurman, and J. M. Roberts.** 2004. N-acetylation and ubiquitin-independent proteasomal degradation of p21(Cip1). *Mol Cell* **16**:839-47.
126. **Chen, Y., D. L. McPhie, J. Hirschberg, and R. L. Neve.** 2000. The amyloid precursor protein-binding protein APP-BP1 drives the cell cycle through the S-M checkpoint and causes apoptosis in neurons. *J Biol Chem* **275**:8929-35.
127. **Chen, Z. J.** 2005. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* **7**:758-65.
128. **Cheng, M., T. G. Boulton, and M. H. Cobb.** 1996. ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. *J Biol Chem* **271**:8951-8.
129. **Cheng, M., E. Zhen, M. J. Robinson, D. Ebert, E. Goldsmith, and M. H. Cobb.** 1996. Characterization of a protein kinase that phosphorylates serine 189 of the mitogen-activated protein kinase homolog ERK3. *J Biol Chem* **271**:12057-62.

130. **Chiariello, M., M. J. Marinissen, and J. S. Gutkind.** 2000. Multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways connect the cot oncoprotein to the c-jun promoter and to cellular transformation. *Mol Cell Biol* **20**:1747-58.
131. **Choi, K. W., and S. Benzer.** 1994. Rotation of photoreceptor clusters in the developing *Drosophila* eye requires the nemo gene. *Cell* **78**:125-36.
132. **Chow, C. W., M. Rincon, J. Cavanagh, M. Dickens, and R. J. Davis.** 1997. Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* **278**:1638-41.
133. **Chowdary, D. R., J. J. Dermody, K. K. Jha, and H. L. Ozer.** 1994. Accumulation of p53 in a mutant cell line defective in the ubiquitin pathway. *Mol Cell Biol* **14**:1997-2003.
134. **Chrestensen, C. A., M. J. Schroeder, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, J. W. Pelo, M. T. Worthington, and T. W. Sturgill.** 2004. MAPKAP kinase 2 phosphorylates tristetraprolin on in vivo sites including Ser178, a site required for 14-3-3 binding. *J Biol Chem* **279**:10176-84.
135. **Christie, G. R., D. J. Williams, F. Macisaac, R. J. Dickinson, I. Rosewell, and S. M. Keyse.** 2005. The dual-specificity protein phosphatase DUSP9/MKP-4 is essential for placental function but is not required for normal embryonic development. *Mol Cell Biol* **25**:8323-33.
136. **Ciechanover, A., H. Heller, S. Elias, A. L. Haas, and A. Hershko.** 1980. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:1365-8.
137. **Ciechanover, A., Y. Hod, and A. Hershko.** 1978. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **81**:1100-5.
138. **Clark, A. R., J. L. Dean, and J. Saklatvala.** 2003. Post-transcriptional regulation of gene expression by mitogen-activated protein kinase p38. *FEBS Lett* **546**:37-44.
139. **Clark, S. G., M. J. Stern, and H. R. Horvitz.** 1992. *C. elegans* cell-signalling gene sem-5 encodes a protein with SH2 and SH3 domains. *Nature* **356**:340-4.
140. **Clurman, B. E., R. J. Sheaff, K. Thress, M. Groudine, and J. M. Roberts.** 1996. Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev* **10**:1979-90.
141. **Cobb, M. H., and O. M. Rosen.** 1983. Description of a protein kinase derived from insulin-treated 3T3-L1 cells that catalyzes the phosphorylation of ribosomal protein S6 and casein. *J Biol Chem* **258**:12472-81.
142. **Coffino, P.** 2001. Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:188-94.
143. **Cohen, P.** 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* **58**:453-508.
144. **Collett, M. S., and R. L. Erikson.** 1978. Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**:2021-4.
145. **Cooper, J. A., and T. Hunter.** 1985. Major substrate for growth factor-activated protein-tyrosine kinases is a low-abundance protein. *Mol Cell Biol* **5**:3304-9.
146. **Cope, G. A., and R. J. Deshaies.** 2003. COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases. *Cell* **114**:663-71.
147. **Cope, G. A., G. S. Suh, L. Aravind, S. E. Schwarz, S. L. Zipursky, E. V. Koonin, and R. J. Deshaies.** 2002. Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cull1. *Science* **298**:608-11.

148. **Cori, G. T., and C. F. Cori.** 1939. The activating effect of glycogen on the enzymatic synthesis of glycogen from glucose-1-phosphate. *J Biol Chem* **131**:397.
149. **Cosgrove, M. S., and C. Wolberger.** 2005. How does the histone code work? *Biochem Cell Biol* **83**:468-76.
150. **Cowley, S., H. Paterson, P. Kemp, and C. J. Marshall.** 1994. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* **77**:841-52.
151. **Crews, C. M., A. Alessandrini, and R. L. Erikson.** 1992. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* **258**:478-80.
152. **Crowe, D. L.** 2004. Induction of p97MAPK expression regulates collagen mediated inhibition of proliferation and migration in human squamous cell carcinoma lines. *Int J Oncol* **24**:1159-63.
153. **Dahlmann, B., L. Kuehn, M. Rutschmann, and H. Reinauer.** 1985. Purification and characterization of a multicatalytic high-molecular-mass proteinase from rat skeletal muscle. *Biochem J* **228**:161-70.
154. **Dai, P., W. C. Xiong, and L. Mei.** 2006. Erbin inhibits RAF activation by disrupting the sur-8-Ras-Raf complex. *J Biol Chem* **281**:927-33.
155. **Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton, and P. A. Futreal.** 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**:949-54.
156. **De Mot, R., I. Nagy, J. Walz, and W. Baumeister.** 1999. Proteasomes and other self-compartmentalizing proteases in prokaryotes. *Trends Microbiol* **7**:88-92.
157. **de Napoles, M., J. E. Mermoud, R. Wakao, Y. A. Tang, M. Endoh, R. Appanah, T. B. Nesterova, J. Silva, A. P. Otte, M. Vidal, H. Koseki, and N. Brockdorff.** 2004. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell* **7**:663-76.
158. **Deffenbaugh, A. E., K. M. Scaglione, L. Zhang, J. M. Moore, T. Buranda, L. A. Sklar, and D. Skowyra.** 2003. Release of ubiquitin-charged Cdc34-S - Ub from the RING domain is essential for ubiquitination of the SCF(Cdc4)-bound substrate Sic1. *Cell* **114**:611-22.
159. **Delhalle, S., R. Blasius, M. Dicato, and M. Diederich.** 2004. A beginner's guide to NF-kappaB signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci* **1030**:1-13.
160. **DeMartino, G. N., C. R. Moomaw, O. P. Zagnitko, R. J. Proske, M. Chu-Ping, S. J. Afendis, J. C. Swaffield, and C. A. Slaughter.** 1994. PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. *J Biol Chem* **269**:20878-84.
161. **den Engelsman, J., V. Keijsers, W. W. de Jong, and W. C. Boelens.** 2003. The small heat-shock protein alpha B-crystallin promotes FBX4-dependent ubiquitination. *J Biol Chem* **278**:4699-704.
162. **Denkert, C., U. Warskulat, F. Hensel, and D. Haussinger.** 1998. Osmolyte strategy in human monocytes and macrophages: involvement of p38MAPK in

- hyperosmotic induction of betaine and myoinositol transporters. *Arch Biochem Biophys* **354**:172-80.
163. **Dent, P., W. Haser, T. A. Haystead, L. A. Vincent, T. M. Roberts, and T. W. Sturgill.** 1992. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. *Science* **257**:1404-7.
 164. **Derijard, B., M. Hibi, I. H. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin, and R. J. Davis.** 1994. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**:1025-37.
 165. **Derijard, B., J. Raingeaud, T. Barrett, I. H. Wu, J. Han, R. J. Ulevitch, and R. J. Davis.** 1995. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* **267**:682-5.
 166. **Deshais, R. J.** 1999. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**:435-67.
 167. **Desole, M. S., L. Sciola, M. R. Delogu, S. Sircana, and R. Migheli.** 1996. Manganese and 1-methyl-4-(2'-ethylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine induce apoptosis in PC12 cells. *Neurosci Lett* **209**:193-6.
 168. **Desterro, J. M., M. S. Rodriguez, G. D. Kemp, and R. T. Hay.** 1999. Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *J Biol Chem* **274**:10618-24.
 169. **Deveraux, Q., V. Ustrell, C. Pickart, and M. Rechsteiner.** 1994. A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* **269**:7059-61.
 170. **Dhillon, A. S., and W. Kolch.** 2002. Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch Biochem Biophys* **404**:3-9.
 171. **Dickens, M., J. S. Rogers, J. Cavanagh, A. Raitano, Z. Xia, J. R. Halpern, M. E. Greenberg, C. L. Sawyers, and R. J. Davis.** 1997. A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* **277**:693-6.
 172. **Dieckhoff, P., M. Bolte, Y. Sancak, G. H. Braus, and S. Irniger.** 2004. Smt3/SUMO and Ubc9 are required for efficient APC/C-mediated proteolysis in budding yeast. *Mol Microbiol* **51**:1375-87.
 173. **Dikic, I., J. Schlessinger, and I. Lax.** 1994. PC12 cells overexpressing the insulin receptor undergo insulin-dependent neuronal differentiation. *Curr Biol* **4**:702-8.
 174. **Dinev, D., B. W. Jordan, B. Neufeld, J. D. Lee, D. Lindemann, U. R. Rapp, and S. Ludwig.** 2001. Extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) is required for the differentiation of muscle cells. *EMBO Rep* **2**:829-34.
 175. **Ditzel, M., R. Wilson, T. Tenev, A. Zachariou, A. Paul, E. Deas, and P. Meier.** 2003. Degradation of DIAP1 by the N-end rule pathway is essential for regulating apoptosis. *Nat Cell Biol* **5**:467-73.
 176. **Dodson, G., and A. Wlodawer.** 1998. Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem Sci* **23**:347-52.
 177. **Dong, C., D. D. Yang, C. Tournier, A. J. Whitmarsh, J. Xu, R. J. Davis, and R. A. Flavell.** 2000. JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. *Nature* **405**:91-4.
 178. **Dorfman, K., D. Carrasco, M. Gruda, C. Ryan, S. A. Lira, and R. Bravo.** 1996. Disruption of the erp/mkp-1 gene does not affect mouse development: normal MAP kinase activity in ERP/MKP-1-deficient fibroblasts. *Oncogene* **13**:925-31.
 179. **Dougherty, M. K., J. Muller, D. A. Ritt, M. Zhou, X. Z. Zhou, T. D. Copeland, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, K. P. Lu, and D. K. Morrison.** 2005. Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell* **17**:215-24.

180. **Douziech, M., F. Roy, G. Laberge, M. Lefrancois, A. V. Armengod, and M. Therrien.** 2003. Bimodal regulation of RAF by CNK in *Drosophila*. *Embo J* **22**:5068-78.
181. **Driessen, H. P., W. W. de Jong, G. I. Tesser, and H. Bloemendal.** 1985. The mechanism of N-terminal acetylation of proteins. *CRC Crit Rev Biochem* **18**:281-325.
182. **Dumaz, N., Y. Light, and R. Marais.** 2002. Cyclic AMP blocks cell growth through Raf-1-dependent and Raf-1-independent mechanisms. *Mol Cell Biol* **22**:3717-28.
183. **Duprez, E., A. J. Saurin, J. M. Desterro, V. Lallemand-Breitenbach, K. Howe, M. N. Boddy, E. Solomon, H. de The, R. T. Hay, and P. S. Freemont.** 1999. SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J Cell Sci* **112 (Pt 3)**:381-93.
184. **Eaton, E. M., and L. Sealy.** 2003. Modification of CCAAT/enhancer-binding protein-beta by the small ubiquitin-like modifier (SUMO) family members, SUMO-2 and SUMO-3. *J Biol Chem* **278**:33416-21.
185. **Eckerdt, F., J. Yuan, and K. Strebhardt.** 2005. Polo-like kinases and oncogenesis. *Oncogene* **24**:267-76.
186. **Elion, E. A.** 2001. The Ste5p scaffold. *J Cell Sci* **114**:3967-78.
187. **England, P. J.** 1975. Correlation between contraction and phosphorylation of the inhibitory subunit of troponin in perfused rat heart. *FEBS Lett* **50**:57-60.
188. **English, J. M., G. Pearson, R. Baer, and M. H. Cobb.** 1998. Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases. *J Biol Chem* **273**:3854-60.
189. **Esparis-Ogando, A., E. Diaz-Rodriguez, J. C. Montero, L. Yuste, P. Crespo, and A. Pandiella.** 2002. Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2. *Mol Cell Biol* **22**:270-85.
190. **Evans, P. C., H. Ovaa, M. Hamon, P. J. Kilshaw, S. Hamm, S. Bauer, H. L. Ploegh, and T. S. Smith.** 2004. Zinc-finger protein A20, a regulator of inflammation and cell survival, has de-ubiquitinating activity. *Biochem J* **378**:727-34.
191. **Evans, P. C., T. S. Smith, M. J. Lai, M. G. Williams, D. F. Burke, K. Heyninck, M. M. Kreike, R. Beyaert, T. L. Blundell, and P. J. Kilshaw.** 2003. A novel type of deubiquitinating enzyme. *J Biol Chem* **278**:23180-6.
192. **Fajerman, I., A. L. Schwartz, and A. Ciechanover.** 2004. Degradation of the Id2 developmental regulator: targeting via N-terminal ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun* **314**:505-12.
193. **Fan, X., and J. J. Chen.** 2004. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the papillomavirus E6 oncogene. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **14**:183-202.
194. **Fanger, G. R., P. Gerwins, C. Widmann, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson.** 1997. MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr Opin Genet Dev* **7**:67-74.
195. **Fanger, G. R., N. L. Johnson, and G. L. Johnson.** 1997. MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42. *Embo J* **16**:4961-72.
196. **Farooq, A., O. Plotnikova, G. Chaturvedi, S. Yan, L. Zeng, Q. Zhang, and M. M. Zhou.** 2003. Solution structure of the MAPK phosphatase PAC-1 catalytic domain. Insights into substrate-induced enzymatic activation of MKP. *Structure* **11**:155-64.

197. **Farooq, A., and M. M. Zhou.** 2004. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* **16**:769-79.
198. **Feig, L. A.** 2003. Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame. *Trends Cell Biol* **13**:419-25.
199. **Feldman, R. M., C. C. Correll, K. B. Kaplan, and R. J. Deshaies.** 1997. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* **91**:221-30.
200. **Fenteany, G., R. F. Standaert, W. S. Lane, S. Choi, E. J. Corey, and S. L. Schreiber.** 1995. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* **268**:726-31.
201. **Ferrigno, P., F. Posas, D. Koepf, H. Saito, and P. A. Silver.** 1998. Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *Embo J* **17**:5606-14.
202. **Finley, D., B. Bartel, and A. Varshavsky.** 1989. The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature* **338**:394-401.
203. **Finley, D., A. Ciechanover, and A. Varshavsky.** 1984. Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* **37**:43-55.
204. **Finley, D., E. Ozkaynak, and A. Varshavsky.** 1987. The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* **48**:1035-46.
205. **Formstecher, E., J. W. Ramos, M. Fauquet, D. A. Calderwood, J. C. Hsieh, B. Canton, X. T. Nguyen, J. V. Barnier, J. Camonis, M. H. Ginsberg, and H. Chneiweiss.** 2001. PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Dev Cell* **1**:239-50.
206. **Forsthoefel, A. M., M. M. Pena, Y. Y. Xing, Z. Rafique, and F. G. Berger.** 2004. Structural determinants for the intracellular degradation of human thymidylate synthase. *Biochemistry* **43**:1972-9.
207. **Frame, S., P. Cohen, and R. M. Biondi.** 2001. A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol Cell* **7**:1321-7.
208. **Freshney, N. W., L. Rawlinson, F. Guesdon, E. Jones, S. Cowley, J. Hsuan, and J. Saklatvala.** 1994. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* **78**:1039-49.
209. **Fu, H., S. Sadis, D. M. Rubin, M. Glickman, S. van Nocker, D. Finley, and R. D. Vierstra.** 1998. Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit Mcl1. *J Biol Chem* **273**:1970-81.
210. **Fu, X. D.** 1995. The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *Rna* **1**:663-80.
211. **Fukuda, M., I. Gotoh, M. Adachi, Y. Gotoh, and E. Nishida.** 1997. A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase. *J Biol Chem* **272**:32642-8.
212. **Fukuda, M., I. Gotoh, Y. Gotoh, and E. Nishida.** 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**:20024-8.

213. **Fukuda, M., Y. Gotoh, and E. Nishida.** 1997. Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *Embo J* **16**:1901-8.
214. **Fukuhara, S., M. J. Marinissen, M. Chiariello, and J. S. Gutkind.** 2000. Signaling from G protein-coupled receptors to ERK5/Big MAPK 1 involves Galpha q and Galpha 12/13 families of heterotrimeric G proteins. Evidence for the existence of a novel Ras AND Rho-independent pathway. *J Biol Chem* **275**:21730-6.
215. **Fuller, S. J., E. L. Davies, J. Gillespie-Brown, H. Sun, and N. K. Tonks.** 1997. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 inhibits the stimulation of gene expression by hypertrophic agonists in cardiac myocytes. *Biochem J* **323** (Pt 2):313-9.
216. **Furthauer, M., W. Lin, S. L. Ang, B. Thisse, and C. Thisse.** 2002. Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nat Cell Biol* **4**:170-4.
217. **Furuchi, T., and R. G. Anderson.** 1998. Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK). *J Biol Chem* **273**:21099-104.
218. **Gaczynska, M., A. L. Goldberg, K. Tanaka, K. B. Hendil, and K. L. Rock.** 1996. Proteasome subunits X and Y alter peptidase activities in opposite ways to the interferon-gamma-induced subunits LMP2 and LMP7. *J Biol Chem* **271**:17275-80.
219. **Gaits, F., G. Degols, K. Shiozaki, and P. Russell.** 1998. Phosphorylation and association with the transcription factor Atf1 regulate localization of Spc1/Sty1 stress-activated kinase in fission yeast. *Genes Dev* **12**:1464-73.
220. **Galan, J. M., and R. Haguenauer-Tsapis.** 1997. Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *Embo J* **16**:5847-54.
221. **Galanis, A., S. H. Yang, and A. D. Sharrocks.** 2001. Selective targeting of MAPKs to the ETS domain transcription factor SAP-1. *J Biol Chem* **276**:965-73.
222. **Gaumont-Leclerc, M. F., U. K. Mukhopadhyay, S. Goumard, and G. Ferbeyre.** 2004. PEA-15 is inhibited by adenovirus E1A and plays a role in ERK nuclear export and Ras-induced senescence. *J Biol Chem* **279**:46802-9.
223. **Ge, B., H. Gram, F. Di Padova, B. Huang, L. New, R. J. Ulevitch, Y. Luo, and J. Han.** 2002. MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* **295**:1291-4.
224. **Gebauer, F., and M. W. Hentze.** 2004. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:827-35.
225. **Gehringer, M. M.** 2004. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Lett* **557**:1-8.
226. **Geier, E., G. Pfeifer, M. Wilm, M. Lucchiari-Hartz, W. Baumeister, K. Eichmann, and G. Niedermann.** 1999. A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* **283**:978-81.
227. **Gershoni-Baruch, R., A. Lerner, J. Braun, Y. Katzir, T. C. Iancu, and A. Benderly.** 1990. Johanson-Blizzard syndrome: clinical spectrum and further delineation of the syndrome. *Am J Med Genet* **35**:546-51.
228. **Gibbs, C. S., and M. J. Zoller.** 1991. Rational scanning mutagenesis of a protein kinase identifies functional regions involved in catalysis and substrate interactions. *J Biol Chem* **266**:8923-31.
229. **Giet, R., C. Petretti, and C. Prigent.** 2005. Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends Cell Biol* **15**:241-50.

230. **Gigione, C., A. Boularot, and T. Meinel.** 2004. Protein N-terminal methionine excision. *Cell Mol Life Sci* **61**:1455-74.
231. **Giroux, S., M. Tremblay, D. Bernard, J. F. Cardin-Girard, S. Aubry, L. Larouche, S. Rousseau, J. Huot, J. Landry, L. Jeannotte, and J. Charron.** 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**:369-72.
232. **Glickman, M. H., D. M. Rubin, O. Cux, I. Wefes, G. Pfeifer, Z. Cjeka, W. Baumeister, V. A. Fried, and D. Finley.** 1998. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* **94**:615-23.
233. **Glickman, M. H., D. M. Rubin, V. A. Fried, and D. Finley.** 1998. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* **18**:3149-62.
234. **Goebel, M. G., J. Yochem, S. Jentsch, J. P. McGrath, A. Varshavsky, and B. Byers.** 1988. The yeast cell cycle gene CDC34 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Science* **241**:1331-5.
235. **Goedert, M., A. Cuenda, M. Craxton, R. Jakes, and P. Cohen.** 1997. Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *Embo J* **16**:3563-71.
236. **Goldknopf, I. L., and H. Busch.** 1977. Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:864-8.
237. **Gollob, J. A.** 2005. Sorafenib: scientific rationales for single-agent and combination therapy in clear-cell renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* **4**:167-74.
238. **Gomes, M. D., S. H. Lecker, R. T. Jago, A. Navon, and A. L. Goldberg.** 2001. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:14440-5.
239. **Gomez, N., and P. Cohen.** 1991. Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature* **353**:170-3.
240. **Gonzalez, F. A., D. L. Raden, M. R. Rigby, and R. J. Davis.** 1992. Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS Lett* **304**:170-8.
241. **Gorlich, D., and U. Kutay.** 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**:607-60.
242. **Graves, L. M., H. I. Guy, P. Kozlowski, M. Huang, E. Lazarowski, R. M. Pope, M. A. Collins, E. N. Dahlstrand, H. S. Earp, 3rd, and D. R. Evans.** 2000. Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature* **403**:328-32.
243. **Groll, M., L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, and R. Huber.** 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**:463-71.
244. **Gstaiger, M., R. Jordan, M. Lim, C. Catzavelos, J. Mestan, J. Slingerland, and W. Krek.** 2001. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:5043-8.
245. **Guan, K. L., S. S. Broyles, and J. E. Dixon.** 1991. A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus. *Nature* **350**:359-62.
246. **Guardavaccaro, D., Y. Kudo, J. Boulaire, M. Barchi, L. Busino, M. Donzelli, F. Margottin-Goguet, P. K. Jackson, L. Yamasaki, and M. Pagano.** 2003. Control

- of meiotic and mitotic progression by the F box protein beta-Trcp1 in vivo. *Dev Cell* **4**:799-812.
247. **Guex, N., and M. C. Peitsch.** 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**:2714-23.
 248. **Gupta, S., T. Barrett, A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, H. K. Sluss, B. Derijard, and R. J. Davis.** 1996. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *Embo J* **15**:2760-70.
 249. **Haas, A. L., and I. A. Rose.** 1982. The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis. *J Biol Chem* **257**:10329-37.
 250. **Hampton, R. Y., R. G. Gardner, and J. Rine.** 1996. Role of 26S proteasome and HRD genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Mol Biol Cell* **7**:2029-44.
 251. **Han, J., J. D. Lee, L. Bibbs, and R. J. Ulevitch.** 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**:808-11.
 252. **Han, M., and P. W. Sternberg.** 1990. let-60, a gene that specifies cell fates during *C. elegans* vulval induction, encodes a ras protein. *Cell* **63**:921-31.
 253. **Han, Z., D. L. Boyle, L. Chang, B. Bennett, M. Karin, L. Yang, A. M. Manning, and G. S. Firestein.** 2001. c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* **108**:73-81.
 254. **Han, Z., L. Chang, Y. Yamanishi, M. Karin, and G. S. Firestein.** 2002. Joint damage and inflammation in c-Jun N-terminal kinase 2 knockout mice with passive murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* **46**:818-23.
 255. **Haneda, M., T. Sugimoto, and R. Kikkawa.** 1999. Mitogen-activated protein kinase phosphatase: a negative regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Eur J Pharmacol* **365**:1-7.
 256. **Hanks, S. K., A. M. Quinn, and T. Hunter.** 1988. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**:42-52.
 257. **Hansen, D. V., A. V. Loktev, K. H. Ban, and P. K. Jackson.** 2004. Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC Inhibitor Emi1. *Mol Biol Cell* **15**:5623-34.
 258. **Hao, B., N. Zheng, B. A. Schulman, G. Wu, J. J. Miller, M. Pagano, and N. P. Pavletich.** 2005. Structural basis of the Cks1-dependent recognition of p27(Kip1) by the SCF(Skp2) ubiquitin ligase. *Mol Cell* **20**:9-19.
 259. **Haracska, L., C. A. Torres-Ramos, R. E. Johnson, S. Prakash, and L. Prakash.** 2004. Opposing effects of ubiquitin conjugation and SUMO modification of PCNA on replicational bypass of DNA lesions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **24**:4267-74.
 260. **Hardtke, C. S., and X. W. Deng.** 2000. The cell biology of the COP/DET/FUS proteins. Regulating proteolysis in photomorphogenesis and beyond? *Plant Physiol* **124**:1548-57.
 261. **Harris, J. R.** 1968. Release of a macromolecular protein component from human erythrocyte ghosts. *Biochim Biophys Acta* **150**:534-7.
 262. **Harris, K. F., I. Shoji, E. M. Cooper, S. Kumar, H. Oda, and P. M. Howley.** 1999. Ubiquitin-mediated degradation of active Src tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:13738-43.

