

Université de Montréal

**Régulation de la voie Jak/STAT par les Récepteurs Couplés aux
Protéines G : Rôle des petites protéines G de la famille Rho.**

par

Stéphane Pelletier

Département de Pharmacologie et Institut de Recherches Cliniques de Montréal
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de *Philosophia Doctorae*
en Pharmacologie

30 avril 2003

© Stéphane Pelletier, 2003



W
4
U58
2003
V.160

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Régulation de la voie Jak/STAT par les récepteurs couplés aux protéines G : rôle des petites protéines G de la famille Rho.

présentée par :
Stéphane Pelletier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Audrey Claing, président-rapporteur
Sylvain Meloche, directeur de recherche
Jean-Philippe Gratton, membre du jury
Jana Stankova, examinateur externe
[Taper le nom] , représentant du doyen de la FES

Résumé

De façon similaire aux récepteurs des cytokines de Type I et II, les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (GPCRs) activent la voie des *Janus kinases* et des *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STATs). Cependant, contrairement aux récepteurs des cytokines, les mécanismes précoces d'activation de cette cascade de signalisation par les GPCRs sont différents. Les données présentées dans cette thèse montrent que la stimulation des récepteurs AT1 et PAR-1 mène à l'activation des Jaks 1, 2 et Tyk2, ainsi qu'à l'activation des STATs 1 et 3. Alors que l'activation de STAT1 par l'Angiotensine II (Ang II) est rapide, faible et soutenue et qu'elle corrèle avec l'activation rapide des Jaks, celle de STAT3 est biphasique. Son activation rapide corrèle aussi avec l'activation rapide des Jaks alors que la seconde phase d'activation requiert l'expression d'un facteur autocrine possiblement une cytokine de la famille de l'IL-6. L'activation rapide et soutenue ainsi que l'activation biphasique de la voie Jak/STAT par les GPCRs nécessitent l'action de Rac, une petite protéine G de la famille Rho. Nous proposons que l'activation rapide de la voie Jak/STAT par les GPCRs emprunte une cascade de signalisation dans laquelle Rac active la NADPH oxydase ce qui a pour effet d'augmenter la génération de radicaux libres oxygénés (*Reactive Oxygen Species*, ROS). Ces derniers inhibent l'action de Protéines Tyrosine Phosphatases ce qui permet au Jaks de s'autophosphoryler et/ou de se transphosphoryler et finalement de phosphoryler et d'activer les STATs. L'activation de Rac mène aussi à l'activation d'autres effecteurs comme la Rho-kinase qui pourrait permettre la synthèse de cytokines de la famille de l'IL-6 qui transmettent leur signal par le truchement de la voie Jak/STAT. Alors que les récepteurs couplés aux protéines $G_{q/11}$ ou bien $G_{i/o}$ conduisent à l'activation rapide des Janus kinases, les récepteurs couplés aux protéines G_s en sont incapables. Au contraire, l'activation de ces récepteurs ou bien l'augmentation d'AMP cyclique dans les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs) inhibe l'activation rapide des Jaks par l'Ang II. De plus, l'élévation d'AMP cyclique dans les VSMCs empêche la croissance induite par l'Ang II. Finalement, l'augmentation d'AMP cyclique induit des changements morphologiques majeurs nommés arborisation. Ces changements de morphologie sont associés à l'inhibition de Rac et à sa capacité d'activer la Rho-Kinase. Ensemble, nos résultats indiquent que l'activation de la petite protéine G Rac conduit à l'activation de multiples cascades de signalisation dont la voie Jak/STAT. À l'inverse, son inhibition par l'AMP cyclique conduit à l'inhibition de plusieurs processus requérant son activité comme la migration, la croissance ainsi que la contraction des VSMCs.

Mots-clés : Récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs), Janus Kinases, Signal transducers and activators of transcription (STATs), GTPases Rho, RhoA, Rac1, Cdc42 Rho kinases, AMP cyclique, NADPH oxydase, Angiotensin II, Thrombin.

Abstract

In common with cytokine receptors and Receptor Tyrosine Kinases (RTKs), G protein-coupled receptors (GPCRs) signal to Janus kinases (Jaks) and signal transducers and activators of transcription (STATs). However, by contrast to cytokine receptors, we show here that the early biochemical events linking GPCRs to this signalling pathway are different. Here, we report that GPCR engagement, by Angiotensin II (Ang II) or thrombin, induces a rapid and direct activation of Jak1, 2 and Tyk2, and the subsequent activation of STATs 1 and 3. While the tyrosine phosphorylation of STAT1 is rapid, weak and sustained, and correlates with the rapid activation of Jaks, the activation of STAT3 is biphasic. On one hand, the first peak is rapid, weak and correlates with the rapid activation of the Jaks by the GPCRs. On the other hand, the second peak requires the synthesis of an autocrine factor, most likely a member of the IL-6 family of cytokines. Both the rapid and late activation of Jaks and STATs by GPCRs require the activity of Rac, a Small GTPase of the Rho family. We propose that activation of Rac by GPCRs engagement and the subsequent generation of Reactive Oxygen Species (ROS) lead to the inhibition of Protein Tyrosine Phosphatases and the autophosphorylation of the Jaks. This leads to the activating tyrosine phosphorylation of STATs. Rac activation also leads to the activation of other effectors, such as the Rho-kinase, to promote the synthesis of an autocrine factors also activating the Jak/STAT pathway. While Gq/11 and Gi/o protein-coupled receptors (Gq/11, Gi/oPCRs) rapidly activate Janus kinases in VSMCs, Gs protein-coupled receptors (GsPCRs) failed to do so. On the contrary, cyclic AMP signalling impairs rapid activation of Janus Kinases by Ang II. In VSMCs, agents that raise cyclic AMP levels antagonize the hypertrophic effect of angiotensin II and other vasoactive factors. Cyclic AMP elevation also inhibits the chemotactic response of arterial smooth muscle cells to angiotensin II and opposes its vasoconstrictor action. We report here that these vascular effects of cyclic AMP are associated with inhibition of Janus kinases activity and modulation of tyrosine phosphorylation signalling. In addition to these effects, cyclic AMP elevating agents also induce profound morphological changes referred to as arborization. We show here that arborization of vascular SMCs in response to cAMP elevating agents is basically due to inhibition of Rac by the second messenger. Taken together, we found that the small GTPase Rac plays a central role in the activation of the Jak/STAT pathway and inhibition of its activity by cyclic AMP signaling interferes with Ang II-induced Jak activation. Furthermore, inhibition of Rac by cyclic AMP also affects many processes that require Rac activity such as cell growth, migration and contraction.

Keywords: G Protein-Coupled Receptors (GPCRs), Janus Kinases, Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs), Rho GTPases, RhoA, Rac1, Cdc42, Rho-kinase, Reactive Oxygen Species, NADPH oxidase, Cyclic AMP, Angiotensin II, Thrombin.

Table des matières

Résumé	3
Abstract	4
Table des matières	5
Liste des tableaux	11
Liste des Figures	12
Liste des Abréviations	15
Introduction	19
1.1. LA VOIE JAK/STAT	20
1.1.1. Les Janus kinases	21
1.1.1.1. Structure des Jaks.	22
1.1.1.1.1. Le domaine JH1	22
1.1.1.1.2. Le domaine JH2	24
1.1.1.1.3. La région N-terminale.	25
1.1.1.2. Mécanismes de régulation des Jaks.	26
1.1.1.2.1. Activation des Jaks.	28
1.1.1.2.2. Inactivation des Jaks	30
1.1.1.2.2.1. Les Protéines Tyrosine Phosphatases.	30
1.1.1.2.2.2. Les Suppressor of Cytokine Signalling	31
1.1.1.3. Fonctions des Jaks.	32
1.1.1.3.1. Jak1.	33
1.1.1.3.2. Jak2.	33
1.1.1.3.3. Tyk2.	34
1.1.1.3.4. Jak3.	34

	6
1.1.2. Les <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i> .	35
1.1.2.1. Structure des STATs.	35
1.1.2.2. Mécanismes de régulation des STATs.	36
1.1.2.2.1. Activation.	36
1.1.2.2.1.1. Site de liaison des STATs aux récepteurs.	36
1.1.2.2.1.2. Phosphorylation et dimérisation.	38
1.1.2.2.1.3. Translocation nucléaire et liaison à l'ADN.	38
1.1.2.2.1.4. Activité transcriptionnelle.	39
1.1.2.2.2. Inactivation.	41
1.1.2.2.2.1. Les Protéines Tyrosine Phosphatase.	41
1.1.2.2.2.2. Les Suppressor of Cytokine Signalling.	42
1.1.2.2.2.3. L'export nucléaire.	42
1.1.2.2.2.4. PIAS et autres.	42
1.1.2.3. Fonctions des STATs.	43
1.1.2.3.1. STAT1.	43
1.1.2.3.2. STAT2.	44
1.1.2.3.3. STAT3.	45
1.1.2.3.4. STAT4.	46
1.1.2.3.5. STAT5A et STAT5B.	47
1.1.2.3.6. STAT6.	48
1.1.3. Jak/STAT chez les organismes inférieurs.	49
1.1.4. Activation de la voie Jak/STAT par les récepteurs des cytokines (sommaire).	49
1.2. LES RÉCEPTEURS AT-1 ET PAR-1 EN TANT QUE MODÈLE DE RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G HÉTÉROTRIMÉRIQUES.	51
1.2.1. Le récepteur AT1 de l'Angiotensine II.	51
1.2.1.1. Structure du récepteur AT1.	53
1.2.1.2. Mécanismes de régulation du récepteur AT1.	53
1.2.1.2.1. Activation.	53
1.2.1.2.2. Inactivation.	55
1.2.1.3. Signalisation intracellulaire par le récepteur AT1.	55
1.2.1.3.1. Protéines G hétérotrimériques et messagers secondaires.	55
1.2.1.3.2. Phosphorylation en tyrosine.	56
1.2.1.3.3. Activation de sérine/thréonine kinases.	60

	7
1.2.1.3.4. <i>Reactive Oxygen Species</i> .	61
1.2.1.4. Fonctions du récepteur AT1.	62
1.2.2. Le récepteur PAR-1 de la thrombine.	64
1.2.2.1. Structure du récepteur PAR-1.	64
1.2.2.2. Mécanismes de régulation du récepteur PAR-1.	65
1.2.2.2.1. Activation.	65
1.2.2.2.2. Inactivation.	67
1.2.2.3. Signalisation intracellulaire par le récepteur de la thrombine.	68
1.2.2.3.1. Protéines G hétérotrimériques et messagers secondaires.	68
1.2.2.3.2. Phosphorylation en tyrosine.	70
1.2.2.3.3. Activation de sérine/thréonine kinase.	70
1.2.2.3.4. Reactive oxygen species.	72
1.2.2.4. Fonctions du récepteur PAR-1 de la thrombine.	72
1.3. LES PETITES PROTÉINES G DE LA FAMILLE RHO.	73
1.3.1. Structure.	73
1.3.1.1. Domaine G.	73
1.3.1.2. Reconnaissance des nucléotides/Spécificité des interactions.	75
1.3.1.3. Hydrolyse du GTP.	77
1.3.1.4. Interaction avec les effecteurs.	787
1.3.2. Mécanismes de régulation.	78
1.3.2.1. Guanine-nucleotide exchange factors (GEFs).	80
1.3.2.2. GTPase Activating Proteins (GAP).	85
1.3.2.3. GTPase dissociation factor (GDI).	85
1.3.2.4. Régulation par les toxines bactériennes.	85
1.3.3. Effecteurs des Protéine G de la famille Rho.	87
1.3.3.1. ROK α et ROK β , PRKs et Citron kinase.	89
1.3.3.2. La p70s6k.	99
1.3.3.3. PAKs 1, 2, 3 et 4.	90
1.3.3.4. Les MEKKs 1, 2, 3 et 4.	90
1.3.3.5. Phosphatidylinositol kinases et autres kinases à lipides.	91
1.3.3.6. La NADPH oxidase.	92
1.3.3.7. Protéines d'échafaudages.	934
1.3.4. Fonctions.	95

	8
1.3.4.1. Organisation du cytosquelette d'actine.	95
1.3.4.2. Migration, différenciation et croissance cellulaire.	98
1.4. SIGNALISATION PAR L'AMP CYCLIQUE.	100
1.4.1. Métabolisme de l'adénosine 3',5' monophosphate cyclique.	100
1.4.1.1. GasPCRs.	100
1.4.1.2. Adénylyl Cyclases.	101
1.4.1.3. Phosphodiesterases.	101
1.4.2. Mécanisme d'action de l'AMP cyclique.	101
1.4.2.1. Les Protéines Kinases A.	102
1.4.2.1.1. Activation.	102
1.4.2.1.1. Régulation.	102
1.4.2.2. Epac.	105
1.4.2.3. Récepteurs de l'AMP cyclique.	105
1.4.3. Fonctions biologiques de l'AMP cyclique sur les cellules musculaires lisses vasculaires.	105
1.4.3.1. Vasorelaxation.	106
1.4.3.2. Inhibition de la croissance cellulaire.	106
1.4.3.3. Autres.	107
Chapitre 1. L'AMP cyclique inhibe l'activation des Janus Kinases par l'Ang II.	109
2.1. MISE EN SITUATION.	110
2.2. ARTICLE 1. Functional cross-talk between the cyclic AMP and Jak/STAT signaling pathways in vascular smooth muscle cells.	111
Chapitre 2. Mécanisme d'activation de la voie Jak/STAT par les GPCRs.	150
3.1. MISE EN SITUATION.	151
3.2. ARTICLE 2. Rho Family GTPases Are Required for Activation of Jak/STAT Signaling by G Protein-Coupled Receptors.	152

Chapitre 3. Régulation négative de Rac par l'AMP cyclique.	195
3.1. MISE EN SITUATION.	196
3.2. ARTICLE 3. Cyclic AMP induces arborization of Vascular Smooth Muscle Cells by Inhibiting the Rac-ROCK Signaling Pathway.	197
Discussion.	242
5.1. ACTIVATION DE LA VOIE JAK/STAT PAR LES RECEPTEURS DES CYTOKINES DES RTKS ET GPCRS.	242
5.1.1. Activation de la voie Jak/STAT par les récepteurs des cytokines.	242
5.1.2. Activation de la voie Jak/STAT par les Gq/iPCRs.	243
5.1.2.1. Activation précoce de la voie Jak/STAT par les GPCRS.	244
5.1.2.2. Activation transitoire versus soutenue de la voie Jak/STAT.	245
5.1.2.3. Activation tardive de la voie Jak/STAT.	246
5.1.3. Activation de la voie Jak/STAT par les GsPCRs.	252
5.1.4. Activation de la voie Jak/STAT par les RTKs.	256
5.2. ROLES DE LA VOIE JAK/STAT EN REPONSE AUX GPCRS.	256
5.2.1. Rôles de STAT1 en réponse à l'Ang II.	256
5.2.2. Rôles de STAT3 en réponse à l'Ang II et la thrombine.	257
5.3. REGULATION CROISEE NEGATIVE ENTRE L'AMP CYCLIQUE ET L'ACTIVATION DE TYK2 PAR L'ANG II.	259
5.4. REGULATION CROISEE NEGATIVE ENTRE L'AMP CYCLIQUE ET RAC.	260
5.4.1. Croissance des VSMCs.	261
5.4.2. Migration des VSMCs.	262
5.4.3. Contraction des VSMCs.	263
5.4.4. Mécanisme d'inhibition de Rac par l'AMP cyclique.	263



	10
5.4.5. Une voie de signalisation Rac/ROCK.	265
Conclusion	269
Bibliographie	270
Annexe 1. Liste des publications.	II
Annexe 2. Résumés de communications	IV
Annexe 3. Prix et mentions et Bourses nominatives.	VII



Liste des tableaux

Tableau 1.1	Classification des différentes Cytokines, de leurs récepteurs et des Jaks et STATs activées par ces récepteurs.	27
Tableau 1.2.	Phénotypes des souris déficientes en Janus kinases et en STATs.	45
Tableau 1.3.	Rôle du récepteur PAR-1 de la thrombine dans les différents tissus.	71
Tableau 1.4.	Alignement de séquence des boucles conservées	74
Tableau 1.5.	Effecteurs des petites protéines G de la famille Rho.	86
Tableau 3.1	Substrate specificity of different bacterial toxins and their effects on Jaks and STATs activation by GPCRs.	184
Table 4.1.	Effect of bacterial toxins on Small GTPases activity and forskolin on stellation of vascular SMCs.	228

Liste des figures

Figure 1.1.	Structure des Janus Kinases.	23
Figure 1.2.	Activation de la voie Jak/STAT par l'IL-6.	29
Figure 1.3.	Les membres de la famille SOCS régulent de façon négative la signalisation par diverses cytokines.	32
Figure 1.4.	Structure cristalline de STAT1 et domaines fonctionnels des différents membres de la famille des STATs.	37
Figure 1.5.	Régulation positive et négative de la voie Jak/STAT.	44
Figure 1.6.	Synthèse de l'Angiotensine I, II, III et IV, les principaux acteurs du système Rénine/Angiotensine.	52
Figure 1.7.	Structure du récepteur AT1 de l'Angiotensine II.	54
Figure 1.8.	Voies de signalisation engendrées par le récepteur AT1 de l'Angiotensine II.	58
Figure 1.9.	Récepteur PAR-1 de la Thrombine.	66
Figure 1.10.	Voies de signalisation engendrées par le récepteur PAR-1 de la Thrombine.	69
Figure 1.11.	Structure de petites protéines G monomériques.	75
Figure 1.12.	Cycle d'activation et d'inactivation des petites protéines G de la famille Rho.	77
Figure 1.13.	Arbre phylogénique des différentes GEFs connues à ce jour.	79
Figure 1.14.	Noms, domaines et spécificités des GEFs.	82
Figure 1.15.	Mécanismes d'activation des GEFs.	84
Figure 1.16.	Rôles des petites protéines G de la famille Rho.	88
Figure 1.17.	Structure du complexe NADPH oxydase.	93
Figure 1.18.	Signalisation menant à la formation de fibres de Stress par Rho.	96
Figure 1.19.	Signalisation menant à la formation de lamellipodes, filopodes et ondulation de la membrane.	97
Figure 1.20.	Voies de signalisation engendrées par le messager secondaire AMP cyclique.	104
Figure 2.1.	Ang II stimulates the activation of the Janus kinases Jak1, Jak2 and Tyk2 in vascular SMC.	143
Figure 2.2.	Activation of Tyk2 by agonists of G protein-coupled receptors and PDGF in aortic SMC.	144
Figure 2.3.	Elevation of cAMP inhibits Ang II-stimulated tyrosine phosphorylation in aortic SMC.	145
Figure 2.4.	Elevation of cAMP inhibits Ang II-dependent activation of Tyk2 in aortic SMC.	146
Figure. 2.5.	Incubation with PKA inhibitors reverses the inhibitory effect of cAMP on Ang II-stimulated Tyk2 activity in aortic SMC.	147
Figure 2.6.	Proposed model of the cross-talk between cAMP and the Jak/STAT pathway in vascular SMC.	148

Figure 3.1.	GPCR agonists stimulate Jak activity and STAT-dependent transcription in vascular SMC.	170
Figure 3.2.	GPCRs stimulate tyrosine and serine phosphorylation of STAT1 and STAT3 in vascular SMC.	171
Figure 3.3.	Activation of Jaks by GPCRs is dependent on the production of ROS.	172
Figure 3.4.	Rho GTPases are required for activation of the Jak/STAT pathway by GPCRs.	173
Figure 3.5.	Rho is necessary for the transcriptional activation of STATs by GPCRs.	175
Figure 3.6.	GPCR agonists activate Rac but not Cdc42 in vascular SMC.	177
Figure 3.7.	Role of Rac and Cdc42 in Jak2 activation and induction of STAT-dependent transcription by GPCRs.	178
Figure 3.8.	Activation of Jak2 and STAT-dependent transcription by Rho GTPases.	180
Figure 3.9.	Effect of Rac1 effector loop mutants on Jak2 activity.	181
Figure 3.10.	Evidence that late phase activation of STAT3 is mediated by an autocrine factor.	182
Figure 3.11.	Proposed model for the role of Rho GTPases in the regulation of Jak activation and STAT-dependent transcription in response to GPCR engagement.	183
Figure 4.1.	cAMP elevating agents induce profound morphological changes in vascular SMCs.	217
Figure 4.2.	cAMP induced “stellate morphology” is associated with the loss of F-actin organization and focal adhesion complexes.	219
Figure 4.3.	Inhibition of Rac activity mimics forskolin-induced stellate shape.	221
Figure 4.4.	Constitutively active mutant of Rac1 impairs cAMP-induced stellate morphology.	223
Figure 4.5.	Forskolin impairs Ang II-induced GTP loading of Rac.	224
Figure 4.6.	Essential role for the p160 ^{ROCK} in RacL61-impaired cAMP-induced stellate morphology.	225
Figure 4.7.	Inhibition of ROCK kinase activity with Y-27632 induces “stellate morphology” in vascular SMCs.	227
Figure 5.1	Rac, tout comme l’Ang II ou la thrombine induit l’expression du récepteur a de l’IL-6 (IL-6Ra) dans les cellules Hela et les VSMCs.	247
Figure 5.2.	Les formes mutantes de Rac1L61 interagissent avec différents effecteurs de Rac.	249
Figure 5.3.	Rac requiert la Rho-kinase pour activer la transcription STAT-dépendante.	250
Figure 5.4.	Rho-kinase est partiellement requise à l’activation de STAT3 en réponse aux agonistes Ang II et thrombine.	251

Figure 5.5.	Hypothèse de travail concernant le mécanisme d'activation de la voie Jak/STAT par la petite protéine G Rac.	251
Figure 5.6.	Implication de la PI3-kinase dans l'activation à long terme de la voie Jak/STAT par les GPCRs.	253
Figure 5.7.	L'augmentation d'AMP cyclique inhibe l'activation des Jaks par l'Ang II.	253
Figure 5.8.	La simulation à long terme des VSMCs par l'isoprotérénol ou la forskoline conduit aussi à l'activation de STAT3 dans les VSMCs.	254
Figure 5.9.	La stimulation des VSMCs par l'Ang II ou la Thrombine, l'élévation d'AMP cyclique stimule l'expression de l'IL-6 et de l'IL-11.	255
Figure 5.10.	L'inhibition de l'activation de Jak2 et de Tyk2 par la forskoline ne requiert pas la synthèse et l'expression d'un régulateur négatif.	260
Figure 5.11.	Hypothèse de travail concernant le mécanisme d'activation de la voie Jak/STAT par la petite protéine G Rac.	264
Figure 5.12.	L'inhibition de la PI3-kinase induit la stellation des VSMCs.	265
Figure 5.13.	L'expression d'un mutant actif de Rho dans les VSMCs conduit à la formation de fibres de stress et à l'arrondissement des cellules.	266
Figure 5.14.	Modèle d'activation de la voie Jak/STAT par les Gq/11 et Gi/oPCRs.	266
Figure 5.15.	Mécanisme d'activation de la voie Jak/STAT par les GsPCRs et le messager secondaire AMP cyclique.	267
Figure 5.16.	L'élévation d'AMP cyclique affecte l'activation de Rac et ainsi l'activation rapide de la voie Jak/STAT, la progression dans le cycle cellulaire, la migration cellulaire.	267

Liste des abréviations.

AMP	Adénosine mono phosphate
AMP cyclique	Adénosine mono phosphate cyclique
AP-1	Facteur de transcription composé de cFos et cJun
AT1	<i>Angiotensin II Type 1 Receptor</i>
AT2	<i>Angiotensin II Type 2 Receptor</i>
ATP	Adénosine Triphosphate
β 2-AR	Récepteur B2-adrénargique
CBP	<i>CREB Binding Protein</i>
CD45	<i>Cluster of differentiaon 45 (PTP membrannique)</i>
Cdk	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	<i>complemantary Desoxyribonucleic acid/Acide désoxyribonucléique complémentaire</i>
CIS	<i>Cytokine inducible SH2 containing protein</i>
CNG	Canaux activés par les nucléotides cycliques
CNTF	<i>Ciliary Neutrophic Factor</i>
CREB	<i>Cyclic AMP response element binding protein</i>
CRIB	<i>Cdc42/Rac Interacting Binding protein</i>
CT-1	<i>Cardiotrophin-1</i>
Dbl	<i>Diffuse B-cell Lymphoma</i>
DH	<i>Dbl Homology</i>
EAG	<i>Ether-A-Gogo</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EPO	<i>Erythropoietin/Érythropiétine</i>
ERK	<i>Extracellular signal Regulated Kinase</i>
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FERM	<i>Four-point-one/Ezrin/Radixin/meosin</i>
GAP	<i>GTPase Activating Protein</i>
GEF	<i>Guanine Exchange Factor</i>
GH	<i>Growth hormone/Hormone de croissance</i>
GHR	<i>Growth hormone receptor</i>
GiPCR	<i>G Protein-Coupled Receptor coupled to Gi/o proteins</i>
GMCSF	<i>Granulocytes Macrophages Colony Stimulating Factor</i>
GMP	Guanosine Monophosphate
GMP cyclique	Guanosine monophosphate cyclique
gp130	glycoprotéine 130
GPCR	<i>G Protein-Coupled Receptor</i>

GqPCR	<i>G Protein-Coupled Receptor coupled to Gq/11 proteins</i>
GRK	<i>G protein Receptor Kinase</i>
GsPCR	<i>G Protein-Coupled Receptor coupled to Gs proteins</i>
GTP	<i>Guanosine Triphosphate</i>
HERG	<i>eag-related channel</i>
I-1	<i>Inhibitor -1</i>
IFN	<i>Interféron</i>
IL-	<i>Interleukine-</i>
JAB	<i>Jak binding protein</i>
Jak	<i>Janus Kinase/Just Another Kinase</i>
JH	<i>Jak Homology</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LOX-1	<i>LDL-oxylated receptor-1</i>
MBS	<i>Myosin-Binding Subunit of MLC phosphatase</i>
MEK	<i>MAP kinase kinase</i>
MLC	<i>Myosin Light Chain</i>
NADH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NADPH oxydase	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxidase</i>
NF-kB	<i>Nuclear Factor-kB</i>
NK	<i>Natural Killer cells</i>
N-WASP	<i>Neurally-enriched WASP</i>
OSM	<i>Oncostatin M</i>
p140Sra-1	<i>Specific Rac-1 associated protein</i>
PAK	<i>p21 Activated Kinase</i>
PAR-1	<i>Protease Activated Receptor-1</i>
PAR-2	<i>Protease Activated Receptor-2</i>
PAR-3	<i>Protease Activated Receptor-3</i>
PAR-4	<i>Protease Activated Receptor-4</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDE	<i>Phosphodiesterase</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PH	<i>Plekstrin Homology</i>
PIAS	<i>Protein Inhibitor of Activated STATs</i>
PKA	<i>Protéine Kinase dépendante de l'AMP cyclique</i>
PKG	<i>Protéine Kinase dépendante du GMP cyclique</i>
POR-1	<i>Partner of Rac-1</i>
Prl	<i>Prolactin/Prolactine</i>
PtdIns	<i>Phosphatidyl Inositol</i>

PTK	Protéine Tyrosine Kinase
PTP	Protéine Tyrosine Phosphatase
PTP-1B	Protéine Tyrosine Phosphatase-1B
RKH	<i>Rok Kinectin Homology</i>
ROCK	Rho-kinase
ROK	Rho-kinase
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RTK	Recepteur Tyrosine Kinase
SCID	<i>Severe Combined Immonodeficiency</i>
SH2	<i>Src homology domain 2</i>
SH3	<i>Src homology domain 3</i>
SHP-1	<i>SH2 containing Protéin tyrosine Phosphatase-1</i>
SHP-2	<i>SH2 containing Protéin tyrosine Phosphatase-2</i>
SOCS	<i>Suppressors of Cytokine Signaling</i>
SSI-1	<i>STAT-induced STAT inhibitor-1</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
STK	<i>Protein serine/threonine kinase</i>
TC-PTP	<i>T-Cell Protein Tyrosin Phosphatase</i>
Th1	<i>T helper1 cells</i>
Th2	<i>T helper-2 cells</i>
TRAP	<i>Thrombin Receptor Activating peptide</i>
VSMCs	<i>Vascular Smooth Muscle Cells</i>
WASP	<i>Wiskott-Aldrich Syndrom Protein</i>
X-SCID	<i>X-linked Severe Combined ImmunoDeficiency</i>

Remerciements

Mes remerciements vont d'abord au Dr Sylvain Meloche pour m'avoir accueilli dans son laboratoire afin de poursuivre mes études doctorales.

J'aimerais aussi remercier les membres du jury : Dre Audrey Claing, Dr Jean-Philippe Gratton et Dre Jana Stankova qui ont bien voulu prendre le temps de lire cette thèse.

Finalement, j'aimerais remercier tout ceux et celles, et plus particulièrement Geneviève Rodier, Mathieu Arcand et Philippe Coulombe, qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de cette thèse ainsi que les différents travaux au cours du Doctorat.

Introduction

Les différentes cellules qui composent les organismes pluricellulaires fonctionnent de concert afin de former un seul individu à part entière. Pour fonctionner ensemble, ces cellules doivent interagir entre elles. Ce type d'interaction repose sur un système de communication intercellulaire par lequel un processus localisé à un endroit du système se transmet au reste de l'organisme. Chez les animaux, cette communication intercellulaire est médiée par l'action combinée de plusieurs messagers primaires que sont les hormones, neurotransmetteurs, autacoïdes etc. Ces messagers intercellulaires sont des molécules parfois simples, comme l'adrénaline, parfois très complexe comme des entités protéiques.

Ces divers messagers cellulaires ne pénètrent généralement pas leurs cellules cibles. Leur message franchit la membrane plasmique par le truchement de protéines membranaires nommées récepteurs (R). L'activation de ces récepteurs conduit à l'activation de plusieurs autres protéines à l'intérieur de la cellule. Ces protéines intracellulaires vont à leur tour activer d'autres protéines qui à leur tour activeront d'autres protéines et ainsi de suite jusqu'à ce que le message véhiculé par le messenger primaire se rende au différents compartiments cellulaires. Ces cascades d'activation successive portent le nom de voie de signalisation.

Les différents récepteurs sont des protéines qui possèdent non seulement un domaine de liaison aux messagers primaires mais aussi un domaine effecteur qui permet l'activation de différentes cascades de signalisation. Certains récepteurs possèdent une activité enzymatique comme les récepteurs protéine tyrosine kinases (RTK), les récepteurs protéine sérine/thréonine kinases (RSTK), les récepteurs à activité protéine tyrosine phosphatase (RPTP), les récepteurs à activité guanylate cyclase. On y retrouve aussi des récepteur canaux ioniques comme le récepteur nicotinique, le récepteur GABA_A de l'acide gamma aminobutyrique et les récepteurs des acides aminés glycine, aspartate et glutamate. Les

messagers primaires activent aussi la très grande famille des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (GPCRs) qui agissent en facilitant la liaison du GTP aux différentes protéines G hétérotrimérique auxquels ils sont couplés à la membrane. Alors actives, ces protéines interagissent avec plusieurs effecteurs comme des phospholipases, des adénylate cyclases et des canaux ioniques afin de les activer ou de les inhiber. Certains messagers primaires s'associent aussi à des protéines cytoplasmiques comme les récepteurs nucléaires qui sont en fait des facteurs de transcription. Il existe aussi des récepteurs qui n'ont pas d'activité enzymatique en soi, mais qui sont associés en permanence à des enzymes, principalement des kinases comme les récepteurs des cytokines ainsi que les récepteurs des cellules T et B.

Souvent, les différents récepteurs activent préférentiellement des voies de signalisation qui leurs sont propre. Par exemple, l'activation de la voie des *Janus kinases* (Jaks) et de *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT) (la voie Jak/STAT) sont activées par les récepteurs des cytokines. De même, les protéines G hétérotrimériques sont activées par des Récepteurs Couplés aux Protéines G hétérotrimériques (GPCRs, de l'anglais G Protein-Coupled Receptors). Cependant, des études récentes brouillent les cartes.

