

Université du Québec

INRS-Institut Armand-Frappier

Translocation nucléaire de la PKC- α en réponse à l'IFN- γ
dans les macrophages : rôle de la p38 MAPK et de PI3K

Par

Pierre-Olivier Hardy

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc) en
Virologie et Immunologie

Jury d'évaluation

Présidente du jury

Pascale Duplay, INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Viktor Steimle, Université de Sherbrooke

Directeur de recherche

Albert Descoteaux, INRS-Institut Armand-Frappier

SOMMAIRE

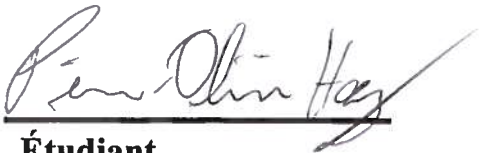
L'activation des macrophages est une étape clef dans l'établissement de leurs capacités microbicides pour la destruction d'un pathogène, l'élimination d'une cellule apoptotique et l'activation de l'immunité adaptative. Cette stimulation est induite par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ qui modulent plusieurs réponses cellulaires par la stimulation de diverses voies de signalisation intracellulaires. Parmi ces intermédiaires, certains membres de la famille des protéines kinases C (PKC) sont impliqués dans plusieurs réponses induites par cette cytokine. Notamment, la PKC- α est activée par l'IFN- γ et module ultimement la transcription génique dans les macrophages. Par ailleurs, le rôle des PKC est déterminé par leur activation, mais aussi par leur localisation cellulaire. Ainsi, en réponse à l'IFN- γ , la PKC- α transloque au noyau des macrophages mais ses fonctions nucléaires et les mécanismes requis pour cette translocation demeurent à identifier.

Durant ce projet, nous avons tenté de mieux caractériser la translocation nucléaire de la PKC- α . Ainsi, nous avons établi l'implication de différentes cascades de signalisation activées par l'IFN- γ . Puis, nous avons caractérisé l'importance de ces voies pour l'expression de gènes induits par l'IFN- γ connus pour être modulés par la PKC- α . Enfin, nous avons établi un nouveau rôle pour la PKC- α dans la signalisation induite par l'IFN- γ .

L'absence d'un signal de localisation nucléaire traditionnel sur la molécule suggère l'activation de molécules de signalisation et/ou l'implication d'un transporteur requis pour la translocation de PKC- α . En utilisant une panoplie d'inhibiteurs pharmacologiques, nous avons démontré que la translocation nucléaire de la PKC- α requiert l'activité de la p38 MAPK et de la PI3-K. Nous avons aussi déterminé que la translocation de la PKC- α est indépendante de sa propre activité ainsi que de celle de la protéine JAK2 associée au récepteur de l'IFN- γ .

À partir de ces résultats, nous avons déterminé que les mécanismes d'activation de la MAPK p38 et de la PI3-K sont indépendants et ne requièrent pas l'activité de la JAK2. De plus, ces cascades ne sont pas impliquées dans l'activation de la PKC- α .

Enfin, nous avons établi que l'expression de CIITA et du CMH II ne requiert pas la translocation nucléaire de la PKC- α puisque leur synthèse n'est pas affectée par l'inhibition de la p38 MAPK, mais implique l'activité de PKC- α . L'activation de la PKC- α est aussi requise pour la phosphorylation du résidu Ser727 du facteur de transcription STAT1. En somme, nous avons déterminé que l'IFN- γ induit la translocation nucléaire de PKC- α par l'intermédiaire de la MAPK p38 et de PI3K, mais cette translocation est indépendante de l'activité de la kinase, et n'est pas requise pour l'expression de gènes précédemment définis comme dépendant de PKC- α .


Étudiant


Directeur de recherche

Table des matières

SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	x
INTRODUCTION.....	1
REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
1. MACROPHAGE.....	5
2. INTERFÉRON.....	5
2.1. Historique et classification.....	5
2.1.1. Interférons types I et III.....	7
2.1.2. Interféron type II.....	7
2.2. Production.....	8
2.3. Signalisation de l'IFN- γ	8
2.3.1. Récepteur.....	8
2.3.2. JAK.....	10
2.3.3. STAT.....	11
2.3.4. Voie JAK/STAT.....	12
2.3.5. Régulation négative.....	13
2.4. Régulation des réponses à l'IFN- γ	14
2.4.1 Régulation de l'expression du gène <i>CIITA</i>	15
2.5. Phosphorylation sur sérine de STAT1.....	16
2.6. Signalisation indépendante de STAT1.....	16
2.7. MAPK.....	19
2.7.1. Activation des MAPK.....	19
2.7.2. p38 MAPK.....	19
2.7.3. ERK.....	20
2.7.4. JNK.....	20
2.7.5. MAPK et IFN- γ	20
2.8. Src.....	21
2.8.1. Src et IFN- γ	21
2.9. PI3-K.....	22
2.9.1. PI3-K et Akt.....	22
2.9.2. PI3-K et IFN- γ	23
3. PKC.....	23

3.1. Structure.....	24
3.2. Activation.....	25
3.2.1 Phosphorylation.....	25
3.2.2 Relocalisation intracellulaire et cofacteurs d'activation.....	26
3.3. PKC et IFN- γ	27
ARTICLE.....	28
DISCUSSION.....	62
CONCLUSION.....	73
REMERCIEMENTS.....	76
LISTE DES RÉFÉRENCES.....	77

Liste des abréviations

BMM : Macrophages dérivés de la moelle osseuse

CIITA : Transactivateur du CMH II

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

DAG : Diacylglycérol

EGFP : Protéine de fluorescence verte potentialisée

ERK : Kinase régulée par un signal extracellulaire (« Extracellular-signal-regulated kinase »)

GAS : Séquence activée par l'IFN- γ (« IFN- γ -activated sequence »)

IFN : Interféron

IFNGR : Récepteur à l'IFN- γ

IRF : Facteur régulateur de l'IFN (« IFN regulatory factor »)

ISRE : Élément de réponse à la stimulation par l'IFN (« IFN-stimulated responsive element »)

JAK : Janus tyrosine kinase

JNK : kinase JUN N-terminale

LPS : Lipopolysaccharide

MAPK : Protéine kinase activée par des agents mitogènes (« Mithogen-activated protein kinase »)

MCP : Protéine chimiotactique des monocytes

MEF : Fibroblaste embryonnaire murin

PDK : Kinase dépendante des phosphoinositides-3'

PI3-K : Phosphatidylinositol-3 kinase

PIAS : Protéine inhibitrice des STATs activés

PIP : Phosphatidylinositol phosphate

PKC : Protéine kinase C

PLC : Phospholipase-C

PS : Phosphatidyl-sérine

PTP : Protéine tyrosine phosphatase

SHP : Protéine phosphatase contenant un domaine SH2

SH : Domaine d'homologie à Src

SOCS : Suppresseur de signalisation des cytokines

STAT : Transducteur de signal et activateur de la transcription

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Le récepteur à l'IFN- γ (IFNGR).....	9
Figure 2 : Structure générale des JAKs.....	10
Figure 3 : Structure générale des STATs.....	11
Figure 4 : Cascade JAK/STAT.....	13
Figure 5 : Cascades de signalisation indépendantes de STAT1.....	17
Figure 6 : Sous-familles et structures des PKCs.....	25
Figure 7 : Schéma d'activation des PKCs classiques.....	26
Figure 8 : Différentes voies de signalisation impliquant la PKC- α et activées en réponse à l'IFN- γ	75
Tableau 1 : Les membres de la famille des IFNs.....	6
Tableau 2 : Expression génique dépendante et indépendante de STAT1 en réponse à l'IFN- γ	18

INTRODUCTION

L'IFN- γ est une cytokine pro-inflammatoire de première importance dans l'établissement d'une réponse immunitaire efficace. Elle est synthétisée principalement par les lymphocytes T et les cellules NK suite à leur activation et est impliqué dans une multitude de réponses. Parmi celles-ci, l'activation des capacités microbicides des macrophages est une étape majeure dans l'élimination d'un pathogène. Pour ce faire, l'IFN- γ active différentes cascades de signalisation suite à sa liaison par son récepteur. Outre la voie bien caractérisée JAK/STAT, l'IFN- γ active plusieurs molécules regroupées comme STAT-indépendantes. Parmi celles-ci, l'importance de certains membres de la superfamille des PKC fut démontrée dans plusieurs systèmes. Par exemple, l'activité du facteur de transcription IRF-1 requiert une modification par la PKC- α , indépendamment de la voie JAK/STAT. Par ailleurs, l'activité des différentes PKC et leur spécificité est régulée par des seconds messagers requis pour leur activation, le type cellulaire ainsi que leur localisation sub-cellulaire. D'ailleurs, nous avons déjà démontré que l'IFN- γ induit la translocation nucléaire de la PKC- α dans des macrophages RAW264.7 transitoirement transfectés avec une construction PKC- α -EGFP. Alors que son rôle dans le cytoplasme est déjà bien documenté, son rôle dans le noyau demeure inconnu. D'autre part, l'absence d'un signal de localisation nucléaire conventionnel et la taille importante de la PKC- α suggèrent l'implication d'autres mécanismes qui restent à déterminer.

Ainsi, au cours de ce projet nous avons vérifié par microscopie confocale l'importance de différentes molécules de signalisation dépendante et indépendante de STAT1 pour la translocation nucléaire de la construction PKC- α -EGFP transfectée de façon transitoire dans la lignée de macrophages murins RAW264.7. Pour vérifier l'implication des différentes molécules, nous avons utilisé une panoplie d'inhibiteurs pharmacologiques. Ainsi, nous avons pu établir l'importance de la MAPK p38 et de la PI3K dans la translocation de la PKC- α .

À partir de ces résultats, nous avons entrepris de mieux caractériser l'activation de ces deux voies en réponse à l'IFN- γ . Pour ce faire, nous avons étudié par immunobuvardage l'impact des inhibiteurs pharmacologiques sur l'activation de la MAPK p38 et de la PI3K. De plus, nous avons déterminé l'importance de ces deux

molécules dans l'activation de la PKC- α . Enfin, nous avons vérifié l'implication de la MAPK p38 et de la PI3K au niveau de l'expression de gènes dont l'expression est dépendante de l'activité de PKC- α , soit CIITA et CMH II. Pour ce faire, nous avons évalué par RT-PCR l'expression d'ARNm pour ces deux gènes.

REVUE DE LITTÉRATURE

1. Macrophage

Depuis l'énoncé de l'hypothèse de la phagocytose par Metchnikoff il y a plus d'un siècle (1884), plusieurs types cellulaires ont été identifiés pour leur capacité à ingérer des particules potentiellement pathogènes et des cellules altérées de l'hôte (Hirsch 1959; Tauber 2003). Ces cellules protectrices sont nommées phagocytes professionnels. La phagocytose définit l'internalisation de larges particules (diamètre supérieur à 0,5 μm) et requiert la réorganisation du cytosquelette d'actine. Chez les vertébrés supérieurs, les phagocytes professionnels regroupent les cellules dendritiques (CD), les leucocytes polymorphonucléaires (PMN) et les monocytes/macrophages (Rabinovitch 1995; Friedl, den Boer *et al.* 2005; Stuart and Ezekowitz 2005). Ces derniers forment un groupe particulier si l'on considère leur position centrale à l'interface de l'immunité innée et acquise. En effet, les particules internalisées sont dégradées par l'action microbicide des phagolysosomes du macrophage. Les fragments antigéniques potentiellement générés sont alors présentés aux lymphocytes T CD4^+ spécifiques qui activent en retour l'immunité acquise et les macrophages eux-mêmes (Fearon and Locksley 1996; Frucht, Fukao *et al.* 2001). L'activation des macrophages et de leurs capacités microbicides résultent de l'exposition à diverses cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron gamma ($\text{IFN-}\gamma$). La stimulation des macrophages implique donc l'activation de cascades de signalisation modulatrices lors d'une réponse spécifique au stimulus.

2. Interféron

2.1 Historique et classification

Première cytokine purifiée, clonée et exprimée de façon recombinante, l'interféron (IFN) fut initialement décrit pour sa capacité à interférer avec la réplication virale (Stark, Kerr *et al.* 1998; Pestka, Krause *et al.* 2004; Schroder, Hertzog *et al.* 2004; Billiau 2006). Tout d'abord divisés selon les types cellulaires sécrétoires, les IFNs forment maintenant trois groupes, types I, II et III, qui se distinguent par la spécificité qu'ils possèdent pour leur récepteur, par le taux d'homologie de leur séquence, par la nature des stimuli requis pour leur expression et enfin, par les voies de signalisation impliquées (Tableau 1).

Tableau 1. Les membres de la famille des IFNs. (Traduit de Takaoka 2006) (Takaoka and Yanai 2006)

Types	Sous-types	Récepteurs	Locus génique ^a	Résidus Acide Aminés	Masse Moléculaire (kDa)	Patron d'expression
I	IFN- α	IFNAR-1/IFNAR2	9p21	165–166 ^b	15–23	Expression ubiquitaire
	IFN- β	IFNAR-1/IFNAR2	9p21	166 ^b	15–23	Expression ubiquitaire
	IFN- δ^c	IFNAR-1/IFNAR2	None	170	20	Trophoblastes
	IFN- ϵ	IFNAR-1/IFNAR2	9p21	208	24.4	Utérus, ovaires
	IFN- ω	IFNAR-1/IFNAR2	9p21	172 ^b	20–23	Leukocytes
	IFN- κ	IFNAR-1/IFNAR2	9p21	180 ^b	24.5	Exprimé sélectivement dans les kératinocytes épidermique
	IFN- τ^d	IFNAR-1/IFNAR2	None	191 ^b	20–22	Trophoblastes
	IFN- ζ^e	IFNAR-1/IFNAR2	None	161 ^b	20	Rate, thymus, ganglions lymphatiques
II	IFN- γ^f	IFNGR-1/IFNGR2	12q24.1	146 ^b	34	Cellules T activées, macrophage, NK
III	IFN- λ 1 (IL-29)	IL-28R α /IL-10R2	19q1	200	20–33 ^g	Expression ubiquitaire
	IFN- λ 2 (IL-28A)	IL-28R α /IL-10R2	19q1	200	22	Expression ubiquitaire
	IFN- λ 3 (IL-28B)	IL-28R α /IL-10R2	19q1	196	22	Expression ubiquitaire
a. Humain.						
b. Les peptides signal ne sont pas inclus						
c. Trouvé seulement chez le porc et le bétail.						
d. Trouvé seulement chez les ruminants.						
e. Trouvé seulement chez la souris.						
f. Agit comme homodimère.						
g. Due à sa glycosylation.						

2.1.1 IFN types I et III

Les IFNs de type I (IFN $-\alpha$, $-\beta$, $-\epsilon$, $-\kappa$, $-\omega$, $-\delta$, $-\tau$) sont tous reconnus par un récepteur commun, le récepteur à l'IFN type I (IFNAR), un hétérodimère formé des chaînes IFN α R1 et IFN α R2. Il faut noter que seuls les isoformes α , β , ϵ , κ , ω sont exprimés chez l'humain alors que l'expression des isoformes δ et τ est restreinte au porc et au bœuf respectivement. Tous les gènes des IFNs de type I sont regroupés sur le chromosome 9 chez l'humain (Schroder, Hertzog *et al.* 2004). Découvert récemment, le type III regroupe trois protéines holomogues, les IFN- λ 1 (IL-28A), $-\lambda$ 2 (IL-28B), $-\lambda$ 3 (IL-29), dont les gènes sont tous situés sur le chromosome 19 humain (Kotenko, Gallagher *et al.* 2003; Sheppard, Kindsvogel *et al.* 2003). Bien qu'induits en réponse à une infection virale comme les IFNs de type I, les membres du type III sont structurellement différents et utilisent un récepteur distinct formé de l'IFN- λ R1 (ou IL-28R α ou CRF2-12) et de la sous-unité IL-10R2 (Kotenko, Gallagher *et al.* 2003). Cette dernière étant commune aux récepteurs de l'IL-10, l'IL-22 et de l'IL-26 (Kotenko, Gallagher *et al.* 2003; Vilcek 2003; Takaoka and Yanai 2006).

2.1.2 IFN type II

Contrairement aux IFNs type I qui rassemblent la majorité des isoformes, le type II ne regroupe qu'un sous-type, l'IFN- γ . Celui-ci lie spécifiquement le récepteur de type II, l'IFN γ R, un hétérodimère formé des chaînes IFN γ R1 (ou α) et IFN γ R2 (ou β). La cytokine elle-même est un homodimère non-covalent composé de 2 chaînes polypeptidiques de 17 kDa glycosylées et associées de façon antiparallèle (Bach, Aguet *et al.* 1997). De plus, la cytokine possède une séquence signal de localisation nucléaire permettant son import au noyau cellulaire suite à son internalisation (Subramaniam, Larkin *et al.* 2000; Ahmed and Johnson 2006). Comme les IFNs de type I ou de type III, l'IFN- γ est induit en réponse à une infection ou à un stress particulier. Contrairement aux IFNs de type I et de type III, qui sont synthétisés de façon ubiquitaire, l'IFN- γ est limité à

certains types cellulaires du système immunitaire (cellules NK, lymphocytes T) (Takaoka and Yanai 2006).

2.2 Production

Comme nous l'avons évoqué, l'infection de l'organisme par un virus induit la synthèse et la sécrétion d'IFNs de type I et III chez la majorité des types cellulaires, alors que la synthèse d'IFN- γ est restreinte aux cellules immunitaires. En effet, les cellules NK, les lymphocytes T CD4⁺ et les T CD8⁺ sont les principales cellules sécrétrices d'IFN- γ . Cette sécrétion se fait notamment en réponse à l'IL-18, en synergie avec l'IL-12, libérées par les cellules présentatrices d'antigènes (Frucht, Fukao *et al.* 2001; Shtrichman and Samuel 2001). Cependant, des études ont aussi attribué aux cellules myéloïdes une certaine capacité de production et de sécrétion d'IFN- γ en réponse à divers stimuli tels que l'IL-12 et l'IL-18 (Frucht, Fukao *et al.* 2001; Bogdan and Schleicher 2006).

2.3 Signalisation de l'IFN- γ

L'IFN- γ est une cytokine pro-inflammatoire qui active la cellule cible par la liaison à son récepteur spécifique présent à la surface cellulaire. Suite à sa reconnaissance par le récepteur, l'IFN module les réponses cellulaires par la transmission de signaux par le récepteur. L'activation subséquente implique diverses cascades de signalisation intracellulaires qui régulent, positivement ou négativement, les réponses cellulaires.

2.3.1 Récepteur

Le récepteur à l'IFN- γ (IFNGR) est un double homodimère formé de 2 sous-unités α (IFN γ R1) et deux sous-unités β (IFN γ R2) qui s'assemblent à la surface cellulaire lors de la liaison de la cytokine (Figure 1; Greenlund, Schreiber *et al.* 1993; Bach, Tanner *et al.* 1996). Le récepteur représente le premier niveau de modulation de la réponse cellulaire en transmettant le signal d'activation de la cytokine (extracellulaire) à l'environnement

intracellulaire. Tout d'abord, l'expression de la sous-unité α , bien qu'induite par différents stimuli, est ubiquitaire et souvent retrouvée en excès à la surface cellulaire. Cependant, l'expression de la chaîne β est finement contrôlée (Schroder, Hertzog *et al.* 2004; Regis, Conti *et al.* 2006) notamment selon le stade de différenciation cellulaire. Contrairement à la sous-unité β , dont la portion cytoplasmique est négligeable, la sous-unité α possède une longue queue cytoplasmique, ce qui suggère un rôle prépondérant dans la signalisation intracellulaire. Cependant, l'absence d'activité catalytique intrinsèque des deux sous-unités (Ihle 1995) implique l'activation des cascades de signalisation modulées par d'autres molécules associées au récepteur. Ainsi, les sous-unités α et β de l'IFNGR sont associées à des Janus tyrosine kinases (JAK), respectivement JAK 1 et JAK 2. La liaison de l'IFN- γ à son récepteur induit donc l'assemblage d'un récepteur fonctionnel et l'activation de différentes voies de signalisation dont la voie JAK/STAT.