263. **Hart, A. C., H. Kramer, D. L. Van Vactor, Jr., M. Paidhungat, and S. L. Zipursky.** 1990. Induction of cell fate in the *Drosophila* retina: the bride of sevenless protein is predicted to contain a large extracellular domain and seven transmembrane segments. *Genes Dev* **4**:1835-47.
264. **Hart, M., J. P. Concordet, I. Lassot, I. Albert, R. del los Santos, H. Durand, C. Perret, B. Rubinfeld, F. Margottin, R. Benarous, and P. Polakis.** 1999. The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol* **9**:207-10.
265. **Hase, J., K. Kobashi, N. Nakai, K. Mitsui, K. Iwata, and T. Takadera.** 1980. The quaternary structure of carp muscle alkaline protease. *Biochim Biophys Acta* **611**:205-13.
266. **Hashimoto, K., G. Guroff, and Y. Katagiri.** 2000. Delayed and sustained activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase induced by proteasome inhibitors through p21(ras) in PC12 cells. *J Neurochem* **74**:92-8.
267. **Hatakeyama, S., M. Yada, M. Matsumoto, N. Ishida, and K. I. Nakayama.** 2001. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem* **276**:33111-20.
268. **Hatano, N., Y. Mori, M. Oh-hora, A. Kosugi, T. Fujikawa, N. Nakai, H. Niwa, J. Miyazaki, T. Hamaoka, and M. Ogata.** 2003. Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells* **8**:847-56.
269. **Hay, R. T.** 2005. SUMO: a history of modification. *Mol Cell* **18**:1-12.
270. **Hayashi, M., S. W. Kim, K. Imanaka-Yoshida, T. Yoshida, E. D. Abel, B. Eliceiri, Y. Yang, R. J. Ulevitch, and J. D. Lee.** 2004. Targeted deletion of BMK1/ERK5 in adult mice perturbs vascular integrity and leads to endothelial failure. *J Clin Invest* **113**:1138-48.
271. **Hayashi, M., and J. D. Lee.** 2004. Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. *J Mol Med* **82**:800-8.
272. **Hayashi, M., R. I. Tapping, T. H. Chao, J. F. Lo, C. C. King, Y. Yang, and J. D. Lee.** 2001. BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase. *J Biol Chem* **276**:8631-4.
273. **Heasman, J.** 2002. Morpholino oligos: making sense of antisense? *Dev Biol* **243**:209-14.
274. **Henrich, L. M., J. A. Smith, D. Kitt, T. M. Errington, B. Nguyen, A. M. Traish, and D. A. Lannigan.** 2003. Extracellular signal-regulated kinase 7, a regulator of hormone-dependent estrogen receptor destruction. *Mol Cell Biol* **23**:5979-88.
275. **Hershko, A., and A. Ciechanover.** 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**:425-79.
276. **Hershko, A., A. Ciechanover, H. Heller, A. L. Haas, and I. A. Rose.** 1980. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:1783-6.
277. **Hershko, A., A. Ciechanover, and I. A. Rose.** 1979. Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:3107-10.
278. **Hershko, A., H. Heller, S. Elias, and A. Ciechanover.** 1983. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* **258**:8206-14.

279. **Hershko, A., and I. A. Rose.** 1987. Ubiquitin-aldehyde: a general inhibitor of ubiquitin-recycling processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:1829-33.
280. **Hibi, M., A. Lin, T. Smeal, A. Minden, and M. Karin.** 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* **7**:2135-48.
281. **Hicke, L.** 1999. Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol* **9**:107-12.
282. **Hicke, L.** 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:195-201.
283. **Hicke, L., and R. Dunn.** 2003. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**:141-72.
284. **Hicke, L., H. L. Schubert, and C. P. Hill.** 2005. Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:610-21.
285. **Hirosumi, J., G. Tuncman, L. Chang, C. Z. Gorgun, K. T. Uysal, K. Maeda, M. Karin, and G. S. Hotamisligil.** 2002. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420**:333-6.
286. **Hochstrasser, M., and A. Varshavsky.** 1990. In vivo degradation of a transcriptional regulator: the yeast alpha 2 repressor. *Cell* **61**:697-708.
287. **Hoege, C., B. Pfander, G. L. Moldovan, G. Pyrowolakis, and S. Jentsch.** 2002. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**:135-41.
288. **Hofmann, K., and P. Bucher.** 1996. The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends Biochem Sci* **21**:172-3.
289. **Hofmann, K., and L. Falquet.** 2001. A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci* **26**:347-50.
290. **Holland, P. M., M. Suzanne, J. S. Campbell, S. Noselli, and J. A. Cooper.** 1997. MKK7 is a stress-activated mitogen-activated protein kinase kinase functionally related to hemipterous. *J Biol Chem* **272**:24994-8.
291. **Hong, Y., R. Rogers, M. J. Matunis, C. N. Mayhew, M. L. Goodson, O. K. Park-Sarge, and K. D. Sarge.** 2001. Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem* **276**:40263-7.
292. **Hook, L., C. O'Brien, and T. Allsopp.** 2005. ES cell technology: an introduction to genetic manipulation, differentiation and therapeutic cloning. *Adv Drug Deliv Rev* **57**:1904-17.
293. **Hoppe, T.** 2005. Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci* **30**:183-7.
294. **Hori, T., F. Osaka, T. Chiba, C. Miyamoto, K. Okabayashi, N. Shimbara, S. Kato, and K. Tanaka.** 1999. Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8. *Oncogene* **18**:6829-34.
295. **Hoyt, M. A., and P. Coffino.** 2004. Ubiquitin-free routes into the proteasome. *Cell Mol Life Sci* **61**:1596-600.
296. **Hu, M., P. Li, M. Li, W. Li, T. Yao, J. W. Wu, W. Gu, R. E. Cohen, and Y. Shi.** 2002. Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde. *Cell* **111**:1041-54.
297. **Hu, R. G., J. Sheng, X. Qi, Z. Xu, T. T. Takahashi, and A. Varshavsky.** 2005. The N-end rule pathway as a nitric oxide sensor controlling the levels of multiple regulators. *Nature* **437**:981-6.

298. **Huang, D. T., A. Paydar, M. Zhuang, M. B. Waddell, J. M. Holton, and B. A. Schulman.** 2005. Structural basis for recruitment of Ubc12 by an E2 binding domain in NEDD8's E1. *Mol Cell* **17**:341-50.
299. **Huang, H. C., and P. S. Klein.** 2004. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol* **5**:234.
300. **Huang, L., E. Kinnucan, G. Wang, S. Beaudenon, P. M. Howley, J. M. Huibregtse, and N. P. Pavletich.** 1999. Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science* **286**:1321-6.
301. **Huibregtse, J. M., M. Scheffner, S. Beaudenon, and P. M. Howley.** 1995. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:2563-7.
302. **Huser, M., J. Lockett, A. Chiloehes, K. Mercer, M. Iwobi, S. Giblett, X. M. Sun, J. Brown, R. Marais, and C. Pritchard.** 2001. MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *Embo J* **20**:1940-51.
303. **Ikeda, M., A. Ikeda, L. C. Longan, and R. Longnecker.** 2000. The Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A PY motif recruits WW domain-containing ubiquitin-protein ligases. *Virology* **268**:178-91.
304. **Ikeda, M., A. Ikeda, and R. Longnecker.** 2002. Lysine-independent ubiquitination of Epstein-Barr virus LMP2A. *Virology* **300**:153-9.
305. **Ip, Y. T., and R. J. Davis.** 1998. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* **10**:205-19.
306. **Ishitani, T., S. Kishida, J. Hyodo-Miura, N. Ueno, J. Yasuda, M. Waterman, H. Shibuya, R. T. Moon, J. Ninomiya-Tsuji, and K. Matsumoto.** 2003. The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol* **23**:131-9.
307. **Ishitani, T., J. Ninomiya-Tsuji, S. Nagai, M. Nishita, M. Meneghini, N. Barker, M. Waterman, B. Bowerman, H. Clevers, H. Shibuya, and K. Matsumoto.** 1999. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature* **399**:798-802.
308. **Ito, M., K. Yoshioka, M. Akechi, S. Yamashita, N. Takamatsu, K. Sugiyama, M. Hibi, Y. Nakabeppu, T. Shiba, and K. I. Yamamoto.** 1999. JSAP1, a novel jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a Scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol Cell Biol* **19**:7539-48.
309. **Jacobs, D., D. Glossip, H. Xing, A. J. Muslin, and K. Kornfeld.** 1999. Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev* **13**:163-75.
310. **Jaffe, A. B., P. Aspenstrom, and A. Hall.** 2004. Human CNK1 acts as a scaffold protein, linking Rho and Ras signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* **24**:1736-46.
311. **Jaffe, A. B., and A. Hall.** 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**:247-69.
312. **Janknecht, R., W. H. Ernst, V. Pingoud, and A. Nordheim.** 1993. Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *Embo J* **12**:5097-104.
313. **Jansen, H. W., B. Ruckert, R. Lurz, and K. Bister.** 1983. Two unrelated cell-derived sequences in the genome of avian leukemia and carcinoma inducing retrovirus MH2. *Embo J* **2**:1969-75.
314. **Jariel-Encontre, I., M. Pariat, F. Martin, S. Carillo, C. Salvat, and M. Piechaczyk.** 1995. Ubiquitylation is not an absolute requirement for degradation of c-Jun protein by the 26 S proteasome. *J Biol Chem* **270**:11623-7.

315. **Jentsch, S., J. P. McGrath, and A. Varshavsky.** 1987. The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature* **329**:131-4.
316. **Jiang, F., N. P. Caraway, R. Li, and R. L. Katz.** 2005. RNA silencing of S-phase kinase-interacting protein 2 inhibits proliferation and centrosome amplification in lung cancer cells. *Oncogene* **24**:3409-18.
317. **Jiang, Y., C. Chen, Z. Li, W. Guo, J. A. Gegner, S. Lin, and J. Han.** 1996. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* **271**:17920-6.
318. **Jin, J., T. Cardozo, R. C. Lovering, S. J. Elledge, M. Pagano, and J. W. Harper.** 2004. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev* **18**:2573-80.
319. **Jin, J., T. Shirogane, L. Xu, G. Nalepa, J. Qin, S. J. Elledge, and J. W. Harper.** 2003. SCFbeta-TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Genes Dev* **17**:3062-74.
320. **Jin, Y., H. Lee, S. X. Zeng, M. S. Dai, and H. Lu.** 2003. MDM2 promotes p21waf1/cip1 proteasomal turnover independently of ubiquitylation. *Embo J* **22**:6365-77.
321. **Joazeiro, C. A., and A. M. Weissman.** 2000. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **102**:549-52.
322. **Joazeiro, C. A., S. S. Wing, H. Huang, J. D. Levenson, T. Hunter, and Y. C. Liu.** 1999. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* **286**:309-12.
323. **Johnson, E. S., B. Bartel, W. Seufert, and A. Varshavsky.** 1992. Ubiquitin as a degradation signal. *Embo J* **11**:497-505.
324. **Johnson, E. S., P. C. Ma, I. M. Ota, and A. Varshavsky.** 1995. A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem* **270**:17442-56.
325. **Johnson, L. N., M. E. Noble, and D. J. Owen.** 1996. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**:149-58.
326. **Johnson, R., B. Spiegelman, D. Hanahan, and R. Wisdom.** 1996. Cellular transformation and malignancy induced by ras require c-jun. *Mol Cell Biol* **16**:4504-11.
327. **Johnson, R. S., B. van Lingen, V. E. Papaioannou, and B. M. Spiegelman.** 1993. A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes Dev* **7**:1309-17.
328. **Johnston, S. C., C. N. Larsen, W. J. Cook, K. D. Wilkinson, and C. P. Hill.** 1997. Crystal structure of a deubiquitinating enzyme (human UCH-L3) at 1.8 Å resolution. *Embo J* **16**:3787-96.
329. **Jones, C. M., and J. C. Smith.** 1999. An overview of *Xenopus* development. *Methods Mol Biol* **97**:331-40.
330. **Joseph, J., S. H. Tan, T. S. Karpova, J. G. McNally, and M. Dasso.** 2002. SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles. *J Cell Biol* **156**:595-602.
331. **Julien, C., P. Coulombe, and S. Meloche.** 2003. Nuclear export of ERK3 by a CRM1-dependent mechanism regulates its inhibitory action on cell cycle progression. *J Biol Chem* **278**:42615-24.
332. **Kaelin, W. G., Jr.** 2005. The von Hippel-Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing. *Biochem Biophys Res Commun* **338**:627-38.

333. **Kallunki, T., T. Deng, M. Hibi, and M. Karin.** 1996. c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell* **87**:929-39.
334. **Kamakura, S., T. Moriguchi, and E. Nishida.** 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**:26563-71.
335. **Kamura, T., M. N. Conrad, Q. Yan, R. C. Conaway, and J. W. Conaway.** 1999. The Rbx1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates Rub1 modification of cullins Cdc53 and Cul2. *Genes Dev* **13**:2928-33.
336. **Kamura, T., T. Hara, M. Matsumoto, N. Ishida, F. Okumura, S. Hatakeyama, M. Yoshida, K. Nakayama, and K. I. Nakayama.** 2004. Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nat Cell Biol* **6**:1229-35.
337. **Kamura, T., D. M. Koepp, M. N. Conrad, D. Skowyra, R. J. Moreland, O. Iliopoulos, W. S. Lane, W. G. Kaelin, Jr., S. J. Elledge, R. C. Conaway, J. W. Harper, and J. W. Conaway.** 1999. Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* **284**:657-61.
338. **Kanayama, A., R. B. Seth, L. Sun, C. K. Ea, M. Hong, A. Shaito, Y. H. Chiu, L. Deng, and Z. J. Chen.** 2004. TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell* **15**:535-48.
339. **Kanei-Ishii, C., J. Ninomiya-Tsuji, J. Tanikawa, T. Nomura, T. Ishitani, S. Kishida, K. Kokura, T. Kurahashi, E. Ichikawa-Iwata, Y. Kim, K. Matsumoto, and S. Ishii.** 2004. Wnt-1 signal induces phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK. *Genes Dev* **18**:816-29.
340. **Kanei-Ishii, C., T. Nomura, J. Tanikawa, E. Ichikawa-Iwata, and S. Ishii.** 2004. Differential sensitivity of v-Myb and c-Myb to Wnt-1-induced protein degradation. *J Biol Chem* **279**:44582-9.
341. **Kannan, N., and A. F. Neuwald.** 2004. Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2alpha. *Protein Sci* **13**:2059-77.
342. **Kasler, H. G., J. Victoria, O. Duramad, and A. Winoto.** 2000. ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol* **20**:8382-9.
343. **Kato, Y., V. V. Kravchenko, R. I. Tapping, J. Han, R. J. Ulevitch, and J. D. Lee.** 1997. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *Embo J* **16**:7054-66.
344. **Kato, Y., R. I. Tapping, S. Huang, M. H. Watson, R. J. Ulevitch, and J. D. Lee.** 1998. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* **395**:713-6.
345. **Kato, Y., M. Zhao, A. Morikawa, T. Sugiyama, D. Chakravorty, N. Koide, T. Yoshida, R. I. Tapping, Y. Yang, T. Yokochi, and J. D. Lee.** 2000. Big mitogen-activated kinase regulates multiple members of the MEF2 protein family. *J Biol Chem* **275**:18534-40.
346. **Katzmann, D. J., M. Babst, and S. D. Emr.** 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**:145-55.
347. **Katzmann, D. J., G. Odorizzi, and S. D. Emr.** 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:893-905.

348. **Kawakami, Y., J. Rodriguez-Leon, C. M. Koth, D. Buscher, T. Itoh, A. Raya, J. K. Ng, C. R. Esteban, S. Takahashi, D. Henrique, M. F. Schwarz, H. Asahara, and J. C. Izpisua Belmonte.** 2003. MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb. *Nat Cell Biol* **5**:513-9.
349. **Kelkar, N., S. Gupta, M. Dickens, and R. J. Davis.** 2000. Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. *Mol Cell Biol* **20**:1030-43.
350. **Kelkar, N., C. L. Standen, and R. J. Davis.** 2005. Role of the JIP4 scaffold protein in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Mol Cell Biol* **25**:2733-43.
351. **Kesavan, K., K. Lobel-Rice, W. Sun, R. Lapadat, S. Webb, G. L. Johnson, and T. P. Garrington.** 2004. MEKK2 regulates the coordinate activation of ERK5 and JNK in response to FGF-2 in fibroblasts. *J Cell Physiol* **199**:140-8.
352. **Khokhlatchev, A. V., B. Canagarajah, J. Wilsbacher, M. Robinson, M. Atkinson, E. Goldsmith, and M. H. Cobb.** 1998. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* **93**:605-15.
353. **Kikuchi, T., M. Mukoyama, K. Yamazaki, and H. Moriya.** 1990. Axonal degeneration of ascending sensory neurons in gracile axonal dystrophy mutant mouse. *Acta Neuropathol (Berl)* **80**:145-51.
354. **Kim, A. H., H. Yano, H. Cho, D. Meyer, B. Monks, B. Margolis, M. J. Birnbaum, and M. V. Chao.** 2002. Akt1 regulates a JNK scaffold during excitotoxic apoptosis. *Neuron* **35**:697-709.
355. **Kim, J. M., M. Yamada, and H. Masai.** 2003. Functions of mammalian Cdc7 kinase in initiation/monitoring of DNA replication and development. *Mutat Res* **532**:29-40.
356. **Kim, S. H., and Y. C. Yang.** 1996. A specific association of ERK3 with B-Raf in rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* **229**:577-81.
357. **Kim, S. Y., A. Herbst, K. A. Tworowski, S. E. Salghetti, and W. P. Tansey.** 2003. Skp2 regulates Myc protein stability and activity. *Mol Cell* **11**:1177-88.
358. **Kim, Y. H., C. Y. Choi, S. J. Lee, M. A. Conti, and Y. Kim.** 1998. Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors. *J Biol Chem* **273**:25875-9.
359. **Kimura, A., K. Matsubara, and M. Horikoshi.** 2005. A decade of histone acetylation: marking eukaryotic chromosomes with specific codes. *J Biochem (Tokyo)* **138**:647-62.
360. **Kipreos, E. T., L. E. Lander, J. P. Wing, W. W. He, and E. M. Hedgecock.** 1996. cul-1 is required for cell cycle exit in *C. elegans* and identifies a novel gene family. *Cell* **85**:829-39.
361. **Kirkpatrick, D. S., C. Denison, and S. P. Gygi.** 2005. Weighing in on ubiquitin: the expanding role of mass-spectrometry-based proteomics. *Nat Cell Biol* **7**:750-7.
362. **Kishino, T., M. Lalande, and J. Wagstaff.** 1997. UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet* **15**:70-3.
363. **Kisseleva, T., S. Bhattacharya, J. Braunstein, and C. W. Schindler.** 2002. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* **285**:1-24.
364. **Kitsberg, D., E. Formstecher, M. Fauquet, M. Kubes, J. Cordier, B. Canton, G. Pan, M. Rolli, J. Glowinski, and H. Chneiweiss.** 1999. Knock-out of the neural

- death effector domain protein PEA-15 demonstrates that its expression protects astrocytes from TNF α -induced apoptosis. *J Neurosci* **19**:8244-51.
365. **Kleines, M., A. Gartner, K. Ritter, and L. Schaade.** 2000. Early steps in termination of the immortalization state in Burkitt lymphoma: induction of genes involved in signal transduction, transcription, and trafficking by the ganglioside IV(3)NeuAc-nLcOse(4)Cer. *Biochim Biophys Acta* **1492**:139-44.
366. **Kleinschmidt, J. A., B. Hugle, C. Grund, and W. W. Franke.** 1983. The 22 S cylinder particles of *Xenopus laevis*. I. Biochemical and electron microscopic characterization. *Eur J Cell Biol* **32**:143-56.
367. **Knighton, D. R., J. H. Zheng, L. F. Ten Eyck, V. A. Ashford, N. H. Xuong, S. S. Taylor, and J. M. Sowadski.** 1991. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**:407-14.
368. **Ko, B. C., A. K. Lam, A. Kapus, L. Fan, S. K. Chung, and S. S. Chung.** 2002. Fyn and p38 signaling are both required for maximal hypertonic activation of the osmotic response element-binding protein/tonicity-responsive enhancer-binding protein (OREBP/TonEBP). *J Biol Chem* **277**:46085-92.
369. **Kobe, B., and A. V. Kajava.** 2001. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* **11**:725-32.
370. **Koegl, M., T. Hoppe, S. Schlenker, H. D. Ulrich, T. U. Mayer, and S. Jentsch.** 1999. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**:635-44.
371. **Koepp, D. M., L. K. Schaefer, X. Ye, K. Keyomarsi, C. Chu, J. W. Harper, and S. J. Elledge.** 2001. Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* **294**:173-7.
372. **Kohl, A., and M. G. Grutter.** 2004. Fire and death: the pyrin domain joins the death-domain superfamily. *C R Biol* **327**:1077-86.
373. **Kohler, A., P. Cascio, D. S. Leggett, K. M. Woo, A. L. Goldberg, and D. Finley.** 2001. The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell* **7**:1143-52.
374. **Kojima, H., T. Sasaki, T. Ishitani, S. Iemura, H. Zhao, S. Kaneko, H. Kunimoto, T. Natsume, K. Matsumoto, and K. Nakajima.** 2005. STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGF β -activated kinase 1 for STAT3 Ser-727 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:4524-9.
375. **Kolch, W.** 2005. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:827-37.
376. **Kondoh, K., S. Torii, and E. Nishida.** 2005. Control of MAP kinase signaling to the nucleus. *Chromosoma* **114**:86-91.
377. **Kornfeld, K., D. B. Hom, and H. R. Horvitz.** 1995. The *ksr-1* gene encodes a novel protein kinase involved in Ras-mediated signaling in *C. elegans*. *Cell* **83**:903-13.
378. **Kortenjann, M., M. Nehls, A. J. Smith, R. Carsetti, J. Schuler, G. Kohler, and T. Boehm.** 2001. Abnormal bone marrow stroma in mice deficient for nemo-like kinase, *Nlk*. *Eur J Immunol* **31**:3580-7.
379. **Kortum, R. L., D. L. Costanzo, J. Haferbier, S. J. Schreiner, G. L. Razidlo, M. H. Wu, D. J. Volle, T. Mori, H. Sakaue, N. V. Chaika, O. V. Chaika, and R. E. Lewis.** 2005. The molecular scaffold kinase suppressor of Ras 1 (KSR1) regulates adipogenesis. *Mol Cell Biol* **25**:7592-604.

380. **Kosako, H., Y. Gotoh, S. Matsuda, M. Ishikawa, and E. Nishida.** 1992. Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *Embo J* **11**:2903-8.
381. **Kostich, M., J. English, V. Madison, F. Gheyas, L. Wang, P. Qiu, J. Greene, and T. M. Laz.** 2002. Human members of the eukaryotic protein kinase family. *Genome Biol* **3**:RESEARCH0043.
382. **Kotlyarov, A., A. Neininger, C. Schubert, R. Eckert, C. Birchmeier, H. D. Volk, and M. Gaestel.** 1999. MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF- α biosynthesis. *Nat Cell Biol* **1**:94-7.
383. **Kotlyarov, A., Y. Yannoni, S. Fritz, K. Laass, J. B. Telliez, D. Pitman, L. L. Lin, and M. Gaestel.** 2002. Distinct cellular functions of MK2. *Mol Cell Biol* **22**:4827-35.
384. **Kovalenko, A., C. Chable-Bessia, G. Cantarella, A. Israel, D. Wallach, and G. Courtois.** 2003. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* **424**:801-5.
385. **Kovalenko, D., X. Yang, R. J. Nadeau, L. K. Harkins, and R. Friesel.** 2003. Sef inhibits fibroblast growth factor signaling by inhibiting FGFR1 tyrosine phosphorylation and subsequent ERK activation. *J Biol Chem* **278**:14087-91.
386. **Krappmann, D., F. G. Wulczyn, and C. Scheidereit.** 1996. Different mechanisms control signal-induced degradation and basal turnover of the NF-kappaB inhibitor I κ B α in vivo. *Embo J* **15**:6716-26.
387. **Krebs, E. G., and E. H. Fischer.** 1956. The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* **20**:150-7.
388. **Kriwacki, R. W., L. Hengst, L. Tennant, S. I. Reed, and P. E. Wright.** 1996. Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11504-9.
389. **Kroll, M., F. Arenzana-Seisdedos, F. Bachelier, D. Thomas, B. Friguet, and M. Conconi.** 1999. The secondary fungal metabolite gliotoxin targets proteolytic activities of the proteasome. *Chem Biol* **6**:689-98.
390. **Krueger, J., F. L. Chou, A. Glading, E. Schaefer, and M. H. Ginsberg.** 2005. Phosphorylation of phosphoprotein enriched in astrocytes (PEA-15) regulates extracellular signal-regulated kinase-dependent transcription and cell proliferation. *Mol Biol Cell* **16**:3552-61.
391. **Kuan, C. Y., A. J. Whitmarsh, D. D. Yang, G. Liao, A. J. Schloemer, C. Dong, J. Bao, K. J. Banasiak, G. G. Haddad, R. A. Flavell, R. J. Davis, and P. Rakic.** 2003. A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:15184-9.
392. **Kuan, C. Y., D. D. Yang, D. R. Samanta Roy, R. J. Davis, P. Rakic, and R. A. Flavell.** 1999. The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* **22**:667-76.
393. **Kudo, Y., D. Guardavaccaro, P. G. Santamaria, R. Koyama-Nasu, E. Latres, R. Bronson, L. Yamasaki, and M. Pagano.** 2004. Role of F-box protein betaTrcp1 in mammary gland development and tumorigenesis. *Mol Cell Biol* **24**:8184-94.
394. **Kuhne, C., and L. Banks.** 1998. E3-ubiquitin ligase/E6-AP links multicopy maintenance protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, the L2G box. *J Biol Chem* **273**:34302-9.