1.1. LA VOIE JAK/STAT

Les interférons (IFNs) et les cytokines sont des messagers intercellulaires qui sont responsables d'une grande variété de réponses cellulaires (Leonard & O'Shea, 1998). Au cours de la dernière décennie, des études extraordinaires ont mis en évidence l'existence de la principale voie de signalisation empruntée par ceux-ci. Cette voie de signalisation implique des familles de protéines bien distinctes, connues aujourd'hui sous le nom de Jaks (Janus kinases) et de STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription) (Darnell, Jr. *et al.*, 1994; Ihle *et al.*, 1995; Bach *et al.*, 1997; Horvath & Darnell, 1997; O'Shea, 1997). Les Jaks sont des protéines tyrosine kinases (PTKs) cytoplasmiques alors que les STATs sont des facteurs de transcription. La voie de signalisation Jak/STAT est le

principal mécanisme de transmission de signaux des interférons de Type I (IFN α/β) et de Type II (IFN γ), ainsi que de toutes les cytokines dont les récepteurs font partie de la superfamille des récepteurs des cytokines. Les cytokines de Type I comprennent les cytokines à courtes chaînes; les Interleukines (IL) -2, -3, -4, -5, -7, 9, -13 et -15, le Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF), et les cytokines à longues chaînes; l'IL-6, l'IL-11, l'Oncostatine M (OSM), le Ciliary Neutrophic Factor (CNTF), la Cardiotrophine-1 (CT-1), l'hormone de croissance (Growth Hormone, GH), la Prolactine (Prl), l'Erythropoïétine (EPO) et finalement la thrombopoïétine. Les cytokines de Type II sont représentées par les interférons α , β et γ (Voir Tableau 1.1).

1.1.1. Les Janus Kinases.

Chez les mammifères, quatre (4) Jaks ont été identifiées et les récentes données provenant du séquençage du génome humain indiquent qu'elles sont et seront les seules Jaks chez les mammifères (Leonard & O'Shea, 1998). Ces Jaks sont nommées Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2. Tyk2 a été la première tyrosine kinase de cette famille à être clonée. Son clonage fut réalisé par le criblage de cDNA provenant de lymphocytes T en utilisant une sonde correspondant au domaine catalytique de c-fms (Krolewski *et al.*, 1990) alors que ses congénères ont été identifiées par PCR à partir de séquences conservées du domaine catalytique des PTKs (Wilks *et al.*, 1991; Harpur *et al.*, 1992; Rane & Reddy, 1994; Takahashi & Shirasawa, 1994; Kawamura *et al.*, 1994; Witthuhn *et al.*, 1994; Gurniak & Berg, 1996). En générale, les Janus kinases Jak1, Jak2 et Tyk2 sont exprimées de façon ubiquitaire alors que l'expression de Jak3 semble être confinée au système immunitaire. De plus, son expression peut varier d'une cellule immunitaire à une autre. Par exemple, l'expression de Jak3 est constitutive dans les cellules NK (Natural Killer) et dans les thymocytes alors qu'elle est inductible dans les lymphocytes B et les cellules myéloïdes (Kawamura *et al.*, 1994; Tortolani *et al.*, 1995; Musso *et al.*, 1995; Gurniak & Berg, 1996; Sharfe *et al.*, 1997). En plus du système immunitaire, Jak3 est exprimée dans les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs de l'anglais Vascular Smooth Muscle Cells) ainsi que dans les cellules endothéliales (Verbsky *et al.*, 1996).

1.1.1.1. Structure des Jaks

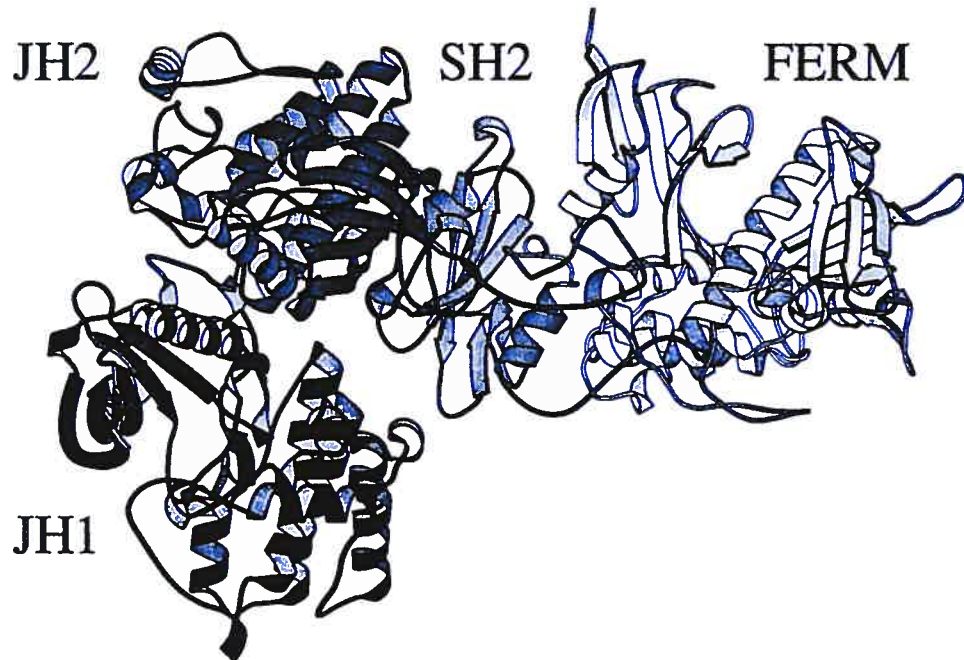
Les Jaks sont des protéines tyrosine kinases d'environ 1200 acides aminés (a.a.) possédant une masse relative apparente (M_r) se situant entre 120 et 130 kilo Daltons (kDa). La principale caractéristique des de ces enzymes est la présence d'un domaine kinase fonctionnel et d'un domaine kinase non fonctionnel (domaine pseudokinase). Cette étrange caractéristique est à l'origine de son nom : Janus kinase, tout comme le dieu romain Janus, gardien des portes du ciel, qui avait un visage à deux faces. Par contre, certains diront que Jak est un acronyme pour Just another kinase. En plus de ces deux domaines, plusieurs autres segments de ces protéines sont semblables et portent le nom de domaine d'homologie des Jaks (Jak Homology domains, JHs). Sept (7) régions ont été identifiées et nommées JH1 à JH7. Alors que le domaine JH1 (le domaine catalytique de la protéine) est relativement bien caractérisé, la fonction des autres domaines reste encore nébuleuse (Figure 1.1).

1.1.1.1.1. Le domaine JH1

Le domaine JH1 des Jaks possède toutes les caractéristiques essentielles d'un domaine kinase typique. En effet, la mutation de la lysine responsable de la liaison de l'adénosine triphosphate (ATP), située dans le sous-domaine II du domaine kinase, prévient toute activité catalytique (Guschin *et al.*, 1995; Gauzzi *et al.*, 1996; Gurniak & Berg, 1996; Briscoe *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1997). En plus de cette lysine, les tyrosines situées dans la boucle activatrice de l'enzyme jouent un rôle crucial dans la régulation de l'activité enzymatique de la kinase. Les données structurales recueillies suite à l'analyse du cristal du récepteur de l'insuline ont permis d'établir un modèle d'activation général des PTKs (Hubbard *et al.*, 1994). En fait, à l'état non-phosphorylée, la boucle d'activation empêche le substrat d'accéder au site catalytique. Une fois la tyrosine phosphorylée, l'enzyme présente une conformation plus « ouverte » et permet au substrat d'accéder au site catalytique (Hubbard *et al.*, 1994). En ce qui concerne les Janus kinases, plusieurs sites d'autophosphorylation ont été identifiés, y compris les tyrosines de la boucle activatrice (Jak1-Tyr1012/1013, Jak2-Tyr1007/1008, Jak3-Tyr980/981 et Tyk2-

Tyr1054/1055) (Gauzzi *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1997). Pour Jak2, la mutation de la tyrosine 1007 située dans la boucle d'activation inhibe

A



B

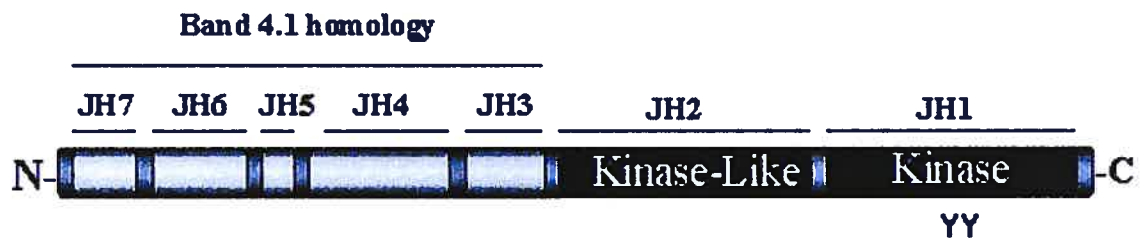


Figure 1.1. Structure des Janus Kinases. A. Représentation en ruban de la Janus kinase Jak2. On remarque le domaine kinase (JH1), le domaine pseudokinase (*kinase-like*, JH2), le domaine SH2 (JH3) ainsi que le domaine FERM (Four-point-one/Ezrin/Radixin/Meosin, JH3 à JH7). Cette structure a été établie domaine par domaine par comparaison avec le domaine Kinase de Src, le domaine SH2 de Src et le domaine FERM de la protéine 4.1 (tiré de (Giordanetto & Kroemer, 2002)). B. Structure secondaire des Janus Kinases Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2. Toutes les Jaks possèdent les domaines JH1 à JH7 et elles ont une longueur très similaire d'environ 1200 acides aminés. YY représente les deux tyrosines situées dans la boucle d'activation et qui sont phosphorylées suite à l'activation des Jaks.

complètement l'activité catalytique de l'enzyme (Feng *et al.*, 1997). À l'inverse, la mutation des tyrosines 1054 et 1055 de la boucle activatrice de Tyk2 n'abolit pas son activité catalytique (Gauzzi *et al.*, 1996). De même, la mutation de la lysine responsable de la liaison de l'ATP sur Tyk2 diminue l'activité catalytique de l'enzyme, sans toutefois complètement l'inhiber. Cependant, l'introduction de mutations aux deux sites (lysine et les deux tyrosines) abolit complètement son activité catalytique. De façon surprenante, l'introduction d'une mutation en position 980 (Y980F) de Jak3 n'affecte pas son activité catalytique alors qu'une mutation en position 981 l'augmente (Zhou *et al.*, 1997).

1.1.1.1.2. Le domaine JH2

La région JH2 est aussi appelée domaine pseudokinase en raison de l'absence d'activité catalytique associée à ce domaine et ce, malgré la présence de sous-domaines responsables de l'activité catalytique des PTKs. En fait, ces sous-domaines, essentiels à l'activité catalytique, sont quelque peu altérés dans cette section de la protéine. Par exemple, le domaine JH2 ne possède pas la troisième Glycine (Gly, G) du motif GXGXXG (où X représente n'importe lequel des a.a.) qui est responsable de former une *hairpin* β permettant de contenir l'un des côtés du triphosphate de l'ATP. L'acide aspartique (Asp, D) présent dans le sous-domaine VIb des PTKs et des protéine sérine/thréonine kinases (STKs), qui sert d'accepteur de protons dans la réaction enzymatique, est absent du domaine SH2. Aussi, le domaine JH2 ne possède pas la phénylalanine (Phe, F) conservée dans les domaines kinases fonctionnels et qui est requise pour la liaison du noyau adénine de l'ATP. Toutes ces observations ont conduit à l'hypothèse que le domaine JH2 ne possède pas d'activité catalytique. Cette hypothèse s'est avérée vraie (Wilks *et al.*, 1991; Velazquez *et al.*, 1995; Frank *et al.*, 1995; Gurniak & Berg, 1996).

Bien que ce domaine ne possède pas d'activité phosphotransférase, il joue un rôle primordial dans la régulation de l'activité des Jaks. En effet, la délétion du domaine JH2 d'une protéine chimérique entre le récepteur de la GH et Jak2 résulte en une activation accrue de l'enzyme ce qui suggère qu'en temps normal, ce domaine inhibe l'activité

catalytique de la kinase (Frank *et al.*, 1994). En accord avec ce modèle, une mutation menant à un gain de fonction (*gain of fonction*) dans le domaine JH2 de Hopscotch (la Jak de *Drosophila melanogaster*) a été identifiée (Luo *et al.*, 1997). De plus, une mutation semblable sur Jak2 a le même effet (Luo *et al.*, 1997). Bien que ceci suggère fortement que le domaine pseudokinase a un rôle négatif sur l'activité kinase de ces deux Jaks, il en est tout autrement pour Tyk2. En effet, la délétion du domaine JH2 de Tyk2 abolit son activité kinase et empêche la réponse aux IFN α et β (Velazquez *et al.*, 1995). Chez l'Homme, plusieurs mutations ont été retrouvées dans le domaine JH2 de Jak3 et sont responsables de la perte d'activité catalytique de Jak3 (Candotti *et al.*, 1997). D'autres fonctions sont attribuées à ce domaine. Par exemple, il pourrait représenter un site de liaison pour d'autres molécules de signalisation comme les STATs (Fujitani *et al.*, 1997).

1.1.1.1.3. La région N-terminale (JH3-JH7)

La portion N-terminale des Jaks comprend les régions JH3 à JH7 et représente le domaine d'interaction avec les récepteurs des cytokines. Alors que la délétion des domaines JH1 et/ou JH2 des Jaks n'influence peu ou pas la liaison des Jaks à leurs récepteurs, une Jak ne possédant pas la portion N-terminale est incapable de s'y associer (Frank *et al.*, 1994; Frank *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1995; Kohlhuber *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997a). De plus, la région N-terminale des Jaks permet également la maturation et le ciblage du récepteur à la membrane (Richter *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2001). Bien que les régions des récepteurs et des Jaks nécessaires à leurs associations soient bien définies, il n'en reste pas moins que les règles régissant l'interaction entre un récepteur donné et une Jak donnée demeurent encore inconnues. Finalement, la portion N-terminale renferme également le domaine JH4 qui est apparenté au domaine SH2 (Src Homology domain-2) de Src. En effet, le domaine JH4 possède une arginine conservée correspondant au site de liaison de protéines phosphotyrosinées (Harpur *et al.*, 1992). Cependant les données recueillies à ce jour n'ont pas mis en évidence qu'une telle fonction existe chez les Jaks (Kohlhuber *et al.*, 1997).

1.1.1.2. Mécanismes de régulation des Jaks

L'étude du rôle des Jaks en réponse aux cytokines a été grandement aidée par la génération et l'utilisation de lignées cellulaires qui ont été mutées et sélectionnées en fonctions de leur insensibilité aux interférons. Pour certaines de ces lignées, la transfection de cDNAs (*complementary DNAs*; ADN complémentaire) encodant différentes Jaks permettait de reconstituer une réponse à la stimulation aux différents IFNs. Ainsi, il a été possible d'identifier les Jaks importantes pour la signalisation de chacune des cytokines.

La signalisation par l'IFN α/β requiert Jak1 et Tyk2 alors que celle de l'IFN γ requiert Jak1 et Jak2 (Velazquez *et al.*, 1992; Watling *et al.*, 1993; Muller *et al.*, 1993; Silvennoinen *et al.*, 1993; Darnell, Jr. *et al.*, 1994). Par la suite, il a été démontré que la signalisation par la GH tout comme l'EPO requiert l'activation de Jak2 (Argetsinger *et al.*, 1993; Witthuhn *et al.*, 1993) alors que l'IL-6 active Jak1, Jak2 et Tyk2 (Stahl *et al.*, 1994). En ce qui concerne Jak3, elle est activée par les récepteurs des cytokines contenant la chaîne commune γ_c (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15) (Johnston *et al.*, 1994; Russell *et al.*, 1994; Russell *et al.*, 1995; Johnston *et al.*, 1995; Oakes *et al.*, 1996; Candotti *et al.*, 1996). Aujourd'hui, il est évident que toutes les cytokines de type I et II activent des Jaks afin de transmettre leur réponse. Le Tableau 1.1 présente le résumé des études démontrant le rôle des différentes Jaks dans la transmission du signal par les cytokines de Type I et II.

Alors que des études démontrent le rôle des différentes Jaks en réponse aux cytokines, d'autres ont permis de mieux comprendre les bases moléculaires de la complicité qui existe entre les récepteurs des cytokines et les Janus kinases : l'association entre les Jaks et les récepteurs des cytokines. Ce phénomène a été démontré pour la première fois entre le récepteur de l'EPO et Jak2 ainsi qu'entre le récepteur de la GH et Jak2 (Argetsinger *et al.*, 1993; Witthuhn *et al.*, 1993). Par la suite, il a été clairement démontré que Jak2 s'associe également avec la chaîne β_c des récepteurs des cytokines (Quelle *et al.*, 1994) alors que la chaîne gp130 s'associe autant à Jak1, Jak2 que Tyk2 (Stahl *et al.*, 1994). Pour sa part, Jak3

s'associe uniquement avec la chaîne γ (Russell *et al.*, 1994; Miyazaki *et al.*, 1994; Boussiotis *et al.*, 1994), alors que la sous-unité non commune de cette famille de récepteur

Tableau 1.1 Classifications des différentes Cytokines, de leurs récepteurs et des Jaks et STATs activées par ces récepteurs. (adapté de Leonard and O'Shea, 1998)

Cytokines de type I	Jaks	STATs
Cytokines dont les récepteurs partagent la chaîne γ		
IL-2, IL-7, IL-9 et IL-15	Jak1, Jak3	STAT 5a, STAT5b, STAT3
IL-4	Jak1, Jak3	STAT6
IL-13	Jak1, Jak2, Tyk2	STAT6
Cytokines dont les récepteurs partagent la chaîne β		
IL-3, IL-5, GM-CSF	Jak2	STAT5a, STAT5b
Cytokines dont les récepteurs partagent la chaîne gp130		
IL-6, IL-11, CT-1, CNTF, OSM, LIF	Jak1, Jak2, Tyk2	STAT3
IL-12	Jak2, Tyk2	STAT4
Leptin		STAT3
Cytokines possédant un récepteur homodimérique		
GH	Jak2	STAT5a, STAT5b, STAT3
Prolactine	Jak2	STAT5a, STAT5b
EPO	Jak2	STAT5a, STAT5b
Thrombopoïétine	Jak2	STAT5a, STAT5b
Cytokines de type II	Jaks	STATs
Interférons		
IFN α , IFN β	Jak1, tyk2	STAT1, STAT2
IFN γ	Jak1, Jak2	STAT1
IL-10	Jak1, Tyk2	STAT3

s'associe à Jak1 (Russell *et al.*, 1994). Ces différentes spécificités d'interactions ont aussi été observées pour les récepteurs des cytokines de Type II. Alors que la sous-unité α du récepteur de l'IFN α/β (IFNR-1) s'associe à Tyk2, la sous-unité β (IFNR-2) elle, s'associe à Jak1 (Colamonici *et al.*, 1994). Ainsi, pour chacune des cytokines et de leurs différents récepteurs, il existe une combinaison de Jaks qui y sont associées. Le Tableau 1.1 présente les interactions entre les différentes Jaks et les différents récepteurs des cytokines. Ces interactions sont classées en fonction des chaînes communes des différents récepteurs.

Bien que les différentes Jaks soient spécifiquement associées à divers récepteurs, ces différentes interactions ne définissent pas nécessairement la spécificité du signal. En fait, l'utilisation des différentes Jaks par les récepteurs semble trop dégénérée (peu spécifique) pour être responsable de cette spécificité (Kotenko *et al.*, 1996). Une autre caractéristique importante de l'interaction récepteur/Jak est que les Jaks sont toujours associées aux récepteurs (Leonard & O'Shea, 1998). D'autre part, des études ont rapporté l'augmentation du nombre de Jaks associées à certains récepteurs en réponse à leur activation (Leonard & O'Shea, 1998). Le mécanisme gouvernant ce phénomène n'est pas encore défini.

1.1.1.2.1. Activation des Jaks.

En réponse à une cytokine, les récepteurs forment des homo- ou hétérodimères. L'interaction entre les différents récepteurs induit des changements de conformation qui sont suffisants pour initier la transmission du signal (de Vos *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1994; Walter *et al.*, 1995). L'oligomérisation des différentes sous-unités des récepteurs favorise le rapprochement des Jaks et leur transphosphorylation subséquente. Par exemple, l'activation de Tyk2 en réponse à l'IFN α et l'activation de Jak2 par l'IFN γ sont abolies dans les cellules qui n'expriment pas Jak1 (Muller *et al.*, 1993). Inversement, en réponse à l'IFN γ ou α , Jak1 n'est pas activée dans les cellules n'exprimant pas Jak2 ou Tyk2 (Muller *et al.*, 1993). Des données similaires ont été obtenues pour d'autres modèles de récepteurs. Par exemple, l'activation de Jak1 en réponse à l'IL-2 est abrogée dans les cellules déficientes en Jak3 (Oakes *et al.*, 1996).

La transfection de cellules n'exprimant plus Jak1 avec un cDNA encodant une forme catalytiquement inactive de Jak1 ne permet pas la transmission du signal en réponse à l'IFN α . De façon similaire, la reconstitution de cellules déficientes en Jak2 avec une Jak2 catalytiquement inactive ne permet pas la transmission du signal en réponse à l'IFN γ (Muller *et al.*, 1993). Cependant, l'inverse n'est pas nécessairement vrai. En effet, la reconstitution de cellules déficientes en Tyk2 par une forme inactive de Tyk2 inhibe partiellement la réponse à l'IFN α mais, elle n'affecte pas la phosphorylation en tyrosine de

Tyk2 (Gauzzi *et al.*, 1996). Aussi, la reconstitution de cellules n'exprimant pas Jak1 avec une forme inactive de Jak1 n'affecte pas la phosphorylation normale de Jak2 en réponse à l'IFN γ , l'activation de STATs et l'expression génique. Ces résultats suggèrent que suite à la stimulation par l'IFN γ , Jak2 peut s'autophosphoryler et phosphoryler Jak1 ce qui permet aussi de recruter STAT1 au récepteur et de transmettre le signal au noyau. D'autre part,

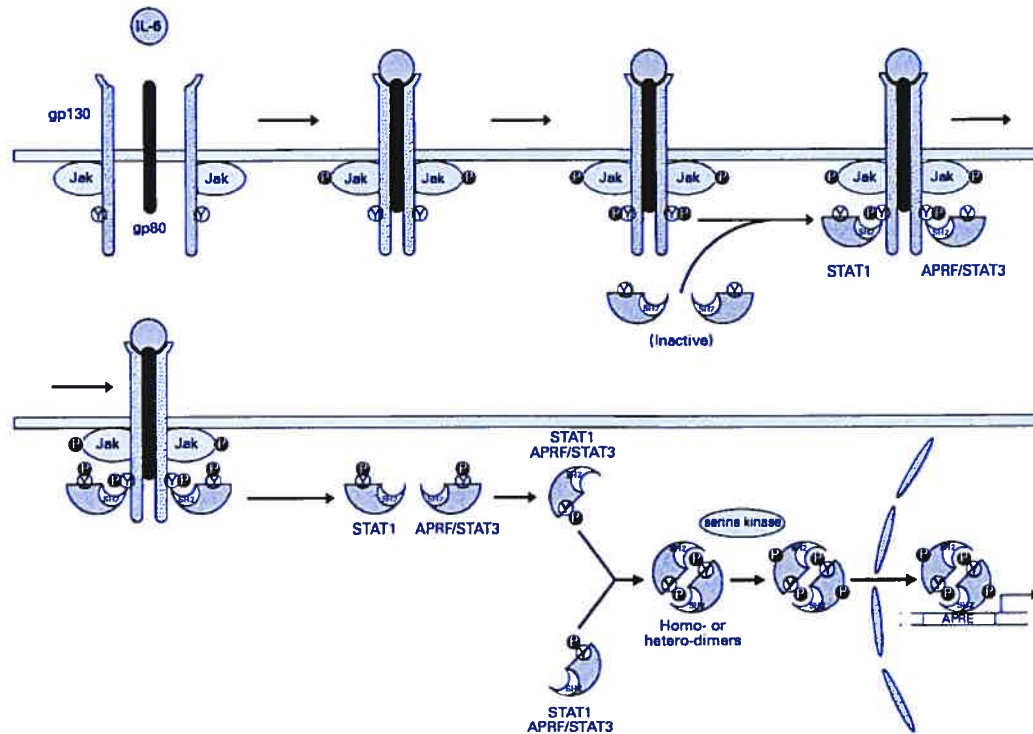


Figure 1.2. Activation de la voie Jak/STAT par l'IL-6. Modèle d'activation de la voie Jak/STAT par l'IL-6. L'IL-6 se lie au récepteur de l'IL-6 qui est formé de deux sous-unités gp130 (IL-6R β) et d'une sous-unité α (IL-6R α , gp80). Cette liaison entraîne l'oligomérisation du récepteur et le rapprochement des Janus kinases qui sont préalablement associées au sous-unités gp-130 du récepteur. La proximité des deux Janus kinases favorise leur transphosphorylation et favorise aussi la phosphorylation des sous-unités β du récepteur de l'IL-6. La phosphorylation du récepteur forme des sites de liaisons aux STATs. Ces dernières s'associent au récepteur via leur domaine SH2. Une fois arrivées au récepteur, les STATs sont phosphorylées sur une tyrosine (STAT1Y703, STAT3Y705) et s'associent entre elles afin de former un dimère (homodimère STAT1-STAT1, homodimère STAT3-STAT3 ou bien un hétéro dimère STAT1-STAT3). En plus de la phosphorylation en tyrosine, les STATs peuvent être phosphorylées sur une sérine située dans le domaine de transactivation. La dimérisation des STATs permet leur translocation au noyau où elles lieront l'ADN afin d'activer la transcription de certains gènes (tiré de (O'Shea *et al.*, 2002)).

Jak1 est requise et essentielle à la réponse à l'IFN α alors que Tyk2 semble jouer un rôle de moindre importance. En résumé, ces données indiquent qu'en réponse à certains stimuli, l'activité catalytique de certaines Jaks est essentielle alors que pour d'autres, elle demeure accessoire. Aussi, ces données suggèrent que les Jaks peuvent avoir un rôle structural en plus de leur activité catalytique.

Concernant la signalisation par l'IL-6, il semble qu'en l'absence de Jak1, cette cytokine ne peut induire la phosphorylation de gp130, STAT1 et STAT3 et l'expression du gène IRF-1. Par contre, l'absence de l'une ou l'autre des Jaks, n'influence pas la phosphorylation des autres Jaks associées à ce récepteur (Guschin *et al.*, 1995). Il est important de noter que les cytokines de la famille de l'IL-6 activent jusqu'à trois Janus kinases, soit Jak1, Jak2 et Tyk2. La Figure 1.2 montre un schéma de l'activation de la voie Jak/STAT par l'IL-6.

1.1.1.2.2. Inactivation des Jaks.

L'activation des Jaks par les récepteurs des cytokines est réversible et le mécanisme d'inactivation de ces kinases est maintenant mieux compris. Au cours des cinq dernières années, plusieurs protéines tyrosine phosphatases (PTPs) ont été identifiées et impliquées dans l'inactivation des Janus Kinases (Klingmuller *et al.*, 1995; David *et al.*, 1995; Myers *et al.*, 2001; Harashima *et al.*, 2002; Simoncic *et al.*, 2002). En plus des PTPs, d'autres régulateurs négatifs des Jaks ont été identifiés et nommés les *Suppressors of Cytokine Signaling* (SOCS) (Starr *et al.*, 1997; Endo *et al.*, 1997; Naka *et al.*, 1997).

1.1.1.2.2.1. Les Protéines Tyrosine Phosphatases

Les PTPs jouent un rôle de premier plan dans l'inactivation des PTKs et des récepteurs protéines tyrosine kinases (RTKs). SHP-1 (*SH2-containing Protein Tyrosine Phosphatase-1*) et SHP-2 furent les premières PTPs identifiées comme étant responsables de la déphosphorylation des Jaks (Klingmuller *et al.*, 1995; David *et al.*, 1995). PTP-1B, TC-PTP et CD45 sont elles aussi trois PTPs impliquées dans la régulation négative des Jaks. Outre le récepteur de l'insuline (IR), PTP-1B semble déphosphoryler Jak2 et Tyk2

spécifiquement (Myers *et al.*, 2001). TC-PTP déphosphoryle les Jaks 1 et 3 (Simoncic *et al.*, 2002) alors que CD45 semble être une PTP non-sélective à l'endroit des Jaks (Harashima *et al.*, 2002).

1.1.1.2.2.2. SOCS, JAB, SSI-1, CIS

La régulation négative de la voie Jak/STAT se fait aussi par l'action d'inhibiteurs naturels de cette cascade de signalisation (Starr *et al.*, 1997; Endo *et al.*, 1997; Naka *et al.*, 1997). Simultanément identifié par plusieurs groupes de recherches, le premier inhibiteur de cette famille de protéines a porté les noms de SOCS-1 (*Suppressor of Cytokine Signalling-1*), JAB (*Jak-binding protein*), SSI-1 (*STAT-induced STAT Inhibitor-1*) et fut associé aux protéines de la famille CIS (*Cytokine Inducible SH2-containing protein*) (Yoshimura *et al.*, 1995). Cette famille d'inhibiteurs naturels de la voie Jak/STAT comprend huit (8) membres qui sont présentés à la figure 1.3. Les SOCS sont produites en réponse aux cytokines et ont pour fonction de réguler négativement la voie Jak/STAT. Les SOCS contiennent un domaine SH2 et leur extrémité C-terminale renferme la boîte SOCS. Bien qu'il existe plusieurs membres de la famille SOCS, seulement quatre (4) d'entre elles sont activement étudiées (Figure 1.3).

Les SOCS présentent une structure très similaire mais, elles inhibent la voie Jak/STAT par différents mécanismes. Les SOCS 1 et 3 possèdent toutes deux une région en N-terminale du domaine SH2 nommée « *kinase inhibitory region* ». Ce domaine agit comme pseudo substrat et s'associe au domaine catalytique des Jaks, empêchant ainsi la phosphorylation de STATs. Contrairement à SOCS-1, SOCS-3 s'associe à la fois aux Jaks et aux récepteurs (Nicholson *et al.*, 1999). En fait, SOCS-3 semble d'abord s'associer au récepteur phosphorylé, facilitant ainsi l'inhibition des Jaks. De son côté, SOCS-1 s'associe au domaine kinase de Jak2 par l'entremise de son domaine SH2 et la tyr1007 (phosphorylée) de la boucle d'activation de Jak2 (Nicholson *et al.*, 1999). En ce qui concerne CIS et SOCS-2, elles semblent s'associer uniquement aux récepteurs et non aux Jaks (Yasukawa *et al.*, 2000). Les SOCS inhibent non seulement l'activité catalytique des Jaks et l'accès des STATs aux récepteurs mais, elles semblent aussi diriger ces kinases et possiblement leurs

substrats vers le système de dégradation protéique du protéasome. La boîte SOCS des SOCS permet une association au complexe elongin B/C, qui forme une *E3-like ubiquitin ligase* avec cullin-2, et permet la dégradation protéasomale. Ce mécanisme de régulation fut d'abord démontré dans l'inhibition de la transformation induite par Tel-Jak2 (Frantsve *et al.*, 2001; Kamizono *et al.*, 2001) et s'étend maintenant à quelques membres de la voie Jak/STAT (Shen *et al.*, 2000; Ungureanu *et al.*, 2002).