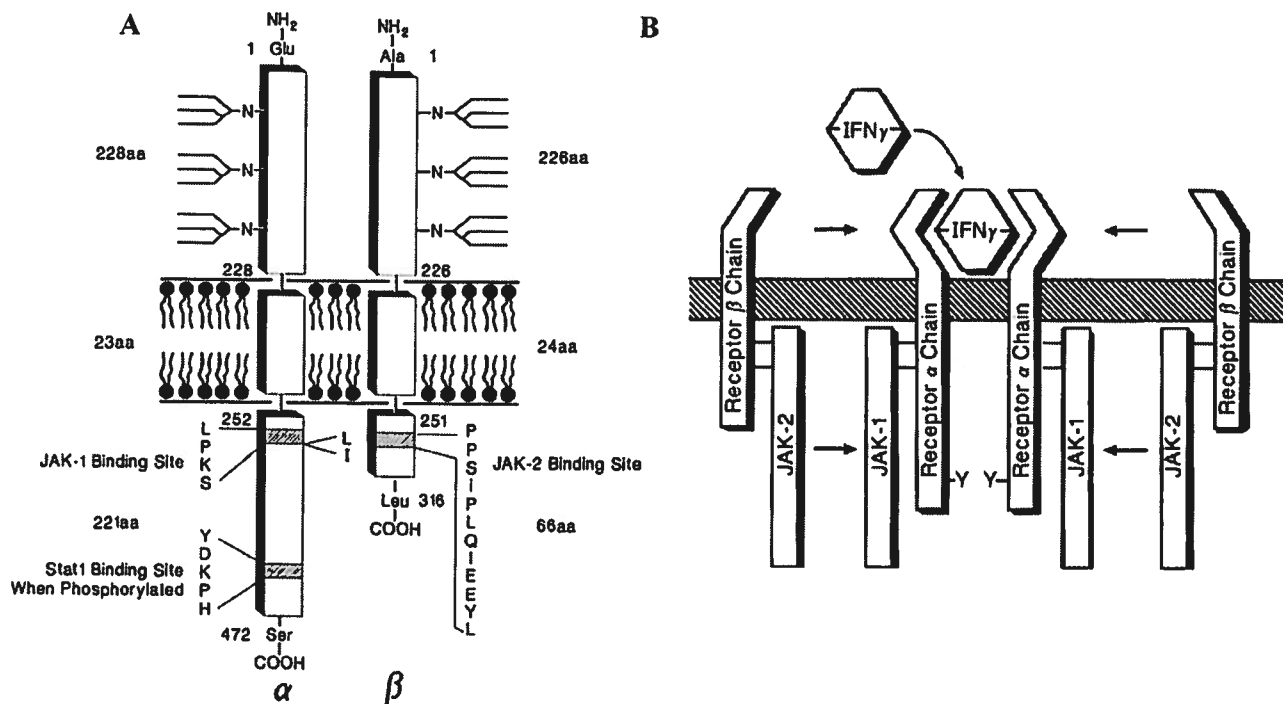


Figure 1 : Le récepteur à l'IFN- γ (IFNGR) : (A) Structure générale des deux sous-unités (α , β) du récepteur ainsi que les sites de liaison et de phosphorylation des protéines associées. (B) Assemblage à la membrane des sous-unités de l'IFNGR et des JAKs associées induit lors de la liaison de l'IFN- γ . (Adaptées de BACH 1997) (Bach, Aguet *et al.* 1997)

2.3.2 JAK

Les protéines tyrosines kinases de la famille Janus (JAK) sont donc des intermédiaires essentiels de la signalisation induites par l'IFN- γ . Elles regroupent 4 membres, JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk 2 (Figure 2; Costa-Pereira, Hermanns *et al.* 2005; Platanius 2005). Les JAKs sont des protéines d'environ 130 kDa, composées de 7 domaines d'homologie à JAK (JH1 à 7). Parmi ceux-ci, il faut noter la présence d'un domaine kinase en C-terminal (JH1) ainsi que d'un domaine adjacent pseudo-kinase (domaine kinase-like) (JH2) déficient en certains résidus indispensables à l'activité catalytique (Briscoe, Guschin *et al.* 1996; Haan, Kreis *et al.* 2006). Les JAKs sont dépourvues de domaine d'homologie à Src 2 ou 3 (SH2 ou SH3) (Ihle 1995; Valentino and Pierre 2006). Leur activité est plutôt modulée par leurs domaines JH et les molécules auxquelles elles sont associées. Ainsi, alors que JAK1 et JAK2 sont constitutivement associées à leur sous-unité respective du récepteur à l'IFN- γ , l'IFN α R est préférentiellement lié à JAK1 et Tyk2. Enfin, bien que JAK1, JAK2 et Tyk2 soient exprimés de façon ubiquitaires, l'expression de JAK3 est quant à elle restreinte aux cellules hématopoïétiques (myéloïdes et lymphoïdes) (Ihle 1995; Endo, Masuhara *et al.* 1997).

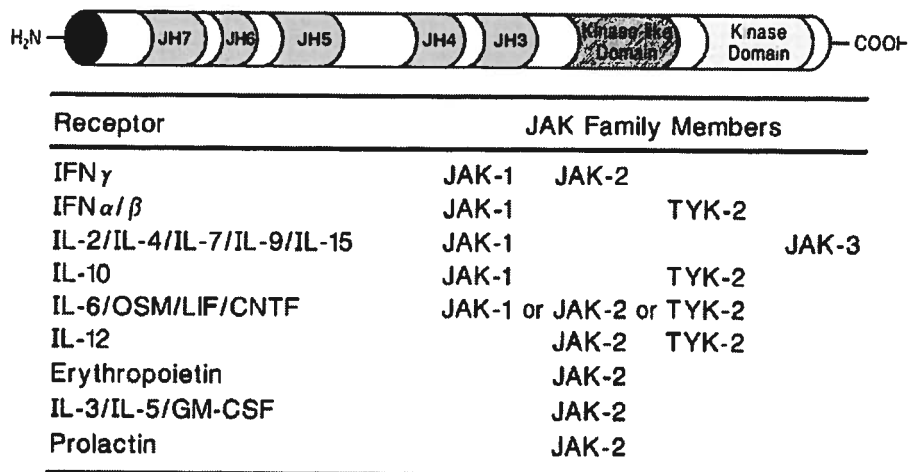
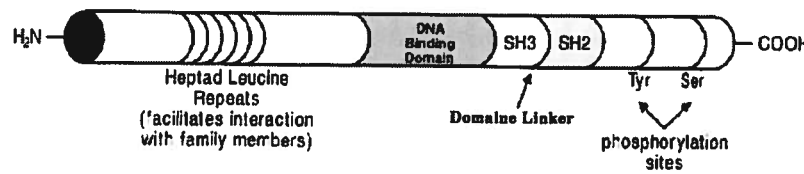


Figure 2 : Structure générale des JAKs ainsi que les récepteurs auxquels ils sont associés. (Bach, Aguet *et al.* 1997)

2.3.3 STAT

À l'origine identifié comme le facteur de transcription des IFNs, les « Signal-Transducer and Activator of Transcription » (STAT) sont aujourd'hui impliqués dans la réponse induite par plus de 50 cytokines et facteurs de croissance (Subramaniam, Torres *et al.* 2001). Ils regroupent 7 facteurs de transcription retrouvés chez les mammifères, soit STAT 1-4, STAT 5 A et B (>90% d'homologie) et STAT 6 (Figure 3). Avec un poids se situant entre 90 et 115 kDa, les STATs sont composés de 6 domaines aux fonctions particulières (Horvath 2000; Brierley and Fish 2005).

Tout d'abord, l'extrémité N-terminale stabilise les interactions dimère/dimère STAT et facilite la formation de tétramères sur les éléments GAS et ISRE qui sont alignés en tandem lors de l'activation de la transcription (Brierley and Fish 2005). Un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison (« Linker ») sont juxtaposés en C-terminal. Ce domaine de liaison est intercalé entre le domaine de liaison à l'ADN et un domaine SH2 et semble impliqué au niveau transcriptionnel. Par ailleurs, le domaine de liaison phosphotyrosine SH2 est plutôt requis pour la liaison au récepteur. Enfin, l'extrémité C-terminale contient un domaine d'activation de la transcription (TAD) modulant l'activité transcriptionnelle, l'interaction avec plusieurs coactivateurs nucléaires et ce domaine facilite également les modifications de la chromatine (Brierley and Fish 2005).



Receptor	STAT Protein Utilized
IFN γ , IFN α/β	STAT1
IFN α/β	STAT2
IL-6R family, IL-10, GH, EGF	STAT3
IL-12	STAT4
IL-2R, & IL-3R family, PRL, EPO	STAT5
IL-4	STAT6

Figure 3 : Structure générale des STATs ainsi que les cytokines qui les activent. (Adapté de Bach, Aguet *et al.* 1997)

2.3.4 Voie JAK/STAT

La liaison de l'IFN- γ à 2 sous-unités α , constitutivement présentes à la surface cellulaire, induit l'assemblage d'un récepteur fonctionnel par la liaison d'une sous-unité β à chaque sous-unités α (Figure 4) (Greenlund, Schreiber *et al.* 1993; Igarashi, Garotta *et al.* 1994; Bach, Aguet *et al.* 1997). La proximité des sous-unités α et β permet l'autophosphorylation et l'activation de JAK2 qui trans-phosphoryle JAK1 (Sakatsume, Igarashi *et al.* 1995; Kaplan, Greenlund *et al.* 1996). Puis, par l'ajout d'un groupement phosphate au résidu Tyr440 de chaque sous-unité α du récepteur, JAK1 permet l'ouverture de 2 sites de liaison aux domaines SH2 de STAT1, latent dans le cytoplasme des cellules au repos (Igarashi, Garotta *et al.* 1994; Sakatsume, Igarashi *et al.* 1995; Schroder, Hertzog *et al.* 2004).

Les 2 molécules STAT1 ainsi recrutées sont alors phosphorylées, potentiellement par JAK2, à la position Tyr701 (Briscoe, Guschin *et al.* 1996; Briscoe, Rogers *et al.* 1996; Schroder, Hertzog *et al.* 2004). Les STAT1 phosphorylés se dissocient du récepteur pour former un homodimère STAT1-STAT1 (nommé facteur activé par l'IFN- γ (GAF)) dans le cytoplasme (Takaoka and Yanai 2006). L'homodimère transloque alors au noyau pour activer la transcription de gènes de réponse à l'IFN en liant les éléments GAS (« gamma-activated sequences ») présents dans les promoteurs de ces gènes. L'activation de la voie JAK/STAT est aussi finement modulée par des cascades de régulation négative.

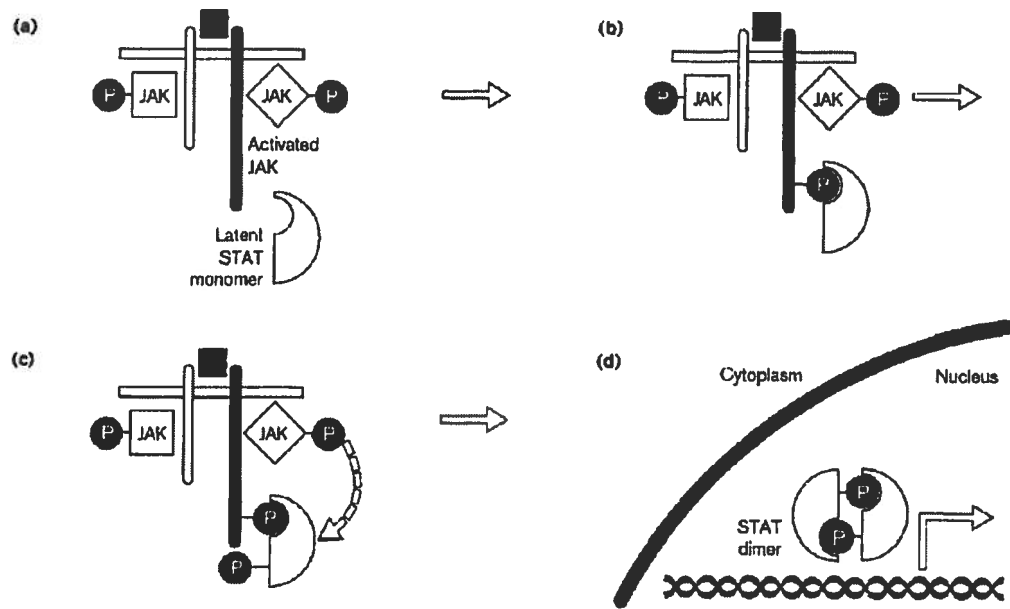


Figure 4 : Cascade JAK/STAT

(a) La multimérisation du récepteur suite à la liaison de la cytokine induit l'activation des JAKs associées à leur sous-unité respective. (b) Les JAKs activées induisent l'ouverture d'un site de liaison sur le récepteur pour le facteur de transcription STAT, jusqu'alors libre dans le cytoplasme. (c) Le recrutement de STAT au récepteur permet sa phosphorylation par les JAKs associées. (d) STAT phosphorylé est relâché dans le cytoplasme, où il forme un homodimère capable de transloquer au noyau. Le dimère active alors la transcription de gènes de réponse à la cytokine. (Liu, Gaffen *et al.* 1998)

2.3.5 Régulation négative

Une exposition prolongée à l'IFN- γ induit non seulement l'arrêt de la croissance, mais aussi l'apoptose de la cellule (Schroder, Hertzog *et al.* 2004; Pokrovskaja, Panaretakis *et al.* 2005). Afin de contrôler cette réponse, l'activation cellulaire est régulée négativement par divers mécanismes tels la déphosphorylation de substrats activés, l'obstruction du site catalytique de tyrosines kinases ou par l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de STAT1.

Il a été démontré que les cellules expriment constitutivement des protéines tyrosines phosphatases (PTP) telles que les phosphatases contenant un domaine SH2 (« SH2-containing phosphatases ») (SHP) -1 et -2. Ces deux protéines sont notamment impliquées dans l'inhibition de la phosphorylation du résidu Tyr701 et de la translocation nucléaire de STAT1 par la déphosphorylation de JAK1/2 (You, Yu *et al.* 1999; Minoo, Zadeh *et al.* 2004).

Alors que l'expression des SHP est constitutive, les membres de la famille des SOCS (Suppresseurs de signalisation des cytokines) sont induits par divers stimuli dont l'IFN- γ . Cette famille regroupe les SOCS 1 à 7 et CIS, mais seule SOCS 1 (aussi appelée JAB) semble impliquée dans la régulation de la voie JAK/STAT1 (Song and Shuai 1998; Wormald, Zhang *et al.* 2006). En effet, l'expression de SOCS1 est induite par STAT1 et elle régule la signalisation en occupant le domaine catalytique de JAK 1/2 via une liaison SH2-JH1 (Endo, Masuhara *et al.* 1997; Starr, Willson *et al.* 1997; Sakamoto, Yasukawa *et al.* 1998; Valentino and Pierre 2006; Wormald, Zhang *et al.* 2006).

La réponse JAK/STAT est aussi modulée négativement au niveau de STAT. Parmi les 4 membres de la famille des protéines inhibitrices des STATs activés (PIAS1, 3, X et Y), seules PIAS1 et PIASY sont des inhibiteurs de l'activité transcriptionnelle dépendante de STAT1 (Shuai and Liu 2003, 2005). Alors que PIAS1 inhibe la liaison de STAT1 à l'ADN, bloquant ainsi l'induction de la transcription génique, PIASY module quant à lui l'activité de STAT1 sans affecter la liaison à l'ADN (Liu, Liao *et al.* 1998; Liu, Gross *et al.* 2001; Liu, Mink *et al.* 2004).

2.4 Régulation des réponses à l'IFN- γ

L'expression de gènes de réponses à l'IFN- γ est modulée à plusieurs niveaux. Outre la régulation négative déjà décrite, l'IFN- γ induit la transcription de gènes particuliers en fonction du temps de stimulation. Rapidement après le début de la stimulation, la liaison du facteur de transcription STAT1 aux sites GAS des promoteurs de gènes de réponse à l'IFN- γ (ex : IRF-1) induit leur expression précoce (Stark, Kerr *et*

al. 1998). Dans une phase plus tardive, une seconde vague d'expression génique est induite notamment par la liaison du facteur de transcription IRF-1 aux séquences ISRE (Élément répondant à la stimulation par l'IFN) des promoteurs de gènes particuliers. Parmi ces gènes, notons le transactivateur du CMH II (CIITA), un co-activateur transcriptionnel ne liant pas l'ADN mais requis pour l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) (Steimle, Otten *et al.* 1993). Le CMH II est la molécule qui permet la présentation d'antigènes aux lymphocytes T CD4⁺ par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que le macrophage. L'expression de CIITA est induite par la liaison de STAT1, de IRF-1 et du facteur constitutif USF-1 aux sites GAS, ISRE et E-box respectivement au niveau du promoteur IV (pIV) du gène *CIITA* (pVI-CIITA) (Muhlethaler-Mottet, Di Berardino *et al.* 1998; Pai, Askew *et al.* 2002).

2.4.1 Régulation de l'expression du gène *CIITA*

Tel que mentionné précédemment, l'expression du CMH II requiert la synthèse du trans-activateur CIITA. Il s'agit d'un co-activateur ne liant pas l'ADN, dont l'expression est modulée par l'usage alternatif de trois promoteurs distincts, soit pI, pIII et pIV. Ces promoteurs génèrent des transcrits d'ARNm qui diffèrent au niveau de la taille de l'exon 1 et de leur stabilité. De plus, leur activité dépend du type cellulaire et du stimulus observé (Nikceovich, Piskurich *et al.* 1999; Waldburger, Suter *et al.* 2001; Pai, Askew *et al.* 2002). Ainsi, pI et pIII sont respectivement requis pour l'expression constitutive du gène *CIITA* dans les cellules dendritiques et dans les lymphocytes B, alors que l'activité du promoteur IV est induite par l'IFN- γ dans les cellules présentatrices d'antigènes. Cependant, ce clivage d'expression n'est pas absolu et plus d'un promoteur peut être actif simultanément dans un même type cellulaire. Par exemple, les macrophages au repos expriment le CIITA type I (promoteur I) et très peu de CIITA type IV (promoteur IV). Cependant, ce ratio est modifié lors d'une stimulation à l'IFN- γ , induisant une forte augmentation du niveau d'expression des types I et IV jusqu'à ce qu'ils atteignent des niveaux similaires (Muhlethaler-Mottet, Di Berardino *et al.* 1998; Pai, Askew *et al.* 2002).

2.5 Phosphorylation sur sérine de STAT1

La phosphorylation du résidu Tyr701 est essentielle à la translocation nucléaire et à l'activité transcriptionnelle de STAT1. Cependant, l'activation optimale et l'expression de certains gènes de réponse à l'IFN- γ requiert le transfert d'un groupement phosphate au résidu Ser727 (Kovarik, Mangold *et al.* 2001). Selon les types cellulaires étudiés, différentes molécules furent associées à cette fonction. Par exemple, il fut démontré que l'IFN- γ active les cascades de PI3-K/Akt et de PKC- ϵ . Ces derniers activent ERK1/2 MAPK qui est requis pour la phosphorylation de STAT1 sur Ser727 et l'expression de MCP-1 dans les monocytes. L'expression de MCP-1 permet le recrutement des macrophages activés au site d'infection (Choudhury 2004; Venkatesan, Mahimainathan *et al.* 2006). Par ailleurs, l'expression du transactivateur CIITA qui est requise pour la synthèse du CMH II en réponse à l'IFN- γ , nécessite la phosphorylation du résidu sérine 727 de STAT1 par PKC- δ dans les macrophages murins et les promyélocytes (Deb, Sassano *et al.* 2003; Kwon, Yao *et al.* 2007). Enfin, le résidu Ser727 de STAT1 est situé au sein d'un motif consensus flanqué de résidus proline, ce qui suggère l'interaction possible avec des MAPK (Wen, Zhong *et al.* 1995; Kovarik, Stoiber *et al.* 1999). Bien que l'implication de p38 MAPK soit confirmée dans les cellules HeLa (Goh, Haque *et al.* 1999), il semble qu'elle se limite à la réponse au stress dans les macrophages (Kovarik, Stoiber *et al.* 1999; Ramsauer, Sadzak *et al.* 2002). Donc, outre la modulation de l'activité transcriptionnelle de STAT1 par la phosphorylation de son résidu tyrosine 701, l'IFN- γ induit aussi l'activation de plusieurs voies de signalisation menant à la phosphorylation du résidu sérine 727.

2.6 Signalisation indépendante de STAT1

Ainsi, l'IFN- γ active également d'autres voies ou molécules de signalisation indépendantes de STAT1. D'ailleurs, Ramana *et al.* (2001; 2002) a démontré que les fibroblastes murins déficients en STAT1 conservent un certain niveau de réponse à la stimulation par l'IFN- γ (Tableau 2 et figure 5; Ramana, Gil *et al.* 2001; Ramana, Gil *et al.*

2002). Parmi les voies de signalisation activées indépendamment de STAT1, les MAPK Pyk2 et ERK1/2, la kinase de la famille Src Fyn, les molécules associées aux protéines-G C3G et Rap1 (Ras-GTPase-activating protein-1), les protéines adaptatrices Vav, CrkL, CrkII et c-Cbl ainsi que certaines isoformes de la famille des PKC tel que PKC- δ et - ϵ furent définies dans différents systèmes cellulaires (Uddin, Sher *et al.* 1997; Plataniias, Uddin *et al.* 1999; Takaoka, Tanaka *et al.* 1999; Alsayed, Uddin *et al.* 2000; Decker and Kovarik 2000; Ramana, Gil *et al.* 2002; Deb, Sassano *et al.* 2003; Venkatesan, Mahimainathan *et al.* 2006). De plus, l'IFN- γ induit l'activation de la PI3-K, puis de sa protéine effectrice Akt, ainsi que de la p38 MAPK, notamment dans les macrophages murins (Ramsauer, Sadzak *et al.* 2002; Navarro, Anand-Apte *et al.* 2003; Sun and Ding 2006; Yao, Xu *et al.* 2006).

