

Rôle des kinases LAMMER et des phosphatases PTP1B/PTP61F dans la régulation des voies de signalisation médiées par l'insuline

Stéphane Tchankouo-Nguetcheu Tchankouo Nguetcheu

► To cite this version:

Stéphane Tchankouo-Nguetcheu Tchankouo Nguetcheu. Rôle des kinases LAMMER et des phosphatases PTP1B/PTP61F dans la régulation des voies de signalisation médiées par l'insuline. Génétique. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT: 2012PA11T067. tel-01124056

HAL Id: tel-01124056 https://theses.hal.science/tel-01124056

Submitted on 6 Mar 2015 $\,$

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : ED419, Signalisation et réseaux intégratifs (BioSigne) Laboratoire de Neuroendocrinologie moléculaire de la prise alimentaire/Génétique des fonctions neuronales intégrées

DISCIPLINE Signalisation, Génétique

THÈSE DE DOCTORAT SUR TRAVAUX

soutenue le 16/11/2012

par

Stéphane TCHANKOUO

ROLE DES KINASES LAMMER ET DES PHOSPHATASES PTP1B/PTP61F DANS LA REGULATION DES VOIES DE SIGNALISATION MEDIEES PAR L'INSULINE

ROLE OF LAMMER KINASES AND PTP1B/PTP61F PHOSPHATASES IN THE REGULATION OF PATHWAYS MEDIATED BY INSULIN

Directeur de thèse : Sud	Mohammed TAOUIS/ Le	eonard RABINOW Professeur/Université Paris
Composition du jury :		
Président du jury : Rapporteurs :	Jean KANELLOPOULOS Bruno FEVE Jacques MONTAGNE	Professeur/Université Paris Sud Professeur/Université Paris 6 Docteur/Gif-Sur-Yvette
Examinateurs :	Tarik ISSAD	Docteur/Institut Cochin

RESUME DU TRAVAIL DE THESE

Le diabète de type 2 et le cancer représentent des problèmes majeurs de santé publique. Une cible thérapeutique importante de ces affections est la protéine tyrosine phosphatase PTP1B. Cette dernière est connue pour réguler la voie de l'insuline en déphosphorylant le récepteur de l'insuline, IR ou le substrat du récepteur de l'insuline, IRS. Cependant les fonctions de PTP1B, le mécanisme par lequel cette phosphatase est régulée restent très ou pas connus. Deux études ont notamment décrites des effets opposés de l'activité de PTP1B suite à la phosphorylation sur résidu de Ser50 de PTP1B par CLK1/CLK2, des kinases LAMMER d'une part et AKT d'autre part. AKT a aussi été montré de phosphoryler la kinase LAMMER CLK1. Par ailleurs, le rôle de PTP1B dans la régulation de la voie Ras/MAPK et donc dans le cancer est un sujet très controversé.

L'objectif premier de ce travail de thèse a été d'analyser, le rôle de *Ptp61F* (l'orthologue de *Drosophile* de PTP1B) dans la voie de l'insuline de *Drosophile*, l'interaction entre la phosphatase et la kinase LAMMER de *Drosophile*, DOA, le rôle de cette phosphatase dans la voie RAS/MAPK. Pour se faire, nous avons utilisé la puissance génétique de la *Drosophile* pour générer un mutant du gène *Ptp61F* qui a été caractérisé et son rôle dans les voies de signalisation a été étudié. Cette étude a montrée que, *Ptp61F* interagit avec IR comme PTP1B chez les mammifères. Elle montre que *Ptp61F* régule les acteurs clés de la voie de l'insuline *Pi3K/Akt*. Elle a également montrée que *Ptp61F* pouvait réguler les fonctions du gène de la kinase LAMMER de *Drosphile*, *Doa*. Elle montre enfin que *Ptp61F* interagit avec nombreuses composantes de la voie RASMAPK de *Drosophile* (*Egfr, Ras, rl* (ERK humain)) en réprimant la fonction de chacun de ces gènes et que Rl serait un substrat direct de PTP61F.

Les informations selon lesquelles, *Ptp61F* interagit avec *Akt* et le gène de la kinase LAMMER de *Drosophile*, *Doa* ont été utilisées dans la deuxième étude pour montrer le rôle que les kinases LAMMER (notamment CLK2, Cdc-like kinase 2) pouvaient jouer dans la voie de signalisation de l'insuline au niveau moléculaire en utilisant les cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y. Il en ressort que la kinase CLK2 joue un rôle important dans cette voie de signalisation. CLK2 est induit par l'insuline et son expression augmente avec le temps. PTP1B interagit *in vitro* et *in vivo* avec CLK2. La surexpression de CLK2 induit la baisse de la phosphorylation de AKT par un mécanisme qui pourrait passer par PTP1B, puisque *in vitro*, CLK2 phosphoryle PTP1B et ce dernier interagit avec AKT *in vivo*. C'est le résidu de Ser50 de PTP1B qui est phosphorylé et cette phosphorylation réprime l'activité de PTP1B *in vitro*. On n'observe cependant pas AKT capable de phosphoryler PTP1B *in vitro* suggérant que la phosphorylation de PTP1B par AKT serait dépendante du contexte cellulaire.

Mots-clés: Diabète de type 2, cancer, kinases LAMMER (CLK2), PTP1B/PTP61F, AKT, Ser50.

ABSTRACT OF THE THESIS WORK

Type 2 diabetes and cancer represent the major public health problems. One important therapeutic target for these pathologies is the protein tyrosin phosphatase PTP1B. The phosphatase is known to negatively regulates the insulin signaling pathway by dephosphorylating the insulin receptor, IR or the insulin receptor substrate, IRS. However, PTP1B functions and its regulation mechanism remain poorly known. Two studies has notably described opposite effects of PTP1B activity following phosphorylation of its Ser50 residue either by CLK1/CLK2, LAMMER kinases or by AKT. Furthermore, AKT, a main insulin signaling pathway component, has been shown to phosphorylate the LAMMER kinase CLK1 following insulin stimulation. In addition, the role of PTP1B in the regulation of the RAS/MAPK signaling pathway and hence in cancer is a very controversial subject.

The first objective of this work was to analyse, the role of *Ptp61F* (the *Drosophila* ortholog of human PTP1B) in the *Drosophila* insulin pathway, the interaction between the phosphatase and the *Drosophila* LAMMER kinase gene, *Doa*, the role of *Ptp61F* in the RAS/MAPK signaling pathway. To achieve these, we took advantage of the genetic powerful of *Drosophila* to generate a *Ptp61F* gene mutant which has been characterized and its role in signaling pathways has been studied. This study showed that *Ptp61F* interacts with *IR* like PTP1B in mammals. It shows that *Ptp61F* regulates key components of insulin signaling pathway *Pi3K/Akt*. It also shows that *Ptp61F* is able to regulate the *Drosophila* LAMMER kinase gene, *Doa*. Finally, we noted that *Ptp61F* interacts by inhibiting the activity of several component of the RAS/MAPK signaling pathway of *Drosophila* (*Egfr, Ras, rl* (human ERK)) and conclude that Rl coud be a direct substrate of PTP61F.

The data showing that *Ptp61F* interacts with *Akt* and the *Drosophila* LAMMER kinase gene, *Doa*, were the basis for the second study in order to show the role that the mammal LAMMER kinase CLK2 (Cdc-like kinase 2) could play in the insulin signaling pathway at molecular level using the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. From this second study, we show that CLK2 play an important role in insulin signaling. CLK2 is induced by insulin and its expression increases with time. PTP1B interacts *in vivo* and *in vitro* with CLK2. Overexpression of CLK2 impairs AKT phosphorylation by a mechanism which could involved PTP1B, since *in vitro*, CLK2 phosphorylates PTP1B and the latter interacts with AKT *in vivo*. It is the Ser50 residue of PTP1B being phosphorylated by CLK2 and this phosphorylation event represses PTP1B activity *in vitro*. AKT cannot phosphorylates PTP1B *in vitro*, suggesting that the phosphorylation of PTP1B by AKT could be cellular environment dependant.

Mots-clés: Type 2 diabetes, cancer, LAMMER kinases (CLK2), PTP1B/PTP61F, AKT, Ser50.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury qui ont bien voulu juger ce travail. Je remercie chaleureusement le Professeur **Jean KANELLOPOULOS** qui m'a fait honneur en acceptant de présider ce jury. Je remercie vivement les Docteurs **Jacques MONTAGNE** et **Bruno FEVE** qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je remercie enfin le Docteur Tarik ISSAD qui a accepté d'examiner ce travail scientifique.

Je remercie tout particulièrement les Professeurs Leonard RABINOW et Mohammed TAOUIS de m'avoir fait confiance en me confiant la responsabilité de ce projet, de m'avoir d'avantage inculqué l'esprit scientifique, l'esprit de chercheur et m'avoir toujours soutenu tant sur le plan professionnel que personnel.

Marie-Laure, Merci de m'avoir fait profiter de ta personnalité scientifique, de cet esprit critique et d'analyse ô combien aigu. Merci pour tous ces chaleureux moments, pour tes conseils, pour ton soutien et ta présence.

Je tiens aussi à remercier Claire-Marie, Yacir, Anne et Laurence pour leurs conseils et critiques scientifiques. Claire-Marie, pour ta présence permanante parmi nous, tes blagues, ton aide, ta gentillesse, merci encore. Yacir, merci une fois de plus pour ta disponibilité, tes remarques.

Alain, pour ton humour, parfois je me demande pourquoi tu n'as pas fait carrière en tant que humoriste, mais certainement parce que tu aimes tant ce métier car tu as toujours un coup d'avance sur les autres.

Merci à **Laure** pour son aide en la préparation des tampons, milieux et boîtes de culture. A **Delphine** pour son aide technique en qRTPCR.

Un très chaleureux remerciement à **Charlotte**, **Hassina** et **Ioanis**, mes compagnons de tous les jours dans l'épreuve des manipes mais aussi dans de nombreux moments de gaité. Je ne cesserai de vous dire merci et combien je suis content de vous avoir rencontré et d'avoir partagé ces trois longues années avec vous!

Je tenais également à remercier tous les membres du CNPS pour toute leur aide.

Je ne serai certainement pas arrivé là sans le soutien indéfectible de ma famille. Je tiens donc ici à leur exprimer ma profonde gratitude pour leur aide, leur soutien, leurs conseils. Je remercie très affectueusement **mes parents** qui ont toujours été présents, une pensée particulière à mon papa qui nous a quitté au début de ce travail et qui aurait tant aimé me voir le défendre.
Edwige et son mari pour leur soutien inconditionnel et sans faille depuis de longues années.
Roméo pour ses conseils, mon tonton Claude et ma tata Laure qui ont toujours été là pour moi.
A tous mes frères et sœurs, merci pour tout. Merci à Mirande, qui, par sa présence et ses conseils m'a beaucoup apporté.

TABLE DES MATIERES

RESUME	2
LISTE DES PRINCIPALES ABBREVIATIONS	9
LISTE DES FIGURES	10
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	11
CHAPITRE 1: L'INSULINE	12
I) Généralité	13
I-1) Découverte	13
I-2) Structure	13
I-3) Source	15
I-4) Sécrétion	15
II) Signalisation de l'insuline	16
II-1) Le Récepteur de l'insuline	16
A) Structure	16
B) Expression	19
C) Activation	19
II-2) Les voies de signalisations induites par l'insuline	20
A) La voie IRS/PI3K/AKT	20
A-1) Les substrats du récepteur de l'insuline (IRS)	20
A-2) La phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)	23
A-3) AKT ou protéine kinase B (PKB)	26
B) La voie des mitogen activated protein kinases (MAPK)	29
C) La voie des Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcrip	tion (STAT)29
D) Les régulateurs de la voie de signalisation de l'insuline	
D-1) Les Protein tyrosine phosphatases (PTPs)	29
D-2) Les suppressor of cytokine signaling (SOCS)	
D-3) Autres mécanismes de régulation de la signalisation de l'insuline	

E) Effets liés à l'action de l'insuline et pathologies associées : Résistance à de type 2	1'insuline et diabète 31
E-1) Effets de l'inuline dans le système nerveux central (SNC)	31
E-2) Le Diabète	32
E-2-1) Le Diabète de type 1 (DT1)	32
E-2-2) Le diabète de type 2 (DT2)	
F) La résistance à l'insuline	
F-1) Résistance périphérique à l'insuline	
F-2) Résistance centrale à l'insuline	
F-3) Mécanismes de la résistance à l'insuline	34
CHAPITRE 2: LA VOIE DE SIGNALISATION DES MAPK (Mitoger Kingge)	n-Activated Protein
Kinase)	
I) Généralités	
II) Les récepteurs à tyrosine kinase (RTKs)	
II-1) Historique et Structure	
II-2) Activation	
III) La famille des protéines Ras	41
III-1) Structure et fonction	41
A) Structure	41
B) Fonction	44
C) Activation et régulation des protéines Ras	44
D) Les substrats de Ras	46
IV) Structure Générale du domaine catalytique des protéines kinases	46
V) La famille des protéines RAF	47
V-1) Structure et fonction	48
A) Structure	48

B) Fonction	
C) Activation de RAF	51
D) Régulation de RAF	51
D-1) C-RAF	
D-2) A-RAF	52
D-3) B-RAF	52
VI) La famille des protéines MEKs	53
VI-1) Structure et fonction	53
A) Structure	53
B) Fonction	53
C) Activation de MEK	55
D) Inhibition de MEK	55
VII) La famille des protéines ERKs	56
VII-1) Structure et fonction	56
A) Structure	56
B) Fonction	
C) Activation et régulation de ERK	58
D) Substrats des kinases ERKs	59
VIII) MAPKs et pathologies chez l'homme	60
CHAPITRE 3: LES KINASES LAMMER	61
I) Historique	
II) Structure et localisation	63
II-1) Structure	63
A) Structure protéique	63
B) Structure des ARNm	66
C) Localisation	66
III) La spécificité des kinases LAMMER : L'autophosphorylation	66
IV) Les substrats des protéines LAMMER	67

V) Autres substrats des kinases LAMMER	69
VI) Expression et fonction et des kinases LAMMER	70
VI-1) Kinase LAMMER de mammifères	70
VI-2) La kinase LAMMER de Drosophile, DOA	70
CHAPITRE 4: LA PROTEINE TYROSINE PHOSPHATASE PTP1B	72
I) Structure et fonction	73
I-1) Structure	73
I-2) Fonction	75
II) Régulation	77
III) PTP1B et médicaments	78
IV) Ptp61F, L'orthologue de Drosophile de PTP1B de mammifères	79
PRESENTATION DU TRAVAIL	83
RESULTATS	86
ETUDE 1	87
ETUDE 2	120
DISCUSSION	141
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	148
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	151

LISTE DES PRINCIPALES ABBREVIATIONS

CCK: Cholécystokinine. CLK1, 2, 3, 4: Cdc-like kinase 1, 2, 3, 4. **DM1:** Diabète Mellitus type 1. DM2: Diabète Mellitus type 2. ERK: Extracellular Regulated Kinase. GLP-1: Glucagon-Like Peptide 1. **IGF-1R:** Insulin-like Growth Factor 1. MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase. **NPY:** Neuropeptide Y. **IR:** Insulin Receptor. **IRS:** Insulin Receptor Substrate. **IRR:** Insulin Receptor related Receptor. JAK: Janus Kinase. PDK1/2: Phosphatidyl inositol-dependant kinase 1/2. PH: Pleckstrin Homology. pI: Point Isoélectrique. **PI3K:** Phosphatidylinositol 3 Kinase. PTP1B: Protein Tyrosine Phosphatase 1B. PTP61F: Protein Tyrosine Phosphatase 61F. **RE:** Réticulum Endoplasmique. **RTK:** Récepteur à domaine Tyrosine Kinase. SH2: Src Homology 2. SH3: Src Homology 3. SHC: Src Homology 2 domain containing. **SOCS:** Suppressor of Cytokine Signaling.

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription.

LISTES DES FIGURES

Figure 1: Structure primaire de l'insuline1	4
Figure 2: Représentation schématique (a) et structure tridimensionnelle du récepteur de l'insu (b)	line 8
Figure 3: Structure des quatre protéines IRS (insulin receptor substrate) et de leurs sites phosphorylation par différentes kinases	de 21
Figure 4: Structure des différentes sous-unités régulatrices de la PI3K: p85α, p85β, p55α, p p50α	55γ, 25
Figure 5: Structure des différentes sous-unités catalytiques de la PI3K selon leur classe2	25
Figure 6: Schéma de la voie IRS/PI3K/Akt induite par l'insuline	28
Figure 7: La voie de signalisation Ras/MAPK répond à nombreux stimuli extracellulaire intracellulaire et contrôle la motilité, la survie, la prolifération et la division cellulaire	e et 8
Figure 8: Structure des différentes isoformes de Ras	13
Figure 9: Diagramme en ruban illustrant le modèle de structurale des protéines kinases (ici B-RA complexé à un inhibiteur, le Sorafenib)4	AF 7
Figure 10: Structure des isoformes de Raf. 5	50
Figure 11: Oragnisation de la structure de MEK1/25	4
Figure 12: Architecture de ERK1 et ERK2 humain	7
Figure 13: Structure des domaines des protéines kinases Eucaryotes	4
Figure 14: Alignements de séquences protéiques des sous domaines VII-X de certains membre la famille des protéines LAMMER aribitrairement sélectionnés	s de 4
Figure 15: Structure des domaines des protéines SR6	58
Figure 16: Structure tridimensionnelle du domaine catalytique de PTP1B	74
Figure 17: Schéma de la structure de PTP1B7	4
Figure 18: Génération des clones cellulaires somatiques par le systèmes FLP/FRT8	8
Tableau 1: Site de phosphorylation optimal de trois protéines kinase LAMMER	8

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1: L'INSULINE

I) Généralités

I-1) découverte

Le rôle hypoglycémiant de l'insuline a été décrit au début du XXe siècle par Frederick Banting, Charles Best, John Macleod qui avaient isolé en1921 un composé peu actif avec beaucoup d'impuretés mais qui a été la base du traitement du diabète. Ce composé a été purifié plus tard et son efficacité à réduire la glycémie a été démontré et a permis de découvrir un moyen thérapeutique de lutte contre le diabète. Cette substance, extraite des îlots pancréatiques de Langerhans est appelée insuline, du latin « *insula* » qui signe « île ». Les scientifiques à l'origine de la découverte de l'insuline, la seule hormone hypoglycémiante connue à ce jour chez l'homme, ont été récompensé par l'obtention du prix Nobel de physiologie et de médecine en 1923.

I-2) Structure

L'insuline est la première protéine à être entièrement séquencée. Sa séquence en acides aminés a été déterminée pour la première fois par Frederick Sanger en 1953 (Sanger and Thompson 1953a; Sanger and Thompson 1953b). Le premier de ses deux prix Nobels a été attribué grâce à cette réalisation.

L'insuline (Figure 1) est une hormone peptidique de 6kDa constituée d'une chaine A de 21 acides aminés et d'une chaine B de 30 acides aminés. Le gène codant pour l'insuline contient deux introns et est localisé chez l'homme à 11p5.5. Ce gène code pour le précurseur de l'insuline, la pré-proinsuline, chaine polypeptidique unique, contient 110 résidus d'acides aminés et un peptide signal de 24 résidus d'acides aminés situé à l'extrémité N-terminale. Le peptide signal oriente la chaîne peptidique vers le réticulum endoplasmique (RE).



Figure 1: Structure primaire de l'insuline. Séquence de la proinsuline montrant les substitutions d'acides aminés associées au diabète dans l'insuline.

(Hua 2010).

Le précurseur subira une protéolyse catalysée par une prohormone convertase spécifique pour donner la proinsuline. Cette dernière deviendra l'insuline par élimination du peptide C (Steiner and Rubenstein 1997). Alors que la structure de la chaîne A est maintenue par un pont disulfure, les chaines A et B sont reliées entre elles par deux ponts disulfures. Malgré sa très petite taille en tant que protéine, elle possède toutes les structures secondaires qu'on peut rencontrer chez une protéine à savoir : hélices α , feuillets β , coude β (Hua 2010).

I-3) Source

L'insuline est produite par les cellules β des îlots de langerhans du pancréas. Ces îlots correspondent à des regroupements de cellules endocrines qui représentent environ 1 à 2% du pancréas.

Les îlots de Langerhans sont constitués d'au moins quatre types cellulaires produisant différentes hormones. Retrouvées au centre des îlots, les cellules β représentent 65 à 80% de la population cellulaire.

Les cellules α , situées en périphérie, représentent 15 à 20% de la population cellulaire et sont responsables de la production du glucagon. Le glucagon a un effet hyperglycémiant et sécrété en cas d'hypoglycémie (glycémie en deça de 0,65g/L). Le glucagon agit principalement sur le foie où il induit la libération du glucose par stimulation de la glycogénolyse et la néoglucogenèse.

I-4) Sécrétion

Le taux de glucose dans le sang est le principal régulateur de la sécrétion d'insuline. En effet, le glucose sanguin filtre à travers les capillaires dans la lymphe intestinale qui baigne les cellules β du pancréas. Le glucose autour des cellules β a donc une concentration similaire à celle du sang. Le glucose est transporté dans ces cellules β par un transporteur non saturable appelé GLUT2. La concentration de glucose intracellulaire va donc refléter celle du sang. L'entrée du glucose dans la cellule bêta est immédiatement suivie de sa phosphorylation par une hexokinase spécifique, la glucokinase, dont les caractéristiques cinétiques jouent un rôle important dans le couplage glycémie/insulinosécrétion. Le métabolisme du glucose dans la cellule β augmente le rapport ATP/ADP. Cela induit la fermeture d'un canal potassique ATP-dépendant et par conséquent la dépolarisation de la membrane des cellules β pancréatiques, favorisant ainsi l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant et déclenchant l'exocytose des vésicules contenant de l'insuline.

Ces phénomènes membranaires se déclenchent dès que la concentration de glucose dépasse 5mmol/L.

Des hormones comme le glucagon, le glucagon-like peptide 1(GLP-1), la cholécystokinine (CCK) sont aussi associées à la régulation de la sécrétion de l'insuline en agissant sur leurs récepteurs situés sur les cellules β . La sécrétion d'insuline peut être inhibée par les catécholamines (adrénaline, noradrénaline) qui se fixent eux aussi sur leurs récepteurs situés sur les cellules β .

L'insuline ainsi libérée exerce ses actions métaboliques et mitogéniques en se liant à son récepteur qui appartient à la famille des tyrosines kinases (RTK).

II-) Signalisation de l'insuline

II-1) Le Récepteur de l'insuline

A) Structure

En 1969, Minemura et collaborateurs ont découvert le récepteur de l'insuline (IR) (Figure 2) qui a été séquencé en 1985 (Ullrich, Bell et al. 1985).

La famille du récepteur de l'insuline comprend le récepteur de l'insuline (IR), le récepteur de l'insulin-like growth factor 1 (IGF-1R) et l'insulin receptor related receptor (IRR) (Lawrence, McKern et al. 2007). Le gène qui code pour IR est localisé à 19p 13.2. Ce gène est composé de 22 exons pour une taille d'environ 13kb. Ce gène code pour IR qui a une structure tétramérique (homodimères) dont les monomères sont liés par des ponts disulfures. Ce tétramère est composé de deux sous unités α (135kDa) extracellulaires qui possèdent le site de liaison de l'insuline et de deux sous unités β (90kDa) transmembranaires dotées d'une activité tyrosine kinase localisée dans la partie C-terminale. (Kishimoto, Hashiramoto et al. 1994). Le récepteur de l'insuline est exprimé sous forme de deux isoformes (IR-A et IR-B). Les deux isoformes différent l'une de l'autre par la présence chez IR-B d'un segment inséré de 12 résidus d'acides aminés codé par l'exon 11. Ce segment est inséré entre les résidus d'acides aminés 716 et 717 de l'IR-A (Moller, Yokota et al. 1989; Lawrence, McKern et al. 2007) et se trouve précisément à l'extrémité C-terminale de la sous-unité α (Seino and Bell 1989). L'isoforme IR-A présente une forte analogie (tout comme l'isoforme IR-B) avec IGF-1R et elles peuvent même exister comme hétérodimères (récepteurs hybrides) dans les tissus où les deux récepteurs sont exprimés (Slaaby, Schäffer et al. 2006).

De l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, chaque monomère est composé d'un domaine de répétition des résidus de leucine appelé L1, d'une région riche en résidus de cystéine appelée CR, d'un second domaine riche en résidus de leucine appelé L2, d'un domaine contenant trois motifs fibronectines de type III (fn-III-1, fn-III-2, fn-III-3). Le second motif fibronectine contient un large domaine d'insertion (ID) d'environ 120 résidus d'acides aminés. Ce domaine contient un site de clivage de la furine qui va générer les chaînes α et β du récepteur mature (Adams, Epa et al. 2000; Ward, Lawrence et al. 2007). Ces domaines sont principalement localisés dans la sous unité α et constituent le site de liaison de l'insuline. Lorsque l'insuline ne s'y fixe pas, les sous unités α exercent un fort effet inhibiteur sur l'activité kinase des sous unités β .



Figure 2: Représentation schématique (a) et structure tridimensionnelle du récepteur de l'insuline (b)

Les flèches orange indiquent les sites de N-glycosylation et les vertes pointent les acides aminés importants, identifiés par mutagénèse dirigée, pour la liaison de l'insuline. Les ponts disulfures apparaissent en rouge. CR : domaine riche en cystéine, CT : domaine carboxy-terminal, Fn : domaine fibronectine de type III, JM : domaine juxtamembranaire, L : domaine de liaison à l'insuline (riche en leucine), TK : domaine tyrosine kinase, TM : domaine transmembranaire.

(De Meyts and Whittaker 2002).

Les sous unités β comportent une partie extracellulaire glycosylée, une courte partie transmembranaire et une longue partie cytoplasmique.

Le domaine C-terminal, intracellulaire contient le domaine tyrosine kinase flanqué de deux régions régulatrices, la région juxtamembranaire et la « C-tail ». C'est donc sur les phosphotyrosines de ce domaine que vont se fixer les molécules de signalisation comme les substrats du récepteur de l'insuline (Hubbard 2004). La région régulatrice juxtamembranaire intervient aussi dans l'internalisation du récepteur. Le domaine tyrosine kinase contient le site de liaison à l'ATP et les sites majeurs d'autophosphorylation puisque d'autres sites de phosphorylation sont situés dans le domaine C-terminal.

Les monomères, pour former le tétramère, sont reliés par des ponts disulfures. Il existe deux ponts disulfures entre les chaînes α . Un pont est formé entre le résidu de Cyst524 de la FnIII-1 et le résidu Cys682, l'autre pont est formé entre la Cys683 et la Cys685 du ID. Enfin, les chaines α et β sont quant à elles reliées par un seul pont disulfure entre les résidus Cys647 et Cys860 (Adams, Epa et al. 2000).

B) Expression

IR est présent sur la membrane des cellules de tous les tissus insulino-sensibles tels que : Le foie, le tissu adipeux, le muscle strié, les cellules β du pancréas et aussi dans les os (Avnet, Salerno et al. 2011) mais aussi fortement dans les cellules neuronales (Bruning, Gautam et al. 2000; Benomar, Roy et al. 2005; Gerozissis 2008). A cause de l'épissage alternatif de l'exon 11, IR-A et IR-B subissent une fine régulation et sont différemment exprimés selon les tissus, la différenciation cellulaire et le stade du développement embryonnaire. Les ostéoblastes humains matures expriment majoritairement IR-B alors que IR-A est principalement exprimé dans les cellules précurseurs de ces ostéoblastes (Avnet, Salerno et al. 2011).

IR-B est plus exprimé dans le tissu adipeux épididymaire, dans les reins et dans le foie. IR-A est plus exprimé dans les muscles squelettiques et dans le pancréas. Il existe cependant des tissus comme le cœur et le péritoine où les deux récepteurs sont également exprimés (Serrano, Villar et al. 2005).

C) Activation

Chaque sous-unité α est potentiellement capable de fixer une molécule d'insuline. Pour une meilleure affinité, les molécules d'insuline peuvent s'organiser en dimères ou hexamères bien que le rôle physiologique de ces associations n'est pas encore clairement démontré (Ottensmeyer,

Beniac et al. 2000).

La liaison de l'insuline à la sous unité α initie un changement conformationnel qui lève l'inhibition exercée par les sous unités α sur les chaînes β . Les sous unités β vont alors subir une « trans » phosphorylation sur les résidus de tyrosine 1146, 1150 et 1151 du domaine catalytique, activant ainsi le récepteur (White, Shoelson et al. 1988; Wilden, Siddle et al. 1992). Dans le domaine juxtamembranaire dont une des fonctions est la fixation des substrats du récepteur de l'insuline (IRSs), le résidu de tyrosine 960 doit être phosphorylé pour que les substrats puissent s'y fixer par leurs domaines SH2 (Feener, Backer et al. 1993).

Dans la partie C-terminale des sous unités β , il existe d'autres sites de phosphorylation, les Tyr1316 et Tyr1322 dont le rôle n'est pas encore connu. On pense que la phosphorylation de la Tyr1322 serait impliquée dans le recrutement et l'activation d'IRS par IR (Maegawa, McClain et al. 1988; Tennagels, Bergschneider et al. 2000) et aussi impliqués dans l'interaction directe de la PI-3 kinase avec IR (Levy-Toledano, Taouis et al. 1994).

IR-A présente une plus grande affinité pour l'insuline et un fort taux d'internalisation (Vogt, Carrascosa et al. 1991) alors que la transduction du signal est meilleure par IR-B qui possède une plus grande activité kinase (Kellerer, Lammers et al. 1992).

Certaines études montrent que ces deux isoformes du IR ont différentes cibles dans la cellule. En effet, dans les cellules β du pancréas, IR-A régule l'expression de l'insuline alors que IR-B régule l'expression de la β -glucokinase (Leibiger, Leibiger et al. 2001) par l'activation de différentes isoformes de la PI3K. Dans les cellules 32D, une lignée cellulaire hématopoïétique de souris, IR-A exerce des effets mitotiques et antiapoptotiques alors que IR-B est impliqué dans la différenciation (Sciacca, Prisco et al. 2003).

II-2) Les voies de signalisations induites par l'insuline

A) La voie IRS/PI3K/AKT

La voie IRS/PI3K/AKT est la principale voie activée par l'insuline.

A-1) Les substrats du récepteur de l'insuline (IRS)

Les protéines IRS jouent un rôle central dans la signalisation de l'insuline. A ce jour, quatre membres de la famille des IRS, de structure très proche, ont été identifiés dans les cellules de mammifères (IRS1-4) (Schmitz-Peiffer and Whitehead 2003) (Figure 3).

La région N-terminale, très conservée, possède 4 domaines de liaison dont deux principaux:

- Le domaine PH (« *Pleckstrin homology* ») qui permet aux IRS de se lier aux phosphoinositides membranaires qui va leur permettre de se rapprocher de IR (Voliovitch, Schindler et al. 1995). Le

domaine PH intervient aussi dans les interactions protéines-protéines avec les autres protéines cellulaires. De telles interactions sont appelées PHIP (« PH-interacting proteins ») (Farhang-Fallah, Yin et al. 2000; Farhang-Fallah, Randhawa et al. 2002).



Figure 3: Structure des quatre protéines IRS (insulin receptor substrate) et de leurs sites de phosphorylation par différentes kinases

Les quatre membres de la famille IRS possèdent dans leur partie N-terminale un domaine PH (pleckstrinhomology) (magenta) et un domaine PTB (phosphotyrosine-binding) (vert foncé). Les positions des résidus de tyrosine (Y) phosphorylés par IR et les protéines en aval qui se lient à ces sites sont montrées. Les positions des résidus de sérine (S) et les kinases qui les phosphorylent sont aussi montrées. Les cercles blues representent les sites de régulation positive et les cercles rouges, les sites de régulation négative. La combinaison des deux couleurs représente les sites où la régulation a été montrée d'être soit positive, soit négative en fonction des conditions. Les cercles blancs représentent les sites où l'effet de la phosphorylation est actuellement inconnu. Plusieurs protéines se lient aux ou phosphorylent les IRS. Ces protéines sont : AKT/protein kinase B (PKB), AMP-activated protein kinase (AMPK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), growth-factor-receptor-bound protein-2 (Grb2), glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β), IkB kinase (IKK), c-Jun-N-terminal kinase (JNK), mammalian target of rapamycin (mTOR), p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase C θ (PKC θ), Srchomology- 2 (SH2) domain-containing tyrosine phosphatase-2 (SHP2), salt-inducible sérine/threonine kinase 2 (SIK2), Rho kinase (ROK). (Taniguchi, Emanuelli et al. 2006). - Le domaine PTB (phosphotyrosine-binding domain), dont l'identité de séquence entre IRS1 et IRS2 est 75%. Il est constitué d'environ 200 résidus d'acides aminés et formé de sept brins β et trois hélices α qui forment un sandwich de trois ou quatre feuillets avec une hélice C-terminale. Il se lie au site de liaison NPXY sur la région justamembranaire du récepteur de l'insuline.

IRS1et IRS2 semblent être les deux substrats les plus importants de la voie de signalisation de l'insuline (Sun, Rothenberg et al. 1991; Sun, Miralpeix et al. 1992).

IRS1 et IRS2 possèdent en outre le domaine SAIN (Shc and IRS1 NPXY-binding domain) dont la séquence est similaire à celle du PTB (Gustafson, He et al. 1995) et qui participerait à l'interaction avec le récepteur de l'insuline et d'autres molécules impliquées dans la transduction du signal insuline comme la PI3K.

Un dernier domaine, spécifique à IRS2, le domaine KRLB (kinase regulatory loop binding, position 591–733), est présenté comme un nouveau mécanisme de régulation de la voie de l'insuline car il exercerait une autoinhibition de la phosphorylation des résidus de sérine de IRS2. Ce qui montre que la régulation négative de IRS2 ne passerait pas par la phosphorylation directe de ses résidus de Ser/Thr, mais, par l'effet inhibiteur de la phosphorylation de ces résidus exercé par KRLB puisque ça va conduire à l'atténuation de la signalisation de l'insuline (Sawka-Verhelle, Baron et al. 1997; Wu, Tseng et al. 2008).

La partie C-terminale, de longueur et de séquence variable entre les membres de la famille des IRS, contient de nombreux motifs de phosphorylation sur les résidus de Tyr (plusieurs motifs consensus YXXM), Ser, Thr. La phosphorylation sur les résidus de Tyrosine par IR créée des sites d'ancrages pour les protéines ayant un domaine SH2 comme la sous unité P85 α de la PI3K, GrB2, Nck, Fyn et les protéines tyrosines phosphatase comme SHPTP2 (Zick 2001; Khan and Pessin 2002; Saltiel and Pessin 2002) et PTP1B.

La phosphorylation sur les résidus de Ser/Thr (par PKA, PKC, MAPK- (Boura-Halfon and Zick 2009) est quant à elles impliquée dans la régulation négative du signal de l'insuline car elle va induire la dissociation de IRS de IR (Paz, Hemi et al. 1997; Liu, Paz et al. 2001) empêchant ainsi la phosphorylation des résidus de Tyr (Mothe and Van Obberghen 1996). Notons que, comme dit plus haut, la régulation négative de IRS2 se ferait par le domaine KRLB et cette inhibition ne se fait qu'avec IR et pas IGF-1R ou les hybrides. Ce qui suggère un rôle différent pour IRS1 et IRS2.

Bien que IRS1 et IRS2 soient distribués de façon ubiquitaire (Sun, Miralpeix et al. 1992), IRS1 est principalement impliqué dans la signalisation de l'insuline au niveau des tissus tels que le muscle squelettique et le tissu adipeux alors IRS2 agirait préférentiellement au niveau hépatique (Schmitz-Peiffer and Whitehead 2003). IRS3 est retrouvé dans le poumon, le foie, les adipocytes et les cellules β pancréatiques (Sciacchitano and Taylor 1997) et IRS4 dans l'estomac, les reins, le poumons et le cerveau (Fantin, Keller et al. 1999).

Bien que les protéines IRS aient une forte homologie de séquence, IRS1 et IRS2 fonctionnent de façons différentes dans la régulation de l'homéostasie du glucose. Il existe ainsi un relai dynamique entre IRS1 et IRS2 dans la signalisation hépatique de l'insuline. IRS2 est impliqué principalement dans le jeûne et immédiatement après le renutrition alors que IRS1 serait impliquée dans la phase de renutrition (Kubota, Kubota et al. 2008).

Les souris KO pour IRS1 ont un retard de croissance, leur tolérance au glucose est altérée et ils présentent une isulino-résistance au niveau des tissus périphériques (Araki, Lipes et al. 1994; Tamemoto, Kadowaki et al. 1994). Ces effets sont compensés par IRS2 dans les hépatocytes, les cellules musculaires et le tissu adipeux (Patti, Sun et al. 1995; Yamauchi, Tobe et al. 1996; Kaburagi, Satoh et al. 1997). De façon similaire, IRS1 est surexprimée chez les souris KO pour *IRS2*, indiquant un méchanisme compensatoire (Freude, Leeser et al. 2008). Cependant les souris KO pour *IRS2* présentent également une résistance à l'insuline, mais, le retard de croissance n'est observé que dans certains tissus comme les cellules β pancréatiques, ce qui conduit au diabète de type 2 (DT2) (Withers, Gutierrez et al. 1998). Ce qui suggère, bien que IRS1 et IRS2 présentent une certaine différence structurale et n'ont pas la même localisation subcellulaire, il y aurait un mécanisme compensatoire de la fonction de l'un par l'autre. Les rôles de IRS3 et IRS4 restent encore à élucider puisque les souris KO pour IRS3 et IRS4 présentent un léger retard de croissance et une légère altération de la glycémie (Sesti, Federici et al. 2001).

A-2) La phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)

C'est au milieu des années 1980 qu'a été découvert la PI3K. Il avait été obervé que certaines oncogènes cellulaires possédaient une activité kinase lipidique qui utilisait le phosphatidylinositol comme substrats. En 1988, le groupe de Cantley découvrait que cette oncoprotéine était en fait le phosphatidykinositol 3-kinase parce qu'elle phosphorylait le groupe hydroxyle (-OH) de l'inositol de la phosphatidylinositol.

On observe plus tard que cette kinase est donc capable de catalyser la phosphorylation en position 3'-OH du noyau inositol des phosphoinositides. Ses substrats comprennent le phosphatidyl inositol (PI), la phosphatidyl-4-phosphate (PI(4)P) et le phosphatidyl-4,5-biphosphate (PI(4,5)P₂) pour donner respectivement le phosphatidylinositol-3'-phosphate (PI(3')P), le phosphatidylinositol-3', 4-bisphosphate (PI(3',4)P₂) et le phosphatidylinositol-3', 4, 5-triphosphate (PI(3', 4, 5)P₃). Il existe plusieurs isorformes (Figure 4) des PI3K qui peuvent être divisées en trois classes : Classe I (Ia et Ib), classe II et classe III (Figure 5).

La classe I qui comprend deux sous classes : PI3K Ia et PI3K Ib. Ce sont des hétérodimères constitués d'une sous unité catalytique qui contient l'activité kinase d'environ 110kDa (P110) et

d'une sous unité régulatrice (ou adaptatrice). En fonction du type de récepteur qui les activera, on va distinguer deux isoformes de la classe I: PI3K Ia va être activée par les récepteurs à activité tyrosine kinase et PI3K Ib sera activée par les récepteurs couplés aux protéines G. Tous les deux peuvent se fixer à RAS, mais le rôle de cette interaction reste inconnu (Rodriguez-Viciana, Warne et al. 1996). C'est la PI3K Ia qui va être activée par l'insuline puisqu'elle est activée par tous les stimuli qui sollicitent les RTK (Stephens, Eguinoa et al. 1993).

Chez les mammifères, la PI3K Ia peut être constituée à partir de trois isoformes de la sous unité P110 (p110 α , β , et δ) codées par trois gènes séparés et au moins sept protéines régulatrices issues de l'épissage alternatif de trois différents gènes (P85 α , P85 β et la P55 γ). Les P110 α et β sont exprimées d'une manière ubiquitaire alors que la P110 δ n'est retrouvée que dans les leucocytes. Chez la Drosophile et chez *C. elegans*, il existe un seul couple catalytique/régulateur pour la PI3K de classe I, Dp110/P60 et AGE-1/AAP-1 respectivement.

Pour ce qui est de la classe Ib de la PI3K, la seule sous unité catalytique identifiée est la P110 γ qui est associée à une sous unité régulatrice de 87 ou 101kDa (P101 ou P87) (Wymann, Bjorklof et al. 2003). Cette classe n'est présente que chez les mammifères et est principalement exprimée dans les leucocytes.

Ces deux isorformes utilisent PI, PI(4)P, or PI(4,5)P2 pour produire principalement PI(3,4,5)P3 dans les cellules.

Les sous unités catalytiques et régulatrices sont des structures organisées en domaines. L'extrémité N-teminal de la P110 α contient un domaine de liaison à la P85 α appelé « adaptor binding domain » (ABD). En partant vers l'extrémité C-terminal, le domaine ABD est suivi du « RAS binding domain » (RBD), d'un domaine C2, d'un domaine en hélices α et finalement du domaine kinase (ou domaine PIK, phosphoinositide kinase) avec deux structures en lobes typiques de toutes les protéines kinases.

La P85 α est constitué, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, d'un domaine SH3 (*src homology 3*) qui va reconnaître les motifs riches en proline d'autres protéines, d'un domaine de liaison à la protéine Rac (domaine homologue à BCR), qui va permettre l'interaction avec les molécules liant le GTP telles que RAS, Rho, Cdc42, suivi de deux domaines riches en résidus de proline (nPRD et cPRD). Les deux domaines SH2 (*src homology 2*) (cSH2 et nSH2) sont liés par le domaine inter-SH2 (iSH2) (Okkenhaug and Vanhaesebroeck 2001). Le domaine iSH2, domaine super enroulé (coiled-coiled), se lie au domaine ABD de la P110 α (Huang, Mandelker et al. 2007). Les deux domaines cSH2 et nSH2 reconnaissent les résidus de tyrosines phosphorylés dans les les motifs YXXM (Songyang, Shoelson et al. 1993) permettant par exemple l'interaction avec IRS1/2 phosphorylés sur ces mêmes motifs (Backer, Myers et al. 1992).



Figure 4: Structure des différentes sous-unités régulatrices de la PI3K : p85α, p85β, p55α, p55γ, p50α

Les damiers représentent une extension de 34 et 32 acides aminés pour respectivement les sous-unités p55 α et γ .

BH : BCR/RacGAP homology, P1 et P2 : régions riches en proline, p110 binding : domaine de liaison à la sous-unité catalytique p110 de la PI3K, SH2 : domaine Src homology 2, qui permet la liaison avec des protéines phosphorylées sur résidus de tyrosine, SH3 : domaine Src homology 3, qui permet la liaison avec des protéines possédant des régions riches en proline.

(Shepherd, Withers et al. 1998).



Figure 5: Structure des différentes sous-unités catalytiques de la PI3K selon leur classe. Les isoformes p110 α , β et γ appartiennent à la classe 1a et portent quatre domaines distincts Kinase domain : domaine catalytique carboxy-terminal, p85-binding domain : domaine de liaison à la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K, PIK : phosphoinositide binding domain, Rasbinding domain : domaine de liaison à la protéine Ras. (Shepherd, Withers et al. 1998). La PI3K est activée par nombreux facteurs de croissance et cytokines. Elle est également activée après être recrutée par IRS suite à une stimulation à l'insuline (Backer, Myers et al. 1993). Toutesfois, par ses régions SH2, la PI3K peut aussi interagir avec IR (Levy-Toledano, Taouis et al. 1994). Quatre résidus de tyrosine sont identifiés comme étant impliqués dans l'interaction avec PI3K : les Tyr608 et 939 qui sont des sites de forte interaction, et les Tyr 460 et 987 qui sont les sites de faible interaction (Sun, Crimmins et al. 1993; Shepherd, Withers et al. 1998).

L'interaction avec ces résidus phosphorylés via les domaines SH2 de la P85 va entrainer un changement conformationnel de la PI3K, la rendant active. Cette interaction a aussi pour but de permettre la translocation de la PI3K dans la membrane plasmique de façon à la rapprocher de ses substrats. Cette translocation serait suffisante à elle seule pour activer ses voies de signalisation (Shoelson, Sivaraja et al. 1993).

La Phosphoinositide 3-phosphatase and tensin homolog, PTEN, va catalyser la conversion de la PIP3 à PIP2 et va ainsi réprimer l'activité de la PI3K.

Il existe trois types d'effecteur de la PI3K :

- Les effecteurs avec le domain PH comme AKT/PKB, *phosphoinositides dependant protein kinase-1* (PDK-1), les protéines kinases C (PKC).

- Les effecteurs avec le domaine FYVE (Stenmark, Aasland et al. 1996) comme FAB1, EEA1.

- Les effecteurs avec le domaine Phox (PX) (Ellson, Gobert-Gosse et al. 2001) comme SGK3 (serum and glucocorticoid-regulated kinases).

A-3) AKT ou protéine kinase B (PKB)

AKT, encore appelée protéine kinase B est une sérine/thréonine kinase qui partage une forte identité d'acides aminés avec la protéine kinase A, PKA (68%) et la protéine kinase C (73%). AKT a été découverte en 1977 par Staal et ses collaborateurs lorsqu'ils découvraient l'induction spontanée de lymphome chez la souris par un virus appelé AKT8 (Staal, Hartley et al. 1977). Après isolation de ce virus, ils montraient qu'il contient une séquence oncogénique appelée *AKT*, dérivée des cellules hôtes.

On dénombre trois isoformes de *AKT* chez les mammifères *PKB1*, *PKB2*, *PKB3* (ou *PKBa*, *PKB* β , *PKB* γ respectivement). Ces trois isoformes sont composées de trois domaines fonctionnels. De l'extrémité N-terminale vers C-terminale, on a :

- Le domaine PH (pleckstrin homology).

- Le domaine kinase à spécificité Ser/Thr.