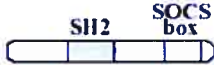







<u>NAME</u>	<u>STRUCTURE</u>	<u>INHIBITS SIGNALING BY</u>
CIS / CIS1		IL-2 (1), IL-3 (2), GH (1), prolactin (1), Epo (2)
SOCS1 / JAB / SSI1		IL-2 (3), IL-3 (3), IL-4 (4), IL-6 (5), GH (6), prolactin (7), Epo (3), LIF (5), IFN γ (5), IFN α (8), OSM (5), TSLP (9), Tpo (5)
SOCS2 / CIS2 / SSI2		GH (10), IL-6 (12), LIF (11)
SOCS3 / CIS3 / SSI3		IL-2 (13), IL-3 (13), IL-4 (4), IL-6 (12), IL-11 (14), GH (6), prolactin (7), Epo (15), LIF (12), IFN γ (8), IFN α (8), CNTF (16), leptin (17), OSM (8)
SOCS4		not tested
SOCS5 / CIS6		IL-6 (12)
SOCS6 / CIS4		does not inhibit in systems tested
SOCS7 / CIS5		not tested

Figure 1.3. Les membres de la famille SOCS régulent de façon négative la signalisation par diverses cytokines. Les protéines SOCS sont des régulateurs négatifs des Janus kinases. On compte 8 différentes SOCS. Alors que CIS et les SOCS 1 à 3 sont bien caractérisées, les autres le sont moins. Toutes les SOCS possèdent un domaine SH2 et un domaine SOCS. Le rôle de ces SOCS est d'inhiber l'activité catalytique des Jaks, d'empêcher le recrutement des STATs aux récepteurs des cytokines et finalement de diriger les Jaks vers la voie du protéasome (tiré de (Krebs & Hilton, 2001)).

1.1.1.3. Fonctions

La séquence du génome humain étant connue, il apparaît que la famille des Janus kinases comprend uniquement quatre membres et que cette famille ne s'étendra pas plus (Leonard & O'Shea, 1998; O'Shea *et al.*, 2002). Grâce aux développements récents de souris déficientes en Jaks (Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2) et la découverte de déficience en Jak3 chez l'Homme, il est maintenant évident que les Jaks ont des fonctions bien distinctes et non-

redondantes *in vivo*. Le Tableau 1.2 résume les observations récentes établies grâce aux souris déficientes en Jaks ou en STATs.

1.1.1.3.1. Jak1

Jak1 est exprimée de façon ubiquitaire et s'associe aux récepteurs des IFNs ainsi qu'aux récepteurs empruntant les chaînes gp-130 et γc . Les souris déficientes en Jak1 (Jak1^{-/-}) ont une physionomie quasi-normal à l'exception de leur système hématopoïétique (O'Shea *et al.*, 2002). Cependant, elles meurent peu après la naissance d'une pathologie mal caractérisée qui pourrait être de nature neurologique. Il semble que les souris Jak1^{-/-} ne répondent plus aux cytokines dont les récepteurs possèdent la chaîne gp-130 et qui sont responsables de la survie neuronale. De plus, comme pour les souris déficientes en Jak3, les souris Jak1^{-/-} souffrent d'immunodéficience combinée sévère (*Severe Combined Immunodeficiency*, SCID). Cette pathologie se caractérise par l'absence de lymphocytes T et de cellules NK. Cette pathologie est aussi associée à une mutation dans la chaîne γc des récepteurs de certaines cytokines ainsi que de mutations dans Jak3 (voir plus bas). Ces données suggèrent aussi que Jak1 est requise pour la signalisation induite par les récepteurs de cytokines empruntant la chaîne γc *in vivo*, ce qui est en accord avec l'idée que Jak1 s'associe à cette sous-unité réceptorielle. De plus, l'étude des cellules provenant de souris Jak1^{-/-} confirme l'importance de cette Jak dans la signalisation par les IFNs (O'Shea *et al.*, 2002).

1.1.1.3.2. Jak2

Comme Jak1, Jak2 est exprimée de façon ubiquitaire et est essentielle à la signalisation par les récepteurs possédant une seule chaîne (Ex : le récepteur de la GH : GHR) et certains récepteurs de cytokines de type I (voir Tableau 1.1). Les souris déficientes en Jak2 meurent au jour 12.5 de gestation en raison de l'absence d'érythropoïèse (Neubauer *et al.*, 1998; Parganas *et al.*, 1998; O'Shea *et al.*, 2002). Les cellules de souris déficientes en Jak2 ne répondent plus à l'IL-3, le GM-CSF, l'IL-5, la thrombopoïétine et l'IFN γ . Cependant, elles répondent encore à l'IL-6 et aux IFNs α et β (Neubauer *et al.*, 1998; Parganas *et al.*, 1998).

1.1.1.3.3. Tyk2

Tyk2 fut d'abord identifiée comme une composante essentielle de la signalisation par les IFNs α et β . De façon surprenante, les souris déficientes en Tyk2 (Tyk2^{-/-}) répondent encore aux l'IFNs α et β . Bien qu'à faibles doses de ces IFNs, les souris Tyk2^{+/+} répondent mieux que les souris Tyk2^{-/-}, la réponse anti-virale maximale semble inchangée. De plus, la réponse à l'IL-10 est normale alors que la réponse à l'IL-12 est simplement diminuée. Ces données suggèrent fortement que, contrairement aux autres Jaks, la « non-redondance » de Tyk2 est d'une importance moindre *in vivo* (Karaghiosoff *et al.*, 2000; Shimoda *et al.*, 2000).

1.1.1.3.4. Jak3

Contrairement aux autres membres de la famille des Jaks, Jak3 est exprimée principalement dans les cellules du système hématopoïétique, dans les cellules musculaires lisses vasculaires et l'endothélium (Kawamura *et al.*, 1994; Tortolani *et al.*, 1995; Musso *et al.*, 1995; Gurniak & Berg, 1996; Sharfe *et al.*, 1997; Verbsky *et al.*, 1996). Jak3 s'associe uniquement à la chaîne γ_c des récepteurs des cytokines. Chez l'Homme, la mutation de la chaîne γ_c est la cause d'une maladie lié au chromosome X, le X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) (Oakes *et al.*, 1996; Candotti *et al.*, 1996). Le lien intime qui existe entre la chaîne γ_c et Jak3 suggère fortement que cette pathologie puisse aussi être reliée à certaines mutations de la protéine Jak3 (Noguchi *et al.*, 1993; Russell *et al.*, 1994; Leonard, 1996a). En effet, certains patients souffrant du SCID possèdent des mutation dans Jak3 et ces dernières sont responsables de la pathologie (Russell *et al.*, 1995; Macchi *et al.*, 1995; Candotti *et al.*, 1997). La délétion du gène encodant Jak3 chez la souris conduit aussi à cette pathologie. Il est important de mentionner que les phénotypes de l'immunodéficiency chez l'Homme et la souris sont légèrement différents. Chez l'Homme, la déficiency en Jak3 ou en chaîne γ_c entraîne une réduction importante du nombre de lymphocytes T mais, le nombre total de cellules immunitaires demeure normal. Chez la souris, le nombre de lymphocytes T semble diminué et les lymphocytes B sont absents

(Cao *et al.*, 1995; DiSanto *et al.*, 1995). La diminution du nombre de cellules T est attribuée à l'absence de signalisation par l'IL-7, alors que l'absence de cellules B semble attribué à l'absence de signalisation par l'IL-15 qui emprunte la chaîne γ c et Jak3. Les cellules lymphoïdes semblent plus sensibles à l'apoptose (Baird *et al.*, 2000). Aussi, Jak3 joue un rôle important dans la régulation de l'expression de Bcl-2 et Bax, et contribue ainsi au développement des lymphocytes T (Wen *et al.*, 2001).

1.1.2. Les Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs).

Les STATs sont des facteurs de transcriptions activés en réponse aux cytokines de type I et II. Les STATs ont été identifiées sous forme de complexes associés aux éléments de réponse de gènes induit en réponse aux IFNs (Darnell, Jr. *et al.*, 1994; Ihle *et al.*, 1995; Leonard, 1996b; Bach *et al.*, 1997). On compte maintenant sept différentes STATs (STATs 1, 2, 3, 4, 5A, 5B et 6) chez les mammifères (Liu *et al.*, 1997). Suite au séquençage du génome humain, il est maintenant certain qu'aucun autre gène n'encode de nouvelles STATs (Ihle, 2001).

1.1.2.1. Structure des STATs.

Les STATs 1, 3, 4 5A et 5B sont des protéines d'environ 750-800 a.a. alors que STAT2 et STAT6 contiennent approximativement 850 a.a (Fu, 1992; Fu *et al.*, 1992; Hou *et al.*, 1994; Akira *et al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 1994; Gouilleux *et al.*, 1994; Zhong *et al.*, 1994a; Zhong *et al.*, 1994b; Lin *et al.*, 1995; Hou *et al.*, 1995; Mui *et al.*, 1995; Azam *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995). Ces sept différentes STATs sont encodées par des gènes distincts qui sont regroupés deux par deux sur différents chromosomes (Copeland *et al.*, 1995). Les gènes encodants les STATs 1 et 4 sont localisés sur le chromosome 1, STAT2 et 6 sur le chromosome 10, alors que les gènes encodants STAT3, 5A et 5B sont présents sur le chromosome 17. Il est important de mentionner que des formes épissées de STAT1 (STAT1b) et de STAT3 (STAT3b) existent aussi (Copeland *et al.*, 1995). Ces dernières résultent en une STAT légèrement raccourcie en C-terminal. Les STATs contiennent un domaine N-terminal (N-term), un domaine coiled-coil, un domaine de liaison à l'ADN

(DBD), un domaine SH2 (SH2) et un domaine de transactivation (TAD) (Bromberg & Darnell, Jr., 1999; Bromberg *et al.*, 1999) (Figure 1.4). Le rôle de ces différents domaines est décrit dans la section 1.1.2.2.1 « Activation des STATs ».

1.1.2.2. Mécanismes de régulation des STATs

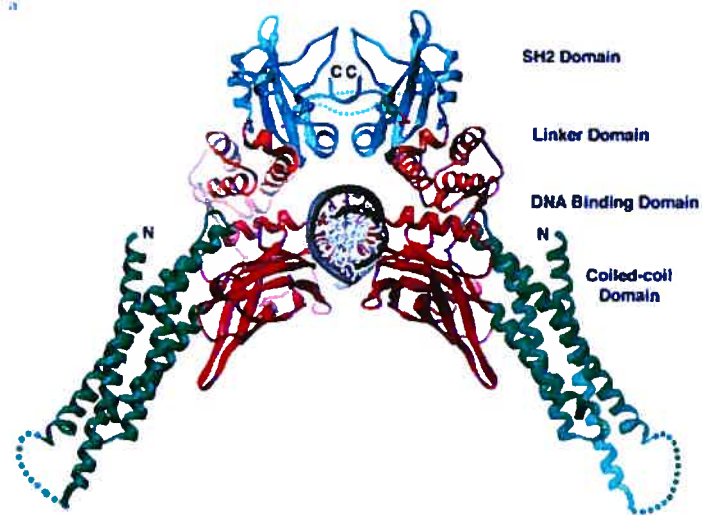
1.1.2.2.1. Activation des STATs

En général, l'activation des différentes STATs est très semblable de l'une à l'autre. Suite à la liaison des cytokines à leurs récepteurs respectifs, les Jaks sont activées. Ces dernières phosphorylent d'abord leurs récepteurs respectifs résultant en la formation de sites de liaisons pour les STATs via leur domaines SH2. Après leur recrutement au récepteur, les STATs sont phosphorylées par les Jaks sur une tyrosine hautement conservée ce qui entraîne leur dimérisation. La dimérisation est nécessaire pour permettre au STATs de se rendre au noyau et ainsi influencer l'expression de certains gènes (Darnell, Jr. *et al.*, 1994; Ihle *et al.*, 1995; Bach *et al.*, 1997; Horvath & Darnell, 1997; O'Shea, 1997). Il serait très laborieux de décrire de façon exhaustive le mécanisme d'activation des STATs suite à l'activation de tous les récepteurs par toutes les cytokines. Ainsi, seul l'activation des STATs 1 et 3 par l'IL-6 (Figure 1.2) et un modèle général de la régulation positive et négative de cette voie de signalisation est présenté (Figure 1.5).

Récemment, il a été proposé que la méthylation de STAT1 peut être essentielle à son activation. Il est proposé que STAT1 est méthylée en réponse à l'IFN α et/ou β . Cette méthylation semble jouer un rôle essentiel sur l'activité transcriptionnelle de STAT1 en inhibant l'interaction du facteur de transcription avec PIAS-1 (*Protein Inhibitor of Activated STATs-1*) (Liu *et al.*, 2001; Jackson, 2001; Mowen *et al.*, 2001).

1.1.2.2.1.1. Sites de liaisons des STATs sur les récepteurs.

Tel que présenté à la figure 1.4, les STATs possèdent toutes un domaine SH2 entre les a.a. 600 et 700. Ce domaine est responsable de la liaison des STATs aux différents récepteurs.



b

Characteristics of STAT Proteins

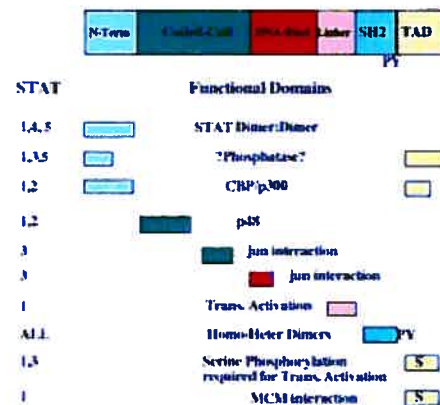


Figure 1.4. Structure cristalline de STAT1 et domaines fonctionnels des différents membres de la famille des STATs. a. Structure en ruban recueillie à partir du cristal de STAT1 dont les régions N et C-terminales ont été tronquées. La structure de STAT3, elle aussi tronquée, se superpose aisément à celle de STAT1. On remarque les domaines SH2 qui sont responsables de la dimérisation des STATs (bleu), les domaines de liaison à l'ADN (rouge) ainsi que les domaines *coiled-coil* (vert). b. Domaines caractéristiques des STATs. La région N-terminale (N-term), la région Coiled-coil, le domaine de liaison à l'ADN (DNA Bind), la région servant de lien avec le domaine C-terminal (linker), le domaine SH2 (SH2) et le domaine de transactivation (TAD). Tiré de (Bromberg and Darnell Jr 2000).

Ces domaines SH2, différents d'une STAT à l'autre permettent la reconnaissance spécifique de certains motifs phosphorylés. Par exemple, STAT6 s'associe à la sous-unité α du récepteur de l'IL-4 (Hou *et al.*, 1994) alors que les STATs 5A et 5B s'associent à la

chaîne β du récepteur de l'IL-2 et la chaîne α du récepteur de l'IL-7 (Tableau 1.1). Bien que certaines STATs s'associent préférentiellement aux récepteurs, il est proposé qu'en réponse à l'IFN α ou β , STAT1 s'associe à STAT2 suite à la phosphorylation en tyrosine de cette dernière (Li *et al.*, 1997). Les STATs sont également capables de s'associer aux Janus kinases elles-mêmes. Par exemple, STAT5 co-précipite avec Jak3 suggérant qu'une interaction directe entre ces protéines peut avoir lieu (Migone *et al.*, 1995; Fujitani *et al.*, 1997).

1.1.2.2.1.2. Phosphorylation et dimérisation des STATs.

Toutes les STATs possèdent à leur extrémité C-terminale une tyrosine légèrement éloignée du domaine SH2. En réponse aux différentes cytokines, cette tyrosine est phosphorylée (Horvath & Darnell, 1997). Suite à cette phosphorylation, les STATs dimérisent en formant une liaison entre cette tyrosine phosphorylée et le domaine SH2 d'une autre STATs. La nature bivalente de cette interaction aide à comprendre la raison pour laquelle la dimérisation est favorisée comparativement à l'association des STATs avec les récepteurs (Leonard & O'Shea, 1998). Certains récepteurs des cytokines possèdent un seul site de liaison aux STATs (Greenlund *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1995), alors que d'autres en possèdent plusieurs (Hou *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1995; Stahl *et al.*, 1995; Friedmann *et al.*, 1996). La présence de multiples sites de liaison aux STATs sur un même récepteur suggère que plus d'une STAT peuvent être activées simultanément. Ainsi, l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation de ces facteurs de transcription est favorisée par la présence de ces différents sites de liaison sur les récepteurs (Leonard & O'Shea, 1998). Par exemple, la dimérisation entre les STATs 1 et 2 (Horvath & Darnell, 1997) ainsi que la dimérisation entre STATs 5A et 5B auront lieu alors que d'autres interactions n'auront pas lieu (Leonard & O'Shea, 1998).

1.1.2.2.1.3. Translocation nucléaire et liaison à l'ADN

Bien que la phosphorylation en tyrosine des STATs soit essentielle à la dimérisation et la translocation nucléaire des STATs, peu de choses sont connues quant à leur transport vers

le noyau. Il est proposé que la phosphorylation et la dimérisation des STATs dévoilent une séquence de localisation nucléaire (NLS). Cependant, cette séquence demeure encore inconnue. De récents progrès ont permis d'identifier la leucine 407 de STAT1 comme étant essentielle à sa translocation au noyau (McBride *et al.*, 2002). De plus l'import de STAT1 au noyau requiert son interaction avec l'importine- α 5 (McBride *et al.*, 2002).

Une fois au noyau, les dimères de STATs se lient à des séquences spécifiques de l'ADN. La structure cristalline de STAT1 a permis de mieux comprendre l'interaction entre le dimère de STAT1 et l'ADN. En fait, le dimère de STAT1 s'associe à l'ADN un peu comme le ferait un casse-noisette (la noisette étant l'ADN) (Figure 1.4). Les homodimères de STATs s'associent aux éléments de réponse nommés GAS (*Gamma Activated Sequence*, TTN₅₋₆AA où N représente n'importe lequel des nucléotides). En général, le nombre de nucléotides dans la portion centrale de l'élément de réponse GAS est responsable de la reconnaissance par les différents dimères de STATs (Ehret *et al.*, 2001). L'hétérodimère STAT1-STAT2, formé en réponse à l'IFN α et β , nécessite l'association à une autre protéine, IRF9 (p48), afin de se lier à l'élément de réponse ISRE (*Interferon Stimulated Response Element*) dont la séquence est AGTTN₃TTTC (Horvath & Darnell, 1997).

1.1.2.2.1.4. Activité transcriptionnelle.

Une fois associées à l'ADN, les STATs modulent l'expression de certains gènes. Alors que certains facteurs de transcription peuvent avoir tantôt un rôle positif, tantôt un rôle négatif, les STATs ne font qu'activer la transcription de leurs gènes cibles (Leonard & O'Shea, 1998). Les domaines de transactivation des STATs 1 (Horvath & Darnell, 1997), 2 (Qureshi *et al.*, 1996) et 5 (Moriggl *et al.*, 1997) ont été caractérisés et se retrouvent dans le domaine C-terminal de la protéine. Il est aussi connu que les domaines de transactivation des STATs 1 et 3 contiennent une sérine (Ser727) qui peut être phosphorylée par diverses kinases (Decker & Kovarik, 2000). Alors que certaines études suggèrent que cette phosphorylation accroît l'activité transcriptionnelle de ces STATs, d'autres proposent le contraire (Decker & Kovarik, 2000). Les STATs 4, 5A et 5B possèdent également une

sérine (Ser721, 725 et 730, respectivement) dans le domaine de transactivation qui est phosphorylée en réponse à certaines cytokines (Decker & Kovarik, 2000). Une caractéristique importante de ces sérines est qu'elles sont à l'intérieur d'un motif très bien caractérisé PMSP (proline, méthionine, sérine, proline) pour STAT1, 3 et 4, et PSP pour les STATs 5A et 5B. Alors que la phosphorylation de la sérine 725 de STAT5A semble constitutive, la phosphorylation de la sérine 730 de STAT5B est augmentée en réponse à la prolactine (Yamashita *et al.*, 2001). La phosphorylation en sérine de STAT3 peut aussi mener à la déphosphorylation ou inhiber la phosphorylation en tyrosine des STATs (Decker & Kovarik, 2000). Ainsi, le rôle de la phosphorylation en sérine et l'impact de cette dernière sur l'activité transcriptionnelle des STATs est peu défini. Il est proposé, qu'en fonction du type cellulaire, du ligand et du gène cible étudié, la phosphorylation de STATs peut avoir des effets opposés.

Les STATs peuvent aussi lier d'autres facteurs de transcription ainsi que des co-activateurs. STAT1, par exemple, s'associe avec Sp1 sur le promoteur de ICAM-1 (Look *et al.*, 1995). Des études de double-hybrides ont révélées que STAT3b s'associe au facteur de transcription c-jun (O'Shea *et al.*, 2002). Le facteur de transcription (activateur transcriptionnel) CBP (*cAMP-response element binding protein*, CREB binding *protein*)/p300 s'associe aussi à certaines STATs, plus particulièrement aux STATs 1 et 2 (Bhattacharya *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996; Horvai *et al.*, 1997). CBP/p300 s'associe aux domaines N et en C terminal de STAT1 via son domaine d'interaction avec CREB et son domaine de liaison à E1A (Zhang *et al.*, 1996). De façon générale, le domaine de transactivation des STATs lie MCM5 et BRCA1 (Ouchi *et al.*, 2000; Horvath, 2000). En outre, il semble que Nmi-1 (*N-Myc interacting protein-1*) faciliterait cette interaction (Paulson *et al.*, 2002). En ce qui concerne STAT2, elle recrute une histone acetyltransferase (HAT) différente de CBP/p300, la GCN5 complexé avec TAF-130 (Paulson *et al.*, 2002). STAT5A interagit aussi avec d'autres facteurs de transcription dont le récepteur des glucocorticoïdes (Stocklin *et al.*, 1996). Les STATs interagissent également avec plusieurs autres facteurs de transcription et protéines comme NF- κ B, les SMADs, USF-1, PU.1, NcoA1, C/EBP β YY-1, TFII-1 et HMG-I(Y) (O'Shea *et al.*, 2002).

Les éléments de réponses GAS sont souvent très rapprochés les uns des autres dans certains promoteurs. Ceci favorise la dimérisation de dimères de STATs afin de former des tétramères de STATs (Sperisen *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1996; John *et al.*, 1996; Vinkemeier *et al.*, 1996; Lecine *et al.*, 1997). Ces tétramères semblent importants pour l'activation de la transcription de certains gènes dont les promoteurs comportent des sites GAS imparfaits (Sperisen *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1996; John *et al.*, 1996). Ces interactions sont renforcées grâce au domaine N-terminal des STATs qui forment une sorte de crochet moléculaire (O'Shea *et al.*, 2002). Les STATs peuvent aussi avoir recours à d'autres facteurs de transcription pour activer la transcription de certains gènes. Parmi ceux-ci, on retrouve certains membres de la famille Ets (Sperisen *et al.*, 1995; John *et al.*, 1996). Ainsi, il est possible qu'une même STAT puisse, en conjonction avec d'autres facteurs de transcription, promouvoir la transcription de certains gènes alors qu'en l'absence de ces autres facteurs de transcription ou en l'absence d'activation de ces autres facteurs, cette STAT serait inactive.

1.1.2.2.2. Inactivation des STATs

Contrairement aux Jaks, la régulation négative des STATs est moins bien caractérisée. En fait, les STATs doivent prendre le chemin inverse de leur activation. Ainsi, les mécanismes de relâche de l'ADN, de déphosphorylation de la tyrosine activatrice, de déphosphorylation de la sérine du domaine de transactivation et l'export nucléaire sont tous impliqués dans l'inactivation des STATs.

1.1.2.2.2.1. Protéines tyrosine phosphatase

Alors que plusieurs PTPs sont responsables de la déphosphorylation des Jaks, celles impliquées dans la déphosphorylation des STATs sont pour la plupart inconnues. Cependant, une étude suggère que PTP-1B puisse déphosphoryler STAT5A et B (Aoki & Matsuda, 2000).

1.1.2.2.2. Les *Suppressor Of Cytokine Signaling*.

Les SOCS, sont des inhibiteurs de l'activité catalytique des Jaks et ont, par conséquent, un rôle négatif sur la phosphorylation des STATs. Cependant, elles ne semblent pas impliquées dans l'inactivation directe des STATs. De plus, aucune étude n'indique un rôle de ces protéines dans le ciblage des STATs vers le système ubiquitine-protéasome comme c'est le cas pour les Jaks (O'Shea *et al.*, 2002).

1.1.2.2.3. L'import et l'export nucléaire.

Puisque les STATs sont des facteurs de transcription, leur activité est aussi dépendante de la régulation de leur import et de leur export nucléaire. Peu d'études ont portées sur les bases moléculaires de la translocation de STATs au noyau. Il est connu que STAT1 migre au noyau par le truchement de l'importine- $\alpha 5$ et la lysine 407 de STAT1 semble impliquée dans le processus (McBride *et al.*, 2000). À l'inverse, l'export nucléaire se fait par un mécanisme CRM1 dépendant. Le NES (*Nuclear Export Signal*, séquence d'a.a. permettant l'association à CRM1) de STAT1 est situé dans le domaine de liaison à l'ADN. Il est proposé que suite à la phosphorylation en tyrosine de STAT1, cette dernière dimérise et se lie à l'ADN masquant ainsi son NES. Suite à l'action de PTPs nucléaires, STAT1 est déphosphorylée ce qui démasque le NES et permet ensuite à CRM1 de s'y lier et d'exporter STAT1 vers le cytoplasme.

1.1.2.2.4. PIAS.

PIAS1 (*Protein Inhibitor of Activated STAT-1*), identifié suite à un criblage par double-hybride, est l'un des membres de la famille PIAS qui comprend aussi PIAS3, PIASy et PIASx (Liu *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001). Ces protéines se lient aux dimères de STATs et inhibent leur activité transcriptionnelle en les empêchant de transloquer au noyau. Cependant, le mécanisme d'action de ces protéines n'est pas encore bien défini. De plus, il est maintenant connu que les PIAS interagissent avec plusieurs familles de protéines et servent de E3-ligase pour la sumoylation (Jackson, 2001).

1.1.2.3. Fonctions des STATs.

Plusieurs STATs peuvent être activées par une multitude de cytokines et de facteurs de croissance. Si on compare le nombre de STATs (et même le nombre de Jaks), il est aussi évident que chacune des cytokines ne peut avoir sa propre STAT ou même sa propre Jak (Tableau 1.1). Cependant, certaines STATs, tout comme certaines Jaks, semblent être essentielles en réponse à différentes cytokines alors que d'autres Jaks ou STATs ont un rôle secondaire ou redondant. Ceci est illustré en partie par les données recueillies grâce aux souris déficientes en Tyk2 (Karaghiosoff *et al.*, 2000; Shimoda *et al.*, 2000). En ce qui concerne les STATs, les paragraphes suivants résument leurs différents rôles.

1.1.2.3.1. STAT1

L'importance de STAT1 en réponse aux IFNs de type I et II est maintenant clairement établie grâce à la génération de souris déficientes en STAT1. Les données recueillies grâce à ces souris confirment celles obtenues à l'aide des cellules déficientes en STAT1 (Leonard & O'Shea, 1998; O'Shea *et al.*, 2002). Bien que plusieurs cytokines et facteurs de croissance soient capables d'activer cette STAT, il semble qu'elle ne soit requise qu'en réponse aux IFNs. En effet, aucun problème, lors du développement de ces souris, n'est attribué à une réponse indépendante des IFNs (Meraz *et al.*, 1996; Durbin *et al.*, 1996). Les souris STAT1^{-/-} sont plus susceptibles aux infections virales et au développement de tumeurs en raison d'une perte de réponse aux IFNs (Meraz *et al.*, 1996; Durbin *et al.*, 1996). L'étude des souris déficientes en STAT1 révèle aussi un autre aspect important de la signalisation par l'IFN γ . Même en absence de STAT1, l'IFN γ influence l'expression de certains gènes. Ces données sont en accord avec d'autres observations qui démontrent que les souris déficientes en STAT1 sont moins susceptibles aux infections que les souris déficientes en IFN γ ou même IFN α/β (Gil *et al.*, 2001; Ramana *et al.*, 2002). Les interférons jouent, de façon générale, un rôle négatif sur la croissance (O'Shea *et al.*, 2002). En absence de STAT1, les IFNs peuvent promouvoir la croissance comme le montre

l'expression de certains gènes comme c-jun et c-myc qui ne sont normalement pas induits en réponse aux IFNs (Nguyen *et al.*, 2000).

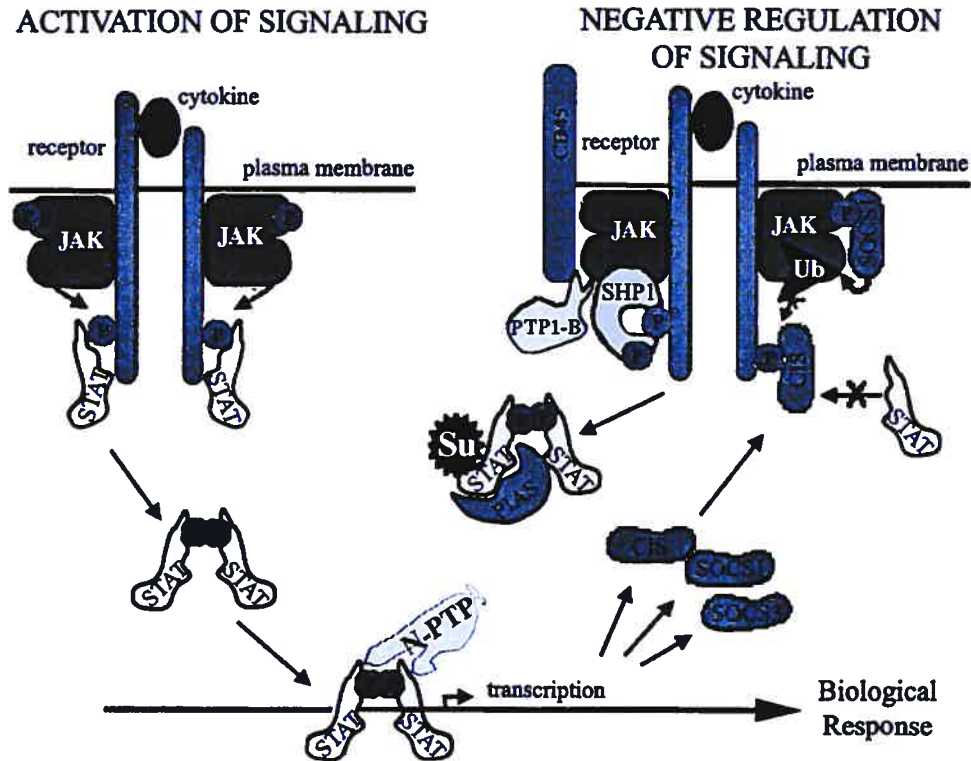


Figure 1.5. Régulation positive et négative de la voie Jak/STAT. L'activation de la voie Jak/STAT se fait par la liaison du ligand à son récepteur. Cette liaison entraîne l'oligomérisation du récepteur et permet aux Jaks, qui y sont rattachées, de se transphosphoryler et de phosphoryler le récepteur. La phosphorylation du récepteur entraîne le recrutement des STATs (via leurs domaines SH2). Ces STATs sont à leur tour phosphorylées sur une tyrosine située près du domaine SH2. Cette phosphorylation entraîne la dimérisation des STATs qui transloquent au noyau ou elles se lient à l'ADN et induisent la transcription de certains gènes. Parmi ces gènes, on retrouve ceux encodant des régulateurs des Jaks (les SOCS). En plus d'inhiber l'activité kinase des Jaks les SOCS peuvent aussi s'associer au récepteur et empêcher le recrutement des STATs. En plus de ces fonctions, les SOCS dirigent les Jaks vers la voie ubiquitine-protéasome. De plus, les PIAS sont responsables de sumoyler les STATs et de, possiblement, les excluent du noyau (tiré de (O'Shea *et al.*, 2002)).

1.1.2.3.2. STAT2

La fonction principale de STAT2 est de s'associer à STAT1 et IRF9 en réponse aux IFNs α et β . Les souris déficientes en STAT2 sont viables, fertiles et hautement susceptibles aux

infections virales en raison de la diminution de la transmission du signal en réponse aux IFNs α et β (Park *et al.*, 2000). En réponse à l'IFN α , STAT1 semble moins active en absence de STAT2 suggérant ainsi que STAT2 peut, dans certains cas du moins, être impliquée dans l'activation de STAT1 tel que proposé précédemment (Li *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2000).