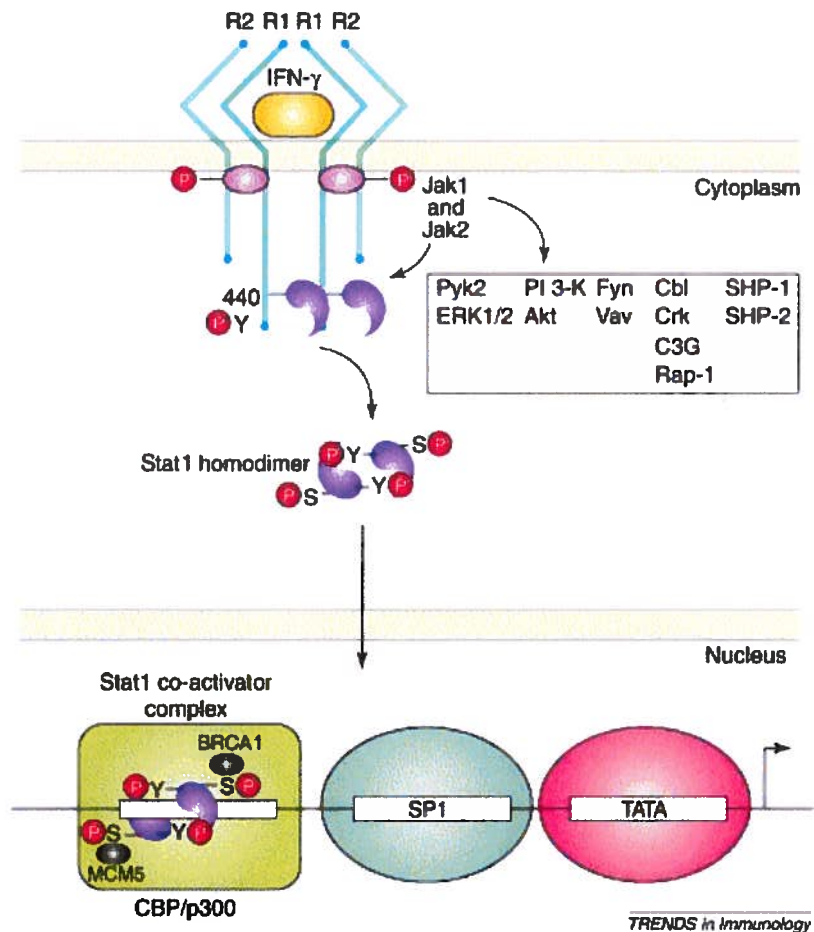


Figure 5 : Cascades de signalisation indépendantes de STAT1. (Ramana, Gil *et al.* 2002)

Tableau 2 : Expression génique dépendante et indépendante de STAT1 dans les macrophages en réponse à l'IFN- γ . (Ramana, Gil *et al.* 2002)

Cell type	Gene	Fold-change in expression	Function
Wild-type	SOCS-1	123	Cytoplasmic: regulation
	MIP-1 β	32	Secreted; chemokine
	MCP-1	22	Secreted; chemokine
	Zyxin	22	Cell motility
	MIG	20	Secreted; chemokine
	IP-10	20	Secreted; chemokine
	SOCS-3	13	Cytoplasmic: regulation
	IRF-1	11	Transcription
	IRG-47	9.8	G-protein: regulation
	LRG-47	9.5	G-protein: regulation
	Ro RNP	9.4	Cell metabolism (suggested)
	p204	9.4	Cell-cycle regulation
	p203	9.0	Cell-cycle regulation
	MIP-1 α receptor	8.7	Chemokine receptor
	GARG-39	7.6	Cell communication (suggested)
	Talin	7.1	Adhesion
	IGTP	6.7	Antimicrobial resistance
	TGTP	6.5	Antiviral resistance
	p202	6.4	Cell-cycle regulation
	Tissue factor (mtf)	5.1	Coagulation
	TPL-2/Cot	4.7	Proto-oncogene: kinase
	Fibronectin	4.5	Extracellular matrix
	ICH-3	4.4	Apoptosis
	PIM-1	4.3	Proto-oncogene; cell proliferation
	GRO/KC	-21	Secreted; chemokine
	c-fos	-13	Oncogene; cell proliferation
	Mel-N1	-9.0	RNA-binding protein
	FAH	-6.7	Metabolism
	MKP-1	-5.5	Regulation; phosphatase
	MIP-2	-5.4	Secreted; chemokine
	TGIF	-4.4	Transcriptional co-repressor
	CXCR4	-4.0	Chemokine receptor
	Stat1 ^{-/-}	MCP-1	20
TDAG-51		12	Apoptosis
Lice2 cysteine protease		7.6	Apoptosis
IL-1 β		6.9	Secreted; cytokine
PRP8		5.0	Splicing factor
PIM-1		5.0	Proto-oncogene; cell proliferation
Fibronectin		4.1	Extracellular matrix
SOCS-3		4.0	Cytoplasmic: regulation
A-X actin		-33	Cell motility; inhibits metastasis
TI-227		-9.1	Metastasis
Melanoma X actin		-8.0	Cell motility; inhibits metastasis
MGluR8		-5.1	Receptor
Zfx		-4.5	Transcription
Rb		-4.2	Tumor suppressor

2.7 MAPK

Les MAPKs (« mitogen-activated Protein Kinases ») regroupent 4 sous-familles de sérine/thréonine kinases dont l'activation nécessite l'action en amont de kinases distinctes. Ces sous-types sont les « Extracellular-signal-regulated kinases 1 et 2 » (ERK1/2), ERK5, JUN N-terminal kinases 1, 2 et 3 (JNK) et les p38 kinases (α , β , δ et γ) (Ashwell 2006; Nishimoto and Nishida 2006). Les enzymes de cette famille ajoutent un groupement phosphate aux résidus sérine et thréonine précédant un résidu proline (Ashwell 2006; Wang and Tournier 2006).

2.7.1 Activation des MAPK

La cascade de signalisation générale des MAPKs implique l'activation d'une sérine/thréonine MAPK kinase kinase (MAPKKK) à proximité de la membrane (membrane-proximale). Cette MAPKKK est distincte selon la famille de MAPK ciblée. Par ailleurs, le substrat de la MAPKKK est une MAPKK (ou MKK) possédant une double-spécificité catalytique. Cette MKK phosphoryle son substrat (MAPK) sur un motif Thr-X-Tyr conservé de la boucle d'activation (où l'acide aminé X est conservé pour une famille de MAPK donnée). La phosphorylation induit un changement conformationnel altérant l'alignement des hémisphères de la protéine et accroît l'accessibilité au substrat (Ashwell 2006).

2.7.2 p38 MAPK

Les p38 MAPK regroupent 4 membres, p38- α , - β , - γ et - δ , encodés par des gènes différents. En réponse à des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-1 ou TGF- β , les petites GTPases Cdc42 et Rac1 activent les MAPKKK MTK1, TAK1 et ASK1, qui activent à leur tour les MAPKK MKK 3, 4 et 6 puis p38 MAPK qui modulera l'activité de divers facteurs de transcription (Ashwell 2006; Krens, Spaink *et al.* 2006). De plus, l'activité de la p38 MAPK est requise pour l'activité transcriptionnelle maximale

de STAT1 en réponse à l'IFN- γ chez les macrophages, indépendamment d'une phosphorylation du résidu Ser727 de STAT1 (Kovarik, Stoiber *et al.* 1999).

2.7.3 ERK

Parmi les « Extracellular-signal-regulated kinases » (ERK), ERK 1 et 2 sont considérés comme les isoformes principaux des MAPKs. Ils sont activés par la MAP/ERK kinase 1 (MEK1), elle-même activée par la MAPKKK Raf ou Mos. ERK 1/2 est un médiateur important de la prolifération cellulaire car il régule l'activation de différents facteurs de transcription tels que Elk1 et c-Myc (Nishimoto and Nishida 2006).

2.7.4 JNK

Les « c-Jun NH2-terminal kinases » (JNK ou SAPK) forment une famille de MAPKs activées par des cytokines de la famille TNF, via la stimulation d'un TLR ou en réponse à un stress environnemental (UV, chaleur, stress mécanique ou chimique). La cascade d'activation de JNK implique l'activité des MAPK kinases MKK4/MKK7. JNK activé phosphoryle alors plusieurs substrats dont des facteurs de transcription tels que c-Myc, ATF-2 et c-Jun (Kyriakis and Avruch 2001; Bogoyevitch and Kobe 2006).

2.7.5 MAPK et IFN- γ

L'implication des MAPKs dans diverses réponses pro-inflammatoires a été décrite dans plusieurs systèmes. Ainsi, l'expression de iNOS (« inducible nitric oxide synthase ») dans les astrocytes stimulés à l'IFN- γ en synergie avec le LPS requiert l'activité de JNK1 (Pawate and Bhat 2006). Tel que mentionné au paragraphe précédent, il fut aussi montré que l'IFN- γ induit l'activation de ERK1/2 et de p38 MAPK, qui régulent négativement l'expression du CMH II en modulant l'expression du promoteur IV du transactivateur CIITA (Yao, Xu *et al.* 2006). En effet, il a été proposé que ces deux MAPKs soient requises pour l'inhibition de l'expression du CMH II en réponse au LPS chez des

macrophages et des cellules dendritiques stimulés avec l'IFN- γ (Yao, Xu *et al.* 2006). En réponse à l'IFN- γ seul, p38 MAPK est aussi impliquée dans diverses réponses. Par exemple, comme nous l'avons mentionné précédemment, p38 MAPK est requise pour l'activation optimale de STAT1 en phosphorylant son résidu sérine (Goh, Haque *et al.* 1999). p38 MAPK est aussi impliquée dans la stabilisation de transcrits d'ARNm 3' element adenine-uridine-riche (ARE)-UTR par phosphorylation directe ou indirecte des « ARE-binding proteins » (Sun and Ding 2006). Dans ce système, l'IFN- γ induit MyD88 qui active alors un signalosome regroupant MLK3, MKK3 et p38 MAPK résultant en l'activation de cette dernière.

2.8 Src

La famille de protéines tyrosine kinases Src est composée de c-Src, Fyn, Yes, Lck, Hck, Blk, Fgr, Lyn et Yrk. L'activation de c-Src est régulée par une phosphorylation sur les tyrosines 527 et 416 (Bjorge, Jakymiw *et al.* 2000). Cependant, elle peut aussi résulter d'un changement conformationnel lors de la liaison avec différentes protéines via son domaine SH2. Par exemple, le « platelet-derived growth factor receptor » (PDGFR) et la « Focal adhesion kinase » (FAK) lient le domaine SH2 de Src, alors que le facteur de virulence Nef du virus de l'immunodéficience acquise humain (VIH)-1 et la protéine adaptatrice Sin lient le domaine SH3 de Hck et Src respectivement (Moarefi, LaFevre-Bernt *et al.* 1997; Bjorge, Jakymiw *et al.* 2000; Xing, Ge *et al.* 2000; Alexandropoulos, Donlin *et al.* 2003; Tribble, Emert-Sedlak *et al.* 2006).

2.8.1 Src et IFN- γ

Lors d'une stimulation à l'IFN- γ , Fyn s'associe à la tyrosine kinase JAK2 activée, par l'intermédiaire de son domaine SH2 (Platanias and Fish 1999). Par ailleurs, l'expression d'ICAM-1 en réponse à l'IFN- γ dans les cellules épithéliales requiert l'activation de la phospholipase-C γ (PLC-C γ) par JAK1/2. La PLC-C γ active en retour

PKC- α et Src. Ultimement, STAT1 est phosphorylé sur le résidu Tyr701, en plus de la phosphorylation directe de ce même résidu par JAK1/2 (Chang, Holtzman *et al.* 2004).

2.9 PI3-K

Il existe 4 classes de phosphatidylinositol-3 kinases (PI3-K), IA, IB, II et III, groupées selon leur spécificité de substrats et leur régulation (Foster, Tracr *et al.* 2003; Bunce, Bergendahl *et al.* 2006; Deleris, Gayral *et al.* 2006). Leur fonction principale est l'ajout d'un groupement phosphate à un ou plusieurs groupements hydroxy D3, D4 ou D5 des phosphoinositides (PI) selon la classe. Les phosphoinositides sont des phospholipides ayant un anneau inositol lié via le groupe 1'-OH. De plus, l'activité des PI3-K est régulée par leur localisation cellulaire. Sous leur forme inactive, les PI3-K sont localisées dans le cytoplasme et transloquent à la membrane lors de leur activation. Enfin, en plus de leur recrutement ou de leur association constitutive aux membranes cytoplasmiques, on retrouve certains membres des classes I et II des PI3-K dans le noyau (Bunce, Bergendahl *et al.* 2006). D'ailleurs, il semble que les PI3-K nucléaires soient recrutées et aient des fonctions semblables à celles retrouvées au niveau de la membrane cytoplasmique (Bunce, Bergendahl *et al.* 2006; Deleris, Gayral *et al.* 2006).

2.9.1 PI3-K et Akt

Les PI3-K recrutées à la membrane sont activées en réponse à divers facteurs de croissance ou cytokines du milieu. L'activité de PI3-K entraîne la génération de PI(3,4)P₂ et de PI(3,4,5)P₃ à la membrane, permettant le recrutement de molécules contenant un domaine d'homologie à plexstrine (PH) (Bottomley, Salim *et al.* 1998; Toker and Newton 2000; Vanhaesebroeck and Alessi 2000). Parmi les protéines ainsi recrutées, la sérine/thréonine kinase Akt (aussi appelée PKB) (Bottomley, Salim *et al.* 1998) est considérée comme l'effecteur principal de la PI3-K. Ainsi, la liaison du domaine PH d'Akt induit l'exposition d'un site de phosphorylation Thr308 pour la Ser/Thr kinase constitutivement active la kinase phosphoinositide-dépendente-1 (PDK1). Cependant, l'activation complète d'Akt requiert aussi la phosphorylation du résidu Ser473 dans un

motif hydrophobe C-terminal par une protéine restant à définir, nommée PDK2 (Bottomley, Salim *et al.* 1998; Toker and Newton 2000; Vanhaesebroeck and Alessi 2000; Lessmann, Ngo *et al.* 2006).

2.9.2 PI3-K et IFN- γ

Plusieurs études ont montré l'activation et l'implication des PI3-K dans la signalisation induite par les IFNs. D'ailleurs, le groupe de Choudury a montré l'implication de PKC- ϵ et, de façon indépendante, d'Akt et de PI3-K, dans la phosphorylation du résidu Ser727 de STAT1 (Decker and Kovarik 2000; Venkatesan, Mahimainathan *et al.* 2006). À l'instar de ERK1/2, l'activation de PI3-K dans les fibroblastes murins est indépendante de l'activité de JAK1 et JAK2 en réponse à l'IFN- γ . En effet, la stimulation de fibroblastes déficients pour JAK1 ou JAK2 supportent la phosphorylation d'Akt, un effecteur de PI3-K (Nguyen, Ramana *et al.* 2001). Cependant, l'activation et donc le rôle de PI3-K semble varier selon le type cellulaire. Par exemple, l'IFN- γ induit son activité dans les monocytes mais pas dans la lignée promyélocytaire THP-1 (Navarro, Anand-Apte *et al.* 2003).

3. PKC

Les Protéines Kinases C (PKC), une famille de sérine/thréonine kinases, sont subdivisées en 3 sous-groupes selon leur spécificité de substrats. Tout d'abord, les PKC classiques (cPKC- α , β I, β II, γ) sont dépendantes du calcium et requièrent la présence de diacylglycerol (DAG) et la proximité de phosphatidylsérine (PS) pour leur activation (Mellor and Parker 1998). Comparativement aux PKC classiques, les isoformes des deux autres groupes, les PKC nouvelles (nPKC- η , ϵ , δ , θ , μ /PKD) et les PKC atypiques (aPKC- ι / λ , ζ), sont respectivement indépendantes du Ca^{2+} et indépendantes du Ca^{2+} /DAG/PMA. Par ailleurs, les aPKC requièrent la présence de PS, de lipides inositol ou d'acide phosphatidique pour leur activation. Enfin, le groupe des « PKC-related kinases » (PRK) s'est ajouté à cette classification. Regroupant trois isoformes (PRK 1 à

3) (Mellor and Parker 1998; Martelli, Evangelisti *et al.* 2006), les PRKs possèdent une certaine homologie de séquence avec les PKC (environ 50% pour PRK1) mais diffèrent structurellement (Mellor and Parker 1998; Lim, Tan *et al.* 2006).

3.1 Structure des PKC

La structure générale des PKC se compose de quatre domaines conservés, C1 à C4, entrecoupés de régions variables, V1 à V5 (Figure 6). L'extrémité NH₂ contient un domaine régulateur composé d'une région pseudosubstrat auto-inhibitrice et de deux modules de ciblage membranaire C1 et C2. Le domaine C1, composé de deux sous-domaines (C1a et C1b) en doigts-de-zinc riches en résidus cystéine est inexistant dans les PRK alors que les aPKC ne possèdent qu'un sous-domaine C1. La présence de ces deux sous-domaines est requise pour la liaison au DAG et aux phorbol-esters (Mellor and Parker 1998; Musashi, Ota *et al.* 2000; Becker and Hannun 2005; Martelli, Evangelisti *et al.* 2006). Outre le domaine C1, la dépendance des cPKC au Ca²⁺ est conférée par l'intégrité du domaine C2 qui est altéré ou absent chez les nPKC et les aPKC respectivement. Par ailleurs, l'extrémité COOH est responsable de l'activité catalytique et se compose du domaine de liaison à l'ATP (domaine C3) et d'une région kinase (domaine C4). Enfin, les portions catalytiques et régulatrices sont séparées par une région charnière dont le clivage libère la région catalytique qui devient alors constitutivement active (Newton 2001).

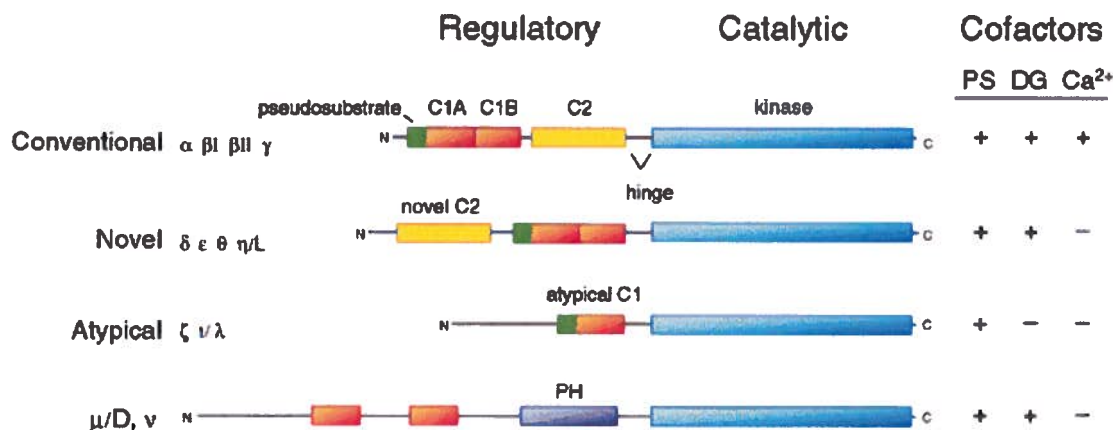


Figure 6 : Sous-familles et structures des PKC. (Newton 2001)

3.2 Activation des PKC

Comme la majorité des enzymes, les PKC sont activées en réponse à un stimulus particulier. Cette activation requiert différentes étapes de modification de l'enzyme. En effet, la stimulation cellulaire induit une suite de phosphorylations et de relocalisations intracellulaires de l'enzyme. Ainsi, la PKC cible se trouve à proximité des différents cofacteurs requis pour son activation. L'ensemble de ces modifications permettent une série de changements de conformation de l'enzyme nécessaires pour l'acquisition de son activité catalytique.

3.2.1 Étapes de phosphorylation

L'activité des PKC dépend d'abord d'une suite de 3 phosphorylations (Figure 7). La première se situe dans la boucle d'activation du domaine catalytique (Thr497 pour PKC- α). Elle est essentielle pour aligner les résidus adéquatement pour l'activité catalytique et libérer l'accès au domaine de liaison du substrat. Cette étape est régulée par la PDK1, une Ser/Thr kinase constitutivement active (Bottomley, Salim *et al.* 1998; Toker and Newton 2000; Sonnenburg, Gao *et al.* 2001). Rapidement, une boucle du domaine kinase est autophosphorylée (Thr638 pour PKC- α), ce site est d'ailleurs nommé « turn motif » et semble le seul requis pour le maintien de l'activité de la forme mature de

la PKC (Behn-Krappa and Newton 1999; Newton 2001). La phosphorylation du « turn motif » est rapidement suivie de l'autophosphorylation du motif hydrophobe (Ser658 pour PKC- α), requise pour la stabilité et la localisation cellulaire de la protéine mature (Parekh, Ziegler *et al.* 2000; Behn-Krappa and Newton 1999). De plus, la séquence entourant le motif hydrophobe forme un site de liaison pour PDK-1 qui est masqué suite à la phosphorylation de la PKC (Newton 2001). Ainsi, PDK-1 est relâchée libérant le site d'autophosphorylation.

3.2.2 Relocalisations intracellulaires et cofacteurs d'activation

Outre ces phosphorylations permettant les changements conformationnels requis pour l'activation des PKC, les isoformes classiques et nouvelles requièrent aussi la liaison de cofacteurs d'activation tels que le PS, le DAG et le Ca^{2+} . Tel que mentionné précédemment, l'IFN- γ active entre autres la phosphatidylcholine-spécifique phospholipase C (PC-PLC), responsable de la génération de DAG et de l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire par l'hydrolyse du phosphatidylcholine membranaire (Sands, Clark *et al.* 1994; Chang, Holtzman *et al.* 2002, 2004). Le DAG et le calcium ainsi générés recrutent en synergie les domaines C1 et C2 des cPKC. Le recrutement de la PKC accroît son affinité pour le phosphatidylsérine membranaire et libère le site actif occupé par le pseudosubstrat lorsque l'enzyme est inactive (Becker and Hannun 2005).

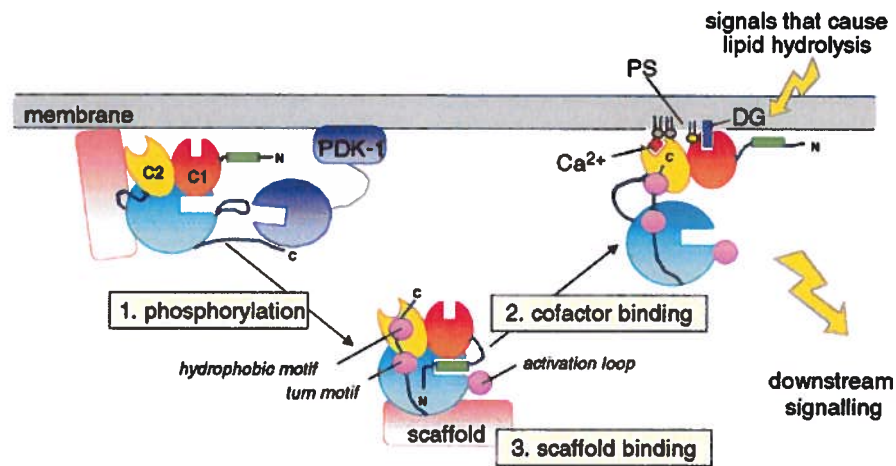


Figure 7 : Schéma d'activation des PKC classiques. (Newton 2001)

3.3 PKC et IFN- γ


Selon les types cellulaires étudiés, différents isoformes de PKC sont impliqués dans la modulation des réponses suite à une stimulation par l'IFN- γ . Outre l'implication de la PKC- δ et de la PKC- ϵ dans la phosphorylation du résidu Ser727 de STAT1 déjà décrite, l'IFN- γ induit aussi, dans les monocytes humains, la phosphorylation du facteur de transcription PU.1 par l'intermédiaire des isoformes α et/ou β I de la PKC (Deb, Sassano *et al.* 2003; Choudhury 2004; Mazzi, Donini *et al.* 2004). Cette phosphorylation est requise pour l'augmentation de l'expression de gp91^{phox} qui est indispensable à la génération d'ions superoxyde lors de la réponse microbicide du macrophage (Mazzi, Donini *et al.* 2004). De plus, l'activité de la PKC- α est requise pour l'expression du CMH II en modulant la capacité du facteur de transcription IRF-1 à activer le promoteur IV (pIV) du transactivateur CIITA dans les macrophages murins RAW264.7 (Giroux, Schmidt *et al.* 2003). Enfin, dans ce même système, il fut montré par microscopie confocale que la PKC- α transloque au noyau des macrophages stimulés (Giroux, Schmidt *et al.* 2003). Cependant, les voies de signalisation requises pour la translocation nucléaire de la PKC- α et l'implication possible de cette réponse dans la modulation de l'expression du CMH II demeurent à établir.