395. **Kumar, S., A. L. Talis, and P. M. Howley.** 1999. Identification of HHR23A as a substrate for E6-associated protein-mediated ubiquitination. *J Biol Chem* **274**:18785-92.
396. **Kuo, M. L., W. den Besten, D. Bertwistle, M. F. Roussel, and C. J. Sherr.** 2004. N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor. *Genes Dev* **18**:1862-74.
397. **Kuo, W. L., C. J. Duke, M. K. Abe, E. L. Kaplan, S. Gomes, and M. R. Rosner.** 2004. ERK7 expression and kinase activity is regulated by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **279**:23073-81.
398. **Kwon, Y. T., A. S. Kashina, I. V. Davydov, R. G. Hu, J. Y. An, J. W. Seo, F. Du, and A. Varshavsky.** 2002. An essential role of N-terminal arginylation in cardiovascular development. *Science* **297**:96-9.
399. **Kwon, Y. T., Z. Xia, J. Y. An, T. Tasaki, I. V. Davydov, J. W. Seo, J. Sheng, Y. Xie, and A. Varshavsky.** 2003. Female lethality and apoptosis of spermatocytes in mice lacking the UBR2 ubiquitin ligase of the N-end rule pathway. *Mol Cell Biol* **23**:8255-71.
400. **Kwon, Y. T., Z. Xia, I. V. Davydov, S. H. Lecker, and A. Varshavsky.** 2001. Construction and analysis of mouse strains lacking the ubiquitin ligase UBR1 (E3 α) of the N-end rule pathway. *Mol Cell Biol* **21**:8007-21.
401. **Kyriakis, J. M., and J. Avruch.** 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**:807-69.
402. **Kyriakis, J. M., and J. Avruch.** 1990. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem* **265**:17355-63.
403. **Kyriakis, J. M., P. Banerjee, E. Nikolakaki, T. Dai, E. A. Rubie, M. F. Ahmad, J. Avruch, and J. R. Woodgett.** 1994. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**:156-60.
404. **Laberge, G., M. Douziech, and M. Therrien.** 2005. Src42 binding activity regulates *Drosophila* RAF by a novel CNK-dependent derepression mechanism. *Embo J* **24**:487-98.
405. **Lake, M. W., M. M. Wuebbens, K. V. Rajagopalan, and H. Schindelin.** 2001. Mechanism of ubiquitin activation revealed by the structure of a bacterial MoeB-MoaD complex. *Nature* **414**:325-9.
406. **Laman, H., J. M. Funes, H. Ye, S. Henderson, L. Galinanes-Garcia, E. Hara, P. Knowles, N. McDonald, and C. Boshoff.** 2005. Transforming activity of Fbxo7 is mediated specifically through regulation of cyclin D/cdk6. *Embo J* **24**:3104-16.
407. **Lanigan, T. M., A. Liu, Y. Z. Huang, L. Mei, B. Margolis, and K. L. Guan.** 2003. Human homologue of *Drosophila* CNK interacts with Ras effector proteins Raf and Rlf. *Faseb J* **17**:2048-60.
408. **Larsen, C. N., and D. Finley.** 1997. Protein translocation channels in the proteasome and other proteases. *Cell* **91**:431-4.
409. **Larsen, C. N., B. A. Krantz, and K. D. Wilkinson.** 1998. Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochemistry* **37**:3358-68.
410. **Lasa, M., K. R. Mahtani, A. Finch, G. Brewer, J. Saklatvala, and A. R. Clark.** 2000. Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. *Mol Cell Biol* **20**:4265-74.

411. **Latres, E., R. Chiarle, B. A. Schulman, N. P. Pavletich, A. Pellicer, G. Inghirami, and M. Pagano.** 2001. Role of the F-box protein Skp2 in lymphomagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:2515-20.
412. **Lawler, S., Y. Fleming, M. Goedert, and P. Cohen.** 1998. Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Curr Biol* **8**:1387-90.
413. **Lechner, C., M. A. Zahalka, J. F. Giot, N. P. Moller, and A. Ullrich.** 1996. ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:4355-9.
414. **Lee, C. M., D. Onesime, C. D. Reddy, N. Dhanasekaran, and E. P. Reddy.** 2002. JLP: A scaffolding protein that tethers JNK/p38MAPK signaling modules and transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:14189-94.
415. **Lee, E. G., D. L. Boone, S. Chai, S. L. Libby, M. Chien, J. P. Lodolce, and A. Ma.** 2000. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* **289**:2350-4.
416. **Lee, J. C., J. T. Laydon, P. C. McDonnell, T. F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M. J. Blumenthal, J. R. Heys, S. W. Landvatter, and et al.** 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **372**:739-46.
417. **Lee, J. D., R. J. Ulevitch, and J. Han.** 1995. Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **213**:715-24.
418. **Lee, K., and W. J. Esselman.** 2002. Inhibition of PTPs by H(2)O(2) regulates the activation of distinct MAPK pathways. *Free Radic Biol Med* **33**:1121-32.
419. **Lee, T., A. N. Hoofnagle, Y. Kabuyama, J. Stroud, X. Min, E. J. Goldsmith, L. Chen, K. A. Resing, and N. G. Ahn.** 2004. Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Mol Cell* **14**:43-55.
420. **Lee, T. H., K. Perrem, J. W. Harper, K. P. Lu, and X. Z. Zhou.** 2006. The F-box protein FBX4 targets PIN2/TRF1 for ubiquitin-mediated degradation and regulates telomere maintenance. *J Biol Chem* **281**:759-68.
421. **Leever, S. J., and C. J. Marshall.** 1992. Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK2, by p21ras oncoprotein. *Embo J* **11**:569-74.
422. **Leever, S. J., H. F. Paterson, and C. J. Marshall.** 1994. Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* **369**:411-4.
423. **Lei, K., A. Nimnual, W. X. Zong, N. J. Kennedy, R. A. Flavell, C. B. Thompson, D. Bar-Sagi, and R. J. Davis.** 2002. The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol Cell Biol* **22**:4929-42.
424. **Lenormand, P., J. M. Brondello, A. Brunet, and J. Pouyssegur.** 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**:625-33.
425. **Lenormand, P., C. Sardet, G. Pages, G. L'Allemain, A. Brunet, and J. Pouyssegur.** 1993. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol* **122**:1079-88.
426. **Leroy, E., R. Boyer, G. Auburger, B. Leube, G. Ulm, E. Mezey, G. Harta, M. J. Brownstein, S. Jonnalagada, T. Chernova, A. Dehejia, C. Lavedan, T. Gasser, P. J. Steinbach, K. D. Wilkinson, and M. H. Polymeropoulos.** 1998. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* **395**:451-2.

427. **Levkowitz, G., H. Waterman, S. A. Ettenberg, M. Katz, A. Y. Tsygankov, I. Alroy, S. Lavi, K. Iwai, Y. Reiss, A. Ciechanover, S. Lipkowitz, and Y. Yarden.** 1999. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* **4**:1029-40.
428. **Ley, R., K. Balmanno, K. Hadfield, C. Weston, and S. J. Cook.** 2003. Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J Biol Chem* **278**:18811-6.
429. **Ley, R., K. Hadfield, E. Howes, and S. J. Cook.** 2005. Identification of a DEF-type docking domain for extracellular signal-regulated kinases 1/2 that directs phosphorylation and turnover of the BH3-only protein BimEL. *J Biol Chem* **280**:17657-63.
430. **Li, J., A. M. Pauley, R. L. Myers, R. Shuang, J. R. Brashler, R. Yan, A. E. Buhl, C. Ruble, and M. E. Gurney.** 2002. SEL-10 interacts with presenilin 1, facilitates its ubiquitination, and alters A-beta peptide production. *J Neurochem* **82**:1540-8.
431. **Li, M., C. L. Brooks, F. Wu-Baer, D. Chen, R. Baer, and W. Gu.** 2003. Mono-versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* **302**:1972-5.
432. **Li, S. J., and M. Hochstrasser.** 2000. The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein. *Mol Cell Biol* **20**:2367-77.
433. **Li, W., M. Han, and K. L. Guan.** 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.
434. **Lim, Y. M., K. Nishizawa, Y. Nishi, L. Tsuda, Y. H. Inoue, and Y. Nishida.** 1999. Genetic analysis of rolled, which encodes a Drosophila mitogen-activated protein kinase. *Genetics* **153**:763-71.
435. **Lima, C. D.** 2003. Regulating UBP-mediated ubiquitin deconjugation. *Structure* **11**:3-4.
436. **Lin, Q., J. Schwarz, C. Bucana, and E. N. Olson.** 1997. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* **276**:1404-7.
437. **Lin, R., R. J. Hill, and J. R. Priess.** 1998. POP-1 and anterior-posterior fate decisions in *C. elegans* embryos. *Cell* **92**:229-39.
438. **Lin, X., B. Sun, M. Liang, Y. Y. Liang, A. Gast, J. Hildebrand, F. C. Brunicardi, F. Melchior, and X. H. Feng.** 2003. Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Mol Cell* **11**:1389-96.
439. **Liu, C. W., M. J. Corboy, G. N. DeMartino, and P. J. Thomas.** 2003. Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science* **299**:408-11.
440. **Liu, L., J. E. Cavanaugh, Y. Wang, H. Sakagami, Z. Mao, and Z. Xia.** 2003. ERK5 activation of MEF2-mediated gene expression plays a critical role in BDNF-promoted survival of developing but not mature cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:8532-7.
441. **Lohi, O., and V. P. Lehto.** 2001. STAM/EAST/Hbp adapter proteins--integrators of signalling pathways. *FEBS Lett* **508**:287-90.
442. **Lorick, K. L., J. P. Jensen, S. Fang, A. M. Ong, S. Hatakeyama, and A. M. Weissman.** 1999. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:11364-9.

443. **Lovering, R., I. M. Hanson, K. L. Borden, S. Martin, N. J. O'Reilly, G. I. Evan, D. Rahman, D. J. Pappin, J. Trowsdale, and P. S. Freemont.** 1993. Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:2112-6.
444. **Lowe, J., D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, and R. Huber.** 1995. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**:533-9.
445. **Lowenstein, E. J., R. J. Daly, A. G. Batzer, W. Li, B. Margolis, R. Lammers, A. Ullrich, E. Y. Skolnik, D. Bar-Sagi, and J. Schlessinger.** 1992. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* **70**:431-42.
446. **Lozano, J., R. Xing, Z. Cai, H. L. Jensen, C. Trempus, W. Mark, R. Cannon, and R. Kolesnick.** 2003. Deficiency of kinase suppressor of Ras1 prevents oncogenic ras signaling in mice. *Cancer Res* **63**:4232-8.
447. **Lu, H. T., D. D. Yang, M. Wusk, E. Gatti, I. Mellman, R. J. Davis, and R. A. Flavell.** 1999. Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *Embo J* **18**:1845-57.
448. **Lu, K. P., and T. Hunter.** 1995. Evidence for a NIMA-like mitotic pathway in vertebrate cells. *Cell* **81**:413-24.
449. **Lu, Z., S. Xu, C. Joazeiro, M. H. Cobb, and T. Hunter.** 2002. The PHD domain of MEKK1 acts as an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2. *Mol Cell* **9**:945-56.
450. **Lupas, A., A. J. Koster, and W. Baumeister.** 1993. Structural features of 26S and 20S proteasomes. *Enzyme Protein* **47**:252-73.
451. **Lyapina, S., G. Cope, A. Shevchenko, G. Serino, T. Tsuge, C. Zhou, D. A. Wolf, N. Wei, A. Shevchenko, and R. J. Deshaies.** 2001. Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science* **292**:1382-5.
452. **Ma, L., Z. Chen, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and P. P. Pandolfi.** 2005. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* **121**:179-93.
453. **MacKeigan, J. P., L. O. Murphy, and J. Blenis.** 2005. Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol* **7**:591-600.
454. **Maeda, D., M. Seki, F. Onoda, D. Brnzei, Y. Kawabe, and T. Enomoto.** 2004. Ubc9 is required for damage-tolerance and damage-induced interchromosomal homologous recombination in *S. cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* **3**:335-41.
455. **Mahajan, R., C. Delphin, T. Guan, L. Gerace, and F. Melchior.** 1997. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* **88**:97-107.
456. **Majka, J., and P. M. Burgers.** 2004. The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **78**:227-60.
457. **Makarova, K. S., L. Aravind, and E. V. Koonin.** 2000. A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and *Chlamydia pneumoniae*. *Trends Biochem Sci* **25**:50-2.
458. **Maki, C. G., and P. M. Howley.** 1997. Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol Cell Biol* **17**:355-63.
459. **Mandl, M., D. N. Slack, and S. M. Keyse.** 2005. Specific inactivation and nuclear anchoring of extracellular signal-regulated kinase 2 by the inducible dual-specificity protein phosphatase DUSP5. *Mol Cell Biol* **25**:1830-45.

460. **Mani, A., and E. P. Gelmann.** 2005. The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol* **23**:4776-89.
461. **Manning, A. M., and R. J. Davis.** 2003. Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat Rev Drug Discov* **2**:554-65.
462. **Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, and S. Sudarsanam.** 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**:1912-34.
463. **Mansour, S. J., W. T. Matten, A. S. Hermann, J. M. Candia, S. Rong, K. Fukasawa, G. F. Vande Woude, and N. G. Ahn.** 1994. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* **265**:966-70.
464. **Mao, J. H., J. Perez-Losada, D. Wu, R. Delrosario, R. Tsunematsu, K. I. Nakayama, K. Brown, S. Bryson, and A. Balmain.** 2004. Fbxw7/Cdc4 is a p53-dependent, haploinsufficient tumour suppressor gene. *Nature* **432**:775-9.
465. **Marais, R., Y. Light, H. F. Paterson, C. S. Mason, and C. J. Marshall.** 1997. Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem* **272**:4378-83.
466. **Marchetti, S., C. Gimond, J. C. Chambard, T. Touboul, D. Roux, J. Pouyssegur, and G. Pages.** 2005. Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogen-activated protein kinase phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation. *Mol Cell Biol* **25**:854-64.
467. **Marx, A., J. Muller, and E. Mandelkow.** 2005. The structure of microtubule motor proteins. *Adv Protein Chem* **71**:299-344.
468. **Masuda, K., H. Shima, C. Katagiri, and K. Kikuchi.** 2003. Activation of ERK induces phosphorylation of MAPK phosphatase-7, a JNK specific phosphatase, at Ser-446. *J Biol Chem* **278**:32448-56.
469. **Matheny, S. A., C. Chen, R. L. Kortum, G. L. Razidlo, R. E. Lewis, and M. A. White.** 2004. Ras regulates assembly of mitogenic signalling complexes through the effector protein IMP. *Nature* **427**:256-60.
470. **Mathias, N., S. L. Johnson, M. Winey, A. E. Adams, L. Goetsch, J. R. Pringle, B. Byers, and M. G. Goebel.** 1996. Cdc53p acts in concert with Cdc4p and Cdc34p to control the G1-to-S-phase transition and identifies a conserved family of proteins. *Mol Cell Biol* **16**:6634-43.
471. **Matsubayashi, Y., M. Fukuda, and E. Nishida.** 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**:41755-60.
472. **Matsuda, S., T. Yasukawa, Y. Homma, Y. Ito, T. Niikura, T. Hiraki, S. Hirai, S. Ohno, Y. Kita, M. Kawasumi, K. Kouyama, T. Yamamoto, J. M. Kyriakis, and I. Nishimoto.** 2001. c-Jun N-terminal kinase (JNK)-interacting protein-1b/islet-brain-1 scaffolds Alzheimer's amyloid precursor protein with JNK. *J Neurosci* **21**:6597-607.
473. **Matsufuji, S., T. Matsufuji, Y. Miyazaki, Y. Murakami, J. F. Atkins, R. F. Gesteland, and S. Hayashi.** 1995. Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian ornithine decarboxylase antizyme. *Cell* **80**:51-60.
474. **Matsuguchi, T., A. Masuda, K. Sugimoto, Y. Nagai, and Y. Yoshikai.** 2003. JNK-interacting protein 3 associates with Toll-like receptor 4 and is involved in LPS-mediated JNK activation. *Embo J* **22**:4455-64.
475. **Matunis, M. J., E. Coutavas, and G. Blobel.** 1996. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein

- RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **135**:1457-70.
476. **Maytal-Kivity, V., N. Reis, K. Hofmann, and M. H. Glickman.** 2002. MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function. *BMC Biochem* **3**:28.
477. **Mazzucchelli, C., C. Vantaggiato, A. Ciamei, S. Fasano, P. Pakhotin, W. Krezel, H. Welzl, D. P. Wolfer, G. Pages, O. Valverde, A. Marowsky, A. Porrazzo, P. C. Orban, R. Maldonado, M. U. Ehrengruber, V. Cestari, H. P. Lipp, P. F. Chapman, J. Pouyssegur, and R. Brambilla.** 2002. Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* **34**:807-20.
478. **McDonough, H., and C. Patterson.** 2003. CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress Chaperones* **8**:303-8.
479. **McGrath, J. P., S. Jentsch, and A. Varshavsky.** 1991. UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *Embo J* **10**:227-36.
480. **McGuire, M. J., M. L. McCullough, D. E. Croall, and G. N. DeMartino.** 1989. The high molecular weight multicatalytic proteinase, macropain, exists in a latent form in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* **995**:181-6.
481. **Mehta, P. B., B. L. Jenkins, L. McCarthy, L. Thilak, C. N. Robson, D. E. Neal, and H. Y. Leung.** 2003. MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion. *Oncogene* **22**:1381-9.
482. **Meloche, S., B. G. Beatty, and J. Pellerin.** 1996. Primary structure, expression and chromosomal locus of a human homolog of rat ERK3. *Oncogene* **13**:1575-9.
483. **Meloche, S., B. Turgeon, P. Coulombe and G. Rodier.** 2004. The atypical ERK3 subfamily of mitogen-activated protein kinases. In: Pandalai SG, ed. *Recent Research Developments in Cell Biology 1*. Kerala: Transworld Research Network, 71-81.
484. **Meneghini, M. D., T. Ishitani, J. C. Carter, N. Hisamoto, J. Ninomiya-Tsuji, C. J. Thorpe, D. R. Hamill, K. Matsumoto, and B. Bowerman.** 1999. MAP kinase and Wnt pathways converge to downregulate an HMG-domain repressor in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **399**:793-7.
485. **Meraldi, P., R. Honda, and E. A. Nigg.** 2002. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *Embo J* **21**:483-92.
486. **Meyer, D., A. Liu, and B. Margolis.** 1999. Interaction of c-Jun amino-terminal kinase interacting protein-1 with p190 rhoGEF and its localization in differentiated neurons. *J Biol Chem* **274**:35113-8.
487. **Meyer, H. H., Y. Wang, and G. Warren.** 2002. Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. *Embo J* **21**:5645-52.
488. **Michael, D., and M. Oren.** 2003. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol* **13**:49-58.
489. **Michaloglou, C., L. C. Vredeveld, M. S. Soengas, C. Denoyelle, T. Kuilman, C. M. van der Horst, D. M. Majoor, J. W. Shay, W. J. Mooi, and D. S. Peeper.** 2005. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**:720-4.

490. **Ming, X. F., G. Stoecklin, M. Lu, R. Looser, and C. Moroni.** 2001. Parallel and independent regulation of interleukin-3 mRNA turnover by phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* **21**:5778-89.
491. **Mirkovic, I., K. Charish, S. M. Gorski, K. McKnight, and E. M. Verheyen.** 2002. *Drosophila nemo* is an essential gene involved in the regulation of programmed cell death. *Mech Dev* **119**:9-20.
492. **Miyoshi, J., T. Higashi, H. Mukai, T. Ohuchi, and T. Kakunaga.** 1991. Structure and transforming potential of the human cot oncogene encoding a putative protein kinase. *Mol Cell Biol* **11**:4088-96.
493. **Mizushima, T., T. Hirao, Y. Yoshida, S. J. Lee, T. Chiba, K. Iwai, Y. Yamaguchi, K. Kato, T. Tsukihara, and K. Tanaka.** 2004. Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase. *Nat Struct Mol Biol* **11**:365-70.
494. **Moberg, K. H., D. W. Bell, D. C. Wahrer, D. A. Haber, and I. K. Hariharan.** 2001. Archipelago regulates Cyclin E levels in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Nature* **413**:311-6.
495. **Mody, N., J. Leitch, C. Armstrong, J. Dixon, and P. Cohen.** 2001. Effects of MAP kinase cascade inhibitors on the MKK5/ERK5 pathway. *FEBS Lett* **502**:21-4.
496. **Molkentin, J. D., B. L. Black, J. F. Martin, and E. N. Olson.** 1995. Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* **83**:1125-36.
497. **Montagnoli, A., F. Fiore, E. Eytan, A. C. Carrano, G. F. Draetta, A. Hershko, and M. Pagano.** 1999. Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* **13**:1181-9.
498. **Moriguchi, T., N. Kuroyanagi, K. Yamaguchi, Y. Gotoh, K. Irie, T. Kano, K. Shirakabe, Y. Muro, H. Shibuya, K. Matsumoto, E. Nishida, and M. Hagiwara.** 1996. A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J Biol Chem* **271**:13675-9.
499. **Moriguchi, T., F. Toyoshima, Y. Gotoh, A. Iwamatsu, K. Irie, E. Mori, N. Kuroyanagi, M. Hagiwara, K. Matsumoto, and E. Nishida.** 1996. Purification and identification of a major activator for p38 from osmotically shocked cells. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase 6 by osmotic shock, tumor necrosis factor- α , and H₂O₂. *J Biol Chem* **271**:26981-8.
500. **Morris, J. R., and E. Solomon.** 2004. BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Hum Mol Genet* **13**:807-17.
501. **Morrison, D. K.** 2001. KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? *J Cell Sci* **114**:1609-12.
502. **Morrison, D. K., and R. J. Davis.** 2003. Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**:91-118.
503. **Mosesson, Y., K. Shtiegman, M. Katz, Y. Zwang, G. Vereb, J. Szollosi, and Y. Yarden.** 2003. Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. *J Biol Chem* **278**:21323-6.
504. **Moshe, Y., J. Boulaire, M. Pagano, and A. Hershko.** 2004. Role of Polo-like kinase in the degradation of early mitotic inhibitor 1, a regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:7937-42.
505. **Mourey, R. J., Q. C. Vega, J. S. Campbell, M. P. Wenderoth, S. D. Hauschka, E. G. Krebs, and J. E. Dixon.** 1996. A novel cytoplasmic dual specificity protein tyrosine phosphatase implicated in muscle and neuronal differentiation. *J Biol Chem* **271**:3795-802.

506. **Muda, M., U. Boschert, A. Smith, B. Antonsson, C. Gillieron, C. Chabert, M. Camps, I. Martinou, A. Ashworth, and S. Arkinstall.** 1997. Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4. *J Biol Chem* **272**:5141-51.
507. **Muda, M., A. Theodosiou, C. Gillieron, A. Smith, C. Chabert, M. Camps, U. Boschert, N. Rodrigues, K. Davies, A. Ashworth, and S. Arkinstall.** 1998. The mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 N-terminal noncatalytic region is responsible for tight substrate binding and enzymatic specificity. *J Biol Chem* **273**:9323-9.
508. **Muller, J., S. Ory, T. Copeland, H. Piwnica-Worms, and D. K. Morrison.** 2001. C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. *Mol Cell* **8**:983-93.
509. **Mulloy, R., S. Salinas, A. Philips, and R. A. Hipskind.** 2003. Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade. *Oncogene* **22**:5387-98.
510. **Munoz, J. J., C. Tarrega, C. Blanco-Aparicio, and R. Pulido.** 2003. Differential interaction of the tyrosine phosphatases PTP-SL, STEP and HePTP with the mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and p38alpha is determined by a kinase specificity sequence and influenced by reducing agents. *Biochem J* **372**:193-201.
511. **Myung, J., K. B. Kim, and C. M. Crews.** 2001. The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med Res Rev* **21**:245-73.
512. **Nakamura, K., and G. L. Johnson.** 2003. PB1 domains of MEKK2 and MEKK3 interact with the MEK5 PB1 domain for activation of the ERK5 pathway. *J Biol Chem* **278**:36989-92.
513. **Nakayama, K., H. Nagahama, Y. A. Minamishima, M. Matsumoto, I. Nakamichi, K. Kitagawa, M. Shirane, R. Tsunematsu, T. Tsukiyama, N. Ishida, M. Kitagawa, K. Nakayama, and S. Hatakeyama.** 2000. Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *Embo J* **19**:2069-81.
514. **Nash, P., X. Tang, S. Orlicky, Q. Chen, F. B. Gertler, M. D. Mendenhall, F. Sicheri, T. Pawson, and M. Tyers.** 2001. Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature* **414**:514-21.
515. **Nassar, N., G. Horn, C. Herrmann, A. Scherer, F. McCormick, and A. Wittinghofer.** 1995. The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature* **375**:554-60.
516. **Nateri, A. S., L. Riera-Sans, C. Da Costa, and A. Behrens.** 2004. The ubiquitin ligase SCFFbw7 antagonizes apoptotic JNK signaling. *Science* **303**:1374-8.
517. **Neufeld, T. P.** 2003. Body building: regulation of shape and size by PI3K/TOR signaling during development. *Mech Dev* **120**:1283-96.
518. **New, L., Y. Jiang, M. Zhao, K. Liu, W. Zhu, L. J. Flood, Y. Kato, G. C. Parry, and J. Han.** 1998. PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *Embo J* **17**:3372-84.
519. **Nguyen, A., W. R. Burack, J. L. Stock, R. Kortum, O. V. Chaika, M. Afkarian, W. J. Muller, K. M. Murphy, D. K. Morrison, R. E. Lewis, J. McNeish, and A. S. Shaw.** 2002. Kinase suppressor of Ras (KSR) is a scaffold which facilitates mitogen-activated protein kinase activation in vivo. *Mol Cell Biol* **22**:3035-45.
520. **Nguyen, T. T., J. C. Scimeca, C. Filloux, P. Peraldi, J. L. Carpentier, and E. Van Obberghen.** 1993. Co-regulation of the mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1, and the 90-kDa ribosomal S6 kinase in PC12

- cells. Distinct effects of the neurotrophic factor, nerve growth factor, and the mitogenic factor, epidermal growth factor. *J Biol Chem* **268**:9803-10.
521. **Nigg, E. A., P. Gallant, and W. Krek.** 1992. Regulation of p34cdc2 protein kinase activity by phosphorylation and cyclin binding. *Ciba Found Symp* **170**:72-84; discussion 84-96.
522. **Nishikawa, H., S. Ooka, K. Sato, K. Arima, J. Okamoto, R. E. Klevit, M. Fukuda, and T. Ohta.** 2004. Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **279**:3916-24.
523. **Nishimoto, S., M. Kusakabe, and E. Nishida.** 2005. Requirement of the MEK5-ERK5 pathway for neural differentiation in *Xenopus* embryonic development. *EMBO Rep* **6**:1064-9.
524. **Nishimoto, T., T. Takahashi, and C. Basilico.** 1980. A temperature-sensitive mutation affecting S-phase progression can lead to accumulation of cells with a G2 DNA content. *Somatic Cell Genet* **6**:465-76.
525. **Nishitani, H., H. Goto, S. Kaneda, F. Yamao, T. Seno, P. Handley, A. L. Schwartz, and T. Nishimoto.** 1992. tsBN75 and tsBN423, temperature-sensitive x-linked mutants of the BHK21 cell line, can be complemented by the ubiquitin-activating enzyme E1 cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* **184**:1015-21.
526. **Nolen, B., C. Y. Yun, C. F. Wong, J. A. McCammon, X. D. Fu, and G. Ghosh.** 2001. The structure of Sky1p reveals a novel mechanism for constitutive activity. *Nat Struct Biol* **8**:176-83.
527. **O'Neill, E., L. Rushworth, M. Baccarini, and W. Kolch.** 2004. Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. *Science* **306**:2267-70.
528. **Oberg, C., J. Li, A. Pauley, E. Wolf, M. Gurney, and U. Lendahl.** 2001. The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J Biol Chem* **276**:35847-53.
529. **Oda, H., S. Kumar, and P. M. Howley.** 1999. Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6AP-mediated ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:9557-62.
530. **Ohh, M., W. Y. Kim, J. J. Moslehi, Y. Chen, V. Chau, M. A. Read, and W. G. Kaelin, Jr.** 2002. An intact NEDD8 pathway is required for Cullin-dependent ubiquitylation in mammalian cells. *EMBO Rep* **3**:177-82.
531. **Ohi, M. D., C. W. Vander Kooi, J. A. Rosenberg, W. J. Chazin, and K. L. Gould.** 2003. Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. *Nat Struct Biol* **10**:250-5.
532. **Ohkawara, B., K. Shirakabe, J. Hyodo-Miura, R. Matsuo, N. Ueno, K. Matsumoto, and H. Shibuya.** 2004. Role of the TAK1-NLK-STAT3 pathway in TGF-beta-mediated mesoderm induction. *Genes Dev* **18**:381-6.
533. **Ohren, J. F., H. Chen, A. Pavlovsky, C. Whitehead, E. Zhang, P. Kuffa, C. Yan, P. McConnell, C. Spessard, C. Banotai, W. T. Mueller, A. Delaney, C. Omer, J. Sebolt-Leopold, D. T. Dudley, I. K. Leung, C. Flamme, J. Warmus, M. Kaufman, S. Barrett, H. Tecle, and C. A. Hasemann.** 2004. Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol* **11**:1192-7.
534. **Ohtakara, K., M. Nishizawa, I. Izawa, Y. Hata, S. Matsushima, W. Taki, H. Inada, Y. Takai, and M. Inagaki.** 2002. Densin-180, a synaptic protein, links to PSD-95 through its direct interaction with MAGUI-1. *Genes Cells* **7**:1149-60.