1.1.2.3.3. STAT3

D'abord identifiée comme une protéine activée lors de la phase aiguë de la réponse immunitaire, STAT3 est un facteur de transcription activé par une panoplie de cytokines (Leonard & O'Shea, 1998). L'inactivation du gène encodant STAT3 conduit à la mort des embryons au jour 7.5 de gestation (Takeda *et al.*, 1997; Akira, 1999). Ceci a forcé la génération de souris déficientes en STAT3 dans certains tissus cibles utilisant la

Tableau 1.2. Phénotypes des souris déficientes en Janus kinases et en STATs. (adapté de Leonard and O'Shea, 1998)

Gène	Phénotypes
Jak1	Viable et meurt peu après la naissance en raison de troubles neurologiques et d'immunodéficience combinée sévère (SCID)
Jak2	Létale au niveau embryonnaire par manque d'érythropoïèse
Jak3	Viable et fertile, SCID
Tyk2	Viable et fertile, perte signalisation à l'IL-12 dans les cellules « <i>natural killer</i> (NK) » et sensibilité accrue à certaines infections virales.
STAT1	Viable et fertile, perte de signalisation par les interférons et tumorigénicité accrue.
STAT2	Viable et fertile, perte de réponse aux interférons α et β baisse de l'expression de STAT1 dans certains tissus.
STAT3	Létale au niveau embryonnaire.
STAT4	Viable et fertile, perte de réponse à l'IL-12 pour la différenciation des cellules Th1 et sensibilité accrue à certains pathogènes intracellulaires.
STAT5A	Viable et fertile, perte de réponse à la Prolactine et défaillance dans le développement des glandes mammaires.
STAT5B	Viable et fertile, défaillance de la croissance, dimorphisme sexuelle <i>sexually dimorphic growth</i>
STATs 5A et 5B	Viable, infertilité chez les femelles, défaillance du développement des glandes mammaires, masse corporelle diminuée et perte de prolifération des cellules T.
STAT6	Viable et fertile, défaillance en différenciation des cellules Th2 et susceptibilité accrue aux infestations helminthiques.
STAT4 et STAT6	Viable et fertile, défaillance en différenciation des cellules Th2.

technologie Cre-Lox (Akaishi *et al.*, 1998; Takeda *et al.*, 1999; Akira, 1999; Sano *et al.*, 1999; Chapman *et al.*, 1999; Akira, 2000; Chapman *et al.*, 2000; Schweizer *et al.*, 2002). Les données recueillies grâce à ces animaux suggèrent que la délétion de STAT3 n'affecte

pas le développement de l'animal en général mais, affecte grandement certaines cellules ou tissus cibles.

Les cellules T et les hépatocytes déficients en STAT3 répondent peu à l'IL-6 alors que les macrophages et les neutrophiles surproduisent plusieurs cytokines en raison d'une réponse exagérée à l'IL-10 (Alonzi *et al.*, 2001). La perte de STAT3 au niveau des glandes mammaires conduit à un retard dans le processus de mort cellulaire programmé lors de l'involution des glandes mammaires (Chapman *et al.*, 1999; Chapman *et al.*, 2000). L'inactivation du gène encodant STAT3 dans les keratinocytes n'influence pas les premiers stades de développement de la peau et de la pilosité mais, influence les cycles subséquents comme la pousse des poils (Sano *et al.*, 1999). De façon importante, l'inactivation du gène encodant STAT3 dans la peau a des répercussions majeures sur la cicatrisation et la migration (*in vitro*) des cellules de l'épiderme (Sano *et al.*, 1999).

Plusieurs lignées cellulaires tumorales provenant de cancers du sein, du cou, des reins, de la prostate et des ovaires ainsi que plusieurs leucémies expriment des formes actives de STAT3 et de STAT5 (Bowman *et al.*, 2000; Levy & Gilliland, 2000). Ces STATs sont souvent activées en réponse aux facteurs de croissance et facilitent la croissance des cellules en activant la transcription de certains gènes comme Bcl-2 et Bcl-X_L (Sakai & Kraft, 1997; Grad *et al.*, 2000). STAT3 et STAT5 sont aussi activées dans plusieurs autres types cellulaires transformés par différents oncogènes comme v-Src et BCR-Abl (Nelson *et al.*, 1998; Danial & Rothman, 2000; Bowman *et al.*, 2001). De plus, l'association forcée de STAT3 (la dimérisation par des ponts disulfures), entraîne la transformation de fibroblastes et la formation de tumeurs chez la souris *nude* (Bromberg *et al.*, 1999). Ces différentes observations suggèrent que, contrairement à STAT1, STAT3 joue un rôle important dans la croissance et/ou la survie cellulaire.

1.1.2.3.4. STAT4

STAT4 est impliquée dans la transmission du signal en réponse à l'IL-12. L'IL-12 stimule la différenciation des cellules CD4⁺ en cellules Th1 (T helper-1) (Wurster *et al.*, 2000). Les

cellules Th1 sont essentielles à la réponse immunitaire contre certains pathogènes et certaines tumeurs et jouent également un rôle dans les maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde, le diabète et les scléroses. Le phénotype des souris déficientes en STAT4 est identique à celui des souris déficientes en IL-12 ou déficientes en récepteur de l'IL-12. Ainsi, ces souris ne produisent plus de cellules Th1, qui ne libèrent plus d'IFN γ (Wurster *et al.*, 2000). STAT4 est aussi essentielle à l'expression adéquate des récepteurs de l'IL-12 et de l'IL-18 dans les cellules Th1 (Lawless *et al.*, 2000).

Les souris déficientes en STAT4 sont résistantes aux maladies auto-immunitaires comme dans certains modèles d'arthrite, de diabète et d'inflammation de l'encéphale (Chitnis *et al.*, 2001). À l'inverse, les souris déficientes en STAT4, en IL-12 et en récepteur de l'IL-12 sont plus susceptibles aux infections par des microorganismes (Lentsch *et al.*, 2001; Matsukawa *et al.*, 2001).

1.1.2.3.5. STAT5A et STAT5B

Les STATs 5A et 5B sont issues de gènes distincts et presque identiques (plus de 90% d'homologie). Les STATs 5A et 5B sont activées par une grande variété de cytokines et il est surprenant de constater que les souris déficientes en STATs 5A et/ou 5B ont des phénotypes très distincts (Lin & Leonard, 2000).

La réponse à la prolactine est grandement affectée dans les souris déficientes en STAT5A alors que les souris déficientes en STAT5B ont des problèmes de croissance (Liu *et al.*, 1997; Imada *et al.*, 1998; Kagami *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2002). Les souris double KO (*Knock-Out*, STATs 5A $^{-/-}$ 5B $^{-/-}$) meurent rapidement après la naissance, sont infertiles et ont un développement mammaire défectueux. Les souris double KO sont plus petites et renferment moins de cellules dans la moelle osseuse (Bunting *et al.*, 2002; Snow *et al.*, 2002). La faible masse corporelle des souris STAT5A $^{-/-}$ STAT5B $^{-/-}$ est attribuable à la perte de signal par la GH. Finalement, la perte de STAT5A et 5B empêche la transformation des cellules par Tel-Jak2 mais non celle induite par v-Abl ou BCR-Abl (Schwaller *et al.*, 2000; Sexl *et al.*, 2000).

La perte de STAT5A ou 5B a des répercussions importantes sur le développement des cellules immunitaires. Dans les souris STAT5A^{-/-}, il y a un défaut d'expression du récepteur α de l'IL-2 (IL-2R α) (Nakajima *et al.*, 1997). L'une des conséquences de cette perte est la diminution de la croissance des cellules immunitaires en réponse à de faibles concentrations d'IL-2 (Nakajima *et al.*, 1997). La perte de STAT5B est responsable d'une diminution plus marquée de la prolifération en réponse à l'IL-2 en comparaison aux souris STAT5A^{-/-}, (Xue *et al.*, 2002). Contrairement aux souris STAT5A^{-/-}, les fortes doses d'IL-2 ne parviennent pas à restaurer la prolifération des splénocytes dans les souris STAT5B^{-/-} (Imada *et al.*, 1998; Kagami *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent que ces deux STATs n'ont que peu ou pas de fonctions redondantes. Les deux STATs 5 jouent un rôle important dans le développement des cellules NK. Cependant, la perte de STAT5B semble en affecter le développement beaucoup plus profondément que la perte de STAT5A (Imada *et al.*, 1998).

1.1.2.3.6. STAT6

STAT6 est importante pour la réponse à l'IL-4 et à l'IL-13. En réponse à l'IL-4, les cellules précurseurs CD4⁺ se différencient en cellules Th2 qui sont essentielles pour la défense de l'organisme contre les helminthes (ver parasite de l'homme ou des animaux) et la réponse allergique (Wurster *et al.*, 2000). Ainsi, les souris déficientes en STAT6 ne répondent plus à l'IL-4 ni à l'IL-13 (Wurster *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2001). Ces souris STAT6^{-/-} présentent des difficultés à combattre les helminthes, une réponse réduite à certains modèles d'asthme et une réponse très sévère à certaines pathologies liées aux cellules Th1 (Chitnis *et al.*, 2001). Les souris déficientes en STAT6 présentent un taux de mortalité ainsi qu'un niveau d'inflammation et de production de cytokines plus élevé en réponse à un choc endotoxique non infectieux. À l'inverse, en réponse à une infection bactérienne, les souris STAT6^{-/-} ont un taux de mortalité plus faible et une plus grande capacité à éliminer les bactéries comparativement aux souris de type sauvage (Lentsch *et al.*, 2001; Matsukawa *et al.*, 2001). Finalement, la déficience en STAT6 est associée à une augmentation de l'activité anti-tumorale (Terabe *et al.*, 2000).

1.1.3. Jak/STAT chez les organismes inférieurs.

La voie Jak/STAT n'est pas restreinte aux mammifères. Des Jaks ont été retrouvées chez plusieurs organismes inférieurs dont le poisson zèbre, la carpe et *Drosophila melanogaster* alors qu'aucune Jak n'a été identifiée chez *Ceanorhabditis elegans* et *Dictyostelium discoideum* (Binari & Perrimon, 1994; Conway *et al.*, 1997; Hou *et al.*, 2002). En revanche, on a identifié des STATs chez tous ces organismes (Hou *et al.*, 2002) Les études génétiques reliées à ces organismes dévoilent que la voie « Jak »/STAT (Jak n'est pas présent chez tous ces organismes) est requise dans un très grand nombre de processus cellulaire. Mis à part son rôle bien défini dans le système immunitaire, les études faites chez les organismes inférieurs ont mis en évidence le rôle majeur de la voie Jak/STAT dans la prolifération, la différenciation ainsi que la migration cellulaire (Hou *et al.*, 2002).

1.1.4. Activation et régulation négative de la voie Jak/STAT par les récepteurs des cytokines (résumé).

Les cytokines agissent sur les diverses cellules du corps via leurs interactions avec une grande diversité de récepteurs. Ces récepteurs activent principalement des voies de signalisation impliquant plusieurs membres des familles des Jaks et des STATs. Bien qu'une cytokine en particulier active principalement certains des membres des familles Jak et STAT, il reste que le mécanisme moléculaire d'activation de la voie Jak/STAT est très similaire d'une cytokine à l'autre.

Sommairement, la liaison d'une cytokine aux différentes sous-unités formant le récepteur induit l'oligomérisation de ces dernières ce qui a pour effet de rapprocher les Jaks qui leurs sont associées. Ces dernières se transphosphorylent et phosphorylent les queues cytoplasmiques du récepteur (l'oligomère) ce qui génère des sites de liaisons aux STATs . Ces STATs seront à leur tour phosphorylées sur une tyrosine hautement conservée et juxtaposée à leur domaine SH2. La phosphorylation de cette tyrosine favorise la dimérisation des STATs via leur domaine SH2. Une fois dimérisées, les STATs transloquent au noyau et se lient à des séquences spécifiques de l'ADN afin d'activer la

transcription de plusieurs gènes cibles. La régulation négative de la voie Jak/STAT se fait à plusieurs niveaux. En effet, plusieurs protéine tyrosine phosphatase (PTPs) incluant SHP-1, PTP-1B et CD45 peuvent déphosphoryler les Jaks et les récepteurs des cytokines. Les STATs, sous forme de dimère, s'associent aux PIAS et peuvent être sumoylées. Certains des gènes encodent des protéines connues sous le nom de SOCS qui, une fois exprimées sous l'influence des STATs, s'associent aux récepteurs et/ou aux Jaks et inhibent l'activité kinase de ces dernières ainsi que le recrutement des STATs aux récepteurs. Tout ceci a pour effet d'inhiber la transmission du signal. De plus, les SOCS jouent un rôle de E3 ligase et dirigent ces même Jaks vers la dégradation par la voie ubiquitine-protéasome.

L'étude des souris déficientes en Jaks ou en STATs a permis de valider le rôle essentiel de la voie Jak/STAT en réponse aux cytokines de type I et II dans les cellules hématopoïétiques. Cependant, cette cascade de signalisation peut être activée par des récepteurs ayant des structures complètement différentes de celles des récepteurs de cytokines de type I ou II. En effet, la voie Jak/STAT est activée en réponse à des facteurs de croissance (comme l'EGF), des médiateurs de l'inflammation (comme le PAF), des chemokines (comme RANTES) ainsi que plusieurs substances vasoactives comme l'angiotensine II (Ang II) et la thrombine. Ces divers agonistes activent principalement des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (GPCRs) ou des Récepteurs Protéines Tyrosine Kinases (RTKs). Cependant, bien que le mécanisme d'activation de cette voie par les cytokines est relativement bien caractérisée, celui passant par les RTKs ou les GPCRs l'est beaucoup moins.

1.2. LES RÉCEPTEURS AT1 ET PAR-1 EN TANT QUE MODÈLE DE RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G HÉTÉROTRIMÉRIQUES.

Les Récepteurs Couplés aux Protéines G hétérotrimériques (*G protein-coupled receptors* : GPCRs) font partie de la superfamille des protéines membranaires qui, suite à la liaison de leurs ligands (neurotransmetteurs, hormones, autacoïdes etc.), permettent la transmission d'un message de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire de protéines G hétérotrimériques (Marinissen & Gutkind, 2001). Cette famille de protéines joue un rôle

important dans une panoplie de phénomènes physiologiques ou pathophysiologiques comme la neurotransmission, le contrôle de la pression sanguine, l'inflammation, la croissance et la différenciation cellulaire etc. En raison de leur grande diversité ainsi que de leur très grand nombre, il serait presque inimaginable de faire la présentation de tous les GPCRs à l'intérieur de cette introduction. Ainsi, seuls les récepteurs AT1 et PAR-1 seront présentés.

Ces deux récepteurs ont été choisis pour fin d'étude en raison de leur capacité à promouvoir la croissance, la migration ainsi que la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs : *vascular smooth muscle cells*) (Chamley-Campbell *et al.*, 1981). En plus de leur actions semblables sur la physiologie et la pathophysiologie des VSMCs, ces récepteurs ont aussi été choisis en raison de leur capacité à activer la voie Jak/STAT (Orlov & Plekhanov, 1968; Baudouin *et al.*, 1972; McCann & Hagen, 1980; De Mey *et al.*, 1982; De Clerck & Van Nueten, 1983; Geisterfer *et al.*, 1988; Berk *et al.*, 1989; Bell & Madri, 1990; Bar-Shavit *et al.*, 1990; Reuning *et al.*, 1994; Schiffrin, 2002; Marrero *et al.*, 1995; Pelletier *et al.*, 2003).

1.2.1. Le récepteur AT1 de l'Angiotensine II.

En 1940, deux groupes de recherche rapportent la découverte d'une substance vasoconstrictrice qu'ils nomment « angiotonin » ou « hypertensin ». Dans les années cinquantes, trois groupes de recherche rapportèrent que cette substance vasoconstrictrice, un octapeptide (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), était la même et fut rebaptisé *angiotensin* (1958) afin de satisfaire les deux groupes à l'origine de sa découverte (Touyz & Schiffrin, 2000; de Gasparo *et al.*, 2000).

Aujourd'hui il est clairement établi que l'Angiotensine II (Ang II) est le fruit du clivage protéolytique d'un précurseur nommé angiotensinogène. L'angiotensinogène est clivé par la rénine afin de produire l'Ang I qui sera clivé par l'*Angiotensin Converting Enzyme* (ACE, l'enzyme de conversion de l'Ang II) afin de produire l'Ang II (Figure 1.6). Bien que l'Ang II soit le principal agent actif du système *Rénine-Angiotensine* (RA), l'Ang III et IV

semblent aussi exercer des fonctions biologiques (Peach, 1977; Schiavone *et al.*, 1990; Wright *et al.*, 1995). Quant à l'Ang II, son action physiologique est principalement relayée par deux sous-type de GPCRs nommés AT1 et AT2. Le récepteur AT1 relaie la quasi-totalité des effets biologiques connus de l'Ang II dans les systèmes cardiovasculaire, rénal, neuronal, endocrine, hépatique, ainsi qu'auprès de plusieurs autres cellules cibles. Ainsi, seul le récepteur AT1 sera revu à l'intérieur de cette thèse.

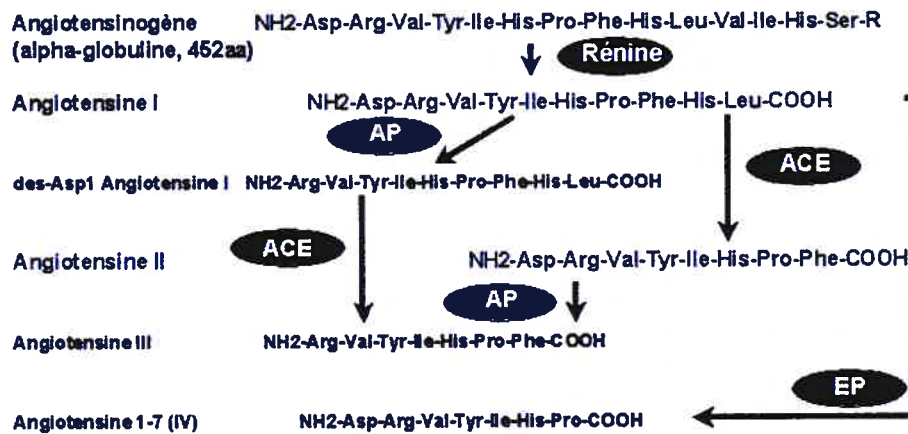


Figure 1.6. Synthèse de l'Angiotensine I, II, III et IV, les principaux acteurs du système Rénine/Angiotensine. L'angiotensinogène est le produit du gène de l'angiotensinogène et est le précurseur de l'Angiotensine II. L'angiotensinogène est clivé par la rénine afin de produire l'Angiotensine I. Afin de produire l'Angiotensine II, le peptide de 10 a.a. est clivé par l'enzyme de conversion de l'Angiotensine (ACE, *Angiotensin Converting Enzyme*). L'Angiotensine II peut être à nouveau clivée par un aminopeptidase (AP) afin de produire l'Angiotensine III. L'Angiotensine IV est produit par le clivage de l'Angiotensine I par une endopeptidase afin de former l'angiotensine 1-7.

1.2.1.1. Structure du récepteur AT1

Le récepteur AT1 est un récepteur de la famille des GPCRs (Murphy *et al.*, 1991; Sasaki *et al.*, 1991). Chez le rat et la souris, il existe deux formes de récepteur AT1 et elles sont nommées AT1A et AT1B. Ces deux récepteurs possèdent la même affinité pour les ligands du récepteur AT1 et sont identiques à 95% (Touyz & Schiffrin, 2000; de Gasparo *et al.*, 2000). Les principales différences entre ces deux récepteurs sont leurs distributions dans les différents tissus, leurs localisations chromosomales, leurs structures génomiques et leurs

mécanismes de régulation transcriptionnelle. Aucun autre mammifère n'a de sous-type de récepteur AT1 (Sasaki *et al.*, 1991; Bergsma *et al.*, 1992; Itazaki *et al.*, 1993; Burns *et al.*, 1993; Burns *et al.*, 1994). Le récepteur AT1 est composé de 359 a.a. avec une masse moléculaire théorique de 41 kDa. Les parties extracellulaires du récepteur sont formées de la région N-terminale, et de trois boucles qui contiennent 3 sites de N-glycosylation et 4 cystéines. Chacun de ces sites de glycosylation sont glycosylés sur le récepteur AT1 (Jayadev *et al.*, 1999). Deux des cystéines forment un pont disulfure entre les boucles extracellulaires 1 et 2 alors que la deuxième paire de cystéines forme un pont disulfure entre la partie N-terminale et la troisième boucle extracellulaire (Ohyama *et al.*, 1995) (figure 1.7). Le récepteur AT1 contient aussi trois boucles cytoplasmiques et une queue C-terminale qui se situent l'intérieur de la cellule.

1.2.1.2. Mécanisme de régulation du récepteur AT1.

1.2.1.2.1. Activation

Le récepteur AT1, tout comme la plupart des GPCRs, oscille spontanément de la forme active (R*) à la forme inactive (R) en absence d'agoniste. Pour la plupart des GPCRs, la forme inactive semble être favorisée en l'absence d'agoniste alors que la forme R* est favorisée (stabilisée) en présence d'agoniste. La présence d'agoniste induit un changement conformationnel menant le récepteur à sa forme active (R*) ce qui permet le couplage à une ou plusieurs protéines G hétérotrimériques. L'interaction entre le récepteur et la protéine G hétérotrimérique va faciliter l'échange du GDP en GTP ce qui a pour effet d'activer la protéine G α et libérer les sous-unités $\beta\gamma$. Les sous-unités $\beta\gamma$ et α vont s'associer à différents effecteurs afin de les activer et d'engendrer une réponse biologique (Marinissen & Gutkind, 2001). Il est maintenant prédit que plus d'une conformation, entre les formes actives et inactives, peuvent être empruntées par ces récepteurs (Thomas *et al.*, 2000).

L'activation du récepteur AT1 par l'Ang II requiert l'interaction entre la Tyr⁴ de l'Ang II et l'Asn¹¹¹ du récepteur AT1. Ce dernier est situé dans le troisième domaine transmembranaire du récepteur (Noda *et al.*, 1996). De plus, l'interaction entre la Phe⁸ du

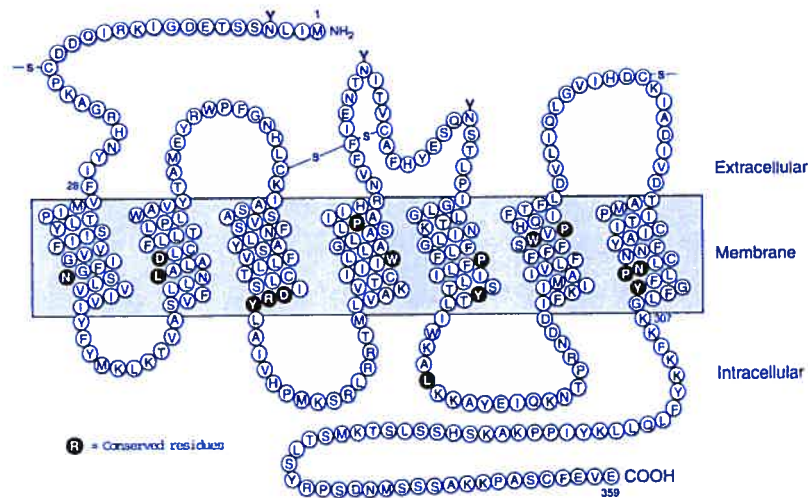


Figure 1.7. Structure du récepteur AT1 de l'Angiotensine II. Le récepteur AT1 est une protéine de 359 a.a. qui possède 7 passages transmembranaires. Ces domaines extracellulaires sont reliés entre eux par des ponts disulfures et on y retrouve plusieurs sites de glycosylation. Les domaines transmembranaires sont hautement hydrophobes et sont responsables de la liaison du ligand, l'Ang II. Les boucles intracellulaires et la queue cytoplasmique sont responsables de la transmission du signal. Les a.a. indiqués en noir sont conservés dans tous les GPCRs (tiré de DeGasparo *et al.*, 2000).

peptide et l'His²⁵⁶ du récepteur permet de stabiliser la conformation active (R*) (Noda *et al.*, 1995). Le mouvement des domaines transmembranaires 3, 6 et 7 mène à des changements de conformation au niveau des boucles cytoplasmiques et permet l'association des protéines G hétérotrimériques (Gether & Kobilka, 1998).

Bien que tous les GPCRs possèdent sept domaines transmembranaires, peu d'acides aminés sont conservés dans cette famille de protéines. En fait l'un des motifs conservé chez la quasi-totalité des GPCRs est le NPX₂₋₃Y. Ce motif est sujet à des changements de conformations (Donnelly *et al.*, 1994). Il joue aussi un rôle dans l'internalisation de certains récepteurs comme le récepteur β_2 -adrénergique (β_2 -AR) mais, non pas pour le récepteur AT1 (Slice *et al.*, 1994). Concernant le récepteur AT1, le motif NPX₂₋₃Y semble important pour la liaison de l'agoniste, l'activation normale du récepteur et la transmission du signal (Hunyady *et al.*, 1995a; Laporte *et al.*, 1996). De la même façon, le motif DRY, situé dans la deuxième boucle intracellulaire de plusieurs GPCRs, est important pour la transmission de signaux (Baldwin *et al.*, 1997). Finalement, la Tyr²¹⁵ est aussi importante

pour l'activation, la transmission du signal et l'internalisation de plusieurs GPCRs dont le récepteur AT1 (Hunyady *et al.*, 1995b).

1.2.1.2.2. Inactivation

Comme pour toutes les protéines impliquées dans les mécanismes de transmission de signaux, l'activité du récepteur AT1 doit être régulée négativement afin d'interrompre la transmission du signal. Suite à la stimulation du récepteur par l'Ang II, la queue cytoplasmique du récepteur AT1 est phosphorylée et ceci conduit à son inactivation (Balmforth *et al.*, 1997; Olivares-Reyes *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2001). L'internalisation du récepteur AT1 se fait via les vésicules tapissées de clathrine (*Clathrin-Coated vesicles*) (Thomas *et al.*, 1996). Contrairement à plusieurs autres GPCRs, il est proposé que l'internalisation du récepteur AT1 se fait sans son association à la dynamine et la β -arrestine (Zhang *et al.*, 1996). Cependant, une autre étude prétend le contraire (Gaborik *et al.*, 2001). De plus, il est proposé que la désensibilisation et l'internalisation du récepteur AT1 se fait par des mécanismes distincts et indépendamment de ceux découlant de son activation et semblent requérir la phosphorylation de sa queue cytoplasmique (Hunyady *et al.*, 1994).

1.2.1.3. Signalisation cellulaire du récepteur AT1.

1.2.1.3.1. Protéines G hétérotrimériques et messagers secondaires.

Comme la plupart des GPCRs mobilisant le Ca^{2+} , le récepteur AT1 s'associe principalement aux protéines $G_{q/11}$ qui activent la phospholipase $C-\beta$ (PLC- β). Cette dernière est responsable de l'hydrolyse du phosphoinositol phosphorylé afin de générer l'inositol triphosphate (InsP3) et le diacylglycerol (DAG). Ces deux messagers secondaires conduisent à la libération de calcium intracellulaire (Ca^{2+}) et l'activation de protéines kinases C classiques (PKC classiques). Il est proposé que dans les VSMCs, l'Ang II active plutôt la phospholipase $C\gamma$ (PLC- γ) contrairement à la PLC- β (Marrero *et al.*, 1994; Marrero *et al.*, 1996a). Cependant, un autre groupe de recherche a clairement démontré que

la PLC- β , et non la PLC- γ , était responsable de la génération d'InsP3 dans les VSMCs (Schelling *et al.*, 1997). En outre, il est clairement établi que le récepteur AT1 de l'Ang II peut activer les phospholipases C- β 1 et β 2 via l'activation de protéines $G_{q/11}$ ou même G_i via leurs sous-unités α et $\beta\gamma$, respectivement (de Gasparo *et al.*, 2000).

D'autres protéines G hétérotrimériques sont engagées suite à l'activation du récepteur AT1 (Macrez *et al.*, 1997; Macrez-Lepretre *et al.*, 1997). L'activation des protéines $G_{12/13}$, par exemple, conduit à l'activation de canaux calciques de type L (Macrez *et al.*, 1997; Macrez-Lepretre *et al.*, 1997; Macrez *et al.*, 1999; Kawanabe *et al.*, 2002). Cependant, le récepteur AT1 stimule la génération d'AMP cyclique via l'activation d'une adénylyl cyclase sensible au calcium plutôt qu'un couplage direct entre le récepteur AT1 et une protéine G_s (Kubalak & Webb, 1993) (Figure 1.8).

1.2.1.3.2. Phosphorylation en tyrosine

L'Ang II active également plusieurs voies de signalisation qui ont longtemps été considérées comme exclusivement réservées aux RTKs ou aux récepteurs des cytokines. Ainsi on notera l'augmentation de la phosphorylation en tyrosine d'une grande variété de protéines dont la PLC- γ (Marrero *et al.*, 1994; Schelling *et al.*, 1997), Src (Ishida *et al.*, 1995), pp120 (Okuda *et al.*, 1995), pp125FAK (Focal Adhesion Kinase) (Okuda *et al.*, 1995), Jak2 (Ali *et al.*, 1997a; Ali *et al.*, 1998; Sayeski *et al.*, 1999a; Ali *et al.*, 2000), plusieurs STATs (Bhat *et al.*, 1994; Marrero *et al.*, 1995; Marrero *et al.*, 1997; Ali *et al.*, 1998; Bhat & Baker, 1998; Sayeski *et al.*, 1999a; Ali *et al.*, 2000), la paxilline (Turner *et al.*, 1995; Giasson *et al.*, 1997), Tyk2 (Marrero *et al.*, 1995; Giasson *et al.*, 1997; Marrero *et al.*, 1997) et plusieurs Mitogen-Activated Protein Kinases (MAP Kinases) (Zohn *et al.*, 1995; Servant *et al.*, 1996; Ushio-Fukai *et al.*, 1998; Eguchi *et al.*, 2001) en réponse à l'Ang II. Contrairement aux RTKs et aux récepteurs des cytokines (qui sont toujours associés aux Jaks), les GPCRs n'ont pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque. Ainsi, les mécanismes requis afin d'augmenter la phosphorylation en tyrosine de ces différentes

protéines diffèrent vraisemblablement de ceux empruntés par les RTKs ou les récepteurs des cytokines.

Il est suggéré que l'activation de la PLC- γ par le récepteur AT1 nécessite d'abord la phosphorylation de cette enzyme ainsi que son association avec le motif YIPP (phosphotyrosiné) situé dans la queue C-terminale du récepteur AT1 (Venema *et al.*, 1998a). Ce même motif est également important pour l'association avec d'autres protéines comme Jak2 et SHP-2 (une Protéine Tyrosine Phosphatase, PTP) (Ali *et al.*, 1997a). Bien que l'enzyme responsable de la phosphorylation de la tyrosine du motif YIPP ne soit pas identifiée, il semble que l'activité de Src, ou un autre membre de la famille, soit requise (Paxton *et al.*, 1994; Venema *et al.*, 1998a).