- Le domaine C-terminal contenant plusieurs motifs hydrophobes (HM) qui régulent l'activité kinase (Franke, Hornik et al. 2003; Scheid and Woodgett 2003). C'est en fait les motifs HM qui

vont servir d'ancrage aux kinases comme p70 S6K, PKC, SGK qui se lieront en même temps à la PDK1 (*Phosphatidyl inositol-dependant kinase 1*) (Balendran, Currie et al. 1999).

En absence de stimulation, AKT est inactive et cytosolique. En réponse à l'insuline, la PI3K activée, induit la production de la PIP2 et PIP3. Ces derniers, notamment PIP3, vont recruter AKT et PDK1 au niveau de la membrane. Leurs fixations sur le domaine PH de AKT va induire un changement de conformation de AKT et un rapprochement avec PDK1 qui va phosphoryler son résidu de Thr308 situé dans la boucle d'activation du domaine kinase (Vanhaesebroeck and Alessi 2000). Ensuite, le résidu de Ser473 va être phosphorylé par le complexe rictor-mTOR (Sarbassov et al. 2005) et/ou par autophosphorylation (Toker and Newton 2000).

AKT activé, va à son tour phosphoryler ses substrats dont le premier substrat à être découvert, la GSK-3, une protéine pro-apoptotique (Cross, Alessi et al. 1995). AKT va également phosphoryler les substrats comme FOXO1 (*Forkhead box 1*) (Rena, Guo et al. 1999), un facteur de transcription, dont la phosphorylation par AKT inhibe sa translocation dans le noyau. L'activation de AKT va également permettre la phosphorylation de TBC1D4. Cette protéine possède une activité GTPase qui est inhibée par la phosphorylation par AKT favorisant ainsi la transclocation de GLUT-4, transporteur du glucose insulino-dépendant au niveau de la membrane.

De plus, la phosphorylation de AKT sur les résidus de Tyr512 et Tyr523, proche de la boucle d'activation est nécessaire pour son activation complète (Chen, Kim et al. 2001). Cette phosphorylation se fait par Src puisque dans les cellules SYF dépourvues de SRC, l'activité de AKT est fortement réduite, mais restaurée après transfection de *c-SRC*.

Plusieurs données montrent que tous les isoformes de *AKT* n'ont pas la même fonction (Franke 2008). Une étude associe un diabète familial à la mutation de *AKT2* (George, Rochford et al. 2004). Dans une autre étude la schizophrénie observée chez des patients à été associée à une expression différentielle de AKT1 (Emamian, Hall et al. 2004). De plus, lorsqu'on supprime sélectivement des gènes de AKT, on observe que la délétion de *AKT1* induit une hypotrophie du placenta accompagnée d'un retard de croissance et une baisse du poids corporel. La délétion de *AKT2* induit chez ces souris une hyperinsulinémie et une hyperphagie. La répression de *AKT3* altère le développement du cerveau (Dummler and Hemmings 2007).

Nombreuses études ont montré que AKT est régulée par les phosphatases PP2A, PP1, PHLPP qui peuvent déphosphoryler les résidus de Thr308 et de Ser473 (Beaulieu, Sotnikova et al. 2005; Gao, Furnari et al. 2005; Van Kanegan, Adams et al. 2005; Brognard, Sierecki et al. 2007; Rocher, Letourneux et al. 2007; Bertoli, Copetti et al. 2009; Padmanabhan, Mukhopadhyay et al. 2009). Une autre étude montre même que la kinase LAMMER CLK2 activerait par phosphorylation la phosphatase PP2A qui à son tour va déphosphoryler AKT (Rodgers, Vogel et al. 2011).



Figure 6: Schéma de la voie IRS/PI3K/Akt induite par l'insuline.

•: Groupement phosphate. : Domaine kinase de IR.

PDK-2 étant abandonné pour le complexe mTORC2 (mTOR/rictor) (Sarbassov et al. 2005).

B) La voie des mitogen activated protein kinases (MAPK)

L'activation des MAPK (par la voie de l'insuline) se fait soit par l'intermédiaire de IRS1 (Waters, Yamauchi et al. 1993; Myers, Wang et al. 1994), soit par *Src homology domain containing* (SHC) (Hara, Yonezawa et al. 1994; Ouwens, van der Zon et al. 1994) qui peut aussi être recruté au niveau du récepteur de l'insuline activé.

La voie des MAPK va être détaillée dans le chapitre suivant.

C) La voie des Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT)

Il est maintenant établi que l'insuline active la voie JAK/STAT. Il a été démontré que l'insuline est capable d'induire la phosphorylation de JAK-1, JAK-2, STAT-3 et STAT-5b (Saad, Carvalho et al. 1996; de Groot, Coffer et al. 1998; Gual, Baron et al. 1998; Benomar, Roy et al. 2005). La technique du yeast double hybride (Y2H) a permis de montrer que STAT-5b interagit directement avec le récepteur de l'insuline activé au niveau du résidu de Tyr960 de la région juxtamembranaire (Chen, Sadowski et al. 1997).

D) Les régulateurs de la voie de signalisation de l'insuline

D-1) Les Protein tyrosine phosphatases (PTPs)

Bien qu'il existe plusieurs mécanismes régulant négativement la signalisation de l'insuline, un des mécanismes les plus importants reste l'action des protéines tyrosines phosphatases (PTPs). Il existe plus de 100 membres de la famille des PTPs qui contrôlent divers processus biologiques (Romsicki, Scapin et al. 2003). Certains agissent en déphosphorylant le récepteur de l'insuline et/ou ses substrats IRS. Les principales protéines tyrosine phosphatases capables d'agir sur le récepteur de l'insuline sont PTP α , PTP ϵ , CD45, LAR, SHP-2, TC-PTP et PTP1B.

Bien que ces phosphatases possèdent toutes un résidu de cystéine qui joue le rôle de nucléophile dans la réaction catalytique et un résidu d'arginine (Guan and Dixon 1991; Cho, Ramer et al. 1992) dans le domaine catalytique au sein du motif conservé de 11 résidus d'acides aminés (I/V)HCXAGXXR(S/T)G qui sert de signature à cette famille de phosphatases (Barford, Das et al. 1998), seules PTP1B (Galic, Hauser et al. 2005; Picardi, Calegari et al. 2008; Miranda, Gonzalez-Rodriguez et al. 2010; Matsuo, Bettaieb et al. 2011) et TC-PTP (Galic, Klingler-Hoffmann et al. 2003; Meng, Buckley et al. 2004; Galic, Hauser et al. 2005) ont été clairement décrites comme étant impliquées dans la régulation de la voie de signalisation de l'insuline. Toutesfois, PTP1B apparaît

être le régulateur majeur des effets métaboliques de l'insuline (Stuible, Doody et al. 2008; Yip, Saha et al. 2010; Tiganis 2012) alors que TC-PTP est notamment impliquée dans le système hématopoétique (Ibarra-Sanchez, Simoncic et al. 2000). Le chapitre 4 sera consacré à PTP1B.

D-2) Les "suppressor of cytokine signaling" (SOCS)

Les protéines « *suppressor of cytokine signaling* » (SOCS) constituent un autre niveau de régulation négative de la signalisation de l'insuline (Emanuelli, Peraldi et al. 2000; Lebrun and Van Obberghen 2008). Ces protéines inhibent la signalisation de l'insuline par trois différents mécanismes :

1) Inhibition de la phosphorylation de IRS par IR. SOCS-3 se fixe par son domaine SH2 sur le résidu de tyrosine 960 de IR et empêchant également l'activation de STAT-5b par l'insuline (Emanuelli, Peraldi et al. 2000).

 2) les protéines SOCS peuvent se fixer sur IRS et induire leur dégradation via le protéasome (Shi 2004).

3) Elles peuvent aussi inhiber l'activité kinase de IR (Mooney, Senn et al. 2001).

D-3) Autres mécanismes de régulation de la signalisation de l'insuline

Comme dit plus haut la phosphorylation des résidus de sérine et/ou thréonine des protéines IRS joue également un rôle dans la régulation négative de la voie de signalisation de l'insuline puisqu'elle va conduire à la dissociation de IRS de IR (Paz, Hemi et al. 1997; Liu, Paz et al. 2001). Cette phosphorylation peut se faire par PKA, PKC, MAPK (Boura-Halfon and Zick 2009).

JNK (Jun-N-terminal linase) peut aussi intervenir dans cette régulation négative en phosphorylant également IRS sur résidu de sérine (Taniguchi, Emanuelli et al. 2006).

Les phosphatases des lipides telles que PTEN et SHIP2 (*SH2 containing inositol phosphatase 2*) déphosphorylent PI (3, 4, 5)P₃, ce qui va conduira à l'inhibition du signal généré par la PI3K. On aura ainsi l'inactivation de AKT, pas de translocation de GLUT4 et donc pas de stockage du glucose (Vinciguerra and Foti 2006).

Un autre mécanisme de régulation de la signalisation de l'insuline est l'internalisation du complexe insuline/récepteur ainsi que la dégradation de l'hormone. Ce mécanisme a pour effet de réduire la densité de IR au niveau de la membrane plasmique et donc à la désensibilisation de la cellule à l'insuline circulante (Carpenter and Briggs 1986).

E) Effets liés à l'action de l'insuline et pathologies associées : Résistance à l'insuline et diabète de type 2

E-1) Effets de l'inuline dans le système nerveux central (SNC)

L'insuline a un spectre d'action très large, elle régule le métabolisme des glucides, des lipides, des protéines et est aussi impliquée dans le contrôle de la division et la croissance cellulaire et ainsi que dans le contrôle central de la prise alimentaire. L'action anabolique de l'insuline se traduit par le transport des nutriments (glucoses, acides gras, acides aminés) et la synthèse des macromolécules (glycogen, triglycérides, protéines) en inhibant leur dégradation.

Le possible effet central de l'insuline a été décrit il y a environ 50 ans (Margolis and Altszuler 1967; Woods and Porte 1977). Mais le fait qu'il ait été difficile de montrer une corrélation entre l'effet central de l'insuline et ses effets sur la périphérie a laissé suggérer que le cerveau produisait lui-même l'insuline (Havrankova 1979; Reiser, Lenz et al. 1985). Depuis qu'il a été démontré que très peu ou pas d'insluline est produite par le cerveau (Woods, Seeley et al. 2003), que l'insuline pouvait traverser la barrière hématoencéphalique (BHE) (Banks 2004), et l'existence du IR au niveau de l'hypothalamus, le bulbe olfacif, le cervelet, l'hippocampe, le cortex cérébral et l'amygdale (Marks, Porte et al. 1990; Unger and Betz 1998), avec une expression particulièrement élevée dans l'hypothalamus et les régions suprachiasmatiques et périventriculaires (Corp, Woods et al. 1986), l'impact central de l'insuline a été admis. L'action de l'insuline au niveau central est modulée par de nombreuses hormones (comme la leptine, la sérotonine et la ghréline) et pour le contrôle de l'homéosatsie énergétique, elle se fait à travers la régulation de l'expression de neuropeptides tels que : NPY (neuropeptide Y, orexigène), AgRP (Agouti-related protein, orexigène) POMC (pro-opiomélanocortine, anorexigène) (Gerozissis and K. 2009).

Il a ainsi été montré que l'insuline avait un effet satiétogène central car son action au niveau, notamment de l'hypothalamus et du bulbe olfactif, inhibe la prise alimentaire et baisse le poids corporel (Air, Benoit et al. 2002). Chez des sujets obèses, on observe un faible taux d'insuline dans le SNC malgré les taux élevés d'insuline circulante (Woods 2003; Kern, Benedict et al. 2006). Ce qui a conduit Hallschmid et *al.* (2008) à montrer qu'une résistance à l'insuline au niveau central conduit à un gain de poids et au développement de l'obésité (Hallschmid, Benedict et al. 2008). Schwartz et *al.*, (1990) montrent d'ailleurs qu'en situation d'obésité, il existe une sensibilité réduite de l'insuline à la BHE (Schwartz, Sipols et al. 1990). Toutes ces observations ont permis de conlcure que de faibles taux d'insuline dans le cerveau favorisent le gain de poids et accroit une résistance périphérique de l'insuline (Laron 2001).

A noter que l'insuline joue également un rôle dans les processus cognitifs (Havrankova, Roth et al.

E-2) Le Diabète

Le diabète est une maladie chronique qui apparaît lorsque le pancréas produit peu ou pas d'insuline ou lorsque l'organisme montre une résistance à cette hormone. C'est la quatrième ou cinquième cause de mortalité notamment dans les pays industrialisés (OMS), même si la maladie s'étend de plus en plus dans les pays dit pauvres ou nouvellement industrialisés. Selon l'OMS, 356 millions de personnes sont atteintes de diabète dans le monde. En 2004, environ 3,4 millions de personnes en sont mortes. D'après les statistiques de l'OMS, le nombre de décès devrait doubler entre 2005 et 2030.

Il existe plusieurs types de diabètes dont les plus fréquents sont le diabète de type 2 (DT2) dû à une résistance à l'insuline (généralement consécutive à l'apparition de l'obésité) et le diabète de type 1 (DT1) qui est une maladie autoimmune caractérisée par une défaillance de la sécrétion de l'insuline par le pancréas.

E-2-1) Le Diabète de type 1 (DT1)

Le DT1 est aussi appelé diabète insulino-dépendant ou diabète maigre ou diabète juvénile. Il apparaît ainsi brutalement chez l'enfant ou le jeune adulte. Le DT1 est une maladie auto-immune qui détruit les cellules β pancréatiques, entrainant donc un défaut de sécrétion de l'insuline. Cette maladie, dont la prévention n'existe pas, est traitée par des injections quotidiennes d'insuline associées à un régime alimentaire stricte et équilibré (Source OMS).

E-2-2) Le diabète de type 2 (DT2)

Le DT2, aussi appelé diabète non insulino-dépendant ou diabète gras ou diabète de la maturité, se déclare en général à plus de 40 ans et représente 90% des cas de diabète dans le monde (OMS) et aussi associé dans de nombreux cas à l'obésité. Ce diabète est déclaré lorsqu'il existe une résistance à l'insuline des tissus périphériques. Pour ramener la glycémie à la normale, le pancréas sécrète encore plus d'insuline, ce qui va conduire à une hyperinsulinémie et plus tard, une hyperglycémie. Le DT2 favoriserait les risques cardiovasculaires, l'hypertriglycéridemie, et l'hypercholestérolémie. L'installation du DT2 peut être favorisée par plusieurs facteurs tels que des facteurs génétiques ou héréditaires, et environnementaux (mode de vie, sédentarité, alimentation hypercalorique et hyperlipidique). Il existe un lien complexe entre le DT2, l'insulino-résistance et

l'obésité.

F) La résistance à l'insuline

F-1) Résistance périphérique à l'insuline

L'insulino-résistance concerne tous les tissus cibles tels que le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux. Elle se traduit par une augmentation de la production hépatique de glucose, augmentation de la lipolyse, une dimunition de lipogenèse, la perturbation de la consommation du glucose par le muscle et une hyperplasie compensatoire des cellules β pancréatique (Asghar, Yau et al. 2006; Escribano, Guillén et al. 2009).

F-2) Résistance centrale à l'insuline

Il est maintenant admis que l'insuline joue un rôle au niveau central en contrôlant l'homéostasie énergétique, en régulant le métabolisme du glucose à la périphérie (Obici, Zhang et al. 2002). Une hyperinsulinémie périphérique chronique diminue l'expression du transporteur de l'insuline au niveau de la BHE (Schwartz and Porte 2005; Ketterer, Tschritter et al. 2011). La résistance à l'insuline associée au DT2 pourrait être en partie due à une diminution du niveau d'insuline dans le cerveau (Hallschmid and Schultes 2009) puisqu'une administration intranasale de l'insuline corrige partiellement les effets dus à l'insulino-résistance (Ketterer, Tschritter et al. 2011). Aussi, Tschritter et al., observaient que la réponse à l'insuline était absente chez les individus en surpoids (Tschritter, Preissl et al. 2006). Il a même été suggéré par ces mêmes auteurs que la résistance centrale à l'insuline ne serait pas seulement une conséquence de l'obésité mais le point de départ des défaillances métaboliques comprenant telles que DT2. L'insulino-résistance serait aussi associée aux pathologies liées aux proccesus cognitifs, la dépression et la maladie d'Alzheimer (Benedict, Hallschmid et al. 2007; Reger, Watson et al. 2008a; Reger, Watson et al. 2008b). Ainsi, en associant la résistance cérébrale à l'insuline ou DT2, certains auteurs ont qualifié la maladie d'Alzheimer de « diabète de type 3 » (Steen, Terry et al. 2005; Wrighten, Piroli et al. 2009).

F-3) Mécanismes de la résistance à l'insuline

L'insulino-résistance est la caractéristique pathologique clé du DT2 et de l'obésité. Les mécanismes moléculaires expliquant cette situation se trouvent au niveau du IR et/ou de ses voies de signalisation. Au début de l'installation de l'insulino-résistance, on observe un état de tolérance

au glucose, mais, associé à un défaut ou une signalisation altérée au délà du récepteur de IR (Cusi, Maezono et al. 2000; Saltiel and Kahn 2001; DeFronzo and Tripathy 2009). L'état plus avancé de la résistance à l'insuline est caractérisé par une intolérance au glucose et est associé à une baisse de la phosphorylation de IR. Cette baisse de la phosphorylation de IR ne peut pas seulement être expliquée par une diminution du nombre de IR à la surface de la membrane ou par une absence de fixation de l'insuline sur son récepteur (Caro, Ittoop et al. 1986; Nyomba, Ossowski et al. 1990; Saltiel and Kahn 2001).

Une surexpression de PTP1B, SOCS3 ou de PC-1/ENPP1 (*plasma cell membrane glycoprotein/ectonucleotide pyrophosphatase-phosphodiesteRASe 1*) peut également induire une résistance à l'insuline et constituent des cibles majeures pour le traitement du DT2 ou l'obésité (Drake and Posner 1998; Goldstein, Ahmad et al. 1998; Cheng, Dube et al. 2002; Asante-Appiah and Kennedy 2003; Dong, Maddux et al. 2005; Maddux, Chang et al. 2006). PC-1/ENPP1 se fixe sur IR et empêche le changement de conformation nécessaire pour l'autophosphorylation et l'activation du domaine kinase du récepteur (Maddux and Goldfine 2000).

Il a été montré qu'une surexpression aiguë et chronique de PC-1/ENPP1 induit une résistance à l'insuline et une hyperglycémie chez des souris (Dong, Maddux et al. 2005; Maddux, Chang et al. 2006).

L'insuline augmente l'expression de SOCS-3 (Starr, Willson et al. 1997; Emanuelli, Peraldi et al. 2000). Une surexpression de SOCS-3 a été obervée chez des souris rendues génétiquement DT2 et obèses, dans le tissus adipeux blanc où l'obésité a été induit par un régime « high fat » (Folli, Kahn et al. 1997; Takano, Haruta et al. 2001).

De nombreuses études montrent une implication de PTP1B dans l'insulino-résistance, notamment celle de (Elchebly, Payette et al. 1999). Depuis, PTP1B fait l'objet d'intenses recherches dans le design de ses inhibiteurs et est devenue une cible thérapeutique de choix pour le traitement du DT2 (Rondinone, Trevillyan et al. 2002; Zinker, Rondinone et al. 2002; Gum, Gaede et al. 2003a; Gum, Gaede et al. 2003b).

Puisque la phosphorylation de IRS sur les résidus de Ser/Thr induit une dissociaton de IRS de IR, ce mécanisme peut également conduire à une installation de l'insulino-résistance et donc potentiellement impliqué dans l'apparition du DT2 (Boura-Halfon and Zick 2009). Ainsi, l'induction par TNF- α (*tumor necrosing factor* α) de la phosphorylation par PI3K sur résidus de sérine de IRS pourrait également favoriser l'installation de l'insulino-résistance chez des souris obèses (Le Marchand-Brustel 1999). La leptine peut également induire la phosphorylation de IRS1 sur Sérine 318 ce qui pourrait également conduire à une résistance à l'insuline en situation de d'hyperleptinémie (Hennige, Stefan et al. 2006).

Certaines mutations du récepteur de l'insuline peuvent aussi engendrer une insulino-résistance. Il a
été montré que des mutations de la sous-unité réceptrice α diminue l'affinité de l'insuline pour son récepteur (Taouis, Levy-Toledano et al. 1994). On oberve aussi des mutations dans le domaine de liaison de l'ATP de la sous-unité β (Odawara, Kadowaki et al. 1989). Il peut également s'agir d'un dysfonctionnement du recyclage de IR dans la cellule (Taylor, Kadowaki et al. 1990). Chez certains patients, il a même été découvert une autoimmunité de la sous unité réceptrice de l'insuline, générant des anticorps qui empêchent l'insuline de se fixer (Flier, Kahn et al. 1976).

CHAPITRE 2: LA VOIE DE SIGNALISATION DES MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase)

I. Généralités

Il existe nombreuses voies de signalisation chez les Eucaryotes permettant de coordonner les processus cellulaires de façon adaptée aux stimuli environnementaux et extracellulaires. La voie de signalisation RAS/MAPK ou voie ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases) est une voie de signalisation majeure permettant d'intégrer un grand nombre de ces stimuli et d'induire une réponse cellulaire adéquate : métabolisme, différenciation, prolifération, apoptose, néovascularisation, la réparation et régénération tissulaire (McKay and Morrison 2007; Hunter 2009 ; Takeuchi and Ito 2011). L'activation de cette voie de signalisation a été longtemps considérée comme linéaire et se déroulait au niveau de la membrane plasmique. Ce modèle a cependant été abandonné lorsqu'il a été découvert que RAFet ERK pouvaient être activées dans différents compartiments intracellulaires et que les récepteurs à domaine tyrosine kinase (RTKs) pouvaient moduler l'activité de RAF et ERK à partir de ces sites (Di Guglielmo, Baass et al. 1994; Baass, Di Guglielmo et al. 1995; Burke, Schooler et al. 2001).

Cette voie de signalisation comporte quatre principales composantes RAS, RAF, MEK, MAPK (ERK, P38) et des protéines adaptatrices Grb2, Sos, Dos. Ces composantes sont activées par de nombreuses voies dont notamment la fixation d'un ligand sur un récepteur RTK (EGFR, IR, IGFR, VEGFR, FGFR, PDGFR, MET) (Figure 7).

L'origine, le développement et la progression de nombreux cancers est associée au dysfonctionnement (mutation hypermorphe, réarrangement et amplification de génique), de l'une ou plusieurs des composantes de cette voie (Morrison 2007).



Figure 7: La voie de signalisation RAS/MAPK répond à nombreux stimuli extracellulaires et intracellulaires et contrôle la motilité, la survie, la prolifération et la division cellulaire.

En absence de stimuli, RAS-GDP est inactif et reste associé à la membrane et RAF, MEK, ERK, inactifs, sont largement cytoplasmiques. Les facteurs de de croissance (GF) se lient et activent l'autophosphorylation des RTKs, générant des sites de liaison pour GRB2 qui recrute SOS, la « GTPase exchange factor », à la membrane. SOS va catalyser l'echange RASGDP en RASGTP et ce dernier va recruter RAF à la membrane et l'activer. Les hormones polypeptidiques, les neurotransmetteurs, et les chemokines (HNC) activent les récepteurs couplés aux protéines G et procèdent par la cascade des MAPK par une trans-activation en amont des RTKs ou par activation de la protéine kinase C (PKC). RAF active MEK et ce dernier active ERK par phosphporylations. ERK peut aussi réguler la cascade par « feeback » négatif en phophorylant MEK, ERK ou au niveau de SOS.

(Mendoza, Er et al. 2011)

II. Les récepteurs à tyrosine kinase (RTKs)

II-1) Historique et Structure

Le premier RTK, EGFR a été découvert il y a plus d'un quart de siècle (Carpenter 1977). L'homme compte 58 RTKs connus, regroupés en 20 sous familles (Blume-Jensen and Hunter 2001). Ces RTKs sont très conservés du nématode *C. elegans* à l'homme (Plowman, Sudarsanam et al. 1999; Adams, Epa et al. 2000; Miller, Malik et al. 2000). La majeure partie des RTKs a une architecture moléculaire similaire et est composée d'un domaine extracellulaire (pour la fixation de l'hormone, facteur de croissance ou autres molécules de signalisation), d'un domaine transmembranaire en hélices α , d'un domaine cytoplasmique qui est le domaine catalytique possédant l'activité tyrosine kinase et à proximité de ce domaine, les régions régulatrices du récepteur (Lemmon and Schlessinger 2010).

II-2) Activation

La plus part des RTKs sont activés par dimérisation faisant suite à la fixation du ligand sur son site de liaison situé sur le domaine extracellulaire du récepteur (Ullrich and Schlessinger 1990). Cependant, les récepteurs de l'insuline IR et IGFR sont exprimés à la surface de la cellule sous forme de dimère $(\alpha\beta)_2$ liés par des ponts disulfure. Ainsi, la fixation du ligand va induire un changement conformationnel du dimère et va stimuler l'activité kinase du récepteur (Ward, Lawrence et al. 2007).

Que ce soit sous forme monomérique ou oligomérique, l'activation du récepteur requiert toujours la fixation d'un ligand (Lemmon and Schlessinger 2010).

Les domaines extracellulaires et transmembranaires peuvent guider la dimérisation des domaines intracellulaires et ainsi activer la fonction kinase du domaine. Dans le dimère, un récepteur phosphoryle les résidus de tyrosine kinase du récepteur voisin : On parle de transactivation. Le récepteur phosphorylé sert alors comme site d'assemblage des protéines de signalisation intracellulaire (Ullrich and Schlessinger 1990).

Le mécanisme de dimérisation se fait de trois façons :

- Soit le ligand est dimérisé et sa fixation va engendrer deux molécules de récepteur (RTK), chacune fixée par une molécule ligand. Ces deux récepteurs ne rentrent pas en contact. C'est le cas des « nerve growth factor receptor » (Wiesmann, Ultsch et al. 1999), KIT, récepteur localisé sur les

cellules souches (Liu, Chen et al. 2007). Dans le dernier cas la fixation du ligand dimère induit un rapprochement des domaines C-terminaux intracellulaires. Ce mode de dimérisation est dit « ligand-mediated dimerisation ».

- Dans le second mode, dit « receptor-mediated dimerisation », la fixation du ligand sur une molécule de récepteur va induire le rapprochement d'une autre molécule de récepteur pour former le dimère et activer le domaine kinase. C'est le cas de l'EGFR (Garrett, McKern et al. 2002; Ogiso, Ishitani et al. 2002; Burgess, Cho et al. 2003).

- La dimérisation est intermédiaire entre les deux précédents modes. Le ligand dimère peut se fixer à l'interface des deux domaines extracellulaires des deux molécules de récepteur et cette fixation induit un rapprochement des domaines intracellulaires ou chaque ligand se fixe sur un récepteur et les deux couples se dimérisent (cas du FGFR) (Schlessinger and J. 2000; Stauber, DiGabriele et al. 2000).

Tous les récepteurs RTKs sont activés par l'un de ces mécanismes de dimérisation.

Après l'activation et l'autophosphorylation des RTKs, des protéines adaptatrices comme Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) qui contiennent un domaine SH2 (Src homology 2) et deux domaines SH3 (Seger 2008; Pierre, Bats et al. 2011), SOS (Son Of Sevenless) ou des protéines connues sous le nom de « docking proteins » (comme IRS, « insulin receptor substrate ») et possédant un domaine PTB (phosphotyrosine binding domain) (Pierre, Bats et al. 2011) vont relayer le signal à la GTPase RAS. Le recrutement des protéines se fait soit de façon directe et dans ce cas, le récepteur interagit directement avec la protéine adaptatrice ou de façon indirecte, et dans ce cas, l'interaction entre le récepteur et la protéine adaptatrice se fera via une « docking protéine » comme Gab1 qui va être phosphorylée par EGFR afin d'interagir avec Grb2 (Schlessinger and J. 2000).

Dans le cas de la voie RAS/MAPK, Grb2 va être recrutée et se fixer par son domaine SH2 sur les phosphotyrosines de Gab1 phosphorylée par un RTK activé (Schlessinger and Lemmon 2003; Pawson 2004). SOS, « Son Of Sevenless », est une "guanine nucleotide exhange factor" qui va permettre l'activation de RAS (Nimnual and Bar-Sagi 2002; Zhao, Du et al. 2007). En effet SOS, par la séquence en riche en résidus de proline (PXXP) de son extrémité C-terminale, interagit avec le domaine SH3 de Grb2 (Jorge, Zarich et al. 2002; Zhao, Du et al. 2007). Le recrutement de cette dernière au niveau du récepteur RTK activé, va ainsi permettre le rapprochement de SOS et RAS au niveau de la membrane plasmique où il va permettre l'echange d'un GDP par un GTP au niveau de RAS.

III-1) Structure et fonction

A) Structure

Les protéines RAS (Rat Sarcoma) appartiennent à la super-famille de GTPases monomériques également appelées famille de petites protéines G. Chez les mammifères, trois gènes ras ont été mis en évidence : H-ras, K-ras, N-ras. Ces gènes codent les protéines H-Ras, K-Ras4A, K-Ras4B (résultant de l'épissage alternatif de l'exon 4) et N-Ras. Ces protéines ont un poids moléculaire de 21kDa (Hettich and Marshall 1994; Colicelli 2004) et contiennent entre 188 (H-Ras, K-Ras4A, N-Ras) et 189 (K-Ras4B) acides aminés et présentant de grandes similitude de séquences en positions N- et C-teriminales (Roskoski 2010). Par exemple, le motif important pour la fixation et l'hydrolyse du GTP est présent dans les 165 premiers résidus d'acides aminés de la protéine (Figure 8). Dans ce même motif, entre le résidu numéro 32 et 40, se trouve le domaine effecteur de RAS qui est le site critique d'interaction avec tous ses effecteurs. La séquence C-terminale, aussi appelée région hypervariable commence à partir du résidu d'acide aminé numéro 165. Cette région est dite hypervariable parce qu'elle n'est pas conservée entre les différentes protéines RAS. Elle participerait également à la liaison avec les effecteurs (Williams, Drugan et al. 2000). Les quatre derniers acides aminés, très conservés entre les protéines RAS et formant le motif CAAX (C= cystéine, A= acide aminé aliphatique, X= autre acide aminé), permettent l'adressage et l'ancrage de RAS à la membrane plasmique (Hancock, Paterson et al. 1990).

Les protéines de la famille RAS sont localisées au niveau des membranes plasmiques lorsqu'elles sont inactives en absence de stimuli. Cette localisation, nécessaire pour l'activation de RAS, est due à la modification du motif CAAX qui se produit dans le réticulum endoplasmique avant qu'elles n'interagissent avec les lipides membranaires (Choy, Chiu et al. 1999). En effet, le résidu de cystéine subit une modification post traductionnelle, la farnesylation par une enzyme appelée farnesyltransférases. Ensuite, les résidus –AAX sont excisés par une endoprotéase. Après action de l'endoprotéase, le groupe carboxyl de la cystéine est maintenant libéré et constitue l'extremité C-terminale qui va être méthylée. Lorsqu'en amont du motif CAAX, se trouve un résidu de cystéine, celui-ci va être palmitoylé mais cette action est réversible. Cette action n'a lieu que chez les protéines RAS ayant 188 résidus d'acides aminés : H-RAS, K-RAS4A, N-RAS).



Figure 8: Structure des différentes isoformes de RAS.

La région hypervariable de RAS (HVR) détermine la différence fonctionnelle entre les différentes isoformes. Ces isoformes ont des identités de séquences au niveau des régions régulatrices et des régions d'interaction avec les effecteurs. La région HVR subie une modification post-tranductionnelle pour permettre l'interaction avec la membrane et leur localisation différentielle (les résidus indispensables à une localisation correcte sont indiqués en rouge). Les astérisques indiquent les sites de mutations oncogéniques portés par les codons 12, 13 et 61.

(Prior and Hancock 2012)

Les gènes *Ras* de mammifères sont exprimés dans toutes les lignées cellulaires, avec cependant, des variations significatives de leurs niveaux d'expression. Chez la souris, *H-ras* est plus élevé dans le cerveau, le muscle et la peau et plus faible dans le foie. Les transcrits *K-ras* sont plus abondants dans l'intestin, le poumon et le thymus et rares dans le muscle squelettique. Les transcrits *N-ras* sont principalement exprimés dans les testicules et le thymus (Leon, Guerrero et al. 1987).

B) Fonction

Les embryons de souris KO pour *K-ras* meurent dès le 12,5e jour du développement à cause d'un défaut de l'hématopoïèse (Johnson, Greenbaum et al. 1997), de la sous prolifération des cellules cardiaques et une augmentation de l'apoptose des cellules neuronales (Koera, Nakamura et al. 1997). En revanche, les embryons de souris déficientes pour *H-ras* ou *N-ras* naissent et grandissent normalement (Esteban, Vicario-Abejon et al. 2001), tout comme les souris KO à la fois pour *H-ras* et *N-ras* (Esteban, Vicario-Abejon et al. 2001).

C) Activation et régulation des protéines RAS

La protéine Ras est activée en réponse à nombreux stimuli extracellulaires, comme des cytokines, des facteurs de croissance ou de différenciation, des neurotransmetteurs ou le calcium. Ces stimuli initient une cascade d'évènements intracellulaires via des RTKs.

La RAS GTPase (Enzyme capable d'hydrolyser le GTP en GDP sur RAS) est un lien critique qui permet aux RTKs de médier le signal reçu jusqu'aux MAPK (McKay and Morrison 2007). L'activation de tous les RTKs induit un échange de GDP en GTP sur RAS qui devient actif et lui permet d'interagir avec ses effecteurs. Cette activation de RAS se déroule au niveau de la membrane plasmique et est catalysée par une « Gunanine nucleotide exchange factor » (GEF) appelée SOS (Son Of Sevenless). SOS qui est localisée dans le cytosole, est recrutée à la membrane plasmique grâce à son interaction constitutive avec Grb2 (Chardin, Camonis et al. 1993; Downward 1993) qui interagit par son domaine SH2 avec les phosphotyrosines du récepteur activé. Il est à noter que Grb2 peut interagir indirectement avec le récepteur soit via Gab1, ou même par l'intermédiaire de SHC (Src homology 2 domain-containing) (Schlessinger and J. 2000), qui se lie au RTK par son domaine PTB (Zhou, Harlan et al. 1995). En effet, SOS existe sous une forme autoinhibée et cette inhibition est levée lorsqu'elle interagit avec RAS. Dans un premier temps, SOS fixe RasGDP dans un site allostérique. Bien que ce site allostérique soit éloigné du site

catalytique il y aura induction d'une une faible activité d'échange de GDP par GTP sur RAS et va libérer RasGTP (Sondermann, Soisson et al. 2004). RasGTP se lie alors au même site sur SOS mais cette fois avec plus d'affinité et avec pour effet un changement conformationnel qui le rapproche du site catalytique. Ce rapprochement augmentera alors l'activité GEF (remplacement de GDP par GTP) (Margarit, Sondermann et al. 2003)

L'activation de RAS peut également survenir dans d'autres compartiments cellulaires tels que les endosomes où (Di Guglielmo, Baass et al. 1994) avaient découvert toutes les composantes de cette voie de signalisation à savoir EGFR, Grb2/Sos, RAS, RAF. D'autres études ont montré que la signalisation « médiée » par RAS peut également se faire au niveau du Golgi et du réticulum endoplasmique (Burke, Schooler et al. 2001).

Des données montrent que la cinétique de signalisation de RAS n'est pas la même suivant les compartiments cellulaires et que cette compartimentalisation pourrait être importante dans la l'ampleur, la durée de la signalisation mais aussi dans l'effet biologique final (Sorkin and Von Zastrow 2002).

Les RTKs peuvent aussi directement activer RAS du Golgi par l'intermédiaire du facteur d'échange RasGRP1 (Ras General receptor for phosphoinositides 1). Ce dernier est un complexe contenant un domaine activé par DAG (diacyl glycérol) et Ca⁺⁺ (Ebinu, Bottorff et al. 1998). En Effet, plusieurs RTKs activés induisent la production de DAG par la PLC γ (Phospholipase C γ) ce qui conduit à une augmentation du calcium intracellulaire. Ce sont ces seconds messagers qui vont activer et diriger RasGRP1 au niveau du Golgi où il va agir sur RAS local (Bevona, Tannous et al. 2003).

La signalisation « médiée » par RAS peut être stoppée lorsque le GTP est hydrolysé en GDP. RAS est capable d'hydrolyser elle-même le GTP grâce à son activité GTPase intrinsèque. Mais, cette activité étant faible, elle va être augmentée par la RasGAP pour « Ras GTPase Activating Protein ».

Dans environ 30% des cancers humains, les protéines RAS sont mutées et actives de façon constitutives. Dans les cancers du poumon, pancréas, colon, c'est notamment K-Ras qui est mutée (Bos 1989; Colicelli 2004). N-Ras est impliquée dans environ 10-15% des mélanomes (van Elsas, Zerp et al. 1995; Davies, Bignell et al. 2002).

L'activité de R-Ras, « Ras-related protein », peut être également régulée par phosphorylation par Src sur son résidu de Tyr66 dans la lignée de cellules 293T transfectées par v-Src (Zou, Liu et al. 2002).

D) Les substrats de RAS

RAS activée (RasGTP) peut interagir et activer nombreux substrats pour une réponse biologique donnée qui varie en fonction de la nature du stimulus. Les substrats les mieux connus sont les kinases de la famille RAF et la PI3-K. Les protéines RAF possèdent une forte affinité pour RasGTP grâce à leur domaine RBD (Ras Binding Domain). La protéine C-RAF est le premier effecteur de RAS (Koide, Satoh et al. 1993; Zhang, Settleman et al. 1993). La PI3K constitue une autre classe très bien connue des effecteurs de RAS (Rodriguez-Viciana, Warne et al. 1994).

IV. Structure Générale du domaine catalytique des protéines kinases

Le domaine kinase a la caractéristique d'avoir un petit lobe N-terminal et un grand lobe Cterminal (Figure 9) (Knighton, Zheng et al. 1991; Roskoski 2010; Roskoski 2012; Roskoski 2012).

Le petit lobe N-terminal contient principalement 5 feuillets β antiparallèles (Taylor and Kornev 2011) et est responsable de la fixation et l'orientation de l'ATP. Il contient également une grande hélice α C présente sous les formes actives et inactives de la kinase. Dans ce petit lobe, on trouve une boucle riche en résidus de glycine très conservée GXGXXG (G= Glycine, X= autres résidus d'acides aminés) où se fixe l'ATP. Elle est appelée pour cette raison « P-loop » (Roskoski 2010). C'est dans la « P-loop » que va être logé le phosphate γ , et les feuillets β 1 et β 2 vont accueillir l'adénine de l'ATP.

Un résidu de valine très conservé qui va établir les liaisons hydrophobes avec le noyau adénine suit directement le motif riche en résidus de glycine. Le feuillet β 3 contient la séquence typique AXK dans laquelle la lysine est conservée. L'hélice C du petit lobe contient également un résidu de glutamate conservé. Pour que la protéine soit active, un pont salin entre la lysine β 3 et le glutamate de l'hélice C doit être formé.

Le grand lobe est principalement constitué d'hélices α (α D- α I) (Taylor and Kornev 2011). Il contient aussi 4 courts feuillets β (β 6- β 9) qui contiennent la plus part des résidus catalytiques associés au phosphate γ qui doit être transféré aux protéines substrats.



Figure 9: Diagramme en ruban illustrant le modèle structurale des protéines kinases (ici B-RAF complexé à un inhibiteur, le Sorafenib).

La boucle d'activation est dans la conformation DFG-ASP, la conformation inactive. L'inhibiteur Sorafenib est situé dans le site actif entre les N-lobe et C-lobe. Une partie du segment d'activation, qui est désordonnée, est représentée en lignes interrompues connectant ses composantes N-terminale (haut) et C-terminale (bas).

(Wan, Garnett et al. 2004).

Le noyau catalytique est constitué de 12 sous domaines très conservés (Hanks, Quinn et al. 1988). Parmi eux, trois résidus d'acides aminés KDD illustrent les propriétés catalytiques de la kinase. Aussi, il existe un résidu de lysine, très conservé, qui établit un pont salin avec les phosphates α et β de l'ATP. Le second acide aspartique du motif KDD est le premier résidu du segment d'activation et fixe deux ions Mg²⁺ qui vont former des liaisons de coordinations avec les trois phosphates de l'ATP.

Le segment d'activation commence par les résidus d'acides aminés DFG et se termine par APE, à l'exception de MEK1 qui se termine par SPE.

Le site catalytique est situé dans un sillon entre le petit et le grand lobe et contient les ions Mg^{2+} complexés à l'ADP. Ces deux lobes peuvent se déplacer l'un par rapport à l'autre de façon à ce que le sillon puisse être sous un état « ouvert » ou « fermé » (Johnson 2009). L'état « ouvert » va permettre l'entrée de l'ATP et la libération de l'ADP alors que l'état « fermé » ramène les résidus dans un état catalytique actif pour le transfert du phosphate sur le substrat. Dans chaque lobe, il y a un segment polypeptidique qui peut se retrouver sous forme active ou inactive en fonction de la présence ou non des substrats. Dans le petit lobe, il s'appelle l'hélice α C et dans le grand lobe, il s'appelle le segment d'activation. Dans ce grand lobe, le segment d'activation commence avec les résidus d'acides aminés DFG. Sous la conformation inactive, la chaine latérale de l'acide aspartique est en dehors du site actif. Cette position est appelée « DFG Asp Out conformation » (Seeliger, Ranjitkar et al. 2009). Sous la conformation active, la chaine latérale de l'acide aspartique se positionne maintenant face au site de liaison de l'ATP et forme des liaisons de coordination avec les ions Mg2+. Ceci est appelé « DFG Asp In conformation » (Roskoski 2010; Roskoski 2012).

V. La famille des protéines RAF

V-1) Structure et fonction

A) Structure

RAF signifie «*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma* ». Elle est ainsi appelée parce que le virus 3611 du sarcome murin augmente l'induction du sarcome chez les nouvelles portées de souris. En effet, la protéine virale, oncogène découvert en 1983 (Zebisch, Cerroni et al. 2003), responsable de ce phénotype ressemble fortement à RAF. La famille des protéines RAF est composée de trois isoformes. A-Raf, B-Raf et C-Raf. Ce sont des Ser/Thr kinases. Raf1 découverte en 1985 est

maintenant appelée C-Raf (la plus étudiée). A-Raf et B-Raf ont été découvertes en 1986 et 1988 respectivement (Roskoski 2010).

RAF est aussi appelée MAPKKK, pour MAPK kinase kinase (ou MKKK).

Les trois isoformes RAF partagent trois régions conservées (CR) nommées CR1, CR2 et CR3. CR1 et CR2 apprtiennent au domaine N-terminal alors que CR3 est dans le domaine C-terminal (Wellbrock, Karasarides et al. 2004) (Figure 10).

CR1 est composé du Ras-binding domain (RBD) et d'un domaine riche en résidus de cystéines (CRD) qui peut fixer deux ions zinc. CR1 interagit avec RAS et les lipides membranaires (Roskoski 2010).

CR2 est un domaine riche en résidus de Ser/Thr. C'est le domaine, une fois phosphorylé, où va se lier la protéine régulatrice 14-3-3. Lorsque cette dernière se fixe sur le résidu de sérine phosphorylé, elle inhibe la protéine RAF (souvent elle fixe RAF dans une localisation particulière de la protéine située après le domaine CR3 de l'extrémité C-terminale) (Roskoski 2010).

CR3 est le domaine kinase de la protéine et est localisé à côté de l'extrémité C-terminal.

B) Fonction

Les protéines RAF jouent un rôle clé dans la voie de signalisation de ERK. En effet, dans 30 à 60% des cancers, on trouve une mutation de l'une des trois isoformes des protéines RAF (Roskoski 2010).



Figure 10: Structure des isoformes de Raf

CR1, CR2 et CR3 indiquent la localisation des trois régions conservées. CR3 est le domaine kinase qui contient un segment d'activation. La localisation des résidus de sérine (S), thréonine (T) et tyrosine (Y) est numéroté. pS446 de B-RAF est constitutivement phosphorylée. Les deux sites de liaison indépendants de la protéine régulatrice 14-3-3 sont indiqués.

(Roskoski 2010)

C) Activation de RAF

Les protéines RAF existent dans le cytosol sous formes inactives avec leur domaine Nterminal agissant comme un autoinhibiteur de domaine kinase en C-terminal (Rapp, Goldsborough et al. 1983). La protéine 14-3-3 se fixe sur les résidus de Ser43 (Wu and Maniatis 1993). Ser233 (Dumaz and Marais 2003) et Ser259 (Dhillon, Pollock et al. 2002; Light, Paterson et al. 2002) phosphorylés pour maintenir cet état d'autoinhibition (Dhillon, Pollock et al. 2002; Light, Paterson et al. 2002). Toutes les protéines RAS activées (RasGTP) peuvent directement interagir avec les protéines RAF. Or les protéines RAF, pour être actives, s'organisent en homo ou hétérodimères (Rushworth, Hindley et al. 2006), donnant ainsi 24 possibilités d'interactions entre les 6 dimères RAF et les 4 protéines RasGTP (Roskoski 2010). Cette interaction est la première étape requise pour l'activation de RAF. Après activation des RTKs, RAF est recrutée à la membrane via RasGTP qui induit la libération de la protéine 14-3-3 du domaine N-terminal. RAF se retrouve alors sous une forme qui permette la phosphorylation de son domaine kinase au niveau des sites d'activation. L'effet de la phosphorylation par PKA (proéine kinase A) (Dhillon, Pollock et al. 2002), par Src (Fabian, Daar et al. 1993; Marais, Light et al. 1995; Marais, Light et al. 1997), par PKC (protéine kinase C) (Kolch, Heidecker et al. 1993), la liaison à RAS et l'interaction avec les lipides membranaires est de lever l'autoinhbition du domaine N-terminal et de mettre RAF sous sa forme active (Morrison 2007).