535. **Okazaki, K., and N. Sagata.** 1995. The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells. *Embo J* **14**:5048-59.
536. **Omura, S., T. Fujimoto, K. Otaguro, K. Matsuzaki, R. Moriguchi, H. Tanaka, and Y. Sasaki.** 1991. Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells. *J Antibiot (Tokyo)* **44**:113-6.
537. **Orlicky, S., X. Tang, A. Willems, M. Tyers, and F. Sicheri.** 2003. Structural basis for phosphodependent substrate selection and orientation by the SCFCdc4 ubiquitin ligase. *Cell* **112**:243-56.
538. **Orlowski, M.** 1990. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry* **29**:10289-97.
539. **Ortega, S., M. Malumbres, and M. Barbacid.** 2002. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1602**:73-87.
540. **Ory, S., and D. K. Morrison.** 2004. Signal transduction: implications for Ras-dependent ERK signaling. *Curr Biol* **14**:R277-8.
541. **Ory, S., M. Zhou, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, and D. K. Morrison.** 2003. Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. *Curr Biol* **13**:1356-64.
542. **Osaka, F., M. Saeki, S. Katayama, N. Aida, E. A. Toh, K. Kominami, T. Toda, T. Suzuki, T. Chiba, K. Tanaka, and S. Kato.** 2000. Covalent modifier NEDD8 is essential for SCF ubiquitin-ligase in fission yeast. *Embo J* **19**:3475-84.
543. **Osaka, H., Y. L. Wang, K. Takada, S. Takizawa, R. Setsuie, H. Li, Y. Sato, K. Nishikawa, Y. J. Sun, M. Sakurai, T. Harada, Y. Hara, I. Kimura, S. Chiba, K. Namikawa, H. Kiyama, M. Noda, S. Aoki, and K. Wada.** 2003. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum Mol Genet* **12**:1945-58.
544. **Ota, I. M., and A. Varshavsky.** 1992. A gene encoding a putative tyrosine phosphatase suppresses lethality of an N-end rule-dependent mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:2355-9.
545. **Paez, J., and W. R. Sellers.** 2003. PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling. *Cancer Treat Res* **115**:145-67.
546. **Pagano, M.** 2004. Control of DNA synthesis and mitosis by the Skp2-p27-Cdk1/2 axis. *Mol Cell* **14**:414-6.
547. **Pages, G., S. Guerin, D. Grall, F. Bonino, A. Smith, F. Anjuere, P. Auberger, and J. Pouyssegur.** 1999. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* **286**:1374-7.
548. **Pages, G., P. Lenormand, G. L'Allemain, J. C. Chambard, S. Meloche, and J. Pouyssegur.** 1993. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:8319-23.
549. **Palombella, V. J., E. M. Conner, J. W. Fuseler, A. Destree, J. M. Davis, F. S. Laroux, R. E. Wolf, J. Huang, S. Brand, P. J. Elliott, D. Lazarus, T. McCormack, L. Parent, R. Stein, J. Adams, and M. B. Grisham.** 1998. Role of the proteasome and NF-kappaB in streptococcal cell wall-induced polyarthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:15671-6.
550. **Pamer, E., and P. Cresswell.** 1998. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* **16**:323-58.
551. **Papkoff, J., I. M. Verma, and T. Hunter.** 1982. Detection of a transforming gene product in cells transformed by Moloney murine sarcoma virus. *Cell* **29**:417-26.

552. **Patschinsky, T., and K. Bister.** 1988. Structural analysis of normal and transforming *mil(raf)* proteins: effect of 5'-truncation on phosphorylation in vivo or in vitro. *Oncogene* **3**:357-64.
553. **Pearson, G., J. M. English, M. A. White, and M. H. Cobb.** 2001. ERK5 and ERK2 cooperate to regulate NF-kappaB and cell transformation. *J Biol Chem* **276**:7927-31.
554. **Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, and M. H. Cobb.** 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**:153-83.
555. **Peng, J., D. Schwartz, J. E. Elias, C. C. Thoreen, D. Cheng, G. Marsischky, J. Roelofs, D. Finley, and S. P. Gygi.** 2003. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* **21**:921-6.
556. **Persson, B., C. Flinta, G. von Heijne, and H. Jornvall.** 1985. Structures of N-terminally acetylated proteins. *Eur J Biochem* **152**:523-7.
557. **Peters, J. M.** 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* **9**:931-43.
558. **Peters, J. M., W. W. Franke, and J. A. Kleinschmidt.** 1994. Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* **269**:7709-18.
559. **Peterson, C. L., and M. A. Laniel.** 2004. Histones and histone modifications. *Curr Biol* **14**:R546-51.
560. **Petroski, M. D., and R. J. Deshaies.** 2003. Context of multiubiquitin chain attachment influences the rate of Sic1 degradation. *Mol Cell* **11**:1435-44.
561. **Petroski, M. D., and R. J. Deshaies.** 2005. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:9-20.
562. **Pi, X., C. Yan, and B. C. Berk.** 2004. Big mitogen-activated protein kinase (BMK1)/ERK5 protects endothelial cells from apoptosis. *Circ Res* **94**:362-9.
563. **Pickart, C. M.** 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**:503-33.
564. **Pickart, C. M., and M. J. Eddins.** 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1695**:55-72.
565. **Pickart, C. M., and D. Fushman.** 2004. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* **8**:610-6.
566. **Pickart, C. M., and I. A. Rose.** 1986. Mechanism of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. Borohydride and hydroxylamine inactivate in the presence of ubiquitin. *J Biol Chem* **261**:10210-7.
567. **Pines, J.** 1996. Cell cycle: reaching for a role for the Cks proteins. *Curr Biol* **6**:1399-402.
568. **Piva, R., J. Liu, R. Chiarle, A. Podda, M. Pagano, and G. Inghirami.** 2002. In vivo interference with Skp1 function leads to genetic instability and neoplastic transformation. *Mol Cell Biol* **22**:8375-87.
569. **Plempner, R. K., and D. H. Wolf.** 1999. Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem Sci* **24**:266-70.
570. **Podust, V. N., J. E. Brownell, T. B. Gladysheva, R. S. Luo, C. Wang, M. B. Coggins, J. W. Pierce, E. S. Lightcap, and V. Chau.** 2000. A Nedd8 conjugation pathway is essential for proteolytic targeting of p27Kip1 by ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:4579-84.
571. **Polakis, P.** 2002. Casein kinase 1: a Wnt'er of disconnect. *Curr Biol* **12**:R499-R501.

572. **Polevoda, B., and F. Sherman.** 2003. Composition and function of the eukaryotic N-terminal acetyltransferase subunits. *Biochem Biophys Res Commun* **308**:1-11.
573. **Polevoda, B., and F. Sherman.** 2003. N-terminal acetyltransferases and sequence requirements for N-terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J Mol Biol* **325**:595-622.
574. **Posas, F., and H. Saito.** 1997. Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**:1702-5.
575. **Poukka, H., U. Karvonen, O. A. Janne, and J. J. Palvimo.** 2000. Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:14145-50.
576. **Pouyssegur, J., and P. Lenormand.** 2003. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Eur J Biochem* **270**:3291-9.
577. **Pouyssegur, J., V. Volmat, and P. Lenormand.** 2002. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol* **64**:755-63.
578. **Preger, E., I. Ziv, A. Shabtay, I. Sher, M. Tsang, I. B. Dawid, Y. Altuvia, and D. Ron.** 2004. Alternative splicing generates an isoform of the human Sef gene with altered subcellular localization and specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:1229-34.
579. **Pringa, E., G. Martinez-Noel, U. Muller, and K. Harbers.** 2001. Interaction of the ring finger-related U-box motif of a nuclear dot protein with ubiquitin-conjugating enzymes. *J Biol Chem* **276**:19617-23.
580. **Pulido, R., A. Zuniga, and A. Ullrich.** 1998. PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *Embo J* **17**:7337-50.
581. **Pullikuth, A., E. McKinnon, H. J. Schaeffer, and A. D. Catling.** 2005. The MEK1 scaffolding protein MP1 regulates cell spreading by integrating PAK1 and Rho signals. *Mol Cell Biol* **25**:5119-33.
582. **Pulverer, B. J., J. M. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki, and J. R. Woodgett.** 1991. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**:670-4.
583. **Puri, P. L., Z. Wu, P. Zhang, L. D. Wood, K. S. Bhakta, J. Han, J. R. Feramisco, M. Karin, and J. Y. Wang.** 2000. Induction of terminal differentiation by constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells. *Genes Dev* **14**:574-84.
584. **Qian, Z., D. Okuhara, M. K. Abe, and M. R. Rosner.** 1999. Molecular cloning and characterization of a mitogen-activated protein kinase-associated intracellular chloride channel. *J Biol Chem* **274**:1621-7.
585. **Qui, M. S., and S. H. Green.** 1992. PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity. *Neuron* **9**:705-17.
586. **Rabizadeh, S., R. J. Xavier, K. Ishiguro, J. Bernabeortiz, M. Lopez-Illasaca, A. Khokhlatchev, P. Mollahan, G. P. Pfeifer, J. Avruch, and B. Seed.** 2004. The scaffold protein CNK1 interacts with the tumor suppressor RASSF1A and augments RASSF1A-induced cell death. *J Biol Chem* **279**:29247-54.
587. **Racke, F. K., K. Lewandowska, S. Goueli, and A. N. Goldfarb.** 1997. Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway is required for megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J Biol Chem* **272**:23366-70.

588. **Rao, H., F. Uhlmann, K. Nasmyth, and A. Varshavsky.** 2001. Degradation of a cohesin subunit by the N-end rule pathway is essential for chromosome stability. *Nature* **410**:955-9.
589. **Rape, M., and M. W. Kirschner.** 2004. Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. *Nature* **432**:588-95.
590. **Rapp, U. R., M. D. Goldsborough, G. E. Mark, T. I. Bonner, J. Groffen, F. H. Reynolds, Jr., and J. R. Stephenson.** 1983. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:4218-22.
591. **Ray, L. B., and T. W. Sturgill.** 1987. Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:1502-6.
592. **Razidlo, G. L., R. L. Kortum, J. L. Haferbier, and R. E. Lewis.** 2004. Phosphorylation regulates KSR1 stability, ERK activation, and cell proliferation. *J Biol Chem* **279**:47808-14.
593. **Rechsteiner, M., and S. W. Rogers.** 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21**:267-71.
594. **Regan, C. P., W. Li, D. M. Boucher, S. Spatz, M. S. Su, and K. Kuida.** 2002. Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:9248-53.
595. **Reimann, J. D., E. Freed, J. Y. Hsu, E. R. Kramer, J. M. Peters, and P. K. Jackson.** 2001. Emil is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell* **105**:645-55.
596. **Reinstein, E., M. Scheffner, M. Oren, A. Ciechanover, and A. Schwartz.** 2000. Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Oncogene* **19**:5944-50.
597. **Reiss, Y., D. Kaim, and A. Hershko.** 1988. Specificity of binding of NH₂-terminal residue of proteins to ubiquitin-protein ligase. Use of amino acid derivatives to characterize specific binding sites. *J Biol Chem* **263**:2693-8.
598. **Remenyi, A., M. C. Good, R. P. Bhattacharyya, and W. A. Lim.** 2005. The role of docking interactions in mediating signaling input, output, and discrimination in the yeast MAPK network. *Mol Cell* **20**:951-62.
599. **Reszka, A. A., R. Seger, C. D. Diltz, E. G. Krebs, and E. H. Fischer.** 1995. Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:8881-5.
600. **Richly, H., M. Rape, S. Braun, S. Rumpf, C. Hoegel, and S. Jentsch.** 2005. A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell* **120**:73-84.
601. **Richmond, C., C. Gorbea, and M. Rechsteiner.** 1997. Specific interactions between ATPase subunits of the 26 S protease. *J Biol Chem* **272**:13403-11.
602. **Rivett, A. J.** 1985. Purification of a liver alkaline protease which degrades oxidatively modified glutamine synthetase. Characterization as a high molecular weight cysteine proteinase. *J Biol Chem* **260**:12600-6.
603. **Robinson, M. J., M. Cheng, A. Khokhlatchev, D. Ebert, N. Ahn, K. L. Guan, B. Stein, E. Goldsmith, and M. H. Cobb.** 1996. Contributions of the mitogen-activated protein (MAP) kinase backbone and phosphorylation loop to MEK specificity. *J Biol Chem* **271**:29734-9.

604. **Robinson, M. J., S. A. Stippec, E. Goldsmith, M. A. White, and M. H. Cobb.** 1998. A constitutively active and nuclear form of the MAP kinase ERK2 is sufficient for neurite outgrowth and cell transformation. *Curr Biol* **8**:1141-50.
605. **Robison, G. A., R. W. Butcher, and E. W. Sutherland.** 1968. Cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* **37**:149-74.
606. **Robzyk, K., J. Recht, and M. A. Osley.** 2000. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* **287**:501-4.
607. **Rocheleau, C. E., A. Ronnlund, S. Tuck, and M. V. Sundaram.** 2005. *Caenorhabditis elegans* CNK-1 promotes Raf activation but is not essential for Ras/Raf signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:11757-62.
608. **Rocheleau, C. E., J. Yasuda, T. H. Shin, R. Lin, H. Sawa, H. Okano, J. R. Priess, R. J. Davis, and C. C. Mello.** 1999. WRM-1 activates the LIT-1 protein kinase to transduce anterior/posterior polarity signals in *C. elegans*. *Cell* **97**:717-26.
609. **Rock, K. L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, and A. L. Goldberg.** 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**:761-71.
610. **Rodriguez, M. S., C. Dargemont, and R. T. Hay.** 2001. SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* **276**:12654-9.
611. **Rodriguez, M. S., J. M. Desterro, S. Lain, D. P. Lane, and R. T. Hay.** 2000. Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* **20**:8458-67.
612. **Rogge, R. D., C. A. Karlovich, and U. Banerjee.** 1991. Genetic dissection of a neurodevelopmental pathway: Son of sevenless functions downstream of the sevenless and EGF receptor tyrosine kinases. *Cell* **64**:39-48.
613. **Rose, I. A., and J. V. Warms.** 1983. An enzyme with ubiquitin carboxy-terminal esterase activity from reticulocytes. *Biochemistry* **22**:4234-7.
614. **Rossini, G. P., C. Pinna, and C. Malaguti.** 1999. Different sensitivities of p42 mitogen-activated protein kinase to phorbol ester and okadaic acid tumor promoters among cell types. *Biochem Pharmacol* **58**:279-84.
615. **Rossomando, A., J. Wu, M. J. Weber, and T. W. Sturgill.** 1992. The phorbol ester-dependent activator of the mitogen-activated protein kinase p42mapk is a kinase with specificity for the threonine and tyrosine regulatory sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:5221-5.
616. **Rossomando, A. J., D. M. Payne, M. J. Weber, and T. W. Sturgill.** 1989. Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:6940-3.
617. **Rotin, D., O. Staub, and R. Haguenauer-Tsapis.** 2000. Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol* **176**:1-17.
618. **Rouse, J., P. Cohen, S. Trigon, M. Morange, A. Alonso-Llamazares, D. Zamanillo, T. Hunt, and A. R. Nebreda.** 1994. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **78**:1027-37.
619. **Rousseau, D., D. Cannella, J. Boulaire, P. Fitzgerald, A. Fotedar, and R. Fotedar.** 1999. Growth inhibition by CDK-cyclin and PCNA binding domains of p21 occurs by distinct mechanisms and is regulated by ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* **18**:4313-25.

620. **Roux, P. P., and J. Blenis.** 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:320-44.
621. **Roy, F., G. Laberge, M. Douziech, D. Ferland-McCollough, and M. Therrien.** 2002. KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module. *Genes Dev* **16**:427-38.
622. **Rubenstein, P. A., and D. J. Martin.** 1983. NH₂-terminal processing of actin in mouse L-cells in vivo. *J Biol Chem* **258**:3961-6.
623. **Rubenstein, P. A., and D. J. Martin.** 1983. NH₂-terminal processing of *Drosophila melanogaster* actin. Sequential removal of two amino acids. *J Biol Chem* **258**:11354-60.
624. **Rubinfeld, H., T. Hanoch, and R. Seger.** 1999. Identification of a cytoplasmic-retention sequence in ERK2. *J Biol Chem* **274**:30349-52.
625. **Saba-El-Leil, M. K., F. D. Vella, B. Vernay, L. Voisin, L. Chen, N. Labrecque, S. L. Ang, and S. Meloche.** 2003. An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep* **4**:964-8.
626. **Sabapathy, K., K. Hochedlinger, S. Y. Nam, A. Bauer, M. Karin, and E. F. Wagner.** 2004. Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol Cell* **15**:713-25.
627. **Saigoh, K., Y. L. Wang, J. G. Suh, T. Yamanishi, Y. Sakai, H. Kiyosawa, T. Harada, N. Ichihara, S. Wakana, T. Kikuchi, and K. Wada.** 1999. Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. *Nat Genet* **23**:47-51.
628. **Sakurai, H., H. Miyoshi, J. Mizukami, and T. Sugita.** 2000. Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1. *FEBS Lett* **474**:141-5.
629. **Sanchez, I., R. T. Hughes, B. J. Mayer, K. Yee, J. R. Woodgett, J. Avruch, J. M. Kyriakis, and L. I. Zon.** 1994. Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* **372**:794-8.
630. **Sasaki, A., K. Inagaki-Ohara, T. Yoshida, A. Yamanaka, M. Sasaki, H. Yasukawa, A. E. Koromilas, and A. Yoshimura.** 2003. The N-terminal truncated isoform of SOCS3 translated from an alternative initiation AUG codon under stress conditions is stable due to the lack of a major ubiquitination site, Lys-6. *J Biol Chem* **278**:2432-6.
631. **Schaeffer, H. J., A. D. Catling, S. T. Eblen, L. S. Collier, A. Krauss, and M. J. Weber.** 1998. MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* **281**:1668-71.
632. **Scheffner, M., J. M. Huibregtse, R. D. Vierstra, and P. M. Howley.** 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**:495-505.
633. **Scheffner, M., U. Nuber, and J. M. Huibregtse.** 1995. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* **373**:81-3.
634. **Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, and P. M. Howley.** 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**:1129-36.
635. **Schlesinger, T. K., G. R. Fanger, T. Yujiri, and G. L. Johnson.** 1998. The TAO of MEKK. *Front Biosci* **3**:D1181-6.
636. **Schmid, H. P., O. Akhayat, C. Martins De Sa, F. Puvion, K. Koehler, and K. Scherrer.** 1984. The prosome: an ubiquitous morphologically distinct RNP particle

- associated with repressed mRNPs and containing specific ScRNA and a characteristic set of proteins. *Embo J* **3**:29-34.
637. **Schoorlemmer, J., and M. Goldfarb.** 2002. Fibroblast growth factor homologous factors and the islet brain-2 scaffold protein regulate activation of a stress-activated protein kinase. *J Biol Chem* **277**:49111-9.
638. **Schulman, B. A., A. C. Carrano, P. D. Jeffrey, Z. Bowen, E. R. Kinnucan, M. S. Finnin, S. J. Elledge, J. W. Harper, M. Pagano, and N. P. Pavletich.** 2000. Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature* **408**:381-6.
639. **Schumacher, M. A., J. L. Todd, A. E. Rice, K. G. Tanner, and J. M. Denu.** 2002. Structural basis for the recognition of a bisphosphorylated MAP kinase peptide by human VHR protein Phosphatase. *Biochemistry* **41**:3009-17.
640. **Schumacher, S., K. Laass, S. Kant, Y. Shi, A. Visel, A. D. Gruber, A. Kotlyarov, and M. Gaestel.** 2004. Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *Embo J* **23**:4770-9.
641. **Schuringa, J. J., L. J. Jonk, W. H. Dokter, E. Vellenga, and W. Kruijer.** 2000. Interleukin-6-induced STAT3 transactivation and Ser727 phosphorylation involves Vav, Rac-1 and the kinase SEK-1/MKK-4 as signal transduction components. *Biochem J* **347 Pt 1**:89-96.
642. **Schwechheimer, C.** 2004. The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development. *Biochim Biophys Acta* **1695**:45-54.
643. **Schwechheimer, C., G. Serino, J. Callis, W. L. Crosby, S. Lyapina, R. J. Deshaies, W. M. Gray, M. Estelle, and X. W. Deng.** 2001. Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science* **292**:1379-82.
644. **Schwob, E., T. Bohm, M. D. Mendenhall, and K. Nasmyth.** 1994. The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* **79**:233-44.
645. **Seger, R., N. G. Ahn, J. Posada, E. S. Munar, A. M. Jensen, J. A. Cooper, M. H. Cobb, and E. G. Krebs.** 1992. Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J Biol Chem* **267**:14373-81.
646. **Seger, R., D. Seger, F. J. Lozeman, N. G. Ahn, L. M. Graves, J. S. Campbell, L. Ericsson, M. Harrylock, A. M. Jensen, and E. G. Krebs.** 1992. Human T-cell mitogen-activated protein kinase kinases are related to yeast signal transduction kinases. *J Biol Chem* **267**:25628-31.
647. **Selkoe, D. J.** 2001. Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:11039-41.
648. **Senga, T., U. Sivaprasad, W. Zhu, J. H. Park, E. E. Arias, J. C. Walter, and A. Dutta.** 2006. PCNA is a cofactor for Cdt1 degradation by CUL4/DDB1-mediated N-terminal ubiquitination. *J Biol Chem* **281**:6246-52.
649. **Seol, J. H., R. M. Feldman, W. Zachariae, A. Shevchenko, C. C. Correll, S. Lyapina, Y. Chi, M. Galova, J. Claypool, S. Sandmeyer, K. Nasmyth, R. J. Deshaies, A. Shevchenko, and R. J. Deshaies.** 1999. Cdc53/cullin and the essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define a ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34. *Genes Dev* **13**:1614-26.

650. **Serrano, M., A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach, and S. W. Lowe.** 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**:593-602.
651. **Seternes, O. M., T. Mikalsen, B. Johansen, E. Michaelsen, C. G. Armstrong, N. A. Morrice, B. Turgeon, S. Meloche, U. Moens, and S. M. Keyse.** 2004. Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *Embo J* **23**:4780-91.
652. **Seufert, W., B. Futcher, and S. Jentsch.** 1995. Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* **373**:78-81.
653. **Shalizi, A., M. Lehtinen, B. Gaudilliere, N. Donovan, J. Han, Y. Konishi, and A. Bonni.** 2003. Characterization of a neurotrophin signaling mechanism that mediates neuron survival in a temporally specific pattern. *J Neurosci* **23**:7326-36.
654. **Shaulian, E., and M. Karin.** 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* **4**:E131-6.
655. **Sheaff, R. J., J. D. Singer, J. Swanger, M. Smitherman, J. M. Roberts, and B. E. Clurman.** 2000. Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol Cell* **5**:403-10.
656. **Sheff, D. R., and P. A. Rubenstein.** 1992. Isolation and characterization of the rat liver actin N-acetylaminopeptidase. *J Biol Chem* **267**:20217-24.
657. **Sheikh-Hamad, D., and M. C. Gustin.** 2004. MAP kinases and the adaptive response to hypertonicity: functional preservation from yeast to mammals. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**:F1102-10.
658. **Shi, Y., A. Kotlyarov, K. Laabeta, A. D. Gruber, E. Butt, K. Marcus, H. E. Meyer, A. Friedrich, H. D. Volk, and M. Gaestel.** 2003. Elimination of protein kinase MK5/PRAK activity by targeted homologous recombination. *Mol Cell Biol* **23**:7732-41.
659. **Shibuya, H., K. Yamaguchi, K. Shirakabe, A. Tonegawa, Y. Gotoh, N. Ueno, K. Irie, E. Nishida, and K. Matsumoto.** 1996. TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science* **272**:1179-82.
660. **Shim, J. H., C. Xiao, A. E. Paschal, S. T. Bailey, P. Rao, M. S. Hayden, K. Y. Lee, C. Bussey, M. Steckel, N. Tanaka, G. Yamada, S. Akira, K. Matsumoto, and S. Ghosh.** 2005. TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev* **19**:2668-81.
661. **Shirakabe, K., K. Yamaguchi, H. Shibuya, K. Irie, S. Matsuda, T. Moriguchi, Y. Gotoh, K. Matsumoto, and E. Nishida.** 1997. TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* **272**:8141-4.
662. **Shtiegman, K., and Y. Yarden.** 2003. The role of ubiquitylation in signaling by growth factors: implications to cancer. *Semin Cancer Biol* **13**:29-40.
663. **Sidow, A., M. S. Bulotsky, A. W. Kerrebrock, B. W. Birren, D. Altshuler, R. Jaenisch, K. R. Johnson, and E. S. Lander.** 1999. A novel member of the F-box/WD40 gene family, encoding dactylin, is disrupted in the mouse dactylaplasia mutant. *Nat Genet* **23**:104-7.
664. **Sieburth, D. S., Q. Sun, and M. Han.** 1998. SUR-8, a conserved Ras-binding protein with leucine-rich repeats, positively regulates Ras-mediated signaling in *C. elegans*. *Cell* **94**:119-30.
665. **Simanis, V., and P. Nurse.** 1986. The cell cycle control gene *cdc2+* of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell* **45**:261-8.