L'Ang II active aussi une voie de signalisation jadis réservée aux récepteurs des cytokines : la voie Jak/STAT. En 1994, Bhat et ses collaborateurs ont montré que l'Ang II induit la formation d'un complexe SIF dans les fibroblastes cardiaques (Bhat *et al.*, 1994). SIF est un complexe protéique qui comprend des membres de la famille STAT associés à un élément de réponse SIE. Des trois complexes SIF induits par le PDGF (SIF A, B et C), l'Ang II induit principalement la formation du complexe SIF-A. En réponse à l'IL-6, ce complexe est formé rapidement (10-20 min), alors qu'en réponse à l'Ang II, il est formé après plusieurs heures. Ils ont rapporté que la formation tardive du complexe SIF-A par l'Ang II ne requiert pas la synthèse de nouvelles protéines ni la libération de facteurs induisant la formation de ce complexe (Bhat *et al.*, 1995). La formation tardive du complexe SIF-A corrèle plutôt avec l'activation tardive de STAT3 par l'Ang II. Cette activation tardive serait principalement associée à des effets inhibiteurs de l'Ang II sur l'activation de STAT3. Cette hypothèse est basée sur l'observation que l'Ang II inhibe l'activation de STAT3 en réponse à l'IL-6 dans les cellules T3CHO qui expriment le récepteur AT1 (Bhat *et al.*, 1995). Cet effet inhibiteur sur l'activation de STAT3 serait dû à l'activation de la voie ERK1/2 par l'Ang II. Cependant, le mécanisme par lequel les MAP kinase ERK1 et 2 interfèrent avec l'activation ou bien la phosphorylation en tyrosine de STAT3 demeure encore inconnu. À l'opposé, un autre groupe a clairement démontré que

l'activation de STAT3 dans les myocytes cardiaques est tardive (maximale à 2 h) et requiert la synthèse de nouvelle(s) protéine(s), possiblement un ou plusieurs membres de la famille de l'IL-6 (Kodama *et al.*, 1998) (Sano *et al.*, 2000). Cependant, l'activation de STAT1 est rapide et corrèle avec l'activation des Janus kinases Jak2 et Tyk2 par l'Ang II autant dans

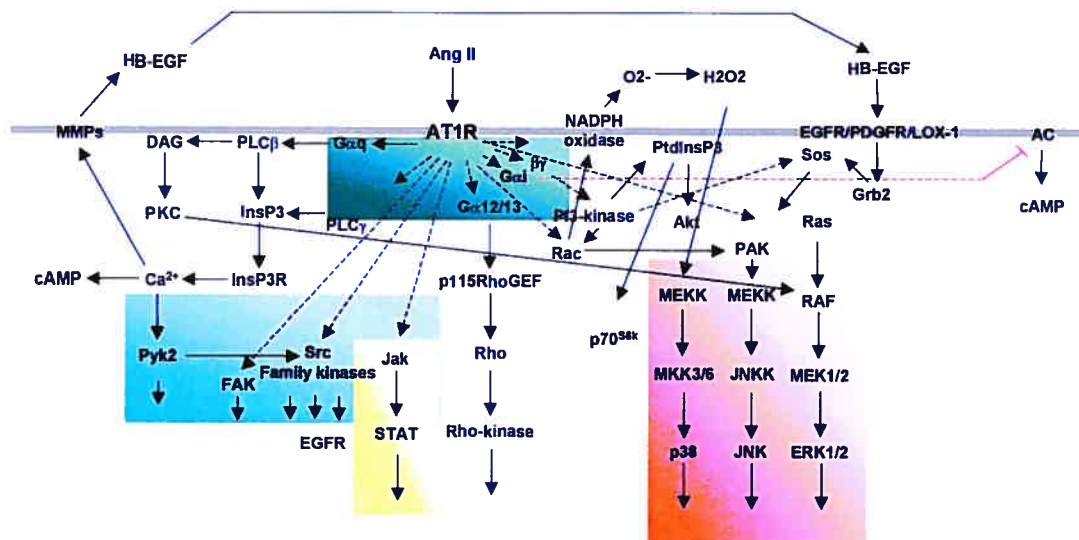


Figure 1.8. Voies de signalisation activées par le récepteur AT1 de l'Angiotensine II. En réponse à l'Ang II, le récepteur AT1 transmet son signal par l'entremise d'une panoplie de voies de signalisation. L'activation du récepteur AT1 conduit à l'activation de protéines G hétérotrimériques (rectangle vert). La croyance veut que ces protéines G soient responsables de l'activation des diverses voies de signalisation dont les cascades des MAP kinase (rectangle orange), l'activation de PTKs (rectangle bleu) ainsi que la voie Jak/STAT (rectangle jaune) ainsi que plusieurs autres cascades de signalisation. Adapté de de (Gasparo *et al.*, 2000).

les myocytes cardiaques que dans les VSMCs (Bhat *et al.*, 1994; Marrero *et al.*, 1995; Kodama *et al.*, 1998; Venema *et al.*, 1998b; Sayeski *et al.*, 1999a; Schieffer *et al.*, 2000; Ali *et al.*, 2000; Sayeski *et al.*, 2001, Chapitre 2).

Les STATs 1 et 3 ne sont pas les seules STATs à être activées par l'Ang II dans le système cardiovasculaire. En effet, les STATs 2 et 5A sont activées en réponse à l'Ang II; la phosphorylation en tyrosine de STAT2 est très rapide et celle de STAT5A est plus lente.

Cependant, l'activation des STATs 2 et 5 semble spécifique aux cardiomyocytes et indépendante des propriétés intrinsèques du récepteur AT1 (McWhinney *et al.*, 1998; Kodama *et al.*, 1998).

L'étude des mécanismes moléculaires menant à l'activation des Janus kinases par le récepteur AT1 a permis l'élaboration d'un modèle d'activation semblable à celui des cytokines et de leurs récepteurs. En réponse à l'Ang II, Jak2 et Tyk2 s'associent au récepteur AT1 (Marrero *et al.*, 1995). L'association de Jak2 au récepteur AT1 nécessite l'activité kinase de Jak2, le motif 231YRFRR de Jak2 et le motif 319YIPP du récepteur AT1 (Ali *et al.*, 1997a; Ali *et al.*, 1998; Ali *et al.*, 2000; Sayeski *et al.*, 2001). En effet, l'introduction d'une mutation dans le sous-domaine VIII (PIFWYAPE→PIFGYAPA) du domaine kinase de Jak2 (Jak2 Δ VIII) inhibe son interaction avec le récepteur AT1. De la même façon, la mutation du motif 319YIPP du récepteur AT1 en AAAA ou bien la mutation d'un motif 231YRFRR de Jak2 en AAAAA empêche l'interaction entre Jak2 et le récepteur. Cependant, le rôle de la tyrosine 319 du récepteur AT1 n'est pas clairement établie. Il est proposé qu'elle pourrait être phosphorylée en réponse à l'Ang II mais la simple mutation de cet acide aminé n'abolit pas l'activation de Jak2 ni son association au récepteur. Aussi, l'activité kinase de Jak2 est nécessaire pour l'activation et l'association de Src et Fyn au récepteur AT1 (Sayeski *et al.*, 1999a; Sayeski *et al.*, 1999b). Suite à l'activation et l'association de Jak2 au récepteur AT1, STAT1 est phosphorylée en tyrosine. Il est aussi suggéré que STAT1 s'associe à Jak2 et non uniquement au récepteur (Ali *et al.*, 2000; Sayeski *et al.*, 2001). De plus, la mutation du motif YRFRR de Jak2 empêche l'interaction entre le récepteur et la kinase, mais n'influence aucunement la phosphorylation en tyrosine de cette dernière. La figure 1.8 présente le modèle proposé pour l'activation de la voie Jak/STAT ainsi que la phosphorylation d'une foule d'autres protéines.

Les paragraphes précédents ont fait état de l'un des mécanismes par lequel l'Ang II active certaines protéines tyrosine kinases. Il a été proposé qu'un autre mécanisme permette d'augmenter la phosphorylation en tyrosine. Ce mécanisme est maintenant connu sous le nom de transactivation de RTKs. Il a été démontré que certains GPCRs possèdent la

capacité d'induire la phosphorylation du récepteur de l'EGF et que cette phosphorylation était responsable de l'activation des MAP kinases ERK1 et ERK2 (Daub *et al.*, 1996). Egushi et ses collaborateurs ont mis en évidence un mécanisme semblable en réponse à l'Ang II (Eguchi *et al.*, 1998; Eguchi *et al.*, 2001). Les uns ont proposé que la transactivation du récepteur de l'EGF par le récepteur AT1 requiert l'activation d'une ou plusieurs métalloprotéases qui permettraient le clivage du pro-HB-EGF en HB-EGF (Prenzel *et al.*, 1999). Ce dernier serait alors responsable de l'activation du récepteur et donc de l'activation des MAP kinases ERK1 et 2 (Eguchi *et al.*, 2001). D'autres ont proposé un modèle dans lequel la production de radicaux libres oxygénés (ROS; *Reactive Oxygen Species*) et l'activation de PTKs (protéine tyrosine kinases solubles) serait responsable de la phosphorylation du récepteur de l'EGF (Shibasaki *et al.*, 2001; Ushio-Fukai *et al.*, 2001a; Ushio-Fukai *et al.*, 2001b). En plus de la transactivation du récepteur de l'EGF, d'autres *cross-talks* ont été rapportés. Le récepteur AT1 transactive le récepteur de l'IGF-1 ainsi que la phosphorylation de IRS-1 (Ali *et al.*, 1997b), le récepteur du PDGFbb (Linseman *et al.*, 1995) ainsi que LOX-1 un récepteur des LDL-oxydées (Li *et al.*, 1999) (Figure 1.8). À l'encontre de ces études, certains ont rapporté que l'activation du récepteur AT1 de l'Ang II active certaines voies de signalisation qui ont une action négative sur la transactivation du récepteur de l'EGF (Li *et al.*, 1998).

1.2.1.3.3. Activation de sérine/thréonine kinases

Comme la plupart des facteurs de croissance, l'Ang II active une multitude de voies de signalisation impliquant des protéines sérine/thréonine kinases (STK). Parmi celles-ci, on retrouve, la voie des MAP kinases ERK1 et 2 (Servant *et al.*, 1996), ERK5 (Abe *et al.*, 1996), p38 (Ushio-Fukai *et al.*, 1998; Meloche *et al.*, 2000 Eguchi *et al.*, 2001) et la voie JNK (Schmitz *et al.*, 1998). Dans les myocytes cardiaques, l'Ang II active la voie ERK1/2 d'une manière similaire aux facteurs de croissance. Ces derniers activent la voie ERK1/2 par l'association de leurs récepteurs à Grb2 et Sos. Sos est un facteur d'échange de nucléotide (*Guanine nucleotide exchange factor*, GEF) qui permet la liaison du GTP à Ras, Rac et Rho (voir section 1.3.). Une fois activée (lié au GTP), Ras s'associe et active la

protéine S/T kinase Raf-1 qui à son tour, phosphoryle MEK1 et 2 (deux MAP kinase kinases). Ces dernières, activent les MAP kinases ERK1 et ERK2 en les phosphorylant sur la thréonine et la tyrosine de leur boucle d'activation. Ainsi phosphorylées, les MAP kinases ERK1 et 2 se dissocient des MEKs et pénètrent au noyau où elles phosphorylent plusieurs substrats comme des facteurs de transcription et d'autres protéines kinases (Argetsinger & Carter-Su, 1996; Widmann *et al.*, 1999; Kyriakis & Avruch, 2001). Elles phosphorylent aussi des substrats cytoplasmiques. Alors que cette cascade de signalisation est relativement bien caractérisée, le mécanisme par lequel Ras est activé en réponse à l'Ang II l'est beaucoup moins. Il est proposé que pp60-Src et Pyk2, tout comme la transactivation du récepteur de l'EGF, jouent un rôle important dans ce processus (Schieffer *et al.*, 1996a; Marrero *et al.*, 1996b; Schieffer *et al.*, 1996b; Eguchi *et al.*, 1998; Eguchi *et al.*, 2001; Uchiyama-Tanaka *et al.*, 2001). De plus, de récentes évidences suggèrent que la protéine d'échafaudage β -arrestin est impliquée dans l'activation de la voie ERK1 et 2 et JNK (McDonald *et al.*, 2000; Luttrell *et al.*, 2001; Tohgo *et al.*, 2002; Ahn *et al.*, 2003).

En plus des MAP kinases ERK1 et 2, plusieurs autres MAP kinases sont activées en réponse à l'Ang II. Tout comme en réponse à l'IL-1 et le *Tumor Necrosis Factor* (TNF), l'Ang II active JNK par l'entremise de la *p21-Activated Kinase* (PAK) (Schmitz *et al.*, 1998). En réponse à l'Ang II, p38 est activé par l'entremise de la génération de ROS (Ushio-Fukai *et al.*, 1998; Meloche *et al.*, 2000). Ceux-ci conduisent également à l'activation de Akt/PKB dans les VSMCs (Ushio-Fukai *et al.*, 1999). En réponse à l'Ang II, Akt est activée selon un mécanisme qui requiert la PI-3 kinase (*Phosphatidylinositol-3 kinase*) ainsi que des PTKs (Takahashi *et al.*, 1999). Finalement, l'Ang II active d'autres STKs dont la p70^{S6k} (Giasson & Meloche, 1995), la Ca^{2+} /calmoduline-kinase-II (Cam Kinase-II) (Abraham *et al.*, 1997) ainsi que la casein kinase I (Voisin *et al.*, 1999) (Figure 1.8).

1.2.1.3.4. Radicaux libres oxygénés.

Les radicaux libres oxygénés jouent un rôle essentiel dans l'activation de certaines voies de signalisation en réponse à l'Ang II, ainsi qu'en réponse à plusieurs autres facteurs de croissance (Rao & Berk, 1992; Sundaresan *et al.*, 1995; Rao *et al.*, 1995; Sundaresan *et al.*, 1996; Ushio-Fukai *et al.*, 1998). À l'origine, les ROS ont été identifiés comme l'un des sous-produits de la dégradation cellulaire. Aujourd'hui, un rôle essentiel dans la transmission de signaux extracellulaires leur est attribué (Bokoch & Diebold, 2002). Les ROS sont produits via l'activation d'un complexe multiprotéique nommé la *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxidase (NADPH)-oxidase*. Le mécanisme de fonctionnement de ce complexe est décrit en détail à la section 1.3. La NADPH oxydase est principalement retrouvé dans les cellules phagocytaires alors qu'un système similaire est retrouvé dans la plupart des autres types cellulaires, dont les VSMCs (Voir section 1.3).

1.2.1.4. Fonctions du récepteur AT1.

À l'origine, les fonctions physiologiques et pathophysiologiques de l'Ang II ont été établies grâce à la génération d'antagonistes spécifiques des récepteurs AT1 et AT2 (ex : losartan (Dup753) ou PD123319, respectivement). Aujourd'hui, ces données ont été confirmées grâce à la génération de souris déficientes en angiotensinogène (Agt^{-/-}) et en enzyme de conversion de l'Ang II (ACE^{-/-}), ainsi que par le ciblage des gènes encodant les trois formes de récepteurs de l'Ang II (Agtr1a^{-/-}, Agtr1b^{-/-} et Agtr2^{-/-}) (Tanimoto *et al.*, 1994; Krege *et al.*, 1995; Esther, Jr. *et al.*, 1996a; Esther, Jr. *et al.*, 1996b; Oliverio *et al.*, 1997; Tsuchida *et al.*, 1998). En plus de confirmer les rôles attribués au système rénine-angiotensine (RA) sur la régulation de la pression sanguine, la génération de ces souris a aussi permis d'identifier la contribution de ce système dans le développement embryonnaire murin.

Les souris déficientes du gène de l'angiotensinogène (Agt^{-/-}) ou de l'ACE (Ace^{-/-}) présentent les mêmes anomalies. D'abord, ces animaux ont une pression sanguine plus faible que les souris de type sauvage, confirmant ainsi l'action vasoconstrictrice de l'Ang

II. Ces souris démontrent aussi certains problèmes de survie puisque la plupart d'entre elles meurent avant d'être sevrées. Pour celles qui surpassent ces problèmes, les études montrent qu'elles meurent dans les douze (12) mois suivant la naissance. Des anomalies rénales ont également été observées. En effet, ces animaux souffrent d'inflammation au niveau du cortex surrénalien ainsi que d'hypoplasie de la medulla. Ceci a pour conséquence une déficience de l'activité rénale qui résulte en une plus faible capacité du rein à concentrer l'urine. Finalement, la perte du gène de l'ACE entraîne l'infertilité chez les mâles (Esther, Jr. *et al.*, 1996a).

L'utilisation d'antagonistes spécifiques des récepteurs de l'Ang II a permis d'établir que l'action de l'Ang II est principalement relayée par le récepteur AT1 (AT1A et AT1B chez les rongeurs) alors que peu de fonction n'est attribué au récepteur AT2. Ces observations ont été confirmées par la génération de souris déficientes en récepteurs AT1A et/ou AT1B (Ito *et al.*, 1995; Sugaya *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1997b). La pression sanguine des souris déficientes en récepteur AT1A (*Agtr1a*^{-/-}) est de 20 mmHg plus faible que chez les souris de type sauvage en plus de demeurer presque inchangée à l'injection d'Ang II. Cependant, contrairement aux souris *Agt*^{-/-} ou *ACE*^{-/-}, les souris *Agtr1a*^{-/-} ne présentent aucune anomalie rénale ou cardiaque ni de problème de survie majeur, excepté que leur longévité est légèrement diminuée comparée aux souris de type sauvage. Ces données confirment le rôle du récepteur AT1A dans le contrôle de la pression sanguine, mais suggère aussi que ce récepteur n'a peu ou pas d'influence sur le développement embryonnaire (Oliverio *et al.*, 1997). Par ailleurs, l'administration d'Ang II aux souris *Agtr1a*^{-/-} résulte en une augmentation de la pression sanguine et elle peut être renversée par la présence d'un antagoniste spécifique du récepteur AT1. Ces données suggèrent que le récepteur AT1b contribue aussi à la réponse vasomotrice de l'Ang II (Oliverio *et al.*, 1997). Ces données sont aussi supportées par l'observation que l'Ang II peut toujours augmenter la mobilisation de Ca²⁺ dans les VSMCs provenant de souris *Agtr1a*^{-/-} (Zhu *et al.*, 1998). Ces données ont mené à la génération de souris doublement déficientes en récepteurs AT1A et AT1B. En plus d'avoir une pression sanguine plus faible au repos, en comparaison aux souris *Agtr1a*^{-/-}, les souris *Agtr1a*^{-/-}/*Agtr1b*^{-/-} présentent les mêmes

anomalies de développement que les souris ACE^{-/-} et Agt^{-/-} (Oliverio *et al.*, 1997; Tsuchida *et al.*, 1998). Finalement, les données recueillies par ces groupes de recherche ont confirmé que la réponse vasomotrice de l'Ang II est uniquement relayée par les récepteurs AT1A et AT1B puisque l'Ang II n'a pas d'influence sur la pression des souris Agtr1a^{-/-}/Agtr1b.

Le ciblage du gène encodant le récepteur AT2 démontre que ce dernier agit en tant qu'antagoniste physiologique du récepteur AT1 puisque les souris Agtr2^{-/-} montrent une hausse de la pression sanguine moyenne et une sensibilité accrue à l'Ang II (Ichiki *et al.*, 1995; Hein *et al.*, 1995a; Hein *et al.*, 1995b).

1.2.2. Le récepteur PAR-1 de la thrombine.

La thrombine a été identifiée comme une protéine sérine protéase produite en réponse au complément sanguin, plus particulièrement au facteur Xa. La thrombine est responsable de la formation de fibrines (la matrice fibreuse des caillots sanguins) à partir du fibrinogène (Stubbs & Bode, 1993). En plus de son rôle dans la formation de caillots sanguins, la thrombine joue un rôle primordial dans l'activation des plaquettes (Macfarlane *et al.*, 2001). Aujourd'hui, la thrombine est aussi connue pour agir sur les monocytes, VSMCs, les cellules endothéliales, les lymphocytes et plusieurs autres types cellulaires (Chen & Buchanan, 1975; Chen *et al.*, 1976; Bar-Shavit *et al.*, 1983; Bizios *et al.*, 1986; Daniel *et al.*, 1986). La majeure partie des fonctions connues de la thrombine est relayée par le récepteur PAR-1 (Proteinase-Activated Receptor-1) (Macfarlane *et al.*, 2001). PAR-1 fait partie d'une famille de récepteurs à sept domaines transmembranaires qui sont activés par des protéases. Cette famille de récepteurs comprend 4 membres : les PAR-1, -2, -3 et -4. Alors que la thrombine active PAR-1, PAR-3 et PAR-4, le récepteur PAR-2 est principalement activé par la trypsine (Nystedt *et al.*, 1994). Le récepteur PAR-3 ne semble pas promouvoir de signalisation intracellulaire (Nakanishi-Matsui *et al.*, 2000) et PAR-4 est un récepteur de très faible affinité envers la thrombine (Kahn *et al.*, 1998). Comme la thrombine relaie principalement ses effets par le récepteur PAR-1, seul ce récepteur sera revu dans cette section.

1.2.2.1. Structure

Le récepteur PAR-1 de la thrombine a été cloné en 1991 et encode une protéine de 425 acides aminés (Vu *et al.*, 1991). L'hydropathie de cette protéine indique qu'elle fait partie des récepteurs à sept passages transmembranaires ou GPCRs. Cette protéine possède un peptide signal à l'extrémité N-terminale, plusieurs sites de glycosylation et une séquence de clivage à la thrombine (LDPR↓S). La présence de cette séquence indique que l'activation du récepteur se fait par clivage protéolytique.

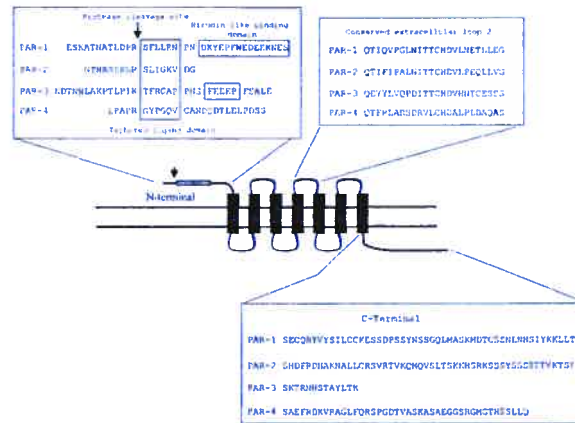
1.2.2.2. Mécanismes de régulation du récepteur PAR1 de la thrombine.

1.2.2.2.1. Activation

Le clivage de la portion N-terminale du récepteur par la thrombine au niveau de l'arginine 41, démasque une séquence peptidique qui sert de ligand. Cette séquence se lie au récepteur et l'active (Figure 1.9). De façon similaire, le récepteur de la thrombine peut être activé en réponse au peptide TRAP-14 (*Thrombin Receptor Activating Peptide-14*, SFLLRNPNPDKYEPF), qui correspond à l'extrémité N-terminale du récepteur suite à son clivage protéolytique. Le clivage protéolytique donnant lieu à l'exposition du ligand semble être le seul mécanisme d'activation du récepteur. En effet, la substitution du site de clivage à la thrombine par une séquence permettant le clivage par l'entérokinase rend le récepteur activable par cette protéase (Chen *et al.*, 1994). De plus, un récepteur mutant qui ne possède plus la région N-terminale est inactif et insensible à la thrombine. Ceci suggère que cette région n'agit pas comme un répresseur du récepteur, mais bien comme ligand et que ce dernier doit être démasqué.

La haute affinité de la thrombine pour ce récepteur est conférée par la présence d'un domaine semblable à l'uridine (*uridine-like domain*). Ce domaine, s'étend de l'a.a. 51 à l'a.a. 63. Les protéines présentant aussi cette région (*uridine-like domain*) ont la capacité d'inhiber l'action de la thrombine (Bouton *et al.*, 1995a; Bouton *et al.*, 1995b). De plus, la γ -thrombine, qui n'interagit pas avec ce domaine, est 10 fois moins efficace que la

A



B

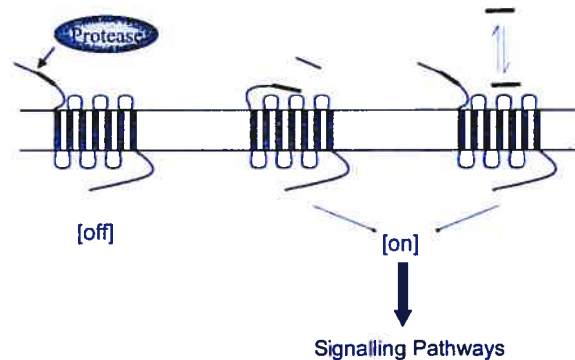


Figure 1.9. Récepteur PAR-1 de la Thrombine. A. Représentation de la structure des récepteurs PARs ainsi que leurs régions importantes pour leur activation. B. Le récepteur PAR-1 de la thrombine est activé par le clivage de l'extrémité N-terminale du récepteur. Ce clivage démasque une région du récepteur qui servira ensuite de ligand pour le récepteur. Un peptide correspondant à cette région du récepteur peut aussi servir d'agoniste (tiré de (Macfarlane *et al.*, 2001)).

thrombine (α -thrombine) pour d'activer le récepteur PAR-1 (Seiler *et al.*, 1995; Ishii *et al.*, 1995; Bouton *et al.*, 1995a; Bouton *et al.*, 1995b) (Figure 1.9).

Comme l'activation du récepteur ne dépend pas uniquement du clivage de la région N-terminale, mais aussi de la liaison du ligand « démasqué » au reste du récepteur, il a été rapporté que cette interaction se fait par la boucle extracellulaire 2 et la région N-terminale

(Bahou *et al.*, 1994; Lerner *et al.*, 1996). À l'aide de la mutagenèse dirigée, les résidus Phe⁸⁷ de la région N-terminale et Glu²⁶⁰ ont été identifiés comme responsables de la spécificité envers le ligand. En fait, l'Arg⁵ du peptide TRAP (SFLLRN) s'associe au Glu²⁶⁰. Il est proposé que l'interaction entre le « motif caché » de la queue N-terminale de la protéine et le reste du récepteur permette des changements de conformations qui entraîneront l'interaction entre le récepteur et les molécules de signalisation comme les protéines G hétérotrimériques.

1.2.2.2. Régulation négative

La désensibilisation et l'internalisation du récepteur PAR-1 se font essentiellement de la même façon que pour les autres récepteurs à sept passages transmembranaires (Macfarlane *et al.*, 2001). Suite à l'activation du récepteur par la thrombine, le récepteur PAR-1 est phosphorylé par les *G protein-receptor kinases* (GRKs) sur les sérines 391 et 395 (Ishii *et al.*, 1994). Il semblerait que GRK-3 soit plus efficace à phosphoryler et découpler le récepteur PAR-1 des protéines G hétérotrimériques que GRK-2. Cependant, l'activation de ces différentes GRKs semble être spécifique au type cellulaire étudié. Par exemple, GRK-5 est la kinase responsable de la phosphorylation de PAR-1 dans les cellules endothéliales alors que GRK-3 est responsable de la phosphorylation du récepteur dans d'autres types cellulaires (Tiruppathi *et al.*, 2000).

En plus de la phosphorylation de la queue cytoplasmique du récepteur par les GRKs, d'autres événements participent à la désensibilisation du récepteur PAR-1. En effet, il a été démontré que le clivage protéolytique du ligand conduirait à l'inactivation du récepteur (Coller *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1996a; Kuliopulos *et al.*, 1999; Hammes & Coughlin, 1999).

L'internalisation du récepteur PAR-1 se fait très rapidement en réponse à la thrombine. Le récepteur PAR-1 est d'abord internalisé dans les endosomes primaires (*early endosomes*). Par la suite, une grande proportion de ces récepteurs sont redirigés vers les lysosomes pour la dégradation (Hoxie *et al.*, 1993). La queue C-terminale du récepteur est responsable de

son internalisation (Trejo *et al.*, 1998). Les récepteurs qui évitent la dégradation lysosomiale sont recyclés à la surface mais ne sont plus activables par la thrombine. Les réserves intracellulaires de récepteur PAR-1 ou bien la synthèse *de novo* est responsable de la re-sensibilisation de la réponse à la thrombine (Hoxie *et al.*, 1993; Brass *et al.*, 1994; Molino *et al.*, 1997).

1.2.2.3. Signalisation cellulaire du récepteur PAR-1 de la thrombine

1.2.2.3.1. Protéines G hétérotrimériques et messagers secondaires

L'activation du récepteur PAR-1 conduit principalement à l'activation de protéines G hétérotrimériques de la classe G_i (Hung *et al.*, 1992; Kanthou *et al.*, 1996). L'activation de ce récepteur permet également la synthèse d'inositol triphosphate (InsP3), la libération de Ca^{2+} intracellulaire, la génération de DAG et l'activation de protéines kinases C (PKCs) classiques (Babich *et al.*, 1990; Hung *et al.*, 1992). La thrombine stimule aussi la génération d'autres phospholipides, dont l'acide arachidonique, suite à l'activation de la phospholipase D (PLD) et de la phospholipase A_2 (PLA₂) (McNicol & Robson, 1997; Cheng *et al.*, 1999). L'activation de la PLA₂ et de la PLD par le récepteur PAR-1 est relayé par une protéine $G_{i/o}$ (Winitz *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1996). La synthèse d'insP3 par la thrombine nécessite l'activation de protéine $G_{q/11}$ dans plusieurs systèmes, alors que pour d'autres systèmes, elle découle de l'activation de protéines G hétérotrimériques sensibles à la toxine pertussique (PTX) (Babich *et al.*, 1990; Lounsbury *et al.*, 1991; Baffy *et al.*, 1994; Benka *et al.*, 1995; Ogino *et al.*, 1996; Offermanns *et al.*, 1997).

En plus des protéines $G_{q/11}$ ou $G_{i/o}$, le récepteur PAR-1 est capable d'activer les protéines G hétérotrimériques G_{12} et G_{13} (Offermanns *et al.*, 1994). L'activation de ces protéines G joue un rôle essentiel dans l'activation de la transcription génique et la synthèse d'ADN en réponse à la thrombine (Aragay *et al.*, 1995). L'activation du facteur de transcription AP-1 (hétérodimère formé de membres de la famille Jun et Fos) semble aussi être relayé par un mécanisme dépendant de G_{12} et l'activation subséquente de Ras, Rac et finalement JNK (Collins *et al.*, 1996). G_{12} est aussi impliquée dans l'induction de la phosphorylation en

tyrosine de plusieurs autres protéines (Collins *et al.*, 1997). Dans certains types, cellulaires l'activation de p38 et de JNK est complètement dépendante de la protéine G_i alors que dans d'autres elle est dépendante de la PKC et $G_{q/11}$ (Mitsui *et al.*, 1997; Mitsui *et al.*, 1998; Malcolm *et al.*, 2000) (Figure 1.10). Plusieurs autres voies de signalisation semblent découler de l'activation de $G_{\alpha 12}$ comme par exemple l'activation de Rho (une petite protéine G monomérique). Rho est impliquée dans l'activation de JNK, de la PI-3 kinase et plusieurs autres protéines kinases y compris la Rho-kinase (ROK, ROCK, Rho-

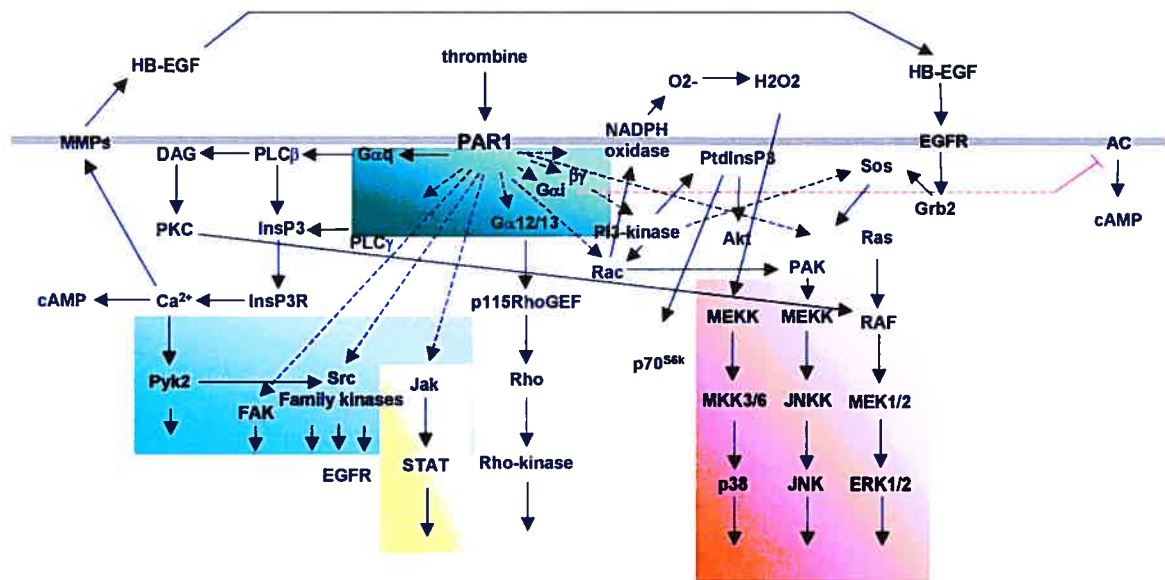


Figure 1.10. Voies de signalisation engendrées par le récepteur PAR-1 de la Thrombine. En réponse à la thrombine, le récepteur PAR-1 transmet son signal par l'entremise d'une panoplie de voies de signalisation. L'activation du récepteur PAR-1 conduit à l'activation de protéines G hétérotrimériques (rectangle vert). La croyance veut que ces protéines G soient responsables de l'activation des diverses voies de signalisation dont les cascades des MAP kinase (rectangle orangé), l'activation de protéines tyrosine kinases (rectangle bleu) ainsi que la voie Jak/STAT (rectangle jaune) ainsi que plusieurs autres cascades de signalisation. (Adapté de MacFarlane *et al.*, 2001)

dependent kinase). Rho joue aussi un rôle important dans l'organisation du cytosquelette d'actine, l'apoptose de cellules neuronales, l'agrégation plaquettaire, l'augmentation de la synthèse d'ADN, la migration des VSMCs ainsi que la contraction des cellules endothéliales (Zhang *et al.*, 1995a; Donovan *et al.*, 1997; Majumdar *et al.*, 1998; Essler *et al.*, 1998; Seasholtz *et al.*, 1999). L'activation de Rho par $G_{\alpha 12/13}$ est relayée par un *guanine exchange factor* (GEF) spécifique à Rho (p115 Rho-GEF). Ce GEF contient un domaine

RGS auquel s'associe la protéine $G_{\alpha 12}$, ce qui active le GEF (Fukuhara *et al.*, 1999) (figure 1.10).