Il a été aussi montré que l'activation de RAF dépend aussi des phosphatases PP1 et PP2A (Abraham, Podar et al. 2000; Ory, Zhou et al. 2003). Ces phosphatases permettent en effet de lever l'effet inhibiteur de la protéine 14-3-3, fixé en N-terminal sur le CR2, en la libérant de RAF par déphosphorylation des résidus de sérine (Rodriguez-Viciana, Oses-Prieto et al. 2006). Il a aussi été montré que l'hétérodimérisation avec B-RAF permet l'activation de C-RAF (Weber, Slupsky et al. 2001). Cependant, on ne sait pas si la phosphorylation du segment d'activation, nécessaire pour l'activation, se fait par B-RAF, par le recrutement d'une autre kinase ou par autophosphorylation de C-RAF.

Une fois activés, tous les membres de la famille des protéines RAF sont capables d'initier une cascade de phosphorylation. Le susbstrat le mieux caractérisé des protéines RAF est MEK (Wellbrock, Karasarides et al. 2004; Roskoski 2010).

D) Régulation de RAF

La régulation physiologique des kinases RAF se fait en plusieurs étapes et implique des interactions protéines-protéines, des cascades de phosphorylation/déphosphorylation et des changements conformationnels (Wellbrock, Karasarides et al. 2004).

D-1) C-RAF

Dans le domaine N-terminal, on a une phosphorylation basale des résidus Ser259 et Ser 621 (Dougherty, Muller et al. 2005). Celles-ci (notamment la phosphorylation de la Ser259) permet l'inhibition de la kinase par fixation des protéines 14-3-3 (Dhillon, Pollock et al. 2002; Dougherty, Muller et al. 2005); Light, 2002 #538}. La phosphorylation de la Thr491 et la Ser494 (Chong, Lee et al. 2001) est nécessaire pour la stimulation de l'activité kinase. La phosphorylation de la Ser471 est nécessaire pour l'activation de C-RAF et son interaction avec MEK1/2 (Zhu, Balan et al. 2005). ERK est capable d'exercer une inhibition « feedback » sur C-RAF en phosphorlylant les résidus de Sérine 29, 43, 289, 296, 301, et 642 (Dougherty, Muller et al. 2005).

D-2) A-RAF

A la différence de C-RAF, la protéine 14-3-3 participerait à l'activation de A-RAF en se fixant sur les résidus de Sérine 214 et 582 (Baljuls, Schmitz et al. 2008). Cette étude montre aussi que la phosphorylation de la Ser432 située dans la boucle catalytique est requise non seulement pour l'activité kinase mais aussi pour la liaison avec MEK1/2. La même étude montre que la phosphorylation des Ser257, 262, 264 est nécessaire pour la stimulation de l'activité kinase.

D-3) B-RAF

Comme C-RAF, la phosphorylation des résidus de Ser365 dans le CR2 et Ser729 à proximité de l'extrémité C-terminale est nécessaire pour la fixation de la protéine 14-3-3 et l'inhibition de la kinase. La phosphorylation de la Thr599 et Ser602 (Wellbrock, Karasarides et al. 2004), de même que celle de la Ser579 et la liaison à MEK1/2 (Zhu, Balan et al. 2005) est indispensable pour l'activité kinase de B-RAF. Alors que A-RAF et C-RAF requiert la phosphorylation des résidus de la région N-terminale pour être actives, B-RAF, ayant dans sa région N-terminale des résidus d'acides aminés négativement chargés, n'a pas besoin d'être phosphorylé pour être active. L'activité basale de B-RAF est supérieure à celle de C-RAF qui elle est supérieure à celle de A-

RAF. B-RAF subit également de la part de ERK une inhibition « feedback » par la phosphorylation de ses résidus Ser151, Thr401, Ser750 et Thr753 (Ritt, Monson et al. 2010).

A l'exception des sites de phosphorylation connus de ERK sur les kinases RAF, les protéines kinases qui catalysent la phosphorylation des résidus de Ser/Thr des protéines RAF ne sont pas connues (Roskoski 2010).

VI. La famille des protéines MEKs

VI-1) Structure et fonction

A) Structure

Il existe deux parologues de protéines MEK chez les mamifères: MEK1 (45KDa) et MEK2 (46KDa). Ces protéines hydrophiles, sont exprimées de façon ubiquitaire et représentent le module MAPKK des MAPKs (Roskoski 2012). Les protéines MEKs sont aussi appelées MAPKK, pour MAPK kinase (ou MKK)

Les protéines MEKs sont constituées (Figure 11) :

- D'une séquence N-terminale trifonctionnelle d'environ 70 résidus d'acides aminés, composée d'un segment inhibiteur, une séquence d'exportation nucléaire (Fukuda, Gotoh et al. 1997), et une séquence qui leur permette de fixer leurs substrats ERKs (Roskoski 2012),

- D'un domaine kinase d'environ 290 résidus d'acides aminés,

- D'une séquence C-terminale d'environ 20 résidus d'acides aminés (Fischmann, Smith et al. 2009).

La séquence N-terminale est composée d'un segment inhibiteur, d'une séquence d'export nucléaire (NES) (Fukuda, Gotoh et al. 1997) et d'un segment qui permet la liaison aux protéines substrats ERKs (Roskoski 2012).

B) Fonction

Les protéines MEKs sont des kinases à double spécificité car elles phosphorylent les résidus de thréonines et tyrosine des protéines ERK1/2, leurs seuls substrats connus (Wortzel and Seger 2011; Roskoski 2012).

Des embryons de souris KO pour MEK1 sont létaux (Catalanotti, Reyes et al. 2009). La suppression de MEK1 diminue de la prolifération des fibroblastes vers la matrix extracellulaire (haptotaxis) mais de façon inattendue, augmente la migration des fibroblastes induite par les facteurs de croissance (chemotaxis).



Figure 11: Oragnisation de la structure de MEK1/2

Les données expérimentales des dites de phosphorylation sont obtenues de <u>www.phosphonet.ca</u> (Roskoski 2012). Ce phénotype est dû chez ces souris à une augmentation de l'activation de ERK. Cette même étude montre en effet que MEK1/2 forme des hétérodimères afin d'être négativement régulée. C'est en effet un « feedback » négatif qu'exerce ERK en phosphorylant le résidu de Tyr292 de l'hétérodimère MEK1/2. C'est cette phosphorylation qui va permettre la déphosphorylation des résidus Ser218 et S222 du segment d'activation de MEK. En conclusion, si MEK1 est supprimée, l'association avec MEK2 n'a plus lieu, de ce fait la régulation négative par « feedback » ne peut plus se faire; la phosphorylation de MEK2 et ERK sera donc prolongée.

C) Activation de MEK

Comme pour nombreuses protéines kinases, le site d'activation des protéines MEKs contient un ou plusieurs sites de phosphorylation qui peuvent être phosphorylés par une kinase de même famille (comme pour le récepteur EGFR par transphosphorylation) ou de famille différente (MEK1 par B-RAF) (Roskoski 2012). Pour que MEK1 soit activée, les résidus de Ser218 et Ser222 (S222 et S226 chez MEK2) du segment d'activation doivent être phosphorylés (Zheng, Ohmichi et al. 1994) car la mutaton de ces deux résidus de sérine en alanine abolit l'activation de MEK1 par les facteurs de croissance dans les cellules Swiss 3T3 (Roskoski 2012). Cette phosphorylation serait « médiée » par C-RAF sur la protéine MEK1 de lapin (Alessi, Saito et al. 1994). La même étude montre cependant que, une fois les deux résidus phosphorylés, la déphosphorylation de l'un d'eux par la phosphatase PP2A n'inactive pas MEK.

Un autre étude montre que la phosphorylation du résidu de Thr298 par PAK1 (P21-activated kinase-1) renforce l'association entre MEK1 et ERK (Eblen, Slack-Davis et al. 2004). Ainsi, lorsque cette phosphorylation suit celle des résidus de Ser218 et Ser222, ERK est activée en réponse aux différents stimuli.

Il est important de noter que l'association des protéines MEKs avec ses partenanires en amont (RAFs) et en aval (ERKs) de la voie MAPK est « médiée » par les proteins KSR1/2 (Wortzel and Seger 2011).

D) Inhibition de MEK

La phosphorylation du résidu de Ser212 réduit ou inhibe l'activation de MEK car elle va avoir pour effet de diminuer la phosphorylation du résidu de Thr298. La kinase responsable de cette phosphorylation est inconnue (Gopalbhai, Jansen et al. 2003). La phosphorylation des résidus Thr292 par ERK (Rossomando, Dent et al. 1994) et la Thr386 phosphorylée par Cdk5

54

(Rossomando, Dent et al. 1994) et ERK (Matsuda, Gotoh et al. 1994; Rossomando, Dent et al. 1994) inhibent également l'activation de MEK. Notons que pour que MEK soit phosphorylée par ERK, il est indispensable qu'il soit sous forme hétérodimère (MEK1/MEK2).

VII. La famille des protéines ERKs

VII-1) Structure et fonction

A) Structure

Nombreux messagers secondaires (diacylglycérol, calcium, protéine kinase A, cAMP) peuvent activer ERK (extracellular-signal-regulated kinase) à travers les petites protéines G, RAS et Rap1.

ERK1 (379 acides aminés, 43KDa) et ERK2 (360 acides aminés, 41KDa) (Figure 12) humain ont environ 84% d'identité de séquence et partagent presque, sinon toutes les fonctions. Pour cette raison, elles sont nommées ERK1/2 (Llyod 2006). Elles contiennent une insertion de 31 résidus d'acides aminés dans le domaine kinase appelé « kinase insert domain » qui leur attribut une spécificité fonctionnelle. Lorsque ces protéines sont phosphorylées par MEK, elles migrent avec un poids moléculaire apparent de 44kDa pour ERK1 et 42kDa pour ERK2 d'où leur appellation P44 et P42 respectivement.

ERK est aussi appelée MAPK.

B) Fonction

A la différence de MEK et RAF, les kinases ERK1/2 possèdent plus de 175 substrats cytoplasmiques et nucléaires (Yoon and Seger 2006). Elles phosphorylent les substrats sur un motif Pro-Xxx-Ser/Thr-Pro. On dit que ce sont des kinases dirigées par le résidu de proline (Gonzalez, Raden et al. 1991).



Figure 12: Architecture de ERK1 et ERK2 humain.

Les numéros sont ceux des résidus d'acides aminés.

(Roskoski 2012)

Pagès et al. montrent que ERK1 est nécessaire mais pas vitale pour le développement de la souris (Pages, Guerin et al. 1999). Par contre une délétion de *ERK2* induit la mort des embryons de souris au 6,5 jours (Yao, Li et al. 2003). Ceci montre que, bien qu'on pourrait penser que ERK1 et ERK2 ont la même fonction puisqu'elles sont activées de la même façon (Lefloch, Pouyssegur et al. 2009), et qu'en les exprimant en bactéries elles possèdent la même fonction *in vitro* (Robbins, Zhen et al. 1993), qu'au moins une partie des substrats phosphorylés par ces kinases est différente puisque que les souris déficientes pour *ERK1* sont viables, fertiles, de tailles normales (Nekrasova, Shive et al. 2005), et Yao et al., montrent que ERK1 et ERK2 ne sont pas entièrement fonctionnellement redondantes (Yao, Li et al. 2003).

C) Activation et régulation de ERK

Le passage de la conformation inactive à la conformation active des protéines ERKs requiert la phosphorylation par MEK1/2 des résidus de Thr202/Tyr204 (ERK1) et Thr184/Tyr186 (ERK2) de la signature Thr-Glu-Tyr située dans le segment d'activation. Toutes les MAPKs contiennent une signature TXY dans leur segment d'activation : Jnk (Thr-Pro-Tyr), P38 (Thr-Gly-Tyr). En effet MEK1/2 phosphoryle d'abord le résidu de tyrosine du segment d'activation de ERK (Haystead, Dent et al. 1992) qui va se dissocier de MEK1/2 avant de se réassocier pour la phosphorylation du résidu de thréonine de ce même segment d'activation (Ferrell and Bhatt 1997). Les MAPKs ne sont activées que lorsque ces deux résidus sont phosphorylés.

Les protéines ERKs étant activées à la suite d'une double phosphorylation sur les résidus de tyrosines et thréonines, l'inhibition de leur activité suppose l'implication de trois types de phosphatases (Zhou, Wang et al. 2002):

- Les phostases à Ser/Thr pour la déphosphorylation du résidu de thréonine.
- Les phosphatases à tyrosines pour la déphosphorylation du résidu de tyrosine.
- Les phosphatases à double spécificité capables de déphosphoryler les deux résidus à la fois.

Anderson et *al.*, (1990) et Boulton et al., 1991 montrent que ERK est désactivée lorsqu'elle est déphosphorylée par la phosphatase PP2A qui est une phosphatase spécifique pour les phosphoSer/Thr (Anderson, Maller et al. 1990; Boulton and Cobb 1991). Hermiston et al., Anderson et al., et Boulton et al., montrent également que ERK2 est complètement inactive lorsqu'elle est déphosphorylée par CD45 (l'isoforme de TC-PTP liée au RE) qui est une phosphatase spécifique pour les phosphotyrosines (Anderson, Maller et al. 1990; Boulton and Cobb 1991; Hermiston, Zikherman et al. 2009). ERK1/2 peut aussi être déphosphorylée par une « MAPK phosphatase (MKP) », la MKP3 qui est une phosphatase à spécificité double capable donc

de déphosphoryler les résidus de tyrosine et de thréonine phosphorylés (Camps, Nichols et al. 2000; Keyse 2000; Zhou, Wang et al. 2002).

Cependant, Majumdar et *al.*, (2010) montre que ERK reste fonctionnel que ce soit sous forme phosphorylée ou non. Ils montrent que dans les yeux et ailes de drosophile, l'état non-phosphorylé de ERK est suffisant pour induire la division mais pas la croissance cellulaire (Majumdar, Paez et al. 2010). Ce qui voudrait dire que ERK joue un rôle clé dans la prolifération cellulaire même étant cytoplasmique et n'a donc pas besoin de transloquer après phosphorylation pour assurer une partie de ses fonctions.

L'activité de ERK1/2 est aussi régulée par nombreuses protéines « Scaffold » telles que KSR1/2, β-arrestin1/2, MP1 (MEK partner 1) (Casar, Sanz-Moreno et al. 2012; Roskoski 2012).

D) Substrats des kinases ERKs

Les kinases ERKs ont plus 175 substrats de nombreux types :

- Les substrats nucléaires. ERK1/2 activent les facteurs de transcription et certains de leurs activateurs (Yoon and Seger 2006). Une des cibles de ERK est la famille des protéines TCF (ternary complex factor) qui sont des facteurs de transcription qui vont induire l'expression des gènes tels que c-Fos et c-Myc et c-Jun impliqués dans la motilité, la division et la survie celleulaire (Murphy, Sakoori et al. 2006; Hollenhorst, Paul et al. 2011), c-Jun (Morton, Davis et al. 2003). Elles sont aussi impliquées dans la catalyse du remodelage de la chromatine et de la répression transcriptionnelle (Plotnikov, Zehorai et al. 2011).

- Les substrats cytoplasmiques. Elles phosphorylent plus de 50 protéines cytoplasmiques incluant la famille des protéines RSKs (Ribosomal S6 Kinase), les phosphoprotéines phosphatases, les phosphodiesterases de l'AMPc (PDE4), la phospholipase A2, les protéines du cytosquelette et les protéines proapoptotiques (Yoon and Seger 2006). La plupart de ces phosphorylations vont conduire à la division de la cellule.

Les protéines ERKs possèdent une séquence de translocation nucléaire leur permettant d'entrer dans le noyau et phosphoryler leurs cibles (Chuderland, Konson et al. 2008). 10 min après une stimulation, 50-70% de ERK1/2 est transloquée dans le noyau (Gille, Strahl et al. 1995).

VIII. MAPKs et pathologies chez l'homme

Puisqu'elle est la voie RAS/MAPK régule la division, la prolifération, la différenciation cellulaire, l'adhésion, l'apoptose, le métabolisme, de nombreux cancers sont associés à la mutation

d'une ou plusieurs composantes de cette voie de signalisation. Dans plus de 1/3 de cancers, l'activité des protéines composantes de la voie RAS/MAPK est fortement augmentée (Roskoski 2012).

RAS est muté dans environ 30% des cancers humains (Bos 1989). Environ 7% des cancers humains sont associés à une mutation de *RAF* (Davies, Bignell et al. 2002). Parmi les trois paralogues de *RAF*, *B-RAF* est le gène le plus souvent trouvé muté dans les cancers associés à *RAF*. Le plus souvent la mutation de B-RAF concerne la boucle riche en glycine située dans le segment d'activation et dans 90% des 65 mutations connues de *RAF*, c'est le résidu de valine en position 600 qui est muté par un résidu d'acide glutamique (V600E) (Roskoski 2010).

CHAPITRE 3: LES KINASES LAMMER

I. Historique

Rabinow et al. avaient découvert que la mutation du gène de drosophile *Doa (Darkener of apricot)* entrainait la formation des yeux rugueux et une augmentation de l'accumulation d'environ 4 fois (Rabinow and Birchler 1989; Rabinow, Chiang et al. 1993). Le clonage et le séquençage du gène montrait la présence d'un motif des kinases S/T, et, l'alignement du gène *Doa* avec les bases de données a révélé qu'il appartenait à une famille de protéines kinases conservée, avec les homologues chez l'homme, la souris et chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* que Rabinow et al. ont nommé kinases « LAMMER », basé sur la présence d'un motif EHLAMMERILG dans le sous domaine X de la kinase et quasiment identique chez tous les homologues (Yun, Farkas et al. 1994).

Chez l'homme et la souris, la kinase CLK1 (cdc2-like kinase) a d'abord été décrite. Elle a ainsi été appelée du fait de la similitude de séquence en acides aminés avec la kinase cdc2 dans certains des sous domaines catalytiques (Stodjl and Bell 1999). CLK1 est aussi appelée STY puisqu'elle possède une spécificité double. C'est-à-dire que c'est par elle qu'il a été obervé pour la première fois l'autophosphorylation aussi bien sur les résidus de Ser/Thr (S/T) que le résidu de Tyr (Y). Les études suivantes ont permis d'identifier 4 paralogues des kinases LAMMER, CLK1-4 chez les vertébrés. Les kinases d'autres espèces ont aussi été décrites : *Arabidopsis thaliana* (ACF1-3) (Bender and Fink 1994), *Nicotiana tabacum* (PK12) (Sessa, Raz et al. 1996), *Saccharomyces cerevisiae* (KNS1) (Padmanabha, Gehrung et al. 1991), *Schizosaccharomyces pombe* (Lkh1) (Park, Kang et al. 2003), *Plamosdium falcifarum* (PfLAMMER) (Li, Targett et al. 2001). Toutes ces kinases possèdent un motif peptidique très conservé contenant la séquence en acides aminés LAMMER dans leur domaine catalytique X.

Les kinases Cyclin-dependant kinases (Cdk), Glycogen synthase kinases (GSK) et les MAPK, ont la spécificité de porter le motif CMGC, permettant de les classifier dans la famille des kinases CMGC. Ces kinases sont dites « prolines dirigées » c'est-à-dire, qu'elles préfèrent un résidu de proline en position +1 du site de phosphorylation (Kannan and Neuwald 2004).

Certains gènes impliqués dans le rythme circadien chez le nematode *C. elegans* sont appelés CLOCK (CLK chez le nématode et HCLK chez l'homme). Ceux-ci sont souvent confondus avec les kinases LAMMER (CLKs chez l'Homme), mais n'ont rien à voir.

II-1) Structure

A) Structure protéique

Les kinases LAMMER possèdent toutes un domaine catalytique dans la partie C-terminal de la protéine (Figure 13). La séquence en acides aminés et la structure de ce domaine catalytique de ces kinases ont un degré de similitude élevé avec pratiquement 100% d'identité de certains résidus et motifs clés du domaine catalytique (Rabinow, 2012, in press). Les motifs HTDLKPENIL et STRHYRAPEVIL des sous domaines catalytiques VIb et VIII respectivement sont identiques à 100% ou presque dans tous les membres de cette famille. Ces motifs sont fortement impliqués dans la reconnaissance du substrat ou dans l'orientation du phosphate à transférer. Le motif HTDLKPENIL est particulier aux kinases LAMMER. A l'exception des kinases SRPK (elles phosphorylent comme les kinases LAMMER, les protéines ayant une répétition de résidus RS souvent impliquées dans le splicing) où ce résidu de thréonine est présent, chez d'autres kinases, il est remplacé par soit une arginine soit une cystéine. Cette substitution, précédant un résidu d'acide aspartique qui est considéré comme activant l'hydroxyle du substrat entrant, doit signifier une sélectivité de substrat. Aussi, le motif GEGXFGXV présent dans le sous domaine I et nécessaire à la liaison de l'ATP est très conservé chez toutes les kinases LAMMER. Chez certaines kinases LAMMER, certains résidus d'acides aminés du motif EHLAMMERILG ne sont pas identiques. C'est le cas par exemple de KSN1 de *S. cerevisiae* (EHMAMMQRIL) et CLK3 (EHLVMMEKIL) (Figure 14).



Figure 13: Structure des domaines des protéines kinases Eucaryotes

La position des acides aminés et des motifs hautement conservés est indiquée au dessus des sous domaine (Hanks, 2003).

481						540	
	DOA	VKNTDVRLID	FGSATFDHEH	HSTIVSTRHY	RAPEVILELG	WSQPCDVWSI	GCILFELYLG
	CLK1	LINPDIKVVD	FGSATYDDEH	HSTLVSTRHY	RAPEVILALG	WSQPCDVWSI	GCILIEYYLG
	CLK2	VKSTAARVVD	FGSATFDHEH	HSTIVSTRHY	RAPEVILELG	WSQPCDVWSI	GCIIFEYYVG
	CLK3	VKNTSIRVAD	FGSATFDHEH	HTTIVATRHY	RPPEVILELG	WAQPCDVWSI	GCILFEYYRG
	AFC1	PKSSAIKLID	FGSTTFEHQD	HNYIVSTRHY	RAPEVILGVG	WNYPCDLWSI	GCILVELCSG
	AFC2	PKSSAIKVID	FGSTTYERQD	QTYIVSTRHY	RAPEVILGLG	WSYPCDVWSV	GCIIVELCTG
	PK12	PKSSAIKVID	FGSTAYERPD	HNYIVSTRHY	RAPEVILGLG	WSYPCDLWSV	GCILIELCSG
	KNS1	LKNPEIKIID	FGSAIFHYEY	HPPVISTRHY	RAPEIVLGLG	WSFPCDIWSI	ACVLVELVIG
		541					600
	DOA	ITLFQTHDNR	EHLAMMERI.		<u>L</u>	<u>G</u> QIPYRMARK	T.KTK
	CLK1	FTVFPTHDSK	EHLAMMERI.		<u>L</u>	GPLPKHMIQK	TRKRK
	CLK2	FTLFQTHDNR	EHLAMMERI.		<u>L</u>	GPIPSRMIRK	TRKQK
	CLK3	FTLFQTHENR	EHLVMMEKI.		<u>L</u>	<u>G</u> PIPSHMIHR	TRKQK
	AFC1	EALFQTHENL	EHLAMMERV.		<u>L</u>	GPLPPHMVLR	ADRRSEK
	AFC2	EALFQTHENL	EHLAMMERV.		<u>L</u>	GPFPQQMLKK	VDRHSEK
	PK12	EALFQTHENL	EHLAMMERV.		<u>L</u>	<u>G</u> PLPSQMLKR	VDRHAEK
	KNS1	ESLYPIHENL	EHMAMMQRIN	GTPFPTDIID	KMFYKSKHKL	GNSPSDLNST	VIKHFDRKTL

Figure 14: Alignements de séquences protéiques des sous domaines VII-X de certains membres de la famille des protéines LAMMER aribitrairement sélectionnés. Le motif EHLAMMERILG est propre aux membres de cette famille de kinase. DOA: *Drosophila melanogaster* (Yun, Farkas et al. 1994; Kpebe and Rabinow 2008); CLK1, 2, 3: human (Bender and Fink 1994; Nayler, Stamm et al. 1997); PK12: tobacco (Sessa, Raz et al. 1996); KNS1: *S. cerevisiae* (Padmanabha, Gehrung et al. 1991). AFC : *Arabidopsis thaliana*. Les acides aminés sont numérotés en fonction des résidus de l'isoforme 55kDa de la kinase DOA. Notez l'insertion

Les données récentes basées sur les structures cristallographiques des kinases de mammifères CLK1 et CLK3 montrent que le motif LAMMER (dans une hélice α) est situé à l'intérieur de la protéine (Bullock, Das et al. 2009). Certaines études montrent que ce motif est nécessaire pour l'activité kinase (Savaldi-Goldstein, Sessa et al. 2000) et pour la localisation nucléaire de la kinase (Savaldi-Goldstein, Aviv et al. 2003).

Bien que les kinases SRPK et LAMMER soient apparentées, ces dernières ne possèdent pas un site « docking » pour leurs substrats. Ceci pourrait expliquer le fait qu'elles phosphorylent des substrats plus variés que SRPK (Colwill, Feng et al. 1996; Velazquez-Dones, Hagopian et al. 2005). Les données de Bullock et al. suggèrent que ces kinases sont actives de façon constitutive sous leurs formes non-autophosphorylées (Bullock, Das et al. 2009). Ces données sont soutenues par celles montrant que DOA est inactivée par autophosphorylation de son domaine catalytique (données non publiées). Il est aussi connu que l'autophosphorylation de CLK2 affecte sa distribution intranucléaire dans les cellules en culture (Nayler, Schnorrer et al. 1998).

Le domaine N-terminal des kinases LAMMER ne possède pas d'activité catalytique et est très divergent parmi les membres de la famille. Ce domaine contient de courtes répétitions uniques ou doubles des motifs Ser-Arg (sauf chez les kinases LAMMER d'*Arabidopsis thaliana*). Bien qu'elles possèdent donc toutes un domaine N-terminal chargé positivement (car riches en acides aminés basiques) avec un pI élevé, l'évolution aurait été moins contraignant en raison du manque d'activité catalytique de ce domaine, ce qui pourrait expliquer la grande divergence de ce domaine entre les différentes kinases LAMMER.

CLK1 est capable de dimériser *in vitro*. Cette dimérisation, indépendante du domaine catalytique (Duncan, Howell et al. 1995), pourrait permettre la régulation de la localisation, de l'autophosphorylation ou encore la sélection des substrats ou des partenaires de liaison de la kinase. L'idée de dimérisation est soutenue par des données génétiques sur complémentation partielle observée entre différents allèles de *Doa* (Kpebe and Rabinow 2008).

Menegay et al. ont montré que l'extremité N-terminale pourrait réprimer l'activité catalytique des kinases LAMMER (Menegay, Myers et al. 2000). Il observe que l'activité de CLK1 tronquée est augmentée, *in vitro*, d'un facteur 45 par rapport à l'activité de la kinase « full length ».

B) Structure des ARNm

Les transcrits de tous les paralogues de mammifères (CLK1-4) sont épissés de façon alternative pour produire des protéines pour lesquelles, à cause de l'utilisation prématurée d'un codon stop, il manque le domaine catalytique. C'est ainsi que les études portant sur les cibles potentielles du mécanisme « nonsense-mediated decay », après analyse des isoformes alternatives des protéines humaines ont révélé qu'une partie des transcrits codants CLK1, 2 et 3 possèdent un codon stop prématuré (Hanes, von der Kammer et al. 1994; Hillman, Green et al. 2004). Il s'agirait d'un niveau de régulation de l'activité des kinases LAMMER. Par exemple CLK1 régule son propre épissage de son propre transcrit (Duncan, Stojdl et al. 1997). En effet, il ressort de cette étude qu'une accumulation de la protéine CLK1 favoriserait la production d'un variant épissé tronqué possédant un codon stop prématuré.

C) Localisation

Plusieurs études montrent que les kinases LAMMER de mammifères sont partiellement localisées dans le noyau. Elles montrent même un profil d'expression diffus dans le nucléoplasme (Menegay, Moeslein et al. 1999). Cependant, bien que l'extremité N-terminale de certaines isoformes des kinases LAMMER possèdent une séquence de localisation nucléaire, la majorité de ces études ont été réalisées dans des situations où les kinases LAMMER sont surexprimées. Cette situation de surexpression peut masquer ou interférer avec leur localisation réelle. C'est ainsi que Menegay et al. montrent par immuno-marquage sur coupes de cerveau de rats que CLK1 a une localisation cytoplasmique majoritaire (Menegay, Moeslein et al. 1999). Plus tard, une autre étude montre que CLK1 a une localisation nucléaire, mais associée à une activité (Prasad and Manley 2003). CLK3 est également retrouvée dans le cytoplasme des spermatozoïdes en développement, puis dans l'acrosome et la queue du spermatozoïde mature (Menegay, Moeslein et al. 1999).

III. La spécificité des kinases LAMMER : L'autophosphorylation

Toutes les kinases LAMMER testées sont capables de s'autophosphoryler avec une spécificité double, sur les résidus de Ser, Thr et Tyr. Cependant, aucune étude ne montre que ces kinases soient capables de phosphoryler un résidu de tyrosine d'une protéine substrat. Un site d'autophosphorylation est conservé parmi toutes les kinases LAMMER des mammifères (Nayler, Schnorrer et al. 1998).

IV. Les substrats des protéines LAMMER

Lorsqu'on détermine *in vitro*, les séquences de phosphorylation de trois kinases LAMMER d'espèces différentes (CLK2 chez l'humain, DOA chez la Drosophile et PK12 chez le tabac), il en ressort un site consensus de phosphorylation (Nikolakaki, Du et al. 2002) (Tableau 1). Ce site a été déterminé par phosphorylation *in vitro* à partir d'une banque de peptides. De cette expérience, il ressort que:

- La phosphorylation porte exclusivement sur les résidus sérine plutôt que de tyrosine ou thréonine.

- Nécessité d'un résidu d'acide aminé basique (Arg) en position -3 du site de phosphorylation.

- un environnement chargé autour du motif RXXS est nécessaire.

- Présence d'un résidu hydrophobe en position +1. Dans les substrats natifs, un résidu de proline semble être préféré à cette position.

Les kinases de la famille CMGC, comme les Cdk et les MAPK, préfèrent, pour phosphoryler leurs substrats, un résidu de proline en position +1 et phosphorylent les motifs X (S/T) P où X est n'importe quel résidu d'acide aminé. Ce résidu de proline permettrait à la protéine substrats d'être dans une conformation particulière pour permettre sa phosphorylation par les kinases CMGC.

- En position -1 et -2, présence d'un résidu hydrophobe ou polaire.

Mis à part la tyrosine kinase c-Abl, phosphorylée sur un résidu de thréonine735 par les kinases CLK1 et CLK4 (Nihira, Taira et al. 2008), le résidu de sérine est connu comme préférentiellement phosphorylé par les kinases LAMMER. Aussi, les kinases LAMMER peuvent phosphoryler tous les résidus de sérine du domaine de leurs substrats alors que les SRPK ne peuvent phosphoryler que des résidus de sérine situés dans une région particulière de ce domaine (Stodjl and Bell 1999; Velazquez-Dones, Hagopian et al. 2005).

		-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5
CLK2	(human)	R	R	R	R	R	Е	Н	S	R	R	D	L	\mathbf{L}
DOA		R	R	R	Е	R	Е	Н	S	R	R	D	L	G/D
PK12		Η	R	Е	Е	<u>R</u>	R	R	s	R	R	D	D	D

Tableau 1: **Site de phosphorylation optimal de trois protéines kinase LAMMER** (Nikolakaki, Du et al. 2002). Cette obervation est supportée par les données de Bullock et al., qui notent que CLK1 sélectionnent préférentiellement les substrats où le résidu de proline est en position P+1 (Bullock, Das et al. 2009). Cette préférence n'est pas commune à CLK2 et CLK3. « 0 » est le site de phosphorylation correspondant au résidu de sérine. Le résidu d'arginine fixé à -3 a été déterminé à partir d'une sélection de banques de peptides ayant une plus grande probabilité de phosphorylation par les kinases LAMMER.



Figure 15: Structure des domaines des protéines SR

RRM1/2, RNA recognition motifs, sont les domaines de liaisons des pre-mRNAs. Le domaine RS, vers l'extrémité C-terminale, porte les résidus de sérine phosphorylés.

(Sanford, Longman et al. 2003).

La majeure partie des substrats connus des protéines LAMMER sont les protéines SR et les protéines « SR-like ». Des évidences de phosphorylation *in vivo* et *in vitro* sont montrées par (Nikolakaki, Du et al. 2002) et (Prasad and Manley 2003).

Les protéines SR appartiennent à une famille de protéines très conservées et fortement impliquées dans l'épissage constitutif et alternatif des pre-mRNA. Elles sont composées de un à deux domaines RRM (RNA recognition motif) suivi d'un domaine C-terminal riche en arginines et sérine (RS) (Figures 15). Les domaines RRM déterminent la spécificité de liaison à l'ARN alors que les résidus RS du domaine C-terminal sont impliqués dans les interactions protéines-protéines et protéines-ARN (au cours de l'épissage) en recrutant les composants d'épissage et en promouvant les liaisons aux sites d'épissages (Wu and Maniatis 1993). Le domaine RS agit aussi comme signal de localisation nucléaire (Caceres, Misteli et al. 1997; Kataoka, Bachorik et al. 1999). Les protéines SR interviendraient dans le remodelage de la chromatine, la progression du cycle cellulaire, la structure de la cellule, la transcription par la RNA polymérase II et la maturation des pre-mRNA (Boucher, Ouzounis et al. 2001). La phosphorylation des résidus de sérine du domaine RS des protéines SR par les kinases LAMMER jouerait un rôle important dans leur régulation et leur localisation. Le fait que la phosphorylation des protéines SR soit fortement régulée par les kinases LAMMER, amène à dire que ces dernières jouent un rôle important dans le splicing constitutif et alternatif des pre-mRNAs.

V. Autres substrats des kinases LAMMER

Le rôle des kinases LAMMER dans l'épissage ne serait pas à leur origine évolutionnaire puisqu'il existe chez *S. cerevisiae*, la kinase KNS1 qui serait impliquée dans une régulation autre que le splicing et son génome ne code ni pour les protéines SR ou « SR-like » et aucun splicing alternatif n'est connu chez cette levure.

CLK2 et DOA sont capables de phosphoryler la Myelin Basic Protein (MBP) *in vitro* (Lee, Du et al. 1996; Menegay, Myers et al. 2000). CLK2 a aussi pour substrat la protéine « SR-like » PGC-1 α , un inducteur de la néoglucogenèse (Rodgers, Haas et al. 2010), et la sérine phosphatase PP2A (Rodgers, Vogel et al. 2011). D'autres substrats des kinases LAMMER comprennent aussi le facteur d'élongation EF1 γ (Fan, Schlierf et al. 2010), la RNA-binding protein SAF-B (Nayler, Schnorrer et al. 1998), la protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) (Moeslein, Myers et al. 1999), la kinase prp4 (Kojima, Zama et al. 2001), la tyrosine kinase c-Abl (Nihira, Taira et al. 2008). PTP1B est le premier substrat extranucléaire des kinases LAMMER à être découvert (Moeslein, Myers et al. 1999). Une partie sur PTP1B sera détaillée plus loin. Les kinases CLK1, 2 et 4 interagissent avec UBL-5 ou « Beacon » (Kantham, Kerr-Bayles et al. 2003), une protéine « ubiquitine-like ». Dans cette étude, l'administration de cette molécule, conduit au gain de poids et à l'obésité. Il a été montré que «Beacon » n'est pas phosphorylée bien qu'interagissant avec ces kinases LAMMER. Ce qui laisse suggérer que, en plus du rôle de l'épissage alternatif, un autre rôle dans la régulation d'autres processus biologiques, peut être par exemple dans la régulation de la voie de signalisation de l'insuline.

Chez la levure *S. pompe*, la kinase Lkh1 phosphoryle la RNA-binding protein Csxl, et les répresseurs de transcription TUP11 et TUP12 (Kang, Park et al. 2010).

L'analyse du réseau de phosphorylation de *S. cerevisiae* a permis d'identifier nombreux substrats, entre autres CDC15 et ATG1. Plus récemment, une étude montre que, après un stress ou un jeûn, la kinase LAMMER KNS1 de *S. cerevisiae* serait phosphorylée par TOR et à son tour permettrait la phosphorylation de la sous unité Rpc53 de la RNA polymérase III par Mck1, un membre de la famille des kinases GSK-3 (Jaehoon, Robynn et al. 2012).

VI. Expression et fonction et des kinases LAMMER

VI-1) Kinase LAMMER de mammifères

CLK1, 2 et 4 sont largement exprimées et peut être de façon ubiquitaire, dans tous les tissus de mammifères alors que CLK3 n'est retrouvée que dans les testicules et le cytoplasme des spermatozoïdes (Menegay, Moeslein et al. 1999).

Toutes les 4 kinases LAMMER de mammifères phosphorylent les protéines SR. CLK1 est impliquée dans le splicing alternatif des adénovirus (Duncan, Stojdl et al. 1997). CLK2 par phosphorylation d'intermédiaires, dont PTP1B, PP2A et PGC-1α serait impliquée dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Moeslein, Myers et al. 1999; Rodgers, Vogel et al. 2011).

Les kinases LAMMER sont connues pour être impliquées dans le stress cellulaire (notamment CLK1 dont l'inhibition entraine l'augmentation de la SOD, super oxyde dismutase1 dans les lignées cellulaires HeLa et MCF-7) et la différenciation érythrocytaire (James, Staatz et al. 2009; Jaehoon, Robynn et al. 2012).

VI-2) La kinase LAMMER de Drosophile, DOA

DOA, codée par le locus *Darkener of apricot* est la seule kinase LAMMER de drosophile. Elle est ainsi appelée parce que sa mutation supprime partiellement l'allèle *white^{apricot}* (Yun, Farkas et al. 1994). C'est le gène codant une kinase LAMMER le mieux caractérisé de toute la famille, grâce à la facilité des manipulations génétiques chez la drosophile. Les allèles de *Doa* sont létaux récessifs. Les embryons homozygotes éclosent et meurent. Cette létalité survient tardivement grâce à une contribution d'ARNm et protéines maternelle (Yun, Farkas et al. 1994). Cependant, des combinaisons hétéroalléliques de certains allèles de *Doa* survivent et induisent des phénotypes anormaux comme les yeux rugueux, une expression ectopique des veines des ailes, la stérilité, et la transformation sexuelle des femelles aux mâles (Kpebe and Rabinow 2008).

A la différence des kinases LAMMER de mammifères, DOA n'est pas régulée par le mécanisme de splicing alternatif conduisant à l'apparition précoce d'un codon stop. L'usage de promoteurs alternatifs de *Doa* donne six isoformes polypeptidiques de 55, 69, 91, 105, 138, et 227kDa (Kpebe and Rabinow 2008). Ces isoformes ont le même domaine catalytique C-terminal et diffèrent par leurs domaines N-terminaux. L'isoforme 55kDa est localisée dans le noyau alors que l'isoforme 105kDa est cytoplasmique.
CHAPITRE 4: LA PROTEINE TYROSINE PHOSPHATASE PTP1B

De nombreux processus biologiques dépendent des cascades de phosphorylation et déphosphorylation. Les protéines kinases et les phosphatases apparaissent donc comme des régulateurs clés des évènements cellulaires. En fonction de la spécificité du résidu phosphorylé, les phosphatases seront soit sérine/thréonine spécifiques, soit tyrosines spécifiques, soit capables de déphosphoryler à la fois des résidus de sérine/thréonine et tyrosine (les phosphatases à doubles spécificités) comme MAPK phosphatase-1, MKP-1 (Sun, Crimmins et al. 1993), PTEN, « *tumor suppressor gene* » (Li, Ernsting et al. 1997; Steck, Pershouse et al. 1997). PTP1B, une tyrosine phosphatase, est l'une des plus étudiées (Yip, Saha et al. 2010). Les PTPs sont soit cytoplasmiques (PTP1B, PTP61F, Shp-1, PTP-PEST, PTP-BL) soit membranaires (CD45, LAR, DLAR, DPTP69D, PTP- α , PTP- β) (Hertog 1999).

I. Structure et fonction

I-1) Structure

PTP1B (ou PTPN1) est la première PTP à être isolée sous une forme homogène à partir du placenta humain (Tonks, Diltz et al. 1988; Charbonneau, Tonks et al. 1989), séquencée (Tonks, Diltz et al. 1988) et sert comme modèle pour illustrer plusieurs propriétés des PTPs. Sa structure a été déterminée par cristallographie en 1994 (Barford, Keller et al. 1994). C'est une phosphatase non-réceptrice de 435 acides aminés (50kDa) (Guan, Haun et al. 1990), monomérique, ubiquitaire et ancrée dans la membrane du RE. Le gène codant pour PTP1B est localisé sur le chromosome 20 (20q13, *PTPNI*).

PTP1B (Figure 16 et 17) est constituée d'un domaine unique composé d'une structure centrale en feuillet de douze brins β entourés par huit hélices α . Les douze brins sont organisés en 4 brins parallèles, centraux, et des brins anti-parallèles adjacents (Barford, Keller et al. 1994).

L'extrémité N-terminale (1-298 résidus d'acides aminés) contient le domaine catalytique. Ce dernier contient deux sites de liaison du phosphate :

- Un site de haute affinité catalytique contenant le résidu de Cys215. Ce résidu joue un rôle majeur dans l'activité catalytique de PTP1B.

- Un site de faible affinité, non-catalytique qui contient les résidus d'arginine 24 et 254 (Wang, Gong et al. 2009).



Figure 16: Structure tridimensionnelle du domaine catalytique de PTP1B Les sites catalytiques et de liaison 2 sont insdipensables pour la catalyse. Le site de liaison 3 permet la sélectivité du substrat. (Rao, Ramachandran et al. 2006).



Figure 17: Schéma de la structure de PTP1B

Le domaine phosphatase conservé de PTP1B s'étend du résidu 30 au résidu 278. Il contient trois tyrosines (66, 152 et 153) nécessaires à son interaction avec le récepteur de l'insuline et phosphorylés par celui-ci. La cystéine 215 est un résidu important du site actif de l'enzyme. En C-terminal, se trouvent un domaine hydrophobe d'ancrage dans le réticulum endoplasmique (RE) de 35 acides aminés, précédés par 122 résidus majoritairement hydrophobes qui contiennent des sites de phosphorylation sur sérine.

(Bandyopadhyay, Kusari et al. 1997).

Le site catalytique est localisé au cœur de la molécule et contient le motif de signature des PTPs. Cette signature, (I/V)HCXAGXXR(S/T)G, commune à toutes les PTPs, est composée de 11 résidus d'acides aminés dont une cystéine215 et une arginine221 nécessaires dans la catalyse (Guan and Dixon 1991; Cho, Ramer et al. 1992; Rao, Ramachandran et al. 2006). Le seul critère structural distinctif entre toutes les PTPs sont les séquences d'acides aminés variées qui se trouvent soit à l'extrémité N-terminale ou C-terminale de ces phosphatases (Barford, Keller et al. 1994).

Le site catalytique est entouré de trois boucles impliquées dans la catalyse et la reconnaissance du substrat. Une de ces boucles est responsable de la spécificité du substrat tyrosine phosphorylé et contient un résidu de tyrosine conservé en position 46. La deuxième boucle appelée boucle WPD, a en position 181, un résidu d'acide aspartique essentiel pour la catalyse. La mutation de ce résidu en alanine (D181A) (Flint, Tiganis et al. 1997), et même les mutations D203A ou C237S (Chang, Lin et al. 2008) ou D181A-Y46F (Boubekeur, Boute et al. 2011) créées une association permanente entre PTP1B et ses substrats (Flint, Tiganis et al. 1997; Bourdeau, Dube et al. 2005). Ces substitutions permettent la technique de « substrate-trapping » qui a permis d'identifier de nombreux substrats de PTP1B. La troisième boucle, la Q-loop contient deux résidus de glutamines invariantes (262 et 266). L'extrémité C-terminale (299-435) est riche en proline. Dans ce domaine, se trouve une région hydrophobe (400-435) qui permet de localiser PTP1B sur la face du RE (Chernoff, Schievella et al. 1990).

Dans la majeure partie des substrats de PTP1B, les résidus de tyrosines phosphorylés se trouvent en aval des résidus d'acides aminés acides et qui ont à l'extrémité C-terminale des résidus hydrophobes (Zhang, Thieme-Sefler et al. 1993).

I-2) Fonction

PTP1B fait aujourd'hui l'objet de plusieurs études, notamment dans le développement de ses inhibiteurs, pour son rôle clé dans les voies de signalisation de l'insuline et de la leptine (Klaman, Boss et al. 2000; Bence, Delibegovic et al. 2006, Koren, 2007 #615).

L'action importante jouée par PTP1B dans la régulation de la signalisation de l'insuline est pointée depuis l'étude qui montre que la région chromosomique 20 (*PTPN1*), où est localisée *PTP1B*, a été liée au diabète de type 2 (Brown-Shimer, Johnson et al. 1990). L'action majeure de cette phosphatase, qui est la déphosphorylation du récepteur IR ou des substrats du récepteur (IRS) a été clairement démontrée (Frangioni, Beahm et al. 1992; Woodford-Thomas, Rhodes et al. 1992; Kenner, Anyanwu et al. 1996; Bandyopadhyay, Kusari et al. 1997; Goldstein, Bittner-Kowalczyk et al. 2000). Lorsque des ovocytes de xénopes reçoivent une injection de PTP1B, leur maturation insulino-dépendante est entravée (Cicirelli, Tonks et al. 1990; Tonks 1990). PTP1B est surexprimée

dans plusieurs models de souris obèses et insulino-résistants (Kusari, Kenner et al. 1994; Ahmad and Goldstein 1995; Goldstein, Mascitelli et al. 2009). Une surexpression transgénique de PTP1B dans le muscle ou le foie de souris est associée à une insulino-résistance (Zabolotny, Haj et al. 2004; Haj, Zabolotny et al. 2005). Les souris KO pour PTP1B présentent une insulino-sensibilité, une tolérance au glucose, et la phosphorylation de IR accrues (Elchebly, Payette et al. 1999; Klaman, Boss et al. 2000). Une délétion neuronale de *PTP1B* (Bence, Delibegovic et al. 2006) ou plus spécifiquement dans les neurones POMC de l'hypothalamus (De Jonghe, Hayes et al. 2011) conduit à une perte de poids corporel asociée à une réduction de la prise alimentaire et une dépense énergétique.