Ainsi, l'objectif principal de ce projet de recherche était d'identifier les mécanismes impliqués dans la translocation nucléaire de la PKC- α dans les macrophages stimulés par l'IFN- γ . Puisque la PKC- α ne contient pas de séquence de localisation nucléaire, nous avons entrepris de vérifier l'implication de divers intermédiaires de signalisation dans cette réponse. Nous avons ensuite établi de mieux situer les molécules identifiées dans les cascades de signalisation activées en réponse l'IFN- γ . Enfin, nous avons tenté d'établir le rôle de la translocation nucléaire de la PKC- α dans la modulation de réponses cellulaires à l'IFN- γ .

ARTICLE

Article à auteurs multiples.

La majorité des travaux et des résultats rapportés dans cet article, soit les figures 1 à 6, ont été réalisés par Pierre-Olivier Hardy. Le résultat présenté à la figure 7 a été réalisé par Tamsir O. Diallo, PhD.



Pierre-Olivier Hardy
Étudiant



Tamsir O. Diallo
Stagiaire post-doctoral



Albert Descoteaux
Directeur de recherche

Regulation of PKC- α activation and nuclear translocation in IFN- γ -stimulated macrophages: roles for PI3K and p38 MAPK¹

Pierre-Olivier Hardy, Tamsir O. Diallo, and Albert Descoteaux²

INRS- Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada

Manuscrit à soumettre

Running title: IFN- γ -induced activation of PKC- α in macrophages

Keywords: Monocytes/Macrophages; Signal transduction; Protein Kinases/Phosphatases

Abstract

Members of the protein kinase C (PKC) family of serine/threonine kinases are activated by IFN- γ and modulate IFN- γ -induced cellular responses by regulating the transcriptional activity of various transcription factors. In this regard, we previously reported that PKC- α contributes to the expression of CIITA by enhancing the ability of IRF-1 to transactivate the CIITA promoter IV in IFN- γ -stimulated macrophages. In addition, IFN- γ induces the nuclear translocation of PKC- α but the mechanisms remain to be elucidated. In this study, we sought to identify the signaling pathways involved in the IFN- γ -induced nuclear translocation of PKC- α in macrophages. Our data indicate that IFN- γ -mediated nuclear translocation of PKC- α is a JAK2-independent process, which requires the PI3K and p38 MAPK pathways. However, PKC- α phosphorylation is independent of the PI3K and p38 MAPK pathways, indicating that IFN- γ -induced phosphorylation and nuclear translocation of PKC- α are mediated by distinct mechanisms. Our results also demonstrate that PKC- α associates with STAT1 and is required for the phosphorylation STAT1 on Ser727 in IFN- γ -stimulated macrophages. Because of their role in the nuclear translocation of PKC- α , we assessed whether the PI3K and p38 MAPK pathways contribute to the expression of type IV CIITA and MHC II. Inhibition of the PI3K, but not p38 MAPK, strongly inhibited IFN- γ -induced CIITA and MHC II gene expression. Taken together, these data suggest that although PKC- α activity is essential, its nuclear translocation is not required for IFN- γ -stimulated type IV CIITA and MHC II gene expression, and point to the existence of yet unidentified regulatory mechanisms involving the PI3K pathway.

Introduction

IFN- γ is a potent macrophage activator that plays a key role in host defense. Following binding to its multisubunit receptor, IFN- γ exerts its action by triggering phosphorylation on tyrosine residues of the IFN- γ receptor-associated Janus family kinases JAK1 and JAK2. These events are followed by tyrosine and serine phosphorylation, homodimerization, and nuclear translocation of the transcription factor STAT1 (1). Binding of STAT1 to specific sequences present in the promoter region of early IFN-responsive genes leads to their rapid expression (2). Among those, the IFN regulatory factor (IRF)³-1, in synergy with STAT1, activates the transcription of several genes including CIITA, a non-DNA binding protein essential for the IFN- γ -induced expression of MHC class II in macrophages (3-5). In addition to the JAK-STAT1 pathway, IFN- γ induces gene expression through STAT1-independent pathways (6, 7) and modulates various signaling pathways including PI3K, MyD88/p38 MAPK, ERK1/2, as well as members of the PKC family (6, 8-17).

PKC is a family of structurally related serine/threonine-specific protein kinases comprising at least 10 members with distinct requirements for activity (18, 19). Differences in their structure, requirement for activity, subcellular localization, and substrate specificity suggest that in a given cell, the various PKC isoenzymes may exert specific functions (20). There is growing evidence that PKC isoenzymes modulate IFN- γ -induced cellular responses by regulating the transcriptional activity of various transcription factors (13-17, 21). Hence, full STAT1 transcriptional activity requires

serine phosphorylation (22) which implicates, among others, the activity of PKC isoenzymes. Depending of the cell type, IFN- γ -induced phosphorylation of STAT1 on Ser727 requires the activity of either PKC- δ or PKC- ϵ (13, 16, 23). In addition, IFN- γ stimulates PU.1 phosphorylation through the activation of PKC- α and/or PKC- β I, leading to the association of PU.1 with the promoter of gp91^{phox} and to increased gp91^{phox} expression in human monocytes (15). PKC- α also contributes to the expression of CIITA by enhancing the ability of IRF-1 to transactivate the CIITA promoter IV in IFN- γ -stimulated RAW 264.7 cells (21).

Whereas the JAK-STAT1 pathway received a great deal of attention, little is known concerning the mechanisms by which IFN- γ activates PKC isoenzymes. PI3K appears to play an important role in the activation of PKC- ϵ and PKC- δ in IFN- γ -stimulated mesangial cells and in promyelocytic leukemia cells, respectively (13, 16, 24). In epithelial cells, IFN- γ -induced ICAM-1 gene expression is mediated by the activation of phosphatidylinositol phospholipase C- γ 2, which is required for the activation of PKC- α , followed by those of c-Src and STAT1 (14). In macrophages and monocytes, IFN- γ induces the nuclear translocation of PKC- α and PKC- β I, where they can interact with transcription factors (15, 21). In contrast to the majority of nuclear proteins, PKC isoenzymes lack canonical nuclear localization signal, indicating that other mechanisms are involved in the transport process. In the present study, we sought to characterize the mechanisms and the consequences of IFN- γ -induced activation and nuclear translocation of PKC- α in macrophages.

Material and Methods

Macrophages

The murine macrophage cell line RAW 264.7 was grown in DMEM with glutamine (Life Technologies Inc.) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Hyclone, Logan, UT), 10 mM Hepes (pH 7.4) and antibiotics (complete medium), in a 37°C incubator with 5% CO₂. BMM were derived from the bone marrow of female Balb/c mice and grown in complete medium as described previously (25).

Reagents

Recombinant mouse IFN- γ (R&D Systems) was used at a final concentration of 100 U/ml (Minneapolis, MN), and LPS from *Escherichia coli* Serotype O127:B8 (Sigma) was used at a final concentration of 100 ng/ml. The inhibitors and their final concentrations used were: Ly294002 (100 μ M), tyrphostin AG-490 (250 μ M), U-73122 (50 μ M), U-73343 (50 μ M), herbimycin A (10 μ g/ml), calyculin A (10 nM) (Sigma-Aldrich), Go-6976 (1 μ M), PD98059 (30 μ M), SB203580 (10 μ M), PP2 (50 μ M), PP3 (50 μ M) (Calbiochem, San Diego, CA). The inhibitors were prepared following the manufacturer instructions. BpV(phen) (kindly provided by Dr. Martin Olivier, McGill University, Montreal, QC, Canada) was prepared in PBS and used at a final concentration of 10 μ M. Those inhibitors are respectively selective for: PI3K, JAK2, phospholipase-C, U-73122 inactive analog, protein tyrosine kinases, protein phosphatases 1 and 2A (PP1 and 2A), cPKC, ERK1/2, p38 MAPK, Src-family protein tyrosine kinases, negative control for PP2 and protein tyrosine phosphatases.

RT-PCR

Total RNA was prepared and reverse transcribed as described previously (21, 26). For PCR, samples were amplified under the following conditions: 30 s at 94°C, 1 min at 56°C, and 1 min at 72°C (30 cycles). The PCR products were migrated on 1.3% (w/v) agarose gel and the pictures were acquired with a AlphaImager 3400 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA). The primers used for *HPRT* were AD-55 (forward) 5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3' and AD-56 (reverse) 5'-GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC-3'; the primers used for type IV *CIITA* were AD-267 (forward) 5'-ACAGCCACAGCCGCGACCATA-3' and AD-268 (reverse) 5'-CTCTGCTCCAATGTGCTCCTA-3'; the primers used for *MHC II* were AD-70 (forward) 5'-GGAATTCTGGGAATCTCAGGTTCCCAGTG-3' and AD-71 (reverse) 5'-GGAATTCTGAACACCATGCTCAGCCTCTG-3' (21).

Signaling pathway analysis

BMM were seeded (3×10^6 /well) in 6-well plates for 18 h, incubated with or without selective inhibitors 1 h prior to stimulation with 100 U/ml IFN- γ or 100 ng/ml LPS for the indicated time points.

Western blot analyses

Cells were lysed and Western blot analyses were performed as described previously (25). Rabbit polyclonal antisera against IRF-1 was from Santa Cruz Biotechnology, antibody against PKC- α was from BD Transduction Laboratories, antibodies against STAT1 and phospho-STAT1 (Ser727) were from Upstate Laboratories, and antibodies against p38

MAPK, phospho-p38 (Thr180/Tyr182), Akt, phospho-Akt (Ser473), phospho-PKC- α (Thr638) were from Cell Signaling Technology.

Translocation of PKC- α -GFP and confocal microscopy

Adherent RAW 264.7 cells were transfected with 0.3 μ g of the hPKC- α -GFP construct (27) (kindly provided by C. Quittau-Prévostel, INSERM, France) using Fugene-6 (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). Briefly, cells were seeded (10^5 /well) in 24-well plates containing microscope coverslips for 18 h and transfected with 100 μ l Fugene-6/DNA mix for 24 h. Cells were incubated 1 h in the presence or the absence of signaling inhibitors and stimulated for 2 h with 100 U/ml IFN- γ . Cells were fixed with 2% formaldehyde, permeabilized 15 min at room temperature with PBS containing 0.1% Triton X-100 and 1% BSA and then, incubated with PBS containing 1% Alexa Fluor 568 phalloïdin (Molecular Probes, Oregon, USA) and 0.2% DRAQ5 (BioStatus Ltd., UK). Coverslips were mounted with Fluoromount-G (Southern Biotechnology associates Inc., Birmingham, AL). Nuclear translocation of PKC- α was quantified using an oil immersion Nikon Plan Apo 100X objective mounted on a Nikon Eclipse E800 microscope (Nikon, Melville, NY) equipped with a BioRad Radiance 2000 confocal imaging system (BioRad Laboratories, Hercules, CA) and data were analyzed with LaserSharp 2000. At least 30 transfected cells were counted for each experiment and the results presented are representatives of three independent experiments. Percentage of nuclear translocation represents the number of transfected cells with nuclear translocation of hPKC- α -GFP on the total number of transfected cells observed.

Immunofluorescence

Adherent macrophages in 24-well plates containing microscope coverslips (Fisher Scientific) (10^5 /well for RAW 264.7 cells or 2×10^5 /well for BMM) were stimulated for 2 h with 100 U/ml IFN- γ and fixed with 2% formaldehyde in PBS. Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 and blocked with 1% BSA and 20% goat serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.). Cells were then marked with mouse monoclonal anti-PKC- α (1:300) (Cell Signaling Technology) and stained with PBS containing the anti-mouse coupled to Alexa-488 (1:500) (Molecular Probes), 1% Alexa Fluor 568 phalloidin (Molecular Probes) and 0.2% DRAQ5 (BioStatus Ltd., UK). Coverslips were mounted and the nuclear localisation of PKC- α was assessed by confocal microscopy.

Co-immunoprecipitations and Western blot analyses.

Adherent macrophages were incubated in the absence or the presence of 100 U/ml IFN- γ for the indicated time points. Cells were then washed with ice-cold PBS and lysed in lysis buffer (50 mM TrisHCl, pH 7.4; 1 mM EDTA; 1% Nonidet P40; 150 mM NaCl; 0.25% deoxycholate) containing proteases and phosphatases inhibitors. PKC- α was immunoprecipitated using a rabbit anti-PKC- α (1:500, Transduction Laboratories), immunocomplexes were resolved in 8% SDS-PAGE and electroblotted onto Hybond-ECL membranes (Amersham Biosciences). Immunodetection of STAT1 was achieved by chemiluminescence (ECL) using a mouse anti-STAT1 antibody (1:1000, Upstate Laboratories). To detect PKC- α a mouse anti-PKC- α antibody (1:1000, Transduction Laboratories) was used.

Results

IFN- γ induces the nuclear translocation of PKC- α in macrophages. Using the mouse macrophage cell line RAW 264.7 transiently expressing a PKC- α -GFP fusion protein, we previously reported that IFN- γ induces the nuclear translocation of PKC- α (21). Here, we validated the use of PKC- α -GFP as a reporter to investigate the mechanisms by which IFN- γ stimulates the nuclear translocation of PKC- α . RAW 264.7 cells transiently expressing the PKC- α -GFP fusion protein and BMM were stimulated with IFN- γ and the intracellular localization of endogenous PKC- α in BMM and of PKC- α -GFP in RAW 264.7 cells was assessed by immunofluorescence at the confocal microscope. As shown in Figure 1, similar to the PKC- α -GFP fusion protein in RAW 264.7 cells, endogenous PKC- α translocated to the nucleus of BMM following IFN- γ stimulation. These results validate the use of PKC- α -GFP as a reporter to investigate nuclear translocation of PKC- α .

PI3K and p38 MAPK are involved in the IFN- γ -induced nuclear translocation of PKC- α . To elucidate the mechanisms by which IFN- γ activates PKC- α , we first sought to identify signaling pathways involved in its nuclear translocation. RAW264.7 cells transiently expressing PKC- α -GFP were incubated in the absence or presence of the indicated pharmacological inhibitors prior to stimulation with IFN- γ . The impact of each inhibitor on the localization of PKC- α -GFP was assessed by confocal microscopy. As shown in Figure 2, inhibition of PI3K (Ly294002), p38 MAPK (SB203580), and protein tyrosine

kinases (herbimycin A) reduced IFN- γ -induced nuclear translocation of PKC- α -GFP to the levels observed in unstimulated cells. In contrast, inhibition of JAK2 (AG-490), Src-family tyrosine kinases (PP2), protein tyrosine phosphatases (BpV(phen), ERK1/2 (PD98059), phospholipase C (U-73122), and PKC- α/β 1 (Go-6976) had no significant impact on the nuclear translocation of PKC- α -GFP. These results indicate that IFN- γ -induced nuclear translocation of PKC- α is a process requiring the PI3K and p38 MAPK pathways, independent of JAK2 activity. Phosphorylation of PKC on conserved serine and threonine residues of the catalytic domain is necessary for catalytic competence and proper intracellular localization (28, 29). We thus determined whether the PI3K and p38 MAPK pathways are involved in the phosphorylation of PKC- α by IFN- γ . BMM were incubated in the absence or the presence either Ly294002, SB203580, or AG-490 prior to the addition of 100 U/ml IFN- γ for 30 min and PKC- α phosphorylation was assessed by Western blot analysis. As shown in Figure 3, none of the inhibitors tested affected PKC- α phosphorylation in IFN- γ -stimulated BMM. These results indicate that similar to its IFN- γ -induced nuclear translocation, PKC- α phosphorylation is independent of JAK2 activity. However, PKC- α phosphorylation is independent of the PI3K and p38 MAPK pathways, suggesting that IFN- γ -induced phosphorylation and nuclear translocation of PKC- α are mediated by distinct mechanisms.

Activation of the PI3K and p38 MAPK pathways by IFN- γ in BMM. Since IFN- γ -induced PKC- α nuclear translocation requires the PI3K and p38 MAPK pathways, we further characterized the mechanisms by which these pathways are activated by IFN- γ in BMM.

As shown in Figure 4A, Western blot analysis indicates that p38 MAPK phosphorylation was not affected by the presence of either AG-490 or Ly294002 indicating that neither JAK2 activity nor PI3K are involved in p38 MAPK activation by IFN- γ . To assess PI3K activation, we determined the levels of phosphorylation of Akt on Ser473 by Western blot. Expectedly, IFN- γ -stimulated phosphorylation of Akt on Ser473 was inhibited by the PI3K inhibitor Ly294002, but it was not affected by the presence of either the JAK2 inhibitor AG-490 or the p38 MAPK inhibitor SB203580 (Figure 4B). Collectively, our results indicate that in BMM, activation of the PI3K and p38 MAPK pathways by IFN- γ occurs through distinct mechanisms, independently of JAK2 activity.

IFN- γ -induced type IV CIITA and MHC II gene expression require the PI3K but not the p38 MAPK pathway. We previously reported that PKC- α activity regulates IFN- γ -induced CIITA and MHC II gene expression by modulating the ability of IRF-1 to transactivate the CIITA promoter IV (21). Consistent with these observations, IFN- γ -stimulated type IV CIITA and MHC II (I-A) gene expression were strongly inhibited by Go-6976 (Fig 4A). Because of their role in the nuclear translocation of PKC- α , we determined whether the PI3K and p38 MAPK pathways contribute to the expression of type IV CIITA and MHC II in IFN- γ -stimulated macrophages. To this end, we compared the effect of Ly294002, AG-490, or SB203580, on IFN- γ -induced type IV CIITA and MHC II gene expression. Both type IV CIITA and MHC II expression were completely inhibited by AG-490 and LY294002, indicating that JAK2 activity and the PI3K pathway play an important role in this process (Figure 4B). In contrast, the p38 MAPK inhibitor SB203580 caused a slight increase in both type IV CIITA and MHC II gene expression,

in agreement with a recent report showing that p38 MAPK negatively regulates CIITA gene expression (12). These results also suggest that nuclear translocation of PKC- α is not required for IFN- γ -induced type IV CIITA and MHC II gene expression.

Together with STAT1, IRF-1 plays an essential role in the regulation of IFN- γ -induced type IV CIITA expression (30, 31). It was thus of interest to determine whether inhibition of type IV CIITA expression by the PKC- α and the PI3K inhibitors was the consequence of a defect in IRF-1 expression. Consistent with previous studies (6, 32), IRF-1 expression is dependent on the JAK/STAT pathway, as it was inhibited by the JAK2 inhibitor AG-490 (Figure 5C). However, our results indicate that neither PKC- α , PI3K, nor p38 MAPK are involved in the regulation of IFN- γ -induced IRF-1 expression (Figure 5C).

IFN- γ induces the phosphorylation of STAT1 on Ser727 and its association PKC- α . In addition to tyrosine phosphorylation, the complete transcriptional activity of STAT1 requires the phosphorylation of Ser727 and members of the PKC family have been implicated in this response (10, 13, 24). To verify the possible requirement of PKC- α , we assessed by western blot the IFN- γ -induced phosphorylation of STAT1 on Ser727 in the presence or the absence of Go-6976. We also included Ly294002, SB203580 and AG-490 as controls. As shown in Figure 6, IFN- γ -induced phosphorylation of STAT1 on Ser727 in BMM was impaired by Go-6976 but remained unaffected by the inhibitors of PI3K, JAK2 and p38 MAPK. The finding that Go-6976 inhibited IFN- γ -stimulated phosphorylation of STAT1 on Ser727 led us to determine whether PKC- α associates with

STAT1 in response to IFN- γ . BMM were stimulated with IFN- γ and at various time points, cells lysates were immunoprecipitated with an antiserum against PKC- α . Immunoprecipitated proteins were separated by SDS-PAGE and the presence of STAT1 was assessed by Western blot. As shown in Figure 7, PKC- α and STAT1 associated in an IFN- γ -dependent manner in BMM.

Discussion

In addition to the JAK-STAT1 pathway, IFN- γ activates multiple signaling cascades involved in the regulation of cellular responses (9, 13, 14, 16, 33, 34). Among those cascades, IFN- γ activates several PKC isoenzymes which regulate gene expression by modulating the transcriptional activity of transcription factors such as STAT1, PU.1, and IRF-1 (15, 17, 21, 23). In the present study, we first sought to identify the mechanisms by which IFN- γ stimulates the nuclear translocation of PKC- α in macrophages. Using pharmacological inhibitors, we found that the PI3K and the p38 MAPK pathways are both involved in this process. These two pathways have previously been identified as important intermediates in both type I and type II IFN signal transduction (8-10, 35-38). To further address the contribution of the PI3K and p38 MAPK pathways to the IFN- γ -stimulated PKC- α activation process, we next undertook to characterize their regulation and respective roles in IFN- γ -stimulated macrophages.