1.2.2.3.2. Phosphorylation en tyrosine.

La stimulation du récepteur PAR-1 par la thrombine conduit lui aussi à l'activation d'une panoplie de voies de signalisation qui conduisent à l'augmentation de phosphorylation en tyrosine et qui semblent, pour certaines, découler de l'activation de $G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha q/11}$ ou bien $G_{12/13}$. Parmi ces voies, on retrouve la phosphorylation en tyrosine de Shc (Choudhury *et al.*, 1996), l'activation de membres de la famille Src (Cichowski *et al.*, 1992; Rao *et al.*, 1995), de Jak2 (Rodriguez-Linares & Watson, 1994), de la pp125FAK (Negrescu *et al.*, 1995; Choudhury *et al.*, 1996), et de Pyk2 (Ohmori *et al.*, 2000). Cependant, les mécanismes précoces menant à l'activation de ces kinases restent encore peu définis (Figure 1.10).

1.2.2.3.3. Activation de sérine/thréonine kinases.

La thrombine est aussi capable d'activer les MAP kinases ERK1 et 2 via le récepteur PAR-1. Il est clairement établi que l'activation de cette voie de signalisation par les RTKs est initialisée par l'activation de Shc qui recrute Sos et Grb2 au récepteur. Sos est un GEF capable d'activer Ras. Une fois active (liée au GTP), Ras recrute et active Raf-1 qui est responsable de phosphoryler et d'activer MEK (une MAP kinase kinase). Finalement cette dernière active par phosphorylation les MAP kinases ERKs 1 et 2 (Widmann *et al.*, 1999). La thrombine active aussi les MAP kinases via l'activation de protéines tyrosine kinases, et de la protéine G hétérotrimérique $G_{\alpha i/o}$ puisque l'activation prolongée de ERK1 et 2 par la thrombine est sensible à la toxine pertussique et la génistéine (Meloche *et al.*, 1992; Kranenburg *et al.*, 1997; Prenzel *et al.*, 1999). À l'opposé, l'activation précoce des MAP kinases et les intermédiaires menant à cette activation (phosphorylation de SHC, l'association de GTP à Ras, etc.) n'est pas sensible à cette toxine et est donc indépendante de $G_{\alpha i/o}$ (Chen *et al.*, 1996b). Tout comme pour le récepteur de l'Ang II, il semblerait que l'activation de ERK1 et 2 soit relayée par la transactivation du récepteur de l'EGF, du

bFGF ou bien du récepteur de l'IGF-1 (Weiss & Maduri, 1993; Daub *et al.*, 1996; Delafontaine *et al.*, 1996) (Figure 1.10).

La thrombine active aussi plusieurs isoformes de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3 kinase) afin de générer le phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate (PtdInsP3). La thrombine active l'isoforme γ -p110 via l'activation de protéines G hétérotrimériques et plus précisément via l'association des sous-unités $\beta\gamma$ à la lipide kinase (Azim *et al.*, 2000). Dans certains types cellulaires, comme les plaquettes, la thrombine stimule la génération de PtdInsP3 par l'entremise de la petite protéine G monomérique Rho (Zhang *et al.*, 1995a). En fait, les mécanismes menant à l'activation de l'une ou plusieurs isoformes de PI-3 kinase semblent être dépendant du type cellulaire étudié. De plus, des mécanismes différents peuvent être empruntés à l'intérieur d'un même type cellulaire (Macfarlane *et al.*, 2001). L'activation de la PI-3 kinase conduit à l'activation d'autres sérine/thréonine kinases comme par exemple la p70^{s6k} (Belham *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 1998; Johanson *et al.*, 1999; Krymskaya *et al.*, 1999) et la protéine kinase B ou Akt (Walker *et al.*, 1998).

Tableau 1.3. Rôle du récepteur PAR-1 de la thrombine dans les différents tissus. (Adapté de MacFarlane *et al.*, 2001).

Tissu	Type cellulaire	Effets
Système respiratoire	Épithélium trachéal, Fibroblastes, SMCs	↑ Relâche de PDGF; relaxation/contraction; ↑ relâche de prostaglandines; ↑ production de collagène; ↑ prolifération.
Sang	Plaquettes	Activation; dégranulation; ↑ Aggrégation; ↑ [Ca ²⁺]; ↑ thromboxane A ₂ .
Os	Ostéoblastes	↑ [Ca ²⁺]; ↑ prolifération.
Tissus conjonctifs	Fibroblastes sinuvials	↑ prolifération; ↑ IL-6; ↑ GM-CSF.
Système cardiovasculaire	VSMCs, endothélium	Relaxation/Contraction; mitogène; ↑ [Ca ²⁺]; ↑ facteur de von Willerbrand; ↑ NO (oxyde nitrique); ↑ de l'expression de P-sélectine et ICAM.
Épiderme	Keratinocytes	↑ [Ca ²⁺]; ↑ prolifération; inhibe la différenciation.
Système immunitaire	Monocytes, Cellules T	↑ [Ca ²⁺]; ↑ IL-6; ↑ IL-1; ↑ TNF- α ; dégranulation et activation.
Intestin	SMCs	Relaxation/contraction.
Reins	Cellules épithéliales glomérulaires, cellules mésangiales glomérulaires	Relâche de TGF- β .
Système nerveux	Cellules gliales, astrocytes, neurones	↑ [Ca ²⁺]; ↑ prolifération; renversement de la <i>stellation</i> ; Induit l'apoptose chez les neurones.
Muscle squelettique	Myocytes	↑ [Ca ²⁺].
Estomac	SMCs	Relaxation/Contraction.

Ces deux dernières jouent un rôle important dans la survie et la croissance cellulaire (Marte & Downward, 1997; Hafizi *et al.*, 1997; Datta *et al.*, 1999; Krasilnikov, 2000).

1.2.2.3.4. Radicaux libres oxygénés

D'autres voies de signalisation sont activées en réponse à la thrombine. Parmi celles-ci, on retrouve la génération de ROS. Ces derniers jouent un rôle important dans le processus d'activation de plusieurs voies de signalisation ainsi que dans la croissance des VSMCs (Rao & Berk, 1992; Abe *et al.*, 1997) (Figure 1.10).

1.2.2.4. Fonctions du récepteur PAR-1 de la thrombine

La thrombine joue un rôle important dans la cicatrisation et la régénération des vaisseaux endommagés (Carney, 1992). En réponse au dommage vasculaire, elle coordonne l'action de plusieurs cellules menant à l'agrégation plaquettaire, l'*extravasation* des leucocytes, l'angiogénèse, la régénération de cellules nerveuses ainsi que l'initiation d'une réponse immunitaire contrôlée. La thrombine exerce ses effets sur une grande variété de types cellulaires faisant partie de plusieurs systèmes. Ceux-ci incluent le système respiratoire, le sang, les os, les tissus conjonctifs, le système cardiovasculaire (principalement les VSMCs et les cellules endothéliales), l'épiderme, le système immunitaire, le système gastro-intestinal, les reins, le système nerveux et les muscles squelettiques (Macfarlane *et al.*, 2001) (Tableau 1.3).

Au niveau cardiovasculaire, la thrombine et les peptides TRAP induisent une vasodilatation dépendante de l'endothélium vasculaire (deBlois *et al.*, 1992; Antonaccio *et al.*, 1993; Antonaccio & Normandin, 1994). Tout comme pour la bradykinine, les effets vasodilatateurs de la thrombine sont relayés par la libération d'oxyde nitrique (NO) et de prostacycline (prostaglandine I₂, PGI₂) par l'endothélium (Ku *et al.*, 1993; Ku & Dai, 1997). Cependant, dans certains lits vasculaires, une réponse vasomotrice de la thrombine peut être observée même en présence d'endothélium (Tay-Uyboco *et al.*, 1995).

En plus de ses effets contractiles et relaxants, la thrombine induit la croissance de plusieurs types cellulaires d'origine mésenchymateuse. En effet, la thrombine stimule la croissance des fibroblastes, des VSMCs et des cellules endothéliales (Chen & Buchanan, 1975; Carney *et al.*, 1978; McNamara *et al.*, 1993). Les effets prolifératifs de la thrombine ont aussi été observés sur les lymphocytes, les ostéoblastes ainsi que plusieurs autres types cellulaires (Chen & Buchanan, 1975; Abraham & MacKie, 1999).

1.3. LES PETITES PROTÉINES G DE LA FAMILLE RHO.

Les petites protéines G (GTPases) de la famille Rho font partie de la superfamille Ras. Cette superfamille compte environ 150 protéines G monomériques de la levure à l'Homme. Cette superfamille se divise en cinq familles : Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf et Ran (Takai *et al.*, 2001). Ces diverses GTPases sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires. Les familles Ras et Rho sont impliquées dans la régulation de l'expression génique, Rho dans l'organisation du cytosquelette, Rab et Sar1/Arf influencent le transport vésiculaire alors que Ran contrôle le transport nucléaire ainsi que le cycle cellulaire (Takai *et al.*, 2001). Jusqu'à présent, dix (19) membres de la famille Rho ont été identifiés et certains ont différentes isoformes: Rho (A, B et C), Rac (1, 2 et 3), Cdc42 (Hs et G25K), Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7, Rnd3/RhoE, RhoD, RhoG, TC10 et TTF (Bishop & Hall, 2000). Parmi ces GTPases, Rho, Rac et Cdc42 sont les plus étudiées et seront traitées plus exhaustivement au cours des prochaines pages.

1.3.1. Structure

Les petites GTPases sont des protéines de faible poids moléculaire variant entre 20 et 30 kDa. La quasi-totalité de la protéine sert de domaine catalytique (domaine G). Ce domaine est unique aux membres de la superfamille Ras (Figure 1.11). En plus du domaine G, les protéines de la famille Ras, Rho et Rab peuvent subir des modifications post-traductionnelles comme l'addition de groupements lipidiques et même subir des clivages

protéolytiques (Casey *et al.*, 1989; Gutierrez *et al.*, 1989; Fujiyama & Tamanoi, 1990; Fujiyama *et al.*, 1991).

1.3.1.1. Domaine G

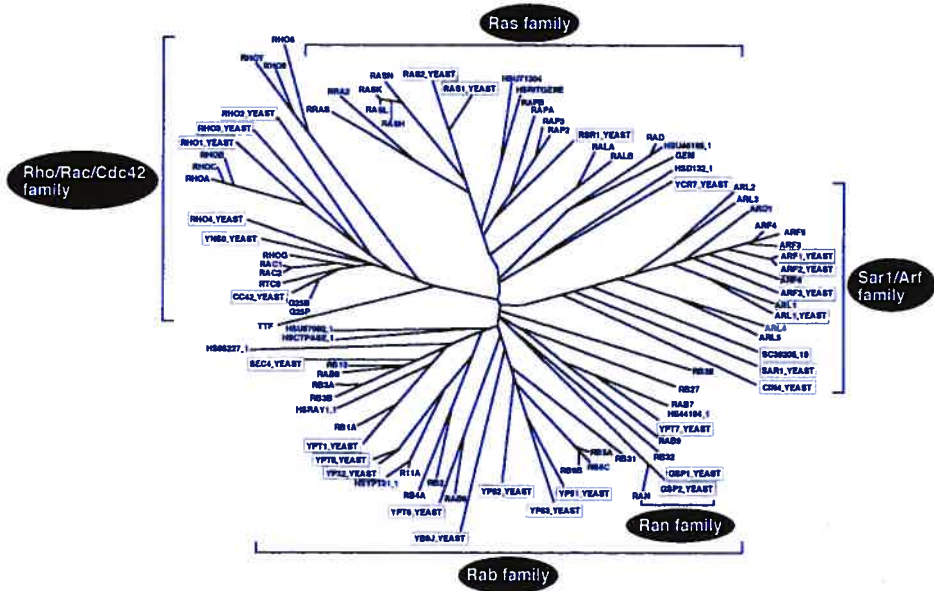
Le domaine G est le domaine catalytique des GTPases. Ce domaine sert de domaine de liaison au guanosine diphosphate (GDP) et guanosine triphosphate (GTP). En plus de lier les différents nucléotides phosphorylés, ce domaine est responsable de l'activité catalytique des protéines G monomériques. Ces protéines hydrolyse le GTP en GDP (activité GTPase) (Takai *et al.*, 2001). Comme pour la plupart des protéines G, la liaison du GTP à la protéine maintient la protéine G dans sa forme active qui peut alors s'associer à divers effecteurs.

Le domaine G comprend 5 hélices α (A1-A5) et 6 feuillets β (B1-B6) ainsi que 5 boucles (G1-G5) (Figure 1.11). Les régions les mieux conservées des petites protéines G se retrouvent entre les hélices α et feuillets β de la protéine et sont les boucles G1 à G5 (Tableau 1.4). La boucle G1, aussi nommée *P-loop*, (*P-loop*) est responsable de la liaison aux phosphates α et β du phosphonucléotide alors que la boucle G3 lie le phosphate γ . La boucle G2 contient une thréonine qui permet la liaison au Mg^{2+} alors que la base guanine est reconnue par les boucles G4 et G5. La boucle G4 contient la séquence consensus NKxD dont la lysine et l'acide aspartique forment les liens avec la base nucléotidique.

Tableau 1.4. Alignement de séquences des boucles conservées (Adapté de Takai *et al.*, 2001).

Protéine	Séquence	G1(P-loop)	G2 (Switch I)	G3 (Switch II)	G4	G5
H-Ras	P01112	GAGGVGKS	YDPTIED	ILDTAGQE	VGNKCD	YIETSAK
RhoA	P06749	GDGACGKT	YVPTVFE	LWDTAGQE	VGNKCD	YMECSAK
Cdc42	P25763	GDGAVGKT	YVPTVFD	LFDTAGQE	VGTDID	YVECSAL
Rac1	P15154	GDGAVGKS	YIPTVFD	LWDTAGQE	VGTKLD	YLECSAL
Gia	P04898	GAGESGKS	RVKTTGI	LFDVGGQR	FLNKCD	THFTCAT
EF-Tu	P20001	GHVDHGKT	GRITINT	HVDGPGHA	FLNKCD	IVRGSAL
Arf-1A	P32889	GLGAAGKS	TIPTIGF	VWDVGGQD	FANKQD	IQATCAT

A



B

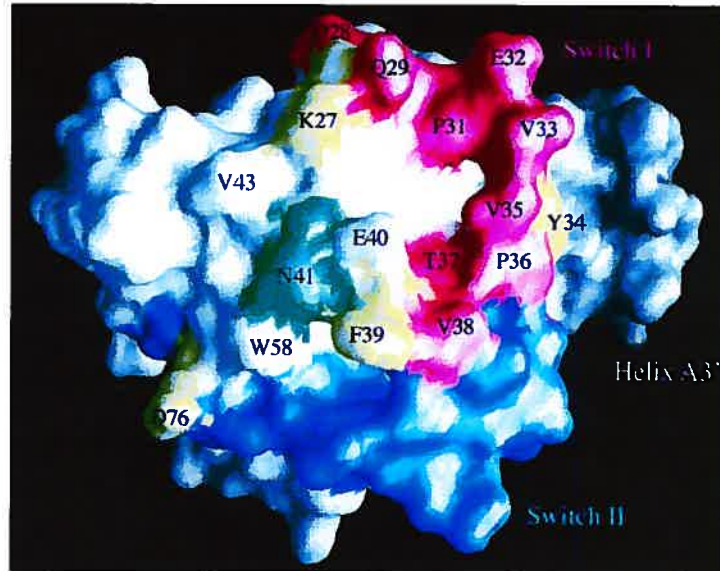


Figure 1.11. Structure de petites protéines G monomériques. A. Arbre phylogénique des protéines G de la superfamille Ras (Tiré de Takai *et al.*, 2001). B. Structure de la petite protéine G Rho lié au GppNHp. On remarque les Switch I et II qui sont responsables de l'interaction avec les différents effecteurs (tiré de Takai *et al.*, 2001).

Suite à la liaison au GTP, deux régions des petites GTPases subissent un changement de conformation. Ce changement se situe au niveau des boucles G2 et G3 qui sont aussi nommées Switch I et Switch II, respectivement. Switch I est aussi nommée boucle effectrice (*Effector loop*) puisqu'elle est responsable de l'interaction entre la protéine G et ses effecteurs. Switch II est formée par la boucle G3 et une portion de l'hélice A2 et constitue la partie la plus flexible du domaine catalytique (Spoerner *et al.*, 2001). Contrairement aux autres protéines G de la superfamille Ras, les protéines G de la famille Rho contiennent une hélice α supplémentaire en N-terminal.

1.3.1.2. Reconnaissance des nucléotides / spécificité des interactions

Toutes les protéines G sont associées à un ion de magnésium (Mg^{2+}). Ce dernier est essentiel à la liaison du GDP et du GTP. Cet ion interagit avec les atomes d'hydrogène du phosphate β et/ou γ du nucléotide. Cette interaction entre le Mg^{2+} et le groupement phosphate γ induit une rigidité des Switch I et II alors que l'hydrolyse de ce groupement déstabilise la région effectrice (John *et al.*, 1993). La coordination du Mg^{2+} est effectuée grâce à l'acide Aspartique (Asp, D) de la boucle G3 et une molécule d'eau. De plus, la boucle G1 est essentielle à la liaison au GDP/GTP puisqu'elle se lie au phosphate α et β grâce à des ponts hydrogènes. La boucle G2 aussi est importante pour l'association du GTP et du GDP puisqu'elle coordonne aussi le Mg^{2+} grâce à la thréonine et deux molécules d'eau. La boucle G5 semble importante pour l'affinité envers le GDP alors que la boucle G4 permet l'interaction avec la guanine (Wei *et al.*, 1997).

1.3.1.3. Hydrolyse du GTP

L'hydrolyse du GTP en GDP se fait principalement par la boucle G3 qui comporte une glutamine (Gln, Q). Cette glutamine sert de base afin d'activer une molécule d'eau qui servira à l'attaque nucléophile qui est requise pour l'hydrolyse du GTP. Normalement, l'hydrolyse du GTP en GDP requiert aussi une arginine (Arg, R). Cette Arg est présente dans les protéines G hétérotrimériques mais, elle est absente dans les petites GTPases. Ainsi, ces petites GTPases ne sont pas catalytiquement fonctionnelles et requièrent une

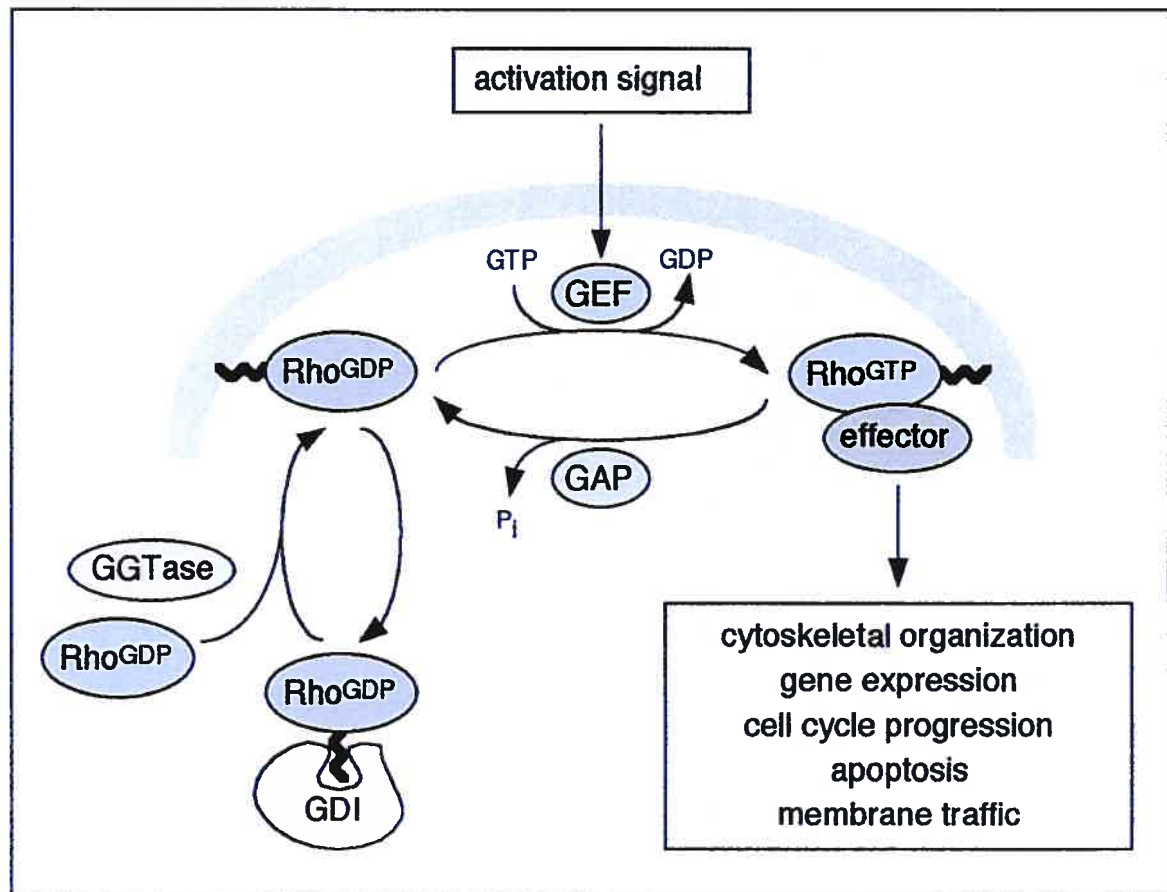


Figure 1.12. Cycle d'activation et d'inactivation des petites protéines G de la famille Rho. L'activation des protéines G se fait par l'échange du GDP pour le GTP au site de liaison des nucléotides. Cet échange est favorisé par un *Guanine Exchange Factor* (GEF) qui a pour fonction d'« ouvrir » le domaine catalytique afin de permettre la dissociation du GDP. Comme la concentration de GDP est de beaucoup inférieure à celle du GTP, ce dernier prend aussitôt la place dans la pochette de liaison au nucléotide. La forme liée au GTP est considérée comme active puisqu'elle peut maintenant s'associer à différents effecteurs (Tableau 1.5) et les activer. La protéine G active (liée au GTP) s'associe aussi à des *GTPase activating proteins* (GAPs) qui ont pour fonction de fournir l'arginine requise à l'activité catalytique de la GTPase. Les GTPases de la famille Rho peuvent aussi être maintenues loin de la membrane plasmique (loin de leurs effecteurs) à cause de leur liaisons à une *RhoGDI* (*GTPase Dissociation Inhibitor*). Cette protéine a pour fonction de « camoufler » le groupement lipidique (géranylgeranyl) situé en C-terminal de la protéine (tiré de Bishop and Hall, 2000).

autre protéine pour le devenir. Les protéines GAPs (GTPase Activating Proteins) fournissent cette Arg catalytique en s'associant aux petites protéines G actives (active/associée au GTP) (Resat *et al.*, 2001). Les acides aminés Lys16, Gly15 et Val14 de la boucle P sont responsables de la redistribution de la charge négative au phosphate β (Allin & Gerwert, 2001). Évidemment, une mutation de la Gln catalytique par une leucine (Leu) permet l'inactivation de l'activité GTPase et par conséquent rend la petite protéine G constitutivement active (ex : RhoAQ63L, Rac1Q61L et Cdc42Q61L).

1.3.1.4. Interaction avec les effecteurs

La liaison du GTP et du Mg^{2+} maintient les Switchs I et II dans leur conformation active. La glycine (Gly, G) de la Switch II est responsable du changement de conformation. La thréonine (Thr, T) de la Switch I est aussi essentielle à la liaison du GTP puisqu'elle est responsable de coordonner le Mg^{2+} et interagit aussi avec le phosphate γ du nucléotide. Ainsi une mutation de la Thr en asparagine (Asn, N) empêche l'association de la GTPase au GTP ce qui empêche le changement de conformation des Switch I et II et rend ces mutants dominants négatifs puisqu'ils restent associés à leurs GEFs (ex : Rac1T17N, RhoAT19N et Cdc42T17N) (Spoerner *et al.*, 2001).

1.3.2. Mécanismes de régulation

La régulation des petites protéines G de la famille Rho se fait principalement par le contrôle du cycle entre la forme liée au GTP et celle liée au GDP. Ce cycle est principalement contrôlé par trois familles de protéines. Ces protéines sont 1) des échangeurs de nucléotides qui sont nommés GEF (Guanine Nucleotide Exchange Factor) 2) un activateur de l'activité GTPase nommé GAP (GTPase Activating Proteins) (Bishop & Hall, 2000). Les GEFs ont pour fonction de favoriser la liaison du GTP aux petite

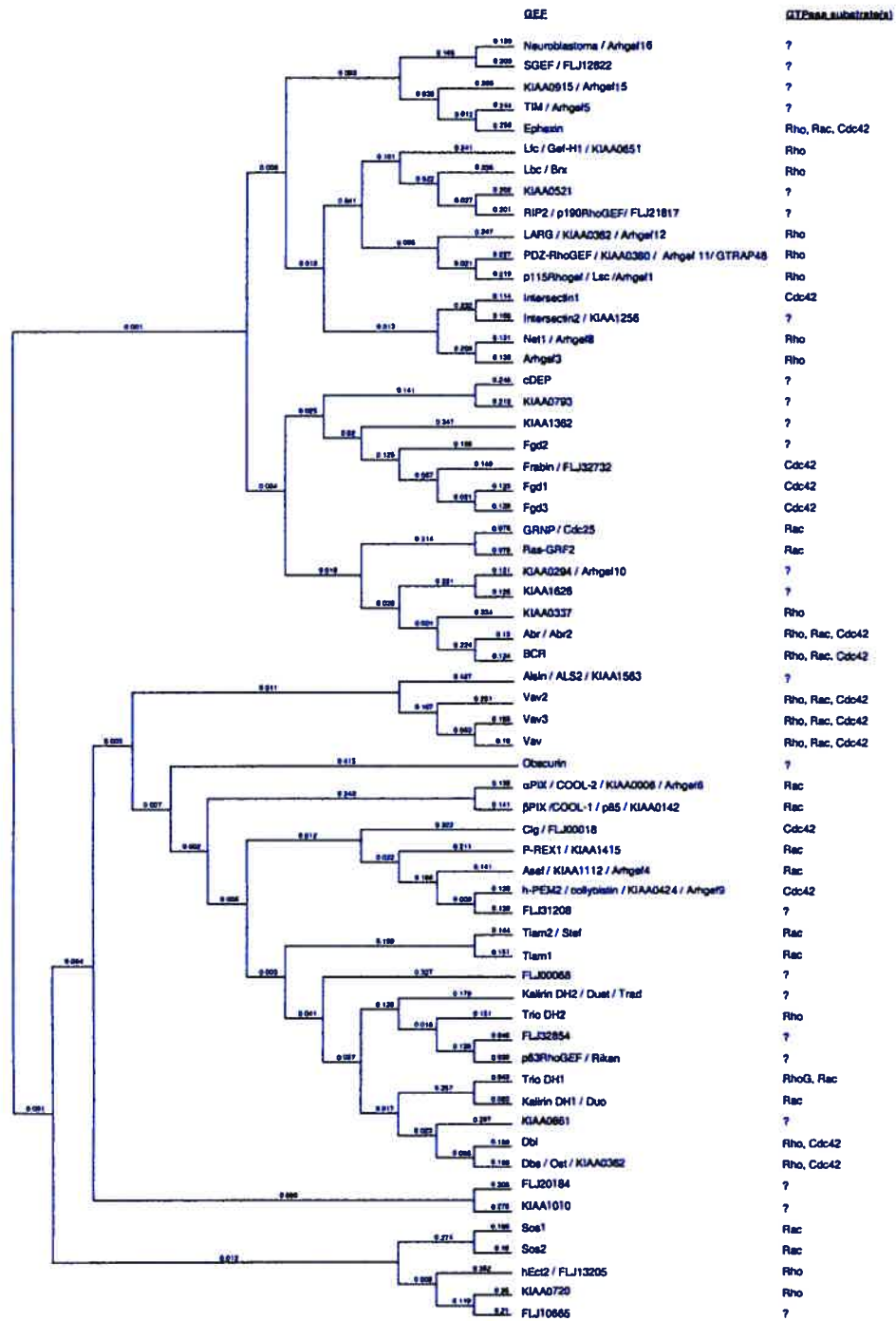


Figure 1.13. Arbre phylogénique des différentes GEFs connues à ce jour (Tiré de Schmidt and Hall, 2002).

GTPases alors que les GAPs ont pour fonction d'augmenter leur activité GTPases. Une autre famille de protéines influence l'activité des petites protéines G. Ce sont les GDIs (GTPase Dissociation Inhibitors) (figure 1.12).

1.3.2.1. Guanine-nucleotide Exchange Factors (GEF)

Le premier GEF de mammifère a été isolé en 1985 suite à des essais de transformation de cellules NIH3T3 à l'aide d'ADN provenant de lignées tumorales Diffuse B-cell lymphoma (Dbl). Cet ADN encode une protéine dont une région d'environ 180 acides aminés est similaire à celle retrouvée chez la protéine de levure CDC24. Cette dernière est un activateur de CDC42 (Eva & Aaronson, 1985; Bender & Pringle, 1989; Ron *et al.*, 1991). Par la suite, il fut démontré que Dbl catalyse l'échange du GDP pour du GTP (activité GEF) de Cdc42 (Hart *et al.*, 1994). Ce domaine est maintenant connu sous le nom de domaine DH (Dbl Homology domain) et est responsable de l'activité GEF (Hart *et al.*, 1994). Aujourd'hui, une multitude de GEFs ont été clonés. Chez *S. cerevisiae* on en compte environ 6, 18 chez *Ceanorhabditis elegans*, 23 chez *Drosophila melanogaster* et plus de 60 chez les mammifères (figure 1.13) (Schmidt & Hall, 2002). Le mécanisme moléculaire permettant l'échange du GDP en GTP est catalysé par le domaine DH des GEFs. Le GEF s'associe à la forme liée au GDP des GTPases et déstabilise le complexe GDP-GTPase en stabilisant la forme libre de nucléotide de la GTPase (Cherfils & Chardin, 1999). Ainsi, en raison du haut ratio GTP:GDP. Le GDP relâché est aussitôt remplacé par le GTP menant à l'activation des petites GTPases.