En plus de son important rôle dans la régulation de l'homéostasie énergétique, PTP1B est également impliquée dans le cancer. Le rôle de PTP1B dans les cancers serait à la fois anticancéreux et pro-cancéreux. En effet, une surexpression de PTP1B antagonise les effets oncogéniques des kinases Src (Woodford-Thomas, Rhodes et al. 1992), et Neu (Brown-Shimer, Johnson et al. 1992). Des études montrent que PTP1B supprime la transformation des fibroblastes, lui suggérant un rôle suppresseur de tumeurs (LaMontagne, Hannon et al. 1998; Liu, Sells et al. 1998; Haj, Markova et al. 2003). Elle joue également un rôle pro-apoptotique (Sangwan, Paliouras et al. 2006; Gonzalez-Rodriguez, Clampit et al. 2007) et renforce l'adhésion cellulaire (Balsamo, Leung et al. 1996; Arregui, Balsamo et al. 1998). D'autres études montrent qu'une ablation ou une inhibition de PTP1B chez une souris atteinte du cancer mammaire supprime très fortement le cancer (Zhai, Beittenmiller et al. 1993; Wiener, Kerns et al. 1994; Bentires-Alj and Neel 2007; Julien, Dube et al. 2007) ou dans le cancer de l'ovaire (Tanner, Grenman et al. 2001), décrivant la phosphatase comme une oncoprotéine.

PTP1B serait aussi impliquée dans la coagulation sanguine (Frangioni, Oda et al. 1993).

L'interaction entre IR et PTP1B se fait par l'intermédiaire des résidus de tyrosine phosphorylés 1146, 1150 et 1151. Pour que PTP1B soit activée et que l'interaction avec IR se fasse, ses résidus de tyrosine 66 et 152 ou 153 doivent être phosphorylés par IR (Bandyopadhyay, Kusari et al. 1997; Dadke, Kusari et al. 2000; Dadke, Kusari et al. 2001).

PTP1B réside sur la face cytoplasmique du RE au niveau de la membrane plasmique (comme EGFR, PDGFR, d'autres substrats de PTP1B). Comment peut se faire l'interaction entre ces protéines? Plusieurs hypothèses ont été émises, mais il semble d'avance que ces mécanismes soient différents selon les substrats de PTP1B. Concernant IR, une hypothèse suggère que IR activé soit internalisé dans les endosomes puis orienté vers des sites spécifiques du RE où il sera déphosphorylé par PTP1B (Haj, Verveer et al. 2002; Romsicki, Scapin et al. 2003). Cette hypothèse qui nécessite l'endocytose du récepteur activé a d'ailleurs été vérifiée pour expliquer la

déphosphorylation de EGFR et PDGFR par PTP1B (Haj, Verveer et al. 2002). L'endocytose de IR ne semble cependant pas nécessaire pour l'association avec la phosphatase, ni même pour sa déphosphorylation (Shi, Egawa et al. 2004). Il semblerait que ce soit le RE qui vienne à proximité de la membrane plasmique et que PTP1B puisse déphosphoryler IR.

PTP1B se rapprocherait de ses substrats grâce à certaines protéines adaptatrices (comme PLC γ , N-cadherin) (Balsamo, Leung et al. 1996; Arregui, Balsamo et al. 1998; Choi, Kim et al. 2006).

II. Régulation

Les mécanismes de régulation de PTP1B restent largement inconnus.

Il existe quatre mécanismes proposés pour la régulation de PTP1B :

1) Le résidu de Cys215 se trouvant dans un envirionnement acide, pH 4,5-5,5, sous les conditions de pH physiologique, perd le proton du groupe –SH et le sulfate nucléophile S⁻ devient exposé à l'oxidation et aux espèces réactives d'oxygène (ROS). Cette réaction va inhiber de façon réversible l'activité de PTP1B (van Montfort, Congreve et al. 2003).

2) La sumoylation : SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) se fixe sur au moins deux résidus de lysine situés à l'extrémité C-terminale de PTP1B. Cette interaction, qui se fait avec la SUMO E3 ligase, inhibe PTP1B (Dadke 2007). PTP1B sumoylée se trouve dans des structures ayant une localisation périnucléaire (Dadke 2007). Suite à la fixation de l'insuline à son récepteur, PTP1B est transitoirement modifiée par fixation de la SUMO E3 ligase, suggérant un mécanisme de régulation post-traductionelle de la phosphatase dans laquelle la phosphatase est transitoirement modulée (Stuible, Doody et al. 2008; Yip, Saha et al. 2010).

3) La protéolyse. L'enzyme protéolytique calpaine-1 coupe PTP1B en petits fragments inhibant ainsi son activité (Kuchay 2007). En effet, un défaut de l'aggrégation des plaquettes sanguines et de la phosphorylation des tyrosines a été corrigé lorsqu'il a été réalisé un double KO pour *PTP1B* et *Capn1*.

4) La phosphorylation de cette phosphatase est le sujet du mécanisme de régulation le plus controversé. PTP1B peut être régulée par phosphorylation sur les résidus de sérine et de thréonine (Yip, Saha et al. 2010). Cependant l'effet de la phosphorylation sur l'activité de PTP1B reste soit modeste soit controversé. Les résidus de sérine 352, 378 et 386 sont phosphorylés par des kinases inconnues durant la métaphase et en situation de stress osmotique avec un faible effet sur l'activité

de PTP1B (Flint, Gebbink et al. 1993; Shifrin, Davis et al. 1997). La phosphorylation de PTP1B par CLK1 et CLK2, des kinases LAMMER, sur résidu de Ser50 active PTP1B (Moeslein, Myers et al. 1999). Ces auteurs ont observé que l'activité de PTP1B était augmentée de 3 à 5 fois *in vitro* et de 2 fois dans les cellules HEK 293 co-transfectées avec PTP1B et CLK1 ou CLK2. Deux ans après, une autre étude montre que la phosphorylation de PTP1B par AKT sur le même résidu de Ser50 inhibe PTP1B, l'empêchant ainsi de déphosphoryler le récepetur de l'insuline (Ravichandran 2001). Dans cette étude le mutant PTP1B S50D et PTP1B WT phosphorylé par AKT sur résidu de Ser50 ne peuvent pas déphosphoryler le récepteur de l'insuline lorsqu'ils sont surexprimés dans les cellules COS-7. D'autres études, qui montrent la phosphorylation sur des résidus de tyrosine (Y66, Y152, Y153) (Bandyopadhyay, Kusari et al. 1997), sont également contradictoires comme celles qui montrent la phosphorylation sur les résidus de sérine. Dadke et al. montrent que la phosphorylation de ces résidus de tyrosine par IR augmente l'activité catalytique de PTP1B (Dadke, Kusari et al. 2001) alors que Tao et al. montrent que la phosphorylation de ces résidus de tyrosine inhibe PTP1B (Tao, Malbon et al. 2001). Toutefois, la phosphorylation sur les résidus de Y152 et Y153 est importante pour son interaction avec IR (Bandyopadhyay, Kusari et al. 1997; Dadke, Kusari et al. 2000; Dadke, Kusari et al. 2001).

Il est important de noter que ces mécanismes fonctionnent parfois en tandem (Yip, Saha et al. 2010).

III. PTP1B et médicaments

Grâce à son rôle clé dans le métabolisme et le cancer, PTP1B a fait la convoitise de nombreux laboratoires pharmaceutiques qui se sont lancés dans le développement des inhibiteurs de cette protéine dans la lutte contre le diabète de type 2, l'obésité (Johnson, Ermolieff et al. 2002) et propablement le cancer du sein (Dube and Tremblay 2005). Plusieurs types d'inhibiteurs de nature chimique ont été développés, mais, depuis que l'étude sur les bases moléculaires de la spécificité entre IR et PTP1B ait montrée la nécessité de présence d'un tandem de pTyr dans cette interaction (Salmeen, Andersen et al. 2000), dès lors, la synthèse des inhibiteurs peptidiques biphosphate, plus spécifiques de PTP1B (Zabolotny, Bence-Hanulec et al. 2002), a été fortement stimulée. Comprendre le mécanisme de régulation de PTP1B, c'est à dire pointer d'autres protéines qui auraient un rôle clé sur sa fonction apparaît donc très important en vue d'obtenir d'autres pistes pour lutter contre les maladies dans lesquelles ell est impliquée.

IV. Ptp61F, L'orthologue de Drosophile de PTP1B de mammifères

Il existe un orthologue de PTP1B chez la drosophile, *Ptp61F* qui est situé sur le bras gauche du troisième chromosome à la position cytologique 61F (McLaughlin and Dixon 1993). Comme PTP1B chez les mammifères, PTP61F est exprimée dans nombreux tissus et à tous les stades du développement, y compris l'ovogenèse et l'embryogenèse (Fitzpatrick, Gorski et al. 1995; Ursuliak 1997). *Ptp61F* subit l'épissage alternatif pour donner deux variants dont un avec une extrémité C-terminale hydrophobe qui permet son ancrage dans la membrane du RE comme PTP1B (McLaughlin and Dixon 1993) et l'autre dépourvue d'une extrémité C-terminale, mais, possède outre une séquence de localisation nucléaire (McLaughlin and Dixon 1993), et *Ptp61F* partage avec la TC-PTP de mammifères 74% d'identité de séquences du domaine catalytique (Andersen, Mortensen et al. 2001; Tiganis and Bennett 2007). Toujours comme PTP1B, PTP61F a dans le domaine non-catalytique C-terminal, une séquence riche en résidus proline de motifs PXXP (McLaughlin and Dixon 1993).

PTP61F et PTP1B ont 49% d'identité et 68% d'homologie au niveau de leurs séquences d'acides aminés (Hati 2002). PTP61F contient 508 acides aminés alors PTP1B en contien 321. Ceci est dû au fait que la phosphatase de drosohpile contient une extension aux extrémités N-terminale et C-terminale (Hati 2002). Cependant, ces deux phosphatases ont des structures secondaires et tertiaires très similaires (Hati 2002).

PTP61F est impliquée dans de nombreux processus biologiques:

- Comme la mémoire et l'apprentisage (Guan, Buhl et al. 2011). Une analyse par microarray d'une souche portant une mutation pour *radish*, un gène impliqué dans la mémoire à long et court terme chez la drosophile et qui code une phospholipase A2 (PLA2), montrait une down-régulation de *Ptp61F* jusqu'à 4,7 fois par rapport au contrôle.

- Dans la régulation négative de la voie JAK/STAT induite par la cytokine Upd3 (de séquence similaire à la leptine (Boulay, O'Shea et al. 2003)) (Wright, Vogt et al. 2011). Il est en effet montré par une analyse génomique des cellules de *Drosophile* S2, lorsque *Ptp61F* est supprimé par RNAi, qu'il y a augmentation de plus de 4 fois de l'activité de STAT92E, un médiateur de la voie JAK/STAT (Baeg, Zhou et al. 2005; Muller, Kuttenkeuler et al. 2005). Ils montrent même que le profil d'expression de *Ptp61F* est très similaire à celui de *STAT92E*, suggérant que la transcription de *Ptp61F* est dépendante de la voie JAK/STAT et donc une régulation par feedback négatif puisque l'expression de *Ptp61F* est induite par JAK/STAT.

- Dans l'organisation du cytosquelette via la protéine Kette, qui, activée par phosphorylation sur résidu Tyr482, intervient dans la dynamique de l'actine-F (Ku, Wu et al. 2009). En effet, lorsqu'ils

réalisent un mutant Y482F dans lequel le site de phosphorylation de la kinase activatrice ABL, un substrat direct de PTP61F, est muté, ils obtiennent des celleules S2 avec une perte d'organisation de l'actin-F et la formation des lamelles.

Dans la mitose notamment dans la transition G1-S (Chen, Archambault et al. 2007). Ces auteurs ont supprimé des gènes par RNAi et ont observé l'effet de la suppression sur la mitose des cellules S2. Lorsqu'ils ont supprimé *Ptp61F*, ils ont observé un mauvais alignement de chromosomes et un défaut de leur ségrégation conduisant à une transition G1-S defectueuse.

- Et aussi dans le guidage axonal des photorécepteurs (Clemens, Ursuliak et al. 1996). Ils montrent en effet par la technique du double hybride et confirmé par une coimmunoprécipitation que PTP61F interagit avec la protéine Dredlocks (DOCK). Lors d'un screen génétique *Dock* a été montré d'être important pour le guidage axonal des photorécepteurs (Garrity, Rao et al. 1996).

- Une étude sur le phosphoprotéome de drosophile où *Ptp61F* est supprimé par ARN interférence, a permis d'identifier que plus de 288 sites de phosphorylations (217 sérines, 45 thréonines et 26 tyrosines) changeaient de façon signitificative (Hilger, Bonaldi et al. 2009). Par ailleurs, cette étude montre une baisse de phosphoryation du résidu de sérine112 de DOA, la kinase LAMMER de drosophile, suggérant un rôle indirect de PTP61F dans la régulation de son activité. Il ressort également que 15 protéines avec 19 sites de tyrosines sont « up » régulés dont notamment la kinase Ableson, ABL et son partenaire Abi (Huang, Lin et al. 2007; Chang, Lin et al. 2008), la protéine d'adhésion focale Lasp et la GTPase RhoGAP15B, EF-1 α (Elongation Factor-1 α), Paxilline, STAT92E.

- Il a aussi été montré que PTP61F « down » régule l'activité de TOR (target of rapamycin) chez des cellules S2 de drosophile en hypoxie (Lee 2008). Ils ont réalisé une étude génomique à grande échelle en supprimant des gènes par RNAi. La suppression de *Ptp61F* améliore la survie des cellules S2 en conditions d'hypoxies prolongées, suggérant que PTP61F participe, sous ces conditions, à la baisse de la synthèse de protéines médiées par TOR.

- (Wu, Buszard et al. 2011) montrent à partir de cellules S2 et HEK 293, et par la technique de substrate-trapping, le test d'activité phosphatase *in vitro* et par la surexpression de PTP61F, que IR est un substrat de PTP61F et que DOCK tout comme son orthologue humain Nck (des protéines adaptatrices) doivent interagir avec PTP61F/PTP1B afin que ce dernier puisse déphosphoryler le récepteur de l'insuline.

L'implication de PTP1B dans la régulation de la voie de signalisation des MAPKs est sujette à controverse. Dadke et al. observaient que l'absence de PTP1B chez des souris entrainait une baisse du niveau de Ras-GTP et une réduction de l'activation de ERK (Dadke and Chernoff 2003). Ces données sont suportées par celles de (Dube, Cheng et al. 2004; Julien, Dube et al. 2007) qui montrent que l'activité de ERK est réduite dans les cellules mammaires de souris déficientes pour

PTP1B. Ils expliquent ces résultats par le fait que p62Dok, une protéine adatative qui se lie à RasGAP, est inactive lorqu'elle est phosphorylée sur résidu de tyrosine. p62Dok, déphosphorylée, et donc active, va empêcher la phosphorylation de p120RasGAP inhibant ainsi son activité et conduisant à des taux élevés de Ras-GTP (Kashige, Carpino et al. 2000; Dube, Cheng et al. 2004). Ainsi, des souris déficientes pour PTP1B, présentent un niveau de phosphorylation sur résidu de tyrosine de p62Dok élevé, induisant l'inhibition de RAS puisque RasGAP est active (Dadke and Chernoff 2003). La même observation a été faite chez des souris déficientes pour PT1B et portant une tumeur mammaire (Julien, Dube et al. 2007). Cependant, (Bentires-Alj and Neel 2007) n'observaient aucun changement de la phosphorylation de p62Dok et de p120RasGAP dans les mêmes modèles de souris transgéniques. Gum et al. observaient chez des souris diabétiques ob/ob que la phosphorylation de P38, la MAPK impliquée dans le stress, était diminuée après un traitement des souris avec un oligonucléotide antisens dirrigé contre PTP1B. Ils ont montré que la phosphorylation de P38 se faisait de façon indépendante de la voie de l'insuline puisque, lorsqu'ils faisaient des injections d'insuline à ces souris diabétiques traitées avec l'oligonucléotide antisens, la phosphorylation de P38 n'était pas augmentée. Ils montrent aussi que dans ces conditions, l'expression des kinases MKK3 et MKK6 (MAPKinase kinase) qui phosphorylent P38 était inchangée.

La voie des MAPKs est impliquée dans l'apoptose, la division, différenciation et prolifération cellulaire. Une dérégulation de cette voie conduira donc au développement des tumeurs. L'implication de PTP1B dans les cancers reste un sujet très controversé puisque d'autres études pointent PTP1B comme une protéine anti-proliférative. C'est notamment l'étude de (Dubé, Bourdeau et al. 2005) qui montrent que l'abblation génétique de PTP1B accélère le développement du lymphome chez des souris déficientes pour *P53*. (Brown-Shimer, Johnson et al. 1992) montraient que la surexpression de PTP1B bloquait la transformation des fibroblastes induite par la protéine oncogène neu. (Liu, Sells et al. 1998) montraient que la suppression de la transformation des fibroblastes de rats 3Y1 des par PTP1B, requiert un domaine SH3 fonctionnel de p130Cas pour une interaction fonctionnelle avec PTP1B à travers les résidus de prolines de l'extrémité C-terminale.

La drosophile est un puissant outil de génétique et est bien reconnue comme un modèle de nombreuses maladies humaines. Son élevage facile, le nombre de chromosomes réduit (quatre), le temps de génération de 10 jours environ, l'observation aisée des phénotypes, l'existence d'un faible degré de redondance fonctionnelle, permet de façon rapide et efficace d'étudier les interactions génétiques, d'avoir une idée de la fonction de ses interactions et se projeter vers des organismes plus complexes tels que l'homme. De très nombreux gènes de mammifères impliqués dans les maladies ont un orthologue chez la drosophile. Le fait qu'il existe un orthologue de PTP1B, un gène de fort intérêt par son rôle clé dans les voies de signalisation, et que c'est grâce aux mutations (nul, hypomorphe, hypermorphe) qu'on caractérise aisément les interactions génétiques, la génération d'une mutation du gène *Ptp61F* permettrait de mieux caractériser l'implication de ce gène dans des voies de signalisation et notamment le mécanisme par lequel il serait régulé.

PRESENTATION DU TRAVAIL

Le DT2 est associé à un état d'insulino-résistance caractérisé par une hyperinsulinémie et une hyperglycémie avec altération de l'homéostasie énergétique. Le DT2 est une des conséquences de l'obésité, qui est en général associé à une résistance à l'insuline. En effet, de nombreuses études épidémiologiques montrent DT2 et obésité sont intimement liées (près de 30 % des individus obèses deviennent résistants à l'insuline et développent un DT2 et environ 85 % des patients atteints d'un DT2 sont obèses (Charles 2000). Le mécanisme moléculaire le plus décrit comme étant à l'origine de l'installation de l'insulino-résistance est la surexpression de la protéine tyrosine phosphatase PTP1B qui va déphosphoryler IR ou IRS et affecter négativement la voie IRS/PI3K/AKT, une des voies activées par l'insuline (Drake and Posner 1998; Goldstein, Ahmad et al. 1998; Cheng, Dube et al. 2002; Asante-Appiah and Kennedy 2003; Benomar, Berthou et al. 2009). Mais aussi, plusieurs cas d'insulino-résistance sont associés à l'obésité. Cependant, bien que le rôle de PTP1B dans le métabolisme énergétique soit bien démontré, le mécanisme par lequel cette phosphatase est régulée reste très peu ou pas connu.

D'un un autre côté, l'insuline active aussi la voie RAS/MAPK notamment à travers l'interaction entre IRS/GRB2 qui va recruter SOS ou directement par l'interaction entre IR et SHC (Src homology 2 domain-containing). Plusieurs cancers humains sont associés au dysfonctionnement de cette voie qui peut être dû soit à une mutation de l'une de ses composantes, soit à un dysfonctionnement de sa régulation. La voie RAS/MAPK est principalement « médiée » par une cascade de phosphorylation et est donc en partie régulée par des protéines phosphatses. Comme décrit plus haut, des études présentent PTP1B soit comme un oncogène (Zhai, Beittenmiller et al. 1993; Wiener, Kerns et al. 1994; Tanner, Grenman et al. 2001; Dube, Cheng et al. 2004; Bentires-Alj and Neel 2007; Julien, Dube et al. 2007), et d'autres au contraire montrent qu'elle est un suppresseur de tumeurs (Brown-Shimer, Johnson et al. 1992; Liu, Sells et al. 1998; Dubé, Bourdeau et al. 2005).

Le mécanisme d'action par lequel PTP1B est régulée est très peu connu. Il a été montré que lorsque PTP1B est phosphorylée par CLK1 ou CLK2 sur son résidu de Ser50 dans les celles HEK 293, son activité est fortement augmentée (Moeslein, Myers et al. 1999). Cet effet est controversé. En effet, une autre étude a montré que lorsque PTP1B est phosphorylée sur le même résidu de Ser50, mais cette fois par AKT dans les cellules COS-7, son activité est fortement réprimée (Ravichandran 2001)

La question qui reste posée, est-ce que la phosphorylation sur Ser50 active ou inhibe PTP1B? Il a été récemment montré que AKT2 phosphoryle et active CLK1 (appartient à la famille des kinases LAMMER) en réponse à l'insuline dans les cellules COS-7 (Jiang, Patel et al. 2009). Ces

observations ont permis d'émettre l'hypothèse d'un rôle possible des kinases LAMMER dans la régulation des voies de signalisation de l'insuline.

J'ai eu comme objectif d'étudier la régulation de PTP1B et notamment de définir le rôle des kinases LAMMER dans sa régulation et l'étude du rôle de PTP1B/PTP61F dans la voie RAS/MAPK. Pour réaliser mon projet, j'ai utilisé deux modèles expérimentaux: *Drosophila melanogaster* et une lignée cellulaire dérivée d'un neuroblastome humain, SHSY-5Y.

L'objectif principal de mon travail a donc été d'une part:

- De générer et caractériser une mutation de *Ptp61F*, l'orthologue de drosophile de PTP1B.

- Analyser les interactions entre *Ptp61F* et les composantes de la voie de signalisation de l'insuline.

- Analyser par le rôle de *Ptp61F* dans la voie RAS/MAPK.

- Analyser l'interaction entre *Ptp61F* et la kinase LAMMER DOA.

D'autre part:

- Analyser le profil d'expression des kinases LAMMER en réponse à la stimulation à l'insuline des cellules SHSY-5Y à différents temps.

- Etudier l'effet des kinases LAMMER sur l'installation de l'insulino-résistance.

- Etudier l'interaction entre PTP1B et les kinases LAMMER et AKT.

- Vérifier si AKT et CLK2 phosphorylent PTP1B en se focalisant sur le site de phosphorylation et s'il y a bien phosphoryation, étudier l'effet de cette phosphorylation sur la focntion de PTP1B *in vitro*.

RESULTATS

ETUDE 1

Fort de la puissance génétique de la drosophile, l'obejectif de ce travail a été de 1) générer le premier mutant du gène *Ptp61F* et le caractériser. 2) Etudier son implication dans la voie de signalisation de l'insuline chez la drosophile et notamment les interactions avec *Pi3K* et *Akt*. 3) Etudier l'interaction entre le gène codant la kinase LAMMER de drosophile, *Doa* et *Ptp61F*. 4) Analyser par épistasie le rôle de *Ptp61F* dans la voie de signalisation de RAS/MAPK. Plus général, nous avons voulu examiner le rôle que joue PTP61F dans diverses voies de signalisation chez la drosophile.

Pour certains de nos tests génétiques, nous avons utlisé le système *GMR-GAL4/UAS*, qui permet l'expression d'un gène particulier dans un tissu spécifique (Brand and Perrimon 1993). La protéine GAL4 est un activateur de transcription de levure. Elle est introduite dans le génome de drosophile de façon aléatoire ou couplé avec un promoteur qui permettra son expression dans un tissu ou pendant un stade de développement prédéterminé. L'introduction d'un élément *GAL4* dans le promoteur d'un gène ou son expression sous direction d'un promoteur couplé permet son expression d'une façon dirigée. Des séquences spécifiques où se fixe la protéine GAL4, appelées « *Upstream Activation Sequence* », permettraient l'activation spécifique de ce gène dans les tissus où GAL4 est exprimée.

Par exemple, *GMR* est un promoteur synthétique spécique aux yeux de drosophile. Lorsque la protéine GAL4 est sous le contrôle de *GMR*, elle s'exprimera uniquement dans les yeux et plus précisément derrière le sillon morphogénique des disques d'yeux en développement et permettrait l'expression spécifique d'un gène ayant des séquences *UAS* au niveau de son promoteur. Ce système nous ainsi permi de caractériser des interactions entre des gènes et/ou des constructions en examinant les yeux de drosophile.

Le système FRT/FLP est également un outil ayant pour origine la levure (Golic and Lindquist 1989). Ce système est utilisé chez la drosophile pour l'induction des clones cellulaires somatiques. Ces derniers sont un ensemble de cellules qui sont génotypiquement issues d'une même cellule originelle. On induit de tels clones pour examiner le phénotype d'une cellule homozygote pour un allèle mutant, léthal récessif pour l'animal.

FLP, lire « *FLIP* » est la recombinase spécifique des séquences FRT, « *FLP Recombination Targets* ». Ainsi, les recombinants issus d'un croisement entre un allèle cible (mutant) et une séquence FRT donnée (« X »), sont croisés avec une souche portant la recombinase FLP et la même séquence FRT « X » qui est portée par le même chromosome que l'allèle cible. Sur ce chromosome homologue, l'allèle cible est sauvage. FLP, sous le contrôle du promoteur d'une HSP (« *Heat Shock Protein* ») va donc induire, après un choc thermique, la recombinaison entre ces chromosomes homologues dans les cellules somatiques de drosophile. Après réplication et division cellulaire, on obtiendra deux types de population clonale. Un clone exprimant l'allèle mutant homozygote et l'autre exprimant l'allèle sauvage. Les clones mutants sont identifiés par un marqueur, souvent dans l'œil, par la présence ou l'absence de la couleur w^+ (rouge). L'intensité de la couleur sera donc doublée dans une des populations de cellules, soit homozygote mutant, soit homozygote sauvage, due à la présence homozygote (deux fois) de l'allèle mutant. Le choix des yeux, comme tissu pour l'identification des clones se justifie par le fait qu'ils sont directement accessibles (contrairement à l'utilisation d'un marqueur immunocytochimique pour d'autres tissus) et par la possibilité de faire des coupes au niveau des yeux afin d'analyser le phénotype au niveau de chaque type cellulaire affecté ou non par l'allèle mutant homozygote.



Figure 18: Génération des clones celluaires somatiques par le système FLP/FRT

Dans une cellule parentale hétérozygote, FLP induit une recombinaison mitotique entre les sites FRT (flèches noires) sur les bras des chromosomes homologues. La ségrégation des chromosomes recombinants à la mitose produit deux cellules filles: Une cellule mutant, portant deux copies de l'allèle mutant (*) et une cellule sauvage contenant uniquement la forme sauvage du gène (+). Le marqueur cellulaire P[hs-pM] (∇) co-ségrège avec l'allèle sauvage, marquant les cellules mutants par son absence. Les prochaines divisions cellulaires vont générer des clones somatiques à partir de chaque cellule fille, dans un « background » de cellules hétérozygotes.

(Theodosiou and Xu 1998).

Conserved functions of *Ptp61F/*PTP1B in the regulation of signaling pathways in Drosophila

Stéphane Nguetcheu-Tchankouo, Marjorie Durand, Mohammed Taouis and Leonard Rabinow[#]

Université Paris Sud, UMR 8195, Bâtiment 442bis

91400 Orsay, France

#Corresponding author: Leonard Rabinow Université Paris Sud, UMR 8195, Bâtiment 442bis 91400 Orsay France Leonard.Rabinow@u-psud.fr (+33) 169-15-74-65

ABSTRACT

PTP1B is an important negative regulator of insulin and several other signaling pathways in mammals. However, the role of PTP1B in the regulation of RAS-MAPK signaling remains a subject of debate, due to conflicting evidence from different experimental systems. The Drosophila orthologue of mammalian PTP1B, PTP61F has remained largely uncharacterized genetically. To establish the potential for a conserved role of PTP61F in the regulation of signaling pathways in Drosophila and to help resolve its fundamental function in RAS-MAPK signaling we generated and characterized an allele of Drosophila *Ptp61F*. Consistent with previous data, activity of the *Abl* locus is increased in *Ptp61F^I* mutants. Interestingly, activity of the *Doa* locus, encoding the LAMMER kinase of Drosophila, is reduced by a *Ptp61F* mutation, resulting in enhancement of *Doa*-induced sex transformations. We further demonstrate that *Ptp61F* negatively regulates the insulin pathway in Drosophila, similarly to PTP1B. Our findings further establish negative regulation of the RAS/MAPK pathway by *Ptp61F* function in whole animals. Perhaps most surprisingly is the suppression of hyperactive rl/MAP kinase activity by *Ptp61F* alleles, suggesting that the phosphatase may intervene at several levels of the pathway.

INTRODUCTION

Insulin is a key hormone regulating usage of stored energy as glycogen and fat. Insulin exerts its effects by binding to its receptor, the insulin receptor (IR), a Receptor Tyrosine Kinase (RTK) that undergoes autophosphorylation and activation to phosphorylate key substrates, including IRS proteins 1–4 (insulin receptor substrates) (White, 1998; Saltiel and Kahn, 2001). Tyrosine phosphorylation of the IRS scaffold proteins allows their activation and transduction of signaling through the PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt pathway that elicits many of insulin's metabolic and mitogenic effects (White, 1998; Saltiel and Kahn, 2001; Lizcano and Alessi, 2002). Insulin promotes glucose uptake in muscle and fat, to lower blood glucose levels and suppress hepatic glucose production (White, 1998; Saltiel and Kahn, 2001). Another key function of insulin signaling is the induction of mitogenic responses. Indeed, IRS also interacts with Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2), an adaptor protein that contains SH3 domains. Grb2 in turn associates with the guanine nucleotide exchange factor Son-of sevenless (Sos) and elicits activation of the MAPK cascade, leading to mitogenic responses (Ogawa et al., 1998). SHC (Src homology 2 domain-containing) is another substrate for the insulin receptor. Upon phosphorylation, SHC associates with GRB2 and can therefore activate the MAPK pathway independently of IRS.

Drosophila melanogaster is an ideal model organism for investigating signaling networks, including those induced by insulin (Lasko, 2002; Bier, 2005; Teleman, 2010). IR signaling regulates varied biological responses in flies, including longevity, female fertility and visual system formation (Lasko, 2002; Bier, 2005; Taguchi and White, 2008; Teleman, 2010).

The importance of phosphorylation and the regulatory roles of protein kinases are well established. It has become apparent that protein phosphatases are no less important. Thus, kinases and phosphatases are partners in regulating signaling responses. The kinases have been implicated in controlling the amplitude of a signaling response, whereas phosphatases are thought to have an important role in controlling the rate and duration of the response (Hornberg et al., 2005). Phosphatases are classified in three different groups based on their substrate specificity (Elchebly et al., 2000; Goldstein, 2001; Tonks, 2006): Those dephosphorylating Ser/Thr residues, those

dephosphorylating Tyr residues and those that dephosphorylate both Ser/Thr and Tyr residues of their substrates at the same time. This last group is termed dual-specificity phosphatases. The prototypic family member of phosphotyrosine phosphatases (PTPs), PTP1B is a negative regulator of many RTK signaling pathways including IR (Cicirelli et al., 1990; Kenner et al., 1996; Haj et al., 2005; Tiganis and Bennett, 2007), EGFR (Epithelial growth factor receptor) (Flint et al., 1997; Haj et al., 2002; Haj et al., 2003), CSF-1 (colony-stimulating factor 1) receptor (Heinonen et al., 2006), PDGFR (Platelet derived growth factor receptor) (Lammers et al., 1993; Haj et al., 2003), IGFR-1 (Kenner et al., 1996; Buckley et al., 2002).

In particular, PTP1B dephosphorylates the IR tandem Tyr1162/Tyr1163 PTK activation loop tyrosine phosphorylation site that is necessary for IR activation and signaling (Salmeen et al., 2000; Galic et al., 2005; Haj et al., 2005). Previous studies have shown that PTP1B-null (Ptpn1–/–) mice exhibit enhanced insulin sensitivity associated with increased IR activation in liver and muscle (Elchebly et al., 1999; Klaman, L. D. et al., 2000; Haj et al., 2005), whereas transgenic overexpression of PTP1B in muscle promotes insulin resistance (Zabolotny et al., 2004). Furthermore, EGFR is hyperphosphorylated in *Ptpn1-/-* mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and downstream signaling components are affected, as evidenced by enhanced ERK2 phosphorylation but without increased AKT activation (Haj et al., 2003). PTP1B's integral role in insulin signaling and potential in Ras/MAPK signaling makes it an exciting potential therapeutic target for the alleviation of insulin resistance in Type 2 diabetes (Goldstein, 2001; Zhang, 2007) and cancer (Lessard et al., 2010).

PTP1B has a controversial function in cancer. Some studies show that PTP1B-defiencient mice present a delay in breast cancer development or are protected from it while over-expression of PTP1B induces breast cancer (Zhai et al., 1993; Wiener et al., 1994; Dube et al., 2004; Bentires-Alj and Neel, 2007; Julien et al., 2007). They observed that p62DOK, a docking protein of the Ras regulatory protein p120RasGAP (Kashige et al., 2000), whose dephosphorylation is mediated by PTP1B, in these mice, p62DOK phosphorylation is enhanced and thus RasGap protein is inhibited, leading to a decrease of RAS and ERK phosphorylation (Dube et al., 2004), (Julien et al., 2007). It

is nevertheless important to note that (Bentires-Alj and Neel, 2007) did not observe increased phosphorylation of p62DOK in mice lacking PTP1B. Frequent amplification of the PTP1B chromosomal region 20q13 has also been associated with ovarian cancer (Tanner et al., 2001). However, others point out PTP1B as an anti-cancer phosphatase (Brown-Shimer et al., 1992; Liu et al., 1998). Strikingly, (Dube et al., 2004) showed that PTP1B-deficient fibroblasts have decreased Ras activity and reduced proliferation. The same authors showed that genetic ablation of protein tyrosine phosphatase 1B accelerates lymphomagenesis of p53 null mice through the regulation of B cell development (Dubé et al., 2005). Therefore the exact role of PTP1B in Ras/MAPK signaling remains unclear. Does it have two different roles in RAS/MAPK signaling or is its function in development substrate-involved or cellular-context dependant?

Many human components of the insulin pathway are essentially identical with those of the *Drosophila* insulin pathway. The PTP1B orthologue in *Drosophila melanogaster* is *Ptp61F* (McLaughlin and Dixon, 1993). Aside from the study of (Wu et al., 2011) which shows that PTP61F interacts with and dephosphorylates the dIR, and studies showing down-regulation of JAK/STAT signaling (Baeg et al., 2005; Muller et al., 2005), it has yet to be determined whether the *Drosophila* PTP1B counterpart *Ptp61F* is involved in regulating the *Drosophila* insulin or other signaling pathways.

Similar to its mammalian counterpart, *Ptp61F* is widely expressed at all stages of development, including oogenesis and embryogenesis (Fitzpatrick et al., 1995; Ursuliak, 1997). Alternative splicing of *Ptp61F* mRNA results in two isoforms: one that is targeted similarly to PTP1B to intracellular membranes (Frangioni et al., 1992), including the ER, by a hydrophobic C-terminal tail, and another that lacks the hydrophobic C-terminus and is targeted to the nucleus by a nuclear localization sequence (McLaughlin and Dixon, 1993), reminiscent of mammalian TC-PTP (T-cell PTP). TC-PTP shares 74% catalytic domain sequence identity with PTP1B (Tiganis et al., 1998; Andersen et al., 2001; Tiganis and Bennett, 2007).

Here we utilize the powerful genetics of *Drosophila* to generate mutations in *Ptp61F* as a first step toward providing better understanding of its role in various signaling pathways. In the

particular case of Ras/MAPK signaling, we examine interactions between *Ptp61F* and key MAPK pathway components (*Egfr, Ras, rolled* (ERK) and the MAPKinase target *pointed*. We show that *Ptp61F* activity suppresses the phenotype of several IR signaling pathway members, including *IR*, *Akt*, and *Pi3K*. We also show that *Ptp61F* represses activity of *Egfr, Ras* and *rolled* while *pnt* seems to be epistatic to it.

MATERIALS AND METHODS

Drosophila culture, crosses: Drosophila stocks and crosses were maintained on standard cornmeal agar medium. Crosses were performed at 25°C, except when the *GAL4-UAS* system was used to drive expression of target constructs, where 29°C was used to enhance phenotypes. Crosses to generate heteroallelic *Doa* individuals were previously described (Rabinow et al., 1993; Kpebe and Rabinow, 2008). To generate progeny expressing specific target genes in a tissue-specific pattern, we used the *GAL4-UAS* system (Brand and Perrimon, 1993). *Ptp61F* RNAi alleles were obtained from Tzu-Chi Meng (Ku et al., 2009) and from the VDRC stock center (http://stockcenter.vdrc.at/control/main). A *Ptp61F* over-expression construct (Baeg et al., 2005) was a generous gift from Norbert Perrimon.

Mutagenesis: *GE29085*, an EP (Rorth et al., 1998) *P*-element insertion near the 5' end of *Ptp61F* coding sequences (CG9181), was purchased from Genexcel. Additional alleles were recovered from imprecise excisions of the initial insertion. *Dr Mio/TMS*, *P{ry[1t7.2] \Delta 2-3*} males were crossed with w^{67c23} ; *P[w*+ *Ptp61F]^{GE29085/TM3*} females (Figure 1); F1 $\Delta 2$ -*3/P[w*+ *Ptp61F]^{GE29085*} males were crossed with yw^{67c23} ; *TM3/TM6* females. White-eyed F2 male progeny were screened for lack of ability to complement *Df(3L)ED207* (61C9-62A6), which removes *Ptp61F*.

Somatic Clones: Somatic clones were generated with the FLP/FRT system (Xu and Rubin, 1993b), using a FRT at 80B. A stock was generated between $Ptp61F^{l}$ (*w*+) and *ebony* to generate a $Ptp61F^{l}$ *e* stock. Recombinants between $Ptp61F^{l}$ *e/TM6* and *w; FRT80B/TM6*, were recovered with w^{+} and loss of *ebony*. We collected 10 males to be sure to have at least one recombinant between

FRT80B and *ebony*. In parallel, another cross was made between *w*; *FRT80B/TM6* and *y w hs Flp; Dr/TM3* to generate *y w hs Flp; FRT80B/TM3* carrying the recombinase Flp and *FRT80B*. Finally, *Ptp61F¹ FRT80B e/TM6* and *y w hs Flp; FRT80B/TM3* flies were then crossed together. For clone generation, 24-48-72 hour-old embryos *y w hsFLP; FRT80B/Ptp61F¹ FRT80B* were heat shocked at 37°C for 1 hour.

Lethal period: The lethal period of *Ptp61F1* was determined by generating heterozygous $Ptp6F^{1}/+$ by crossing to *CantonS* (wild-type). Heterozygotes were then crossed together. If lethal during embryonic stages, we expected 25% lethality from homozygotes of these heterozygotes. Flies were allowed to lay eggs. After 24h of incubation at 25°C, 100-300 eggs were collected and incubated at 25°C for an additional 72 hours. Non-hatching eggs were counted.

Inverse PCR: Inverse PCR was performed using the restriction endonucleases TaqI, HinP1I, AvaII, BstNI, HincII, according to the protocol of the Berkeley Drosophila Genome project (*http://www.fruitfly.org*). Inverse primers were designed based on the *white*⁺ sequence remaining in the residual *P*-element. Sticky fragments generated by the above 4-cutter enzymes were allowed to circularize by ligation by a T4 DNA ligase at 4°C overnight. After ethanol precipitation, DNA was amplified by PCR.

Scanning electron microscopy: Flies were dehydrated in an ascending series of ethanol baths to 70%. Images were acquired by a Zeiss Supra 55 VP at a 15 kV under a nitrogen atmosphere varying from 19 to 29 Pa and using a backscattered electron detector.

RESULTS

To decipher where and how PTP1B acts on various signaling pathways, we first generated a mutation in *Ptp61F*, orthologue to mammalian *PTP1B*, by imprecise excision of a *P*-element inserted near the 5' end of the *Ptp61F* coding region. *GE29085*, a stock obtained from Genexcel, carries an EP *P*-element insertion on 3L at nucleotide 1,349,604 near the 5' end of *Ptp61F* coding sequences and parallel to them (Figure 2). The *GE29085* chromosome is homozygous viable, and complements Df(3L)ED207 and Df(3L)ED4196, which delete the *Ptp61F* locus. Based on RNAi

data (Ku et al., 2009), we reasoned that a *Ptp61F* null allele would be recessive lethal, because it was observed that early third instar larvae expressing RNAi against *Ptp61F* died. Thus, flies failing to complement the chromosomal deficiency Df(3L)ED207 (61C9-62A6) might carry a null or hypomorphic mutation for *Ptp61F*. To generate a null allele, we mobilized the *P*-element in *GE29085*, which carries a w^+ allele (Figure 1). The potential mutants are flies where the w^+ was mutated to w^- due to the mobilized *P*-element. Potential mutants were then tested for their ability to complement Df(3L)ED207 (61C9-62A6) and carried a severely reduced w^+ eye color compared with the allele of origin. It was retained for further characterization and named *Ptp61F^d*.

Mutant characterization: $Ptp61F^{l}$ retains very slight w^{+} pigmentation, suggesting that at least a functional part of the w^{+} marker was intact, although it could have been transposed elsewhere in the genome. To determine the structure of $Ptp61F^{l}$, we generated sets of PCR primers, two located at each extremity of the *P*-element sequences and the others throughout Ptp61F (Figure 2). The results show that PCR fragments amplified between primers at the 5' end of the *P*-element and the 5' end of Ptp61F gene are normal. In contrast, PCR performed between primers at the 3' end of the *P*-element and others throughout Ptp61F, as well as those initiating in the distal lethal group l(3)02640, reveal abnormal gene structure, because no amplification fragments were recovered. Therefore, the coding region of Ptp61F appears to have been mutated in this allele. Repeated attempts to generate sequence information concerning the putative lesion in $Ptp61F^{l}$ using inverse PCR with multiple primers designed in the mini-white gene included in the *P*-element, and using multiple restriction enzymes were fruitless.

To eliminate the possibility of a large chromosomal rearrangement with a breakpoint in Ptp61F, the cytology of the $Ptp61F^{l}$ chromosome was checked by chromosomal squashes and was found normal (Figure 3A).

Deficiency mapping of $Ptp61F^{I}$ **delimits a 34 kb region including** Ptp61F: We performed deficiency mapping to better characterize $Ptp61F^{I}$ (Figure 3B, Table 1), using deficiencies with molecularly-defined endpoints, which allow exact localization with respect to the genes contained

within them (Table 1). By PCR, the 5' end *Ptp61F* was shown to be intact. This result was confirmed by complementation with Df(3L)BSC178 (Figure 3B, Table 1), which removes sequence proximal to the *Ptp61F* locus. Df(3L)BSC799 and Df(3L)BSC311, all distal to *Ptp61F* but also not affecting it, complement *Ptp61F¹*. In contrast, deficiencies Df(3L)ED4196 and Df(3L)ED207, all including *Ptp61F*, fail to complement *Ptp61F¹*. Df(3L)BSC289, which includes *Ptp61F* and as well as the nearby lethal complementation group l(3)02640, also fails to complement *Ptp61F¹*. Importantly however, Df(3L)BSC250 complements *Ptp61F¹*. The proximal breakpoint in this deficiency does not affect *Ptp61F*, l(03)02640, or *CG2199*, which intervenes between the two loci. The deficiency mapping results thus define a region of 34 kb which is lethal when deleted in combination with *Ptp61F¹*, defining a region containing at most 3 different loci. Together with results of the PCR experiments demonstrating that the 5' end of the P-element and *Ptp61F* are intact, we conclude that the phosphatase locus is mutated in *Ptp61F¹*, but that l(03)02640 could be mutated as well.

Recessive lethality of $Ptp61F^{l}$ occurs during early larval stages: Ku et al. (Ku et al., 2009), showed by RNAi that efficient Ptp61F knock-down is embryonic lethal. Our mutation was selected as lethal in combination with a deficiency of the region. To determine at which stage developmental lethality occurs, the $Ptp61F^{l}/TM6$ stock was crossed with a *Canton S* (C^{S}) wild-type stock to generate heterozygous ($Ptp61F^{l}/C^{S}$) which were then crossed together to avoid effects of any unknown secondary recessive lethal mutations in the $Ptp61F^{l}$ stock and lethality of the TM6 balancer. A total of 1254 eggs from $Ptp61F^{l}/C^{S}$ and 1310 eggs from C^{S} were collected and nonhatching eggs counted after 72 hours of additional time. The long incubation period ensured that if any developmental delays but not lethality were induced by homozygosity for $Ptp61F^{l}$, that larvae would hatch. 98/1254 and 311/1310 eggs failed to hatch from the $Ptp61F^{l}/+$ heterozygous cross and the C^{S} strains respectively. 25% of non-hatching eggs would be obtained from $Ptp61F^{l}$ if it were embryonic lethal, but we observed only 7.8% lethality. We do not have an explanation for the relatively high rate of non-hatching embryos from the C^{S} stock. Nevertheless, we conclude that the lethal period of $Ptp61F^{l}$ occurs during post-embryonic development, most likely during early larval

periods, as no dead third instar larvae or pupae are observed on vial walls of the stock. The survival of Ptp61F1 homozygotes to larval stages is consistent with the observation that maternal *Ptp61F* mRNA is transferred to embryos (Fitzpatrick et al., 1995).