Activation of the PI3K pathway by both type I and type II IFNs has been reported in several cell types. One of the main downstream effects of PI3K activation is the phosphorylation of STAT1 on Ser727, which is necessary for optimal transcriptional activity in several cell types (22). However, the effects of PI3K on the regulation of STAT1 activity are highly cell-specific (8). Indeed, whereas IFN- γ -stimulated GBP gene expression was inhibited by the PI3K inhibitor Ly294002 in the monocytic cell line THP-1, it was similar to controls in human primary monocytes (8). The kinase downstream of PI3K responsible for phosphorylation of STAT1 on Ser727 was identified as PKC- δ in

human acute promyelocytic leukemia cells (13). Other members of the PKC family may also regulate serine phosphorylation of STAT1 in response to IFN- γ as shown in rat mesengial cells, where PI3K-activated PKC- ϵ regulates MAPK activity, which in turn phosphorylates STAT1 on Ser727 and regulates its transcriptional activity (16). For both PKC- δ and PKC- ϵ , IFN- γ -stimulated STAT1 Ser727 phosphorylation is mediated by the PI3K pathway. In macrophages, our results indicate that IFN- γ -induced STAT1 Ser727 phosphorylation is mediated by PKC- α , independently of the PI3K pathway. This is consistent with the finding that the PI3K pathway has no effect on the phosphorylation of PKC- α . The fact that the PI3K pathway is required for IFN- γ -stimulated nuclear translocation of PKC- α suggests the existence of at least two distinct pathways involved in the regulation of PKC- α activation in IFN- γ -stimulated macrophages. Hence, the initial step of PKC- α maturation (phosphorylation) (28) is regulated by a yet unidentified pathway(s), whereas the targeting step (nuclear localization) requires the PI3K pathway.

Although both type I and type II IFNs activate p38 MAPK, the role of this kinase in the regulation of IFN responses remains poorly understood. Recent studies clearly showed that whereas p38 MAPK is required for STAT1-driven gene expression in response to IFN- α and IFN- β , it plays no role in IFN- γ -dependent gene transcription (37, 38). Furthermore, p38 MAPK is not required for the phosphorylation of STAT1 on Ser727 (37, 38), indicating that p38 MAPK modulates STAT1-driven transcription independently of Ser727 phosphorylation in IFN- α/β -stimulated cells. Consistent with these previous studies, our results indicate that p38 MAPK is not required for IFN- γ -induced IRF-1 expression and phosphorylation of STAT1 on Ser727 in macrophages.

However, the requirement for p38 MAPK in IFN- γ -stimulated PKC- α nuclear translocation indicates a role for this MAPK in the modulation of IFN- γ responses. Since p38 MAPK is not involved in the initial step of PKC- α activation (phosphorylation) by IFN- γ , the mechanism(s) by which p38 MAPK modulates PKC- α nuclear translocation remains to be identified.

We previously reported that PKC- α activity regulates IFN- γ -induced MHC II expression by modulating the ability of IRF-1 to transactivate the CIITA promoter IV (21). Consistent with these previous findings, IFN- γ -stimulated type IV CIITA and MHC II expression were strongly inhibited by Go-6976. Our data also indicated that whereas the PI3K and p38 MAPK pathways regulate IFN- γ -induced nuclear translocation of PKC- α , they have no significant impact on IFN- γ -stimulated PKC- α phosphorylation and on STAT1-mediated IRF-1 expression. In the light of these observations, it was of interest to determine the impact of these pathways on the expression of type IV CIITA and MHC II in IFN- γ -stimulated macrophages. In the case of the PI3K pathway, inhibition with Ly294002 strongly inhibited IFN- γ -stimulated type IV CIITA and MHC II gene expression, indicating an important role for this pathway. In contrast, the p38 MAPK inhibitor SB203580 even caused an increase in type IV CIITA and MHC II gene expression. This observation is consistent with a recent report showing that CIITA expression is negatively regulated by p38 MAPK and ERK pathways in macrophages and dendritic cells (12). Taken together, these data suggest that although PKC- α activity is essential, its nuclear translocation is not required for IFN- γ -stimulated type IV CIITA and MHC II gene expression, and point to the existence of yet unidentified regulatory

mechanisms involving the PI3K pathway. Clearly, additional investigation will be required to further understand the regulation of CIITA expression.

In contrast to the majority of nuclear proteins, PKC isoenzymes lack canonical nuclear localization signal (39), indicating that other mechanisms are involved in the transport process. The finding that IFN- γ induces the association of PKC- α with STAT1 raises several questions concerning the role of PKC- α in the regulation of IFN- γ -induced responses in macrophages. Indeed, our data that IFN- γ -stimulated phosphorylation of STAT1 on Ser727 is inhibited by Go6976 suggests that PKC- α acts as a kinase for phosphorylating STAT1 on Ser727. A similar role for PKC- δ has been reported in acute promyelocytic leukemia cells, where PKC- δ was shown to associate with and to phosphorylate STAT1 (13). Moreover, since phosphorylated STAT1 dimers translocate to the nucleus, it is possible that PKC- α uses STAT1 as a shuttle to access the nucleus. This possibility is currently under investigation.

Acknowledgements

We are grateful to Marcel Desrosiers and Robert Lodge for their help with confocal microscopy and immunofluorescence.

References

1. Darnell, J. E., Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science* 277: 1630-1635.
2. Stark, G. R., I. M. Kerr, B. R. Williams, R. H. Silverman, and R. D. Schreiber. 1998. How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 227-264.
3. Steimle, V., C. A. Siegrist, A. Mottet, B. Lisowska-Grospierre, and B. Mach. 1994. Regulation of MHC class II expression by interferon- γ mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265: 106-109.
4. Cullell-Young, M., M. Barrachina, C. Lopez-Lopez, E. Gonalons, J. Lloberas, C. Soler, and A. Celada. 2001. From transcription to cell surface expression, the induction of MHC class II I-A α by interferon- γ in macrophages is regulated at different levels. *Immunogenetics* 53: 136-144.
5. Kroger, A., M. Koster, K. Schroeder, H. Hauser, and P. P. Mueller. 2002. Activities of IRF-1. *J. Interferon Cytokine Res.* 22: 5-14.
6. Ramana, C. V., M. P. Gil, R. D. Schreiber, and G. R. Stark. 2002. Stat1-dependent and -independent pathways in IFN- γ -dependent signaling. *Trends Immunol.* 23: 96-101.
7. Ramana, C. V., M. P. Gil, Y. Han, R. M. Ransohoff, R. D. Schreiber, and G. R. Stark. 2001. Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN- γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6674-6679.
8. Navarro, A., B. Anand-Apte, Y. Tanabe, G. Feldman, and A. C. Lerner. 2003. A PI-3 kinase-dependent, Stat1-independent signaling pathway regulates interferon-stimulated monocyte adhesion. *J. Leukoc. Biol.* 73: 540-545.

9. Plataniias, L. C. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 375-386.
10. Nguyen, H., C. V. Ramana, J. Bayes, and G. R. Stark. 2001. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon- γ -dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression. *J. Biol. Chem.* 276: 33361-33368.
11. Sun, D., and A. Ding. 2006. MyD88-mediated stabilization of interferon- γ -induced cytokine and chemokine mRNA. *Nat. Immunol.* 7: 375-381.
12. Yao, Y., Q. Xu, M. J. Kwon, R. Matta, Y. Liu, S. C. Hong, and C. H. Chang. 2006. ERK and p38 MAPK signaling pathways negatively regulate CIITA gene expression in dendritic cells and macrophages. *J. Immunol.* 177: 70-76.
13. Deb, D. K., A. Sassano, F. Lekmine, B. Majchrzak, A. Verma, S. Kambhampati, S. Uddin, A. Rahman, E. N. Fish, and L. C. Plataniias. 2003. Activation of protein kinase C δ by IFN- γ . *J. Immunol.* 171: 267-273.
14. Chang, Y. J., M. J. Holtzman, and C. C. Chen. 2002. Interferon- γ -induced epithelial ICAM-1 expression and monocyte adhesion. Involvement of protein kinase C-dependent c-Src tyrosine kinase activation pathway. *J. Biol. Chem.* 277: 7118-7126.
15. Mazzi, P., M. Donini, D. Margotto, F. Wientjes, and S. Dusi. 2004. IFN- γ induces gp91phox expression in human monocytes via protein kinase C-dependent phosphorylation of PU.1. *J. Immunol.* 172: 4941-4947.

16. Choudhury, G. G. 2004. A linear signal transduction pathway involving phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C ϵ , and MAPK in mesangial cells regulates interferon- γ -induced STAT1 α transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 279: 27399-27409.
17. Ivaska, J., L. Bosca, and P. J. Parker. 2003. PKC ϵ is a permissive link in integrin-dependent IFN- γ signalling that facilitates JAK phosphorylation of STAT1. *Nat. Cell Biol.* 5: 363-369.
18. Mellor, H., and P. J. Parker. 1998. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332 (Pt 2): 281-292.
19. Ohno, S., and Y. Nishizuka. 2002. Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *J Biochem. (Tokyo)* 132: 509-511.
20. Nishizuka, Y. 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334: 661-665.
21. Giroux, M., M. Schmidt, and A. Descoteaux. 2003. IFN- γ -induced MHC class II expression: transactivation of class II transactivator promoter IV by IFN regulatory factor-1 is regulated by protein kinase C- α . *J. Immunol.* 171: 4187-4194.
22. Wen, Z., Z. Zhong, and J. E. Darnell, Jr. 1995. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82: 241-250.
23. Kwon, M. J., Y. Yao, M. J. Walter, M. J. Holtzman, and C. H. Chang. 2007. Role of PKC δ in IFN- γ -inducible CIITA gene expression. *Mol. Immunol.* 44: 2841-2849.

24. Venkatesan, B. A., L. Mahimainathan, N. Ghosh-Choudhury, Y. Gorin, B. Bhandari, A. J. Valente, H. E. Abboud, and G. G. Choudhury. 2006. PI 3 kinase-dependent Akt kinase and PKC ϵ independently regulate interferon- γ -induced STAT1 α serine phosphorylation to induce monocyte chemotactic protein-1 expression. *Cell Signal*. 18: 508-518.
25. Prive, C., and A. Descoteaux. 2000. *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. *Eur. J. Immunol*. 30: 2235-2244.
26. Flandin, J. F., F. Chano, and A. Descoteaux. 2006. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon- γ -primed macrophages. *Eur. J. Immunol*. 36: 411-420.
27. Quittau-Prevostel, C., N. Delaunay, A. Collazos, A. Vallentin, and D. Joubert. 2004. Targeting of PKC α and ϵ in the pituitary: a highly regulated mechanism involving a GD(E)E motif of the V3 region. *J. Cell Sci*. 117: 63-72.
28. Shirai, Y., and N. Saito. 2002. Activation mechanisms of protein kinase C: maturation, catalytic activation, and targeting. *J. Biochem. (Tokyo)* 132: 663-668.
29. Newton, A. C. 2001. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem. Rev*. 101: 2353-2364.

30. Meraz, M. A., J. M. White, K. C. Sheehan, E. A. Bach, S. J. Rodig, A. S. Dighe, D. H. Kaplan, J. K. Riley, A. C. Greenlund, D. Campbell, K. Carver-Moore, R. N. DuBois, R. Clark, M. Aguet, and R. D. Schreiber. 1996. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84: 431-442.
31. Muhlethaler-Mottet, A., W. Di Berardino, L. A. Otten, and B. Mach. 1998. Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon- γ requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity* 8: 157-166.
32. Harada, H., T. Fujita, M. Miyamoto, Y. Kimura, M. Maruyama, A. Furia, T. Miyata, and T. Taniguchi. 1989. Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell* 58: 729-739.
33. Alsayed, Y., S. Uddin, S. Ahmad, B. Majchrzak, B. J. Druker, E. N. Fish, and L. C. Platanius. 2000. IFN- γ activates the C3G/Rap1 signaling pathway. *J. Immunol.* 164: 1800-1806.
34. Kaur, S., S. Uddin, and L. C. Platanius. 2005. The PI3' kinase pathway in interferon signaling. *J. Interferon Cytokine Res.* 25: 780-787.
35. Uddin, S., L. Yenush, X. J. Sun, M. E. Sweet, M. F. White, and L. C. Platanius. 1995. Interferon- α engages the insulin receptor substrate-1 to associate with the phosphatidylinositol 3'-kinase. *J. Biol. Chem.* 270: 15938-15941.
36. Goh, K. C., S. J. Haque, and B. R. Williams. 1999. p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons. *Embo J.* 18: 5601-5608.

37. Ramsauer, K., I. Sadzak, A. Porras, A. Pilz, A. R. Nebreda, T. Decker, and P. Kovarik. 2002. p38 MAPK enhances STAT1-dependent transcription independently of Ser-727 phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 12859-12864.
38. Li, Y., A. Sassano, B. Majchrzak, D. K. Deb, D. E. Levy, M. Gaestel, A. R. Nebreda, E. N. Fish, and L. C. Platanias. 2004. Role of p38 α Map kinase in Type I interferon signaling. *J. Biol. Chem.* 279: 970-979.
39. Nakashima, S. 2002. Protein kinase C α (PKC α): regulation and biological function. *J. Biochem. (Tokyo)* 132: 669-675.

Footnotes

1. This work was supported by Canadian Institutes of Health Research grant MT-29033. AD is a Chercheur-boursier from the Fonds de la recherche en santé du Québec and the holder of a Canada Research Chair. TOD was partly supported by a postdoctoral fellowship from the Fondation Pasteur/Fondation Armand-Frappier.

2. Address correspondence and reprint requests to Dr. Albert Descoteaux, INRS- Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boul des Prairies, Laval, QC, Canada H7V 1B7; E-mail address: albert.descoteaux@iaf.inrs.ca.

3. Abbreviations used in this paper: IRF, IFN regulatory factor; PKC, protein kinase C; BMM, bone marrow-derived macrophages.

Figure legends

Figure 1. IFN- γ induces PKC- α nuclear translocation in RAW264.7 cells and in BMM. RAW 264.7 cells transfected with PKC- α -GFP (A, C) or BMM (B, D) were incubated in the absence (A, B) or presence (C, D) of 100 U/ml IFN- γ for 2 h and prepared for immunofluorescence as described in *Materials and Methods* (red: F-actin; green: PKC- α ; blue: DNA).

Figure 2. Effect of signalling pathways inhibitors on the IFN- γ -induced nuclear translocation of PKC- α . Adherent RAW 264.7 cells were transfected with PKC- α -GFP, incubated with the indicated inhibitors for 1 h prior to stimulation with 100 U/ml IFN- γ for 2 h, and prepared for confocal microscopy analysis as described in *Materials and Methods*. At least 30 PKC- α -GFP transfected cells were counted for each inhibitor tested and the results are representatives of three independent experiments. The percentage of nuclear translocation represents the ratio of nuclear PKC- α -positive cells/total transfected cells. Open bars: unstimulated control; black bars: IFN- γ -stimulated cells; hatched bars: cells treated with inhibitors prior to IFN- γ stimulation.

Figure 3. IFN- γ -induced phosphorylation of PKC- α is independent of JAK2, PI3K and p38 MAPK pathways. Adherent BMM were incubated in the absence or the presence of either AG-490, Ly294002, or SB203580 for 1 h prior to the addition of 100 U/ml IFN- γ for 30 min. The presence of phosphorylated PKC- α (top panel) and total PKC- α (bottom

panel) in cell extracts was detected by Western blot analysis as described in *Materials and Methods*. Similar results were obtained in two independent experiments.

Figure 4. IFN- γ induces p38 MAPK and Akt phosphorylation in BMM. Adherent BMM were incubated in the absence or the presence of either AG-490, Ly294002, or SB203580 for 1 h prior to the addition of 100 U/ml IFN- γ for 5 min (A) or 30 min (B). Controls consisted of BMM incubated for 15 min with 100 ng/ml LPS. Cell extracts were analyzed by western blot for the presence of (A) phosphorylated (top panel) and total p38 MAPK (bottom panel) and (B) phosphorylated (top panel) and total Akt (bottom panel). Similar results were obtained in two independent experiments.

Figure 5. IFN- γ -induced CIITA and I-A gene expression require the PI3K but not the p38 MAPK pathway. (A, B) BMM were incubated for 1 h in the absence or the presence of the selective inhibitors and stimulated 6 h with 100 U/ml IFN- γ . Total RNA was extracted and subjected to RT-PCR with specific primers for type IV CIITA, MHC II (I-A) and HPRT. (C) IFN- γ induced IRF-1 protein expression is normal in presence of selective signalling inhibitors. Adherent BMM were incubated 1h with or without selective inhibitors, stimulated 4 h with IFN- γ and then, the IRF-1 expression was assessed by Western blot as described in *Materials and Methods*. Similar results were obtained in two independent experiments.

Figure 6. IFN- γ -induced phosphorylation of STAT1 on Ser727 requires the activity of PKC- α but remains unaffected by the inhibition of PI3K and p38 MAPK. Adherent

BMM were incubated 30 min in the absence or the presence of either Ly294002, AG-490, SB203580 or Go-6976 before the addition of 100 U/ml IFN- γ for 30 min. Phosphorylation of STAT1 on Ser727 was determined by western blot as described in *Materials and Methods*. Similar results were obtained in two independent experiments.

Figure 7. IFN- γ induces the association of PKC- α with STAT1. Adherent BMM were incubated in the absence or presence of 100 U/ml IFN- γ for the indicated time points. PKC- α was immunoprecipitated and the presence of STAT1 in immunoprecipitates was determined by Western blot analysis as described in *Materials and Methods*. The blot was stripped and reprobbed with an anti-PKC- α antibody to ensure that equal amounts of PKC- α were immunoprecipitated in each samples. Similar results were obtained in two independent experiments.

Figure 1 : IFN- γ induces PKC- α nuclear translocation in RAW264.7 cells and in BMM.

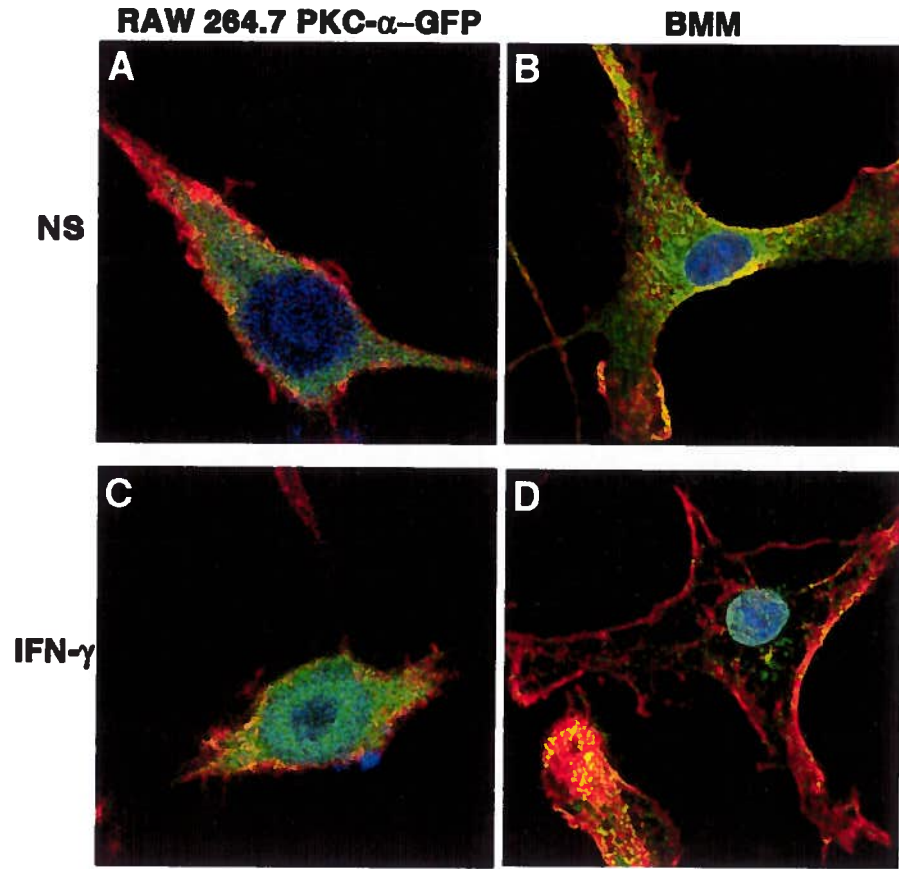


Figure 2 : Effect of signalling pathways inhibitors on the IFN- γ -induced nuclear translocation of PKC- α .

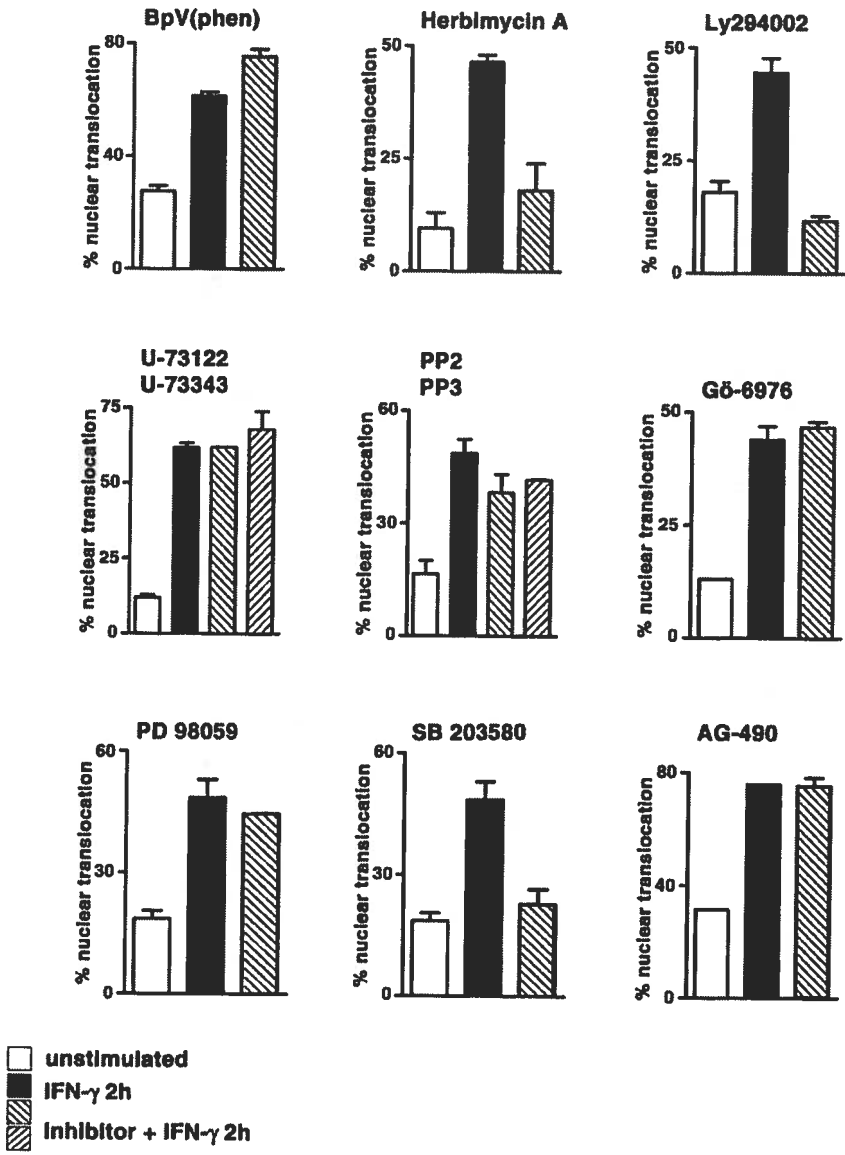


Figure 3 : IFN- γ -induced phosphorylation of PKC- α is independent of JAK2, PI3K and p38 MAPK pathways.