Tel que présenté à la figure 1.14, il existe une multitude de GEFs. Ces derniers sont plus ou moins spécifiques envers une GTPase ou une autre. Par exemple, Fgl1 et p115RhoGEF activent spécifiquement Cdc42 et Rho (Hart *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 1996), alors que d'autres GEFs peuvent en activer plusieurs: Vav1 active respectivement Rho, Rac et Cdc42 alors que Dbl active Rho et Cdc42 (Hart *et al.*, 1994; Olson *et al.*, 1996).

Les GEFs ne possèdent pas uniquement un domaine DH. La plupart d'entre eux possèdent plusieurs domaines d'interaction avec d'autres protéines ainsi qu'un domaine PH (Plekstrin Homology). Le domaine PH se lie au phosphatidylinositols phosphorylés ainsi qu'à

certaines protéines (Rebecchi & Scarlata, 1998; Lemmon & Ferguson, 2000). Il est proposé que le module PH-DH soit suffisant pour l'activité GEF. Alors que l'un possède l'activité GEF en soi, l'autre permet une localisation à la membrane. Parmi les domaines d'interaction protéine-protéine on retrouve les domaines SH2 (*Src homology domain 2*), SH3 (*Src homology domain 3*), sérine/thréonine ou bien tyrosine kinase, Ras-GEF, Rho-GAP, Ran-GEF, PDZ etc. (figure 1.14).

L'activation des GEFs semble se faire de plusieurs façons. Certains GEFs possèdent des séquences auto inhibitrices qui lorsqu'elles sont phosphorylées ou bien modifiées par d'autres modifications post-traductionnelles permettraient l'accession de la GTPase à ce GEF. D'autres GEFs possèdent aussi des séquences auto inhibitrices permettant l'association à certains phosphatidylinositol phosphorylés (PtdInsP) qui une fois associées à ces PtdInsPs, permettraient l'accession de la GTPase. Un autre mécanisme d'activation se fait par une interaction protéine-protéine qui ne requiert pas la relâche d'une région auto inhibitrice comme par exemple l'activation de p115RhoGEF par la protéine $G_{\alpha 12}$ (Schmidt & Hall, 2002) (Figure 1.15).

Beaucoup de travaux ont permis d'établir les mécanismes moléculaires menant à l'activation des GEFs. Cependant, la régulation négative de ces enzymes est moins bien comprise. Il a été proposé que le cheminement inverse à leur activation est le principal mécanisme de régulation négative. Par exemple, si l'activation du GEF se fait par phosphorylation, son inactivation serait due la déphosphorylation de ce dernier. Cependant, tout comme pour plusieurs autres protéines de signalisation, il paraît vraisemblable que d'autres mécanismes puissent être impliqués. Ceci est vrai pour Vav. Les protéines Cbl-b et hSiah2 sont capable d'inhiber Vav en interagissant avec l'extrémité C-terminale de cette dernière (Bustelo *et al.*, 1997; Germani *et al.*, 1999). De la même manière, l'interaction entre nm23HI avec Tiam-1 ainsi que HIV-1 gp41 avec p115RhoGEF inhibent leurs activités (Zhang *et al.*, 1999; Otsuki *et al.*, 2001).

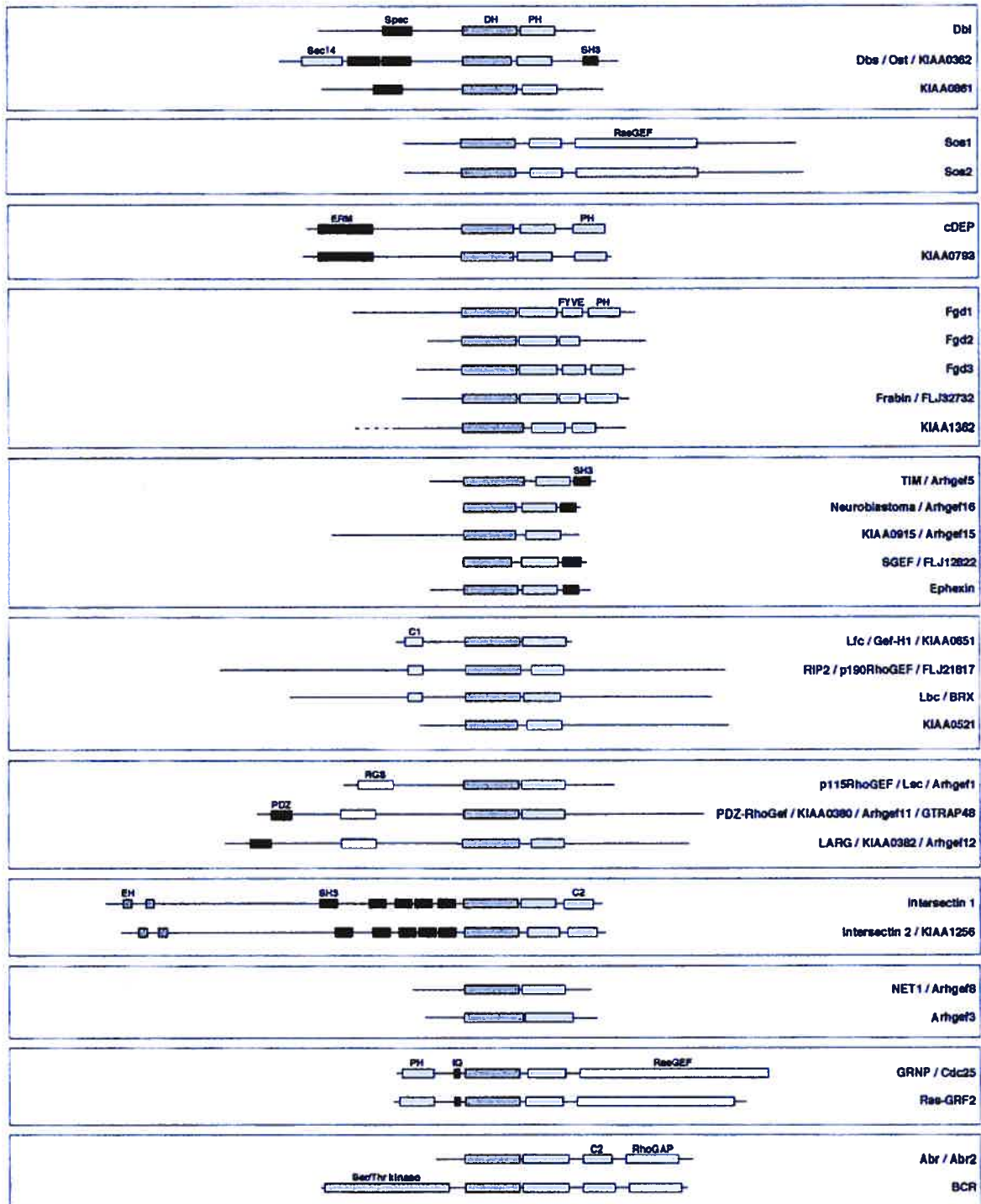


Figure 1.14. Noms, domaines et spécificités des GEFs. (Schmidt and Hall, 2002)

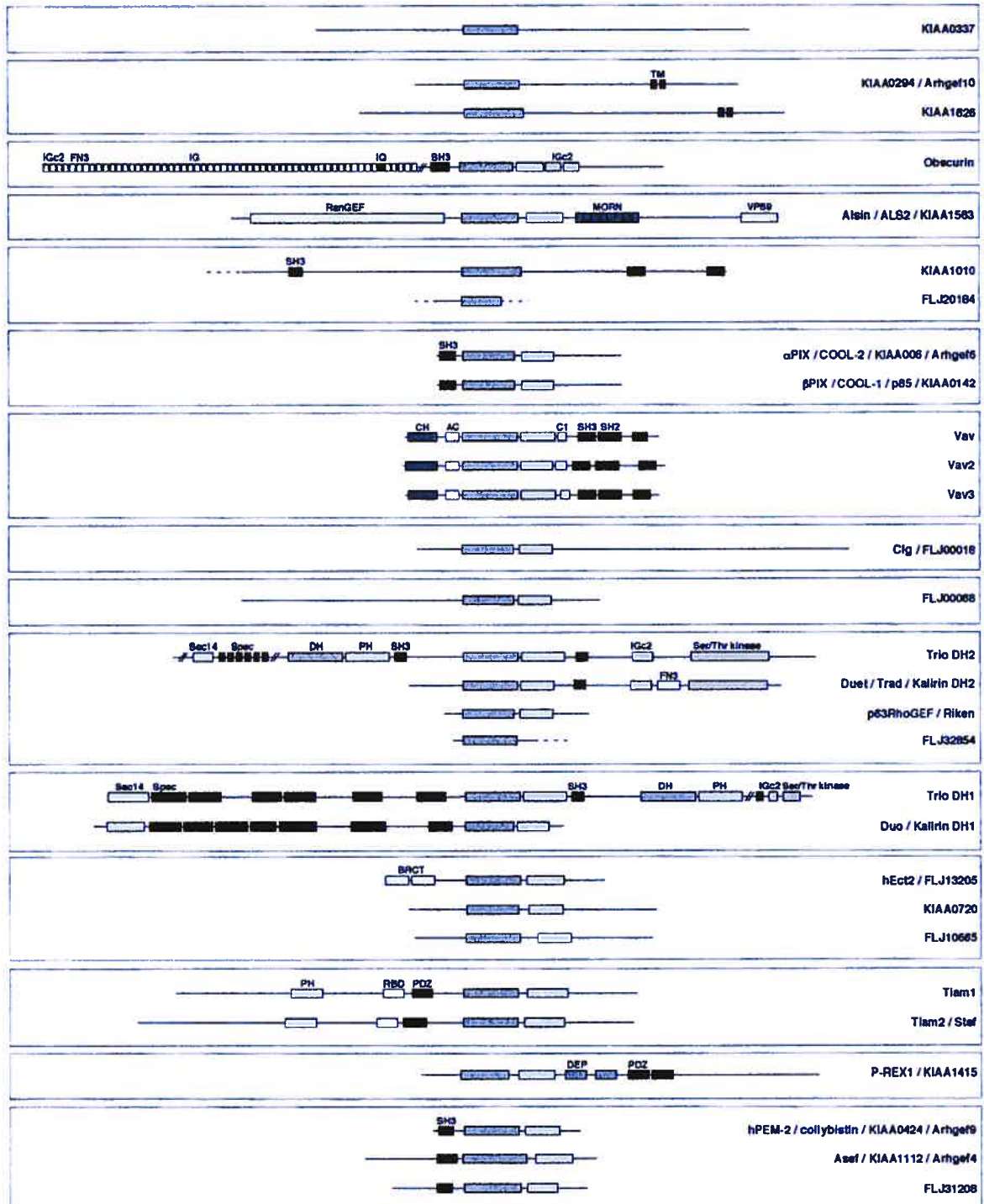


Figure 1.14. Noms, domaines et spécificités des GEFs (suite). (tiré de Schmidt and Hall, 2002).

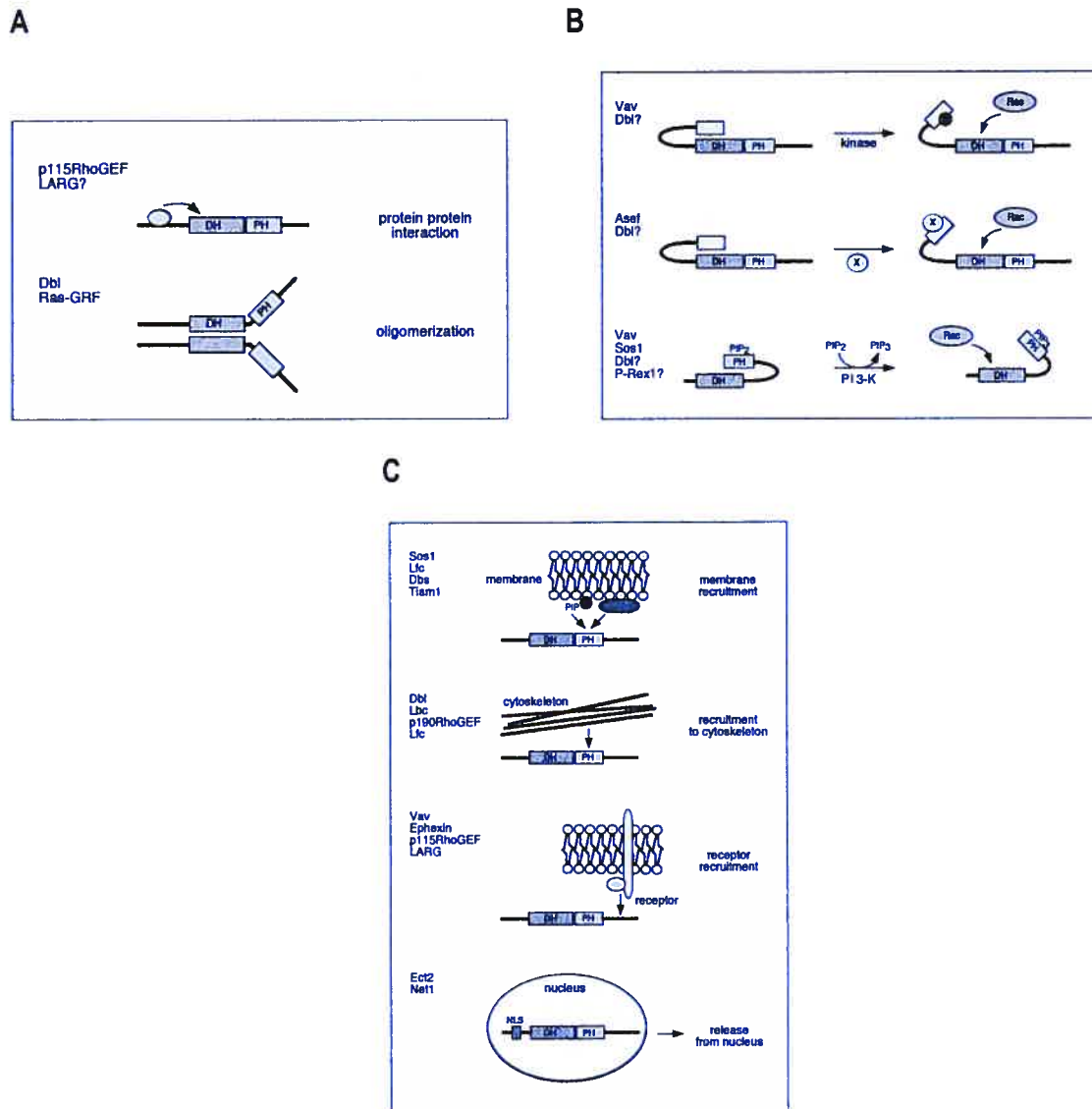


Figure 1.15. Mécanismes d'activation des GEFs. Il existe plusieurs mécanismes d'activation des GEFs. A. Certains GEFs sont activés par l'interaction (homodimérisation ou hétérodimérisation) avec une autre protéine ce qui favorise l'activation du GEF. B. Certains GEFs possèdent une région inhibitrice qui peut être retirée suite à sa phosphorylation, par l'interaction avec une autre protéine ou bien par l'interaction avec les produits de la PI3-kinase, le PtdInsP3. C. D'autres GEFs activent les différentes protéines G par leur interaction avec la membrane plasmique, le cytosquelette, certains récepteurs membranaires ainsi que leur compartimentalisation dans certaines structures cellulaires comme par exemple le noyau de la cellule (tiré de Schmidt and Hall, 2002).

1.3.2.2. GTPase Activating Proteins (GAP)

Alors que près de 70 GEFs ont été identifiés chez les mammifères, il semble y avoir beaucoup moins de GAPs. Les GAPs sont essentielles à l'activité GTPases des petites protéines G de la superfamille Ras. Tel que vu précédemment, les petites GTPases ne possèdent pas l'Arg essentielle à l'activité catalytique. Ainsi, les GAPs viennent fournir cette Arg ce qui accélère l'activité catalytique des petites protéines G (Scheffzek *et al.*, 1996; Kjeldgaard *et al.*, 1996; Rittinger *et al.*, 1997).

1.3.2.3. GTPase dissociation inhibitors (GDI)

Certaines petites protéines G s'associent aussi à des protéines nommées *GTPase dissociation inhibitors* (GDIs) (Geyer & Wittinghofer, 1997). Il existe deux GDIs : RabGDI et RhoGDI. Il n'existe que peu ou pas de similarité entre ces deux protéines mais, elles jouent le même rôle. RabGDI a pour fonction de contrôler l'association de Rab à la membrane plasmique, RhoGDI contrôle celle des petites protéines G de la famille Rho. Les RhoGDIs et RabGDIs titrent les petites protéines G de la membrane plasmique en masquant leur modifications lipidiques (Gosser *et al.*, 1997; Scheffzek *et al.*, 2000).

1.3.2.4. Régulation par des toxines bactériennes

En plus des mutations constitutivement actives et dominantes négatives don't il a été question ci-haut, les petites protéines G de la famille Rho peuvent être modifiées par des toxines bactériennes menant ainsi à leur inhibition ou leur activation. L'activité biologique de Rho (RhoA, B ou C) peut être inhibée par l'activité de la C3-exoenzyme. Cette dernière ADP-ribosyle Rho à la position 41 (Asn), sans influencer Rac ou Cdc42. Les toxines clostridiales (*Clostridium difficile* toxin A et B) glucosylent les Thr 37 (Rho) ou Thr35 (Rac et Cc42) ce qui encore une fois conduit à l'inhibition de ces petites protéines en empêchant leur couplage aux différents effecteurs. Les toxines ExoS, YopE et SptP de *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia* et *Salmonella ssp* inhibent les fonctions de Rho en agissant comme Rho GAP. De plus, les petites protéines G de la famille Rho peuvent être activées par le CNF (*cytotoxic necrotizing factors* CNF1 et CNF2) de *Escherichia coli* et

par le DNT (*dermonecrotizing toxin*) de *Botulinium bronchiseptica*. Ces toxines désaminent et transglutaminent la Gln63 de Rho et inhibent l'activité GTPase de l'enzyme. SopE, une autre toxine bactérienne, agit aussi comme un GEF et les active. Les toxines LT82 et LT9048 glucosylent et inhibent l'action des petites protéines G Rac, Ras, Ral et Ral (LT82) et Rac, Cdc42, Ras et faiblement Rap (LT9048) (Richard et al., 1999; Aktories et al., 2000).

Tableau 1.5. Effecteurs des petites protéines G de la famille Rho (Adapté de Bishop and Hall, 2000).

Effecteurs potentiels	Types de protéine	Fonction(s)	Sélectivité pour une GTPase de la famille rho		Motifs de liaison aux GTPases
ROCK-I, ROCK-II	STK	Actine/myosine	Rho		RKH
PKN/PRK1, PRK2	STK	?	Rho		REM
Citron kinase	STK	Cytokinèse	Rho		
p70 ^{S6k}	STK	Régulation de la transcription		Rac	Cdc42
Mlk2, 3	STK	Active JNK		Rac	Cdc42
MEKK1, MEKK4	STK	Active JNK		Rac	Cdc42
PAK1, 2, 3	STK	JNK/actine		Rac	Cdc42
PAK4	STK	Actine			Cdc42
MRCK α , β	STK	Actine			Cdc42
Ack1, 2	PTK	?			Cdc42
MBS	Sous-unité de phosphatase de la myosine	Inactivation de la MLC	Rho		
PI-4-P5K	Kinase à lipides	Génération de PIP2	Rho	Rac	
PI3K	Kinase à lipides	Génération de PIP3		Rac	Cdc42
DAG kinase	Kinase à lipides	Génération de acide phosphatidique (PA)	Rho	Rac	
PLD	Lipase	Génération de acide phosphatidique (PA)	Rho	Rac	Cdc42
PLC- β 2	Lipase	Génération de GAG/IP3		Rac	Cdc42
Rhopilin	échafaudage	?	Rho		REM
Rhotekin	échafaudage	?	Rho		REM
Kinectin	échafaudage	Liaison à la kinésine	Rho		RKH
Dia1, Dia2	échafaudage	Organisation de l'actine	Rho		
WASP, N-WASP	échafaudage	Organisation de l'actine			Cdc42
WAVE, Scar	échafaudage	Organisation de l'actine		Rac	
POSH	échafaudage	?		Rac	
POR-1	échafaudage	Organisation de l'actine		Rac	
P140Sra-1	échafaudage	Organisation de l'actine		Rac	
P67 ^{phox}	échafaudage	Production de ROS, composante de la NADPH oxydase		Rac	
MSE55, BORGs	échafaudage	?			Cdc42
IQGAP1, 2	échafaudage	Organisation de l'actine et contact cellule-cellule.		Rac	
CIP-4	échafaudage	?			Cdc42

1.3.3. Effecteurs des protéines G de la famille Rho.

Les petites protéines G de la famille Rho participent à une très grande variété de processus cellulaires comme la morphogénèse (polarité cellulaire, morphologie), le mouvement

(chimiotactisme, invasion) ainsi que le comportement cellulaire (contraction, phagocytose, prolifération) (Bishop & Hall, 2000; Etienne-Manneville & Hall, 2002) (Figure 1.16). Toutes ces réponses sont relayées par une impressionnante quantité de protéines effectrices de toutes sortes (Tableau 1.5). Parmi ces effecteurs, on retrouve des protéines sérine/thréonine kinases (STKs), des protéine tyrosine kinases (PTKs), des kinases à lipides, des lipases, des complexes enzymatiques (ex : NADPH oxydase (Figure 1.17)) et plusieurs protéines d'échafaudage. La plupart de ces effecteurs ont été identifiés par criblage en double hybride ou par chromatographie d'affinité. De plus, ces différentes protéines interagissent préférentiellement avec la forme active des GTPases (liées au GTP) (Bishop & Hall, 2000) (Tableau 1.5).

1.3.3.1. ROK α et ROK β , PRKs, et citron kinase.

Les protéines sérine/thréonine kinases ROK α et ROK β (ROCKII et ROCKI, respectivement, aussi connues sous le nom de Rho-kinases) sont activées suite à la liaison de la forme active de Rho (Rho-GTP) à un domaine RKH (*ROK-Kinectin homology*) aussi connu sous le nom de *Class 2 Rho Binding domain* de ces kinases. L'étude des fonctions de ces kinases a été grandement aidée par le développement d'un inhibiteur de l'activité kinase de ces protéines, le Y-27632 (Uehata *et al.*, 1997). Les ROCKs jouent un rôle important dans l'organisation et la polymérisation de la F-actine en fibres de stress ainsi que dans l'assemblage des points d'adhésion focaux. L'expression de mutants constitutivement actifs de ROK α stimule la formation de filaments d'actomyosine (Leung *et al.*, 1996; Ishizaki *et al.*, 1997), alors que l'inhibition de cette kinase par le Y-27632 conduit à la perte de fibres de stress dans les HeLa et les NIH3T3 (Uehata *et al.*, 1997). Plusieurs substrats de la ROK ont été identifiés et semblent jouer un rôle dans la polymérisation de l'actine et la formation de filaments d'actomyosine. Parmi ceux-ci, on retrouve la MLC (*Myosin Light Chain*) et la MBS (*Myosin-Binding Subunit of MLC phosphatase*). Ainsi, la phosphorylation de la MLC par la Rho kinase est doublement efficace. D'abord, ROCK phosphoryle directement la chaîne légère de la myosine ce qui favorise la polymérisation de fibre d'actomyosine. Ensuite, ROCK inhibe, par la phosphorylation de la MBS, l'activité phosphatase de cette dernière. Elle est responsable de la déphosphorylation de l'actine et d'empêcher sa

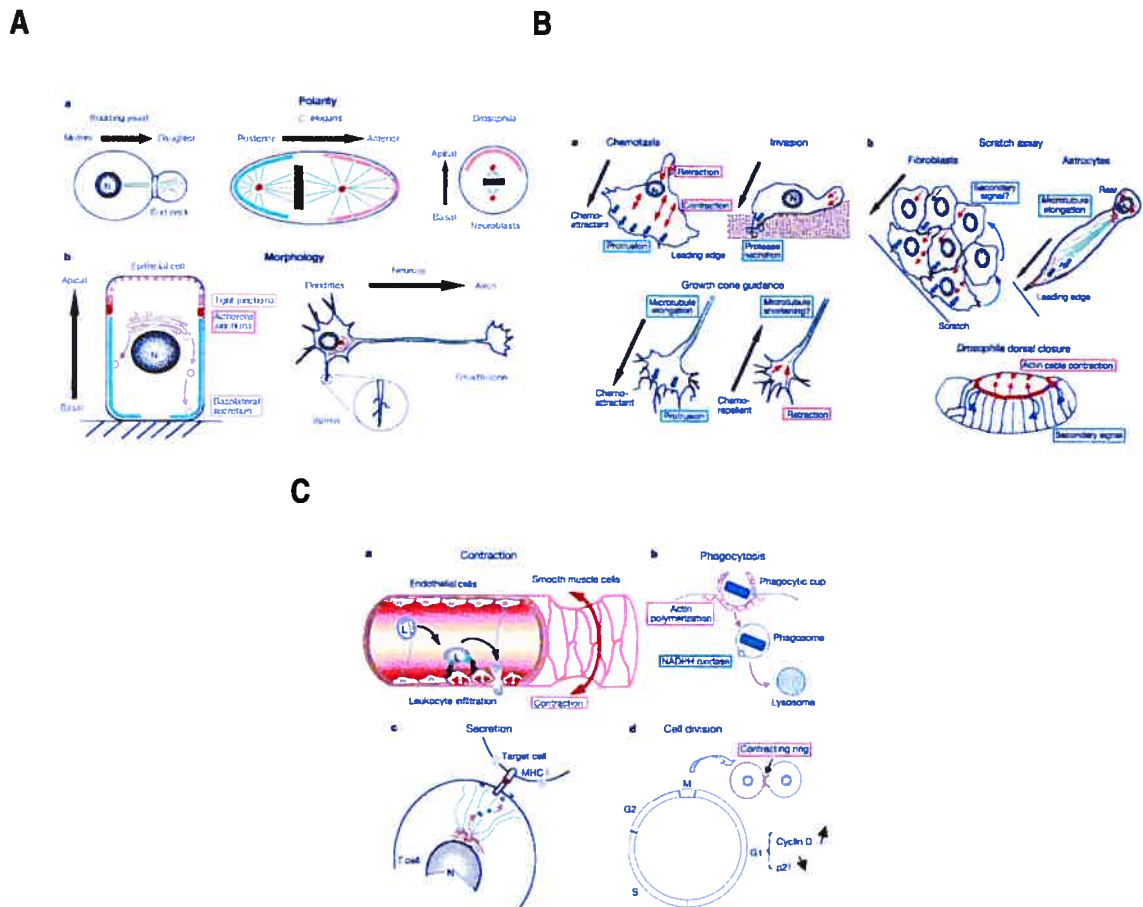


Figure 1.16. Rôles des petites protéines G de la famille Rho. Les petites protéines G de la famille Rho sont impliquées dans divers processus cellulaires. A. Les petites protéines G de la famille Rho sont impliquées dans la polarité cellulaire ainsi que le maintien de la morphologie. B. Elles sont aussi impliquées dans les processus de chimiotactisme, d'invasion cellulaire et de la guidance axonale. C. Elles sont aussi requises pour le *rolling* des leucocytes, la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires, la contraction des cellules endothéliales, la phagocytose, la dégradation (oxydation) dans les phagosomes, l'entrée en phase S et la formation du sillon de division en fin de mitose (Tiré de Etienne-Manneville and hall, 2002).

polymérisation. La phosphorylation de la MLC est responsable de la formation de fibres de stress (fibres d'actomyosine) (Kimura *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1999; Maekawa *et al.*, 1999). (Figure 1.18)

ROK active aussi par phosphorylation la LIM kinase, une enzyme responsable de phosphoryler la cofiline et de l'inactiver. Cette inactivation mène à la stabilisation des filaments d'actine (Maekawa *et al.*, 1999). La Rho kinase active aussi l'échangeur

sodium/proton NHE1 (*Na⁺/H⁺ Exchange protein*) qui contribue aussi à la formation des fibres de stress (Vexler *et al.*, 1996; Tominaga *et al.*, 1998; Tominaga & Barber, 1998). La Rho-kinase influence l'activité d'autres protéines comme les membres de la famille ERM (*Ezrin-Radixin-Meosin*) et adducine, qui sont responsables de lier l'actine avec la membrane plasmique (ERM) et de s'associer à la F-actine afin de la stabiliser (adducine) (Matsui *et al.*, 1998; Fukata *et al.*, 1999).

D'autres STKs sont activées par leur liaison à Rho. On retrouve les membres de la famille PRKs et la kinase citron. Rho interagit avec les sérine/thréonine kinases PRK1 et PRK2. Ces deux kinases jouent un rôle dans la polymérisation de l'actine (Amano *et al.*, 1996; Vincent & Settleman, 1997). Cependant le mécanisme d'action des PRKs est moins bien caractérisé. La kinase citron est activée suite à son interaction avec la forme active de Rho. Cependant, cette kinase ne semble pas jouer un rôle dans la polymérisation de l'actine mais plutôt dans la formation du sillon de division en fin de télophase (Eda *et al.*, 2001).

1.3.3.2. La p70^{s6k}

En plus d'activer ces sérine/thréonine kinases, les petites protéines G de la famille Rho (principalement Rac et possiblement Cdc42) activent la p70^{s6k}. En fait il est proposé que l'interaction entre Rac et p70^{s6k} est suffisante afin d'activer cette dernière (Chou & Blenis, 1996). La p70^{s6k} est impliquée dans l'initiation de la traduction en phosphorylant la sous-unités ribosomale 6S, ce qui se traduit par une activité traductionnelle accrue.

1.3.3.3. PAKs 1, 2, 3 et 4.

Les petites protéines G Rac et Cdc42 activent plusieurs effecteurs communs. Parmi ceux-ci, on retrouve les *p21-Activated Protéine Kinases* (PAKs 1, 2 et 3). Les PAKs sont des STKs semblables à Ste20 (Stérile 20) de *S. cerevisiae* (Abo *et al.*, 1998; Bagrodia & Cerione, 1999). Le rôle des PAKs dans l'organisation de l'actine est, jusqu'à présent, encore nébuleux. Alors que certains groupes de recherche ont proposé que PAK (dans le sens de : les PAKs en général) est impliquée dans la formation de lamellipodes et de filopodes (Sells *et al.*, 1997; Daniels *et al.*, 1998), d'autres ont infirmé ces résultats (Lamarche *et al.*, 1996;

Van Aelst *et al.*, 1996; Joneson *et al.*, 1996). Cependant, une chose semble certaine, PAK est impliquée dans l'organisation de l'actine en association avec d'autres protéines. Rac, comme Rho, peut activer la LIM kinase. De plus, *in vitro*, PAK phosphoryle la LIM kinase ce qui suggère que PAK puisse aussi réguler cette kinase (Arber *et al.*, 1998). Cependant, la démonstration *in vivo* se fait toujours attendre. PAK phosphoryle la MLC kinase ce qui l'inactive et diminue ainsi la phosphorylation de la MLC et, par conséquent, la formation d'actomyosine (Sanders *et al.*, 1999).

1.3.3.4. MEKKs 1 et 4

L'activation de Rac et Cdc42 conduit aussi à l'activation des voies JNK (*Jun N-terminal kinase*) et p38 MAP kinase (SAP kinase, *Stress Activated Protein Kinase*) (Coso *et al.*, 1995; Minden *et al.*, 1995; Bagrodia & Cerione, 1999). En fait, l'activation de ces protéines kinases par certains facteurs de croissance est inhibée par la présence de mutants dominant-négatifs des protéines G Rac et Cdc42 (Coso *et al.*, 1995; Atfi *et al.*, 1997). Il est aussi proposé que PAK joue un rôle dans cette activation puisque la co-expression de PAK avec Rac ou Cdc42 conduit à une plus forte stimulation de p38 et/ou JNK (Zhang *et al.*, 1995b; Brown *et al.*, 1996). Encore une fois, il semble que ce phénomène ne soit pas suffisant en soi puisque certains groupes de recherche n'ont pu démontrer l'activation de p38 ou JNK en réponse à la co-expression de Rac/Cdc42 et PAK (Wei *et al.*, 1997; Westwick *et al.*, 1997; Tapon *et al.*, 1998).