Somatic clones: Since $Ptp61F^{l}$ is recessive lethal, we wished to observe the phenotype of individual homozygous cells if possible. Given the slight pigment levels in the eyes of Ptp61F flies, we attempted to generate clones in the eyes, which would be recognized by doubling of pigment levels. We induced $Ptp61F^{l}$ somatic cell clones by using the FLP/FRT system (Xu and Rubin, 1993a). We used a $Ptp61F^{l} e^{s}/TM6$ stock to recombine with a FRT at 80B to obtain $Ptp61F^{l}$ FRT80B/TM6. FLP activation was performed at 24hr, 48hr, and 72hr of development. Individuals bearing somatic clones in the eyes were identified but only with difficulty due to the very slight pigment levels of w^{+} carried by $Ptp61F^{l}$. Ommatidia of these flies were abnormal due to their disorganization (not shown).

PTP61F FUNCTION IN DIVERSE SIGNALING PATHWAYS

Mammalian PTP1B is involved in several signaling pathways including those regulating metabolism, cell proliferation and apoptosis. We therefore wished to examine the role of PTP61F in these and other pathways in *Drosophila*.

Abl is negatively regulated by *Ptp61F*: Ku et al. showed that the ABL kinase is activated by tyrosine phosphorylation and is a direct substrate for PTP61F (Ku et al., 2009). PTP61F inactivates ABL by dephosphorylation of Tyr482. Crosses between *Ptp61F¹/TM6* and *GMR>GAL4/UAS-Abl; TM6/+* (Figure 4) show that the eyes of flies carrying *Ptp61F¹* (Figure 4, left) (*GMR>GAL4/UAS-Abl; Ptp61F¹/+*) are bigger than those of their control siblings (*GMR>GAL4/UAS-Abl; TM6/+*, right), suggesting that reduction of PTP61F activity leads to increased phosphorylation of ABL and eye overgrowth.

PTP61F negatively regulates *Drosophila* insulin signaling: When $Ptp61F^{l}/TM6$ is crossed with an allele of the insulin receptor constitutively activated in eye discs (w^{1118} ; P (w+) $GMR>InR^{A1325D}$), eyes of descendants carrying $Ptp61F^{1}$ (w^{1118} ; P (w+) $GMR>InR^{A1325D}/Ptp61F^{l}$)

are noticeably bigger than those of their sibling control flies (w^{1118} ; P(w+) GMR>InR^{A1325D}/TM6) (Figure 5A). This result demonstrates a functional interaction between *Ptp61F* and *InR*, but which could be direct or indirect. In contrast, no effect is observed when the *Ptp61F^I* allele is combined with a dominant negative allele of *InR* (yw^{1118} ; *GMR*>*InR*^{K1409A}/*Ptp61F^I*) (Figure 5C). Consistently, an allele over-expressing *Ptp61F (UAS*>*Ptp61F/TM6C)*, produces flies with what may be smaller eyes with the w^{1118} ; P(w+) GMR>*InR*^{A1325D} allele (Figure 5B). Finally, RNAi alleles of *Ptp61F* driven with the *GMR-GAL4* element (*Ptp61F C2V-IR/TM6* and *Ptp61F i2.5-IR/TM6* (Ku et al., 2009), induce phenotypes identical to the *Ptp61F^I* mutant allele (Figures 5D, E), confirming the existence of functional interaction between *InR* and *Ptp61F*.

We also observed that *Ptp61F* interacts functionally with *Akt* ($v w^{1118}$; *GMR-GAL4/+*; *UAS*- $(vw^{1118};$ Akt1) and with constitutively activated allele of Pi3K а GMR>Pi3K92E.CAAX}2/T(2;3)TSTL, CvO: TM6B, Tb) (Figures 4F and 4G respectively), two main components of insulin signaling. Eyes of flies carrying $Ptp61F^{l}$ combined with an activating allele of Pi3K ($y w^{1118}$; GMR > Pi3K92E.CAAX/+; $Ptp61F^{1}/+$) or with an allele over-expressing Akt in the eyes ($y w^{1118}$; GMR-GAL4/+; UAS-Akt1/Ptp61F¹) are larger than the sibling controls ($y w^{1118}$; GMR > Pi3K92E.CAAX/+; TM6/+ or $y w^{1118}; GMR-GAL4/+; UAS-Akt1/TM6)$. These results demonstrate that the role for *Ptp61F* as a negative regulator of insulin signaling is conserved between mammals and Drosophila.

Doa mutant phenotypes are enhanced by *Ptp61F¹*: The *Darkener of apricot* locus (*Doa*), encodes the LAMMER protein kinase of Drosophila. LAMMER protein kinases are regulators of alternative splicing, among other things. Somatic sex determination in flies is under the control of a well-characterized cascade of alternative splicing (Rabinow and Samson, 2010). Heteroallelic combinations of *Doa* mutations (e.g. Doa^{HD}/Doa^{DEM}) induce somatic sex transformations to varying degrees (Du et al., 1998; Kpebe and Rabinow, 2008). It was recently shown via a phosphoproteomics approach that *Ptp61F* ablation by RNAi in S2 cells reduced phosphorylation of DOA Ser112 (Hilger et al., 2009). Effects of this phosphorylation are unknown. However, this result is obviously indirect since PTP61F is tyrosine specific. We tested whether a genetic interaction occurred between *Doa* and *Ptp61F*. When *Ptp61F^I Doa^{HD}/TM6* is crossed with another allele of *Doa* ($Doa^{DEM}/TM6$) to generate a heteroallelic *Doa* combination (*Ptp61F^I Doa^{HD}/+ Doa^{DEM}*), *Ptp61F^I* enhanced *Doa*-induced somatic sex transformations from female to male, with the appearance of a male-like structure, probably the beginning of a male clasper (Figure 6).

Ptp61F intervenes at multiple levels in MAPK signaling: Mammalian PTP1B plays an undefined and ambiguous role in MAPK signaling. Some reports described PTP1B as an anti-proliferative protein (Brown-Shimer et al., 1992; Liu et al., 1998; Gum et al., 2003a; Dubé et al., 2005), while others attributed an oncogenic function to it (Zhai et al., 1993; Wiener et al., 1994; Tanner et al., 2001; Dube et al., 2004; Bentires-Alj and Neel, 2007; Julien et al., 2007). To assign a role for *Ptp61F* in MAPK signaling, we crossed alleles of key genes in the pathway to *Ptp61F^d*, as well as RNAi and overexpression *Ptp61F* alleles, to investigate and define actions of the phosphatase in MAPK signaling.

Data with a hyperactivated allele of the EGF receptor, $Egfr^{Elp}$ (Figure 7B) show that RNAi of *Ptp61F* enhances its phenotype (Figure 7D) whereas hyper-induction of the phosphatase suppresses it (Figure 7E). Conversely, we also observed enhancement of the *Elp* phenotype with the mutation *Ptp61F^l* (Figure 7C).

Several steps downstream of *Egfr* in the MAPK pathway is *Ras*. The severe genotype induced by *sev-Ras*^{V12} (Figures 8B and 8G), a hyper-activated allele of *Ras* only expressed in photoreceptors R1, R6 and R7, is enhanced by the *Ptp61F*¹ mutation (Figure 8C, compare with sibling, Figure 8B), similar to what is observed by reduction in *Ptp61F* activity by RNAi (Figure 8D). Moreover, deficiencies *Df(3L)ED207* and *Df(3L)ED4196*, which include *Ptp61F*, strongly enhance the *sev-Ras*^{V12} phenotype (Figures 7E and 7F respectively). In contrast, the *sev-Ras*^{V12} phenotype is suppressed by over-expression of *Ptp61F* (Figure. 8H, compare with sibling 8G).

Another key component downstream in the Drosophila Ras/MAPK pathway is *rolled* (*rl*), which encodes the Drosophila orthologue of *MAPK*. The allele *rl*^{SEM} (Figure 9B) is a hyperactivated point mutant of MAPK reducing the ability of the kinase to be dephosphorylated (Brunner et al., 1994). Among other phenotypes, it induces thickened and ectopic wing venation, particularly in the

anterior cross vein. This effect is partially suppressed by increased expression of *Ptp61F* (Figure 9C) and enhanced by reduced expression of *Ptp61F* by RNAi (Figure 9D, 9E), including the appearance of substantial ectopic venation. Enhancement is strongest when rt^{SEM} is combined with the *Ptp61F¹* mutation (Figure 8F).

 rl^{SEM} was initially described as producing roughened eyes (Brunner et al., 1994), but the stock has since lost that phenotype (http://www.dgrc.kit.ac.jp/en/index.html). We were thus somewhat surprised to note in the crosses above that the presence of *Ptp61F* alleles reducing function induced larger than normal eyes (Fig. 10). Thus, results obtained in wing veins on effects of *Ptp61F* reduction in function on rl^{SEM} are consistent with those observed in eyes, and suggest that increased rl activity induced by reduction of *Ptp61F* function results in excess cell proliferation.

One of the major effectors of Ras/MAPK signaling in the fly is the ETS family transcription factor *pointed*. (Charroux et al., 2006) and (Rendina et al., 2010) showed that flies heteroallelic for the hypomorphic alleles *pnt*⁴⁸⁸/*pnt*¹²⁷⁷ possess rough eyes. We introduced the *Ptp61F¹* mutation into this combination to determine whether interactions between these genes existed and observed no effect on eye roughness (Figure 11A). Moreover, when alleles increasing or reducing *Ptp61F* expression are combined with a hypermorphic allele of *pnt* (w^{1118} ; *UAS-pnt*^{P2}/*TM3*), which induces smooth and glassy eyes when driven with *GMR-GAL4*, no differences were observed between progeny carrying the RNAi alleles *Ptp61F-i2.5-IR* or *Ptp61F-i2.5 C2V-IR*) or their siblings (Figure 11B, C). We also tested the over-expressing allele *GMR>Ptp61F* (Figure 11D). The lack of interaction between *Ptp61F* and *pnt* demonstrates that *pnt* acts epistatically to *Ptp61F*.

DISCUSSION

Deletion mapping and PCR data show that the coding region of Ptp61F is affected in $Ptp61F^{I}$. Lethality associated with this allele is located between deficiencies Df(3L)BSC178 and Df(3L)BSC250, which is a 34 kb interval. Knock-down of Ptp61F by RNAi results in embryonic lethality (Ku et al., 2009). Our data partially confirm this observation, since $Ptp61F^{I}$ fails to complement Df(3L)ED4196, Df(3L)ED207 and Df(3L)BSC289, which all include Ptp61F. However, in contrast to their findings, we observed that $Ptp61F^{I}$ survives as a homozygote until early larval development. The survival of $Ptp61F^{I}$ homozygous embryos until early larval stages could be due to the maternal transcripts observed (Fitzpatrick et al., 1995). This explanation would also be consistent with the discrepancy between survival of $Ptp61F^{I}$ homozygous mutant embryos and the earlier death provoked by RNAi directed against the transcripts, since any maternally-deposited mRNA would be expected to be rapidly degraded by the RISC complex. Additionally, PTP61F-modified substrates may be maternally deposited in the oocyte. These two possibilities are not mutually exclusive.

It was previously demonstrated by substrate-trapping, by RNAi directed toward *Ptp61F*, and by genetic interactions, that ABL kinase is a direct substrate of PTP61F (Ku et al., 2009). When we combined *Ptp61F^l/TM6* with over-expression of *Abl* that *GMR>Abl*; *Ptp61F1/+* progeny possess overgrown eyes relative to their siblings without the phosphatase mutation. This observation further confirms not only that ABL is a substrate of PTP61F but also supports the fact that *Ptp61F* activity is substantially decreased in *Ptp61F^l*.

Our data demonstrate that *Ptp61F* regulates *Doa* activity. The mechanism of regulation is necessarily indirect since phosphoproteomics (Hilger et al., 2009) show that knocking-down *Ptp61F* activity in S2 cells produces a significant reduction of Ser112 phosphorylation of DOA. However, the result implicates *Ptp61F* in additional signaling pathways, including those regulating alternative splicing, due to *Doa's* known effects on splicing of pre-mRNAs (Du et al., 1998).

The insulin signaling pathway is highly conserved between mammals and flies, and studies in *Drosophila* have defined the biological functions of several pathway components, including that of InR, IRS-1-IRS-4, PI3K, and AKT (Garofalo, 2002; Lasko, 2002; Bier, 2005; Teleman, 2010). Aside from the study conducted by (Wu et al., 2011), where over-expression of *Ptp61F* reduced the disorganization of eves of flies grossly over-expressing InR, no studies clearly demonstrate that *Ptp61F* functions as a negative regulator of InR function as mammalian PTP1B. By using null, reduction of function and over-expressing *Ptp61F* alleles, constitutive activation and dominant negative alleles of the insulin receptor and other pathway members, we show that *Ptp61F* is a general negative regulator of the Drosophila insulin pathway. We also describe here for the first time a functional interaction between Ptp61F with Akt and Pi3K. PI3K/AKT are also involved in growth, development and differentiation (Brunet et al., 1999; Alvarez et al., 2001; Casas-Tinto et al., 2007; Lavery et al., 2007). The interactions between *Ptp61F* and *Akt* and *Pi3K* could plausibly even be direct, since the catalytic subunit P110 of PI3K undergoes tyrosine phosphorylation in mammals (Craxton et al., 1999). Additionally, several studies show that besides sérine and threonine phosphorylation, tyrosine phosphorylation on Tyr512 and Tyr523 is required for full AKT activation in mammals (Craxton et al., 1999; Li et al., 1999; Chen et al., 2001). It might be noted that human AKT and dAKT share high sequence identity (Scanga et al., 2000; Sarbassov et al., 2005).

MAPK is a well described pathway regulating cell proliferation, survival, differentiation, migration and division. This pathway is activated by a cascading series of phosphorylation events (Rebay, 2002; Zhou et al., 2002). Various components of the MAPK pathway are activated by phosphorylation on Ser/Thr or Tyr residues (Ahn et al., 1991). The role of PTP1B in regulation of the Ras/MAPK pathway remains controversial. Eye development in *Drosophila* requires signaling through the epithelial growth factor receptor (EGFR) and Sevenless RTKs (Qiao et al., 2006). RTK activity leads to activation of RAS, which in turn leads to activation of the mitogen activated protein kinase (MAPK), ROLLED (Brunner et al., 1994). We observed that *Ptp61F* negatively regulates *Egfr*. This is not a surprising result since several studies show that mammalian PTP1B is a negative regulator of RTKs (Ahmad and Goldstein, 1995; Kenner et al., 1996; Flint et al., 1997; Elchebly et al., 1999; Klaman, L. D. et al., 2000; Buckley et al., 2002; Haj et al., 2002; Haj et al.,

102

2003). In addition to negative effects on EGF-R activity, however, we further found that *Ptp61F* also negatively regulates *Ras* and *rl*. These results could be indirect or by direct dephosphorylation of RAS/MAPK signaling components by PTP61F. For example, RAS is activated by an adaptor protein called p130Cas, which requires tyrosine phosphorylation for its own activation (Gotoh et al., 2000). p130Cas is dephosphorylated in mammals by PTP1B (Liu et al., 1998). Moreover, before guanine nucleotide exchange between SOS and RAS, the former must be tyrosine phosphorylated by the Sevenless receptor (Bonfini et al., 1992). *Drosophila* RAF also undergoes tyrosine phosphorylation at Tyr510 (Xia et al., 2008), and would thus be potentially susceptible to PTP61F inactivation but we did not test this MAPK signaling component directly. Interaction between *Ptp61F* and the RAS-MAPK pathway could also be due to cross-talk between *Ptp61F* and another signaling pathway, parallel to MAPK. Finally, MAPK/R1 itself requires a tyrosine and threonine phosphorylation for activation. Somewhat surprisingly, PTP61F represses *rl* activity, as demonstrated by our results with *rl*^{SEM}. This is in agreement with the observations of suppression of transformation by PTP1B in rat fibroblasts with a decrease of ERK1/2 phosphorylation (Liu et al., 1998).

We noted that Ptp61F suppresses activity of $Egfr^{Elp}$, Ras^{V12} , and rt^{SEM} but not of pntP2 hypomorphic or hypermorphic alleles. Since we used hyperactivated alleles of each signaling component, suppression by Ptp61F of the phenotypes of these alleles encoding genes in the MAP kinase pathway means that the phosphatase gene interacts either at the same level, below these genes, or in a pathway parallel to MAP kinase. Interactions between Ptp61F and Egfr, Ras and rl suggest the distinct possibility that the phosphatase intervenes at multiple points in the pathway. The absence of interaction between Ptp61F and pnt means that pnt acts epistatically to Ptp61F. Therefore, action of the Ptp61F is at or below rl. Because PNT is directly phosphorylated by RL, and there are no known intermediates between them, this invites the speculation that PTP61F directly interacts with RL, probably to dephosphorylate it. This *in vivo* finding is in direct contrast to that obtained via *in vitro* de-phosphorylation studies (Zhou et al., 2002), but is based upon

sufficiently strong genetic evidence as to suggest the eventual need for future *in vitro* and more *in vivo* studies.

The evidence we provide confirms a conserved role for PTP61F/PTP1B in development and the regulation of several signaling cascades. Based on our observations, the phosphatase could effectively play a role in cancer, depending on the cellular context. Our results suggest that a fundamental function of PTP61F could be to repress cell proliferation and differentiation.

REFERENCES

Ahmad, F. and Goldstein, B. J. (1995). Alterations in specific protein-tyrosine phosphatases accompany insulin resistance of streptozotocin diabetes. *Am J Physiol.* **268**, E932-940.

Ahn, N. G., Seger, R., Bratlien, R. L., Diltz, C. D., Tonks, N. K. and Krebs, E. G. (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**, 4220-4227.

Alvarez, B., Martínez, A. C., Burgering, B. M. and Carrera, A. C. (2001). Forkhead transcription factors contribute to execution of the mitotic programme in mammals.

Alvarez B, Martínez-A C, Burgering BM, Carrera AC. Nature 413, 744-747.

Andersen, J. N., Mortensen, O. H., Peters, G. H., Drake, P. G., Iversen, L. F., Olsen, O. H., Jansen,
P. G., Andersen, H. S., Tonks, N. K. and Moller, N. P. (2001). Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol Cell Biol* 21, 7117-7136.

Baeg, G. H., Zhou, R. and Perrimon, N. (2005). Genome-wide RNAi analysis of JAK/STAT signaling components in Drosophila. *Genes Dev* **19**, 1861-1870.

Bentires-Alj, M. and Neel, B. G. (2007). Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer. *Cancer Res* **67**, 2420-2424.

Bier, E. (2005). Drosophila , the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 9-23.

Bonfini, L., Karlovich, C. A., Dasgupta, C. and Banerjee, U. (1992). The Son of sevenless gene product: a putative activator of Ras. *Science* **255**, 603-606.

Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.

Brown-Shimer, S., Johnson, K. A., Hill, D. E. and Bruskin, A. M. (1992). Effect of protein tyrosine phosphatase 1B expression on transformation by the human neu oncogene. *Cancer Res.* **52**, 478-482.

105

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. and Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-868.

Brunner, D., Oellers, N., Szabad, J., Biggs, W. H. I., Zipursky, S. L. and Hafen, E. (1994). A gain of function mutation in *Drosophila* MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signalling pathways. *Cell* **76**, 875-888.

Buckley, D. A., Loughran, G., Murphy, G., Fennelly, C. and O'Connor, R. (2002). Identification of an IGF-1R kinase regulatory phosphatase using the fission yeast Schizosaccharomyces pombe and a GFP tagged IGF-1R in mammalian cells. *Mol Pathol.* **55**, 46-54.

Casas-Tinto, S., Marr, M. T., 2nd, Andreu, P. and Puig, O. (2007). Characterization of the Drosophila insulin receptor promoter. *Biochim Biophys Acta* **1769**, 236-243.

Charroux, B., Freeman, M., Kerridge, S. and Baonza, A. (2006). Atrophin contributes to the negative regulation of epidermal growth factor receptor signaling in Drosophila. *Dev Biol* **291**, 278-290.

Chen, R., Kim, O., Yang, J., Sato, K., Eisenmann, K. M., McCarthy, J., Chen, H. and Qiu, Y. (2001). Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **276**, 31858-31862.

Cicirelli, M. F., Tonks, N. K., Diltz, C. D., Weiel, J. E., Fischer, E. H. and Krebs, E. G. (1990). Microinjection of a protein-tyrosine-phosphatase inhibits insulin action in Xenopus oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5514-5518.

Craxton, A., Jiang, A., Kurosaki, T. and Clark, E. A. (1999). Syk and Bruton's tyrosine kinase are required for B cell antigen receptor-mediated activation of the kinase Akt. *J Biol Chem* **274**, 30644-30650.

Du, C., McGuffin, M. E., Dauwalder, B., Rabinow, L. and Mattox, W. (1998). Protein phosphorylation plays an essential role in the regulation of alternative splicing and sex determination in Drosophila. *Molecular Cell* **2**, 741-750.

106
Dube, N., Cheng, A. and Tremblay, M. L. (2004). The role of protein tyrosine phosphatase 1B in Ras signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1834-1839.

Dubé, N., Bourdeau, A., Heinonen, K. M., Cheng, A., Loy, A. L. and Tremblay, M. L. (2005). Genetic ablation of protein tyrosine phosphatase 1B accelerates lymphomagenesis of p53-null mice through the regulation of B-cell development. *Cancer Res* **65**, 10088-10095.

Elchebly, M., Cheng, A. and Tremblay, M. L. (2000). Modulation of insulin signaling by protein tyrosine phosphatases. *J Mol Med (Berl)* **78**, 473-482.

Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A. L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C. C. et al. (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*. **283**, 1544-1548.

Fitzpatrick, K. A., Gorski, S. M., Ursuliak, Z. and Price, J. V. (1995). Expression of protein tyrosine phosphatase genes during oogenesis in Drosophila melanogaster. *Mech Dev* **53**, 171-183.

Flint, A. J., Tiganis, T., Barford, D. and Tonks, N. K. (1997). Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1680-1685.

Frangioni, J. V., Beahm, P. H., Shifrin, V., Jost, C. A. and Neel, B. G. (1992). The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. *Cell* **68**, 545-560.

Galic, S., Hauser, C., Kahn, B. B., Haj, F. G., Neel, B. G., Tonks, N. K. and Tiganis, T. (2005). Coordinated regulation of insulin signaling by the protein tyrosine phosphatases PTP1B and TCPTP. *Mol Cell Biol* **25**, 819-829.

Garofalo, R. S. (2002). Genetic analysis of insulin signaling in Drosophila. *Trends Endocrinol Metab*13, 156-162.

Goldstein, B. J. (2001). Protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B): a novel therapeutic target for type 2 diabetes mellitus, obesity and related states of insulin resistance. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **1**, 265-275.

Gotoh, T., Cai, D., Tian, X., Feig, L. A. and Lerner, A. (2000). p130Cas regulates the activity of AND-34, a novel Ral, Rap1, and R-Ras guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* **275**, 30118-30123.

Gum, R. J., Gaede, L. L., Heindel, M. A., Waring, J. F., Trevillyan, J. M., Zinker, B. A., Stark, M. E., Wilcox, D., Jirousek, M. R., Rondinone, C. M. et al. (2003a). Antisense protein tyrosine phosphatase 1B reverses activation of p38 mitogen-activated protein kinase in liver of ob/ob mice. *Mol Endocrinol* **17**, 1131-1143.

Haj, F. G., Verveer, P. J., Squire, A., Neel, B. G. and Bastiaens, P. I. (2002). Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum. *Science* **295**, 1708-1711.

Haj, F. G., Markova, B., Klaman, L. D., Bohmer, F. D. and Neel, B. G. (2003). Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *J Biol Chem* **278**, 739-744.

Haj, F. G., Zabolotny, J. M., Kim, Y. B., Kahn, B. B. and Neel, B. G. (2005). Liver-specific proteintyrosine phosphatase 1B (PTP1B) re-expression alters glucose homeostasis of PTP1B-/-mice. *J Biol Chem* 280, 15038-15046.

Heinonen, K. M., Dubé, N., Bourdeau, A., Lapp, W. S. and Tremblay, M. L. (2006). Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates macrophage development through CSF-1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2776-2781.

Hilger, M., Bonaldi, T., Gnad, F. and Mann, M. (2009). Systems-wide analysis of a phosphatase knock-down by quantitative proteomics and phosphoproteomics. *Mol Cell Proteomics* **8**, 1908-1920.

108

Hornberg, J. J., Binder, B., Bruggeman, F. J., Schoeberl, B., Heinrich, R. and Westerhoff, H. V. (2005). Control of MAPK signalling: from complexity to what really matters. *Oncogene* **24**, 5533-5542.

Julien, S. G., Dube, N., Read, M., Penney, J., Paquet, M., Han, Y., Kennedy, B. P., Muller, W. J. and Tremblay, M. L. (2007). Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. *Nat Genet* **39**, 338-346.

Kashige, N., Carpino, N. and Kobayashi, R. (2000). Tyrosine phosphorylation of p62dok by p210bcr-abl inhibits RasGAP activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2093-2098.

Kenner, K. A., Anyanwu, E., Olefsky, J. M. and Kusari, J. (1996). Protein-tyrosine phosphatase 1B is a negative regulator of insulin- and insulin-like growth factor-I-stimulated signaling. *J Biol Chem* 271, 19810-19816.

Klaman, L. D., Boss, O., Peroni, O. D., Kim, J. K., Martino, J. L., Zabolotny, J. M., Moghal, N., Lubkin, M., Kim, Y. B., Sharpe, A. H. et al. (2000). Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol.* **20**, 5479-5489.

Klaman, L. D., Boss, O., Peroni, O. D., Kim, J. K., Martino, J. L., Zabolotny, J. M., Moghal, N., Lubkin, M., Kim, Y. B., Sharpe, A. H. et al. (2000). Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol* **20**, 5479-5489.

Kpebe, A. and Rabinow, L. (2008). Dissection of Darkener of apricot kinase isoform functions in Drosophila. *Genetics* **179**, 1973-1987.

Ku, H. Y., Wu, C. L., Rabinow, L., Chen, G. C. and Meng, T. C. (2009). Organization of F-actin via concerted regulation of Kette by PTP61F and dAbl. *Mol Cell Biol* **29**, 3623-3632.

109

Lammers, R., Bossenmaier, B., Cool, D. E., Tonks, N. K., Schlessinger, J., Fischer, E. H. and Ullrich, A. (1993). Differential activities of protein tyrosine phosphatases in intact cells. *J Biol Chem* 268, 22456-22462.

Lasko, P. (2002). Diabetic flies? Using Drosophila melanogaster to understand the causes of monogenic and genetically complex diseases. *Clin Genet.* **62**, 358-367.

Lavery, W., Hall, V., Yager, J. C., Rottgers, A., Wells, M. C. and Stern, M. (2007). Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt nonautonomously promote perineurial glial growth in Drosophila peripheral nerves. *J Neurosci* **27**, 279-288.

Lessard, L., Stuible, M. and Tremblay, M. L. (2010). The two faces of PTP1B in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1804**, 613-619.

Li, H. I., Davis, W. W., Whiteman, E. L., Birnbaum, M. J. and Puré, E. J. (1999). The tyrosine kinases Syk and Lyn exert opposing effects on the activation of protein kinase Akt/PKB in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6890-6895.

Liu, F., Sells, M. A. and Chernoff, J. (1998). Transformation suppression by protein tyrosine phosphatase 1B requires a functional SH3 ligand. *Mol Cell Biol* **18**, 250-259.

Lizcano, J. M. and Alessi, D. R. (2002). The insulin signalling pathway. Curr Biol 12, R236-238.

McLaughlin, S. and Dixon, J. E. (1993). Alternative splicing gives rise to a nuclear protein tyrosine phosphatase in Drosophila. *J Biol Chem* **268**, 6839-6842.

Muller, P., Kuttenkeuler, D., Gesellchen, V., Zeidler, M. P. and Boutros, M. (2005). Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference. *Nature* **436**, 871-875.

Ogawa, W., Matozaki, T. and Kasuga, M. (1998). Role of binding proteins to IRS-1 in insulin signalling. *Mol Cell Biochem* **182**, 13-22.

Qiao, F., Harada, B., Song, H., Whitelegge, J., Courey, A. J. and Bowie, J. U. (2006). Mae inhibits Pointed-P2 transcriptional activity by blocking its MAPK docking site. *EMBO J* **25**, 70-79.

110

Rabinow, L. and Samson, M. L. (2010). The role of the Drosophila LAMMER protein kinase DOA in somatic sex determination. *J Genet* **89**, 271-277.

Rabinow, L., Chiang, S. L. and Birchler, J. A. (1993). Mutations at the *Darkener of apricot* locus modulate transcript levels of *copia* and *copia*-induced mutations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **134**, 1175-1185.

Rebay, I. (2002). Keeping the receptor tyrosine kinase signaling pathway in check: lessons from Drosophila. *Dev Biol* **251**, 1-17.

Rendina, R., Strangi, A., Avallone, B. and Giordano, E. (2010). Bap170, a subunit of the Drosophila PBAP chromatin remodeling complex, negatively regulates the EGFR signaling. *Genetics* **186**, 167-181.

Rorth, P., Szabo, K., Bailey, A., Laverty, T., Rehm, J., Rubin, G., Weigmann, K., Milan, M., Benes,
V., Ansorge, W. et al. (1998). Systematic gain-of-function genetics in Drosophila. *Development* 125, 1049-1057.

Salmeen, A., Andersen, J. N. and al., M. M. P. e. (2000). Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *Molecular Cell* **6**, 1401-1412.

Saltiel, A. R. and Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799-806.

Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. and Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098-1101.

Scanga, S. E., Ruel, L., Binari, R. C., Snow, B., Stambolic, V., Bouchard, D., Peters, M., Calvieri, B., Mak, T. W., Woodgett, J. R. et al. (2000). The conserved PI3'K/PTEN/Akt signaling pathway regulates both cell size and survival in Drosophila. *Oncogene* **19**, 3971-3977.

Taguchi, A. and White, M. F. (2008). Insulin-like signaling, nutrient homeostasis, and life span. *Annu Rev Physiol* **70**, 191-212. Tanner, M. M., Grenman, S., Koul, A., Johannsson, O., Meltzer, P., Pejovic, T., Borg, A. and Isola, J. J. (2001). Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 6, 1833-1839.

Teleman, A. (2010). Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in Drosophila. *Biochem J.* **425**, 13-26.

Tiganis, T. and Bennett, A. M. (2007). Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective. *Biochem J* **402**, 1-15.

Tiganis, T., Bennett, A. M., Ravichandran, K. S. and Tonks, N. K. (1998). Epidermal growth factor receptor and the adaptor protein p52Shc are specific substrates of T-cell protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* **18**, 1622-1634.

Tonks, N. K. (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 833-846.

Ursuliak, Z., Clemens, J. C., Dixon, J. E. and Price, J. V. (1997). Differential accumulation of DPTP61F alternative transcripts: regulation of a protein tyrosine phosphatase by segmentation genes. *Mech Dev.* **65**, 19-30.

White, M. F. (1998). The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* **182**, 3-11.

Wiener, J. R., Kerns, B. J., Harvey, E. L., Conaway, M. R., Iglehart, J. D., Berchuck, A. and Bast, R.
C. J. (1994). Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in human breast cancer: association with p185c-erbB-2 protein expression. *J Natl Cancer Inst.* 86, 372-378.

Wu, C. L., Buszard, B., Teng, C. H., Chen, W. L., Warr, C. G., Tiganis, T. and Meng, T. C. (2011). Dock/Nck facilitates PTP61F/PTP1B regulation of insulin signalling. *Biochem J* **439**, 151-159.

Xia, F., Li, J., Hickey, G. W., Tsurumi, A., Larson, K., Guo, D., Yan, S. J., Silver-Morse, L. and Li, W.
X. (2008). Raf activation is regulated by tyrosine 510 phosphorylation in Drosophila. *Plos Biol.* 6, e128.

Xu, T. and Rubin, G. M. (1993a). Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues. *Development* **117**, 1223-1237.

Xu, T. and Rubin, G. M. (1993b). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-1237.

Zabolotny, J. M., Haj, F. G., Kim, Y. B., Kim, H. J., Shulman, G. I., Kim, J. K., Neel, B. G. and Kahn, B. B. (2004). Transgenic overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle causes insulin resistance, but overexpression with leukocyte antigen-related phosphatase does not additively impair insulin action. *J Biol Chem* **279**, 24844-24851.

Zhai, Y. F., Beittenmiller, H., Wang, B., Gould, M. N., Oakley, C., Esselman, W. J. and Welsch, C.
W. (1993). Increased expression of specific protein tyrosine phosphatases in human breast epithelial cells neoplastically transformed by the neu oncogene. *Cancer Res* 53, 2272-2278.

Zhang, S. a. Z., Z. Y. (2007). PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery. *Drug Discov Today.* **12**, 373-381.

Zhou, B., Wang, Z. X., Zhao, Y., Brautigan, D. L. and Zhang, Z. Y. (2002). The specificity of extracellular signal-regulated kinase 2 dephosphorylation by protein phosphatases. *J Biol Chem* 277, 31818-31825.

ACKNOWLEDGEMENTS

Drosophila stocks were graciously provided by Norbert Perrimon and Rich Binari, Tzu-Ching Meng, the Indiana University Drosophila stock center, the Drosophila Genetic Resource Center, Kyoto Japan, and the Vienna Drosophila RNAi Center. We particularly thank Jaesob Kim for help in obtaining the P-element insertions in *Ptp61F*. Funding was provided by the Université de Paris Sud and the CNRS.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Mutagenesis. The *EP* P-element *GE29085* inserted in *Ptp61F* coding region was mobilized by the $\Delta 2$ -3 transposase. Flies showing lethality with deficiency *Df(3L)ED207*, which includes *Ptp61F*, were identified as potential mutants.

Figure 2: Locus structure of *Ptp61F* and *GE29085*. PCR was performed with primers located at both P-element extremities and on both sides of *Ptp61F*. Amplification products 5' to the insertion site were normal. Those 3' to the insertion site were undetectable. PCR 3' to GE29085 covered the entire *Ptp61F* region up to and including l(3)02640, without recovery of any amplification products.

Figure 3: A. Cytology of the distal left arm of chromosome 3L in a $Ptp61F^{1}/+$ heterozygote. The arrow indicates the 61F region. No abnormalities were observed.

B. Deficiency mapping of $Ptp61F^{l}$. The region encoding PTP61F is 132757 bp. Black bars define the deficiencies used to test for complementation with $Ptp61F^{l}$. Lethality or viability (complementation) with $Ptp61F^{l}$ is indicated for each deficiency tested.

Figure 4: $Ptp61F^{l}$ enhances an eye-overgrowth phenotype induced by overexpression of ABL kinase. A. left : *GMR-GAL4 UAS-Abl/+*; $Ptp61F^{l}/+$, right: a *GMR-GAL4 UAS-Abl/+*; TM6/+ sibling. A. scanning electron micrograph; B. light microscopy. Over-growth of the eyes induced by *Abl* over-expression is enhanced by reduced phosphatase activity in the $Ptp61F^{l}$ animals.

Figure 5: *Ptp61F* negatively regulates insulin signaling. All comparisons were made between sibling flies. A. Left: w^{1118} ; P(w+) $GMR > InR^{A1325D}/Ptp61F^{1}$; Right: w^{1118} ; P(w+) $GMR > InR^{A1325D}/TM6$. InR^{A1325D} is a constitutively active allele that generates eyes that are slightly larger than wild-type. Note the strong enhancement of the phenotype by reduction in *Ptp61F* activity (left). B. Left: w^{1118} ; P(w+) $GMR > InR^{A1325D}/GMR > UAS-Ptp61F$, right: w^{1118} ; P(w+) $GMR > InR^{A1325D}/TM6$.

Over-expression of *Ptp61F* suppresses the slightly larger eye due to *InR* hyper-activation, in contrast to (A), where *Ptp61F* mutation enhances it. C. Left: $y w^{1118}$; *GMR>InR*^{K1409A}/*Ptp61F*¹, Right: $y w^{1118}$; *GMR-InR*^{K1409A}/*TM6*. *InR*^{K1409A} is a dominant negative (inactive) allele, and thus cannot be modified by *Ptp61F* alleles. D. Left: w^{1118} ; $P (w+) GMR>InR^{41325D}/Ptp61F-IR-C2V$, right: w^{1118} ; $P (w+) GMR>InR^{41325D}/Ptp61F-IR-C2V$, right: w^{1118} ; $P (w+) GMR>InR^{41325D}/TM6$. E. Left: w^{1118} ; $P (w+) GMR>InR^{41325D}/Ptp61F-IR-i2.5$, right: w^{1118} ; $P (w+) GMR>InR^{41325D}/TM6$. In both (D) and (E), the RNAi constructs targeting *Ptp61F* transcripts, *C2V* and *i2.5*, mimic the effects of *Ptp61F* mutations, as in (A), strongly enhancing eye over-growth induced by constitutive activity of *InR*. F. Left: $y w^{1118}$; *GMR-GAL4/+*; *UAS-Akt1/Ptp61F*¹. Right: $y w^{1118}$; *GMR-GAL4/+*; *UAS-Akt1/TM6*. G. Left: yw^{1118} ; *GMR>Pi3K92E.CAAX/+*; *Ptp61F*¹/+, right: yw^{1118} ; *GMR>Pi3K92E.CAAX/+*; *TM6/+*. Slightly increased eye size may be observed in animals over-expressing (left) *Akt1* (F), or a constitutively activated allele of *Pi3K92E* (G), when compared with their siblings segregating for a balancer chromosome.

Figure 6: Ptp61F plays a positive role in somatic sex determination. $Ptp61F^{l}$ enhances the female to male sex transformation induced by heteroallelic combinations of *Doa*. A. Wild-type (*Canton-S*) female. B. Doa^{HD}/Doa^{DEM} female. C. Female $Ptp61F^{l} Doa^{HD} /+ Doa^{DEM}$. Note the appearance of an additional appendage in the Ptp61F heterozygote. This is likely to be a male "clasper" and is a sign of partial female-to-male sex transformation.

Figure 7: *Ptp61F* activity suppresses, while its reduction enhances the phenotype induced by the hyperactivated allele $Egfr^{Elp}$. A. Wild-type. B. $y w^{67c23}$; $Egfr^{Elp}/+$; TM6/+. C. $y w^{67c23}$; $Egfr^{Elp}/GMR$ -GAL4; $Ptp61F^{l}/+$. D. $y w^{67c23}$; $Egfr^{Elp}/GMR$ -GAL4; Ptp61F IR i2.5/+. A slightly larger eye is induced in *Elp* flies by an RNAi construct targeting *Ptp61F* transcripts, an effect comparable to that observed with the mutation in (C, as compared with B).

E. yw^{67c23} ; Egfr^{Elp}/GMR-GAL4; UAS-Ptp61F/+. Note the smaller eye compared with (B), indicating enhancement of the *Elp* phenotype.

Figure 8: *Ptp61F* genetically interacts with *Ras*. Reduction in function of *Ptp61F*, whether by mutation of the gene (C, compare with sibling, B), RNAi (D), or deletion of the locus (E, F), enhances the eye-overgrowth phenotype of *sev-Ras85D^{V12}*. Conversely, the induction of *Ptp61F* activity (H, compare with sibling, G), suppresses the *sev-Ras85D^{V12}* phenotype.

A. *Canton-S* (wild-type). B. *CyO*, *sev-Ras85D*^{V12}/ +. C. *CyO*, *sev-Ras85D*^{V12}; *Ptp61F*¹/+. D. *CyO*, *sev-Ras85D*^{V12}; *Ptp61F-i2.5-IR*/+ E. *CyO*; *sev-Ras85D*^{V12}; *Df(3L)ED4196*/+ F. *CyO*, *sev-Ras85D*^{V12}; *Df(3L)ED207*/+ G. *CyO*, *sev-Ras85D*^{V12}/+. H. *CyO*, *sev-Ras85D*^{V12}; *UAS-Ptp61F*/+.

Figure 9: *Ptp61F* genetically interacts with *rolled*, the *MAPK* (*ERK*) orthologue of *Drosophila*. Note the thickened and aberrant veins (B, arrows), compared with wild-type (A). This phenotype is suppressed by *Ptp61F* over-expression (C), giving a near normal appearance of the wing. In (D) and (E), strong enhancement of the rt^{SEM} thickened vein phenotype is observed, as well as the appearance of ectopic venation in animals expressing interfering RNAi targeting *Ptp61F*. In (F), the *Ptp61F*¹ mutant allele parallels the effects of the RNAi constructs. A. *Canton-S* (wild-type). B. rt^{SEM}/CyO C. $rt^{SEM}/GMR-GAL4$; *UAS-Ptp61F/+*. D. $rt^{SEM}/GMR-GAL4$; *Ptp61F-C2V-IR/+*. E. $rt^{SEM}/GMR-GAL4$; *Ptp61F-i2.5-IR/+* As in (D). F. $rt^{SEM}/+$; *Ptp61F¹/+*.

Figure 10: Enhancement of a novel rl^{SEM} phenotype in the Drosophila eye by reduction in function of *Ptp61F*. Note the increased size of the eye in animals carrying rl^{SEM} and either *Ptp61F¹* or expressing an RNAi directed against *Ptp61F* transcripts (left), compared with their siblings (right). A. Left: rl^{SEM}/GMR -GAL4; *UAS-Ptp61F/+*, right: rl^{SEM}/GMR -GAL4; *TM6/+*. B. Left: rl^{SEM}/GMR -GAL4; *Ptp61F-C2V-*IR/+, right: rl^{SEM}/GMR -GAL4; *TM6/+*. C. Left: rl^{SEM}/GMR -GAL4; *Ptp61F IR-i2.5-*IR/+, right: rl^{SEM}/GMR -GAL4; *TM6/+*.

Figure 11: *pnt* acts epistatically to *Ptp61F*. Inclusion of over-expressing, reduction of function or RNAi alleles of *Ptp61F* in either hypomorphic combinations of *pnt* alleles (A) or with an over-

expressing construct (B, C, D), had no effect on their rough or glassy-eyed phenotypes, respectively. A. Left: $Ptp61F^{l} Pnt^{A88} + Pnt^{l277}$, right: $+ pnt^{A88} + pnt^{l277}$. B. Left: GMR-GAL4/+; UAS- pnt^{P2}/UAS -Ptp61F. Right: GMR-GAL4/+; UAS- $pnt^{P2}/TM6$. C: Left: GMR-GAL4/+; UAS- $pnt^{P2}/Ptp61F$ -C2V-IR. Right: GMR-GAL4/+; UAS- $pnt^{P2}/TM6$. D. Left: GMR-GAL4/+; UAS- $pnt^{P2}/Ptp61F$ -i2.5-IR. Right: GMR-GAL4/+; UAS- $pnt^{P2}/TM6$.

Deficiency/Gene	Cytology	Molecular Breakpoints	Complementation X <i>Ptp61F¹</i>
Ptp61F	61F7-62A2	1,342,493: 1,475,249	+
Df(3L)ED4196/TM2	61C7-62A2	639,583: 1,478,937	Lethal
Df(3L)ED207/TM2	61C9-62A6	738,739: 1,568,108	Lethal
Df(3L)BSC799/TM6c	61E3-61F4	1,074,839: 1,247,708	Viable
Df(3L)BSC311/TM6b	61F3-61F4	1,208,396: 1,277,029	Viable
Df(3L)BSC250/TM6c	61F4-61F6	1,267,401: 1,334,579	Viable
Df(3L)BSC289/TM6c	61F6-62A9	1,332,329: 1,628,101	Lethal
Df(3L)BSC178/TM6b	61F8-62A3	1,368,841 1,534,423	Viable

Table 1: Cytology and sequence informations of deficiencies used to define the mutation lenght. Deficiencies which molecular breakpoints are closest to Ptp61F gene and which success to complement with the generated mutant Ptp61F stock are Df(3L)BSC250/TM6c and Df(3L) BSC178/TM6b and hence allowed to preceise that the only involved gene in the mutation is the protein tyrosine phosphatase Ptp61F.



Tchankouo et al. Figure 1























ETUDE 2

La voie de signalisation de l'insuline est la voie principale de régulation de l'homéostasie énergétique de l'organisme. Cette voie est négativement régulée par la protéine tyrosine phosphatase PTP1B. Cette dernière, localisée sur le réticulum endoplasmique, agit en déphosphorylant le récepteur de l'insuline IR et son substrat IRS (Cicirelli, Tonks et al. 1990; Kenner, Anyanwu et al. 1996; Haj, Zabolotny et al. 2005; Tiganis and Bennett 2007).

Les fonctions de PTP1B, le mécanisme par lequel cette phosphatase est régulée restent très peu ou pas connus de nos jours. Les seules études qui ont abordé cette question sont contradictoires. (Moeslein, Myers et al. 1999) montrent à partir des cellules HEK 293 que la phosphorylation de PTP1B sur son résidu de Ser50 par CLK1 ou CLK2, l'active. L'étude de (Ravichandran 2001) montre à partir des cellules COS-7 que la phosphorylation de PTP1B sur le même de résidu Ser50 par AKT réprime son activité. Ces résultats conduisent à se poser la question de savoir pourquoi le même résidu de sérine phosphorylé conduit à des activités opposées de PTP1B? Aussi, il a été montré que AKT2 phosphoryle et active CLK1 en réponse à l'insuline dans les cellules L6 de myoblastes de rat (Jiang, Patel et al. 2009). CLK1 et CLK2 faisant partie de la famille des kinases LAMMER, ces études ont conduit à émettre l'idée d'un rôle possible de ces kinases dans la régulation de la voie de signalisation de l'insuline à travers PTP1B.

L'objectif de ce travail a été de : 1) Etudier l'expression de la kinase LAMMER CLK2 en réponse à

l'insuline dans les cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y. 2) Etudier l'interaction entre

CLK2, AKT et PTP1B. 3) Analyser l'effet de la surexpression de CLK2 sur la phosphorylation de

AKT. 4) Etudier la phosphorylation de PTP1B par CLK2 ou AKT et se focaliser sur le site de phosphorylation si elle a lieu. 5) Etudier l'effet de cette phosphorylation sur l'activité de PTP1B.

The regulation of insulin pathway signaling by the LAMMER kinase CLK2 through the

protein tyrosine phosphatase PTP1B.