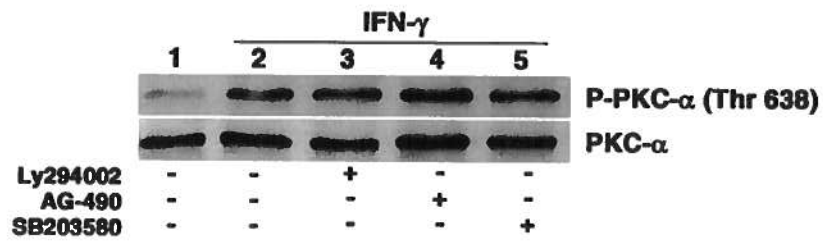


Figure 4 : IFN- γ induces p38 MAPK and Akt phosphorylation in BMM.

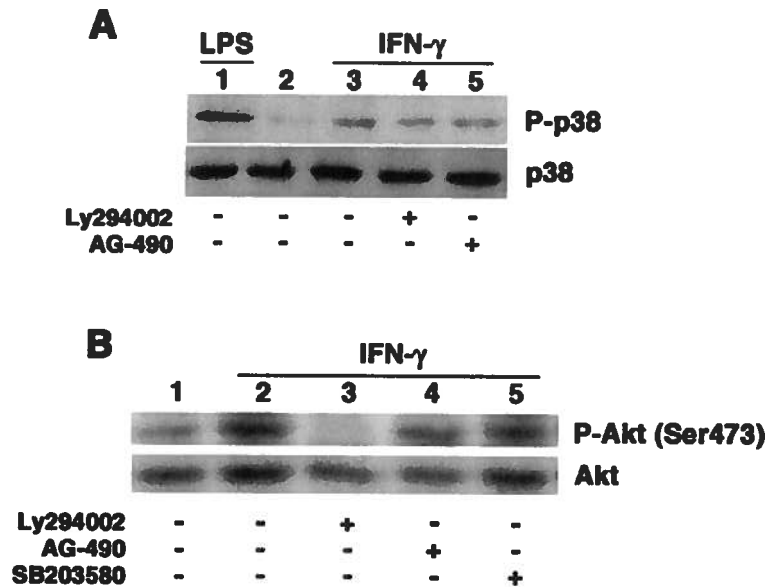


Figure 5 : IFN- γ -induced CIITA and I-A gene expression require the PI3K but not the p38 MAPK pathway.

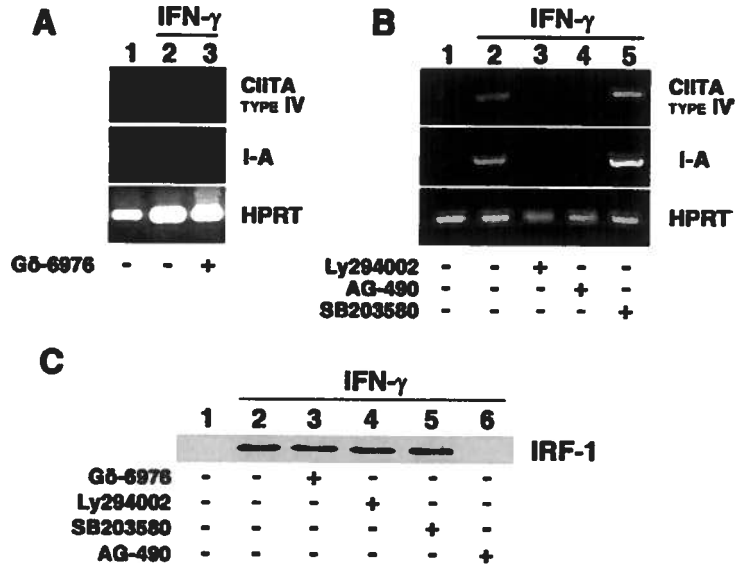


Figure 6 : IFN- γ -induced phosphorylation of STAT1 on Ser727 requires the activity of PKC- α but remains unaffected by the inhibition of PI3K and p38 MAPK.

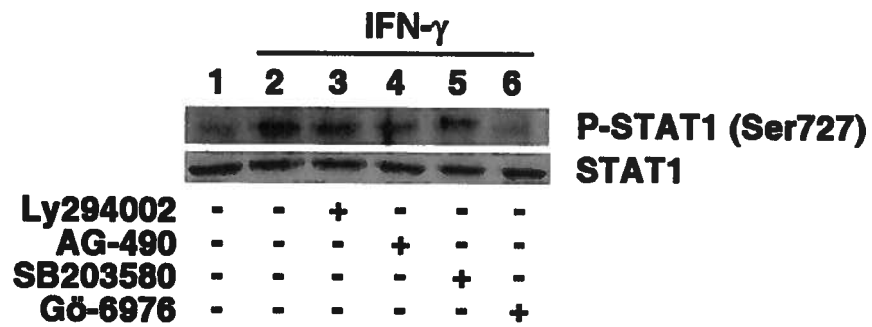
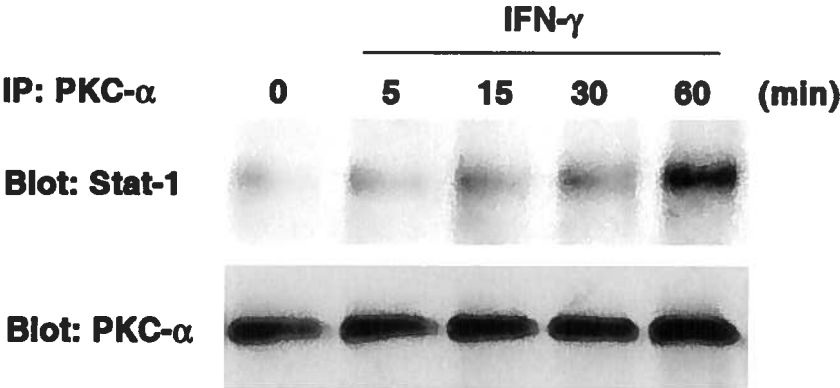


Figure 7 : IFN- γ induces the association of PKC- α with STAT1.



DISCUSSION

La reconnaissance d'un antigène présenté par une molécule de CMH II à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, dont l'IFN- γ . Ce dernier active notamment les macrophages et leur potentiel microbicide. La liaison de l'IFN- γ à son récepteur à la surface de la cellule cible stimule diverses molécules de signalisation qui servent alors d'intermédiaires pour les réponses cellulaires subséquentes à cette stimulation. Parmi ces réponses, la synthèse de CIITA, induite par l'IFN- γ , est requise pour l'expression de molécules de CMH II et donc, pour accroître la présentation antigénique.

Outre la voie bien caractérisée JAK/STAT, l'IFN- γ active une multitude de cascades de signalisation indépendantes de STAT (Gil, Bohn *et al.* 2001; Ramana, Gil *et al.* 2002). Parmi ces dernières, l'implication de certains membres de la superfamille de sérine/thréonine kinases PKC fut décrite. En réponse à l'IFN- γ , la PKC- ϵ et la PKC- δ sont requises pour la phosphorylation du résidu Ser727 de STAT1 dans les monocytes et les promyélocytes respectivement (Deb, Sassano *et al.* 2003; Chang, Holtzman *et al.* 2004). Dans cette optique, l'activité de la PKC- ϵ est essentielle à l'expression de la cytokine chimiotactique MCP-1, alors que la PKC- δ est plutôt impliquée dans l'expression du CMH II et de son transactivateur CIITA dans les macrophages RAW264.7 (Kwon, Yao *et al.* 2007). Dans un système similaire, il fut aussi démontré que l'expression de ces deux gènes requiert l'activité de la PKC- α (Giroux, Schmidt *et al.* 2003). Dans ce cas, il semble que la protéine module de façon post-traductionnelle l'activité du facteur de transcription IRF-1 dont l'expression est directement dépendante de la voie JAK/STAT. De plus, il fut observé que l'IFN- γ induit la translocation nucléaire de la PKC- α dans des macrophages RAW264.7 transitoirement transfectés avec une construction PKC- α -EGFP (Giroux, Schmidt *et al.* 2003). L'activité des différentes PKC et leur spécificité est principalement régulée par la présence des seconds messagers requis pour leur activation, le type cellulaire ainsi que leur localisation sub-cellulaire (Newton 2001; Martelli, Evangelisti *et al.* 2006). Ainsi, la découverte de la localisation nucléaire de la PKC- α suite à une stimulation par l'IFN- γ apparaît particulièrement importante pour en déterminer le rôle dans la régulation des réponses à la cytokine. Considérant l'absence d'un signal de

localisation nucléaire conventionnel et la taille importante de la PKC- α , il semble que d'autres mécanismes ou voies de signalisation soient impliquées dans la régulation de sa translocation nucléaire (Martelli, Sang *et al.* 1999). À partir de ces observations, nous avons entrepris d'identifier et de caractériser certaines voies de signalisation requises pour cette translocation nucléaire ainsi que leur implication potentielle dans la modulation des réponses à l'IFN- γ .

1. Translocation de la PKC- α endogène

Des études antérieures suggèrent que la fusion d'un gène d'intérêt à une molécule de fluorescence telle que la EGFP peut altérer la localisation cellulaire de la protéine résultante ou affecter les fonctions cellulaires (Söling 2002; Baens, Noels *et al.* 2006; Inomoto, Umemura *et al.* 2007). Puisque dans notre système, la translocation nucléaire de la PKC- α avait, jusqu'à présent, été observée qu'en condition de surexpression de la construction PKC- α -EGFP, nous avons vérifié que sa relocalisation cellulaire n'est pas attribuable à la construction avec GFP mais bien à la PKC- α (Giroux, Schmidt *et al.* 2003). Par immunofluorescence dans les macrophages RAW264.7 et BMM, nous avons observé que la stimulation à l'IFN- γ induit la translocation nucléaire du PKC- α endogène en comparaison aux cellules non stimulées. De plus, des macrophages RAW264.7 transfectés de façon transitoire avec le vecteur EGFP-C1 vide présentent une répartition uniforme de la fluorescence dans l'ensemble de la cellule, incluant le noyau et cette distribution n'est pas modulée par une stimulation à l'IFN- γ . Ces résultats confirment que la translocation nucléaire de la PKC- α -GFP n'est pas un artéfact de la surexpression mais une réponse représentative d'un mécanisme endogène. De plus, ces observations sont en accord avec des recherches précédentes où la localisation nucléaire de la PKC- α en réponse à l'IFN- γ chez des monocytes serait requise pour la phosphorylation du facteur de transcription PU.1 (Mazzi, Donini *et al.* 2004). Par ailleurs, le niveau d'expression de la protéine, et donc la translocation, étant supérieure chez les transfectants, nous avons poursuivi l'étude dans des RAW264.7 exprimant de façon transitoire la construction

PKC- α -EGFP afin de clairement déterminer la présence ou l'absence de translocation nucléaire.

2. Rôle des tyrosine kinases

Tout d'abord, afin d'établir l'implication des intermédiaires de la voie JAK/STAT, nous avons vérifié l'impact de trois inhibiteurs pharmacologiques sélectifs pour la JAK2, les protéines tyrosines kinases et les protéines tyrosines phosphatases. Ainsi, l'utilisation du tyrphostin AG-490, une molécule liant le site liaison du substrat de la JAK2 (Marrero, Schieffer *et al.* 1997), a permis d'établir que la translocation nucléaire de la PKC- α est indépendante de l'activité de la JAK2. Cette observation est surprenante puisque l'activité de la JAK2 est requise pour la phosphorylation de STAT1 sur Tyr701, mais n'est pas sans précédents (Chang, Holtzman *et al.* 2004). Par exemple, l'activation de la PI3-K et de la ERK1/2 en réponse à l'IFN- γ est indépendante de l'activité des JAK1 et 2 dans les fibroblastes embryonnaires murins (MEF) (Nguyen, Ramana *et al.* 2001). Par ailleurs, l'inhibition générale des protéines tyrosines kinases par l'herbimycin A résulte en une inhibition de la translocation nucléaire de la PKC- α . L'herbimycin A est un antibiotique benzoquinoid ansamycin naturel isolé de *Streptomyces sp.* qui dirige irréversiblement les tyrosines kinases vers la dégradation par le protéasome en liant la portion quinone de l'inhibiteur (Levitcki and Gazit 1995). Considérant l'implication des protéines tyrosines kinases, l'inhibition des protéines tyrosines phosphatases par le BpV(phen) (potassium bisperoxo (1,10-phenanthroline) oxovanadate (V_i)) (Tsiani and Fantus 1997; Olivier, Romero-Gallo *et al.* 1998) devait résulter en un accroissement du taux de translocation, ce qui fut d'ailleurs observé. Ainsi, la translocation nucléaire de la PKC- α requiert aussi l'activité de protéines tyrosines kinases autres que JAK2.

Des observations antérieures suggèrent certaines interactions entre les PKC et Src. Par exemple, il fut démontré que l'expression d'ICAM-1 en réponse à l'IFN- γ dans les cellules épithéliales requiert l'activation de la cascade PI-PLC- γ 2/PKC- α /Src (Chang, Holtzman *et al.* 2004). Par ailleurs, la PKC- δ possède un site de phosphorylation sur résidu tyrosine analogue aux substrats de Src et la phosphorylation de ce résidu semble

requis pour sa translocation au nucléaire (Steinberg 2004; Martelli, Evangelisti *et al.* 2006). Ainsi, afin de vérifier l'implication de Src dans la translocation nucléaire de la PKC- α en réponse à l'IFN- γ , nous avons utilisé l'inhibiteur PP2 et son analogue inactif le PP3. Le PP2 est un inhibiteur sélectif pour Src qui rivalise pour l'ATP mais avec peu d'impact sur d'autres protéines tyrosines kinases telles que la JAK2 comparativement à la staurosporine (Hanke, Gardner *et al.* 1996). Cependant, aucun impact n'a été observé sur le pourcentage de translocation nucléaire de la PKC- α -EGFP en microscopie confocale. La localisation nucléaire de la PKC- α implique donc l'activité de protéines tyrosines kinases autres que JAK2 et Src.

3. Rôle de l'activité de la PKC- α

Dans plusieurs modèles de translocation nucléaire induite par une stimulation, l'activation de la molécule est requise pour sa translocation. Par exemple, STAT1 requiert la phosphorylation du résidu Tyr701 pour sa dimérisation puis sa translocation au noyau des cellules stimulées à l'IFN- γ (Mochly-Rosen 1995; Horvath and Darnell 1997). Afin d'établir l'importance de l'activité de la PKC- α pour sa translocation nucléaire, nous avons vérifié l'impact de l'indolocarbazole Gö-6976 qui est un inhibiteur compétiteur d'ATP et restreint aux PKC dépendantes du Ca^{2+} (Martiny-Baron, Kazanietz *et al.* 1993). Cependant, le pourcentage de translocation est demeuré inchangé en présence de l'inhibiteur, ce qui suggère que la translocation nucléaire de la PKC- α est indépendante de son activité.

4. Rôle des cascades indépendantes de STAT1

Puisque la translocation nucléaire de la PKC- α est indépendante de son activité et de celle de la JAK2, mais que cette dernière est requise pour la phosphorylation de STAT1 sur Y701, il était pertinent de déterminer l'implication des cascades indépendantes de STAT1. Pour ce faire, nous avons utilisé des inhibiteurs sélectifs pour la PLC, les MAPK ERK1/2 et p38 ainsi que pour la PI3-K.

Considérant l'importance de la PLC pour l'activation de la PKC- α dans plusieurs systèmes (Mattila and Renkonen 1992), nous avons déterminé son rôle dans la translocation nucléaire à l'aide de l'inhibiteur U-73122 (1-[6-[[17 β -3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]-hexyl]1*H*-pyrrole-2,5-dione). Il s'agit d'un agent alkylant amphiphile qui s'insère dans les lipides membranaires pour potentiellement interférer avec l'activité des enzymes présentes (Bleasdale and K. 1993). Des études antérieures ont montré que la présence du U-73122 inhibe la génération d'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et de DAG en interagissant spécifiquement avec la PI-PLC (phosphoinositide-spécifique phospholipase C) (Mattila and Renkonen 1992). Puisque le DAG est requis pour l'activité de la PKC- α , il est cohérent que l'inhibition de la PLC n'ait pas d'impact sur le pourcentage de translocation nucléaire de la PKC- α . Ce résultat est d'ailleurs en accord avec celui obtenu avec le Gö-6976 et est en accord avec l'hypothèse que la translocation nucléaire de la PKC- α est indépendante de son activation.

Des études préliminaires ont montré que l'IFN- γ stimule la p38 MAPK par l'entremise de la protéine adaptatrice MyD88 dans les macrophages, et que cette activation accroît la stabilité des ARNm 3'ARE-UTR (Sun and Ding 2006). De plus, l'activation des MAPKs p38 et ERK1/2 régule négativement l'expression de CIITA et du CMH II dans les cellules dendritiques et les macrophages stimulés (Yao, Xu *et al.* 2006). À partir de ces observations, il était pertinent de vérifier l'implication possible des MAPKs ERK1/2 et p38 dans la translocation nucléaire de la PKC- α . Pour cibler la ERK1/2, nous avons utilisé le PD98059 (2'-Amino-3'-methoxyflavone). Il s'agit d'un inhibiteur non-compétitif, sélectif pour la MAPKK1 requise pour l'activation de la ERK1/2 (Alessi, Cuenda *et al.* 1995). Cependant, la présence du PD98059 (inhibiteur des ERKs) n'a eu aucun impact sur le pourcentage de translocation nucléaire de la PKC- α . Par ailleurs, l'utilisation du SB203580 (pyridinyl imidazol) qui inhibe l'activité de la p38 MAPK en liant le site de liaison de l'ATP a montré une inhibition significative de la translocation (Young, McLaughlin *et al.* 1997). Ce résultat montre l'implication de la p38 MAPK dans la translocation nucléaire de la PKC- α en réponse à l'IFN- γ , suggérant un nouveau partenaire d'interaction ou un nouveau substrat pour la p38 MAPK.

Tel que mentionné précédemment, la stimulation à l'IFN- γ de MEF induit l'activation de la PI3-K et ce, même en l'absence des JAK1 ou JAK2 (Nguyen, Ramana *et al.* 2001). Outre cette activation indépendante des tyrosines kinases associées au récepteur, la PI3-K module diverses réponses cellulaires notamment par l'entremise des PKC. En effet, il fut démontré que la PI3-K active les PKC- δ et - ϵ dans les promyélocytes et les monocytes respectivement (Deb, Sassano *et al.* 2003; Choudhury 2004). Dans ces deux cas, les PKC sont requises pour la phosphorylation du résidu Ser727 de STAT1 et la modulation de son activité transcriptionnelle. De plus, l'expression de MCP-1 dans les monocytes requiert l'activation de la cascade PKC- ϵ /STAT1(Ser727). Cependant, l'activité de la PI3-K dans les réponses à l'IFN- γ est décrite comme fortement spécifique au type cellulaire étudié. Par exemple, l'implication de PI3-K dans l'expression de GBP-1 en réponse à l'IFN- γ dans les cellules THP-1, n'est pas observée dans les monocytes (Navarro, Anand-Apte *et al.* 2003). Enfin, l'utilisation du Ly294002 dans notre système a permis d'établir un nouveau rôle pour la PI3-K dans les réponses à l'IFN- γ . Le Ly294002 est un inhibiteur qui bloque l'activité de la PI3-K en occupant le site de liaison de l'adénine et du ribose de l'ATP (Vanhaesebroeck, Leervers *et al.* 2001). On a d'ailleurs confirmé son efficacité par immunobuvardage pour la phosphorylation d'Akt, un effecteur de la PI3-K. En microscopie confocale la présence du Ly294002 a grandement réduit le pourcentage de translocation à un niveau similaire aux cellules non-stimulées par l'IFN- γ .

Il serait par ailleurs pertinent de vérifier l'importance de la p38 MAPK et de la PI3K pour la translocation nucléaire de la PKC- α endogène dans la lignée de cellules primaires BMM. Cette vérification permettrait de confirmer l'implication réelle des intermédiaires identifiés.

5. Activation de la p38 MAPK et de la PI3-K par l'IFN- γ

À partir des résultats obtenus en microscopie confocale, nous avons établi de caractériser davantage l'activation de la p38 MAPK et de la PI3-K en réponse à une stimulation par l'IFN- γ dans les BMM et la lignée RAW264.7. Par immunobuvardage, nous avons démontré que la phosphorylation de la p38 MAPK n'est pas affectée par l'inhibition sélective de la PI3-K ou de la JAK2 et réciproquement, la phosphorylation d'Akt n'est pas modulée par l'inhibition de la p38 MAPK ou de la JAK2. Par ailleurs, la présence du AG-490 inhibe complètement l'expression d'IRF-1, de CIITA et du CMH II qui dépendent notamment de la voie JAK/STAT. De ce fait, nous pouvons conclure que l'inhibiteur est efficace et que le maintien de l'activité de la PI3-K et de la phosphorylation de la p38 MAPK est une réponse indépendante de l'activité de la JAK2. Cependant, il serait pertinent de déterminer l'importance de la JAK1 pour cette activation.