666. **Simpson, M. V.** 1953. The release of labeled amino acids from the proteins of rat liver slices. *J Biol Chem* **201**:143-54.
667. **Sithanandam, G., W. Kolch, F. M. Duh, and U. R. Rapp.** 1990. Complete coding sequence of a human B-raf cDNA and detection of B-raf protein kinase with isozyme specific antibodies. *Oncogene* **5**:1775-80.
668. **Sitry, D., M. A. Seeliger, T. K. Ko, D. Ganoth, S. E. Breward, L. S. Itzhaki, M. Pagano, and A. Hershko.** 2002. Three different binding sites of Cks1 are required for p27-ubiquitin ligation. *J Biol Chem* **277**:42233-40.
669. **Smith, D. L., C. C. Chen, B. B. Bruegger, S. L. Holtz, R. M. Halpern, and R. A. Smith.** 1974. Characterization of protein kinases forming acid-labile histone phosphates in Walker-256 carcinosarcoma cell nuclei. *Biochemistry* **13**:3780-5.
670. **Sohn, S. J., B. K. Sarvis, D. Cado, and A. Winoto.** 2002. ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem* **277**:43344-51.
671. **Solit, D. B., L. A. Garraway, C. A. Pratilas, A. Sawai, G. Getz, A. Basso, Q. Ye, J. M. Lobo, Y. She, I. Osman, T. R. Golub, J. Sebolt-Leopold, W. R. Sellers, and N. Rosen.** 2006. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* **439**:358-62.
672. **Sonenberg, N., and T. E. Dever.** 2003. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol* **13**:56-63.
673. **Songyang, Z., K. P. Lu, Y. T. Kwon, L. H. Tsai, O. Filhol, C. Cochet, D. A. Brickey, T. R. Soderling, C. Bartleson, D. J. Graves, A. J. DeMaggio, M. F. Hoekstra, J. Blenis, T. Hunter, and L. C. Cantley.** 1996. A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol Cell Biol* **16**:6486-93.
674. **Soriano, P., T. Gridley, and R. Jaenisch.** 1987. Retroviruses and insertional mutagenesis in mice: proviral integration at the Mov 34 locus leads to early embryonic death. *Genes Dev* **1**:366-75.
675. **Spence, J., S. Sadis, A. L. Haas, and D. Finley.** 1995. A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* **15**:1265-73.
676. **Spruck, C., H. Strohmaier, M. Watson, A. P. Smith, A. Ryan, T. W. Krek, and S. I. Reed.** 2001. A CDK-independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1. *Mol Cell* **7**:639-50.
677. **Sridhar, S. S., D. Hedley, and L. L. Siu.** 2005. Raf kinase as a target for anticancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* **4**:677-85.
678. **Starita, L. M., and J. D. Parvin.** 2003. The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. *Curr Opin Cell Biol* **15**:345-50.
679. **Steen, R. L., S. B. Martins, K. Tasken, and P. Collas.** 2000. Recruitment of protein phosphatase 1 to the nuclear envelope by A-kinase anchoring protein AKAP149 is a prerequisite for nuclear lamina assembly. *J Cell Biol* **150**:1251-62.
680. **Stewart, S., M. Sundaram, Y. Zhang, J. Lee, M. Han, and K. L. Guan.** 1999. Kinase suppressor of Ras forms a multiprotein signaling complex and modulates MEK localization. *Mol Cell Biol* **19**:5523-34.
681. **Stockinger, W., C. Brandes, D. Fasching, M. Hermann, M. Gotthardt, J. Herz, W. J. Schneider, and J. Nimpf.** 2000. The reelin receptor ApoER2 recruits JNK-interacting proteins-1 and -2. *J Biol Chem* **275**:25625-32.

682. **Stoecklin, G., T. Stubbs, N. Kedersha, S. Wax, W. F. Rigby, T. K. Blackwell, and P. Anderson.** 2004. MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *Embo J* **23**:1313-24.
683. **Stokoe, D., D. G. Campbell, S. Nakielnny, H. Hidaka, S. J. Leever, C. Marshall, and P. Cohen.** 1992. MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase. *Embo J* **11**:3985-94.
684. **Sudo, T., K. Kawai, H. Matsuzaki, and H. Osada.** 2005. p38 mitogen-activated protein kinase plays a key role in regulating MAPKAPK2 expression. *Biochem Biophys Res Commun* **337**:415-21.
685. **Sudol, M.** 1998. From Src Homology domains to other signaling modules: proposal of the 'protein recognition code'. *Oncogene* **17**:1469-74.
686. **Sun, M., Y. Wei, L. Yao, J. Xie, X. Chen, H. Wang, J. Jiang, and J. Gu.** 2006. Identification of extracellular signal-regulated kinase 3 as a new interaction partner of cyclin D3. *Biochem Biophys Res Commun* **340**:209-14.
687. **Sun, W., K. Kesavan, B. C. Schaefer, T. P. Garrington, M. Ware, N. L. Johnson, E. W. Gelfand, and G. L. Johnson.** 2001. MEKK2 associates with the adapter protein Lad/RIBP and regulates the MEK5-BMK1/ERK5 pathway. *J Biol Chem* **276**:5093-100.
688. **Sun, Z. W., and C. D. Allis.** 2002. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* **418**:104-8.
689. **Sundaram, M., and M. Han.** 1995. The *C. elegans* *ksr-1* gene encodes a novel Raf-related kinase involved in Ras-mediated signal transduction. *Cell* **83**:889-901.
690. **Sundaresan, P., and R. W. Farndale.** 2002. P38 mitogen-activated protein kinase dephosphorylation is regulated by protein phosphatase 2A in human platelets activated by collagen. *FEBS Lett* **528**:139-44.
691. **Suzaki, Y., M. Yoshizumi, S. Kagami, A. H. Koyama, Y. Taketani, H. Houchi, K. Tsuchiya, E. Takeda, and T. Tamaki.** 2002. Hydrogen peroxide stimulates c-Src-mediated big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) and the MEF2C signaling pathway in PC12 cells: potential role in cell survival following oxidative insults. *J Biol Chem* **277**:9614-21.
692. **Swaffield, J. C., and M. D. Purugganan.** 1997. The evolution of the conserved ATPase domain (CAD): reconstructing the history of an ancient protein module. *J Mol Evol* **45**:549-63.
693. **Tada, K., T. Okazaki, S. Sakon, T. Kobarai, K. Kurosawa, S. Yamaoka, H. Hashimoto, T. W. Mak, H. Yagita, K. Okumura, W. C. Yeh, and H. Nakano.** 2001. Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. *J Biol Chem* **276**:36530-4.
694. **Takaesu, G., S. Kishida, A. Hiyama, K. Yamaguchi, H. Shibuya, K. Irie, J. Ninomiya-Tsuji, and K. Matsumoto.** 2000. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* **5**:649-58.
695. **Takeda, K., T. Hatai, T. S. Hamazaki, H. Nishitoh, M. Saitoh, and H. Ichijo.** 2000. Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) induces neuronal differentiation and survival of PC12 cells. *J Biol Chem* **275**:9805-13.
696. **Takekawa, M., T. Maeda, and H. Saito.** 1998. Protein phosphatase 2A inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *Embo J* **17**:4744-52.

697. **Takekawa, M., K. Tatebayashi, and H. Saito.** 2005. Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinase kinases. *Mol Cell* **18**:295-306.
698. **Tamura, K., T. Sudo, U. Senftleben, A. M. Dadak, R. Johnson, and M. Karin.** 2000. Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell* **102**:221-31.
699. **Tamura, T., I. Nagy, A. Lupas, F. Lottspeich, Z. Cejka, G. Schoofs, K. Tanaka, R. De Mot, and W. Baumeister.** 1995. The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*. *Curr Biol* **5**:766-74.
700. **Tan, Y., H. Ruan, M. R. Demeter, and M. J. Comb.** 1999. p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* **274**:34859-67.
701. **Tanaka, N., M. Kamanaka, H. Enslen, C. Dong, M. Wysl, R. J. Davis, and R. A. Flavell.** 2002. Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase kinases MKK3 and MKK6 in T-cell apoptosis. *EMBO Rep* **3**:785-91.
702. **Tanoue, T., M. Adachi, T. Moriguchi, and E. Nishida.** 2000. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol* **2**:110-6.
703. **Tanoue, T., R. Maeda, M. Adachi, and E. Nishida.** 2001. Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *Embo J* **20**:466-79.
704. **Tanoue, T., and E. Nishida.** 2003. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* **15**:455-62.
705. **Tarricone, C., R. Dhavan, J. Peng, L. B. Areces, L. H. Tsai, and A. Musacchio.** 2001. Structure and regulation of the CDK5-p25(nck5a) complex. *Mol Cell* **8**:657-69.
706. **Tasaki, T., L. C. Mulder, A. Iwamatsu, M. J. Lee, I. V. Davydov, A. Varshavsky, M. Muesing, and Y. T. Kwon.** 2005. A family of mammalian E3 ubiquitin ligases that contain the UBR box motif and recognize N-degrons. *Mol Cell Biol* **25**:7120-36.
707. **Teis, D., W. Wunderlich, and L. A. Huber.** 2002. Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Dev Cell* **3**:803-14.
708. **ter Haar, E., J. T. Coll, D. A. Austen, H. M. Hsiao, L. Swenson, and J. Jain.** 2001. Structure of GSK3beta reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nat Struct Biol* **8**:593-6.
709. **Terasawa, K., K. Okazaki, and E. Nishida.** 2003. Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway. *Genes Cells* **8**:263-73.
710. **Terui, Y., N. Saad, S. Jia, F. McKeon, and J. Yuan.** 2004. Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1. *J Biol Chem* **279**:28257-65.
711. **Tetzlaff, M. T., C. Bai, M. Finegold, J. Wilson, J. W. Harper, K. A. Mahon, and S. J. Elledge.** 2004. Cyclin F disruption compromises placental development and affects normal cell cycle execution. *Mol Cell Biol* **24**:2487-98.
712. **Therrien, M., H. C. Chang, N. M. Solomon, F. D. Karim, D. A. Wassarman, and G. M. Rubin.** 1995. KSR, a novel protein kinase required for RAS signal transduction. *Cell* **83**:879-88.
713. **Therrien, M., N. R. Michaud, G. M. Rubin, and D. K. Morrison.** 1996. KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade. *Genes Dev* **10**:2684-95.

714. **Therrien, M., A. M. Wong, E. Kwan, and G. M. Rubin.** 1999. Functional analysis of CNK in RAS signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:13259-63.
715. **Therrien, M., A. M. Wong, and G. M. Rubin.** 1998. CNK, a RAF-binding multidomain protein required for RAS signaling. *Cell* **95**:343-53.
716. **Thiagalingam, S., K. H. Cheng, H. J. Lee, N. Mineva, A. Thiagalingam, and J. F. Ponte.** 2003. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann N Y Acad Sci* **983**:84-100.
717. **Thorne, A. W., P. Sautiere, G. Briand, and C. Crane-Robinson.** 1987. The structure of ubiquitinated histone H2B. *Embo J* **6**:1005-10.
718. **Thorpe, C. J., and R. T. Moon.** 2004. nemo-like kinase is an essential co-activator of Wnt signaling during early zebrafish development. *Development* **131**:2899-909.
719. **Thrower, J. S., L. Hoffman, M. Rechsteiner, and C. M. Pickart.** 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J* **19**:94-102.
720. **Tofaris, G. K., R. Layfield, and M. G. Spillantini.** 2001. alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome. *FEBS Lett* **509**:22-6.
721. **Tonks, N. K.** 2005. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell* **121**:667-70.
722. **Torii, S., M. Kusakabe, T. Yamamoto, M. Maekawa, and E. Nishida.** 2004. Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell* **7**:33-44.
723. **Touitou, R., J. Richardson, S. Bose, M. Nakanishi, J. Rivett, and M. J. Allday.** 2001. A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome. *Embo J* **20**:2367-75.
724. **Tournier, C., C. Dong, T. K. Turner, S. N. Jones, R. A. Flavell, and R. J. Davis.** 2001. MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev* **15**:1419-26.
725. **Tournier, C., P. Hess, D. D. Yang, J. Xu, T. K. Turner, A. Nimnual, D. Barsagi, S. N. Jones, R. A. Flavell, and R. J. Davis.** 2000. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* **288**:870-4.
726. **Tran, Y. K., O. Bogler, K. M. Gorse, I. Wieland, M. R. Green, and I. F. Newsham.** 1999. A novel member of the NF2/ERM/4.1 superfamily with growth suppressing properties in lung cancer. *Cancer Res* **59**:35-43.
727. **Trausch-Azar, J. S., J. Lingbeck, A. Ciechanover, and A. L. Schwartz.** 2004. Ubiquitin-Proteasome-mediated degradation of Id1 is modulated by MyoD. *J Biol Chem* **279**:32614-9.
728. **Tsujimoto, Y., and S. Shimizu.** 2000. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* **466**:6-10.
729. **Tsurumi, C., Y. Shimizu, M. Saeki, S. Kato, G. N. Demartino, C. A. Slaughter, M. Fujimuro, H. Yokosawa, M. Yamasaki, K. B. Hendil, A. Toh-e, N. Tanahashi, and K. Tanaka.** 1996. cDNA cloning and functional analysis of the p97 subunit of the 26S proteasome, a polypeptide identical to the type-1 tumor-necrosis-factor-receptor-associated protein-2/55.11. *Eur J Biochem* **239**:912-21.
730. **Tsvetkov, L. M., K. H. Yeh, S. J. Lee, H. Sun, and H. Zhang.** 1999. p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr Biol* **9**:661-4.
731. **Tunquist, B. J., and J. L. Maller.** 2003. Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Dev* **17**:683-710.

732. **Turgeon, B., M. K. Saba-El-Leil, and S. Meloche.** 2000. Cloning and characterization of mouse extracellular-signal-regulated protein kinase 3 as a unique gene product of 100 kDa. *Biochem J* **346 Pt 1**:169-75.
733. **Tzivion, G., and J. Avruch.** 2002. 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* **277**:3061-4.
734. **Uhlik, M. T., A. N. Abell, N. L. Johnson, W. Sun, B. D. Cuevas, K. E. Lobel-Rice, E. A. Horne, M. L. Dell'Acqua, and G. L. Johnson.** 2003. Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nat Cell Biol* **5**:1104-10.
735. **Uhlmann, F.** 2003. Separate regulation during mitosis. *Biochem Soc Symp*:243-51.
736. **Urbancikova, M., and S. E. Hitchcock-DeGregori.** 1994. Requirement of amino-terminal modification for striated muscle alpha-tropomyosin function. *J Biol Chem* **269**:24310-5.
737. **Ussar, S., and T. Voss.** 2004. MEK1 and MEK2, different regulators of the G1/S transition. *J Biol Chem* **279**:43861-9.
738. **van Nocker, S., S. Sadis, D. M. Rubin, M. Glickman, H. Fu, O. Coux, I. Wefes, D. Finley, and R. D. Vierstra.** 1996. The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol Cell Biol* **16**:6020-8.
739. **VanDemark, A. P., R. M. Hofmann, C. Tsui, C. M. Pickart, and C. Wolberger.** 2001. Molecular insights into polyubiquitin chain assembly: crystal structure of the Mms2/Ubc13 heterodimer. *Cell* **105**:711-20.
740. **Varadan, R., M. Assalg, A. Haririnia, S. Raasi, C. Pickart, and D. Fushman.** 2004. Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling. *J Biol Chem* **279**:7055-63.
741. **Varadan, R., O. Walker, C. Pickart, and D. Fushman.** 2002. Structural properties of polyubiquitin chains in solution. *J Mol Biol* **324**:637-47.
742. **Varshavsky, A.** 1997. The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells* **2**:13-28.
743. **Varshavsky, A.** 2005. Regulated protein degradation. *Trends Biochem Sci* **30**:283-6.
744. **Velazquez-Dones, A., J. C. Hagopian, C. T. Ma, X. Y. Zhong, H. Zhou, G. Ghosh, X. D. Fu, and J. A. Adams.** 2005. Mass spectrometric and kinetic analysis of ASF/SF2 phosphorylation by SRPK1 and Clk/Sty. *J Biol Chem* **280**:41761-8.
745. **Verdecia, M. A., C. A. Joazeiro, N. J. Wells, J. L. Ferrer, M. E. Bowman, T. Hunter, and J. P. Noel.** 2003. Conformational flexibility underlies ubiquitin ligation mediated by the WWP1 HECT domain E3 ligase. *Mol Cell* **11**:249-59.
746. **Verhey, K. J., D. Meyer, R. Deehan, J. Blenis, B. J. Schnapp, T. A. Rapoport, and B. Margolis.** 2001. Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J Cell Biol* **152**:959-70.
747. **Verma, R., R. S. Annan, M. J. Huddleston, S. A. Carr, G. Reynard, and R. J. Deshaies.** 1997. Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase. *Science* **278**:455-60.
748. **Verma, R., L. Aravind, R. Oania, W. H. McDonald, J. R. Yates, 3rd, E. V. Koonin, and R. J. Deshaies.** 2002. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* **298**:611-5.

749. **Verma, R., R. Oania, J. Graumann, and R. J. Deshaies.** 2004. Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell* **118**:99-110.
750. **Verma, R., N. R. Peters, M. D'Onofrio, G. P. Tochtrop, K. M. Sakamoto, R. Varadan, M. Zhang, P. Coffino, D. Fushman, R. J. Deshaies, and R. W. King.** 2004. Ubistatins inhibit proteasome-dependent degradation by binding the ubiquitin chain. *Science* **306**:117-20.
751. **Vijay-Kumar, S., C. E. Bugg, and W. J. Cook.** 1987. Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* **194**:531-44.
752. **Vogel, G.** 2004. Nobel Prizes. Gold medal from cellular trash. *Science* **306**:400-1.
753. **Voges, D., P. Zwickl, and W. Baumeister.** 1999. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **68**:1015-68.
754. **Vomastek, T., H. J. Schaeffer, A. Tarcsafalvi, M. E. Smolkin, E. A. Bissonette, and M. J. Weber.** 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**:6981-6.
755. **Voorhees, P. M., and R. Z. Orlowski.** 2006. The proteasome and proteasome inhibitors in cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**:189-213.
756. **Walden, H., M. S. Podgorski, D. T. Huang, D. W. Miller, R. J. Howard, D. L. Minor, Jr., J. M. Holton, and B. A. Schulman.** 2003. The structure of the APPBP1-UBA3-NEDD8-ATP complex reveals the basis for selective ubiquitin-like protein activation by an E1. *Mol Cell* **12**:1427-37.
757. **Walden, H., M. S. Podgorski, and B. A. Schulman.** 2003. Insights into the ubiquitin transfer cascade from the structure of the activating enzyme for NEDD8. *Nature* **422**:330-4.
758. **Walsh, D. A., J. P. Perkins, and E. G. Krebs.** 1968. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* **243**:3763-5.
759. **Walton, M. R., and I. Dragunow.** 2000. Is CREB a key to neuronal survival? *Trends Neurosci* **23**:48-53.
760. **Wang, H., L. Wang, H. Erdjument-Bromage, M. Vidal, P. Tempst, R. S. Jones, and Y. Zhang.** 2004. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* **431**:873-8.
761. **Wang, P. Y., P. Liu, J. Weng, E. Sontag, and R. G. Anderson.** 2003. A cholesterol-regulated PP2A/HePTP complex with dual specificity ERK1/2 phosphatase activity. *Embo J* **22**:2658-67.
762. **Wang, Q., P. Young, and K. J. Walters.** 2005. Structure of S5a bound to monoubiquitin provides a model for polyubiquitin recognition. *J Mol Biol* **348**:727-39.
763. **Wang, X., A. J. Merritt, J. Seyfried, C. Guo, E. S. Papadakis, K. G. Finegan, M. Kayahara, J. Dixon, R. P. Boot-Handford, E. J. Cartwright, U. Mayer, and C. Tournier.** 2005. Targeted deletion of mek5 causes early embryonic death and defects in the extracellular signal-regulated kinase 5/myocyte enhancer factor 2 cell survival pathway. *Mol Cell Biol* **25**:336-45.
764. **Wang, Z., B. J. Canagarajah, J. C. Boehm, S. Kassisa, M. H. Cobb, P. R. Young, S. Abdel-Meguid, J. L. Adams, and E. J. Goldsmith.** 1998. Structural basis of inhibitor selectivity in MAP kinases. *Structure* **6**:1117-28.

765. **Wang, Z., P. C. Harkins, R. J. Ulevitch, J. Han, M. H. Cobb, and E. J. Goldsmith.** 1997. The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:2327-32.
766. **Waskiewicz, A. J., A. Flynn, C. G. Proud, and J. A. Cooper.** 1997. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J* **16**:1909-20.
767. **Watanabe, N., H. Arai, Y. Nishihara, M. Taniguchi, N. Watanabe, T. Hunter, and H. Osada.** 2004. M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:4419-24.
768. **Watanabe, N., Y. Nagamatsu, K. Gengyo-Ando, S. Mitani, and Y. Ohshima.** 2005. Control of body size by SMA-5, a homolog of MAP kinase BMK1/ERK5, in *C. elegans*. *Development* **132**:3175-84.
769. **Waterborg, J. H.** 2001. Dynamics of histone acetylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **40**:2599-605.
770. **Watson, F. L., H. M. Heerssen, A. Bhattacharyya, L. Klesse, M. Z. Lin, and R. A. Segal.** 2001. Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nat Neurosci* **4**:981-8.
771. **Wei, N., T. Tsuge, G. Serino, N. Dohmae, K. Takio, M. Matsui, and X. W. Deng.** 1998. The COP9 complex is conserved between plants and mammals and is related to the 26S proteasome regulatory complex. *Curr Biol* **8**:919-22.
772. **Welchman, R. L., C. Gordon, and R. J. Mayer.** 2005. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:599-609.
773. **Weldon, C. B., A. B. Scandurro, K. W. Rolfe, J. L. Clayton, S. Elliott, N. N. Butler, L. I. Melnik, J. Alam, J. A. McLachlan, B. M. Jaffe, B. S. Beckman, and M. E. Burow.** 2002. Identification of mitogen-activated protein kinase kinase as a chemoresistant pathway in MCF-7 cells by using gene expression microarray. *Surgery* **132**:293-301.
774. **Wenzel, T., C. Eckerskorn, F. Lottspeich, and W. Baumeister.** 1994. Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products. *FEBS Lett* **349**:205-9.
775. **Wertz, I. E., K. M. O'Rourke, H. Zhou, M. Eby, L. Aravind, S. Seshagiri, P. Wu, C. Wiesmann, R. Baker, D. L. Boone, A. Ma, E. V. Koonin, and V. M. Dixit.** 2004. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* **430**:694-9.
776. **Weston, C. R., and R. J. Davis.** 2002. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev* **12**:14-21.
777. **Whitby, F. G., G. Xia, C. M. Pickart, and C. P. Hill.** 1998. Crystal structure of the human ubiquitin-like protein NEDD8 and interactions with ubiquitin pathway enzymes. *J Biol Chem* **273**:34983-91.
778. **Whitehurst, A. W., F. L. Robinson, M. S. Moore, and M. H. Cobb.** 2004. The death effector domain protein PEA-15 prevents nuclear entry of ERK2 by inhibiting required interactions. *J Biol Chem* **279**:12840-7.
779. **Whitehurst, A. W., J. L. Wilsbacher, Y. You, K. Luby-Phelps, M. S. Moore, and M. H. Cobb.** 2002. ERK2 enters the nucleus by a carrier-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:7496-501.
780. **Whitmarsh, A. J., J. Cavanagh, C. Tournier, J. Yasuda, and R. J. Davis.** 1998. A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* **281**:1671-4.