Stéphane Nguetcheu-Tchankouo, Leonard Rabinow and Mohammed Taouis #

Université Paris Sud, UMR 8195, Bâtiment 447

91400 Orsay, France

#Corresponding author: Mohammed Taouis Université Paris Sud, UMR 8195, Bâtiment 447 91400 Orsay France Mohammed.taouis@u-psud.fr (+33) 169-15-70-08

ABSTRACT

PTP1B is a key regulator of insulin signaling through the dephosphorylation of insulin receptor and its substrates IRS1/2, promoting then insulin resistance. However, little is known concerning the regulation of PTP1B. CLK2, a LAMMER kinase involved in RS phosphorylation, has been previously described to activate PTP1B by phosphorylation of Ser50. However, the effect of this phosphorylation remained controversial since another study reported the inhibition of PTP1B by AKT through the Ser50 phosphorylation. Here, we show that CLK2 expression was increased following chronic insulin treatment of human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. In addition, we show that the over-expression of CLK2 led to the impairment of insulin-dependent AKT phosphorylation. In addition, we showed the insulin-dependent co-immunoprecipitation of PTP1B and CLK2. Using in vitro phosphorylation assay, we show that CLK2 phosphorylates PTP1B on Ser50 leading to a significant inhibition of its phosphatase activity. Furthermore, AKT coimmunoprecipitates with PTP1B without altering its activity and this interaction was not dependent Taken together, our findings suggest a complex interaction between insulin. upon PTP1B/CLK2/AKT at the cellular level that differs from the interaction in vitro system. This study clearly demonstrates the interaction between CLK2 and PTP1B, and the negative impact of CLK2 in vivo on insulin responsiveness.

INTRODUCTION

Insulin is a key hormone regulation of energy homeostasis through its action at both peripheral and central levels. In mammals, a key function of insulin is to lower blood glucose levels after a meal. Insulin serves to promote glucose uptake in muscle and fat and suppress hepatic glucose production (White and MF. 1998; Saltiel and Kahn 2001). At the central level, insulin has an anorexigenic effect through its action in the hypothalamic arcuate nucleus contributing then to the control of food intake;

Insulin exerts its effects through the insulin receptor (IR), a RTK (receptor tyrosine kinase) that undergoes autophosphorylation and activates tyrosine phosphorylation of key substrates, including IRS proteins 1-4 (insulin receptor substrates) (White and MF. 1998; Saltiel and Kahn 2001). Tyrosine phosphorylation of IRSs to the activation of PI3K (phosphatidylinositol 3kinase)/Akt signaling pathway that elicits many of insulin's metabolic and mitogenic effects (White and MF. 1998; Saltiel and Kahn 2001; Lizcano and Alessi 2002). The insulin receptor signaling, such as other tyrosine kinase receptors, is tributary to the balance between tyrosine phosphorylation (under the control of IR) and tyrosine dephosphorylation (under the control of tyrosine phosphatases). The kinases have been implicated in controlling the amplitude of a signaling response, whereas phosphatases are thought to have an important role in controlling the rate and duration of the response (Hornberg, Binder et al. 2005). The prototypic family member PTP1B is a negative regulator of most RTK signaling including IR (Cicirelli, Tonks et al. 1990; Kenner, Anyanwu et al. 1996; Haj, Zabolotny et al. 2005; Tiganis and Bennett 2007), EGFR (Epithelial growth factor receptor) (Flint, Tiganis et al. 1997; Haj, Verveer et al. 2002; Haj, Markova et al. 2003) CSF-1 (colony-stimulating factor 1) receptor (Heinonen, Dubé et al. 2006), PDGFR (Platelet derived growth factor receptor) (Lammers, Bossenmaier et al. 1993; Haj, Markova et al. 2003), IGFR-1 (Kenner, Anyanwu et al. 1996; Buckley, Loughran et al. 2002). In particular, PTP1B dephosphorylates the IR tandem Tyr1162/Tyr1163 PTK activation loop tyrosine phosphorylation

site that is necessary for IR activation and signaling (Salmeen, Andersen et al. 2000; Galic, Hauser et al. 2005; Haj, Zabolotny et al. 2005). Moreover, previous studies have shown that PTP1B-null (Ptpn1-/-) mice exhibit enhanced insulin sensitivity associated with increased IR activation in liver and muscle (Elchebly, Payette et al. 1999; Klaman, Boss et al. 2000; Haj, Zabolotny et al. 2005), whereas transgenic overexpression of PTP1B in muscle promotes insulin resistance (Zabolotny, Haj et al. 2004). Furthermore, EGFR is hyperphosphorylated in *Ptpn1-/-* mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and downstream signaling components are affected, pAKT and pERK2 (Haj, Markova et al. 2003). Thus, PTP1B has been considered as a therapeutic target for the alleviation of insulin resistance in Type 2 diabetes (Goldstein, Bittner-Kowalczyk et al. 2000; Zhang 2007) and cancer (Lessard, Stuible et al. 2010).

The Cdc2-like kinases (Clk), also termed LAMMER kinases, are an evolutionary conserved family of dual-specificity CMGC kinases found in most, if not all, eukaryotes. They are known to autophosphorylate (Nayler, Schnorrer et al. 1998) and phosphorylate Ser/Thr residues of their substrates (Nikolakaki, Du et al. 2002). They are putative high-level regulators of alternative splicing through phosphorylation of SR domains on splicing factors (Hanes, von der Kammer et al. 1994; Duncan, Howell et al. 1995; Colwill, Feng et al. 1996; Lee, Du et al. 1996; Prasad, Colwill et al. 1999; Hillman, Green et al. 2004). These kinases are also described to be involved in stress conditions as they negatively regulate SOD1 (superoxide dismutase 1) in human and *Drosophila* cell lines (Park, Kang et al. 2003; James, Staatz et al. 2009).

Although LAMMER kinases are well described, there is an extremely limited understanding of Clk targets, function, and regulation in a biological context. Also, thought that the mechanism of action of PTP1B is well known, the mechanisms involved in its regulation are not clearly established. The two single studies attempting to propose a mechanism of PTP1B regulation published opposite results. Indeed, PTP1B activity is enhanced when phosphorylated by CLK1 or CLK2 (two human LAMMER kinase isoforms) on its S50 residue in HEK-293 cells (Moeslein, Myers et al. 1999) Later, the study conducted by (Ravichandran 2001) shows in COS-7 cells that

PTP1B activity is repressed when phosphorylated by AKT (a key component of insulin signaling) on its S50 residue. Moreover, it has recently been shown that CLK1 is phosphorylated by AKT2 upon insulin treatment in L6 rat skeletal myoblasts (Jiang, Patel et al. 2009). Despite the discrepancy between, the two first studies, the three studies show a possible role of LAMMER kinases in insulin signaling which could have as intermediate PTP1B and SR proteins (Jiang, Patel et al. 2009) as also described by (Rodgers, Haas et al. 2010) showing that CLK2 suppresses neoglucogenesis through phosphorylation of the PGC-1 α SR protein. It has been also shown that CLK2 impairs AKT phosphorylation through phosphorylation of the sérine phosphatase PP2A (Rodgers, Vogel et al. 2011) pointing out CLK2 as an insulin resistance mediator. It should be therefore important to decipher the clear mechanism through which CLK2 affects insulin signaling and how PTP1B could be regulated by AKT and CLK2.

In the present study we show that the LAMMER kinase CLK2 impairs AKT phosphorylation upon insulin treatment of human neuroblastoma cell line cells. We demonstrate that CLK2 and AKT interact with PTP1B and CLK2 but not AKT phosphorylates PTP1B at S50 residue *in vitro*. This phosphorylation dramatically represses PTP1B activity *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Materials and chemicals: The human neuroblastoma cell line SH-SY5Y was obtained from Dr. B. Dufy (Unit Mixte de Recherche 5543, Centre National de la Recherche Scientifique, Bordeaux-II University, Bordeaux, France). All cell culture reagents were purchased from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Lipofectamine 2000 (11668-019) was from Invitrogen (Carlsbad, CA). Antibodies directed toward AKT, phospho-AKT, were from Cell Signaling (Ozyme, Saint Quentin-en-Yvelines, France). Antibodies against PTP-1B (sc-14021) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Antibodies directed toward CLK2 (SAB 1401077) were from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Protein A-Agaorse (P7786) from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). AKT1 kinase (SRP5001) was from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). CLK2 cDNA construct for kinase assay was generated in our laboratory by PCR cloning from pBS vector carrying catalytic domain of human CLK2 and cloned in pMAL-C2 vector in BamHI sites. Insulin, all trans-retinoic acid, and other chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Nitrocellulose membranes were from Euromedex (Mundolsheim, France), enhanced chemiluminescence (ECL) detection reagents were from Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK). Phosphatase assay kit (17-125) was from Millipore (Billerica, MA). [γ -32P]-ATP was from Perkin Elmer (Courtaboeuf, France). Ni-NTA agarose matrix (1018244) was from Qiagen (Hilden, Germany). Amylose resin (E8021S) was from New England Biolabs (Evry, France). cDNA encoding human truncated PTP1B constructs (PTP1B WT, PTP1BD181A, PTP1BC215S) were a generous gift from Dr. T. C. Meng (University of Taiwan) and were fused with 6X-His tag. Recombinant proteins WT-PTP1B, PTP1BD181A, PTP1BC215S were produced in Bl21 Escherichia coli strain from Invitrogen (Carlsbad, CA). Full-length cDNA PTP1BS50A was a generous gift from Pr. Reiner Lammers (University Tubingen) and was fused with 6X-His tag. CLK2 cDNA construct using for transient transfection was a generous gift from xxx (University of). Recombinant protein was produced using amylase matrix from New England Biolabs.

Cell culture: SH-SY5Y human neuroblastoma cells were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum, 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin in 5% CO2 atmosphere at 37 °C; differentiation of SH-SY5Y cells was achieved by treatment with retinoic acid (RA) (López-Carballo, Moreno et al. 2002). Differentiated cells were used after 15 days of RA treatment to obtain a high percentage of cells that showed a clear morphological differentiation.

Cell stimulation and immunoblotting: SH-SY5Y cells were seeded in six-well dishes and differentiated for 15 d with retinoic acid as previously described (Benomar, Roy et al. 2005). Serum-starved cells were incubated in serum-free DMEM in absence of insulin overnight. Cells were then rinsed and stimulated for 15 min, 2, 4, 16 h with insulin (100 nM). After hormonal treatment, protein lysates were prepared and immunoblotting was performed. Briefly, proteins from whole-cell lysates (50–100 μ g) were resolved by SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose. Membranes were then incubated with the appropriate primary and secondary antibodies, and targeted proteins were visualized by enhanced chemiluminescence reagents (ECL detection kit) followed by autoradiography or by Carestream In-Vivo FPRO, Molecular imaging.

Co-immunoprecipitation: SH-SY5Y cells were seeded in P100 dishes and differentiated for 15 d with retinoic acid as previously described (Benomar, Roy et al. 2005). Serum-starved cells were incubated in serum-free DMEM in absence of insulin overnight. Cells were then rinsed and stimulated for 15 min, 2, or 4 h with insulin (100 nM). After hormonal treatment, protein lysates were prepared and immunoprecipitation was performed. Briefly, proteins from whole-cell lysates (500 µg) were used. Primary antibody anti-hCLK2 (2µg) was incubated with whole-cell extracts at 4°C overnight on a wheel. 40µl of protein A-Agarose where added and a new incubation for 1 h at 4°C to capture the immune complex. Proteins were then centrifugated at 13,000 spin for 3 min, the pellet resuspend in 500µL 1X PBS and re-centrifugated. We performed this step three times. Controls were realized and containing either protein sample without primary antibody or just the primary antibody without protein sample. Proteins were resolved by SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose. Membranes were then incubated with the appropriate anti-PTP1B as primary antibody and a secondary antibody from Santa Cruz (Santa Cruz, CA) with the particularity to only bind the junction between light and heavy chains of antibodies avoiding binding IgG heavy chains from anti-hCLK2. The targeted proteins were visualized by enhanced chemiluminescence reagents (ECL detection kit) followed by Carestream In-Vivo FPRO, Molecular imaging.

Quantification of CLK2 expression by quantitative RT-PCR: Total RNA from

differentiated SH-SY5Y cells was extracted using RNA Insta Pure kit (Eurogentec, Angers, France) according to the manufacturer's recommendations. One microgram of total denatured RNA was reverse transcribed, and the resulting cDNAs were submitted to quantitative PCR analysis as previously described (Benomar et al. 2006). The PCR primer sequences used were as follows: CLK2 forward, 5'-AGTCGCTCCTGGTCAAGTAGT-3', CLK2 reverse, 5'-GTCTGTGTCATAGTAGGCATC-3'; β-actin forward, 5'-ATCGTGCGTGACATTAAGGAGAA-3', β-actin reverse, 5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3'.

Real-time PCR was carried out using the Applied LightCycler apparatus and the Fast Start DNA Master SYBER Green I kit (Applied, Mannheim, Germany). PCR amplification was performed in triplicate using the following conditions: initial activation of the hot start DNA polymerase for 15 min at 94 C followed by denaturation for 10 sec at 94 C, annealing for 10 sec at 60°C for CLK2, and extension for 10 sec at 72 C. Forty cycles of PCR were programmed to ensure that the threshold crossing point (cycle number) was attained. Fluorescence emission was monitored continuously during cycling. At the completion of cycling, melting curve analysis was carried out to establish the specificity of the amplified product. The expression level of mRNA and his estimated crossing point in each sample were determined relative to the standard preparation using the LightCycler computer software (Applied). A ratio of specific mRNA to β-actin amplification was then calculated to correct for any difference in efficiency at reverse transcription.

Transient transfection: SH-SY5Y cells were seeded in 6-well plates and differentiated as previously described (Benomar, Roy et al. 2005). Seventy percent confluent cells were then transfected using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's recommendations. Each well received 10 μ l of Lipofectamine 2000 and 4 μ g of plasmid DNA in 2,5ml of serum-free optiMEM medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Cells were either not transfected or transfected with an expression vector encoding wild-type CLK2. After 6 h, cell medium was supplemented with 10% fetal calf serum. Twenty-four hours after transfection, SH-SY5Y cells were serum deprived for 16 h before stimulation with insulin (100 nm for 15 min. Cells were then harvested and protein lysates were prepared for immunoblotting.

Bacterial Expression: Proteins were expressed in the BL21 E. coli strain. The cDNAs for the catalytic domains of CLK2 were subcloned into the pMAL-C2 vector at the BamHI sites. Fulllength S50A-PTP1B, PTP1BC215S and PTP1BD181A were subcloned into pET-28a. WT-PTP1B was subcloned into pET-19b. Cultures were grown at 37°C for 4 h, isopropyl-1-thio- β -dgalactopyranoside (0.3 mM final concentration) was added, and the cultures were further incubated at 25°C for 3 h. Following lysis in Lysis Buffer (50 mM TrisHCl, pH 7.4, 0.3M NaCl for 6X-Histagged proteins and 20mM TrisHCl PH 7.4, 200mM NaCl 1mM EDTA for MBP-tagged protein), the Nickel and MBP fusion proteins were purified by incubation with Nickel beads and amylase resin respectively. The Ni- MBP-tagged proteins were then eluted from the beads in Elution Buffer (Lysis buffer + 250mM Imidazole and Lysis buffer + 10mM maltose respectively), and stored at -20°C in 50% glycerol.

In Vitro AKT Kinase Assays: In vitro assays using purified activated AKT1 (0.3 μ g) as the kinase and PTP1B (2.5 μ g) as substrate were carried out at 30°C for 30 min in kinase assay buffer (diluted 5-fold with 5% glycerol) containing 25 mM MOPS, pH 7.2, 12.5 mM glycerol 2-phosphate, 25 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 2 mM EDTA, and dithiothreitol prior to use to a final concentration of 0.25 mM, 250 μ M of [γ -32P]-ATP cocktail assay (5.75 ml of kinase assay buffer, 10 μ M ATP, 100 μ L [γ -32P]-ATP (1mCi/100 μ L))/assay. Reactions were stopped by adding 1X

Laemmli sample buffer and boiling for 10 min. Samples were subjected to 10% SDS-PAGE and a PhosphorImager (Molecular Dyamics, Inc, Sunnyvale, CA) was used to detect phosphorylated PTP1B and autophosphorylated AKT.

In vitro CLK2 Kinase Assays: Bacterially expressed recombinant CLK2 (1 μ g) protein was incubated with PTP1B as substrates (2.5 μ g) in Kinase Reaction Buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 1 μ M ATP, 10 mM MgCl2, 1 mM dithiothreitol) and was supplemented with 10 μ Ci of [γ -32P]ATP. Reactions were carried out at 25°C for 30 min and were stopped by the addition of 1X Laemmli Sample Buffer and boiling for 10 min. Samples were subjected to 10% SDS-PAGE and a PhosphorImager (Molecular Dyamics, Inc., Sunnyvale, CA) was used to detect phosphorylated PTP1B and autophosphorylated CLK2.

Protein-tyrosine Phosphatase Assays: The activity of PTP-1B was assayed by hydrolysis of p-nitrophenol phosphate (pNPP). The phosphatases were first incubated in presence or absence of CLK2/AKT (1 μ g/0.3 μ g) for kinase reaction and then for a second incubation with 5 μ L of 5 mg/mL BSA and 80 μ L of pNPP Tyr assay buffer delivered by the manufacturer for 30 min at 37°C. A final incubation was done with 60 μ L of pNPP for 30 min at 37°C. The absorbance at 405 nm was measured. The reactions were run in triplicates.

Statistical analysis: Statistical analysis was performed using student *t*-test (Statview software program, version 5) to detect significant inter-group differences. The results are expressed as the means±S.E.M and P<0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

CLK2 expression is induced upon insulin treatment at mRNA and protein levels: To investigate the possible interaction of CLK2 with the insulin signaling pathways, we studied the impact of insulin on CLK2 expression at the mRNA level using the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Serum starved differentiated SH-SY5Y cells were stimulated with 100nM insulin at various times (2h, 4h) and mRNAs were prepared for qRT-PCR analyses. Following 4 hours incubation, insulin significantly increased CLK2 mRNA expression level as compared to controls (Figure 1).

The CLK2 LAMMER kinase and AKT interact with the protein tyrosine phosphatase PTP1B: Because CLK2 is induced following insulin treatment, we attempted to determine the physiological relevance of this interaction. Based on previous studies that PTP1B could be a substrate for CLK2 (Moeslein, Myers et al. 1999) and AKT (Ravichandran 2001), we studied the potential interaction between CLK2 and PTP1B and also between PTP-1B and AKT using a coimmuniprecipation approach. Serum starved differentiated SH-SY5Y cells were incubated in the presence or absence of 100nM insulin at different times (0min, 15min, 4h) and proteins were extracted to perform co-immunoprecipitations. Figure 2A clearly show an insulin and timedependent interaction between PTP-1B and CLK2 that is sustained over 4 hours of incubation. However, the interaction between PTP-1B and AKT seems insulin and time independent (Figure 2B).

Overexpression of CLK2 in SHSY5Y cells impairs AKT phosphorylation: To investigate in vivo, the potential impact of CLK2 on insulin signaling, we studied the effect of an overexpression of CLK2 on the insulin-dependent phosphorylation of AKT. Thus, we transiently over-expressed CLK2 in SH-SY5Y cells and then incubated them in the presence or absence of insulin. Westerns blots were performed to determine AKT phosphorylation levels. Insulin significantly induced AKT phosphorylation in control cells, whereas in CLK2 overexpressing cells, the insulin effect was significantly attenuated (Figure 3).

CLK2 phosphorykates PTP1B on Ser50: Since, we have showed *in vivo* that CLK2 altered insulin signaling and that CLK2 strongly interacts with PTP-1B, we hypothesized that the effect of CLK2 on AKT is most likely mediated through the activation of PTP1B most likely through a phosphorylation process. We therefore measured *in vitro* phosphorylation of PTP1B by purified CLK2. The *in vitro* phosphorylation assay was performed with PTP1B WT, PTP1BS50A (the putative CLK2 phosphorylation site on PTP1B), the substrate trapping mutant PTPTD181A and the catalytic dead mutant PTP1BC215S. We used [γ 32P-ATP] as phosphate group donor. The results clearly show that CLK2 phosphorylates PTP1B and the phosphorylated residue is S50 (Figure 4) as observed previously (Moeslein, Myers et al. 1999). MBP was used as positive control (data not shown).

Phosphorylation of PTP1B at S50 by CLK2 impairs the activity of PTP1B *in vitro*: To determine whether the CLK2-dependent PTP1B S50 phosphorylation activates or inhibits its tyrosine phosphatase activity we measured PTP1B activity in the presence or absence of CLK2. We performed *in vitro* phosphatase assays with PTP1BWT and PTP1BS50A in the presence or absence of CLK2. The activity of PTP1B is measured by its ability to dephosphorylate the para-nitro phenylphosphate, pNPP and measured at OD 405nm. CLK2 phosphorylation of PTP1B on S50 markedly impairs its ability to dephosphorylate pNPP, inhibiting PTP1B by more than 30 fold compared to the control (without CLK2) (Figure 5). Moreover the activity of PTP1BS50A mutant is no change in the presence or absence of CLK2, strengthening that the CLK2 phosphorylation site is S50.

AKT does not phosphorylate PTP1B and has no effect on PTP1B activity *in vitro*: To further understand the relationship between PTP1B, CLK2, and AKT, we investigated whether AKT regulates PTP1B through phosphorylation process. We performed the same experiment as with CLK2 for phosphorylation followed by phosphatase assays. In contrast to the report published by (Ravichandran 2001), we did not observe any phosphorylation of PTP1B by AKT although we observed that AKT autophosphorylated and phosphorylated MBP (myelin basic protein) used as a
positive control for kinase activity (Figure 6). Despite this result, we realized an in vitro phosphatase assay with or without AKT in presence of PTP1BWT and PTP1BS50A. The activity of PTP1B is also measured by its ability to dephosphorylate the para-nitro phenylphosphate, pNPP and measured at OD 405nm. As expected, we noted no difference between PTP1B activity in the presence of AKT (Figure 7).

DISCUSSION

Besides their well known and described function in splicing through phosphorylation of sérine residues in RS domain of SR proteins, CLK1 and CLK2 remain the most studied LAMMER kinases for their role in insulin signaling. We attempt to decipher their functions in the regulation of insulin-responsiveness in human neuroblstoma cell line.

We show that CLK2 mRNA expression levels were significantly increased following 4 hours of incubation in the presence of insulin. In addition, we have also noticed that CLK2 expression was also increased in serum starved cells in time-dependent manner. The increase of CLK2 expression could be attributed to the well-described role of LAMMER kinases in cellular stress as previously shown (Park, Kang et al. 2003; James, Staatz et al. 2009). It has been also shown an over-expression of CLK2 in mice liver following refeeding with a positive correlation to plasma insulin levels (Rodgers, Haas et al. 2010). The role of CLK2 in stress and glucose metabolism could have PGC-1 α as intermediate. In fact in the study of Rodgers et al., they show that CLK2 induces neoglucogenesis through phosphorylation of PGC-1 α (Rodgers, Haas et al. 2010). It has been shown that PGC-1 α regulates expression of SOD1, SOD2 and glutathione peroxidase (St-Pierre, Drori et al. 2006).

To further investigate the role of CLK2 in insulin responsiveness and /or involvement of CLK2 in insulin signaling, we performed co-immunoprecipation studies between CLK2 and PTP1B. In fact,

CLK2 was overexpressed following 4 hours insulin incubation which is concomitant with the onset of insulin-resistance as previously described in this cellular model (Benomar, Roy et al. 2005; Benomar, Berthou et al. 2009). In addition, insulin resistance state is characterized by the upregulation of PTP1B. Based on these observations and those described in the literature revealing a potential interaction between CLK2 and PTP1B, we have performed co-immunoprecipitation where we clearly confirm this interaction *in vivo*. Interestingly, the up-regulation of CLK-2 following insulin chronic treatment is most likely involved in the impairment of insulin responsiveness in the human neuroblastoma cell line, as mirrored by the striking inhibition of insulin-dependent AKT phosphorylation following CLK2 overexpression. This is in good agreement with previous studies that have reported the CLK2 inhibition of AKT phosphorylation in mouse primary hepatocytes (Rodgers, Vogel et al. 2011). In addition, authors have shown that the dephosphorylation of AKT resulted from the activation of PP2A, a sérine/threonine phosphatase. Furthermore, the full activation loop of the enzyme (Craxton, Jiang et al. 1999; Li, Davis et al. 1999; Chen, Kim et al. 2001).

Furthermore, using *in vitro* phosphorylation assay we show that CLK2 is able to phosphorylate PTP1B on Ser50 as previously reported by Moeslein et al. However, this phosphorylation is associated with a significant inhibition of PTP1B which contrasts with the activation described by Moeslein et al. (Moeslein, Myers et al. 1999). This discrepancy could be attributed to the methods used; we analysed *in vitro* phosphorylation of PTP1B whereas Moeslein et al. have used the HEK 293 cell model. In addition, AKT was unable to phosphorylate PTP1B *in vitro*. However, in COS-7 cells, it has been reported that AKT was able to phosphorylate PTP1B on Ser50 repressing then its activity (Ravichandran 2001).

These results demonstrate that the LAMMER kinase CLK2 plays a key role in insulin signaling and regulates PTP1B activity by phosphorylation on Ser50. This phosphorylation leads to the inactivation of PTP1B in vitro and basically promotes insulin signaling. However, when CLK2

was over-expressed, we noted inhibition of insulin signaling suggesting that at the cellular level, other factors are most likely involved in the regulation of PTP-1B activity.

REFERENCES

- Benomar, Y., F. Berthou, et al. (2009). "Leptin but not ciliary neurotrophic factor (CNTF) induces phosphotyrosine phosphatase-1B expression in human neuronal cells (SH-SY5Y): putative explanation of CNTF efficacy in leptin-resistant state." <u>Endocrinology.</u> **150**(3): 1182-1191.
- Benomar, Y., A. F. Roy, et al. (2005). "Cross down-regulation of leptin and insulin receptor expression and signalling in a human neuronal cell line." <u>Biochem J</u> **388**(Pt 3): 929-939.
- Buckley, D. A., G. Loughran, et al. (2002). "Identification of an IGF-1R kinase regulatory phosphatase using the fission yeast Schizosaccharomyces pombe and a GFP tagged IGF-1R in mammalian cells." <u>Mol Pathol.</u> **55**(1): 46-54.
- Chen, R., O. Kim, et al. (2001). "Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation." J Biol Chem **276**(34): 31858-31862.
- Cicirelli, M. F., N. K. Tonks, et al. (1990). "Microinjection of a protein-tyrosine-phosphatase inhibits insulin action in Xenopus oocytes." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **87**(14): 5514-5518.
- Colwill, K., L. L. Feng, et al. (1996). "SRPK1 and Clk/STY protein kinases show distinct substrate specificities for Sérine/Arginine-rich splicing factors." J. Biol.Chem. **271**: 24569-24575.
- Craxton, A., A. Jiang, et al. (1999). "Syk and Bruton's tyrosine kinase are required for B cell antigen receptor-mediated activation of the kinase Akt." J Biol Chem **274**(43): 30644-30650.
- Duncan, P. I., B. W. Howell, et al. (1995). "Alternative splicing of STY, a nuclear dual specificity kinase." J. Biol. Chem. 270(37): 21524-21531.
- Elchebly, M., P. Payette, et al. (1999). "Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene." <u>Science</u>. **283**(5407): 1544-1548.
- Flint, A. J., T. Tiganis, et al. (1997). "Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 94(5): 1680-1685.
- Galic, S., C. Hauser, et al. (2005). "Coordinated regulation of insulin signaling by the protein tyrosine phosphatases PTP1B and TCPTP." <u>Mol Cell Biol</u> **25**(2): 819-829.
- Goldstein, B. J., A. Bittner-Kowalczyk, et al. (2000). "Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein." <u>J Biol Chem</u> 275(6): 4283-4289.
- Haj, F. G., B. Markova, et al. (2003). "Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B." J Biol Chem **278**(2): 739-744.

- Haj, F. G., P. J. Verveer, et al. (2002). "Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum." <u>Science</u> **295**(5560): 1708-1711.
- Haj, F. G., J. M. Zabolotny, et al. (2005). "Liver-specific protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) re-expression alters glucose homeostasis of PTP1B-/-mice." J Biol Chem 280(15): 15038-15046.
- Hanes, J., H. von der Kammer, et al. (1994). "Characterization by cDNA cloning of two new human protein kinases." J. Mol. Biol. **244**: 665-672.
- Heinonen, K. M., N. Dubé, et al. (2006). "Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates macrophage development through CSF-1 signaling." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 103(8): 2776-2781.
- Hillman, R. T., R. E. Green, et al. (2004). "An unappreciated role for RNA surveillance." <u>Genome</u> <u>Biol</u> **5**(2): R8.
- Hornberg, J. J., B. Binder, et al. (2005). "Control of MAPK signalling: from complexity to what really matters." <u>Oncogene</u> **24**(36): 5533-5542.
- James, B. P., W. D. Staatz, et al. (2009). "Superoxide dismutase is regulated by LAMMER kinase in Drosophila and human cells." <u>Free Radic Biol Med.</u> **46**(6): 821-827.
- Jiang, K., N. A. Patel, et al. (2009). "Akt2 regulation of Cdc2-like kinases (Clk/Sty), sérine/argininerich (SR) protein phosphorylation, and insulin-induced alternative splicing of PKCbetall messenger ribonucleic acid." <u>Endocrinology</u> **150**(5): 2087-2097.
- Kenner, K. A., E. Anyanwu, et al. (1996). "Protein-tyrosine phosphatase 1B is a negative regulator of insulin- and insulin-like growth factor-I-stimulated signaling." <u>J Biol Chem</u> 271(33): 19810-19816.
- Klaman, L. D., O. Boss, et al. (2000). "Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice." <u>Mol</u> <u>Cell Biol.</u> 20(15): 5479-5489.
- Lammers, R., B. Bossenmaier, et al. (1993). "Differential activities of protein tyrosine phosphatases in intact cells." <u>J Biol Chem</u> **268**(30): 22456-22462.
- Lee, K., C. Du, et al. (1996). "Activity and autophosphorylation of LAMMER protein kinases." J. Biol. Chem. 271(44): 27299-27303.
- Lessard, L., M. Stuible, et al. (2010). "The two faces of PTP1B in cancer." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1804**(3): 613-619.

Li, H. L., W. W. Davis, et al. (1999). "The tyrosine kinases Syk and Lyn exert opposing effects on the activation of protein kinase Akt/PKB in B lymphocytes." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **96**(12): 6890-6895.

Lizcano, J. M. and D. R. Alessi (2002). "The insulin signalling pathway." Curr Biol 12(7): R236-238.

- López-Carballo, G., L. Moreno, et al. (2002). "Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells." J Biol Chem **277**(28): 25297-25304.
- Moeslein, F. M., M. P. Myers, et al. (1999). "The CLK family kinases, CLK1 and CLK2, phosphorylate and activate the tyrosine phosphatase." J. Biol. Chem. **274**(38): 26697–26704.
- Nayler, O., F. Schnorrer, et al. (1998). "The cellular localization of the murine Sérine/Arginine-rich protein kinase CLK2 is regulated by Sérine 141 autophosphorylation." <u>J. Biol. Chem.</u> **273**: 34341-34348.
- Nikolakaki, E., C. Du, et al. (2002). "Phosphorylation by LAMMER protein kinases: determination of a consensus site, identification of in vitro substrates and implications for substrate preferences." <u>Biochemistry</u> **41**: 2055-2066.
- Park, Y. D., W. H. Kang, et al. (2003). "LAMMER kinase homolog, Lkh1, is involved in oxidativestress response of fission yeast." <u>Biochem Biophys Res Commun.</u> **311**(4): 1078-1083.
- Prasad, J., K. Colwill, et al. (1999). "The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing." <u>Mol Cell Biol</u> **19**(10): 6991-7000.
- Ravichandran (2001). "Phosphorylation of ptp1b at ser(50) by akt impairs its ability to dephosphorylate the insulin receptor." <u>Mol Endocrinol</u> **15**: 1768–1780.
- Rodgers, J. T., W. Haas, et al. (2010). "Cdc2-like kinase 2 is an insulin-regulated suppressor of hepatic gluconeogenesis." <u>Cell Metab</u> **11**(1): 23-24.
- Rodgers, J. T., R. O. Vogel, et al. (2011). "Clk2 and B56beta mediate insulin-regulated assembly of the PP2A phosphatase holoenzyme complex on Akt." <u>mol Cell</u> **41**(4): 471-479.
- Salmeen, A., J. N. Andersen, et al. (2000). "Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B." <u>Molecular Cell</u> 6(6): 1401-1412.
- Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." <u>Nature</u> **414**(6865): 799-806.
- St-Pierre, J., S. Drori, et al. (2006). "Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators." <u>Cell</u> **127**(2): 397-408.

- Tiganis, T. and A. M. Bennett (2007). "Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective." <u>Biochem J</u> **402**(1): 1-15.
- White and MF. (1998). "The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action." <u>Mol Cell Biochem</u> **182**(1-2): 3-11.
- Zabolotny, J. M., F. G. Haj, et al. (2004). "Transgenic overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle causes insulin resistance, but overexpression with leukocyte antigen-related phosphatase does not additively impair insulin action." <u>J Biol Chem</u>
 279(23): 24844-24851.
- Zhang, S. a. Z., Z. Y. (2007). "PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery." <u>Drug Discov Today.</u> **12**(9-10): 373-381.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: CLK2 expression is induced at mRNA level following insulin treatment. Differentiated SH-SY5Y cells were treated with insulin (100nM) during 2, 4h. mRNA were extracted for qRTPCR analysis. The results are expressed as the ratio of mean intensity of mean Ct of CLK2/Beta-actin and presented as means \pm SEM (n = 3). * indicates p<0.005.

Figure 2: CLK2 and AKT interact with PTP1B. Differentiated SH-SY5Y cells were treated with insulin (100nM) during 0 min, 15 min, and 4 h. (A) protein samples were immunoprecipitated (IP) with anti-CLK2. The precipitates were then immunoblotted (IB) with anti-PTP1B. (B) Protein samples were immunoprecipitated with anti-PTP1B. The precipitates were then immunoblotted with anti-AKT. Experiments were performed 4 times. Blots were revealed by ECL® and bands quantified by BIO1D software (Molecular Imaging, Vilber Lourma, France). PTP1B immunoblot shows two different bands as indicate by the manufacturer and probably represents the two isoforms of the phosphatase. Con1 represents control where protein sample is without primary antibody (i.e anti-CLK2 or anti-PTP1B). Con2 represents the control where primary antibody (i.e anti-CLK2 or anti-PTP1B) is incubated without protein sample.

Figure 3: Over-expression of CLK2 impairs AKT phosphorylation. Differentiated SH-SY5Y cells were transfected with an expression vector of human CLK2 under the control of an elongation factor promoter and were treated with insulin (100nM) during 15 min. Proteins were extracted for western blot analysis. The blots are representative of mean results presented in the histogram. The results are expressed as the ratio of mean intensity of p-AKT/t-AKT and presented as means \pm SEM (n = 3). Blots were revealed by Carestream In-Vivo FPRO, Molecular imaging and quantified by Carestream software. ** indicates *p*<0.01.

Figure 4: CLK2 phosphorylates PTP1B and the phosphorylation occurs at Ser50 residue. *In vitro* kinase reactions were performed by incubating of recombinant PTP-1Bs with the truncated active form CLK2 and in the presence of [γ -32P]-ATP. The ³²P-labeled proteins were separated by SDS-PAGE, and visualized by autoradiography using a PhosphoImager system. The position of PTP-1B (indicated with arrow) was determined by CooBlue FX Instant Stain for Proteins in Gel (UPG4562A, Interchim) staining of the gels. Experiments were done in three independent times.

Figure 5: Phosphorylation of PTP1B by CLK2 dramatically impairs its activity. Recombinant PTP1Bs was preincubated in the absence or presence of active CLK2 *in vitro* in kinase reaction buffer. The PTP1Bs or CLK2 were diluted in phosphatase reaction buffer and BSA and reincubated. A final incubation with 60 μ L of pNPP was realized at 37°C for 30 min. Phosphatase activity was assayed by liberation of the pNPP cleavage product quantitated at OD₄₀₅ by spectrophotometry. The results shown are the means ± S.E.M of three independent experiments. # indicates p<0.001.

Figure 6: AKT does not phosphorylate PTP1B *in vitro*. *In vitro* kinase reactions were performed by incubating recombinant PTP1Bs with active AKT and in the presence of $[\gamma-32P]$ -ATP. The ³²P-labeled proteins were separated by SDS-PAGE, and visualized by autoradiography using a PhosphoImager system. The positions of MBP and AKT (indicated with arrow) were determined by CooBlue FX Instant Stain for Proteins in Gel (UPG4562A, Interchim) staining of the gels. Experiments were done in three independent times.

Figure 7: PTP1B activity is unchanged in presence of AKT *in vitro*. Recombinant PTP1Bs was preincubated in the absence or presence of active AKT *in vitro* in kinase reaction buffer. The PTP1Bs or AKT were diluted in phosphatase reaction buffer and BSA and re-incubated. A final incubation with 60 μ L of pNPP was realized at 37°C for 30 min. Phosphatase activity was assayed by liberation of the pNPP cleavage product quantitated at OD₄₀₅ by spectrophotometry. The results shown are the means ± S.E.M of three independent experiments.



Figure 1 Tchankouo et al.



Figure 2A and 2B Tchankouo et al.



Figure 3 Tchankouo et al.



←PTP1B

CLK2 alone

Figure 4 Tchankouo et al.



Figure 5 Tchankouo et al.



AKT + PTP1BD181A AKT + CLK2 AKT alone AKT + PTP1BWT AKT + PTP1BS50A

Figure 6 Tchankouo et al.



DISCUSSION

La protéine tyrosine phosphatase PTP1B constitue une cible potentielle visant à lutter contre le diabète de type 2, l'obésité et le cancer (Lee and Wang 2007; Zhang and Zhang 2007; Lessard, Stuible et al. 2010). De nombreux inhibiteurs ont été développés dans un but d'essai thérapeutique. A cause de la structure très conservée du site catalytique des protéines tyrosine phosphatase (PTPs), développer des inhibiteurs spécifiques pour PTP1B reste un grand défi (Lee and Wang 2007; Zhang 2007). Le rôle de PTP-1B dans les voies de signalisation impliquées dans les régulations métaboliques, son rôle dans les voies de signalisation contrôlant la prolifération et la mort cellulaire restent peu documentés. Toutefois, les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression et de l'activité de PTP1B restent aussi peu ou pas déterminés. La famille des kinases LAMMER et plus précisément CLK2 a été suggérée comme un potentiel régulateur de PTP1B.

En effet, il a été montré que CLK1 et CLK2 activent PTP1B par phosphorylation sur Ser50 (Moeslein, Myers et al. 1999). Toutefois, une autre étude a montré que la phosphorylation de PTP1B sur Ser50 par Akt aurait un effet inhibiteur sur l'activité de PTP1B (Ravichandran 2001). Plus récemment, un lien a été établi entre AKT2 et CLK1, où cette dernière est phosphorylée d'une manière insulino-dépendante par AKT2 (Jiang, Patel et al. 2009). L'ensemble de ces études montre que les kinases LAMMER joueraient un rôle clé dans la régulation de la voie de l'insuline et leur action pourrait avoir PTP1B comme un intermédiaire.

Dans la première étude, nous avons tenté de décrypter les rôles de PTP1B dans la régulation de la voie de l'insuline, de RAS/MAPK et l'effet des kinases LAMMER sur la fonction de PTP1B en utilisant la drosophile comme modèle pour générer un mutant du gène *Ptp61F*, l'orthologue de drosophile de PTP1B.

Nous avons obtenus un mutant sur 310 potentiels. Cette mutation est létale récessive puisqu'elle ne survit pas en face de la Df(3L)ED207 (61C9-62A6) incluant le gène Ptp61F. En effet, (Ku, Wu et al. 2009) avaient observé chez la drosophile qu'en supprimant Ptp61F par RNAi, la létalité survenait vers le troisième stade larvaire. La carte de déficience montre que la mutation s'étend sur un intervalle qui pourrait être jusqu'à environ 34kb, incluant les gènes Ptp61F, CG2199, et l(3)02640 décrit comme létal récessif. Ptp61F est bien muté mais la létalité observée pourrait être au moins due à la mutation du gène l(3)02640 ou des deux. Cependant, on ne peut pas encore affirmer que Ptp61F soit létal récessif comme suggèrent les données de (Ku, Wu et al. 2009).

Le faible rendement de mutagenèse pourrait s'expliquer par deux faits. 1) la spécificité du gène: le lieu d'expression ou la localisation sur le chromosome. 2) Le critère génotypique pour le choix des potentiels mutants était basé sur la sélection des individus qui ne survivent pas en face de la Df(3L)ED207 (qui inclue Ptp61F) puisque (Ku, Wu et al. 2009) avaient montré qu'en supprimant Ptp61F par RNAi, que les individus étaient létaux. Les 310 potentiels mutants ont été sélectionnés

sur la couleur « blanche » (w^{-}) des yeux due à l'absence (après saut) de l'élément transposable qui portait un marqueur w^{+} . Ces individus avaient été écartés et nous avons retenu que celui qui était létal récessif. Or les résultats de la carte de déficience nous montre que cette létalité est peut être due à la mutation de l(3)02640 et non pas de Ptp61F et par conséquent les individus viables aux yeux blancs auraient pu être analysés. Cette mutation d'un maximum de 34kb peut expliquer pourquoi nous n'avons pas pu avoir par PCR les informations moléculaires exactes de la mutation. La PCR nous informe néanmoins que la partie 3', la région codante de Ptp61F est mutée puisque aucune amplification de fragments d'ADN n'était observée jusqu'à plus de 7kb, c'est-à-dire même au-delà de Ptp61F et jusqu'à dans le gène l(3)02640. Le test de complémentation a également permis de confirmer grâce à la Df(3L)BSC178, incluant toute l'extrémité 5' de Ptp61F, que cette extrémité est intact comme observé par PCR.

La cytologie nous a permis d'écarter l'hypothèse d'un grand réarrangement chromosomique puisque la région 61F est intacte comparée à la région sauvage.

La létalité induite par l'allèle généré survient au stade post embryonnaire du développement. La survie des individus jusqu'à ce stade serait due à la contribution maternelle de la phosphatase PTP61F à l'embryon puisqu'il avait été observé par (Fitzpatrick, Gorski et al. 1995) des signaux mRNA de *Ptp61F* maternel dans le cytoplasme des embryons.

L'interaction fonctionnelle entre *Ptp61F* et la kinase *Abl* servait comme un contrôle puisqu'il avait déjà été montré que la kinase ABL, activée par phosphorylation sur résidu de Tyr482, est un substrat direct de PTP61F (Ku, Wu et al. 2009). L'augmentation de la taille des yeux est due à l'activation constitutive de ABL quand il y a un niveau de PTP61F insuffisant pour inactiver la kinase.

L'interaction génétique observée entre *Ptp61F* et les mutations de *Doa* serait indirecte puisque selon l'étude de (Hilger, Bonaldi et al. 2009), la suppression de *Ptp61F* par RNAi induit la déphosphorylation de DOA sur résidu de sérine. Cependant une question reste ouverte. Est ce que DOA phosphoryle PTP61F? Nous avons observé *in vitro* que DOA phosphoryle PTP1B (données pas montrées). Si DOA phosphoryle PTP1B, ce serait sur un autre site puisqu'il n'y a pas S50 dans PTP61F.

Nous montrons pour la première fois que *Ptp61F* de la drosophile est impliquée dans la voie de signalisation de l'insuline comme PTP1B chez les mammifères, notamment par son interaction avec le récepteur de l'insuline de drosophile. Cependant l'interaction avec *Akt* et *Pi3K* était moins attendue puisqu'il n'est à notre connaissance pas connue que PTP1B/PTP61F interagissent avec ces deux composantes clé de la voie de l'insuline. PI3K/AKT sont fortement impliqués dans le

développement, la croissance et la différenciation à travers le facteur de transcription FOXO qui est une cible de AKT (Brunet, Bonni et al. 1999; Alvarez, Martínez et al. 2001; Casas-Tinto, Marr et al. 2007; Lavery, Hall et al. 2007). Bien qu'on pourrait penser que cette interaction soit indirecte, des études décrivent que la sous unité catalytique P110 de la PI3K (Craxton, Jiang et al. 1999) et AKT (Craxton, Jiang et al. 1999; Li, Davis et al. 1999; Chen, Kim et al. 2001) de mammifères sont phosphorylés sur résidus de tyrosines pour être actives, suggérant une possible interaction directe entre les produits de ces gènes et le PTP1B. Il a aussi été montré que les composantes de la voie de signalisation de l'insuline chez la drosophile et chez les mammifères sont fortement conservées (Garofalo 2002; Lasko 2002; Bier 2005; Teleman and AA. 2010), suggérant la possibilité que PTP1B chez les mammifères affecterait AKT et PI3K.