6. Rôle de la translocation nucléaire de la PKC- α

Il fut précédemment démontré que l'activité de la PKC- α est requise pour l'expression de CIITA et du CMH II en réponse à l'IFN- γ dans les macrophages RAW264.7 (Giroux, Schmidt *et al.* 2003). Cette étude a fait appel à des mutants dominant-négatifs et des transfections transitoires de mutants constitutivement actifs de la PKC- α . Dans cette étude, nous avons utilisé l'inhibiteur Gö-6976, et tel qu'attendu, l'inhibition sélective de l'activité de la PKC- α bloque la synthèse d'ARNm de CIITA type IV et du CMH II en réponse à l'IFN- γ .

Ensuite, afin de vérifier le rôle de la translocation nucléaire de la PKC- α dans l'expression de ces gènes, nous avons vérifié si la synthèse des ARNm de CIITA et du CMH II était affectée par la présence des inhibiteurs sélectifs pour la p38 MAPK, la PI3-K et la JAK2. Ainsi, nous avons déterminé qu'outre l'implication déjà connue de la voie JAK/STAT, seule l'inhibition de la PI3-K bloque l'expression de ces deux gènes. Cependant, puisque l'inhibition de la p38 MAPK n'a pas d'effet sur l'expression de CIITA et du CMH II, mais que son activité est essentielle à la translocation nucléaire de

la PKC- α , nous pouvons conclure que les deux réponses sont indépendantes. En effet, il appert que la PKC- α module l'expression de CIITA et du CMH II à partir du cytoplasme et que son rôle nucléaire serait tout autre. Pour ce qui est de l'impact du Ly294002, il est possible qu'il résulte de l'implication de la PI3-K dans de multiples cascades de signalisation autres que celles menant à la translocation nucléaire de la PKC- α . De plus, nous avons montré que la modulation de l'expression de CIITA et du CMH II par la PI3-K et la PKC- α n'est pas le résultat d'une modification du niveau d'expression d'IRF-1 qui est requis pour leur synthèse. Par ailleurs, l'expression de GBP, un autre gène de réponse à l'IFN- γ dépendant d'IRF-1, n'est pas affectée par l'inhibition des PKC- α , PI3-K ou p38 MAPK (Briken, Ruffner *et al.* 1995). Ces résultats suggèrent une modulation spécifique de CIITA et du CMH II par la PKC- α qui n'est pas attribuable à une modification du niveau d'expression ou de l'activité du facteur de transcription IRF-1. Enfin, cette observation est aussi en accord avec l'observation que l'expression d'IRF-1 en réponse à l'IFN- γ n'est pas affectée dans des macrophages exprimant un mutant dominant-négatif de la PKC- α (Giroux, Schmidt *et al.* 2003). Cependant, comme Giroux *et al.* (2003) l'a suggéré, il est possible que l'activité de la PKC- α soit requis pour moduler au niveau post-traductionnel l'activité d'IRF-1 (Giroux, Schmidt *et al.* 2003). Il serait donc intéressant de vérifier l'implication de la MAPK p38 et de la PI3-K sur le point de focalisation isoélectrique d'IRF-1 par immunobuvardage à deux dimensions.

7. Nouveau rôle de la PKC- α en réponse à l'IFN- γ

Tel que décrit précédemment, les PKC- δ et PKC- ϵ sont essentielles à la phosphorylation du résidu Ser727 de STAT1 dans différents types cellulaires et cette réponse requiert l'activité de la PI3-K en amont de l'activation des PKC (Deb, Sassano *et al.* 2003; Choudhury 2004). Il était donc pertinent de vérifier l'implication de la PKC- α et de la PI3-K dans cette réponse requise pour l'expression de plusieurs gènes induit par l'IFN- γ . Ainsi, nous avons démontré que l'activité de la PKC- α est requise pour la phosphorylation du résidu Ser727 de STAT1. Cependant, en opposition aux PKC- δ et PKC- ϵ , l'activité de la PKC- α sur STAT1 n'implique pas la PI3-K. Ce nouveau rôle de la

PKC- α suggère une interaction possible avec STAT1 qui pourrait représenter un véhicule efficace de transport nucléaire pour la protéine. En effet, ce transport pourrait être indépendant de l'activité de la PKC- α puisque STAT1 induit l'expression de gènes même en l'absence d'une phosphorylation du résidu sérine, ce qui est en accord avec la conclusion que la translocation nucléaire de PKC- α ne requiert pas son activité. Une autre hypothèse serait une redondance dans l'implication des PKC pour la modulation des réponses cellulaires. Cette hypothèse est suggérée par la capacité de la PKC- δ de transférer un groupement phosphate au résidu Ser727 de STAT1 dans les macrophages stimulés. Il serait pertinent de vérifier l'impact d'un mutant STAT1 ne pouvant transloquer au noyau sur la translocation nucléaire de la PKC- α .

8. Activation de la PKC- α

Enfin, la phosphorylation de la PKC- α en réponse à l'IFN- γ est indépendante de l'activité de la PI3-K et de la p38 MAPK. Ce résultat est en accord avec l'indépendance observée entre les molécules de signalisation requises pour la translocation nucléaire de la PKC- α et celles responsables de son activité résultant notamment en la phosphorylation de STAT1(Ser727). Cette conclusion est aussi en accord avec l'hypothèse que l'inhibition de l'expression de CIITA et du CMH II en présence du Ly294002 représente une réponse indépendante de la translocation nucléaire de la PKC- α .

9. Conclusion

En conclusion, au cours de ce projet nous avons démontré que la stimulation par l'IFN- γ de macrophages induit l'activation de la PKC- α qui est impliquée dans diverses réponses cellulaires. Ainsi, l'activation de la PKC- α résulte en la phosphorylation du résidu Ser727 de STAT1, en l'expression du CMH II et de son transactivateur CIITA, indépendamment d'une modification du niveau d'expression du facteur de transcription IRF-1. De plus, l'IFN- γ stimule les cascades de signalisation des PI3-K et p38 MAPK, indépendamment de la voie JAK/STAT. Enfin, nous avons démontré que ces deux

intermédiaires sont essentiels pour la translocation nucléaire de la PKC- α suite à la stimulation. Cependant, il semble que les réponses déterminées comme dépendantes de l'activité de la PKC- α demeurent insensibles à l'inhibition de sa translocation nucléaire. Des études additionnelles seront nécessaires pour identifier avec précision le rôle intranucléaire de la PKC- α .

CONCLUSION

En conclusion, au cours de ce projet nous avons démontré que la stimulation par l'IFN- γ induit la translocation nucléaire de la PKC- α chez les macrophages. Cette translocation précédemment observé dans un système de surexpression fut confirmée par immunofluorescence dans des macrophages immortalisés RAW264.7, mais également dans des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMM). Nous avons vérifié l'impact de divers inhibiteurs pharmacologiques sur la translocation nucléaire de la PKC- α ce qui nous a permis d'établir l'implication de la MAPK p38 ainsi que de la PI3-K. Par cette stratégie, nous avons aussi pu déterminer que la translocation est une réponse indépendante de l'activité de la PKC- α et de la JAK2. De plus, nous avons déterminé par immunobuvardage que l'activation de la p38 MAPK et de la PI3-K sont indépendantes et ne sont pas requises pour l'activation de la PKC- α . Par ailleurs, l'activité de cette dernière est nécessaire à la phosphorylation du résidu Ser727 de STAT1. Par ailleurs, nous avons établi que bien que l'expression de CIITA et du CMH II requièrent l'activité de la PKC- α , elle est indépendante de sa translocation nucléaire. Enfin, la diminution de l'expression de ces deux gènes par l'inhibition de la PKC- α n'est pas la résultante d'une modulation du niveau d'expression du facteur de transcription IRF-1 (Figure 8).

En somme, nous avons démontré que la stimulation à l'IFN- γ induit une relocalisation nucléaire de la PKC- α . L'étude des mécanismes impliqués dans cette translocation nous a permis de conférer un nouveau rôle cellulaire à la PI3-K ainsi qu'à la MAPK p38. De plus, nous avons démontré que la translocation nucléaire de la PKC- α est une réponse indépendante de son activité et n'est pas requise pour la modulation de l'expression de gènes connus pour être dépendant de l'activité de la protéine.

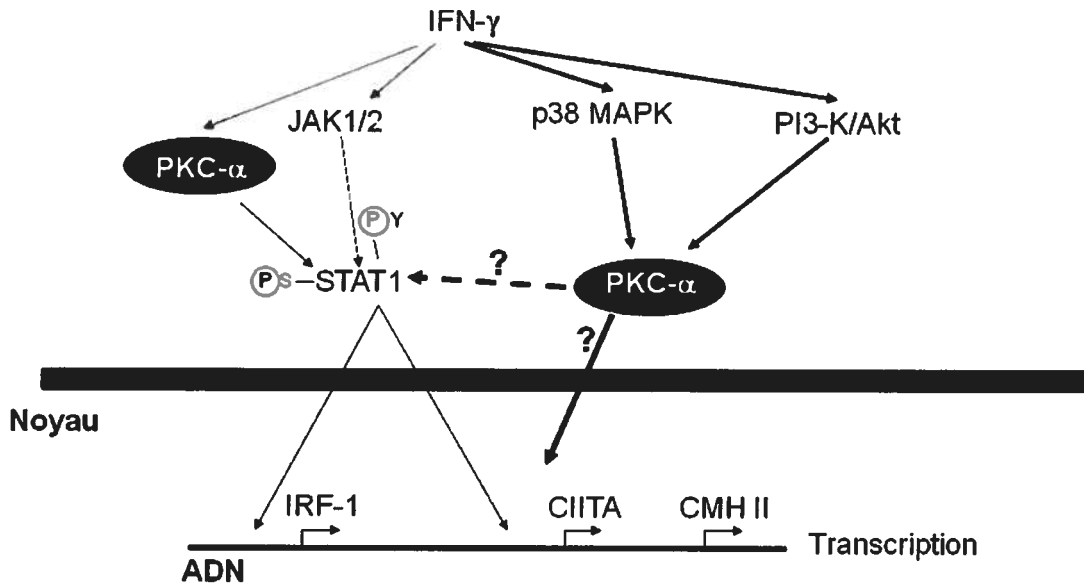


Figure 8 : Différentes voies de signalisation impliquant la PKC- α et activées en réponse à l'IFN- γ . Nous avons démontré que la translocation nucléaire de la PKC- α en réponse à l'IFN- γ est dépendante de l'activité de la p38 MAPK et de la PI3-K, mais indépendante de STAT1. D'autre part, nous avons démontré que l'activité de la PKC- α est requise pour la phosphorylation du résidu sérine de STAT1, indépendamment de JAK2. Enfin, l'IFN- γ induit la liaison de PKC- α avec STAT1.

Remerciements

J'aimerais remercier Albert Descoteaux pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour m'avoir permis de vivre cette expérience de la vie de laboratoire. Je remercie aussi tout les membres du laboratoire pour leur esprit d'équipe, leur présence et leur soutien lors des moments difficiles et heureux. Enfin, je remercie ma famille, mes parents et mes amis pour m'avoir soutenu, conseillé et changé les idées durant les périodes heureuses et devant les obstacles personnels et scolaires.

RÉFÉRENCES

- AHMED, C. M. and H. M. JOHNSON (2006)."IFN-gamma and its receptor subunit IFNGR1 are recruited to the IFN-gamma-activated sequence element at the promoter site of IFN-gamma-activated genes: evidence of transactivational activity in IFNGR1." J Immunol **177**(1): 315-21.
- ALESSI, D. R., A. CUENDA, P. COHEN, D. T. DUDLEY and A. R. SALTIEL (1995)."PD 098059 Is a Specific Inhibitor of the Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase in Vitro and in Vivo." J. Biol. Chem. **270**(46): 27489-27494.
- ALEXANDROPOULOS, K., L. T. DONLIN, L. XING and A. G. REGELMANN (2003)."Sin: good or bad? A T lymphocyte perspective." Immunological Reviews **192**(1): 181-195.
- ALSAYED, Y., S. UDDIN, S. AHMAD, B. MAJCHRZAK, B. J. DRUKER, E. N. FISH and L. C. PLATANIAS (2000)."IFN-gamma activates the C3G/Rap1 signaling pathway." J Immunol **164**(4): 1800-6.
- ASHWELL, J. D. (2006)."The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system." Nat Rev Immunol **6**(7): 532-40.
- BACH, E. A., M. AGUET and R. D. SCHREIBER (1997)."The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling." Annu Rev Immunol **15**: 563-91.
- BACH, E. A., J. W. TANNER, S. MARSTERS, A. ASHKENAZI, M. AGUET, A. S. SHAW and R. D. SCHREIBER (1996)."Ligand-induced assembly and activation of the gamma interferon receptor in intact cells." Mol Cell Biol **16**(6): 3214-21.
- BAENS, M., H. NOELS, V. BROECKX, S. HAGENS, S. FEVERY, A. D. BILLIAU, H. VANKELECOM and P. MARYNEN (2006)."The Dark Side of EGFP: Defective Polyubiquitination." PLoS ONE **1**: e54.

- BECKER, K. P. and Y. A. HANNUN (2005)."Protein kinase C and phospholipase D: intimate interactions in intracellular signaling." Cell Mol Life Sci **62**(13): 1448-61.
- BEHN-KRAPPA, A. and A. C. NEWTON (1999)."The hydrophobic phosphorylation motif of conventional protein kinase C is regulated by autophosphorylation." Current Biology **9**(14): 728-737.
- BILLIAU, A. (2006)."Interferon: the pathways of discovery I. Molecular and cellular aspects." Cytokine Growth Factor Rev **17**(5): 381-409.
- BJORGE, J. D., A. JAKYMIW and D. J. FUJITA (2000)."Selected glimpses into the activation and function of Src kinase." Oncogene **19**(49): 5620-35.
- BLEASDALE, J. E. and F. S. K. (1993)."Use of U-73122 as an Inhibitor of Phospholipase C-Dependent Processes." Neuroprotocols **3**(2): 125-133.
- BOGDAN, C. and U. SCHLEICHER (2006)."Production of interferon-[gamma] by myeloid cells - fact or fancy?" Trends in Immunology **27**(6): 282-290.
- BOGOYEVITCH, M. A. and B. KOBE (2006)."Uses for JNK: the Many and Varied Substrates of the c-Jun N-Terminal Kinases." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **70**(4): 1061-1095.
- BOTTOMLEY, M. J., K. SALIM and G. PANAYOTOU (1998)."Phospholipid-binding protein domains." Biochim Biophys Acta **1436**(1-2): 165-83.
- BRIERLEY, M. M. and E. N. FISH (2005)."Stats: multifaceted regulators of transcription." J Interferon Cytokine Res **25**(12): 733-44.

- BRIKEN, V., H. RUFFNER, U. SCHULTZ, A. SCHWARZ, L. F. REIS, I. STREHLOW, T. DECKER and P. STAEHELI (1995). "Interferon regulatory factor 1 is required for mouse Gbp gene activation by gamma interferon." Mol Cell Biol 15(2): 975-82.
- BRISCOE, J., D. GUSCHIN, N. C. ROGERS, D. WATLING, M. MULLER, F. HORN, P. HEINRICH, G. R. STARK and I. M. KERR (1996). "JAKs, STATs and signal transduction in response to the interferons and other cytokines." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 351(1336): 167-71.
- BRISCOE, J., N. C. ROGERS, B. A. WITTHUHN, D. WATLING, A. G. HARPUR, A. F. WILKS, G. R. STARK, J. N. IHLE and I. M. KERR (1996). "Kinase-negative mutants of JAK1 can sustain interferon-gamma-inducible gene expression but not an antiviral state." Embo J 15(4): 799-809.
- BUNCE, M. W., K. BERGENDAHL and R. A. ANDERSON (2006). "Nuclear PI(4,5)P(2): A new place for an old signal." Biochim Biophys Acta.
- CHANG, Y. J., M. J. HOLTZMAN and C. C. CHEN (2002). "Interferon-gamma-induced epithelial ICAM-1 expression and monocyte adhesion. Involvement of protein kinase C-dependent c-Src tyrosine kinase activation pathway." J Biol Chem 277(9): 7118-26.
- CHANG, Y. J., M. J. HOLTZMAN and C. C. CHEN (2004). "Differential role of Janus family kinases (JAKs) in interferon-gamma-induced lung epithelial ICAM-1 expression: involving protein interactions between JAKs, phospholipase Cgamma, c-Src, and STAT1." Mol Pharmacol 65(3): 589-98.

- CHOUDHURY, G. G. (2004)."A Linear Signal Transduction Pathway Involving Phosphatidylinositol 3-Kinase, Protein Kinase C{epsilon}, and MAPK in Mesangial Cells Regulates Interferon- γ -induced STAT1 α Transcriptional Activation." J. Biol. Chem. **279**(26): 27399-27409.
- COSTA-PEREIRA, A. P., H. M. HERMANN, H. IS'HARC, T. M. WILLIAMS, D. WATLING, V. ARULAMPALAM, S. J. NEWMAN, P. C. HEINRICH and I. M. KERR (2005)."Signaling through a mutant IFN- γ receptor." J Immunol **175**(9): 5958-65.
- CULLELL-YOUNG, M., M. BARRACHINA, C. LOPEZ-LOPEZ, E. GONALONS, J. LLOBERAS, C. SOLER and A. CELADA (2001)."From transcription to cell surface expression, the induction of MHC class II I-A alpha by interferon- γ in macrophages is regulated at different levels." Immunogenetics **53**(2): 136-44.
- DARNELL, J. E., JR. (1997)."STATs and gene regulation." Science **277**(5332): 1630-5.
- DEB, D. K., A. SASSANO, F. LEKMINE, B. MAJCHRZAK, A. VERMA, S. KAMBHAMPATI, S. UDDIN, A. RAHMAN, E. N. FISH and L. C. PLATANIAS (2003)."Activation of protein kinase C delta by IFN- γ ." J Immunol **171**(1): 267-73.
- DECKER, T. and P. KOVARIK (2000)."Serine phosphorylation of STATs." Oncogene **19**(21): 2628-37.
- DELERIS, P., S. GAYRAL and M. BRETON-DOUILLON (2006)."Nuclear PtdIns(3,4,5)P3 signaling: an ongoing story." J Cell Biochem **98**(3): 469-85.

- ENDO, T. A., M. MASUHARA, M. YOKOUCHI, R. SUZUKI, H. SAKAMOTO, K. MITSUI, A. MATSUMOTO, S. TANIMURA, M. OHTSUBO, H. MISAWA, T. MIYAZAKI, N. LEONOR, T. TANIGUCHI, T. FUJITA, Y. KANAKURA, S. KOMIYA and A. YOSHIMURA (1997). "A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases." Nature **387**(6636): 921-4.
- FEARON, D. T. and R. M. LOCKSLEY (1996). "The instructive role of innate immunity in the acquired immune response." Science **272**(5258): 50-3.
- FLANDIN, J. F., F. CHANO and A. DESCOTEAUX (2006). "RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages." Eur J Immunol **36**(2): 411-20.
- FOSTER, F. M., C. J. TRAER, S. M. ABRAHAM and M. J. FRY (2003). "The phosphoinositide (PI) 3-kinase family." J Cell Sci **116**(Pt 15): 3037-40.
- FRIEDL, P., A. T. DEN BOER and M. GUNZER (2005). "Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse." Nat Rev Immunol **5**(7): 532-45.
- FRUCHT, D. M., T. FUKAO, C. BOGDAN, H. SCHINDLER, J. J. O'SHEA and S. KOYASU (2001). "IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge." Trends Immunol **22**(10): 556-60.
- GIL, M. P., E. BOHN, A. K. O'GUIN, C. V. RAMANA, B. LEVINE, G. R. STARK, H. W. VIRGIN and R. D. SCHREIBER (2001). "Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6680-5.

- GIROUX, M., M. SCHMIDT and A. DESCOTEAUX (2003)."IFN-gamma-induced MHC class II expression: transactivation of class II transactivator promoter IV by IFN regulatory factor-1 is regulated by protein kinase C-alpha." J Immunol **171**(8): 4187-94.
- GOH, K. C., S. J. HAQUE and B. R. WILLIAMS (1999)."p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons." Embo J **18**(20): 5601-8.
- GREENLUND, A., R. SCHREIBER, D. GOEDDEL and D. PENNICA (1993)."Interferon-gamma induces receptor dimerization in solution and on cells." J. Biol. Chem. **268**(24): 18103-18110.
- HAAN, C., S. KREIS, C. MARGUE and I. BEHRMANN (2006)."Jaks and cytokine receptors-An intimate relationship." Biochem Pharmacol.
- HANKE, J. H., J. P. GARDNER, R. L. DOW, P. S. CHANGELIAN, W. H. BRISSETTE, E. J. WERINGER, B. A. POLLOK and P. A. CONNELLY (1996)."Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation." J Biol Chem **271**(2): 695-701.
- HARADA, H., T. FUJITA, M. MIYAMOTO, Y. KIMURA, M. MARUYAMA, A. FURIA, T. MIYATA and T. TANIGUCHI (1989)."Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes." Cell **58**(4): 729-39.
- HIRSCH, J. G. (1959)."Immunity to infectious diseases: review of some concepts of Metchnikoff." Bacteriol Rev **23**(2): 48-60.
- HORVATH, C. M. (2000)."STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals." Trends Biochem Sci **25**(10): 496-502.