781. **Whitmarsh, A. J., C. Y. Kuan, N. J. Kennedy, N. Kelkar, T. F. Haydar, J. P. Mordes, M. Appel, A. A. Rossini, S. N. Jones, R. A. Flavell, P. Rakic, and R. J. Davis.** 2001. Requirement of the JIP1 scaffold protein for stress-induced JNK activation. *Genes Dev* **15**:2421-32.
782. **Widmann, C., S. Gibson, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson.** 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**:143-80.
783. **Wilk, S., and M. Orlowski.** 1983. Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *J Neurochem* **40**:842-9.
784. **Wilkinson, C. R., M. Wallace, M. Seeger, W. Dubiel, and C. Gordon.** 1997. Mts4, a non-ATPase subunit of the 26 S protease in fission yeast is essential for mitosis and interacts directly with the ATPase subunit Mts2. *J Biol Chem* **272**:25768-77.
785. **Wilkinson, K. D., M. K. Urban, and A. L. Haas.** 1980. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* **255**:7529-32.
786. **Willems, A. R., M. Schwab, and M. Tyers.** 2004. A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim Biophys Acta* **1695**:133-70.
787. **Williams, C. A., H. Angelman, J. Clayton-Smith, D. J. Driscoll, J. E. Hendrickson, J. H. Knoll, R. E. Magenis, A. Schinzel, J. Wagstaff, E. M. Whidden, and et al.** 1995. Angelman syndrome: consensus for diagnostic criteria. Angelman Syndrome Foundation. *Am J Med Genet* **56**:237-8.
788. **Willoughby, E. A., G. R. Perkins, M. K. Collins, and A. J. Whitmarsh.** 2003. The JNK-interacting protein-1 scaffold protein targets MAPK phosphatase-7 to dephosphorylate JNK. *J Biol Chem* **278**:10731-6.
789. **Winston, J. T., P. Strack, P. Beer-Romero, C. Y. Chu, S. J. Elledge, and J. W. Harper.** 1999. The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro. *Genes Dev* **13**:270-83.
790. **Winzen, R., M. Kracht, B. Ritter, A. Wilhelm, C. Y. Chen, A. B. Shyu, M. Muller, M. Gaestel, K. Resch, and H. Holtmann.** 1999. The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *Embo J* **18**:4969-80.
791. **Wishart, M. J., J. M. Denu, J. A. Williams, and J. E. Dixon.** 1995. A single mutation converts a novel phosphotyrosine binding domain into a dual-specificity phosphatase. *J Biol Chem* **270**:26782-5.
792. **Wishart, M. J., and J. E. Dixon.** 1998. Gathering STYX: phosphatase-like form predicts functions for unique protein-interaction domains. *Trends Biochem Sci* **23**:301-6.
793. **Wolanin, P. M., P. A. Thomason, and J. B. Stock.** 2002. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol* **3**:REVIEWS3013.
794. **Wright, W. E., and J. W. Shay.** 2001. Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr Opin Genet Dev* **11**:98-103.
795. **Wu, G., G. Xu, B. A. Schulman, P. D. Jeffrey, J. W. Harper, and N. P. Pavletich.** 2003. Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP1) ubiquitin ligase. *Mol Cell* **11**:1445-56.

796. **Wu, J., J. K. Harrison, P. Dent, K. R. Lynch, M. J. Weber, and T. W. Sturgill.** 1993. Identification and characterization of a new mammalian mitogen-activated protein kinase kinase, MKK2. *Mol Cell Biol* **13**:4539-48.
797. **Wu, J., A. J. Rossomando, J. H. Her, R. Del Vecchio, M. J. Weber, and T. W. Sturgill.** 1991. Autophosphorylation in vitro of recombinant 42-kilodalton mitogen-activated protein kinase on tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:9508-12.
798. **Wunderlich, W., I. Fialka, D. Teis, A. Alpi, A. Pfeifer, R. G. Parton, F. Lottspeich, and L. A. Huber.** 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**:765-76.
799. **Wysk, M., D. D. Yang, H. T. Lu, R. A. Flavell, and R. J. Davis.** 1999. Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for tumor necrosis factor-induced cytokine expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:3763-8.
800. **Xia, Y., C. Makris, B. Su, E. Li, J. Yang, G. R. Nemerow, and M. Karin.** 2000. MEK kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:5243-8.
801. **Xie, X., Y. Gu, T. Fox, J. T. Coll, M. A. Fleming, W. Markland, P. R. Caron, K. P. Wilson, and M. S. Su.** 1998. Crystal structure of JNK3: a kinase implicated in neuronal apoptosis. *Structure* **6**:983-91.
802. **Xing, J., D. D. Ginty, and M. E. Greenberg.** 1996. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* **273**:959-63.
803. **Xu, B., S. Stippec, F. L. Robinson, and M. H. Cobb.** 2001. Hydrophobic as well as charged residues in both MEK1 and ERK2 are important for their proper docking. *J Biol Chem* **276**:26509-15.
804. **Xu, R. M., G. Carmel, R. M. Sweet, J. Kuret, and X. Cheng.** 1995. Crystal structure of casein kinase-1, a phosphate-directed protein kinase. *Embo J* **14**:1015-23.
805. **Yada, M., S. Hatakeyama, T. Kamura, M. Nishiyama, R. Tsunematsu, H. Imaki, N. Ishida, F. Okumura, K. Nakayama, and K. I. Nakayama.** 2004. Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *Embo J* **23**:2116-25.
806. **Yamanaka, A., M. Yada, H. Imaki, M. Koga, Y. Ohshima, and K. Nakayama.** 2002. Multiple Skp1-related proteins in *Caenorhabditis elegans*: diverse patterns of interaction with Cullins and F-box proteins. *Curr Biol* **12**:267-75.
807. **Yan, C., H. Luo, J. D. Lee, J. Abe, and B. C. Berk.** 2001. Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains. *J Biol Chem* **276**:10870-8.
808. **Yan, F., S. K. John, G. Wilson, D. S. Jones, M. K. Washington, and D. B. Polk.** 2004. Kinase suppressor of Ras-1 protects intestinal epithelium from cytokine-mediated apoptosis during inflammation. *J Clin Invest* **114**:1272-80.
809. **Yan, L., J. Carr, P. R. Ashby, V. Murry-Tait, C. Thompson, and J. S. Arthur.** 2003. Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development. *BMC Dev Biol* **3**:11.
810. **Yang, C. C., O. I. Ornatsky, J. C. McDermott, T. F. Cruz, and C. A. Prody.** 1998. Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. *Nucleic Acids Res* **26**:4771-7.

811. **Yang, D., C. Tournier, M. Wusk, H. T. Lu, J. Xu, R. J. Davis, and R. A. Flavell.** 1997. Targeted disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase activation, and defects in AP-1 transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:3004-9.
812. **Yang, D. D., C. Y. Kuan, A. J. Whitmarsh, M. Rincon, T. S. Zheng, R. J. Davis, P. Rakic, and R. A. Flavell.** 1997. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* **389**:865-70.
813. **Yang, J., M. Boerm, M. McCarty, C. Bucana, I. J. Fidler, Y. Zhuang, and B. Su.** 2000. Mekk3 is essential for early embryonic cardiovascular development. *Nat Genet* **24**:309-13.
814. **Yang, S. H., A. Galanis, and A. D. Sharrocks.** 1999. Targeting of p38 mitogen-activated protein kinases to MEF2 transcription factors. *Mol Cell Biol* **19**:4028-38.
815. **Yang, S. H., E. Jaffray, R. T. Hay, and A. D. Sharrocks.** 2003. Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol Cell* **12**:63-74.
816. **Yao, T., and R. E. Cohen.** 2002. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* **419**:403-7.
817. **Yao, Y., W. Li, J. Wu, U. A. Germann, M. S. Su, K. Kuida, and D. M. Boucher.** 2003. Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:12759-64.
818. **Yaron, A., A. Hatzubai, M. Davis, I. Lavon, S. Amit, A. M. Manning, J. S. Andersen, M. Mann, F. Mercurio, and Y. Ben-Neriah.** 1998. Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase. *Nature* **396**:590-4.
819. **Yasuda, J., A. Tsuchiya, T. Yamada, M. Sakamoto, T. Sekiya, and S. Hirohashi.** 2003. Nemo-like kinase induces apoptosis in DLD-1 human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **308**:227-33.
820. **Yasuda, J., A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, M. Sharma, and R. J. Davis.** 1999. The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol* **19**:7245-54.
821. **Yasuda, J., H. Yokoo, T. Yamada, I. Kitabayashi, T. Sekiya, and H. Ichikawa.** 2004. Nemo-like kinase suppresses a wide range of transcription factors, including nuclear factor-kappaB. *Cancer Sci* **95**:52-7.
822. **Yordy, J. S., and R. C. Muise-Helmericks.** 2000. Signal transduction and the Ets family of transcription factors. *Oncogene* **19**:6503-13.
823. **Yoshida, B. A., Z. Dubauskas, M. A. Chekmareva, T. R. Christiano, W. M. Stadler, and C. W. Rinker-Schaeffer.** 1999. Mitogen-activated protein kinase kinase 4/stress-activated protein/Erk kinase 1 (MKK4/SEK1), a prostate cancer metastasis suppressor gene encoded by human chromosome 17. *Cancer Res* **59**:5483-7.
824. **Yoshida, Y., T. Chiba, F. Tokunaga, H. Kawasaki, K. Iwai, T. Suzuki, Y. Ito, K. Matsuoka, M. Yoshida, K. Tanaka, and T. Tai.** 2002. E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. *Nature* **418**:438-42.
825. **Yoshida, Y., F. Tokunaga, T. Chiba, K. Iwai, K. Tanaka, and T. Tai.** 2003. Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains. *J Biol Chem* **278**:43877-84.
826. **Yu, H., G. Kaung, S. Kobayashi, and R. R. Kopito.** 1997. Cytosolic degradation of T-cell receptor alpha chains by the proteasome. *J Biol Chem* **272**:20800-4.

827. **Yujiri, T., S. Sather, G. R. Fanger, and G. L. Johnson.** 1998. Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption. *Science* **282**:1911-4.
828. **Yuvaniyama, J., J. M. Denu, J. E. Dixon, and M. A. Saper.** 1996. Crystal structure of the dual specificity protein phosphatase VHR. *Science* **272**:1328-31.
829. **Zacksenhaus, E., and R. Sheinin.** 1990. Molecular cloning, primary structure and expression of the human X linked A1S9 gene cDNA which complements the ts A1S9 mouse L cell defect in DNA replication. *Embo J* **9**:2923-9.
830. **Zama, T., R. Aoki, T. Kamimoto, K. Inoue, Y. Ikeda, and M. Hagiwara.** 2002. A novel dual specificity phosphatase SKRP1 interacts with the MAPK kinase MKK7 and inactivates the JNK MAPK pathway. Implication for the precise regulation of the particular MAPK pathway. *J Biol Chem* **277**:23909-18.
831. **Zama, T., R. Aoki, T. Kamimoto, K. Inoue, Y. Ikeda, and M. Hagiwara.** 2002. Scaffold role of a mitogen-activated protein kinase phosphatase, SKRP1, for the JNK signaling pathway. *J Biol Chem* **277**:23919-26.
832. **Zeng, G. C., J. Donegan, H. L. Ozer, and R. Hand.** 1984. Characterization of a ts mutant of BALB/3T3 cells and correction of the defect by in vitro addition of extracts from wild-type cells. *Mol Cell Biol* **4**:1815-22.
833. **Zenker, M., J. Mayerle, M. M. Lerch, A. Tagariello, K. Zerres, P. R. Durie, M. Beier, G. Hulskamp, C. Guzman, H. Rehder, F. A. Beemer, B. Hamel, P. Vanlieferinghen, R. Gershoni-Baruch, M. W. Vieira, M. Domic, R. Auslender, V. L. Gil-da-Silva-Lopes, S. Steinlicht, M. Rauh, S. A. Shalev, C. Thiel, A. B. Ekici, A. Winterpacht, Y. T. Kwon, A. Varshavsky, and A. Reis.** 2005. Deficiency of UBR1, a ubiquitin ligase of the N-end rule pathway, causes pancreatic dysfunction, malformations and mental retardation (Johanson-Blizzard syndrome). *Nat Genet* **37**:1345-50.
834. **Zhang, F., A. Strand, D. Robbins, M. H. Cobb, and E. J. Goldsmith.** 1994. Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* **367**:704-11.
835. **Zhang, J., B. Zhou, C. F. Zheng, and Z. Y. Zhang.** 2003. A bipartite mechanism for ERK2 recognition by its cognate regulators and substrates. *J Biol Chem* **278**:29901-12.
836. **Zhang, M., C. M. Pickart, and P. Coffino.** 2003. Determinants of proteasome recognition of ornithine decarboxylase, a ubiquitin-independent substrate. *Embo J* **22**:1488-96.
837. **Zhang, M., M. Windheim, S. M. Roe, M. Peggie, P. Cohen, C. Prodromou, and L. H. Pearl.** 2005. Chaperoned ubiquitylation--crystal structures of the CHIP U box E3 ubiquitin ligase and a CHIP-Ubc13-Uev1a complex. *Mol Cell* **20**:525-38.
838. **Zhang, X. F., J. Settleman, J. M. Kyriakis, E. Takeuchi-Suzuki, S. J. Elledge, M. S. Marshall, J. T. Bruder, U. R. Rapp, and J. Avruch.** 1993. Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* **364**:308-13.
839. **Zhang, Y., J. N. Blattman, N. J. Kennedy, J. Duong, T. Nguyen, Y. Wang, R. J. Davis, P. D. Greenberg, R. A. Flavell, and C. Dong.** 2004. Regulation of innate and adaptive immune responses by MAP kinase phosphatase 5. *Nature* **430**:793-7.
840. **Zhang, Z. Y.** 2002. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**:209-34.
841. **Zheng, J., D. R. Knighton, L. F. ten Eyck, R. Karlsson, N. Xuong, S. S. Taylor, and J. M. Sowadski.** 1993. Crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-

- dependent protein kinase complexed with MgATP and peptide inhibitor. *Biochemistry* **32**:2154-61.
842. **Zheng, N., B. A. Schulman, L. Song, J. J. Miller, P. D. Jeffrey, P. Wang, C. Chu, D. M. Koepp, S. J. Elledge, M. Pagano, R. C. Conaway, J. W. Conaway, J. W. Harper, and N. P. Pavletich.** 2002. Structure of the Cull1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* **416**:703-9.
843. **Zheng, N., P. Wang, P. D. Jeffrey, and N. P. Pavletich.** 2000. Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* **102**:533-9.
844. **Zheng, Q., G. Yin, C. Yan, M. Cavet, and B. C. Berk.** 2004. 14-3-3beta binds to big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1/ERK5) and regulates BMK1 function. *J Biol Chem* **279**:8787-91.
845. **Zhou, G., Z. Q. Bao, and J. E. Dixon.** 1995. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* **270**:12665-9.
846. **Zhu, A. X., Y. Zhao, D. E. Moller, and J. S. Flier.** 1994. Cloning and characterization of p97MAPK, a novel human homolog of rat ERK-3. *Mol Cell Biol* **14**:8202-11.
847. **Zhu, X. H., H. Nguyen, H. D. Halicka, F. Traganos, and A. Koff.** 2004. Noncatalytic requirement for cyclin A-cdk2 in p27 turnover. *Mol Cell Biol* **24**:6058-66.
848. **Zimmermann, J., D. Erdmann, I. Lalande, R. Grossenbacher, M. Noorani, and P. Furst.** 2000. Proteasome inhibitor induced gene expression profiles reveal overexpression of transcriptional regulators ATF3, GADD153 and MAD1. *Oncogene* **19**:2913-20.
849. **Zimmermann, J., N. Lamerant, R. Grossenbacher, and P. Furst.** 2001. Proteasome- and p38-dependent regulation of ERK3 expression. *J Biol Chem* **276**:10759-66.
850. **Ziogas, A., K. Moelling, and G. Radziwill.** 2005. CNK1 is a scaffold protein that regulates Src-mediated Raf-1 activation. *J Biol Chem* **280**:24205-11.

ANNEXES

Nuclear Export of ERK3 by a CRM1-dependent Mechanism Regulates Its Inhibitory Action on Cell Cycle Progression*

Received for publication, March 18, 2003, and in revised form, August 6, 2003
Published, JBC Papers in Press, August 12, 2003, DOI 10.1074/jbc.M302724200

Catherine Julien^{‡§}, Philippe Coulombe^{‡¶}, and Sylvain Meloche^{‡¶**}

From the [‡]Institut de Recherches Cliniques de Montréal and the Departments of [§]Pharmacology and [¶]Molecular Biology, Université de Montréal, Montréal, Québec H2W 1R7, Canada

Extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3) is an atypical member of the mitogen-activated protein kinase family of serine/threonine kinases. Little is known on the regulation of ERK3 function. Here, we report that ERK3 is constitutively localized in the cytoplasmic and nuclear compartments. In contrast to other mitogen-activated protein kinases, the cellular distribution of ERK3 remains unchanged in response to common mitogenic or stress stimuli and is independent of the enzymatic activity or phosphorylation of the kinase. The cytoplasmic localization of ERK3 is directed by a CRM1-dependent nuclear export mechanism. Treatment of cells with leptomycin B causes the nuclear accumulation of ERK3 in a high percentage of cells. Moreover, ectopic expression of CRM1 promotes the cytoplasmic relocalization of ERK3, whereas overexpression of snurportin 1, which binds CRM1 with high affinity, inhibits the nuclear export of ERK3. We also show that CRM1 binds to ERK3 *in vitro*. Importantly, we show that enforced localization of ERK3 in the nucleus or cytoplasm markedly attenuates the ability of the kinase to induce cell cycle arrest in fibroblasts. Our results suggest that nucleocytoplasmic shuttling of ERK3 is required for its negative regulatory effect on cell cycle progression.

Recent studies have highlighted the importance of the nucleocytoplasmic transport of signaling proteins in the regulation of eukaryotic cellular responses such as cell cycle progression and cell proliferation, differentiation, stress responses, and circadian clocks (1). Small regulatory proteins can, in principle, enter and leave the nucleus by simple diffusion through the nuclear pore complexes. However, molecules larger than ~ 60 kDa are actively translocated from one side of the nuclear envelope to the other by a family of soluble transport receptors, classified as importins or exportins, which belong to the importin- β family of RanGTP-binding proteins. Importins bind their cargo in the cytoplasm and release it upon binding to RanGTP in the nucleus; on the opposite, exportins form a trimeric complex with cargo and RanGTP in the nucleus and release their transport substrate into the cytoplasm upon GTP hydrolysis (for review, see Refs. 2–4). At steady state, the

subcellular localization of proteins is determined by the balance between import and export rates. Cargo proteins interact directly with their cognate transport receptor through specific nuclear localization signal (NLS)¹ or nuclear export signal (NES) sequences or indirectly via adaptor molecules (2, 4).

MAP kinases are a family of evolutionary conserved protein kinases that play a critical role in transducing extracellular chemical and physical signals into intracellular responses (for review, see Refs. 5–7). Upon activation, these enzymes phosphorylate a variety of substrates that are present in all compartments of the cell. Consequently, the spatial distribution of MAP kinases, as well as the temporal regulation of their activity, is an important determinant of the ultimate biological response. Studies on the regulation of MAP kinase localization have been focused mainly on the mammalian enzymes ERK1 and ERK2 (8, 9). In resting cells, unphosphorylated ERK1/2 are anchored in the cytoplasm by their association with the MAP kinase kinases MEK1/2 (10) as well as with other cellular proteins such as protein phosphatase PTP-SL (11) and the death effector domain-containing protein PEA-15 (12). After mitogenic stimulation, the MEK-ERK complex is disrupted, and a pool of ERK1/2 is translocated to the nucleus (13–15). Recent work has shown that ERK2 mainly enters the nucleus by a saturable, carrier-independent facilitated mechanism (16). It has been proposed that sustained retention of ERK1/2 in the nucleus requires the neosynthesis of nuclear anchoring proteins (17). Dephosphorylation of ERK1/2 by nuclear phosphatases promotes their binding to NES-containing MEK1/2, which then mediate the export of MAP kinases to the cytoplasm by an active CRM1-dependent mechanism (18). Studies in yeast and mammalian cells suggest that localization of MAP kinases is regulated mainly by changes in the abundance and affinity of anchoring proteins.

Several studies have emphasized the importance of the subcellular localization of MAP kinases in modulating cellular responses. Disruption of the NES was found to potentiate dramatically the ability of activated mutants of MAP kinase kinase to induce morphological changes and malignant transformation of rodent fibroblasts (19). These effects were correlated with a strong increase in the fraction of nuclear activated ERK1/2 and were reversed by coexpression of MAP kinase phosphatase-1. Ectopic expression of an activated variant of ERK2 in the nucleus was also shown to transform NIH 3T3

* This work was supported in part by Grant FRN-38010 from the Canadian Institutes for Health Research. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ Recipient of a studentship from the Canadian Institutes for Health Research.

** Investigator of the Canadian Institutes for Health Research. To whom correspondence should be addressed: Institut de recherches cliniques de Montréal, 110 Pine Ave. West, Montreal, Quebec H2W 1R7, Canada.

¹ The abbreviations used are: NLS, nuclear localization signal; BrdUrd, 5-bromo-2-deoxyuridine; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FITC, fluorescein isothiocyanate; GFP, green fluorescent protein; GST, glutathione S-transferase; HA, hemagglutinin; HEK, human embryonic kidney; JNK, c-Jun N-terminal kinase; LMB, leptomycin B; MAP, mitogen-activated protein kinase; MEK, mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase; NES, nuclear export signal; PBS, phosphate-buffered saline; TRITC, tetramethylrhodamine isothiocyanate.

FIG. 1. ERK3 is localized into the cytoplasmic and nuclear compartments. *A*, the indicated cell lines were transiently transfected with Myc-tagged ERK3. Exponentially proliferating cells were stained with anti-Myc antibody, and the localization of ectopic ERK3 was analyzed by fluorescence microscopy. *B*, localization of endogenous ERK3. Proliferating HeLa and HEK293 cells were stained with polyclonal anti-ERK3 antibody E3-CTE4 and analyzed by fluorescence microscopy. *C*, specificity of anti-ERK3 antibody. NIH 3T3 fibroblasts were incubated in the absence of primary antibody (*- antibody*), with anti-ERK3 antibody E3-CTE4, or with anti-ERK3 antibody immunodepleted on His₆-ERK3-GST-immobilized beads or empty beads. Staining of ERK3 was detected by immunofluorescence microscopy.

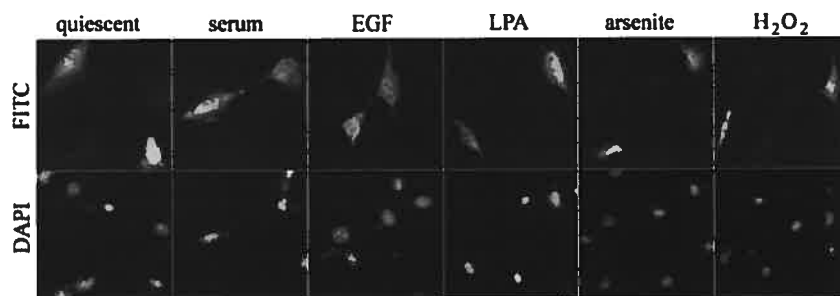
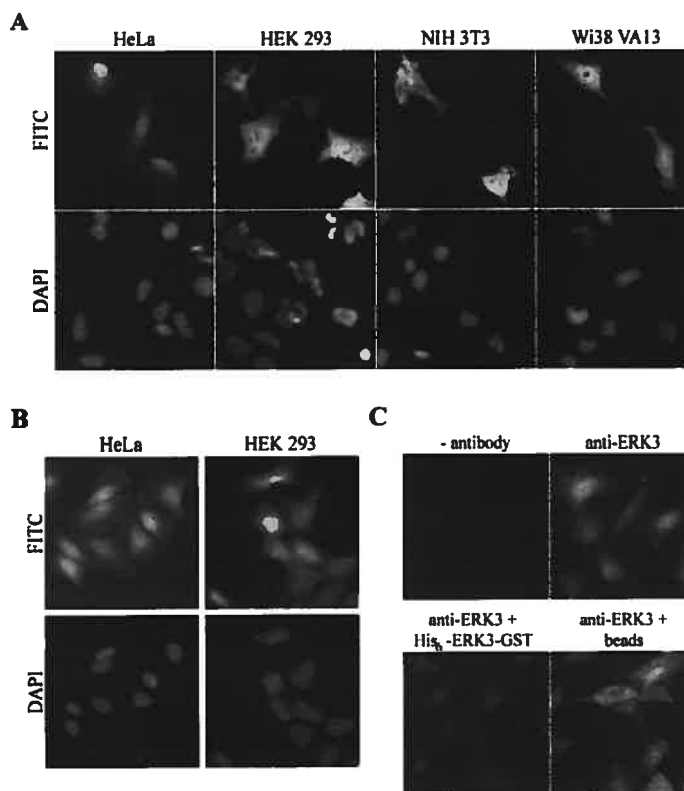


FIG. 2. Subcellular localization of ERK3 is not affected by common MAP kinase stimuli. NIH 3T3 fibroblasts were transfected with Myc-tagged ERK3 and serum-starved for 24 h (*quiescent*). The cells were then stimulated for 1 h with 10% serum, 50 ng/ml epidermal growth factor (*EGF*), 10 μ M lysophosphatidic acid (*LPA*), 0.5 mM sodium arsenite, or 600 μ M H_2O_2 . The localization of ectopically expressed ERK3 was analyzed by fluorescence microscopy after staining with anti-Myc antibody.

cells and to induce neurite extension in PC12 cells (20). Reciprocally, sequestration of ERK1/2 in the cytoplasm by forced expression of a catalytically inactive MAP kinase phosphatase-3 mutant inhibits Elk1-dependent gene transcription and prevents S phase entry in fibroblasts (21). In astrocytes, the increased cell proliferation observed upon inactivation of the PEA-15 gene is associated with constitutive nuclear localization of ERK1/2 and augmented *c-fos* mRNA expression (12).

ERK3 defines a distinct subfamily of MAP kinases which also includes the related kinase p63^{MAPK} (22). ERK3 is a 100-kDa protein that shares about 50% identity with ERK1/2 in the kinase domain but presents structural features that distinguish it from conventional MAP kinases (23–25). Notably, ERK3 contains the sequence SEG instead of the conserved TXY motif in the activation loop and possesses a long C-terminal

extension. Little is known about the regulation and functions of ERK3. Interestingly, we have observed recently that overexpression of ERK3 in NIH 3T3 cells markedly inhibits DNA synthesis (26). Because of the importance of MAP kinase localization in the control of their activity, we have examined the subcellular distribution and nucleocytoplasmic transport of ERK3. We show that ERK3 is present in the cytoplasmic and nuclear compartments in resting cells and that localization is not affected by common mitogenic or stress stimuli. The cytoplasmic localization of ERK3 requires active nuclear export by a CRM1-dependent mechanism. Contrary to other MAP kinase family members, ERK3 binds directly to the CRM1 receptor *in vitro*. Importantly, we provide evidence that nucleocytoplasmic shuttling of ERK3 regulates its inhibitory action on cell cycle progression.