La voie de signalisation RAS/MAPK est impliquée dans le développement, la criossance, la prolifération, l'apoptose, la différenciation cellulaire. Cette voie est activée par des évènements de phosphorylation (Zhou, Wang et al. 2002) sur les résidus de Ser/Thr et Tyr (Ahn, Seger et al. 1991). Chez la drosophile, le développement des yeux requiert une signalisation à travers la voie EGFR/RAS/RI (MAPK) (Qiao, Harada et al. 2006). Nous avons observé ainsi que Ptp61F régule négativement plusieurs composantes de cette voie. Il a été montré que PTP1B régule négativement le récepteur EGFR (Flint, Tiganis et al. 1997; Haj, Verveer et al. 2002; Haj, Markova et al. 2003). De ce fait, la répression de l'activité de *Egfr* par *Ptp61F* n'est pas surprenante. Cette action négative de PTP1B sur une des RTK suggère que l'absence de cette phosphatase pourrait avoir un effet oncogénique comme suggéré (Dube and Tremblay 2005). L'action négative exercée par Ptp61F constatée sur Ras serait indirecte puisqu'il n'est pas connu de phosphorylation de résidus de tyrosine activatrice de RAS. Cependant, il a été montré que la protéine adaptatrice p130Cas, qui est activée par phosphorylation sur résidu de tyrosine et déphosphorylée par PTP1B (Liu, Sells et al. 1998), active des protéines GTPases telles que R-RAS (Gotoh, Cai et al. 2000). Il existe un orthologue de drosophile de P130Cas et qui porte le même nom. Mais il n'y a pas de données suggérant sa phosphorylation sur résidu de tyrosine. De plus, l'activation de SOS, qui catalyse l'échange de GDP/GTP sur RAS, nécessite une phosphorylation sur résidu de tyrosine par le récepteur Sevenless (Bonfini, Karlovich et al. 1992). Bien que SEV ne soit uniquement présente que dans les photorécepteurs R7, on peut donc suggérer que le phénotype induit par Ras^{V12} soit renforcé en absence de *Ptp61F* dû à l'hyperphosphorylation sur résidus de tyrosines de p130Cas et/ou SOS. Aussi, il a été montré que RAF est activée par phosphorylation sur résidu de Tyr510 (Xia, Li et al. 2008) mais nous n'avons pas testé cette composante de la voie RAS/MAPK. rl, codant le MAPK de drosophile est activé par phosphorylation à la fois sur résidus de Thr et Tyr (Oellers and Hafen 1996). L'interaction avec Ptp61F pourrait être directe par déphosphorylation de son résidu de tyrosine et inactivation de Rl. Cependant, ce résultat n'était pas attendu puisque

(Zhou, Wang et al. 2002) montrent que PTP1B est incapable de déphosphoryler ERK1/2 *in vitro*. Ce qui suggère que, *in vivo*, l'action de *Ptp61F* sur *rl* est indirecte et dans ce cas, interviendrait d'autres facteurs. Ces deux faits expliqueraient pourquoi Zhou et al. n'observent pas de déphosphorylation *in vitro*.

Nous avons montré que *Ptp61F* supprime les fonctions de *Efgr^{ELP}*, *Ras^{V12}*, *rl^{SEM}*, mais pas celle de *pnt^{P2}*. Nous avons utilisé des allèles hyperactivés de chacune de ces composantes, ce qui voudrait dire que chacun de ces allèles peut jouer son rôle dans la voie de signalisation (activation des composantes en aval) sans qu'il ne soit nécessairement activé en amont. Ainsi, l'action suppressive du gène codant pour la phosphatase PTP61F pourrait être au même niveau ou en dessous de cellesci ou dans une voie de signalisation parallèle interagissant avec la voie RAS/MAPK. L'absence d'interaction entre *Ptp61F* et *pnt^{P2}* voudrait dire que le second est épistatique au premier, signifiant que l'action de *Ptp61F* serait avant *pnt^{P2}*. On peut donc suggérer que l'activité de PTP61F se situe soit au niveau de Rl ou alors entre Rl et Pnt. Mais, sachant que Rl phosphoryle directement Pnt^{P2}, et qu'il n'existe pas d'intermédiaire(s) connu(s), PTP61F interagirait au niveau de Rl.

Les résultats que nous avons obtenus indiquent un rôle négatif de PTP61F dans la voie de signalisation RAS/MAPK suggérant un rôle anti-cancer pour cette phosphatase. Ce résultat est en accord avec les études suggérant que PTP1B soit un suppresseur de tumeur (Brown-Shimer, Johnson et al. 1992; Woodford-Thomas, Rhodes et al. 1992; Liu, Sells et al. 1998; Dubé, Bourdeau et al. 2005). Pourtant, d'autres études montrent cependant que PTP1B induit le cancer mammaire chez des souris (Zhai, Beittenmiller et al. 1993; Wiener, Kerns et al. 1994; Dube, Cheng et al. 2004; Bentires-Alj and Neel 2007; Julien, Dube et al. 2007), notamment par activation de RAS/ERK à travers p61DOK/RasGAP (Dube, Cheng et al. 2004; Julien, Dube et al. 2007).

Le fait que PTP1B agisse en déphosphorylant ses substrats laisserait effectivement suggérer un rôle anti-prolifératif pour cette phosphatase. Mais lorsqu'il déphosphoryle, il peut soit lever l'inhibition, cas de c-src (Woodford-Thomas, Rhodes et al. 1992) ou soit inactiver un substrat qui agit comme inhibiteur, p62DOK (Dube, Cheng et al. 2004; Julien, Dube et al. 2007). Dans ces deux cas, il induit l'activation des voies de signalisation. La double face de PTP1B dans les cancers pourrait donc être dépendante du type cancer et par conséquent du tissu concerné.

Cette première étude a permis de montrer en partie qu'il existe une interaction génétique entre *Ptp61F* et le gène de kinase LAMMER, *Doa*, mais aussi une interaction entre *Ptp61F* et *Akt*. Il serait donc nécessaire de déterminer les bases moléculaires de ces interactions et surtout de comprendre leur importance physiologique.

Concernant l'étude du rôle des kinases LAMMER dans la voie de l'insuline, nous nous sommes focalisés sur CLK2, c'est celle qui est la plus proche dans sa séquence primaire des kinases progénitrices de la famille des kinases LAMMER et DOA de la drosophile. De façon pratique, elle est aussi celle pour laquelle nous avons des outils moléculaires disponibles.

Dans la deuxième partie de mes résultats, nous avons montré que l'expression de CLK2 est augmentée dans les cellules sevrées et par l'insuline, ce qui indiquerait son implication potentielle dans la régulation énergétique et/ou le stress cellulaire. En effet, il a été montré que les kinases LAMMER sont stimulées en conditions de stress (James, Staatz et al. 2009, Park, 2003 #247). De plus, CLK2 induit la néoglucogénèse en phosphorylant PGC-1 α (Rodgers, Haas et al. 2010), un facteur de transcription contenant un domaine RS et fortement impliqué dans la régulation des gènes du métabolisme. Une augmentation de l'expression de CLK2 a été aussi positivement corrélée aux taux circulants d'insuline. L'implication de CLK2 dans le stress et le métabolisme du glucose pourrait avoir PGC-1 α comme point commun puisque cette dernière est également fortement stimulée en conditions de stress, régulant les antioxydants tels que SOD1, SOD2 et la glutathione peroxidase 1 (St-Pierre, Drori et al. 2006).

Nous avons aussi pu établir un lien entre CLK2 et l'insulino-résistance. En effet la surexpression de CLK2 dans la lignée neuronale humaine SH-SY5Y diminue la phosphorylation insulino-dépendante de AKT. Cette baisse de la phosphorylation de AKT pourrait être due à l'activation CLK2dépendante de PTP1B ou de AKT. Cette hypothèse est fondée sur nos études de coimmunoprécipitation où nous avons montré une interaction insulinodépendante entre CLK2 et PTP1B d'une part et d'autre part une interaction entre PTP1B et AKT. Il a par ailleurs été montré que la phosphorylation de deux résidus de tyrosines proches du segment d'activation est nécessaire pour l'activation de AKT (Craxton, Jiang et al. 1999; Li, Davis et al. 1999; Chen, Kim et al. 2001). De plus, CLK2 phosphoryle et active PTP1B dans les cellules HEK 293 (Moeslein, Myers et al. 1999). Cependant, bien que la surexpression de CLK2 dans des hépatocytes primaires de souris induisait la baisse de la phosphorylation de AKT, c'est la Ser/Thr phosphatase PP2A qui est responsable de la déphosphorylation de AKT (Rodgers, Vogel et al. 2011). Cette observation n'est pas à exclure dans notre analyse, mais suggère avec nos données et celle de génétique que AKT pourrait être régulée par des phosphatases à Ser/Thr ou à Tyr. Ces observations suggèrent que dans un cas de d'obésité, de diabète de type 2 où la résistance à l'insuline est induite, on peut observer une expression élevée de la kinase LAMMER CLK2.

L'interaction moléculaire entre CLK2 et PTP1B a également été démontrée *in vitro* puisque CLK2 phosphoryle PTP1B sur le résidu Ser50 et nos données sont en concordances avec les travaux précédents (Moeslein, Myers et al. 1999; Ravichandran 2001). Cependant, nous ne montrons pas de

phosphorylation de PTP1B par AKT *in vitro* comme avait observé (Ravichandran 2001) sur les cellules COS-7, suggérant que la phosphorylation de PTP1B par AKT serait dépendante du contexte cellulaire et nécessiterait d'autres facteurs. Il en est de même de l'effet de la phosphorylation de CLK2 sur l'activité de PTP1B qui est contraire à l'effet activateur décrit par (Moeslein, Myers et al. 1999), suggérant que le contexte cellulaire serait également important.

Nous montrons que CLK2 est impliquée dans l'insulino-résistance et son action passerait par PTP1B et/ou PP2A. La phosphorylation de PTP1B par AKT (ou d'autres kinases) ou l'effet de la phosphorylation sur l'activité de PTP1B seraient dépendants du contexte cellulaire. Le résidu de Ser50 est clé pour l'activité catalytique de PTP1B.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En résumé de mon travail de thèse, Nous avons montré en première partie que:

- PTP61F régule négativement la voie de l'insuline comme PTP1B chez les mammifères. De plus, on montre que PTP61F supprime de façon directe ou indirecte l'activité de la PI3K et AKT.

- DOA, la kinase LAMMER de drosophile est également une cible de PTP61F qui la régule d'une manière indirecte.

- *Ptp61F* supprime de façon directe ou indirecte l'activité des principales composantes de la voie de signalisation RAS/MAPK (*Egfr, Ras, rl*). On montre pour la première fois que Rl, la MAPK de *Drosophile* pourrait être un substrat direct de PTP61F.

En deuxième partie nous avons pu démontrer que:

- La kinase LAMMER CLK2 est induite par l'insuline dans les cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y.

- Cette surexpression de CLK2 induirait une insuline-résistance qui se traduit par la baisse de la phosphorylation insulino-dépendante de AKT observée dans les cellules SH-SY5Y.

- CLK2 interagit avec PTP1B *in vivo* et *in vitro* et phosphoryle PTP1B sur Ser50. Cette phosphorylation inhibe l'activité de PTP1B *in vitro*.

- AKT interagit avec PTP1B in vivo. Mais in vitro, AKT ne phosphoryle pas PTP1B.

En perspectives:

Il serait important de vérifier si le gène l(3)02640 est muté dans la souche $Ptp61F^{l}$. Bien qu'on démontre que les effets observés dans les voies de signalisation de l'insuline et RAS/MAPK soient induits par Ptp61F, il est important d'exclure la possibilité que le gène létal l(3)02640 soit également muté. Les expériences pour tester cette hypothèse sont en cours.

Il serait important de regarder au niveau moléculaire l'état de phosphorylation de Rl (MAPK de drosophile) dans les homozygotes de la mutation de $Ptp61F^{l}$. Ceci permettrait de tester au niveau moléculaire, l'intearaction génétique observée entre rl et Ptp61F. Il serait aussi intéressant de tester au niveau des mammifères cette interaction entre ERK1/2 et PTP1B *in vivo*, si possible.

La régulation de la voie JAK/STAT par PTP61F serait également importante à analyser afin de proposer un rôle pour PTP1B dans cette voie de signalisation chez les mammifères.

Etant donné que la baisse de la phosphorylation de AKT suite à la surexpression de CLK2 soit possiblement due à l'action de PTP1B, qui serait activée par phosphorylation par CLK2, il serait important de regarder l'état de phosphorylation des substrats les mieux connus de PTP1B dans la

voie de signalisation de l'insuline que sont le récepteur de l'insuline et ses substrats IRS1/2 en condition de surexpression de CLK2. Ceci permettrait de proposer un mécanisme plus clair de l'action de régulation négative de PTP1B dans la voie de signalisation de l'insuline en se focalisant sur le rôle de la kinase LAMMER CLK2.

Il serait également important, pour des applications futures, de déterminer le niveau d'expression de CLK2 dans les modèles de souris diabétiques de type 2 et obèses et confirmer le lien entre CLK2, PTP1B et insulino-sensibilité chez des modèles plus intégrés.

Puisqu'il existe chez les mammifères quatre gènes codants des kinases LAMMER qui joueraient plus ou moins les mêmes rôles, c'est à dire notamment impliquées dans la régulation de l'épissage des ARNm, il serait intéressant de regarder l'effet des autres kinases LAMMER (CLK1, 3, et 4) dans la régulation de la voie de l'insuline afin de déterminer si d'autres que CLK2 y jouent un rôle et s'il existe une synergie d'action entre elles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abraham, D., K. Podar, et al. (2000). "Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation." J Biol Chem **275**(29): 22300-22304.
- Adams, T. E., V. C. Epa, et al. (2000). "Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor." <u>Cell Mol Life Sci</u> **57**(7): 1050-1093.
- Ahmad, F. and B. J. Goldstein (1995). "Alterations in specific protein-tyrosine phosphatases accompany insulin resistance of streptozotocin diabetes." <u>Am J Physiol.</u> 268(5 Pt 1): E932-940.
- Ahn, N. G., R. Seger, et al. (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**(7): 4220-4227.
- Air, E. L., S. C. Benoit, et al. (2002). "Insulin and leptin combine additively to reduce food intake and body weight in rats." <u>Endocrinology</u> **143**(6): 2449-2452.
- Alessi, D. R., Y. Saito, et al. (1994). "Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1." <u>EMBO J</u> **13**(7): 1610-1619.
- Alvarez, B., A. C. Martínez, et al. (2001). "Forkhead transcription factors contribute to execution of the mitotic programme in mammals.

Alvarez B, Martínez-A C, Burgering BM, Carrera AC." Nature 413(6857): 744-747.

- Andersen, J. N., O. H. Mortensen, et al. (2001). "Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains." <u>Mol Cell Biol</u> **21**(21): 7117-7136.
- Anderson, N. G., J. L. Maller, et al. (1990). "Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase." <u>Nature</u> 343(6259): 651-653.
- Araki, E., M. A. Lipes, et al. (1994). "Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene." <u>Nature</u> **372**(6502): 186-190.

Arregui, C. O., J. Balsamo, et al. (1998). "Impaired integrin-mediated adhesion and signaling in fibroblasts expressing a dominant-negative mutant PTP1B." <u>J Cell Biol</u> **143**(3): 861-873.

- Asante-Appiah, E. and B. P. Kennedy (2003). "Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action." <u>Am J Physiol Endocrinol Metab</u> **284**(4): E663-670.
- Asghar, Z., D. Yau, et al. (2006). "Insulin resistance causes increased beta-cell mass but defective glucose-stimulated insulin secretion in a murine model of type 2 diabetes." <u>Diabetologia</u>
 49(1): 90-99.

- Avnet, S., M. Salerno, et al. (2011). "IGF2 derived from SH-SY5Y neuroblastoma cells induces the osteoclastogenesis of human monocytic precursors." <u>Exp Cell Res</u> **317**(15): 2147-2158.
- Baass, P. C., G. M. Di Guglielmo, et al. (1995). "Compartmentalized signal transduction by receptor tyrosine kinases." <u>Trends Cell Biol</u> **5**(12): 465-470.
- Backer, J. M., M. G. Myers, Jr., et al. (1992). "Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation." <u>EMBO J</u> **11**(9): 3469-3479.
- Backer, J. M., M. G. Myers, Jr., et al. (1993). "Association of IRS-1 with the insulin receptor and the phosphatidylinositol 3'-kinase. Formation of binary and ternary signaling complexes in intact cells." <u>J Biol Chem</u> 268(11): 8204-8212.
- Baeg, G. H., R. Zhou, et al. (2005). "Genome-wide RNAi analysis of JAK/STAT signaling components in Drosophila." <u>Genes Dev</u> **19**(16): 1861-1870.
- Balendran, A., R. Currie, et al. (1999). "Evidence that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 mediates phosphorylation of p70 S6 kinase in vivo at Thr-412 as well as Thr-252." J
 <u>Biol Chem</u> 274(52): 37400-37406.
- Baljuls, A., W. Schmitz, et al. (2008). "Positive regulation of A-RAF by phosphorylation of isoform-specific hinge segment and identification of novel phosphorylation sites." <u>J Biol Chem</u>
 283(40): 27239-27254.
- Balsamo, J., T. Leung, et al. (1996). "Regulated binding of PTP1B-like phosphatase to N-cadherin: control of cadherin-mediated adhesion by dephosphorylation of beta-catenin." <u>J Cell Biol</u> 134(3): 801-813.
- Bandyopadhyay, D., A. Kusari, et al. (1997). "Protein-tyrosine phosphatase 1B complexes with the insulin receptor in vivo and is tyrosine-phosphorylated in the presence of insulin." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> **272**(3): 1639-1645.
- Banks, W. A. (2004). "The source of cerebral insulin." Eur J Pharmacol **490**(1-3): 5-12.
- Barford, D., A. K. Das, et al. (1998). "The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation." <u>Annu Rev Biophys Biomol Struct.</u> **27**: 133-164.
- Barford, D., J. C. Keller, et al. (1994). "Purification and crystallization of the catalytic domain of human protein tyrosine phosphatase 1B expressed in Escherichia coli." <u>J Mol Biol</u> 239(5): 726-730.
- Beaulieu, J. M., T. D. Sotnikova, et al. (2005). "An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior." <u>Cell</u> **122**(2): 261-273.
- Bence, K. K., M. Delibegovic, et al. (2006). "Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action." <u>Nat Med</u> **12**(8): 917-924.

- Bender, J. and G. R. Fink (1994). "*AFC1*, a LAMMER kinase from *Arabidopsis thaliana*, activates STE12-dependent processes in yeast." <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u> **91**(25): 12105-12109.
- Benedict, C., M. Hallschmid, et al. (2007). "Intranasal insulin improves memory in humans: superiority of insulin aspart." <u>Neuropsychopharmacology</u> **32**(1): 239-243.
- Benomar, Y., F. Berthou, et al. (2009). "Leptin but not ciliary neurotrophic factor (CNTF) induces phosphotyrosine phosphatase-1B expression in human neuronal cells (SH-SY5Y): putative explanation of CNTF efficacy in leptin-resistant state." <u>Endocrinology</u>. **150**(3): 1182-1191.
- Benomar, Y., A. F. Roy, et al. (2005). "Cross down-regulation of leptin and insulin receptor expression and signalling in a human neuronal cell line." <u>Biochem J</u> **388**(Pt 3): 929-939.
- Bentires-Alj, M. and B. G. Neel (2007). "Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neuinduced breast cancer." <u>Cancer Res</u> **67**(6): 2420-2424.
- Bertoli, C., T. Copetti, et al. (2009). "Calpain small-1 modulates Akt/FoxO3A signaling and apoptosis through PP2A." <u>Oncogene</u> **28**(5): 721-733.
- Bevona, C., Z. Tannous, et al. (2003). "Dermal melanocytic proliferation with features of a plaquetype blue nevus and neurocristic hamartoma." <u>J Am Acad Dermatol</u> **49**(5): 924-929.
- Bier, E. (2005). "Drosophila , the golden bug, emerges as a tool for human genetics." <u>at. Rev.</u> <u>Genet.</u> **6**: 9-23.
- Blume-Jensen, P. and T. Hunter (2001). "Oncogenic kinase signalling." <u>Nature</u>. **411**(6835): 355–365.
- Bonfini, L., C. A. Karlovich, et al. (1992). "The Son of sevenless gene product: a putative activator of Ras." <u>Science</u> **255**(5044): 603-606.
- Bos, J. L. (1989). "ras oncogenes in human cancer: a review." <u>Cancer Res</u> 49(17): 4682-4689.
- Boubekeur, S., N. Boute, et al. (2011). "A new highly efficient substrate-trapping mutant of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) reveals full autoactivation of the insulin receptor precursor." <u>J Biol Chem</u> **286**(22): 19373-19380.
- Boucher, L., C. A. Ouzounis, et al. (2001). "A genome-wide survey of RS domain proteins." <u>RNA</u> 7(12): 1693-1701.
- Boulay, J. L., J. J. O'Shea, et al. (2003). "Molecular Phylogeny within Type I Cytokines and Their Cognate Receptors." <u>Immunity</u> **19**(2): 159-163.
- Boulton, T. G. and M. H. Cobb (1991). "Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies." <u>Cell Regul</u> **2**(5): 357-371.
- Boura-Halfon, S. and Y. Zick (2009). "Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance." <u>Am J Physiol Endocrinol Metab</u> **296**(4): E581-591.

- Bourdeau, A., N. Dube, et al. (2005). "Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **17**(2): 203-209.
- Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." <u>Development</u> **118**(2): 401-415.
- Brognard, J., E. Sierecki, et al. (2007). "PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms." <u>mol Cell</u> 25(6): 917-931.
- Brown-Shimer, S., K. A. Johnson, et al. (1992). "Effect of protein tyrosine phosphatase 1B expression on transformation by the human neu oncogene." <u>Cancer Res.</u> **52**(2): 478-482.
- Brown-Shimer, S., K. A. Johnson, et al. (1990). "Molecular cloning and chromosome mapping of the human gene encoding protein phosphotyrosyl phosphatase 1B." <u>Proc Natl Acad Sci U S</u> <u>A</u> 87(13): 5148-5152.
- Brunet, A., A. Bonni, et al. (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." <u>Cell</u> **96**(6): 857-868.
- Bruning, J. C., D. Gautam, et al. (2000). "Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction." <u>Science</u> **289**(5487): 2122-2125.
- Bullock, A. N., S. Das, et al. (2009). "Kinase domain insertions define distinct roles of CLK kinases in SR protein phosphorylation." <u>Structure</u> **17**(3): 352-362.
- Burgess, A. W., H. S. Cho, et al. (2003). "An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ ErbB receptors." <u>Mol Cell.</u> **12**(3): 541-552.
- Burke, P., K. Schooler, et al. (2001). "Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking." <u>Mol Biol Cell</u> **12**(6): 1897-1910.
- Caceres, J. F., T. Misteli, et al. (1997). "Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity." <u>J Cell Biol</u> **138**(2): 225-238.
- Camps, M., A. Nichols, et al. (2000). "Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function." <u>FASEB J</u> **14**(1): 6-16.
- Caro, J. F., O. Ittoop, et al. (1986). "Studies on the mechanism of insulin resistance in the liver from humans with noninsulin-dependent diabetes. Insulin action and binding in isolated hepatocytes, insulin receptor structure, and kinase activity." <u>J Clin Invest</u> **78**(1): 249-258.
- Carpenter, D. O. and D. B. Briggs (1986). "Insulin excites neurons of the area postrema and causes emesis." <u>Neurosci Lett</u> **68**(1): 85-89.
- Carpenter, G., Cohen, S. (1977). "Influence of lectins on the binding of 125I-labeled EGF to human fibroblasts." <u>Biochem. Biophys. Res. Commun.</u> **79**(2): 545-552.

- Casar, B., V. Sanz-Moreno, et al. (2012). "Mxi2 promotes stimulus-independent ERK nuclear translocation." <u>EMBO J</u> 26(3): 635-646.
- Casas-Tinto, S., M. T. Marr, 2nd, et al. (2007). "Characterization of the Drosophila insulin receptor promoter." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1769**(4): 236-243.
- Catalanotti, F., G. Reyes, et al. (2009). "A Mek1-Mek2 heterodimer determines the strength and duration of the Erk signal." <u>Nat Struct Mol Biol</u> **16**(3): 294-303.
- Chang, Y. C., S. Y. Lin, et al. (2008). "Tyrosine phosphoproteomics and identification of substrates of protein tyrosine phosphatase dPTP61F in Drosophila S2 cells by mass spectrometrybased substrate trapping strategy." <u>J Proteome Res</u> **7**(3): 1055-1066.
- Charbonneau, H., N. K. Tonks, et al. (1989). "Human placenta protein-tyrosine-phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins." <u>Proc Natl Acad Sci U S</u> <u>A</u> 86(14): 5252-5256.
- Chardin, P., J. H. Camonis, et al. (1993). "Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2." <u>Science</u> **260**(5112): 1338-1343.
- Charles, M. A. (2000). "[Update on the epidemiology of obesity and type 2 diabetes in France]." <u>Diabetes Metab</u> **26 Suppl 3**: 17-20.
- Chen, F., V. Archambault, et al. (2007). "Multiple protein phosphatases are required for mitosis in Drosophila." <u>Curr Biol</u> **17**(4): 293-303.
- Chen, J., H. B. Sadowski, et al. (1997). "Stat5 is a physiological substrate of the insulin receptor." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **94**(6): 2295-2300.
- Chen, R., O. Kim, et al. (2001). "Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation." J Biol Chem **276**(34): 31858-31862.
- Cheng, A., N. Dube, et al. (2002). "Coordinated action of protein tyrosine phosphatases in insulin signal transduction." <u>Eur J Biochem</u> **269**(4): 1050-1059.
- Chernoff, J., A. R. Schievella, et al. (1990). "Cloning of a cDNA for a major human protein-tyrosinephosphatase." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **87**(7): 2735-2739.
- Cho, H., S. E. Ramer, et al. (1992). "Catalytic domains of the LAR and CD45 protein tyrosine phosphatases from Escherichia coli expression systems: purification and characterization for specificity and mechanism." <u>Biochemistry</u> **31**(1): 133-138.
- Choi, J. H., H. S. Kim, et al. (2006). "Phospholipase Cgamma1 negatively regulates growth hormone signalling by forming a ternary complex with Jak2 and protein tyrosine phosphatase-1B."
 <u>Nat Cell Biol</u> 8(12): 1389-1397.

- Chong, H., J. Lee, et al. (2001). "Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation." <u>EMBO J</u> **20**(14): 3716-3727.
- Choy, E., V. K. Chiu, et al. (1999). "Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi." <u>Cell</u> **98**(1): 69-80.
- Chuderland, D., A. Konson, et al. (2008). "Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins." <u>mol Cell</u> **31**(6): 850-861.
- Cicirelli, M. F., N. K. Tonks, et al. (1990). "Microinjection of a protein-tyrosine-phosphatase inhibits insulin action in Xenopus oocytes." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **87**(14): 5514-5518.
- Clemens, J. C., Z. Ursuliak, et al. (1996). "A Drosophila protein-tyrosine phosphatase associates with an adapter protein required for axonal guidance." <u>J Biol Chem</u> **271**(29): 17002-17005.
- Colicelli, J. (2004). "Human RAS superfamily proteins and related GTPases." <u>Sci STKE</u> **2004**(250): RE13.
- Colwill, K., L. L. Feng, et al. (1996). "SRPK1 and Clk/STY protein kinases show distinct substrate specificities for Sérine/Arginine-rich splicing factors." J. Biol.Chem. **271**: 24569-24575.
- Corp, E. S., S. C. Woods, et al. (1986). "Localization of 125I-insulin binding sites in the rat hypothalamus by quantitative autoradiography." <u>Neurosci Lett</u> **70**(1): 17-22.
- Craxton, A., A. Jiang, et al. (1999). "Syk and Bruton's tyrosine kinase are required for B cell antigen receptor-mediated activation of the kinase Akt." J Biol Chem **274**(43): 30644-30650.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, et al. (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." <u>Nature</u> **378**(6559): 785-789.
- Cusi, K., K. Maezono, et al. (2000). "Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle." J Clin Invest **105**(3): 311-320.
- Dadke (2007). "Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by sumoylation." <u>Nat Cell Biol</u> **9**: 80-85.
- Dadke, S. and J. Chernoff (2003). "Protein-tyrosine phosphatase 1B mediates the effects of insulin on the actin cytoskeleton in immortalized fibroblasts." <u>J Biol Chem</u> **278**(42): 40607-40611.
- Dadke, S., A. Kusari, et al. (2001). "Phosphorylation and activation of protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B by insulin receptor." <u>Mol Cell Biochem.</u> **221**(1-2): 147-154.
- Dadke, S., J. Kusari, et al. (2000). "Down-regulation of insulin signaling by protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B is mediated by an N-terminal binding region." J Biol Chem 275(31): 23642-23647.
- Davies, H., G. R. Bignell, et al. (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." <u>Nature</u> **417**(6892): 949-954.

- de Groot, R. P., P. J. Coffer, et al. (1998). "Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family." <u>Cell Signal</u> **10**(9): 619-628.
- De Jonghe, B. C., M. R. Hayes, et al. (2011). "Deficiency of PTP1B in POMC neurons leads to alterations in energy balance and homeostatic response to cold exposure." <u>Am J Physiol</u> <u>Endocrinol Metab</u> **300**(6): E1002-1011.
- De Meyts, P. and J. Whittaker (2002). "Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design." <u>Nat Rev Drug Discov</u> **1**(10): 769-783.
- DeFronzo, R. A. and D. Tripathy (2009). "Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes." <u>Diabetes Care</u> **32 Suppl 2**(S157-63).
- Dhillon, A. S., C. Pollock, et al. (2002). "Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of sérine 259." <u>Mol Cell Biol</u>

22(10): 3237-3246.

- Di Guglielmo, G. M., P. C. Baass, et al. (1994). "Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma." <u>EMBO J.</u> 13(18): 4269-4277.
- Dong, H., B. A. Maddux, et al. (2005). "Increased hepatic levels of the insulin receptor inhibitor, PC-1/NPP1, induce insulin resistance and glucose intolerance." <u>Diabetes</u> **54**(2): 367-372.
- Dougherty, M. K., J. Muller, et al. (2005). "Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation." <u>mol Cell</u> **17**(2): 215-224.
- Downward, B. a. J. (1993). "Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor." <u>Cell</u>
 73(3): 611-620.
- Drake, P. G. and B. I. Posner (1998). "Insulin receptor-associated protein tyrosine phosphatase(s): role in insulin action." <u>Mol Cell Biochem</u> **182**(1-2): 79-89.
- Dubé, N., A. Bourdeau, et al. (2005). "Genetic ablation of protein tyrosine phosphatase 1B accelerates lymphomagenesis of p53-null mice through the regulation of B-cell development." <u>Cancer Res</u> 65(21): 10088-10095.
- Dube, N., A. Cheng, et al. (2004). "The role of protein tyrosine phosphatase 1B in Ras signaling." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **101**(7): 1834-1839.
- Dube, N. and M. L. Tremblay (2005). "Involvement of the small protein tyrosine phosphatases TC-PTP and PTP1B in signal transduction and diseases: from diabetes, obesity to cell cycle, and cancer." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1754**(1-2): 108-117.

- Dumaz, N. and R. Marais (2003). "Protein kinase A blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras." J Biol Chem **278**(32): 29819-29823.
- Dummler, B. and B. A. Hemmings (2007). "Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease." <u>Biochem Soc Trans</u> **35**(Pt 2): 231-235.
- Duncan, P. I., B. W. Howell, et al. (1995). "Alternative splicing of STY, a nuclear dual specificity kinase." J. Biol. Chem. **270**(37): 21524-21531.
- Duncan, P. I., D. F. Stojdl, et al. (1997). "In vivo regulation of alternative pre-mRNA splicing by the Clk1 protein kinase." <u>Mol. Cell. Biol.</u> **17**(10): 5996-6001.
- Ebinu, J. O., D. A. Bottorff, et al. (1998). "RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs." Science **280**(5366): 1082-1086.
- Eblen, S. T., J. K. T. Slack-Davis, A. , et al. (2004). "Mitogen-activated protein kinase feedback phosphorylation regulates MEK1 complex formation and activation during cellular adhesion." <u>Mol Cell Biol.</u> **24**(6): 2308-2317.
- Elchebly, M., P. Payette, et al. (1999). "Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene." <u>Science</u>. **283**(5407): 1544-1548.
- Ellson, C. D., S. Gobert-Gosse, et al. (2001). "PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox)." <u>Nat Cell Biol</u> **3**(7): 679-682.
- Emamian, E. S., D. Hall, et al. (2004). "Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia." <u>Nat Genet</u> **36**(2): 131-137.
- Emanuelli, B., P. Peraldi, et al. (2000). "SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling." <u>J Biol Chem</u> **275**(21): 15985-15991.
- Escribano, O., C. Guillén, et al. (2009). "Beta-Cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: role of a liver-pancreas endocrine axis through insulin receptor A isoform." <u>Diabetes</u> **4**(58): 820-828.
- Esteban, L. M., C. Vicario-Abejon, et al. (2001). "Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development." <u>Mol Cell Biol</u> **21**(5): 1444-1452.
- Fabian, J. R., I. O. Daar, et al. (1993). "Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase." <u>Mol Cell Biol</u> **13**(11): 7170-7179.
- Fan, Y., M. Schlierf, et al. (2010). "Drosophila Translational Elongation Factor-1{gamma} is Modified in Response to DOA Kinase Activity and is Essential For Cellular Viability." <u>Genetics</u> 184(1): 141-154.

- Fantin, V. R., S. R. Keller, et al. (1999). "Insulin receptor substrate 4 supports insulin- and interleukin 4-stimulated proliferation of hematopoietic cells." <u>Biochem Biophys Res</u> <u>Commun</u> 260(3): 718-723.
- Farhang-Fallah, J., V. K. Randhawa, et al. (2002). "The pleckstrin homology (PH) domain-interacting protein couples the insulin receptor substrate 1 PH domain to insulin signaling pathways leading to mitogenesis and GLUT4 translocation." <u>Mol Cell Biol</u> **22**(20): 7325-7336.
- Farhang-Fallah, J., X. Yin, et al. (2000). "Cloning and characterization of PHIP, a novel insulin receptor substrate-1 pleckstrin homology domain interacting protein." <u>J Biol Chem</u> 275(51): 40492-40497.
- Feener, E. P., J. M. Backer, et al. (1993). "Insulin stimulates sérine and tyrosine phosphorylation in the juxtamembrane region of the insulin receptor." <u>J Biol Chem</u> 268(15): 11256-11264.
- Ferrell, J. E., Jr. and R. R. Bhatt (1997). "Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem **272**(30): 19008-19016.
- Fischmann, T. O., C. K. Smith, et al. (2009). "Crystal structures of MEK1 binary and ternary complexes with nucleotides and inhibitors." <u>Biochemistry</u> **48**(12): 2661-2674.
- Fitzpatrick, K. A., S. M. Gorski, et al. (1995). "Expression of protein tyrosine phosphatase genes during oogenesis in Drosophila melanogaster." <u>Mech Dev</u> **53**(2): 171-183.
- Flier, J. S., C. R. Kahn, et al. (1976). "Characterization of antibodies to the insulin receptor: a cause of insulin-resistant diabetes in man." <u>J Clin Invest</u> **58**(6): 1442-1449.
- Flint, A. J., M. F. Gebbink, et al. (1993). "Multi-site phosphorylation of the protein tyrosine phosphatase, PTP1B: identification of cell cycle regulated and phorbol ester stimulated sites of phosphorylation." <u>EMBO J</u> 12(5): 1937-1946.
- Flint, A. J., T. Tiganis, et al. (1997). "Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 94(5): 1680-1685.
- Folli, F., C. R. Kahn, et al. (1997). "Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for sérine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk." J Clin Invest 100(9): 2158-2169.
- Frangioni, J. V., P. H. Beahm, et al. (1992). "The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence." <u>Cell</u>
 68(3): 545-560.
- Frangioni, J. V., A. Oda, et al. (1993). "Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets." <u>EMBO J</u> 12(12): 4843-4856.
- Franke, T. F. (2008). "Intracellular signaling by Akt: bound to be specific." <u>Sci Signal</u> 1(24): pe29.
- Franke, T. F., C. P. Hornik, et al. (2003). "PI3K/Akt and apoptosis: size matters." <u>Oncogene</u> **22**(56): 8983-8998.
- Freude, S., U. Leeser, et al. (2008). "IRS-2 branch of IGF-1 receptor signaling is essential for appropriate timing of myelination." J Neurochem **107**(4): 907-917.
- Freychet, P. (2000). "Insulin receptors and insulin actions in the nervous system." <u>Diabetes Metab</u> <u>Res Rev</u> **16**(6): 390-392.
- Fukuda, M., I. Gotoh, et al. (1997). "A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> **272**(51): 32642-32648.
- Galic, S., C. Hauser, et al. (2005). "Coordinated regulation of insulin signaling by the protein tyrosine phosphatases PTP1B and TCPTP." <u>Mol Cell Biol</u> **25**(2): 819-829.
- Galic, S., M. Klingler-Hoffmann, et al. (2003). "Regulation of insulin receptor signaling by the protein tyrosine phosphatase TCPTP." <u>Mol Cell Biol</u> **23**(6): 2096-2108.
- Gao, T., F. Furnari, et al. (2005). "PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth." <u>mol Cell</u> **18**(1): 13-24.
- Garofalo, R. S. (2002). "Genetic analysis of insulin signaling in Drosophila." <u>Trends Endocrinol</u> <u>Metab</u> **13**(4): 156-162.
- Garrett, T. P. J., N. M. McKern, et al. (2002). "Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha." <u>Cell.</u>
 110(6): 763-773.
- Garrity, P. A., Y. Rao, et al. (1996). "Drosophila photoreceptor axon guidance and targeting requires the dreadlocks SH2/SH3 adapter protein." <u>Cell</u> **85**(5): 639-650.
- George, S., J. J. Rochford, et al. (2004). "A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2." <u>Science</u> **304**(5675): 1325-1328.
- Gerozissis and K. (2009). "Function (and dysfunctions) of insulin in the brain." <u>J Japan Diab Soc.</u> **52**(5): 333-339.
- Gerozissis, K. (2008). "Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies." <u>Eur J Pharmacol</u> **585**(1): 38-49.

- Gille, H., T. Strahl, et al. (1995). "Activation of ternary complex factor Elk-1 by stress-activated protein kinases." <u>Curr Biol</u> **5**(10): 1191-1200.
- Goldstein, B. J., F. Ahmad, et al. (1998). "Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases." <u>Mol Cell Biochem</u> **182**(1-2): 91-99.
- Goldstein, B. J., A. Bittner-Kowalczyk, et al. (2000). "Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein." <u>J Biol Chem</u> 275(6): 4283-4289.
- Goldstein, M. R., L. Mascitelli, et al. (2009). "Obesity and survival among patients with pancreatic cancer." JAMA **302**(16): 1752-1753.
- Golic, K. G. and S. Lindquist (1989). "The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the Drosophila genome." Cell **59**(3): 499-509.
- Gonzalez, F. A., D. L. Raden, et al. (1991). "Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases." J Biol Chem **266**(33): 22159-22163.
- Gonzalez-Rodriguez, A., J. E. Clampit, et al. (2007). "Developmental switch from prolonged insulin action to increased insulin sensitivity in protein tyrosine phosphatase 1B-deficient hepatocytes." <u>Endocrinology</u> **148**(2): 594-608.
- Gopalbhai, K., G. Jansen, et al. (2003). "Negative regulation of MAPKK by phosphorylation of a conserved sérine residue equivalent to Ser212 of MEK1." J Biol Chem **278**(10): 8118-8125.
- Gotoh, T., D. Cai, et al. (2000). "p130Cas regulates the activity of AND-34, a novel Ral, Rap1, and R-Ras guanine nucleotide exchange factor." J Biol Chem **275**(39): 30118-30123.
- Gual, P., V. Baron, et al. (1998). "Interaction of Janus kinases JAK-1 and JAK-2 with the insulin receptor and the insulin-like growth factor-1 receptor." <u>Endocrinology</u> **139**(3): 884-893.
- Guan, K. L. and J. E. Dixon (1991). "Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate." J Biol Chem **266**(26): 17026-17030.
- Guan, K. L., R. S. Haun, et al. (1990). "Cloning and expression of a protein-tyrosine-phosphatase." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **87**(4): 1501-1505.
- Guan, Z., L. K. Buhl, et al. (2011). "Altered gene regulation and synaptic morphology in Drosophila learning and memory mutants." <u>Learn Mem</u> **18**(4): 191-206.
- Gum, R. J., L. L. Gaede, et al. (2003a). "Antisense protein tyrosine phosphatase 1B reverses activation of p38 mitogen-activated protein kinase in liver of ob/ob mice." <u>Mol Endocrinol</u> 17(6): 1131-1143.

- Gum, R. J., L. L. Gaede, et al. (2003b). "Reduction of protein tyrosine phosphatase 1B increases insulin-dependent signaling in ob/ob mice." <u>Diabetes</u> **52**(1): 21-28.
- Gustafson, T. A., W. He, et al. (1995). "Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain." <u>Mol Cell Biol</u> **15**(5): 2500-2508.
- Haj, F. G., B. Markova, et al. (2003). "Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B." <u>J Biol Chem</u> 278(2): 739-744.
- Haj, F. G., P. J. Verveer, et al. (2002). "Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum." <u>Science</u> **295**(5560): 1708-1711.
- Haj, F. G., J. M. Zabolotny, et al. (2005). "Liver-specific protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) re-expression alters glucose homeostasis of PTP1B-/-mice." J Biol Chem 280(15): 15038-15046.
- Hallschmid, M., C. Benedict, et al. (2008). "Obese men respond to cognitive but not to catabolic brain insulin signaling." Int J Obes **32**(2): 275-282.
- Hallschmid, M. and B. Schultes (2009). "Central nervous insulin resistance: a promising target in the treatment of metabolic and cognitive disorders?" <u>Diabetologia</u> **52**(11): 2264-2269.
- Hancock, J. F., H. Paterson, et al. (1990). "A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane." <u>Cell</u> 63(1): 133-139.
- Hanes, J., H. von der Kammer, et al. (1994). "Characterization by cDNA cloning of two new human protein kinases." J. Mol. Biol. **244**: 665-672.
- Hanks, S. K., A. M. Quinn, et al. (1988). "The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains." <u>Science</u> **241**(4861): 42-52.
- Hara, K., K. Yonezawa, et al. (1994). "1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulinstimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells." <u>Proc Natl Acad Sci U S</u> <u>A</u> 91(16): 7415-7419.

Hati, S., Bhattacharyya, S., Price, J. V. and Tracey, A. S. (2002). "Comparative modeling of the phosphatase and kinase domains of protein tyrosine phosphatase and insulin receptor kinase from Drosophila melanogaster (DPTP61fm), and a computational study of their mutual interactions." <u>Biochem. Cell Biol.</u> **80**(2): 225-239.

Havrankova, J., J. Roth, et al. (1978). "Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat." <u>Nature</u> **272**(5656): 827-829.

Havrankova, J., Roth, J., Brownstein, M.J., (1979). "Concentrations of insulin and of insulin receptors in the brain are independent of peripheral

insulin levels." J. Clin. Invest. 64(2): 636-642.

- Haystead, T. A., P. Dent, et al. (1992). "Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase." <u>FEBS Lett</u> **306**(1): 17-22.
- Hennige, A. M., N. Stefan, et al. (2006). "Leptin down-regulates insulin action through phosphorylation of sérine-318 in insulin receptor substrate 1." <u>FASEB J</u> 20(8): 1206-1208.
- Hermiston, M. L., J. Zikherman, et al. (2009). "CD45, CD148, and Lyp/Pep: critical phosphatases regulating Src family kinase signaling networks in immune cells." <u>Immunol Rev</u> 228(1): 288-311.

Hertog, J. d. (1999). "Protein-tyrosine phosphatases in development." Mech Dev 85(1-2): 3–14.

- Hettich, L. and M. Marshall (1994). "Structural analysis of the Ras GTPase activating protein catalytic domain by semirandom mutagenesis: implications for a mechanism of interaction with Ras-GTP." <u>Cancer Res</u> **54**(20): 5438-5444.
- Hilger, M., T. Bonaldi, et al. (2009). "Systems-wide analysis of a phosphatase knock-down by quantitative proteomics and phosphoproteomics." <u>Mol Cell Proteomics</u> **8**(8): 1908-1920.
- Hillman, R. T., R. E. Green, et al. (2004). "An unappreciated role for RNA surveillance." <u>Genome</u> <u>Biol</u> **5**(2): R8.
- Hollenhorst, P. C., L. Paul, et al. (2011). "The ETS gene ETV4 is required for anchorage-independent growth and a cell proliferation gene expression program in PC3 prostate cells." <u>Genes</u> <u>Cancer.</u> 1(10): 1044-1052.

Hua, Q. (2010). "Insulin: a small protein with a long journey." Protein Cell 1(6): 537-551.

- Huang, C. H., T. Y. Lin, et al. (2007). "The involvement of Abl and PTP61F in the regulation of Abi protein localization and stability and lamella formation in Drosophila S2 cells." J Biol Chem 282(44): 32442-32452.
- Huang, C. H., D. Mandelker, et al. (2007). "The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations." <u>Science</u> **318**(5857): 1744-1748.
- Hubbard, S. R. (2004). "Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases." <u>Nat Rev Mol</u> <u>Cell Biol</u> **5**(6): 464-471.
- Hunter, T. (2009). "Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **21**(2): 140-146.
- Ibarra-Sanchez, M. J., P. D. Simoncic, et al. (2000). "The T-cell protein tyrosine phosphatase." <u>Semin Immunol</u> **12**(4): 379-386.

- Jaehoon, L., D. Robynn, et al. (2012). "TOR signaling regulates ribosome and tRNA synthesis via LAMMER/Clk and GSK-3 family kinases." <u>Molecular Cell</u> **45**(6): 836-843.
- James, B. P., W. D. Staatz, et al. (2009). "Superoxide dismutase is regulated by LAMMER kinase in Drosophila and human cells." <u>Free Radic Biol Med</u> **15**(6): 821-827.
- James, B. P., W. D. Staatz, et al. (2009). "Superoxide dismutase is regulated by LAMMER kinase in Drosophila and human cells." <u>Free Radic Biol Med.</u> **46**(6): 821-827.
- Jiang, K., N. A. Patel, et al. (2009). "Akt2 regulation of Cdc2-like kinases (Clk/Sty), sérine/argininerich (SR) protein phosphorylation, and insulin-induced alternative splicing of PKCbetall messenger ribonucleic acid." <u>Endocrinology</u> **150**(5): 2087-2097.
- Johnson, L., D. Greenbaum, et al. (1997). "K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras." <u>Genes Dev</u> **11**(23): 3277-3281.
- Johnson, L. N. (2009). "Protein kinase inhibitors: contributions from structure to clinical compounds." <u>Q Rev Biophys</u> **42**(1): 1-40.
- Johnson, T. O., J. Ermolieff, et al. (2002). "Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes." <u>Nat Rev Drug Discov</u> **1**(9): 696-709.
- Jorge, R., N. Zarich, et al. (2002). "HSos1 contains a new amino-terminal regulatory motif with specific binding affinity for its Pleckstrin homology domain." <u>J Biol Chem</u> **277**(46): 44171-44179.
- Julien, S. G., N. Dube, et al. (2007). "Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis." <u>Nat</u> <u>Genet</u> 39(3): 338-346.
- Kaburagi, Y., S. Satoh, et al. (1997). "Role of insulin receptor substrate-1 and pp60 in the regulation of insulin-induced glucose transport and GLUT4 translocation in primary adipocytes." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> 272(41): 25839-25844.
- Kang, W. H., Y. H. Park, et al. (2010). "The LAMMER kinase homolog,
- Lkh1, regulates Tup transcriptional repressors through phos-
- phorylation in Schizosaccharomyces pombe." J. Biol. Chem. 285(18): 13797-13806.
- 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." <u>Protein Sci</u> 13(8): 2059-2077.
- Kantham, L., L. Kerr-Bayles, et al. (2003). "Beacon interacts with cdc2/cdc28-like kinases." <u>Biochem</u> <u>Biophys Res Commun.</u> **304**(1): 125-129.