- HORVATH, C. M. and J. E. DARNELL (1997). "The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 233-9.
- IGARASHI, K., G. GAROTTA, L. OZMEN, A. ZIEMIECKI, A. F. WILKS, A. G. HARPUR, A. C. LARNER and D. S. FINBLOOM (1994). "Interferon-gamma induces tyrosine phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor." J Biol Chem **269**(20): 14333-6.
- IHLE, J. N. (1995). "The Janus protein tyrosine kinases in hematopoietic cytokine signaling." Semin Immunol **7**(4): 247-54.
- INOMOTO, C., S. UMEMURA, N. EGASHIRA, T. MINEMATSU, S. TAKEKOSHI, Y. ITOH, J. ITOH, L. TAUPENOT, D. T. O'CONNOR and R. Y. OSAMURA (2007). "Granulogenesis in Non-neuroendocrine COS-7 Cells Induced by EGFP-tagged Chromogranin A Gene Transfection: Identical and Distinct Distribution of CgA and EGFP." J. Histochem. Cytochem. **55**(5): 487-493.
- IVASKA, J., L. BOSCA and P. J. PARKER (2003). "PKCepsilon is a permissive link in integrin-dependent IFN-gamma signalling that facilitates JAK phosphorylation of STAT1." Nat Cell Biol **5**(4): 363-9.
- KAPLAN, D. H., A. C. GREENLUND, J. W. TANNER, A. S. SHAW and R. D. SCHREIBER (1996). "Identification of an interferon-gamma receptor alpha chain sequence required for JAK-1 binding." J Biol Chem **271**(1): 9-12.
- KAUR, S., S. UDDIN and L. C. PLATANIAS (2005). "The PI3' kinase pathway in interferon signaling." J Interferon Cytokine Res **25**(12): 780-7.

- KOTENKO, S. V., G. GALLAGHER, V. V. BAURIN, A. LEWIS-ANTES, M. SHEN, N. K. SHAH, J. A. LANGER, F. SHEIKH, H. DICKENSHEETS and R. P. DONNELLY (2003). "IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex." Nat Immunol **4**(1): 69-77.
- KOVARIK, P., M. MANGOLD, K. RAMSAUER, H. HEIDARI, R. STEINBORN, A. ZOTTER, D. E. LEVY, M. MULLER and T. DECKER (2001). "Specificity of signaling by STAT1 depends on SH2 and C-terminal domains that regulate Ser727 phosphorylation, differentially affecting specific target gene expression." Embo J **20**(1-2): 91-100.
- KOVARIK, P., D. STOIBER, P. A. EYERS, R. MENGHINI, A. NEININGER, M. GAESTEL, P. COHEN and T. DECKER (1999). "Stress-induced phosphorylation of STAT1 at Ser727 requires p38 mitogen-activated protein kinase whereas IFN-gamma uses a different signaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13956-61.
- KRENS, S. F. G., H. P. SPAINK and B. E. SNAAR-JAGALSKA (2006). "Functions of the MAPK family in vertebrate-development." FEBS Letters **580**(21): 4984-4990.
- KROGER, A., M. KOSTER, K. SCHROEDER, H. HAUSER and P. P. MUELLER (2002). "Activities of IRF-1." J Interferon Cytokine Res **22**(1): 5-14.
- KWON, M. J., Y. YAO, M. J. WALTER, M. J. HOLTZMAN and C. H. CHANG (2007). "Role of PKCdelta in IFN-gamma-inducible CIITA gene expression." Mol Immunol **44**(11): 2841-9.
- KYRIAKIS, J. M. and J. AVRUCH (2001). "Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation." Physiol. Rev. **81**(2): 807-869.

- LESSMANN, E., M. NGO, M. LEITGES, S. MINGUET, N. D. RIDGWAY and M. HUBER (2006). "Oxysterol-binding protein-related protein (ORP) 9 is a PDK-2 substrate and regulates Akt phosphorylation." Cell Signal.
- LEVITZKI, A. and A. GAZIT (1995). "Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development." Science **267**(5205): 1782-8.
- LI, Y., A. SASSANO, B. MAJCHRZAK, D. K. DEB, D. E. LEVY, M. GAESTEL, A. R. NEBREDA, E. N. FISH and L. C. PLATANIAS (2004). "Role of p38alpha Map kinase in Type I interferon signaling." J Biol Chem **279**(2): 970-9.
- LIM, W. G., B. J. TAN, Y. ZHU, S. ZHOU, J. S. ARMSTRONG, Q. T. LI, Q. DONG, E. CHAN, D. SMITH and C. VERMA (2006). "The very C-terminus of PRK1/PKN is essential for its activation by RhoA and downstream signaling." Cellular Signalling **18**(9): 1473-1481.
- LIU, B., M. GROSS, J. TEN HOEVE and K. SHUAI (2001). "A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(6): 3203-7.
- LIU, B., J. LIAO, X. RAO, S. A. KUSHNER, C. D. CHUNG, D. D. CHANG and K. SHUAI (1998). "Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(18): 10626-31.
- LIU, B., S. MINK, K. A. WONG, N. STEIN, C. GETMAN, P. W. DEMPSEY, H. WU and K. SHUAI (2004). "PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity." Nat Immunol **5**(9): 891-8.
- LIU, K. D., S. L. GAFFEN and M. A. GOLDSMITH (1998). "JAK/STAT signaling by cytokine receptors." Curr Opin Immunol **10**(3): 271-8.

- MARRERO, M. B., B. SCHIEFFER, B. LI, J. SUN, J. B. HARP and B. N. LING (1997). "Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation." J Biol Chem **272**(39): 24684-90.
- MARTELLI, A. M., C. EVANGELISTI, M. NYAKERN and F. A. MANZOLI (2006). "Nuclear protein kinase C." Biochim Biophys Acta.
- MARTELLI, A. M., N. SANG, P. BORGATTI, S. CAPITANI and L. M. NERI (1999). "Multiple biological responses activated by nuclear protein kinase C." J Cell Biochem **74**(4): 499-521.
- MARTINY-BARON, G., M. G. KAZANIETZ, H. MISCHAK, P. M. BLUMBERG, G. KOCHS, H. HUG, D. MARME and C. SCHACHTELE (1993). "Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976." J Biol Chem **268**(13): 9194-7.
- MATTILA, P. and R. RENKONEN (1992). "IFN-gamma induces a phospholipase D dependent triphasic activation of protein kinase C in endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **189**(3): 1732-8.
- MAZZI, P., M. DONINI, D. MARGOTTO, F. WIENTJES and S. DUSI (2004). "IFN-gamma induces gp91phox expression in human monocytes via protein kinase C-dependent phosphorylation of PU.1." J Immunol **172**(8): 4941-7.
- MELLOR, H. and P. J. PARKER (1998). "The extended protein kinase C superfamily." Biochem J **332** (Pt 2): 281-92.

- MERAZ, M. A., J. M. WHITE, K. C. SHEEHAN, E. A. BACH, S. J. RODIG, A. S. DIGHE, D. H. KAPLAN, J. K. RILEY, A. C. GREENLUND, D. CAMPBELL, K. CARVER-MOORE, R. N. DUBOIS, R. CLARK, M. AGUET and R. D. SCHREIBER (1996). "Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway." Cell **84**(3): 431-42.
- MINOO, P., M. M. ZADEH, R. ROTTAPPEL, J. J. LEBRUN and S. ALI (2004). "A novel SHP-1/Grb2-dependent mechanism of negative regulation of cytokine-receptor signaling: contribution of SHP-1 C-terminal tyrosines in cytokine signaling." Blood **103**(4): 1398-407.
- MOAREFI, I., M. LAFEVRE-BERNT, F. SICHERI, M. HUSE, C. H. LEE, J. KURIYAN and W. T. MILLER (1997). "Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement." Nature **385**(6617): 650-3.
- MOCHLY-ROSEN, D. (1995). "Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction." Science **268**(5208): 247-251.
- MUHLETHALER-MOTTET, A., W. DI BERARDINO, L. A. OTTEN and B. MACH (1998). "Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1." Immunity **8**(2): 157-66.
- MUSASHI, M., S. OTA and N. SHIROSHITA (2000). "The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis." Int J Hematol **72**(1): 12-9.
- NAKASHIMA, S. (2002). "Protein kinase C alpha (PKC alpha): regulation and biological function." J Biochem (Tokyo) **132**(5): 669-75.

- NAVARRO, A., B. ANAND-APTE, Y. TANABE, G. FELDMAN and A. C. LARNER (2003). "A PI-3 kinase-dependent, Stat1-independent signaling pathway regulates interferon-stimulated monocyte adhesion." J Leukoc Biol **73**(4): 540-5.
- NEWTON, A. C. (2001). "Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions." Chem Rev **101**(8): 2353-64.
- NGUYEN, H., C. V. RAMANA, J. BAYES and G. R. STARK (2001). "Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon-gamma-dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression." J Biol Chem **276**(36): 33361-8.
- NIKCEVICH, K. M., J. F. PISKURICH, R. P. HELLENDALL, Y. WANG and J. P. TING (1999). "Differential selectivity of CIITA promoter activation by IFN-gamma and IRF-1 in astrocytes and macrophages: CIITA promoter activation is not affected by TNF-alpha." J Neuroimmunol **99**(2): 195-204.
- NISHIMOTO, S. and E. NISHIDA (2006). "MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2." EMBO Rep **7**(8): 782-6.
- NISHIZUKA, Y. (1988). "The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation." Nature **334**(6184): 661-5.
- OHNO, S. and Y. NISHIZUKA (2002). "Protein kinase C isoforms and their specific functions: prologue." J Biochem (Tokyo) **132**(4): 509-11.
- OLIVIER, M., B. J. ROMERO-GALLO, C. MATTE, J. BLANCHETTE, B. I. POSNER, M. J. TREMBLAY and R. FAURE (1998). "Modulation of interferon-gamma-induced macrophage activation by phosphotyrosine phosphatases inhibition. Effect on murine Leishmaniasis progression." J Biol Chem **273**(22): 13944-9.

- PAI, R. K., D. ASKEW, W. H. BOOM and C. V. HARDING (2002). "Regulation of class II MHC expression in APCs: roles of types I, III, and IV class II transactivator." J Immunol **169**(3): 1326-33.
- PAREKH, D. B., W. ZIEGLER and P. J. PARKER (2000). "Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation." Embo J **19**(4): 496-503.
- PAWATE, S. and N. R. BHAT (2006). "C-Jun N-terminal kinase (JNK) regulation of iNOS expression in glial cells: predominant role of JNK1 isoform." Antioxid Redox Signal **8**(5-6): 903-9.
- PESTKA, S., C. D. KRAUSE and M. R. WALTER (2004). "Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors." Immunol Rev **202**: 8-32.
- PLATANIAS, L. C. (2005). "Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling." Nat Rev Immunol **5**(5): 375-86.
- PLATANIAS, L. C. and E. N. FISH (1999). "Signaling pathways activated by interferons." Exp Hematol **27**(11): 1583-92.
- PLATANIAS, L. C., S. UDDIN, E. BRUNO, M. KORKMAZ, S. AHMAD, Y. ALSAYED, D. VAN DEN BERG, B. J. DRUKER, A. WICKREMA and R. HOFFMAN (1999). "CrkL and CrkII participate in the generation of the growth inhibitory effects of interferons on primary hematopoietic progenitors." Exp Hematol **27**(8): 1315-21.
- POKROVSKAJA, K., T. PANARETAKIS and D. GRANDER (2005). "Alternative signaling pathways regulating type I interferon-induced apoptosis." J Interferon Cytokine Res **25**(12): 799-810.
- PRIVE, C. and A. DESCOTEAUX (2000). "Leishmania donovani promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase,

- and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages." Eur J Immunol **30**(8): 2235-44.
- QUITTAU-PREVOSTEL, C., N. DELAUNAY, A. COLLAZOS, A. VALLENTIN and D. JOUBERT (2004)."Targeting of PKC α and epsilon in the pituitary: a highly regulated mechanism involving a GD(E)E motif of the V3 region." J Cell Sci **117**(Pt 1): 63-72.
- RABINOVITCH, M. (1995)."Professional and non-professional phagocytes: an introduction." Trends Cell Biol **5**(3): 85-7.
- RAMANA, C. V., M. P. GIL, Y. HAN, R. M. RANSOHOFF, R. D. SCHREIBER and G. R. STARK (2001)."Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN-gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6674-9.
- RAMANA, C. V., M. P. GIL, R. D. SCHREIBER and G. R. STARK (2002)."Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling." Trends Immunol **23**(2): 96-101.
- RAMSAUER, K., I. SADZAK, A. PORRAS, A. PILZ, A. R. NEBREDA, T. DECKER and P. KOVARIK (2002)."p38 MAPK enhances STAT1-dependent transcription independently of Ser-727 phosphorylation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 12859-64.
- REGIS, G., L. CONTI, D. BOSELLI and F. NOVELLI (2006)."IFN γ R2 trafficking tunes IFN γ -STAT1 signaling in T lymphocytes." Trends Immunol **27**(2): 96-101.
- SAKAMOTO, H., H. YASUKAWA, M. MASUHARA, S. TANIMURA, A. SASAKI, K. YUGE, M. OHTSUBO, A. OHTSUKA, T. FUJITA, T. OHTA, Y. FURUKAWA, S. IWASE, H. YAMADA and A. YOSHIMURA (1998)."A Janus kinase

- inhibitor, JAB, is an interferon-gamma-inducible gene and confers resistance to interferons." Blood **92**(5): 1668-76.
- SAKATSUME, M., K. IGARASHI, K. D. WINESTOCK, G. GAROTTA, A. C. LARNER and D. S. FINBLOOM (1995)."The Jak kinases differentially associate with the alpha and beta (accessory factor) chains of the interferon gamma receptor to form a functional receptor unit capable of activating STAT transcription factors." J Biol Chem **270**(29): 17528-34.
- SANDS, W. A., J. S. CLARK and F. Y. LIEW (1994)."The role of a phosphatidylcholine-specific phospholipase C in the production of diacylglycerol for nitric oxide synthesis in macrophages activated by IFN-gamma and LPS." Biochem Biophys Res Commun **199**(2): 461-6.
- SCHRODER, K., P. J. HERTZOG, T. RAVASI and D. A. HUME (2004)."Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." J Leukoc Biol **75**(2): 163-89.
- SHEPPARD, P., W. KINDSVOGEL, W. XU, K. HENDERSON, S. SCHLUTSMEYER, T. E. WHITMORE, R. KUESTNER, U. GARRIGUES, C. BIRKS, J. RORABACK, C. OSTRANDER, D. DONG, J. SHIN, S. PRESNELL, B. FOX, B. HALDEMAN, E. COOPER, D. TAFT, T. GILBERT, F. J. GRANT, M. TACKETT, W. KRIVAN, G. MCKNIGHT, C. CLEGG, D. FOSTER and K. M. KLUCHER (2003)."IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R." Nat Immunol **4**(1): 63-8.
- SHIRAI, Y. and N. SAITO (2002)."Activation mechanisms of protein kinase C: maturation, catalytic activation, and targeting." J Biochem (Tokyo) **132**(5): 663-8.
- SHTRICHMAN, R. and C. E. SAMUEL (2001)."The role of gamma interferon in antimicrobial immunity." Curr Opin Microbiol **4**(3): 251-9.

- SHUAI, K. and B. LIU (2003). "Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system." Nat Rev Immunol 3(11): 900-11.
- SHUAI, K. and B. LIU (2005). "Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system." Nat Rev Immunol 5(8): 593-605.
- SÖLING (2002). "Intracellular localization of Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase fused to different fluorescent proteins depends on choice of fluorescent tag." 527(1-3): 153-158.
- SONG, M. M. and K. SHUAI (1998). "The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities." J Biol Chem 273(52): 35056-62.
- SONNENBURG, E. D., T. GAO and A. C. NEWTON (2001). "The Phosphoinositide-dependent Kinase, PDK-1, Phosphorylates Conventional Protein Kinase C Isozymes by a Mechanism That Is Independent of Phosphoinositide 3-Kinase." J. Biol. Chem. 276(48): 45289-45297.
- STARK, G. R., I. M. KERR, B. R. WILLIAMS, R. H. SILVERMAN and R. D. SCHREIBER (1998). "How cells respond to interferons." Annu Rev Biochem 67: 227-64.
- STARR, R., T. A. WILLSON, E. M. VINEY, L. J. MURRAY, J. R. RAYNER, B. J. JENKINS, T. J. GONDA, W. S. ALEXANDER, D. METCALF, N. A. NICOLA and D. J. HILTON (1997). "A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling." Nature 387(6636): 917-21.
- STEIMLE, V., L. A. OTTEN, M. ZUFFEREY and B. MACH (1993). "Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome)." Cell 75(1): 135-46.

- STEIMLE, V., C. A. SIEGRIST, A. MOTTET, B. LISOWSKA-GROSPIERRE and B. MACH (1994)."Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA." Science **265**(5168): 106-9.
- STEINBERG, S. F. (2004)."Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta." Biochem J **384**(Pt 3): 449-59.
- STUART, L. M. and R. A. EZEKOWITZ (2005)."Phagocytosis: elegant complexity." Immunity **22**(5): 539-50.
- SUBRAMANIAM, P. S., J. LARKIN, 3RD, M. G. MUJTABA, M. R. WALTER and H. M. JOHNSON (2000)."The COOH-terminal nuclear localization sequence of interferon gamma regulates STAT1 alpha nuclear translocation at an intracellular site." J Cell Sci **113** (Pt 15): 2771-81.
- SUBRAMANIAM, P. S., B. A. TORRES and H. M. JOHNSON (2001)."So many ligands, so few transcription factors: a new paradigm for signaling through the STAT transcription factors." Cytokine **15**(4): 175-87.
- SUN, D. and A. DING (2006)."MyD88-mediated stabilization of interferon-gamma-induced cytokine and chemokine mRNA." Nat Immunol **7**(4): 375-81.
- TAKAOKA, A., N. TANAKA, Y. MITANI, T. MIYAZAKI, H. FUJII, M. SATO, P. KOVARIK, T. DECKER, J. SCHLESSINGER and T. TANIGUCHI (1999)."Protein tyrosine kinase Pyk2 mediates the Jak-dependent activation of MAPK and Stat1 in IFN-gamma, but not IFN-alpha, signaling." Embo J **18**(9): 2480-8.
- TAKAOKA, A. and H. YANAI (2006)."Interferon signalling network in innate defence." Cell Microbiol **8**(6): 907-22.

- TAUBER, A. I. (2003)."Metchnikoff and the phagocytosis theory." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(11): 897-901.
- TOKER, A. and A. C. NEWTON (2000)."Cellular signaling: pivoting around PDK-1." Cell **103**(2): 185-8.
- TRIBLE, R. P., L. EMERT-SEDLAK and T. E. SMITHGALL (2006)."HIV-1 Nef Selectively Activates Src Family Kinases Hck, Lyn, and c-Src through Direct SH3 Domain Interaction." J. Biol. Chem. **281**(37): 27029-27038.
- TSIANI, E. and I. G. FANTUS (1997)."Vanadium Compounds: Biological Actions and Potential as Pharmacological Agents." Trends in Endocrinology and Metabolism **8**(2): 51-58.
- UDDIN, S., D. A. SHER, Y. ALSAYED, S. PONS, O. R. COLAMONICI, E. N. FISH, M. F. WHITE and L. C. PLATANIAS (1997)."Interaction of p59fyn with interferon-activated Jak kinases." Biochem Biophys Res Commun **235**(1): 83-8.
- UDDIN, S., L. YENUSH, X. J. SUN, M. E. SWEET, M. F. WHITE and L. C. PLATANIAS (1995)."Interferon-alpha engages the insulin receptor substrate-1 to associate with the phosphatidylinositol 3'-kinase." J Biol Chem **270**(27): 15938-41.
- VALENTINO, L. and J. PIERRE (2006)."JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies." Biochem Pharmacol **71**(6): 713-21.
- VANHAESEBROECK, B. and D. R. ALESSI (2000)."The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB." Biochem J **346 Pt 3**: 561-76.

- VANHAESEBROECK, B., S. J. LEEVERS, K. AHMADI, J. TIMMS, R. KATSO, P. C. DRISCOLL, R. WOSCHOLSKI, P. J. PARKER and M. D. WATERFIELD (2001). "Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids." Annu Rev Biochem **70**: 535-602.
- VENKATESAN, B. A., L. MAHIMAINATHAN, N. GHOSH-CHOUDHURY, Y. GORIN, B. BHANDARI, A. J. VALENTE, H. E. ABOUD and G. G. CHOUDHURY (2006). "PI 3 kinase-dependent Akt kinase and PKCepsilon independently regulate interferon-gamma-induced STAT1alpha serine phosphorylation to induce monocyte chemotactic protein-1 expression." Cell Signal **18**(4): 508-18.
- VILCEK, J. (2003). "Novel interferons." Nat Immunol **4**(1): 8-9.
- WALDBURGER, J. M., T. SUTER, A. FONTANA, H. ACHA-ORBEA and W. REITH (2001). "Selective abrogation of major histocompatibility complex class II expression on extrahematopoietic cells in mice lacking promoter IV of the class II transactivator gene." J Exp Med **194**(4): 393-406.
- WANG, X. and C. TOURNIER (2006). "Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway." Cell Signal **18**(6): 753-60.
- WEN, Z., Z. ZHONG and J. E. DARNELL, JR. (1995). "Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation." Cell **82**(2): 241-50.
- WORMALD, S., J. G. ZHANG, D. L. KREBS, L. A. MIELKE, J. SILVER, W. S. ALEXANDER, T. P. SPEED, N. A. NICOLA and D. J. HILTON (2006). "The comparative roles of suppressor of cytokine signaling-1 and -3 in the inhibition and desensitization of cytokine signaling." J Biol Chem **281**(16): 11135-43.

- XING, L., C. GE, R. ZELTSER, G. MASKEVITCH, B. J. MAYER and K. ALEXANDROPOULOS (2000). "c-Src signaling induced by the adapters Sin and Cas is mediated by Rap1 GTPase." Mol Cell Biol **20**(19): 7363-77.
- YAO, Y., Q. XU, M. J. KWON, R. MATTA, Y. LIU, S. C. HONG and C. H. CHANG (2006). "ERK and p38 MAPK Signaling Pathways Negatively Regulate CIITA Gene Expression in Dendritic Cells and Macrophages." J Immunol **177**(1): 70-6.
- YOU, M., D. H. YU and G. S. FENG (1999). "Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway." Mol Cell Biol **19**(3): 2416-24.
- YOUNG, P. R., M. M. MCLAUGHLIN, S. KUMAR, S. KASSIS, M. L. DOYLE, D. MCNULTY, T. F. GALLAGHER, S. FISHER, P. C. MCDONNELL, S. A. CARR, M. J. HUDDLESTON, G. SEIBEL, T. G. PORTER, G. P. LIVI, J. L. ADAMS and J. C. LEE (1997). "Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site." J Biol Chem **272**(18): 12116-21.