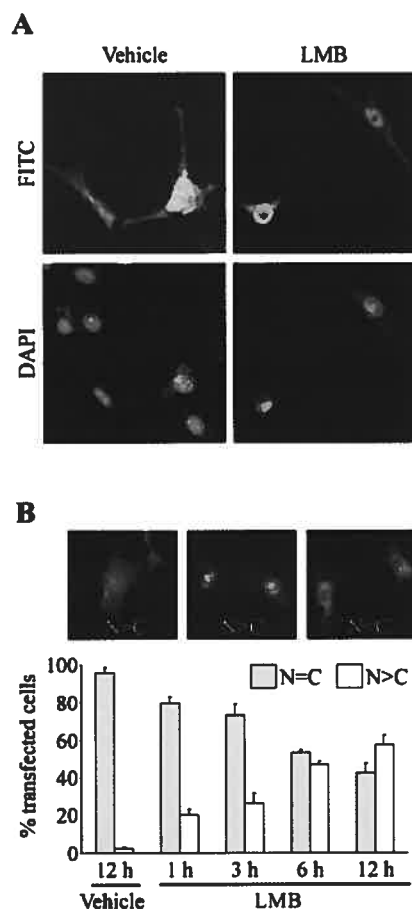


FIG. 3. Effect of LMB on the subcellular localization of ERK3. A, NIH 3T3 cells were transiently transfected with Myc-tagged ERK3. Exponentially proliferating cells were then treated with vehicle alone or 1 ng/ml LMB for 12 h. The localization of ectopic ERK3 was determined by fluorescence microscopy after staining with anti-Myc antibody. B, quantitative analysis of the localization data. NIH 3T3 cells transfected with Myc-ERK3 were incubated with LMB for the indicated times. The cellular localization of ERK3 was scored in three categories: uniform distribution between the cytoplasm and nucleus ($N = C$), predominantly nuclear ($N > C$), or predominantly cytoplasmic ($N < C$). At least 150 cells were scored for each coverslip. The bar graph represents the mean \pm S.E. of two independent experiments.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture and Transfections. NIH 3T3 fibroblasts were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% calf serum and antibiotics. HEK293 and HeLa cells were cultured in minimum essential medium containing 10% fetal bovine serum plus antibiotics. W38 VA13 human fibroblasts were grown in RPMI medium containing 10% fetal bovine serum and antibiotics. For transfection, NIH 3T3 cells were plated onto glass coverslips coated with poly-L-lysine (Sigma) at a density of 40,000 cells/well of 6-well plates. After overnight growth, the cells were transiently transfected with LipofectAMINE reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The total amount of transfected plasmid DNA was 2 μ g/well. The cells were harvested 48 h after transfection and processed for immunofluorescence as described below.

Reagents and Antibodies. LMB was a gift from M. Yoshida (University of Tokyo). 5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdUrd) was from Roche Diagnostics. Commercial antibodies were obtained from the following suppliers: monoclonal anti-Myc (9E10) and polyclonal anti-HA (Y-11) from Santa Cruz Biotechnology; monoclonal anti-CRM1 from Transduction Laboratories; monoclonal anti-BrdUrd from Oncogene Research Prod-

ucts; polyclonal anti-GST from ABR Affinity Bioreagents; fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated donkey anti-mouse and anti-rabbit IgG and TRITC-conjugated donkey anti-mouse and anti-rabbit IgG from Jackson ImmunoResearch. The polyclonal ERK2 antiserum α Icp42 has been described (27). A polyclonal antibody to the C terminus of ERK3 (E3-CTE4) was obtained by immunization of rabbits with purified His₆-E3₃₆₅₋₇₂₁-GST fusion protein (26). The ERK3 phosphoserine 189-specific antibody was generated in collaboration with Cell Signaling Technology by immunizing rabbits with a synthetic phosphoserine 189 peptide coupled to keyhole limpet hemocyanin (26).

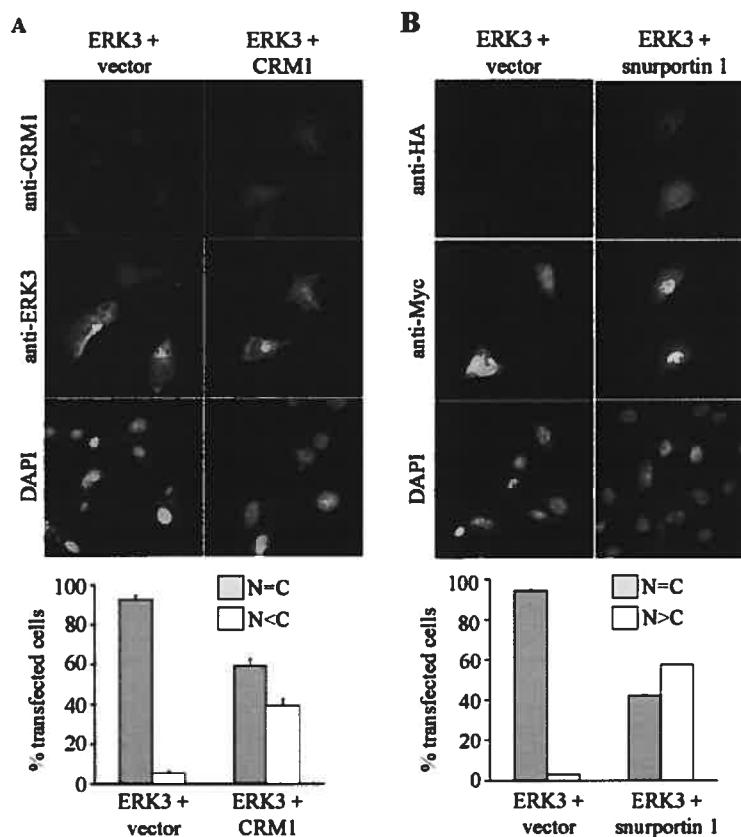
Plasmid Constructs and Mutagenesis. All recombinant ERK3 DNA constructs were derived from the human cDNA sequence (25). Mutations were introduced into ERK3 cDNA using the Altered Sites *in vitro* mutagenesis system (Promega). pcDNA3-Myc₆ was constructed by inserting the Myc₆ epitope sequence derived from pCS3MT (provided by A. J. Waskiewicz, Fred Hutchinson Cancer Research Center) into the HindIII/EcoRI sites of pcDNA3 (Invitrogen). pcDNA3-Myc₆-ERK3 was constructed by first inserting an EcoRI site at the initiator ATG codon of ERK3 cDNA by site-directed mutagenesis, followed by subcloning of the ERK3 coding sequence into the EcoRI site of pcDNA3-Myc₆. The K49A/K50A (kinase-dead) and Ser-189 mutants of ERK3 were obtained by site-directed mutagenesis and subcloned into pcDNA3-Myc₆ vector. The ERK3₁₋₃₆₅ Δ , ERK3₁₋₃₉₆ Δ , and ERK3₁₋₆₄₂ Δ deletion mutants were generated by PCR using pcDNA3-HA-ERK3 as template and subcloned into the EcoRI/XbaI sites of pcDNA3-Myc₆. To construct the Rev-ERK3-GFP fusion plasmids, the ERK3 regions of interest were amplified by PCR and subcloned into the AgeI site of pRev(1.4)-GFP (28). To generate NLS-ERK3, two annealed oligonucleotides coding for the SV40 NLS were subcloned into the NcoI/EcoRI sites of pCS3MT. The sequence PPKKIRKRL replaced the sixth Myc epitope of the Myc₆ tag. The NES-ERK3 was engineered similarly by subcloning two annealed oligonucleotides coding for MEK1 NES (LQKKLELELE) into the NcoI/EcoRI sites of pCS3MT. Then, the coding sequence of ERK3 was ligated in-frame into the EcoRI site of the modified pCS3MT vectors. The ERK3-NLS was obtained by subcloning oligonucleotides coding for SV40 NLS into the EcoRI/XbaI sites of pCS3MT followed by ligation of the ERK3 sequence into the EcoRI site of the vector. To generate the NES-ERK3-NLS construct, oligonucleotides coding for SV40 NLS were first subcloned into the EcoRI/XbaI sites of pCS3MT-NES followed by insertion of ERK3 coding sequence into the EcoRI site of the vector to yield pCS3MT-NES-ERK3-NLS. All mutations were confirmed by DNA sequencing. pcDNA3 vector encoding Myc-tagged CRM1 was kindly provided by C. Dargemont (Institut Jacques Monod, Paris). To construct the pcDNA3-HA-snrp1 expression vector, the snrporin 1 coding sequence from pQE60-snrp1 (29) was amplified by PCR with EcoRI flanking sites and subcloned into EcoRI-digested pcDNA3-HA. pET15b-CRM1 was constructed by subcloning the human CRM1 cDNA from pET3a-CRM1 (30) into the NdeI/BamHI sites of pET15b (Novagen). Sequence of the primers used for PCR and details about the cloning strategies are available upon request.

Preparation of Recombinant Proteins. The recombinant His₆-CRM1, His₆-GST, and His₆-ERK3-GST proteins were expressed in *Escherichia coli* and purified by affinity chromatography on nickel-nitrilotriacetic acid resin (Qiagen) as described (31). His-tagged canine RanQ69L was kindly provided by D. Görlich (Universität Heidelberg) and purified as described (32).

Immunofluorescence Microscopy. Cells grown on glass coverslips were washed twice with ice-cold PBS, and then fixed with 3.7% paraformaldehyde and PBS for 20 min at 37 °C. After quenching in 0.1 M glycine and PBS for 5 min, the cells were permeabilized by incubation in 0.1% Triton X-100 and PBS for 5 min at room temperature and then blocked in 1% bovine serum albumin and PBS for 1 h at 37 °C or overnight at 4 °C. For detection of ectopically expressed ERK3, the cells were stained for 1 h at 37 °C with anti-Myc primary antibody followed by incubation with FITC-conjugated anti-mouse IgG. Transfected HA-tagged snrporin 1 was visualized using a polyclonal anti-HA primary antibody. For localization of endogenous ERK3, the cells were stained with polyclonal anti-ERK3 antibody E3-CTE4 (1:50 dilution) followed by incubation with FITC-conjugated anti-rabbit IgG. CRM1 was detected by staining with a monoclonal anti-CRM1 antibody. Cells were mounted on glass slides using mounting medium (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 5 mg/ml N-propylgallate, 50% glycerol) and viewed with fluorescence microscopy (Leica DM RB). A minimum of 150 cells was scored for each coverslip.

CRM1 Binding Assay. *In vitro* CRM1 binding assays were performed as described (33) with some modifications. The recombinant proteins His₆-GST or His₆-ERK3-GST (3–10 μ g) were bound to glutathione-Sepharose beads (Amersham Biosciences) preblocked for 1 h

FIG. 4. CRM1 promotes the nuclear export of ERK3. *A*, NIH 3T3 cells were transiently transfected with 1 μ g of Myc-tagged ERK3 in combination with 1 μ g of Myc-CRM1 or empty vector as indicated. After 48 h, the cellular localization of ERK3 and CRM1 was analyzed by fluorescence microscopy after staining with anti-ERK3 and anti-CRM1 antibodies, respectively (*top panel*). The localization of ERK3 was analyzed quantitatively as described in Fig. 3 (*bottom panel*). The bar graph represents the mean \pm S.E. of two independent experiments. *B*, NIH 3T3 cells were transiently transfected with 1 μ g of Myc-tagged ERK3 along with 1 μ g of HA-snrurportin 1 or empty vector as indicated. The localization of ectopically expressed ERK3 and snrurportin 1 was analyzed by fluorescence microscopy after staining with anti-Myc and anti-HA antibodies, respectively.



with 1% bovine serum albumin. The beads were then washed with CRM1 binding buffer (50 mM Hepes, pH 7.9, 200 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM β -mercaptoethanol, 0.4% Tween 20, 0.4% nonfat dry milk, 1 mM GTP) and used as affinity matrices. His₆-CRM1 was either expressed in *E. coli* or translated *in vitro* from pET15b-CRM1 in the presence of [³⁵S]methionine using the TNT T7 Coupled Wheat Germ Extract System (Promega) and incubated with the beads for 3 h at 4 °C in a total volume of 388 μ l of binding buffer. Where indicated, bacterially expressed His-tagged RanQ69L was added at a final concentration of 0.4 μ M. The beads were recovered by mild centrifugation and washed four times with binding buffer. Bound proteins were resolved by SDS-PAGE and visualized by autoradiography or immunoblotting with anti-CRM1 antibody. The total amount of His₆-GST or His₆-ERK3-GST proteins was monitored by immunoblotting with anti-GST antibody.

BrdUrd Incorporation Studies—For analysis of BrdUrd incorporation, NIH 3T3 fibroblasts were seeded at 40,000 cells/well onto poly-L-lysine-coated glass coverslips placed in 6-well plates and transfected with expression plasmids (2 μ g of DNA) as described above. Exponentially growing cells were then incubated for 16 h with 10 μ M BrdUrd. The cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde and PBS for 20 min at 37 °C. After quenching in 0.1 M glycine for 5 min, the cells were permeabilized by incubation in 0.1% Triton X-100 for 5 min at room temperature. Nonspecific sites were blocked in 1% bovine serum albumin and PBS for 60 min at 37 °C. The transfected proteins were detected by staining with anti-Myc as primary antibody and FITC-conjugated anti-rabbit IgG as secondary reagent. Then, DNA was denatured with 2 N HCl for 10 min at room temperature. Staining for BrdUrd incorporation was performed by incubating cells for 1 h at 37 °C with anti-BrdUrd antibody followed by incubation with rhodamine-conjugated anti-mouse IgG as secondary reagent. The nuclei were visualized by DAPI (1 μ M final concentration) staining. Cell samples were analyzed by fluorescence microscopy. The results are expressed as the percentage of transfected cells showing nuclear labeling for BrdUrd.

RESULTS

Localization of ERK3 in the Cytoplasmic and Nuclear Compartments—To determine the subcellular distribution of ERK3, we transiently expressed a Myc-tagged construct of ERK3 in various cell lines and analyzed its localization by immunofluorescence microscopy with 9E10 antibody. In the cell lines tested, Myc-ERK3 was distributed evenly in the cytoplasmic and nuclear compartments, with the exception of HeLa cells where the kinase was enriched in the nucleus (Fig. 1A). To verify that localization of ectopically expressed ERK3 reflects that of the endogenous protein, we examined the distribution of endogenous ERK3 in cells using a polyclonal anti-ERK3 antibody. As shown in Fig. 1, B and C, ERK3 staining was detected in both the cytoplasm and nucleus of exponentially proliferating cells. Preincubation of the antiserum with His₆-ERK3-GST fusion protein immobilized to nickel-nitrilotriacetic acid beads, but not with empty beads, almost completely abolished the fluorescence signal, confirming the specificity of the antibody (Fig. 1C). No reactivity was detected in the absence of primary antibody.

Stimulation of cells with mitogenic factors causes the translocation of ERK1/2 MAP kinases from the cytoplasm to the nucleus (13–15). To determine whether the cellular localization of ERK3 was regulated by extracellular stimuli, NIH 3T3 cells were transfected with Myc-ERK3 and exposed to different growth factors or chemical stresses (Fig. 2). In quiescent cells, ERK3 was localized in both the cytoplasmic and nuclear compartments, whereas ERK2 was present exclusively in the cytoplasm. Stimulation with serum growth factors, epidermal

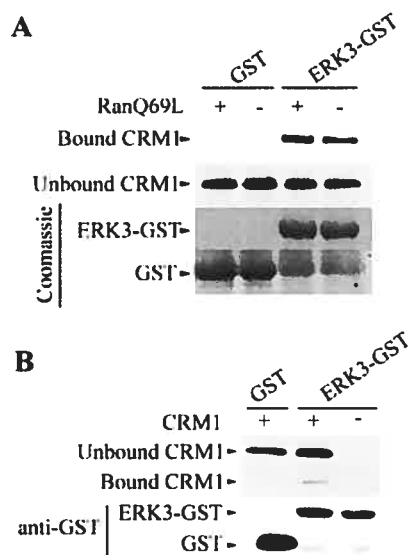


FIG. 5. ERK3 interacts with CRM1 *in vitro*. *A*, CRM1 was translated *in vitro* from a wheat germ extract in the presence of [³⁵S]methionine and incubated for 3 h with His₆-GST or His₆-ERK3-GST fusion proteins bound to glutathione-agarose beads. Where indicated, 0.4 μM RanQ69L was added to the reaction. Bound proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by fluorography. The lower panels show the Coomassie staining of the starting material. *B*, recombinant His₆-CRM1 purified from *E. coli* was incubated with His₆-GST or His₆-ERK3-GST fusion proteins as above. Bound material was analyzed by immunoblotting with anti-CRM1 antibody.

growth factor, or the G protein-coupled receptor agonist lysophosphatidic acid for 5 min to 3 h did not modify the subcellular distribution of ERK3. Under the same conditions, ERK2 was quantitatively relocalized to the nucleus (data not shown). Similarly, exposure to the oxidant H₂O₂ or to arsenite had no detectable effect on ERK3 localization. These experiments indicate that the cellular localization of ERK3 is not influenced by common MAP kinase stimuli.

ERK3 Is Actively Exported to the Cytoplasm by a CRM1-dependent Mechanism—Treatment of cells with the protein synthesis inhibitor cycloheximide does not modify the cellular distribution of ERK3, suggesting that the cytoplasmic localization of the kinase is ensured by a nuclear export mechanism (data not shown). To test the possibility that ERK3 is actively exported from the nucleus by the receptor CRM1 (also known as exportin 1) (34–36), we treated cells with the antibiotic LMB, a specific inhibitor of CRM1-dependent transport (37). Addition of LMB to exponentially proliferating NIH 3T3 cells caused the progressive accumulation of ERK3 in the nucleus (Fig. 3, *A* and *B*). Quantification of the results revealed that ERK3 staining was primarily nuclear in less than 5% of control cells, whereas ~60% of cells displayed predominant nuclear staining after 12 h of treatment with LMB (Fig. 3*B*). To establish further the role of CRM1 in ERK3 transport, we tested the effect of CRM1 overexpression on the cellular localization of the kinase. As shown in Fig. 4*A*, ectopic expression of CRM1 promoted the cytoplasmic relocalization of ERK3 in 40% of cotransfected cells, again suggesting that CRM1 directs ERK3 nuclear export.

Snurportin 1 is an adaptor protein that mediates nuclear import of m⁷G-capped uridine-rich snRNPs by the importin-β receptor pathway (29). After each round of import, snurportin 1 must return to the cytoplasm, and this recycling is mediated by the export receptor CRM1 (30). Notably, snurportin 1 binds

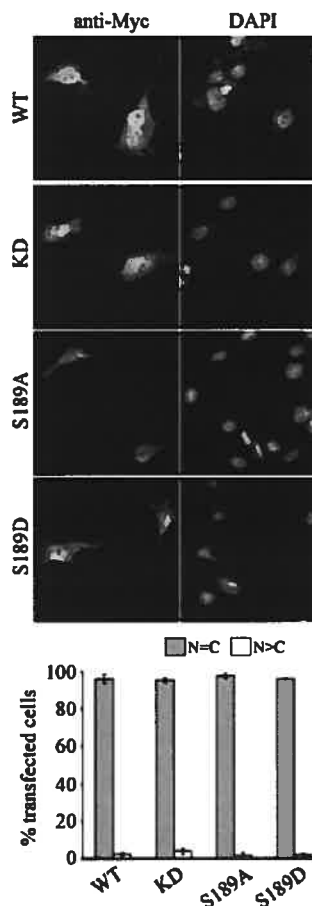


FIG. 6. Nuclear export of ERK3 is independent of activation loop phosphorylation or kinase activity. NIH 3T3 cells were transiently transfected with the indicated Myc-tagged ERK3 constructs. The localization of ectopically expressed ERK3 was determined by fluorescence microscopy after staining with anti-Myc antibody. Quantitative analysis of the localization data is presented in the bar graph, which represents the mean ± S.E. of two independent experiments.

CRM1 with a much higher affinity than the leucine-rich NES-containing protein Rev and competes with CRM1-dependent RNA export pathways *in vivo*. From this, it has been suggested that sensitivity toward competition by snurportin 1 would represent a stringent test for CRM1 requirement (30). We thus exploited this idea to test further the involvement of CRM1 in mediating ERK3 export. When snurportin 1 was coexpressed with ERK3 in NIH 3T3 cells, the localization of ERK3 became predominantly nuclear (Fig. 4*B*). Quantification of the results indicated that around 60% of cells cotransfected with snurportin 1 display enriched nuclear staining for ERK3, in contrast to less than 5% of control cells.

We used an *in vitro* binding assay to determine whether CRM1 interacts directly with ERK3. CRM1 was translated *in vitro* with a wheat germ extract (to eliminate the contribution of endogenous lysate proteins) and incubated with *E. coli*-purified His₆-ERK3-GST recombinant protein immobilized to glutathione-agarose beads, in the absence or presence of active RanQ69L. Labeled CRM1 bound to immobilized ERK3, and the binding was enhanced by the presence of RanQ69L (Fig. 5*A*). In contrast, very weak binding of His₆-GST was observed under these conditions. Recombinant CRM1 purified from *E. coli* also

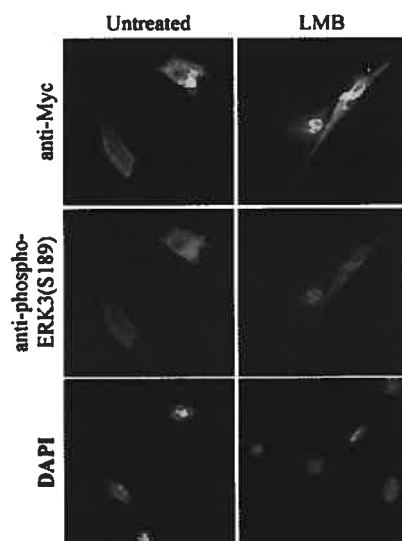


FIG. 7. ERK3 phosphorylated on Ser-189 has the same cellular distribution profile as total ERK3 protein. NIH 3T3 cells were transiently transfected with Myc-tagged ERK3. The subcellular localization of ectopic ERK3 and Ser-189-phosphorylated ERK3 was determined by fluorescence microscopy after staining with anti-Myc and anti-phospho-ERK3(S189) antibodies, respectively.

bound to His₆-ERK3-GST, confirming that the interaction between the two proteins is direct (Fig. 5B). Altogether, our results demonstrate that ERK3 is actively exported to the cytoplasm by the exportin CRM1.

Activation Loop Phosphorylation and Kinase Activity of ERK3 Are Not Required for Its Nuclear Export—It has been proposed that ERK1/2 dephosphorylation is required for its nuclear export by MEK (18). To determine whether activation loop phosphorylation and kinase activity of ERK3 influence its cellular distribution, we examined the behavior of various ERK3 mutants. The two lysine residues present in subdomain II of ERK3 were mutated to alanine to generate a kinase-dead enzyme, and the activation loop Ser-189 was replaced by either alanine (S189A) or by a phosphomimetic aspartate (S189D) residue. ERK3 has been shown to be phosphorylated on Ser-189 *in vivo* (26, 38). No change in the cellular localization of ERK3 was observed for any of these mutants (Fig. 6), suggesting that nuclear export of ERK3 is independent of enzymatic activation and Ser-189 phosphorylation/dephosphorylation. To substantiate this, we examined the localization of phosphorylated ERK3 using a phosphoserine 189-specific antibody. In proliferating NIH 3T3 fibroblasts, the Ser-189-phosphorylated form of ERK3 was distributed evenly between the cytoplasm and nucleus (Fig. 7). Treatment of cells with LMB led to a redistribution of phosphorylated ERK3 to the nuclear compartment. The immunostaining pattern of Ser-189-phosphorylated ERK3 was superimposable to that of total ERK3, consistent with the idea that activation loop phosphorylation does not regulate ERK3 transport.

Mapping the Regions of ERK3 Conferring Nuclear Export Activity—CRM1 has been identified as the receptor for leucine-rich NES proteins (2, 4). This type of export signal is characterized by the presence of four critically spaced hydrophobic residues, most often represented by leucine (39). ERK3 possesses several motifs that resemble the leucine-rich NES (Table I). To address the contribution of these sequences to the nuclear export of ERK3, we mutated two of the characteristic hydrophobic residues within eight different NES-

TABLE I
Subcellular localization of ERK3 with mutations in leucine-rich NES-like sequences

The localization of ectopically expressed ERK3 was determined by fluorescence microscopy after staining with anti-Myc antibody. The percentage of cells with a uniform distribution of ERK3 between the cytoplasm and nucleus (N = C) was scored. Results represents the mean \pm S.E. of two experiments. Hydrophobic amino acids are in bold, and residues mutated to alanine are underlined.

Sequence mutated	Cells with N = C %
Wild-type	92.5 \pm 2.4
⁵⁹ VKHALREIKII ⁶⁹	95.1 \pm 2.3
⁹¹ LTDDVGSLETELNSV ¹⁰⁴	90.9 \pm 0.2
¹⁴⁸ VLHRDLKPANLFI ¹⁶⁰	91.8 \pm 1.2
¹⁶⁰ INTEDLVLKIGD ¹⁷¹	93.1 \pm 0.7
³³⁴ IEDEVDDLMD ³⁴⁵	93.4 \pm 0.9
⁵²⁷ FDSFIAGTIQLSS ⁵³⁹	91.3 \pm 2.8
⁵⁵⁷ VSQLELKLISK ⁵⁶⁸	96.1 \pm 0.6
⁶⁸⁹ LFNKQLESIGIP ⁶⁸⁰	94.2 \pm 3.0

like motifs and analyzed the cellular localization of the resulting mutants. Immunofluorescence analysis revealed that all of the individual ERK3 mutants have a cellular distribution similar to that of the wild-type protein (Table I), indicating that either none of these motifs has export activity or that mutation of a single motif is not sufficient to disrupt CRM1-mediated export.

To identify the export signal of ERK3, we also generated a series of truncations of the C-terminal extension of the kinase (Fig. 8A). Deletion of the last 179 amino acids of ERK3 had no significant impact on its cellular localization (Fig. 8B). However, further deletion of the region comprised between amino acids 399 and 542 (ERK3₁₋₃₉₈ Δ) resulted in the nuclear accumulation of the protein in \sim 25% of transfected cells. The smaller ERK3₁₋₃₆₅ Δ mutant had the same cellular distribution as the 1-398 deletion mutant. These results suggest that a functional export signal may reside within residues 399-542 of ERK3. However, we cannot exclude the possibility that deletion of residues 399-542 accelerates the nuclear import of ERK3. To distinguish between these possibilities, we tested the intrinsic export activity of different regions of ERK3, encompassing amino acids 399-542, using the Rev-GFP nuclear export assay (28). The ERK3 region comprising amino acids 297-542 displayed an export activity comparable with that of I κ B NES in this assay (Fig. 8C). Removal of amino acids 297-365 or 366-542 abolished the export activity, indicating that either the two fragments interact synergistically to form a functional export sequence or that the global conformation of the ERK3₂₉₇₋₅₄₂ region is important for receptor binding and nuclear export. We conclude from these data that residues 297-542 of ERK3 contain nuclear export activity.