- Kashige, N., N. Carpino, et al. (2000). "Tyrosine phosphorylation of p62dok by p210bcr-abl inhibits RasGAP activity." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **95**(5): 2093-2098.
- Kataoka, N., J. L. Bachorik, et al. (1999). "Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins." <u>J Cell Biol</u> **145**(6): 1145-1152.
- Kellerer, M., R. Lammers, et al. (1992). "Distinct alpha-subunit structures of human insulin receptor A and B variants determine differences in tyrosine kinase activities." <u>Biochemistry</u> 31(19): 4588-4596.
- Kenner, K. A., E. Anyanwu, et al. (1996). "Protein-tyrosine phosphatase 1B is a negative regulator of insulin- and insulin-like growth factor-I-stimulated signaling." J Biol Chem 271(33): 19810-19816.
- Kern, W., C. Benedict, et al. (2006). "Low cerebrospinal fluid insulin levels in obese humans." Diabetologia **49**(11): 2790-2792.
- Ketterer, C., O. Tschritter, et al. (2011). "Insulin sensitivity of the human brain." <u>Diabetes Res Clin</u> <u>Pract</u> **93 Suppl 1**: S47-51.
- Keyse, S. M. (2000). "Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **12**(2): 186-192.
- Khan, A. H. and J. E. Pessin (2002). "Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways." <u>Diabetologia</u> **45**(11): 1475-1483.
- Kishimoto, M., M. Hashiramoto, et al. (1994). "[The structure function relationship in the human insulin receptor]." <u>Nihon Rinsho</u> **52**(10): 2616-2622.
- Klaman, L. D., O. Boss, et al. (2000). "Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice." <u>Mol</u> <u>Cell Biol.</u> 20(15): 5479-5489.
- Knighton, D. R., J. H. Zheng, et al. (1991). "Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase." <u>Science</u> 253(5018): 407-414.
- Koera, K., K. Nakamura, et al. (1997). "K-ras is essential for the development of the mouse embryo." <u>Oncogene</u> **15**(10): 1151-1159.
- Koide, H., T. Satoh, et al. (1993). "GTP-dependent association of Raf-1 with Ha-Ras: identification of Raf as a target downstream of Ras in mammalian cells." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 50(18): 8683-8686.
- Kojima, T., T. Zama, et al. (2001). "Cloning of human PRP4 reveals interaction with Clk1." <u>J Biol</u> Chem **276**(34): 32247-32256.

- Kolch, W., G. Heidecker, et al. (1993). "Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation." <u>Nature</u> **364**(6434): 249-252.
- Kpebe, A. and L. Rabinow (2008). "Alternative promoter usage generates multiple evolutionarily conserved isoforms of Drosophila DOA kinase." <u>genesis</u> **46**(3): 132-143.
- Kpebe, A. and L. Rabinow (2008). "Dissection of Darkener of Apricot Kinase Isoform Functions in Drosophila." <u>Genetics</u> **179**(4): 1973-1987.
- Ku, H. Y., C. L. Wu, et al. (2009). "Organization of F-actin via concerted regulation of Kette by PTP61F and dAbl." <u>Mol Cell Biol</u> 29(13): 3623-3632.
- Kubota, N., T. Kubota, et al. (2008). "Dynamic functional relay between insulin receptor substrate1 and 2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding." <u>Cell Metab</u> 8(1): 49-64.
- Kuchay (2007). "Double knockouts reveal that protein tyrosine phosphatase 1B is a physiological target of calpain-1 in platelets." <u>Mol Cell Biol</u> **27**(17): 6038–6052.
- Kusari, J., K. A. Kenner, et al. (1994). "Skeletal muscle protein tyrosine phosphatase
- activity and tyrosine phosphatase 1B protein content are associated with insulin action and resistance." J clin Invest. **93**(3): 1156-1162.
- LaMontagne, K. R., Jr., G. Hannon, et al. (1998). "Protein tyrosine phosphatase PTP1B suppresses p210 bcr-abl-induced transformation of rat-1 fibroblasts and promotes differentiation of K562 cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14094-14099.
- Laron, Z. (2001). "Growth hormone and insulin-like growth factor-I: Effects on the brain." <u>Hormones brain and behavior, 2nd edition</u> **54**(5): 311-316.
- Lasko, P. (2002). "Diabetic flies? Using Drosophila melanogaster to understand the causes of monogenic and genetically complex diseases." <u>Clin Genet.</u> **62**(5): 358-367.
- Lavery, W., V. Hall, et al. (2007). "Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt nonautonomously promote perineurial glial growth in Drosophila peripheral nerves." <u>J Neurosci</u> **27**(2): 279-288.
- Lawrence, M. C., N. M. McKern, et al. (2007). "Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor." <u>Curr Opin Struct Biol</u> **17**(6): 699-705.
- Le Marchand-Brustel, Y. (1999). "Molecular mechanisms of insulin action in normal and insulinresistant states." <u>Exp Clin Endocrinol Diabetes</u>. **107**(2): 126-132.
- Lebrun, P. and E. Van Obberghen (2008). "SOCS proteins causing trouble in insulin action." <u>Acta</u> <u>Physiol (oxf)</u> **192**(1): 29-36.
- Lee, K., C. Du, et al. (1996). "Activity and autophosphorylation of LAMMER protein kinases." J. Biol. Chem. 271(44): 27299-27303.

- Lee, S. and Q. Wang (2007). "Recent development of small molecular specific inhibitor of protein tyrosine phosphatase 1B." <u>Med Res Rev</u> **27**(4): 553-573.
- Lee, S. J., Feldman, R., O'Farrell, P.H. (2008). "An RNA interference screen identifies a novel regulator of target of rapamycin that mediates hypoxia suppression of translation in Drosophila S2 cells." <u>Mol. Biol. Cell</u> **19**(10): 4051-4061.
- Lefloch, R., J. Pouyssegur, et al. (2009). "Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation." <u>Cell</u> <u>Cycle</u> **8**(5): 705-711.
- Leibiger, B., I. B. Leibiger, et al. (2001). "Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells." <u>mol Cell</u> 7(3): 559-570.
- Lemmon, M. A. and J. Schlessinger (2010). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." <u>Cell</u> **141**(7): 1117-1134.
- Leon, J., I. Guerrero, et al. (1987). "Differential expression of the ras gene family in mice." <u>Mol Cell</u> <u>Biol</u> **7**(4): 1535-1540.
- Lessard, L., M. Stuible, et al. (2010). "The two faces of PTP1B in cancer." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1804**(3): 613-619.
- Levy-Toledano, R., M. Taouis, et al. (1994). "Insulin-induced activation of phosphatidyl inositol 3kinase. Demonstration that the p85 subunit binds directly to the COOH terminus of the insulin receptor in intact cells." J Biol Chem **269**(49): 31178-31182.
- Li, H. L., W. W. Davis, et al. (1999). "The tyrosine kinases Syk and Lyn exert opposing effects on the activation of protein kinase Akt/PKB in B lymphocytes." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **96**(12): 6890-6895.
- Li, J. L., G. A. Targett, et al. (2001). "Primary structure and sexual stage-specific expression of a LAMMER protein kinase of Plasmodium falciparum." <u>Int J Parasitol</u> **31**(4): 387-392.
- Li, L., B. R. Ernsting, et al. (1997). "A family of putative tumor suppressors is structurally and functionally conserved in humans and yeast." J Biol Chem **272**(47): 29403-29406.
- Light, Y., H. Paterson, et al. (2002). "14-3-3 antagonizes Ras-mediated Raf-1 recruitment to the plasma membrane to maintain signaling fidelity." Mol Cell Biol **22**(14): 4984-4996.
- Liu, F., M. A. Sells, et al. (1998). "Transformation suppression by protein tyrosine phosphatase 1B requires a functional SH3 ligand." <u>Mol Cell Biol</u> **18**(1): 250-259.
- Liu, H., X. Chen, et al. (2007). "Structural basis for stem cell factor-KIT signaling and activation of class III receptor tyrosine kinases." <u>EMBO J.</u> **26**(3): 891-900

Liu, Y. F., K. Paz, et al. (2001). "Insulin stimulates PKCzeta -mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). A self-attenuated mechanism to negatively regulate the function of IRS proteins." J Biol Chem 276(17): 14459-14465.

Llyod, A. C. (2006). "Distinct functions for ERKs?" Journal of Biology 5(5): 13.

- Maddux, B. A., Y. N. Chang, et al. (2006). "Overexpression of the insulin receptor inhibitor PC-1/ENPP1 induces insulin resistance and hyperglycemia." <u>Am J Physiol Endocrinol Metab</u> **290**(4): E746-749.
- Maddux, B. A. and I. D. Goldfine (2000). "Membrane glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor function occurs via direct interaction with the receptor alpha-subunit." <u>Diabetes</u>
 49(1): 13-19.
- Maegawa, H., D. A. McClain, et al. (1988). "Properties of a human insulin receptor with a COOHterminal truncation. II. Truncated receptors have normal kinase activity but are defective in signaling metabolic effects." J Biol Chem **263**(18): 8912-8917.
- Majumdar, N., G. L. Paez, et al. (2010). "MAP Kinase phosphorylation is dispensable for cell division, but required for cell growth in Drosophila." <u>Fly (Austin)</u> **4**(3): 204-212.
- Marais, R., Y. Light, et al. (1995). "Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation." <u>EMBO J</u> **14**(13): 3136-3145.
- Marais, R., Y. Light, et al. (1997). "Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases." J Biol Chem **272**(7): 4378-4383.
- Margarit, S. M., H. Sondermann, et al. (2003). "Structural evidence for feedback activation by Ras.GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS." <u>Cell</u> **112**(5): 685-695.
- Margolis, R. U. and N. Altszuler (1967). "Insulin in the cerebrospinal fluid." <u>Nature</u> **215**(5108): 1375-1376.
- Marks, J. L., D. Porte, Jr., et al. (1990). "Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization." <u>Endocrinology</u> **127**(6): 3234-3236.
- Matsuda, S., Y. Gotoh, et al. (1994). "Signaling pathways mediated by the mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase/MAP kinase cascade." <u>J Leukoc Biol</u> **56**(5): 548-553.
- Matsuo, K., A. Bettaieb, et al. (2011). "Regulation of brown fat adipogenesis by protein tyrosine phosphatase 1B." <u>PLoS One</u> **6**(1): e16446.
- McKay, M. M. and D. K. Morrison (2007). "Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK." <u>Oncogene</u> **26**(22): 3113-3121.
- McLaughlin, S. and J. E. Dixon (1993). "Alternative splicing gives rise to a nuclear protein tyrosine phosphatase in Drosophila." <u>J Biol Chem</u> **268**(10): 6839-6842.

- Mendoza, M. C., E. E. Er, et al. (2011). "The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation." <u>Trends Biochem Sci</u> **36**(6): 320-328.
- Menegay, H., F. Moeslein, et al. (1999). "The dual specificity protein kinase CLK3 is abundantly expressed in mature mouse spermatozoa." <u>Exp. Cell Res.</u> **253**(2): 463-473.
- Menegay, H. J., M. P. Myers, et al. (2000). "Biochemical characterization and localization of the dual specificity kinase CLK1." J. Cell Science **113**(Pt 18): 3241-3253.
- Meng, T. C., D. A. Buckley, et al. (2004). "Regulation of insulin signaling through reversible oxidation of the protein-tyrosine phosphatases TC45 and PTP1B." J Biol Chem 279(36): 37716-37725.
- Miller, M. A., I. A. Malik, et al. (2000). "The Src/Csk regulatory circuit arose early in metazoan evolution." <u>Oncogene</u> **19**(34): 3925-3930.
- Miranda, S., A. Gonzalez-Rodriguez, et al. (2010). "Beneficial effects of PTP1B deficiency on brown adipocyte differentiation and protection against apoptosis induced by pro- and antiinflammatory stimuli." <u>Cell Signal</u> **22**(4): 645-659.
- Moeslein, F. M., M. P. Myers, et al. (1999). "The CLK family kinases, CLK1 and CLK2, phosphorylate and activate the tyrosine phosphatase." J. Biol. Chem. **274**(38): 26697–26704.
- Moller, D. E., A. Yokota, et al. (1989). "Normal insulin-receptor cDNA sequence in Pima Indians with NIDDM." Diabetes **38**(11): 1496-1500.
- Mooney, R. A., J. Senn, et al. (2001). "Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance." J Biol Chem **276**(28): 25889-25893.
- Morrison, M. M. a. D. (2007). "Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK." <u>Oncogene</u> 27: 3113–3121.
- Morton, S., R. J. Davis, et al. (2003). "A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun." <u>EMBO J</u> **22**(15): 3876-3886.
- Mothe, I. and E. Van Obberghen (1996). "Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple sérine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action." J Biol Chem 271(19): 11222-11227.
- Muller, P., D. Kuttenkeuler, et al. (2005). "Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference." <u>Nature</u> **436**(7052): 871-875.
- Murphy, N. P., K. Sakoori, et al. (2006). "Lack of evidence of a role for the neurosteroid allopregnanolone in ethanol-induced reward and c-fos expression in DBA/2 mice." <u>Brain</u> <u>Res</u> **1094**(1): 107-118.

- Myers, M. G., Jr., L. M. Wang, et al. (1994). "Role of IRS-1-GRB-2 complexes in insulin signaling." Mol Cell Biol **14**(6): 3577-3587.
- Nayler, O., F. Schnorrer, et al. (1998). "The cellular localization of the murine Sérine/Arginine-rich protein kinase CLK2 is regulated by Sérine 141 autophosphorylation." <u>J. Biol. Chem.</u> **273**: 34341-34348.
- Nayler, O., S. Stamm, et al. (1997). "Characterization and comparison of four sérine- and argininerich (SR) protein kinases." <u>Biochem. J.</u> **326**: 693-700.
- Nekrasova, T., C. Shive, et al. (2005). "ERK1 deficient mice show normal T cell effector function and are highly susceptible 3012

to experimental autoimmune encephalomyelitis." Journal of Immunology 175(4): 2374-2380.

Nihira, K., N. Taira, et al. (2008). "TTK/Mps1 controls nuclear targeting of c-Abl by 14–3–3-coupled phosphoryla

tion in response to oxidative stress." Oncogene 27(719): 7285-7295.

Nikolakaki, E., C. Du, et al. (2002). "Phosphorylation by LAMMER protein kinases: determination of a consensus site, identification of in vitro substrates and implications for substrate preferences." <u>Biochemistry</u> **41**: 2055-2066.

Nimnual, A. and D. Bar-Sagi (2002). "The two hats of SOS." <u>Sci STKE</u> 2002(145): pe36.

- Nyomba, B. L., V. M. Ossowski, et al. (1990). "Insulin-sensitive tyrosine kinase: relationship with in vivo insulin action in humans." <u>Am J Physiol</u> **258**(6 Pt 1): E964-974.
- Obici, S., B. B. Zhang, et al. (2002). "Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production." <u>Nature</u> **12**(8): 1376-1382.

Odawara, M., T. Kadowaki, et al. (1989). "Human diabetes associated with a mutation in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor." <u>Science</u> **245**(4913): 66-68.

- Oellers, N. and E. Hafen (1996). "Biochemical characterization of rolledSem, an activated form of Drosophila mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem **271**(40): 24939-24944.
- Ogiso, H., R. Ishitani, et al. (2002). "Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains." <u>Cell.</u> **110**: 775-787.
- Okkenhaug, K. and B. Vanhaesebroeck (2001). "New responsibilities for the PI3K regulatory subunit p85 alpha." <u>Sci STKE</u> **2001**(65): pe1.
- Ory, S., M. Zhou, et al. (2003). "Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites." <u>Curr Biol.</u> **13**(16): 1356-1364.

- Ottensmeyer, F. P., D. R. Beniac, et al. (2000). "Mechanism of transmembrane signaling: insulin binding and the insulin receptor." <u>Biochemistry</u> **39**(40): 12103-12112.
- Ouwens, D. M., G. C. van der Zon, et al. (1994). "A mutant insulin receptor induces formation of a Shc-growth factor receptor bound protein 2 (Grb2) complex and p21ras-GTP without detectable interaction of insulin receptor substrate 1 (IRS1) with Grb2. Evidence for IRS1independent p21ras-GTP formation." J Biol Chem **269**(52): 33116-33122.
- Padmanabha, R., S. Gehrung, et al. (1991). "The KNS1 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes a nonessential protein kinase homologue that is distantly related to members of the CDC28/cdc2 gene family." <u>Mol. Gen. Genet.</u> 229: 1-9.
- Padmanabhan, S., A. Mukhopadhyay, et al. (2009). "A PP2A regulatory subunit regulates C. elegans insulin/IGF-1 signaling by modulating AKT-1 phosphorylation." <u>Cell</u> **136**(5): 939-951.
- Pages, G., S. Guerin, et al. (1999). "Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice." <u>Science</u> **286**(5443): 1374-1377.
- Park, Y. D., W. H. Kang, et al. (2003). "LAMMER kinase homolog, Lkh1, is involved in oxidativestress response of fission yeast." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **311**(4): 1078-1083.
- Patti, M. E., X. J. Sun, et al. (1995). "4PS/insulin receptor substrate (IRS)-2 is the alternative substrate of the insulin receptor in IRS-1-deficient mice." <u>J Biol Chem</u> 270(42): 24670-24673.
- Pawson, T. (2004). "Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems." <u>Cell</u> **116**(2): 191-203.
- Paz, K., R. Hemi, et al. (1997). "A molecular basis for insulin resistance. Elevated sérine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation." <u>J Biol Chem</u> 272(47): 29911-29918.
- Picardi, P. K., V. C. Calegari, et al. (2008). "Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats." <u>Endocrinology</u> 149(8): 3870-3880.
- Pierre, S., A. S. Bats, et al. (2011). "Understanding SOS (Son of Sevenless)." <u>Biochemical</u> <u>Pharmacology</u> **82**(9): 1049-1056.
- Plotnikov, A., E. Zehorai, et al. (2011). "The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1813**(9): 1619-1633.

- Plowman, G. D., S. Sudarsanam, et al. (1999). "The protein kinases of Caenorhabditis elegans: a model for signal transduction in multicellular organisms." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 96(24): 13603-13610.
- Prasad, J. and J. L. Manley (2003). "Regulation and Substrate Specificity of the SR Protein Kinase Clk/Sty." <u>Molec. Cell. Biol.</u> **23**: 4139-4149.
- Prior, I. A. and J. F. Hancock (2012). "Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling." <u>Semin Cell Dev Biol</u> **23**(2): 145-153.
- Qiao, F., B. Harada, et al. (2006). "Mae inhibits Pointed-P2 transcriptional activity by blocking its MAPK docking site." <u>EMBO J</u> **25**(1): 70-79.
- Rabinow, L. and J. A. Birchler (1989). "A dosage-sensitive modifier of retrotransposon induced alleles of the *Drosophila white* locus." <u>EMBO J.</u> **8**: 879-889.
- Rabinow, L., S. L. Chiang, et al. (1993). "Mutations at the *Darkener of apricot* locus modulate transcript levels of *copia* and *copia*-induced mutations in *Drosophila melanogaster*." <u>Genetics</u> 134: 1175-1185.
- Rao, G. S., M. V. Ramachandran, et al. (2006). "In silico structure-based design of a potent and selective small peptide inhibitor of protein tyrosine phosphatase 1B, a novel therapeutic target for obesity and type 2 diabetes mellitus: a computer modeling approach." <u>J Biomol</u> Struct Dyn **23**(4): 377-384.
- Rapp, U. R., M. D. Goldsborough, et al. (1983). "Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 80(14): 4218-4222.
- Ravichandran (2001). "Phosphorylation of ptp1b at ser(50) by akt impairs its ability to dephosphorylate the insulin receptor." <u>Mol Endocrinol</u> **15**: 1768–1780.
- Reger, M. A., G. S. Watson, et al. (2008a). "Intranasal insulin administration dose-dependently modulates verbal memory and plasma amyloid-beta in memory-impaired older adults." J <u>Alzheimers Dis.</u> **13**(3): 323-331.
- Reger, M. A., G. S. Watson, et al. (2008b). "Intranasal insulin improves cognition and modulates beta-amyloid in early AD." <u>Neurology</u> **70**(6): 440-448.
- Reiser, M., E. Lenz, et al. (1985). "Insulin-like immunoreactivity in human cerebrospinal-fluid is independent of insulin blood levels." <u>Hum Neurobiol.</u> **4**(1): 53-55.
- Rena, G., S. Guo, et al. (1999). "Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B." J Biol Chem **274**(24): 17179-17183.
- Ritt, D. A., D. M. Monson, et al. (2010). "Impact of feedback phosphorylation and Raf heterodimerization on normal and mutant B-Raf signaling." <u>Mol Cell Biol</u> **30**(3): 806-819.

- Robbins, D. J., E. Zhen, et al. (1993). "Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro." J Biol Chem **268**(7): 5097-5106.
- Rocher, G., C. Letourneux, et al. (2007). "Inhibition of B56-containing protein phosphatase 2As by the early response gene IEX-1 leads to control of Akt activity." <u>J Biol Chem</u> 282(8): 5468-5477.
- Rodgers, J. T., W. Haas, et al. (2010). "Cdc2-like kinase 2 is an insulin-regulated suppressor of hepatic gluconeogenesis." <u>Cell Metab</u> **11**(1): 23-24.
- Rodgers, J. T., R. O. Vogel, et al. (2011). "Clk2 and B56beta mediate insulin-regulated assembly of the PP2A phosphatase holoenzyme complex on Akt." <u>mol Cell</u> **41**(4): 471-479.
- Rodriguez-Viciana, P., J. Oses-Prieto, et al. (2006). "A phosphatase holoenzyme comprised of Shoc2/Sur8 and the catalytic subunit of PP1 functions as an M-Ras effector to modulate Raf activity." <u>Mol Cell</u>

22(2): 217-230.

- Rodriguez-Viciana, P., P. H. Warne, et al. (1994). "Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras." <u>Nature</u> **370**(6490): 527-532.
- Rodriguez-Viciana, P., P. H. Warne, et al. (1996). "Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation." <u>EMBO J</u> **15**(10): 2442-2451.
- Romsicki, Y., G. Scapin, et al. (2003). "Functional characterization and crystal structure of the C215D mutant of protein-tyrosine phosphatase-1B." J Biol Chem **278**(31): 29009-29015.
- Rondinone, C. M., J. M. Trevillyan, et al. (2002). "Protein tyrosine phosphatase 1B reduction regulates adiposity and expression of genes involved in lipogenesis." <u>Diabetes</u> 51(8): 2405-2411.
- Roskoski, R. (2010). "RAF protein-sérine/threonine kinases: Structure and regulation." <u>Biochemical</u> and <u>Biophysical Research Communications</u> **399**(3): 313-317.
- Roskoski, R. (2012). "ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation." <u>Pharmacol Res</u> **66**(2): 105-143.
- Roskoski, R. (2012). "MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation." <u>Biochem</u> <u>Biophys Res Commun.</u> **417**(1): 5-10.

Rossomando, A. J., P. Dent, et al. (1994). "Mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MKK1) is negatively regulated by threonine phosphorylation." <u>Mol Cell Biol</u>

14(3): 1594-1602.

Rushworth, L. K., A. D. Hindley, et al. (2006). "Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization." <u>Mol Cell Biol</u> **26**(6): 2262-2272.

- Saad, M. J., C. R. Carvalho, et al. (1996). "Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat." J Biol Chem **271**(36): 22100-22104.
- Salmeen, A., J. N. Andersen, et al. (2000). "Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B." <u>Molecular</u> <u>Cell</u> **6**(6): 1401-1412.
- Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." <u>Nature</u> **414**(6865): 799-806.
- Saltiel, A. R. and J. E. Pessin (2002). "Insulin signaling pathways in time and space." <u>Trends Cell Biol</u> **12**(2): 65-71.
- Sanford, J. R., D. Longman, et al. (2003). "Multiple roles of the SR protein family in splicing regulation." <u>Prog Mol Subcell Biol</u> **31**: 33-58.
- Sanger, F. and E. O. Thompson (1953a). "The amino-acid sequence in the glycyl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates." <u>Biochem J</u> **53**: 353–366.
- Sanger, F. and E. O. Thompson (1953b). "The amino-acid sequence in the glycyl chain of insulin. II. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates." <u>Biochem i</u> **53**.
- Sangwan, V., G. N. Paliouras, et al. (2006). "Protein-tyrosine phosphatase 1B deficiency protects against Fas-induced hepatic failure." J Biol Chem **281**(1): 221-228.
- Savaldi-Goldstein, S., D. Aviv, et al. (2003). "Alternative splicing modulation by a LAMMER kinase impinges on developmental and transcriptome expression." <u>Plant Cell</u> **15**(4): 926-938.
- Savaldi-Goldstein, S., G. Sessa, et al. (2000). "The ethylene-inducible PK12 kinase mediates the phosphorylation of SR splicing factors." <u>Plant Journ.</u> **21**: 91-96.
- Sawka-Verhelle, D., V. Baron, et al. (1997). "Tyr624 and Tyr628 in insulin receptor substrate-2 mediate its association with the insulin receptor." J Biol Chem **272**(26): 16414-16420.
- Sawka-Verhelle, D., C. Filloux, et al. (1997). "Identification of Stat 5B as a substrate of the insulin receptor." <u>Eur J Biochem</u> **250**(2): 411-417.
- Scheid, M. P. and J. R. Woodgett (2003). "Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt." <u>FEBS Lett</u> **546**(1): 108-112.
- Schlessinger and J. (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell. 103: 211-225.
- Schlessinger, J. and M. A. Lemmon (2003). "SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling." <u>Sci</u> <u>STKE</u> **2003**(191): RE12.
- Schmitz-Peiffer, C. and J. P. Whitehead (2003). "IRS-1 regulation in health and disease." <u>IUBMB Life</u> **55**(7): 367-374.

- Schwartz, M. W. and D. Porte, Jr. (2005). "Diabetes, obesity, and the brain." <u>Science</u> **307**(5708): 375-379.
- Schwartz, M. W., A. Sipols, et al. (1990). "Kinetics and specificity of insulin uptake from plasma into cerebrospinal fluid." <u>Am J Physiol.</u> **259**(3): E378-383.
- Sciacca, L., M. Prisco, et al. (2003). "Signaling differences from the A and B isoforms of the insulin receptor (IR) in 32D cells in the presence or absence of IR substrate-1." <u>Endocrinology</u>
 144(6): 2650-2658.
- Sciacchitano, S. and S. I. Taylor (1997). "Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of the mouse IRS-3 gene." <u>Endocrinology</u> **138**(11): 4931-4940.
- Seeliger, M. A., P. Ranjitkar, et al. (2009). "Equally potent inhibition of c-Src and Abl by compounds that recognize inactive kinase conformations." <u>Cancer Res.</u> **69**(6): 2384-2392.
- Seger, R., Rodeck, U., and Yarden, Y. (2008). "Receptor tyrosine kinases: the emerging tip of systems control." <u>IET Syst. Biol.</u> **2**: 1-4.
- Seino, S. and G. I. Bell (1989). "Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **159**(1): 312-316.
- Serrano, R., M. Villar, et al. (2005). "Differential gene expression of insulin receptor isoforms A and B and insulin receptor substrates 1, 2 and 3 in rat tissues: modulation by aging and differentiation in rat adipose tissue." J Mol Endocrinol **34**(1): 153-161.
- Sessa, G., V. Raz, et al. (1996). "PK12, a plant dual-specificity protein kinase of the LAMMER family, is regulated by the hormone ethylene." <u>Plant Cell</u> **8**: 2223-2234.
- Sesti, G., M. Federici, et al. (2001). "Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders." <u>FASEB J</u> **15**(12): 2099-2111.
- Shepherd, P. R., D. J. Withers, et al. (1998). "Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling." <u>Biochem J</u> **333 (Pt 3)**: 471-490.
- Shi (2004). "Suppressor of cytokine signaling-3 is a physiological regulator of adipocyte insulin signaling." <u>J. Biol. Chem.</u> **279**: 34733–34740.
- Shi, K., K. Egawa, et al. (2004). "Protein-tyrosine phosphatase 1B associates with insulin receptor and negatively regulates insulin signaling without receptor internalization." <u>J Biochem.</u>
 136(1): 89-96.
- Shifrin, V. I., R. J. Davis, et al. (1997). "Phosphorylation of protein-tyrosine phosphatase PTP-1B on identical sites suggests activation of a common signaling pathway during mitosis and stress response in mammalian cells." <u>J Biol Chem</u> **272**(5): 2957-2962.

- Shoelson, S. E., M. Sivaraja, et al. (1993). "Specific phosphopeptide binding regulates a conformational change in the PI 3-kinase SH2 domain associated with enzyme activation."
 <u>EMBO J</u> 12(2): 795-802.
- Slaaby, R., L. Schäffer, et al. (2006). "Hybrid receptors formed by insulin receptor (IR) and insulinlike growth factor I receptor (IGF-IR) have low insulin and high IGF-1 affinity irrespective of the IR splice variant." J Biol Chem 281(36): 25869-25874.
- Sondermann, H., S. M. Soisson, et al. (2004). "Structural analysis of autoinhibition in the Ras activator Son of sevenless." <u>Cell</u> **119**(3): 393-405.
- Songyang, Z., S. E. Shoelson, et al. (1993). "SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences." <u>Cell</u> **72**(5): 767-778.
- Sorkin, A. and M. Von Zastrow (2002). "Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds." <u>Nat Rev Mol Cell Biol.</u> **3**(8): 600-614.
- St-Pierre, J., S. Drori, et al. (2006). "Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators." <u>Cell</u> **127**(2): 397-408.
- Staal, S. P., J. W. Hartley, et al. (1977). "Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 74(7): 3065-3067.
- Starr, R., T. A. Willson, et al. (1997). "A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling." <u>Nature</u> **387**(6636): 917-921.
- Stauber, D. J., A. D. DiGabriele, et al. (2000). "Structural interactions of fibroblast growth factor receptor with its ligands." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **97**: 45-49.
- Steck, P. A., M. A. Pershouse, et al. (1997). "Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers." <u>Nat</u> <u>Genet</u> 15(4): 356-362.
- Steen, E., B. M. Terry, et al. (2005). "Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes?" <u>J Alzheimers Dis.</u>
 7(1): 63-80.
- Steiner, D. F. and A. H. Rubenstein (1997). "Proinsulin C-peptide--biological activity?" <u>Science</u> 277(5325): 531-532.
- Stenmark, H., R. Aasland, et al. (1996). "Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger." J Biol Chem **271**(39): 24048-24054.

- Stephens, L., A. Eguinoa, et al. (1993). "Receptor stimulated accumulation of phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate by G-protein mediated pathways in human myeloid derived cells."
 <u>EMBO J</u> 12(6): 2265-2273.
- Stodjl, D. F. and J. C. Bell (1999). "SR protein kinases: the splice of life." <u>Biochem Cell Biol.</u> 77: 293-298.
- Stuible, M., K. M. Doody, et al. (2008). "PTP1B and TC-PTP: regulators of transformation and tumorigenesis." <u>Cancer Metastasis Rev</u> **27**(2): 215-230.
- Sun, X. J., D. L. Crimmins, et al. (1993). "Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1." <u>Mol Cell Biol</u> **13**(12): 7418-7428.
- Sun, X. J., M. Miralpeix, et al. (1992). "Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission." J Biol Chem **267**(31): 22662-22672.
- Sun, X. J., P. Rothenberg, et al. (1991). "Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein." <u>Nature</u> **352**(6330): 73-77.
- Takano, A., T. Haruta, et al. (2001). "Growth hormone induces cellular insulin resistance by uncoupling phosphatidylinositol 3-kinase and its downstream signals in 3T3-L1 adipocytes." <u>Diabetes</u> 50(8): 1891-1900.
- Takeuchi, K. and F. Ito (2011). "Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics." <u>Biol</u> <u>Pharm Bull</u> **34**(12): 1774-1780.
- Tamemoto, H., T. Kadowaki, et al. (1994). "Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1." <u>Nature</u> **372**(6502): 182-186.
- Taniguchi, C. M., B. Emanuelli, et al. (2006). "Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action." <u>Nat Rev Mol Cell Biol.</u> **7**(2): 85-96.
- Tanner, M. M., S. Grenman, et al. (2001). "Frequent amplification of chromosomal region 20q12q13 in ovarian cancer." <u>Clin Cancer Res</u> **6**(5): 1833-1839.
- Tao, J., C. C. Malbon, et al. (2001). "Insulin stimulates tyrosine phosphorylation and inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in vivo." J Biol Chem **276**(31): 29520-29525.
- Taouis, M., R. Levy-Toledano, et al. (1994). "Structural basis by which a recessive mutation in the alpha-subunit of the insulin receptor affects insulin binding." <u>J Biol Chem</u> **269**(21): 14912-14918.
- Taylor, S. I., T. Kadowaki, et al. (1990). "Mutations in the insulin receptor gene in genetic forms of insulin resistance." <u>Recent Prog Horm Res.</u> **46**: 185-213.
- Taylor, S. S. and A. P. Kornev (2011). "Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins." <u>Trends Biochem Sci</u> **36**(2): 65-77.

- Teleman and AA. (2010). "Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in Drosophila." <u>Biochem J.</u> **425**(1): 13-26.
- Tennagels, N., E. Bergschneider, et al. (2000). "Autophosphorylation of the two C-terminal tyrosine residues Tyr1316 and Tyr1322 modulates the activity of the insulin receptor kinase in vitro." <u>FEBS Lett</u> **479**(1-2): 67-71.
- Theodosiou, N. A. and T. Xu (1998). "Use of FLP/FRT system to study Drosophila development." <u>Methods.</u> **14**(4): 355-365.
- Tiganis, T. (2012). "PTP1B and TCPTP nonredundant phosphatases in insulin signaling and glucose homeostasis." <u>FEBS J</u>.
- Tiganis, T. and A. M. Bennett (2007). "Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective." <u>Biochem J</u> **402**(1): 1-15.
- Toker, A. and A. C. Newton (2000). "Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site." J Biol Chem **275**(12): 8271-8274.
- Tonks (1990). "Effect of microinjection of a low-Mr human placenta protein tyrosine phosphatase on induction of meiotic cell division in Xenopus oocytes." <u>Mol Cell Biol.</u> **10**(2): 458-463.
- Tonks, N. K., C. D. Diltz, et al. (1988). "Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta." J Biol Chem **263**(14): 6731-6737.
- Tonks, N. K., C. D. Diltz, et al. (1988). "Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta." J Biol Chem **263**(14): 6722-6730.
- Tschritter, O., H. Preissl, et al. (2006). "The cerebrocortical response to hyperinsulinemia is reduced in overweight humans: a magnetoencephalographic study." <u>Proc Natl Acad Sci U S</u> <u>A</u> 32(103): 12103–12108.
- Ullrich, A., J. R. Bell, et al. (1985). "Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes." <u>Nature</u> **313**(6005): 756-761.
- Ullrich, A. and J. Schlessinger (1990). "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity." <u>Cell</u> **61**(2): 203-212.
- Unger, J. W. and M. Betz (1998). "Insulin receptors and signal transduction proteins in the hypothalamo-hypophyseal system: a review on morphological findings and functional implications." <u>Histol Histopathol</u> **13**(4): 1215-1224.
- Ursuliak, Z., Clemens, J. C., Dixon, J. E. and Price, J. V. (1997). "Differential accumulation of DPTP61F alternative transcripts: regulation of a protein tyrosine phosphatase by segmentation genes." <u>Mech Dev.</u> **65**(1-2): 19-30.

- van Elsas, A., S. Zerp, et al. (1995). "Analysis of N-ras mutations in human cutaneous melanoma: tumor heterogeneity detected by polymerase chain reaction/single-stranded conformation polymorphism analysis." <u>Recent Results Cancer Res</u> **139**: 57-67.
- Van Kanegan, M. J., D. G. Adams, et al. (2005). "Distinct protein phosphatase 2A heterotrimers modulate growth factor signaling to extracellular signal-regulated kinases and Akt." <u>J Biol</u> Chem **280**(43): 36029-36036.
- van Montfort, R. L., M. Congreve, et al. (2003). "Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B." <u>Nature</u> **423**(6941): 773-777.
- Vanhaesebroeck, B. and D. R. Alessi (2000). "The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB." <u>Biochem J</u> **346**(3): 561-576.
- Velazquez-Dones, A., J. C. Hagopian, et al. (2005). "Mass spectrometric and kinetic analysis of ASF/SF2 phosphorylation by SRPK1 and Clk/ Sty." J. Biol. Chem. **280**(50): 41761–41768.
- Vinciguerra, M. and M. Foti (2006). "PTEN and SHIP2 phosphoinositide phosphatases as negative regulators of insulin signalling." <u>Arch. Physiol Biochem.</u> **112**(2): 89-104.
- Vogt, B., J. M. Carrascosa, et al. (1991). "The two isotypes of the human insulin receptor (HIR-A and HIR-B) follow different internalization kinetics." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> 177(3): 1013-1018.
- Voliovitch, H., D. G. Schindler, et al. (1995). "Tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in vivo depends upon the presence of its pleckstrin homology region." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> 27(30): 18083-18087.
- Wan, P. T., M. J. Garnett, et al. (2004). "Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF." <u>Cell</u> **116**(6): 855-867.
- Wang, J. F., K. Gong, et al. (2009). "Structural flexibility and interactions of PTP1B's S-loop." Interdiscip Sci **1**(3): 214-219.
- Ward, C. W., M. C. Lawrence, et al. (2007). "The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand-induced receptor activation." <u>Trends Biochem Sci.</u> **32**(3): 129-137.
- Waters, S. B., K. Yamauchi, et al. (1993). "Functional expression of insulin receptor substrate-1 is required for insulin-stimulated mitogenic signaling." J Biol Chem **268**(30): 22231-22234.
- Weber, C. K., J. R. Slupsky, et al. (2001). "Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf." <u>Cancer Res</u> **61**(9): 3595-3598.
- Wellbrock, C., M. Karasarides, et al. (2004). "The RAF proteins take centre stage." <u>Nat Rev Mol Cell</u> <u>Biol</u> **5**(11): 875-885.

- White, M. F., S. E. Shoelson, et al. (1988). "A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor." J Biol Chem 263(6): 2969-2980.
- Wiener, J. R., B. J. Kerns, et al. (1994). "Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in human breast cancer: association with p185c-erbB-2 protein expression." <u>J Natl Cancer</u> <u>Inst.</u> 86(5): 372-378.
- Wiesmann, C., M. H. Ultsch, et al. (1999). "Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor." <u>Nature</u> **401**(6749): 184-188.
- Wilden, P. A., K. Siddle, et al. (1992). "The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities. Analysis with insulin and antireceptor antibodies." J Biol Chem 267(19): 13719-13727.
- Williams, J. G., J. K. Drugan, et al. (2000). "Elucidation of binding determinants and functional consequences of Ras/Raf-cysteine-rich domain interactions." <u>J Biol Chem</u> 275(29): 22172-22179.
- Withers, D. J., J. S. Gutierrez, et al. (1998). "Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice." <u>Nature</u> **391**(6670): 900-904.
- Woodford-Thomas, T. A., J. D. Rhodes, et al. (1992). "Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src-transformed mouse 3T3 fibroblasts." <u>J Cell Biol.</u> **117**(2): 401-414.
- Woods, S. C. and D. J. Porte (1977). "Relationship between plasma and cerebrospinal fluid insulin levels of dogs." <u>am J Physiol.</u> **233**(4): E331-334.
- Woods, S. C., R. J. Seeley, et al. (2003). "Insulin and the blood-brain barrier." <u>Curr Pharm Des</u> **9**(10): 795-800.
- Woods, S. C., Seeley, R.J., Baskin, D.G., Schwartz, M.W., (2003). "Insulin and the blood-brain barrier." <u>Curr. Pharm. Des.</u> **9**: 795-800.
- Wortzel, I. and R. Seger (2011). "The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles." <u>Genes Cancer.</u> **2**(3): 195-209.
- Wright, V. M., K. L. Vogt, et al. (2011). "Differential activities of the Drosophila JAK/STAT pathway ligands Upd, Upd2 and Upd3." <u>Cell Signal</u> **23**(5): 920-927.
- Wrighten, S. A., G. G. Piroli, et al. (2009). "A look inside the diabetic brain: Contributors to diabetes-induced brain aging." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1792**(5): 444-453.
- Wu, C. L., B. Buszard, et al. (2011). "Dock/Nck facilitates PTP61F/PTP1B regulation of insulin signalling." <u>Biochem J</u> 439(1): 151-159.

- Wu, J., Y. D. Tseng, et al. (2008). "Structural and biochemical characterization of the KRLB region in insulin receptor substrate-2." <u>Nat Struct Mol Biol</u> **15**(3): 251-258.
- Wu, J. Y. and T. Maniatis (1993). "Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing." <u>Cell.</u> **75**(6): 1061-1070.
- Wymann, M. P., K. Bjorklof, et al. (2003). "Phosphoinositide 3-kinase gamma: a key modulator in inflammation and allergy." <u>Biochem Soc Trans</u> **31**(Pt 1): 275-280.
- Xia, F., J. Li, et al. (2008). "Raf activation is regulated by tyrosine 510 phosphorylation in Drosophila." <u>Plos Biol.</u> **6**(5): e128.
- Yamauchi, T., K. Tobe, et al. (1996). "Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice." <u>Mol Cell Biol</u> **16**(6): 3074-3084.
- Yao, Y., W. Li, et al. (2003). "Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **100**(22): 12759-12764.
- Yip, S. C., S. Saha, et al. (2010). "PTP1B: a double agent in metabolism and oncogenesis." <u>Trends</u> <u>Biochem Sci</u> **35**(8): 442-449.
- Yoon, S. and R. Seger (2006). "The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions." <u>Growth Factors</u> **24**(1): 21-44.
- Yun, B., R. Farkas, et al. (1994). "The Doa locus encodes a member of a new protein kinase family, and is essential for eye and embryonic development in Drosophila melanogaster." <u>Genes</u> <u>Dev.</u> 8(10): 1160-1173.
- Zabolotny, J. M., K. K. Bence-Hanulec, et al. (2002). "PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo." <u>Developmental Cell</u> **2**(4): 489-495.
- Zabolotny, J. M., F. G. Haj, et al. (2004). "Transgenic overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle causes insulin resistance, but overexpression with leukocyte antigen-related phosphatase does not additively impair insulin action." <u>J Biol Chem</u>
 279(23): 24844-24851.
- Zebisch, A., L. Cerroni, et al. (2003). "Therapy-related leukemia cutis: case study of an aggressive disorder." <u>Ann Hematol</u> **82**(11): 705-707.
- Zhai, Y. F., H. Beittenmiller, et al. (1993). "Increased expression of specific protein tyrosine phosphatases in human breast epithelial cells neoplastically transformed by the neu oncogene." <u>Cancer Res</u> 53(10 Suppl): 2272-2278.
- Zhang, S. and Z. Y. Zhang (2007). "PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery." <u>Drug Discov Today</u>. **12**(9-10): 373-381.

- Zhang, S. a. Z., Z. Y. (2007). "PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery." <u>Drug Discov Today</u>. **12**(9-10): 373-381.
- Zhang, X. F., J. Settleman, et al. (1993). "Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the aminoterminal regulatory domain of c-Raf-1." <u>Nature</u> **364**(6435): 308-313.
- Zhang, Z. Y., A. M. Thieme-Sefler, et al. (1993). "Substrate specificity of the protein tyrosine phosphatases." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **90**(10): 4446-4450.
- Zhao, C., G. Du, et al. (2007). "Phospholipase D2-generated phosphatidic acid couples EGFR stimulation to Ras activation by Sos." <u>Nat Cell Biol</u> **9**(6): 706-712.
- Zheng, C. F., M. Ohmichi, et al. (1994). "Growth factor induced MEK activation is primarily mediated by an activator different from c-raf." <u>Biochemistry</u> **33**(18): 5595-5599.
- Zhou, B., Z. X. Wang, et al. (2002). "The specificity of extracellular signal-regulated kinase 2 dephosphorylation by protein phosphatases." J Biol Chem **277**(35): 31818-31825.
- Zhou, M. M., J. E. Harlan, et al. (1995). "Binding affinities of tyrosine-phosphorylated peptides to the COOH-terminal SH2 and NH2-terminal phosphotyrosine binding domains of Shc." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> 270(52): 31119-31123.
- Zhu, J., V. Balan, et al. (2005). "Identification of Raf-1 S471 as a novel phosphorylation site critical for Raf-1 and B-Raf kinase activities and for MEK binding." <u>Mol Biol Cell</u> **16**(10): 4733-4744.
- Zick, Y. (2001). "Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling." <u>Trends Cell Biol</u> **11**(11): 437-441.
- Zinker, B. A., C. M. Rondinone, et al. (2002). "PTP1B antisense oligonucleotide lowers PTP1B protein, normalizes blood glucose, and improves insulin sensitivity in diabetic mice." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A</u> **99**(17): 11357-11362.
- Zou, J. X., Y. Liu, et al. (2002). "Activated SRC oncogene phosphorylates R-ras and suppresses integrin activity." J Biol Chem **277**(3): 1824-1827.