ERK3 Is Imported in the Nucleus by a Temperature-dependent Mechanism—The molecular mass of ERK3 (\sim 100 kDa) suggests that the protein enters the nucleus by an active transport mechanism. To address this point further, we tested the temperature dependence of ERK3 nuclear import. Exponentially proliferating NIH 3T3 cells transfected with Myc-ERK3 were treated with LMB at either 37 or 4 $^{\circ}$ C, and the localization of the protein was monitored by immunofluorescence. As shown in Fig. 9, ERK3 accumulated in the nucleus of 25% of cells after 1 h of exposure to LMB at 37 $^{\circ}$ C. However, the nuclear accumulation of ERK3 was completely abrogated at low temperature, implying that ERK3 is imported by an active mechanism.

ERK3 does not contain a classical single or bipartite NLS. However, a lysine-rich sequence is found between residues 489 and 494 of human ERK3 (25). To test whether this region constitutes an authentic NLS, we examined the subcellular

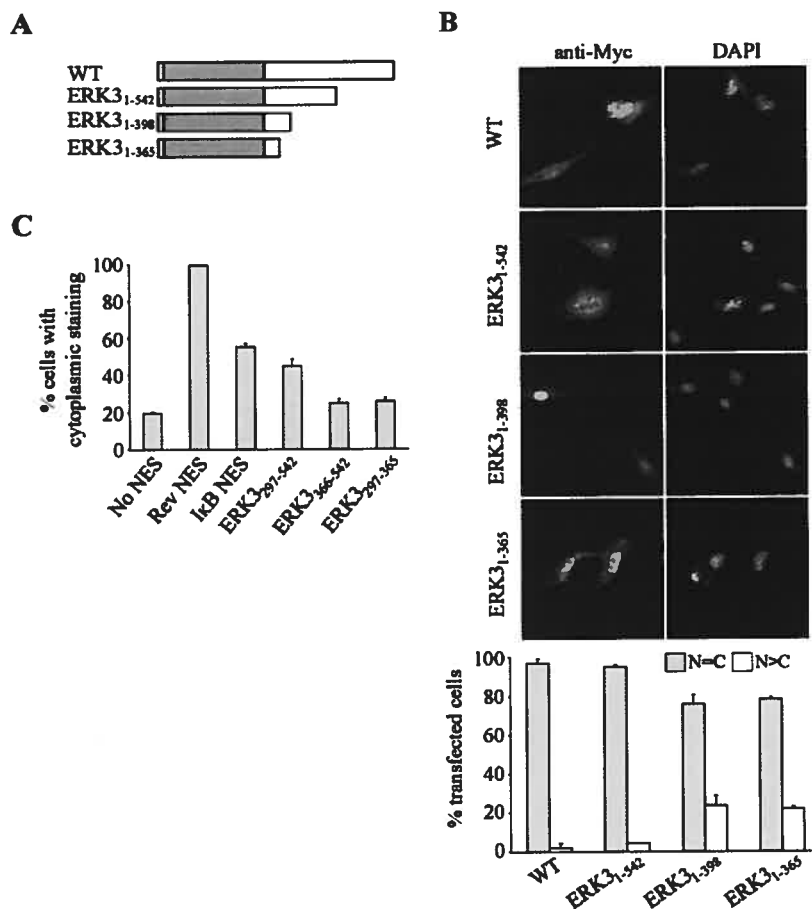


FIG. 8. Identification of a region in ERK3 conferring nuclear export activity. *A*, schematic representation of the constructs. The catalytic domain of ERK3 is shaded. *B*, NIH 3T3 cells were transiently transfected with the indicated Myc-tagged ERK3 constructs. The localization of ectopically expressed ERK3 was determined by fluorescence microscopy after staining with anti-Myc antibody. Quantitative analysis of the localization data is presented in the bar graph, which represents the mean \pm S.E. of two independent experiments. *C*, nuclear export assay. NIH 3T3 cells were transfected with the indicated Rev-GFP fusion constructs. After 48 h, the cells were treated for 3 h with 5 μ g/ml actinomycin D to block nuclear import of Rev and 15 μ g/ml cycloheximide to inhibit new protein synthesis. The cells were fixed and analyzed by fluorescence microscopy to score the percentage of cells with cytoplasmic GFP localization. Similar results were obtained in three independent experiments.

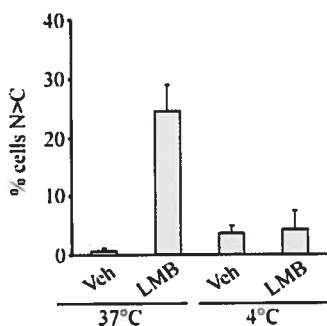


FIG. 9. Nuclear import of ERK3 is sensitive to temperature. NIH 3T3 cells transfected with Myc-tagged ERK3 were treated with vehicle alone or 1 ng/ml LMB for 1 h at 37 or 4 °C as indicated. The localization of ERK3 was analyzed quantitatively as described in Fig. 3. The bar graph represents the mean \pm S.E. of two independent experiments.

localization of a mutant ERK3 protein with alanine substitutions of lysine residues 489, 490, and 492. Mutation of these basic amino acids had no detectable influence on the cellular

distribution of ERK3 (data not shown), suggesting that an adaptor molecule or a distinct class of signal mediates the nuclear import of the kinase.

Nucleocytoplasmic Shuttling of ERK3 Is Necessary for Its Inhibitory Effect on DNA Synthesis—We have shown recently that overexpression of ERK3 inhibits S phase entry in NIH 3T3 fibroblasts (26). To determine whether the subcellular localization of ERK3 regulates its ability to inhibit cell cycle progression, we introduced by mutagenesis a strong NLS (from SV40) or NES (from MEK1) at the N terminus or C terminus of ERK3 to force its expression in the nuclear or cytoplasmic compartment. As predicted, addition of the SV40 NLS to ERK3 was sufficient to induce its nuclear accumulation in a high proportion of cells, whereas the NES-ERK3 fusion protein localized predominantly to the cytoplasm (Fig. 10A). To evaluate the impact of these ERK3 constructs on the cell cycle, exponentially proliferating NIH 3T3 cells were incubated for 16 h with BrdUrd to monitor S phase entry (Fig. 10, B and C). Ectopic expression of p27^{Kip1}, used as positive control, markedly decreased the number of BrdUrd-positive cells. As observed previously, overexpression of ERK3 strongly inhibited entry of

42622

CRM1-mediated Nuclear Export of ERK3

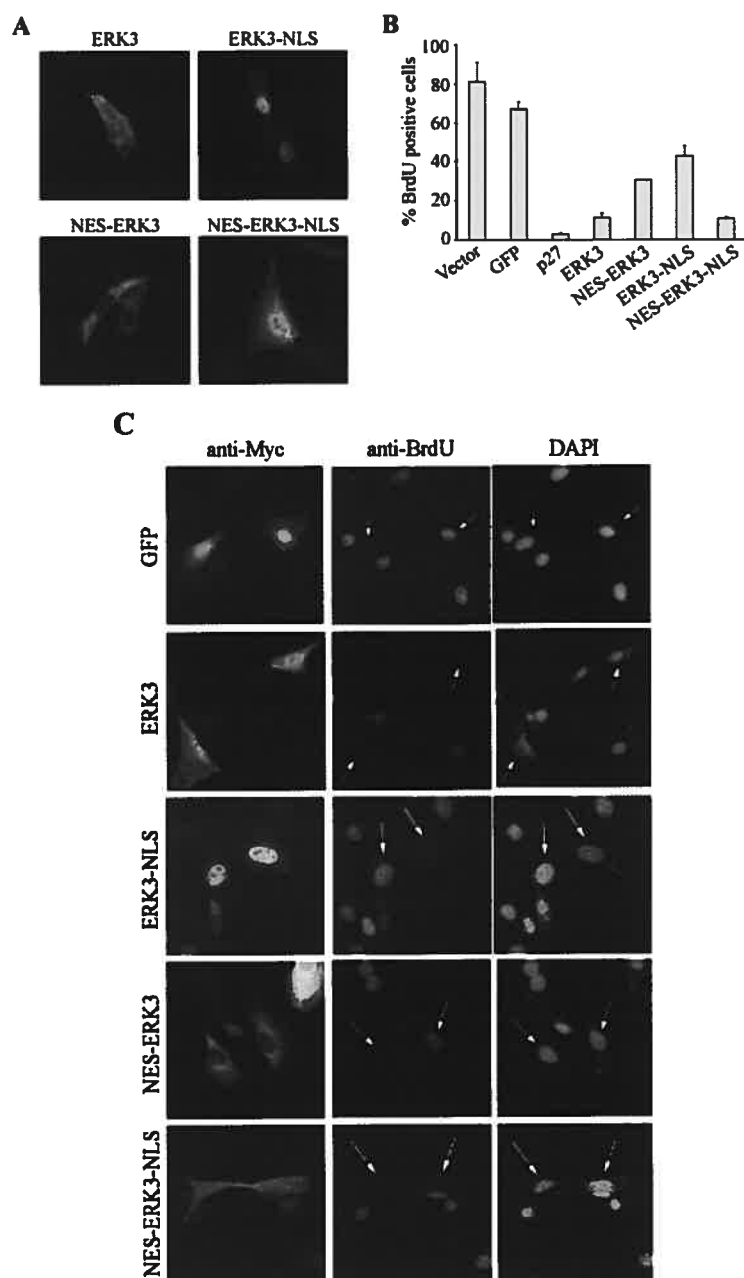


FIG. 10. Nucleocytoplasmic shuttling of ERK3 regulates its inhibitory action on cell cycle progression. *A*, the subcellular localization of ectopically expressed ERK3-NLS, NES-ERK3, and NES-ERK3-NLS fusion proteins in proliferating NIH 3T3 fibroblasts was analyzed by fluorescence microscopy. *B*, NIH 3T3 cells were transiently transfected with the indicated constructs. BrdUrd was then added to exponentially proliferating cells for 16 h prior to fixation and staining. The percentage of transfected cells (Myc-positive) that incorporated BrdUrd was evaluated by fluorescence microscopy. *C*, representative examples of the results shown in *B*.

cells into S phase. Notably, the ERK3-NLS (or NLS-ERK3) and NES-ERK3 (or ERK3-NES) fusion proteins were much less effective in inducing cell cycle arrest than the wild-type kinase, suggesting that nucleocytoplasmic shuttling of ERK3 may be important for its function (Fig. 10*B*). To test this hypothesis further, we made an ERK3 construct in which we added both the NES and NLS to restore the shuttling of the kinase between the nuclear and cytoplasmic compartments (Fig. 10*A*). Overexpression of NES-ERK3-NLS was found to inhibit S phase entry to the same extent as the wild-type ERK3 protein (Fig. 10, *B* and *C*). We conclude from these results that nucle-

ocytoplasmic shuttling of ERK3 is required for its negative regulatory action on G₁ phase progression.

DISCUSSION

Nuclear Export of ERK3 by the Exportin CRM1—We report here that the atypical MAP kinase family member ERK3 constitutively localizes to the cytoplasm and nucleus in a variety of cell lines. No significant change in the subcellular distribution of ERK3 was observed in response to common mitogenic stimuli or chemical stresses. In a previous study, Cheng *et al.* (40) have reported that ERK3 is a constitutive nuclear kinase in

exponentially growing, quiescent, or growth factor-stimulated cells. However, these authors examined the localization of a truncated 62-kDa protein with a different C terminus, as a result of a cloning artifact, which renders the results of this study difficult to interpret. We provide compelling evidence that the cytoplasmic localization of ERK3 is dependent in large part on its active nuclear export by the CRM1 receptor. CRM1 has the broadest range of substrates among the exportin receptors and has been shown to mediate the nuclear export of numerous signaling molecules (41), including yeast and mammalian MAP kinases (18, 42–44). Our conclusion is supported by the following evidence. First, treatment of NIH 3T3 fibroblasts with LMB, a potent and selective inhibitor of CRM1 function (37, 45), causes the nuclear accumulation of ERK3 in ~60% of cells. Second, overexpression of CRM1 promotes the cytoplasmic relocation of ERK3 in a high percentage of cells. Third, overexpression of snurportin 1, which binds CRM1 with an affinity 50-fold higher than the NES-containing Rev protein (30), competes with ERK3 export, resulting in the nuclear relocation of the kinase in around 60% of transfected cells. Finally, we show that recombinant ERK3 directly binds to CRM1 *in vitro*. It is noteworthy that ERK3 is the first member of the MAP kinase family for which a direct interaction with an exportin is demonstrated.

CRM1 was identified as the export receptor of proteins containing leucine-rich NESs (34–36). This export signal is defined as a short stretch of ~10 amino acids with the consensus sequence LX₂₋₃(LIVFM)X₂₋₃LX(LI) (39). However, this consensus is insufficient to describe many NESs. Indeed, a recent alignment of 58 experimentally verified NES indicated that only 36% of the sequences fit the consensus (41). In this study, we have targeted eight hydrophobic motifs in ERK3 which resemble the leucine-rich NES (Table I). Mutation of either of these sequences alone was not sufficient to change the cellular localization of ERK3. One possible explanation for these results is that nuclear export of ERK3 may be mediated by more than one NES. There are several examples of proteins containing multiple functional NES, including actin (46), Cdc25 (47), adenomatous polyposis coli (48, 49), and the STE20-like kinase MST (50). In support of this idea, we found that deletion of amino acids 399–542 leads to the nuclear accumulation of ERK3 in ~25% of transfected cells, an effect that is partial compared with LMB treatment or snurportin 1 overexpression. Thus, several NESs, more or less diverging from the consensus leucine-rich NES, may interact synergistically with the CRM1 receptor and promote export. Alternatively, a novel type of export signal may mediate the binding of CRM1 to ERK3. Additional mutagenesis studies will be necessary to distinguish between these possibilities.

Regulation of ERK3 Is Distinct from Other MAP Kinase Family Members—Our findings highlight major differences in the regulation of ERK3 compared with other MAP kinase family members. In contrast to the classical MAP kinases ERK1/2, JNK, and p38, we observed that exposure of cells to common mitogenic stimuli or chemical stresses does not cause the relocation of ERK3 to a distinct subcellular compartment. In the case of ERK1/2, the closest homologs of ERK3, mitogenic stimulation leads to disruption of the MEK-ERK complex (51) and promotes the rapid uptake of ERK2 into the nucleus by a facilitated transport mechanism (16). The nuclear accumulation of ERK1/2 appears to be regulated mainly by nuclear export and interaction with nuclear anchor proteins. On the opposite, exposure of cells to stress triggers the nuclear export of p38 α MAP kinase to the cytoplasm in complex with phosphorylated MAP kinase-activated protein kinase-2 (43). Under the cellular conditions tested, ERK3 is constitutively localized

in both the cytoplasmic and nuclear compartments.

Another regulatory feature that distinguishes ERK3 from the MAP kinases ERK1/2 is the role of activation loop phosphorylation. Previous studies have suggested that dephosphorylation of nuclear ERK1/2 in the activation loop is necessary for binding to MEK1/2 and subsequent export from the nucleus (18). Consistent with this idea, thiophosphorylated ERK2 remains in the nucleus for a much longer time than unphosphorylated ERK2 after nuclear injection (52). Interestingly, we have shown that, contrary to ERK1/2, JNK, and p38, phosphorylation of ERK3 in the activation loop (Ser-189 residue) is constitutive in various cell lines.² This would argue against a major regulatory role of Ser-189 phosphorylation in ERK3 transport. In agreement with this, we show that replacement of Ser-189 of ERK3 by alanine or by a phosphomimetic aspartic acid does not influence the subcellular localization of the kinase in NIH 3T3 cells. Furthermore, the cellular staining pattern of Ser-189-phosphorylated ERK3 is indistinguishable from that of total ERK3.

Nucleocytoplasmic Shuttling of ERK3 Is Important for Regulation of Cell Cycle Progression—The subcellular localization of MAP kinases is a critical determinant of their transcriptional and biological responses. Enforced nuclear localization of ERK1/2 is sufficient to induce morphological transformation of rodent fibroblasts (19, 20), whereas sequestration of ERK1/2 in the cytoplasm by overexpression of inactive MAP kinase phosphatase-3 inhibits Elk1-dependent transcription and progression into S phase (21). Similarly, loss of cellular adhesion inhibits nuclear accumulation of ERK1/2 and impairs Elk-1 phosphorylation (53). We have shown recently that overexpression of ERK3 inhibits S phase entry in NIH 3T3 fibroblasts (26). It was therefore of interest to determine whether the subcellular localization of the kinase may impact on its regulatory effect on the cell cycle. To this end, we engineered fusion constructs of ERK3 with the strong SV40 NLS or the MEK1 NES to force the localization of the kinase in the nucleus or cytoplasm. Importantly, we observed that enrichment of ERK3 in the nuclear or cytoplasmic compartment markedly attenuates its ability to block S phase entry. Our results strongly suggest that nucleocytoplasmic shuttling of ERK3 is required for its negative regulatory action on cell cycle progression. Work is in progress to identify the cellular targets of ERK3.

Acknowledgments—We thank C. Dargemont, D. Görlich, B. R. Henderson, R. Lüthmann, A. J. Waskiewicz, and M. Yoshida for the generous gift of reagents. We also thank G. Rodier for help and discussion.

REFERENCES

1. Carmo-Fonseca, M. (2002) *Cell* **108**, 513–521
2. Mattaj, J. W., and Englmeier, L. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 265–306
3. Gorlich, D., and Kutay, U. (1999) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 607–660
4. Nakieli, S., and Dreyfuss, G. (1999) *Cell* **99**, 677–690
5. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., and Johnson, G. L. (1999) *Physiol. Rev.* **79**, 143–180
6. Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (2001) *Physiol. Rev.* **81**, 807–869
7. Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M. H. (2001) *Endocr. Rev.* **22**, 153–183
8. Cyert, M. S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 20805–20808
9. Volmat, V., and Pouyssegur, J. (2001) *Biol. Cell* **93**, 71–79
10. Fukuda, M., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1997) *EMBO J.* **16**, 1901–1908
11. Zuniga, A., Torres, J., Ubeda, J., and Pulido, R. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 21900–21907
12. Formstecher, E., Ramos, J. W., Fauquet, M., Calderwood, D. A., Hsieh, J. C., Canton, B., Nguyen, X. T., Barnier, J. V., Camonis, J., Ginsberg, M. H., and Chneiweiss, H. (2001) *Dev. Cell* **1**, 239–250
13. Chen, R. H., Sarnecki, C., and Blenis, J. (1992) *Mol. Cell Biol.* **12**, 915–927
14. Gonzalez, F. A., Seth, A., Raden, D. L., Bowman, D. S., Fay, F. S., and Davis, R. J. (1993) *J. Cell Biol.* **122**, 1089–1101
15. Lenormand, P., Sardet, C., Pages, G., L'Allemand, G., Brunet, A., and Pouyssegur, J. (1993) *J. Cell Biol.* **122**, 1079–1088
16. Whitehurst, A. W., Wilsbacher, J. L., You, Y., Luby-Phelps, K., Moore, M. S.,

² P. Coulombe and S. Meloche, unpublished data.

- and Cobb, M. H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 7496–7501
17. Lenormand, P., Brondello, J. M., Brunet, A., and Pouyssegur, J. (1998) *J. Cell Biol.* **142**, 625–633
 18. Adachi, M., Fukuda, M., and Nishida, E. (2000) *J. Cell Biol.* **148**, 849–856
 19. Fukuda, M., Gotoh, I., Adachi, M., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 32642–32648
 20. Robinson, M. J., Stippec, S. A., Goldsmith, E., White, M. A., and Cobb, M. H. (1998) *Curr. Biol.* **8**, 1141–1150
 21. Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Dowd, S., Keyse, S., and Pouyssegur, J. (1999) *EMBO J.* **18**, 664–674
 22. Turgeon, B., Lang, B. F., and Meloche, S. (2002) *Genomics* **80**, 673–680
 23. Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., DePinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H., and Yancopoulos, G. D. (1991) *Cell* **65**, 663–675
 24. Zhu, A. X., Zhao, Y., Moller, D. E., and Flier, J. S. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 8202–8211
 25. Meloche, S., Beatty, B. G., and Pellerin, J. (1996) *Oncogene* **13**, 1575–1579
 26. Coulombe, P., Rodier, G., Pelletier, S., Pellerin, J., and Meloche, S. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4542–4558
 27. Meloche, S. (1995) *J. Cell. Physiol.* **163**, 577–588
 28. Henderson, B. R., and Eleftheriou, A. (2000) *Exp. Cell Res.* **256**, 213–224
 29. Huber, J., Cronshagen, U., Kadokura, M., Marshallsay, C., Wada, T., Sekine, M., and Luhrmann, R. (1998) *EMBO J.* **17**, 4114–4126
 30. Paraskeva, E., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Huber, J., Kutay, U., Hartmann, E., Luhrmann, R., and Gorlich, D. (1999) *J. Cell Biol.* **145**, 255–264
 31. Coulombe, P., and Meloche, S. (2002) *Anal. Biochem.* **310**, 219–222
 32. Kutay, U., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Mattaj, I. W., and Gorlich, D. (1997) *EMBO J.* **16**, 1153–1163
 33. McBride, K. M., McDonald, C., and Reich, N. C. (2000) *EMBO J.* **19**, 6196–6206
 34. Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I. W. (1997) *Cell* **90**, 1051–1060
 35. Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., and Nishida, E. (1997) *Nature* **390**, 308–311
 36. Ossareh-Nazari, B., Bachevalerie, F., and Dargemont, C. (1997) *Science* **278**, 141–144
 37. Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E. P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (1998) *Exp. Cell Res.* **242**, 540–547
 38. Cheng, M., Zhen, E., Robinson, M. J., Ebert, D., Goldsmith, E., and Cobb, M. H. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 12057–12062
 39. Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Benson, R. E., Hua, J., and Cullen, B. R. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4207–4214
 40. Cheng, M., Boulton, T. G., and Cobb, M. H. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 8951–8958
 41. La Cour, T., Gupta, R., Rapacki, K., Skriver, K., Poulsen, F. M., and Brunak, S. (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**, 393–396
 42. Ferrigno, P., Posas, F., Koepf, D., Saito, H., and Silver, P. A. (1998) *EMBO J.* **17**, 5606–5614
 43. Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H. F., and Marshall, C. J. (1998) *Curr. Biol.* **8**, 1049–1057
 44. Gaits, F., and Russell, P. (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**, 1395–1407
 45. Nishi, K., Yoshida, M., Fujiwara, D., Nishikawa, M., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 6320–6324
 46. Wada, A., Fukuda, M., Mishima, M., and Nishida, E. (1998) *EMBO J.* **17**, 1635–1641
 47. Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (1999) *Genes Dev.* **13**, 1067–1072
 48. Henderson, B. R. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 653–660
 49. Neufeld, K. L., Nix, D. A., Bogerd, H., Kang, Y., Beckerle, M. C., Cullen, B. R., and White, R. L. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12085–12090
 50. Lee, K. K., and Yonehara, S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 12351–12358
 51. Adachi, M., Fukuda, M., and Nishida, E. (1999) *EMBO J.* **18**, 5347–5358
 52. Khokhlatchev, A. V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E., and Cobb, M. H. (1998) *Cell* **93**, 605–615
 53. Aplin, A. E., Stewart, S. A., Assoian, R. K., and Juliano, R. L. (2001) *J. Cell Biol.* **153**, 273–282

Bourses d'études:

1998-2000	Bourse de Maîtrise, Fond de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ-FCAR) (déclinée)
1998-2000	Bourse d'étude supérieure (maîtrise), CRSNG
2000-2003	Bourse de Doctorat, FRSQ (déclinée)
2000-2003	Bourse de Doctorat, IRSC
2003-2005	Bourse de Doctorat, FRSQ (déclinée)
2003-2005	Bourse de Doctorat, NCIC

Publications:

- 1) Servant MJ, **Coulombe P**, Turgeon B and Meloche S. (2000) Differential regulation of p27(Kip 1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J. Cell Biol.*, 148, 543-556.
- 2) Rodier G, Montagnoli A, Dimarcotullio L, **Coulombe P**, Draetta GF, Pagano M and Meloche S. (2001) p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis. *EMBO J.*, 20, 6672-6682. *
- 3) **Coulombe P** and Meloche S. (2002) Dual-tag prokaryotic vectors for enhanced expression of full-length recombinant proteins. *Anal Biochem.* 310, 219-222.
- 4) Gingras B, Rodier G, Giasson E, **Coulombe P**, Chassagne C and Meloche S. (2003) Expression of angiotensin type II receptor downregulates Cdk4 synthesis and inhibits cell-cycle progression. *Oncogene*, 22, 2633-42.
- 5) Pelletier S, Duhamel F, **Coulombe P**, Popoff MR and Meloche S. (2003) Rho-family of small GTPases are required for activation of JAK/STAT signalling by G-protein coupled receptors. *Mol Cell Biol.*, 23, 1316-1333. *
- 6) **Coulombe P**, Rodier G, Pelletier S, Pellerin J and Meloche S. (2003) Rapid turnover of Extracellular signal-Regulated Kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of MAP kinase regulation during cellular differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, 23, 4542-4558. *
- 7) 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, 42615-24.
- 8) **Coulombe P**, Rodier G, Bonneil E, Thibault P and Meloche S. (2004) N-terminal ubiquitination of Extracellular signal-Regulated Kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome. *Mol. Cell. Biol.*, 24, 6140-50. *
- 9) Rodier G, Makris C, **Coulombe P**, Scime A, Nakayama K, Nakayama KI and Meloche S. (2005) p107 inhibits G1 to S phase progression by down-regulating expression of the F-box protein SKP2. *J. Cell. Biol.*, 168, 44-66. *

Note: * : articles révisés par la "Faculty of 1000" (<http://www.f1000biology.com>).

Chapitre de livre:

Meloche S, Turgeon B, **Coulombe P**, Rodier G. (2004) The atypical ERK3 subfamily of mitogen-activated protein kinases. In: Pandalai SG, ed. *Recent Research Developments in Cell Biology*, 1. Kerala: Transworld Research Network, 71-81.



2023/04/18/02