Rac et Cdc42 peuvent s'associer à Mlk1, 2 et 3 qui contiennent un domaine CRIB (*Cdc42/Rac Interactive Binding*) et ainsi les activer. Mlks 1, 2 et 3 sont des MAP kinase kinases (MAPKKKs ou bien MEKKs) suggérant ainsi que Rac et Cdc42 peuvent conduire à l'activation de voies MAP kinases (Teramoto *et al.*, 1996a; Teramoto *et al.*, 1996b; Sahai *et al.*, 1998; Nagata *et al.*, 1998; Abdul-Manan *et al.*, 1999). De plus, Rac et Cdc42 lient et activent MEKK1 et MEKK4, qui sont deux puissants activateurs de JNK (Fanger *et al.*, 1997).

1.3.3.5. Phosphatidyl inositol kinases et autres lipide kinases

Plusieurs des effets de Rho sur le cytosquelette d'actine nécessitent la production de PtdInsP2 (Shibasaki *et al.*, 1997). Aussi, il a été rapporté que Rho s'associe à la PI-4-P5 kinase qui est l'enzyme responsable de générer le PtdInsP2 (Ren *et al.*, 1996; Desrivieres *et al.*, 1998). En plus de mener à la polymérisation de l'actine en favorisant son décapsulage (*uncapping*) (Hartwig *et al.*, 1995; Tolia *et al.*, 2000), il apparaît que le PtdInsP2 joue un rôle important dans l'assemblage des points d'adhésion focaux ainsi que dans la phosphorylation de protéines de la famille ERM (Ezrin/Radixin/Meosin). Rac interagit également avec la PI-4-P5 kinase. Ces deux GTPases interagissent avec cette enzyme indépendamment de leur liaison au GTP (Tolia *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 1996).

Les petites protéines G de la famille Rho interagissent aussi avec une autre lipide kinase : La Phosphatidyl Inositol-3 kinase (PI-3 kinase) . Cette enzyme responsable de générer le PtdInsP3. En plus de son activité lipide kinase, cette enzyme possède une activité STK (Carpenter *et al.*, 1993; Dhand *et al.*, 1994). Cette enzyme est impliquée dans la transmission de signaux menant à l'activation d'Akt ainsi qu'à plusieurs autres kinases impliquées dans la régulation de la croissance cellulaire (Krasilnikov, 2000; Sato *et al.*, 2001; Abraham, 2002). En réponse aux facteurs de croissance, Rac et Cdc42 s'associent à cette kinase et ceci pourrait, selon certains, mener à son activation (Zheng *et al.*, 1994; Tolia *et al.*, 1995; Bokoch *et al.*, 1996).

1.3.3.6. NADPH oxydase

Rac s'associe de façon spécifique à l'une des composantes du complexe NADPH oxydase phagocytaire, la p67^{phox} (Abo *et al.*, 1991; Knaus *et al.*, 1991; Chanock *et al.*, 1994). Le complexe NADPH oxydase est composé de plusieurs sous-unités qui ont la tâche de générer des radicaux libres oxygénés (ROS). Ces derniers jouent un rôle important dans l'action des cellules phagocytaires qui produisent ces dérivés oxygénés afin de tuer les microorganismes qui ont été engloutis. En plus de leur implication dans la phagocytose, les ROS jouent un rôle prépondérant dans la promotion de la croissance cellulaire en réponse aux facteurs de croissance (Sundaresan *et al.*, 1996) et à une

forme active de Ras (Joseph *et al.*, 1994; Irani, 2000). L'interaction entre Rac et le complexe enzymatique NADPH oxydase permet le transfert d'électrons nécessaires à la génération de radicaux libres oxygénés (Joneson & Bar-Sagi, 1997; Babior, 1999).

La NADPH oxydase des cellules phagocytaires est composée de plusieurs sous-unités: gp91^{phox} (*Phagocytic oxidase*), p22^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox} p40^{phox} et finalement Rac (Bokoch & Diebold, 2002). gp91^{phox} et p22^{phox} sont des protéines membranaires et forment le complexe connu sous le nom de cytochrome b₅₅₈. Les autres sous-unités du complexe enzymatique sont cytosoliques. En fait, toutes ces sous-unités à l'exception de p22^{phox}, ne sont pas étroitement associées à gp91^{phox}. Les sous-unités p40^{phox}, p47^{phox} et p67^{phox} sont associées les unes aux autres. Ce n'est qu'en réponse à des chemoattractants, à des chemokines et à des facteurs pro inflammatoires que le complexe est formé. La p40^{phox} se dissocie des sous-unités p67^{phox} et p47^{phox} alors que ceux-ci se lient au cytochrome b₅₅₈. En plus de l'association entre les différentes sous-unités, la p47^{phox} devient hautement phosphorylée. Cette phosphorylation est responsable des changements de conformations qui résultent en la translocation du complexe p47^{phox}/p67^{phox} au cytochrome b₅₅₈ (Bokoch, 1994; Diebold & Bokoch, 2001). Le complexe actif requiert aussi l'association de Rac qui se fait simultanément mais indépendamment de l'association du complexe p47^{phox}/p67^{phox} (Heyworth *et al.*, 1994; Dorseuil *et al.*, 1995). La formation de ce complexe conduit à un transfert séquentiel d'un électron du NADPH au FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) puis du FAD à l'hème du cytochrome b₅₅₈ où ils seront transféré à l'oxygène. Il est à noter que Rac est responsable de l'initiation de cette réaction (Bokoch & Diebold, 2002) (Figure 1.17). La plupart des travaux qui ont mené à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de la génération des ROS ont eu comme modèle la NADPH oxydase des cellules phagocytaires. Toutefois, un système similaire a été identifié dans les VSMCs et autres cellules originant du mésoderme. En fait, NOX-1 est une protéine très similaire à la sous-unité gp91^{phox} (Suh *et al.*, 1999; Lambeth *et al.*, 2000). Toutes les autres composantes du complexe ont été identifiées dans les VSMCs, à l'exception de la p67^{phox}. Cependant, très récemment, des homologues de la p67^{phox} et de la p47^{phox} ont été clonés à partir de cellules épithéliales (Banfi *et al.*, 2003).

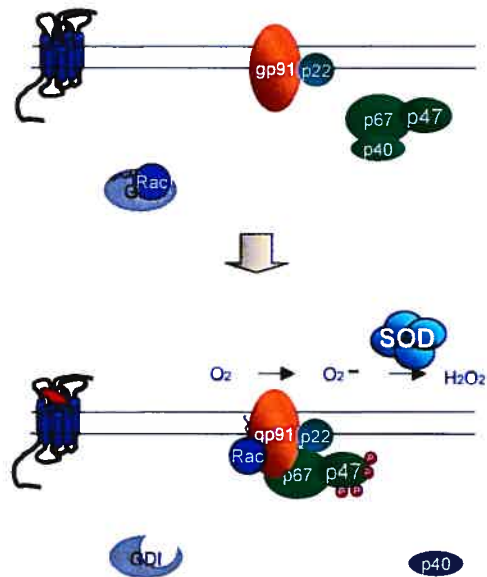


Figure 1.17. Structure du complexe NADPH oxydase. La NADPH oxydase des cellules phagocytaires est composée de plusieurs sous-unités: gp91^{phox}, p22^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox} p40^{phox} et finalement Rac. Le complexe est formé en réponse à divers agonistes de récepteurs membranaires. La p40^{phox} se dissocie des sous-unités p67^{phox} et p47^{phox} simultanément à leurs associations au cytochrome b₅₅₈. En plus de l'association entre les différentes sous-unités, la p47^{phox} est hautement phosphorylée suite à l'activation des leucocytes. Le complexe actif requiert aussi l'association de Rac qui se fait simultanément mais, indépendamment à l'association du complexe p47^{phox}/67^{phox}. La formation de ce complexe conduit à un transfert d'électrons du NADPH au FAD et finalement du FAD à l'hème du cytochrome b₅₅₈ et finalement transféré à l'oxygène. Dans les VSMCs, la production de superoxyde (O₂⁻) est rapidement transformé en H₂O₂ par les différentes Superoxyde Dismutases (SOD) (Adapté de Bokoch and Diebold, 2002).

1.3.3.7. Protéines d'échafaudage.

Les petites protéines G de la famille Rho interagissent aussi avec une multitude de protéines d'échafaudage comme mDia, WASP, WAVE, POR-1, etc. (Tableau 1.5).

mDia est une protéine d'échafaudage impliquée dans la formation de fibres de stress (Watanabe *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1999; Nakano *et al.*, 1999). Elle est requise afin de coordonner l'action de la Rho-kinase qui n'est pas en soi capable d'induire la formation de fibres de stress organisées. Dia (ou mDia) s'associe à la profiline (une *G-actin binding protein*) ce qui favoriserait la formation de la F-actine (Watanabe *et al.*, 1999).

Rac possède très peu d'effecteurs uniques. En fait la majorité des effecteurs activés par Rac le sont aussi par Cdc42. Cependant, POR-1 (*Partner Of Rac-1*) et p140Sra-1 (*Specific Rac-1 associated protein*) s'associent spécifiquement à Rac et jouent un rôle dans la réorganisation de la F-actine ainsi que dans la formation de lamellipodes (Van Aelst *et al.*, 1996; D'Souza-Schorey *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 1998).

WASP (*Wiskott-Aldrich Syndrom Protein*) est principalement exprimée dans les cellules hématopoïétiques et est le produit du gène de l'immunodéficiência associée au syndrome Wiskott-Aldrich (Derry *et al.*, 1994; Etienne-Manneville & Hall, 2002). Sa forme ubiquitaire est N-WASP (*Neurally enriched WASP*) et cette dernière s'associe aussi à Cdc42 (Miki *et al.*, 1996; Aspenstrom *et al.*, 1996; Kolluri *et al.*, 1996). Ces protéines contiennent un domaine PH (*Plekstrin homology*), suivi d'un WH1 (*WASP homology domain-1*), d'un domaine SH3 (*Src homology-3-binding proline rich sequence*), d'un domaine WH2 (*verprolin-like domain*) et finalement une région C-terminale acide permettant l'association à Arp2/3. L'expression de WASP ou de Cdc42 conduit à la formation de filopodes. Via leur domaine verproline, WASP et N-WASP s'associent aux monomères d'actine (G-actine) afin de promouvoir leur polymérisation (Suetsugu *et al.*, 1998; Machesky *et al.*, 1999; Suetsugu *et al.*, 1999).

WAVE est une protéine semblable à WASP et s'associe principalement à Rac. Elle joue un rôle dans le repli des membranes plasmiques (*membrane ruffling*) (Miki *et al.*, 1998). WAVE, tout comme WASP et N-WASP, s'associe au complexe Arp2/3 via son extrémité C-terminale.

Enfin, plusieurs autres protéines d'échafaudage se liant aux petites protéines G de la famille Rho et ayant un rôle à jouer dans l'organisation et la polymérisation de l'actine ont été recensées. On y retrouve la Rho-philine, la Rhotekine, la Kinectine, POSH, MSE55, BORGs, IQGAP1, 2 et CIP-4 (Watanabe *et al.*, 1996; Reid *et al.*, 1996; Hotta *et al.*, 1996; Joyal *et al.*, 1997; Fukata *et al.*, 1997; Aspenstrom, 1997; Tapon *et al.*, 1998; Kaibuchi *et al.*, 1999; Burbelo *et al.*, 1999; Joberty *et al.*, 1999; Rohatgi *et al.*, 1999).

1.3.4. Fonctions

Comme ces petites protéines G monomériques activent une grande variété d'effecteurs, il est attendu qu'elles jouent un rôle important dans une panoplie de fonctions cellulaires. Les GTPases de la famille Rho sont impliquées dans la réorganisation du cytosquelette ainsi que dans l'activation de plusieurs fonctions biochimiques.

1.3.4.2. Organisation du cytosquelette d'actine.

L'une des fonctions majeures des petites protéines G de la famille Rho est le contrôle de l'organisation du cytosquelette d'actine. Dans les cellules Swiss 3T3, l'activation de Rho par le LPA ou la bombésine conduit à la formation de fibres de stress et la formation de complexes d'adhésion focaux. De son côté, Rac est impliquée dans la polymérisation de l'actine sur le contour des cellules conduisant à la formation de lamellipodes et d'ondulations de la membranes (*membrane ruffling*) (Ridley *et al.*, 1992; Ridley & Hall, 1992). Finalement, l'activation de Cdc42 par la bradykinine conduit à la formation de *protrusions* nommées filopodes (Nobes & Hall, 1995; Kozma *et al.*, 1995). Ces données ont été confirmées par l'expression ectopique de mutants constitutivement actifs de ces différentes protéines G monomériques. En fait, la surexpression de formes actives de Rho mène à la formation de fibres de stress, celle de Rac, à la formation de lamellipodes et d'ondulations de la membrane, alors que celle de Cdc42 conduit à la formation de filopodes (Ridley *et al.*, 1992; Ridley & Hall, 1992; Nobes & Hall, 1995; Kozma *et al.*, 1995).

Une autre caractéristique importante de ces petites protéines G monomériques est leur capacité à s'interpeller l'une et l'autre (*Crosstalk*). En fait, basé sur l'organisation de filaments d'actine en réponse à l'expression de ces diverses protéines G, il a été proposé que Cdc42 puisse mener à l'activation de Rac et que cette dernière a la capacité d'activer Rho (Nobes & Hall, 1995; Kozma *et al.*, 1995). Cependant, des données récentes montrent que ces différentes GTPases possèdent des effecteurs communs (et/ou redondants) qui, eux aussi, peuvent contribuer à la formation de certaines structures dogmatiquement restreintes à l'action d'une autre protéine G (Lamarche *et al.*, 1996; Vincent & Settleman, 1997).

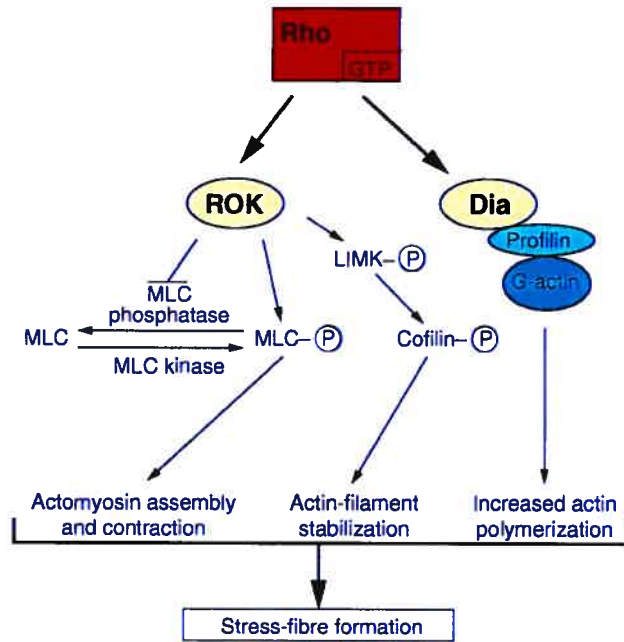


Figure 1.18. Signalisation menant à la formation de fibres de stress par Rho. (tiré de Bishop and Hall, 2000).

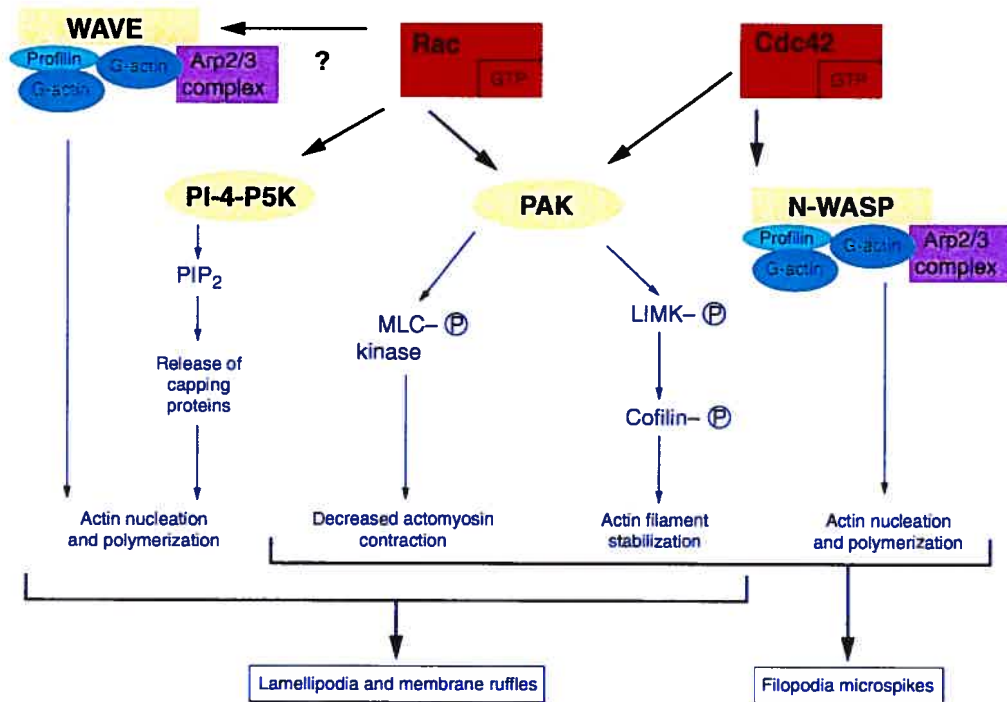


Figure 1.19. Signalisation menant à la formation de lamellipodes, filopodes et ondulation de la membrane. (tiré de Bishp and hall, 2000).

L'activation de Rho mène principalement à la formation de fibres de stress. La formation de ces fibres de stress par Rho est relayée par l'activation de la Rho-kinase qui conduit à l'activation de la LIM kinase et la phosphorylation de la cofiline. Ceci conduit à la stabilisation des filaments d'actine. L'activation de la Rho-kinase conduit aussi à l'inhibition de la MLC phosphatase, ce qui favorise la phosphorylation de la MLC. La phosphorylation de la MLC conduit à la formation de fibres de stress. De plus, Rho s'associe à mDia, une protéine d'échafaudage, qui s'associe à la profiline et qui recrute la G-actine et favorise la polymérisation de l'actine (figure 1.18) (Kimura *et al.*, 1996; Leung *et al.*, 1996; Ishizaki *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1999; Maekawa *et al.*, 1999).

L'activation de Rac et de Cdc42 conduit aussi à la polymérisation de l'actine. Cependant, l'activation de Rac et de Cdc42 ne conduit pas à la formation de fibres de stress mais, à la formation de lamellipodes et l'ondulation des membranes ou bien à la formation de filopodes. Une fois active, Rac s'associe à diverses protéines d'échafaudage, à des protéines kinases ou bien à des kinases de lipides. En fait Rac s'associe à un complexe protéique comprenant WAVE, le complexe Arp2/3 et la profiline, ce qui permet de recruter la G-actine et favoriser la polymérisation de l'actine. L'activation de la PI-4P5 kinase permet la relâche de protéines de coiffe des filaments d'actine. Finalement, l'activation de PAK semble impliquée dans la phosphorylation de la MLC-kinase et activer la LIM kinase, ce qui mène à la phosphorylation de la cofiline et à la stabilisation des filaments d'actine. Cdc42 active aussi PAK menant ainsi à la stabilisation des filaments d'actine et via son association à N-WASP, favorise aussi la polymérisation de l'actine (Figure 1.19) (Ren *et al.*, 1996; Desrivieres *et al.*, 1998; Tolia *et al.*, 1998; Suetsugu *et al.*, 1998; Miki *et al.*, 1998; Machesky *et al.*, 1999; Suetsugu *et al.*, 1999).

En plus de régulation croisée entre les petites protéines G de la famille Rho, ces dernières active aussi plusieurs autres protéines G de D'autres famille. Par exemple, l'activation de ARF6 peut mener à l'activation de Rac tout comme l'activation de Ras peut mener à l'activation de RAC (D'Souza-Schorey *et al.*, 1997; Matozaki *et al.*, 2000).

1.3.4.3. Migration, différenciation et croissance cellulaire.

Les petites protéines G de la famille Rho jouent un rôle important dans plusieurs processus cellulaires qui nécessitent la réorganisation du cytosquelette. Ces divers processus sont la maintenance de la morphologie, la migration, la guidance axonale, la phagocytose, la prolifération et la transformation, la contraction et la cytokinèse (Figure 1.16).

La migration cellulaire est un processus important impliqué dans plusieurs fonctions physiologiques comme le développement embryonnaire, l'angiogénèse, l'inflammation et la réponse immunitaire. Cependant, elle peut avoir un rôle délétère, comme lors de formation de métastases ou de sténose vasculaire. Rac joue un rôle important dans le développement de la force motrice par la formation de lamellipodes (Ridley *et al.*, 1992). En effet, des études démontrent que la migration de macrophages, de cellules épithéliales ou de fibroblastes est compromise lorsque Rac est inhibé (Ridley *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1998; Nobes & Hall, 1999; Banyard *et al.*, 2000). Alors que Rac est responsable de générer la force motrice essentielle au mouvement, Cdc42 contrôle la polarité de la cellule et permet ainsi la migration dirigée des cellules (chimiotactisme) (Nelson *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1998; Nobes & Hall, 1999). Le rôle de Rho dans la migration cellulaire est moins bien défini. Chez le macrophage, Rho joue un rôle essentiel dans la migration en contrôlant la rétraction de l'arrière de la cellule par la génération de la force de rétraction. Cependant, ces observations sont en désaccord avec le concept selon lequel Rho est responsable de la formation de points d'adhésions focaux et de l'adhésion à la matrice extracellulaire. Une inhibition partielle de Rho augmente la vitesse de migration de fibroblastes alors que l'inhibition complète de Rho empêche la migration des cellules (Nobes & Hall, 1999). De plus, il semble que Rho et Rho-kinase jouent un rôle important dans l'invasion d'hépatomes (Itoh *et al.*, 1999).

En plus de la migration cellulaire, les GTPases de la famille Rho contribuent à la croissance cellulaire. La progression dans le cycle cellulaire dépend des Cdks (*Cyclin-dependent kinases*) dont l'activité varie au cours de la croissance et la division cellulaire (Sherr, 1996). La progression de la phase G1 à S requiert l'activation de Ras. Ras active la cascade Raf-

MEK-ERK qui est responsable de l'activation de Cdk4 et Cdk6 tôt dans la phase G1, par l'entremise de l'expression du gène de la cycline D1 et l'assemblage des complexes cycline D-Cdk4/6 (Cheng *et al.*, 1998; Kerkhoff & Rapp, 1998). La principale fonction de ces complexes est la phosphorylation de Rb. Ceci conduit à l'activation du facteur de transcription E2F. Ce dernier active la transcription de gènes requis pour la transition G1/S. Ras n'agit pas seule. Cette progression dans le cycle cellulaire nécessite Rac puisque l'expression d'un mutant dominant négatif de Rac empêche la transition G1/S (Joneson & Bar-Sagi, 1998). Bien que Rac soit impliquée dans ce processus, il reste que les événements biochimiques qui relaient son action sont mal caractérisés (Westwick *et al.*, 1997) (Gille & Downward, 1999). Il semble que l'habileté de Rac à promouvoir la progression en phase G1 dépend aussi de l'expression de la cycline D1. Ce phénomène requiert l'activation de PAK et l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Joyce *et al.*, 1999). Ainsi, il est proposé que l'activation de Rac, en collaboration avec la cascade des MAP kinases ERK1 et 2 est nécessaire pour l'expression suffisante de cycline D, ce qui entraîne la transition G1/S. La capacité de Rac à coopérer avec Ras afin de promouvoir l'entrée en phase S dépend uniquement d'une région bien spécifique de Rac: les a.a. 124-135. La région couvrant ces acides aminés est essentielle à l'association de Rac au complexe enzymatique NADPH oxydase (Joseph & Pick, 1995; Freeman *et al.*, 1996). L'interaction entre Rac et le complexe enzymatique NADPH oxydase permet le transfert d'électrons requis afin de générer les radicaux libres oxygénés (ROS) (Joneson & Bar-Sagi, 1998; Babior, 1999). Ainsi, l'inhibition de la génération ROS empêche l'action mitogénique de Ras (Irani *et al.*, 1997). Dans les VSMCs, l'inhibition de la production de ROS empêche le PDGF d'activer le promoteur de la cycline D1 (Page *et al.*, 1999).

Rho joue aussi un rôle important dans la progression du cycle cellulaire. Elle est responsable de l'inhibition de l'expression de p21^{Cip1} (Olson *et al.*, 1998). De plus, Rho semble responsable de l'induction de la dégradation de p27^{Kip1} via la formation du complexe cycline E-Cdk2 (Weber *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1999). Ainsi, Rac et Rho sont aussi impliquées dans la transformation oncogénique par Ras (Khosravi-Far *et al.*, 1995; Qiu *et al.*, 1995a; Qiu *et al.*, 1995b). En plus de favoriser la progression du cycle cellulaire,

Rac et Rho stimulent la survie cellulaire par l'activation du facteur de transcription NF- κ B. NF- κ B est un facteur de transcription qui est essentiel à la transformation cellulaire induite par Ras en inhibant l'apoptose induite par l'oncogène (Perona *et al.*, 1997; Reuther *et al.*, 1998).

1.4. SIGNALISATION PAR L'AMP CYCLIQUE.

L'adénosine 3',5' monophosphate cyclique (AMP cyclique, AMPc) est le tout premier messenger secondaire identifié. Depuis sa découverte, une impressionnante quantité d'études a permis d'élucider le rôle essentiel de ce messenger secondaire en réponse à plusieurs hormones et neurotransmetteurs. Malgré son âge, on lui trouve encore des vertus.

1.4.3. Métabolisme de l'adénosine 3',5' monophosphate cyclique

1.4.3.2. GsPCRs

De façon générale, l'AMP cyclique est produite suite à l'activation de certains récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques. Ainsi, suite à l'interaction entre un agoniste et son récepteur, une protéine G ($G_{\alpha s}$) est activée. Tout comme les petites protéines G monomériques, l'activation de protéines G hétérotrimériques se fait par changement de conformation de la protéine, la perte du GDP et la liaison au GTP. Alors activée, la protéine $G_{\alpha s}$ se dissocie des sous-unités $\beta\gamma$ et s'associe à l'enzyme responsable de la synthèse de l'AMP cyclique : l'adénylate cyclase (Gilman, 1984).

1.4.3.3. Adénylate cyclase

L'Adénylate Cyclase (AC) est responsable de convertir l'ATP en AMP cyclique suite à une réaction d'hydrolyse. L'adénylate cyclase est un tetramère composé de deux protomères catalytiques et de deux protomères régulateurs. En absence de la protéines $G_{\alpha s}$ active, le

protomère catalytique possède un K_m bien supérieur à celui de la concentration d'ATP intracellulaire physiologique. Suite à la liaison de la protéine $G_{\alpha s}$, l'AC subit des changements de conformation par lesquels les protomères catalytiques acquièrent une valeur de K_m bien inférieure à la concentration d'ATP environnante et peut convertir une partie de l'ATP en AMP cyclique (Gilman, 1984).

Chez les mammifères, il existe jusqu'à neuf différentes adénylate cyclases AC1 à AC9. Les différentes adénylates cyclases ne sont pas exprimées dans tous les tissus et ne sont pas nécessairement régulées de la même manière (Hanoune & Defer, 2001).

1.4.3.4. Phosphodiesterases

Les effets de l'AMP cyclique sont contrôlés par les phosphodiesterases (PDEs) qui sont responsables de convertir l'AMP cyclique en AMP (adénosine monophosphate). Il existe jusqu'à 16 PDEs qui sont divisées en sept familles. Cette division est basée sur les différences de substrats ainsi que leurs sensibilités aux différents régulateurs endogènes et exogènes (Beavo *et al.*, 1994). L'AMP cyclique est principalement et spécifiquement dégradée par l'action des Phosphodiesterase de type IV (PDE4). L'AMP cyclique ainsi que le GMP cyclique (guanosine monophosphate cyclique) sont dégradés par diverses familles de PDEs alors que le GMP cyclique est dégradé spécifiquement par les phosphodiesterases de type V et VI (Essayan, 1999). De façon intéressante, il est proposé que certaines phosphodiesterase s'associent à certains récepteurs activés afin de limiter l'activation de certaines kinases par ces récepteurs (Perry *et al.*, 2002; Baillie *et al.*, 2003).

1.4.4. Mécanisme d'action de l'AMP cyclique.

L'AMP cyclique transmet le signal hormonal (ou autre) par son association avec différents effecteurs. Le nombre de ces derniers est plutôt restreint et se résume à trois chez les mammifères, soit la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique (PKA), le GEF Epac et les canaux sensibles à l'AMP cyclique.

1.4.4.2. La protéine kinase A

1.4.4.2.1. Activation par l'AMP cyclique.

La PKA est la principale et la plus connue des cibles de l'AMP cyclique. La PKA est une STK qui, sous sa forme inactive, est composée de quatre sous-unités, dont deux sont régulatrices et deux catalytiques. Les sous-unités régulatrices sont encodées par quatre gènes distincts (RI α , RI β , RII α et RII β), alors que trois autres gènes encodent les sous-unités catalytiques (C α , C β et C γ) (Chin *et al.*, 2002). L'AMP cyclique active la PKA en s'associant aux sous-unités régulatrices du tétramère. Cette liaison favorise des changements de conformation permettant de libérer les sous-unités catalytiques de l'enzyme.

1.4.4.2.2. Inactivation et régulation de l'activité.

Mis à part la répression de l'activité catalytique par les sous-unités régulatrices, la PKA est régulée de façon négative par les inhibiteurs de protéines kinases (PKIs) (Olsen & Uhler, 1991). Il existe trois isoformes de PKIs (α , β et γ) qui sont encodées par différents gènes et dont l'expression est spécifique à certains tissus (Collins & Uhler, 1997; Olsen & Uhler, 1991; Scarpetta & Uhler, 1993) En plus d'inhiber l'activité catalytique de la PKA, les PKIs jouent le rôle de protéines chaperonnes menant à l'export nucléaire de la PKA, ce qui leur confère une deuxième fonction régulatrice sur les PKAs (Wiley *et al.*, 1999). Les PKIs ne sont pas les seules protéines (peptides) régulant l'action des PKAs. Les AKAPs (*A-Kinase Anchoring Proteins*) sont des protéines qui sont associées aux sous-unités régulatrices des PKAs et qui ont pour fonction de localiser les différentes PKAs à des sites particuliers de la cellule comme la membrane plasmique, la membrane nucléaire, les mitochondries, le peroxisome, le cytosquelette, les centrosomes, l'appareil de golgi, le réticulum endoplasmique ainsi que l'association à certaines protéines comme des récepteurs membranaires, des canaux ioniques, etc. (Carrera *et al.*, 1994; Dransfield *et al.*, 1997; Eide *et al.*, 1998; Fraser *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1999; Witczak *et al.*, 1999;

Orstavik *et al.*, 2000; Seki *et al.*, 2000; Reinton *et al.*, 2000a; Reinton *et al.*, 2000b; Klingbeil *et al.*, 2001; Anway *et al.*, 2002; Jha & Shivaji, 2002; Li *et al.*, 2003).

La régulation négative de la PKA se fait aussi par des protéines sérine/thréonine phosphatases qui sont responsables de déphosphoryler les divers substrats de la PKA. Ces sérine/thréonine phosphatases proviennent principalement des familles PP1 et PP2A. Ces différentes phosphatases peuvent être contrôlées par des inhibiteurs de phosphatases comme I-1 et DARPP32 qui sont tous deux des substrats de la PKA (Alberts *et al.*, 1994; Connor *et al.*, 1998). En fait, une fois activée, la PKA phosphoryle ces inhibiteurs, ce qui permet leur association à différentes phosphatases et les inhibent.

1.4.4.2.3. Effecteurs.

La PKA phosphoryle une très grande diversité de substrats qui possèdent la séquence consensus RRXS/T. Ceci a pour effet d'influencer plusieurs voies de signalisation ainsi que l'activité de protéines impliquées dans le contrôle de la synthèse de l'AMP cyclique. En fait, la PKA phosphoryle et active plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire ainsi que des canaux ioniques intracellulaires (récepteur de la ryanodine (Takasago *et al.*, 1991)) ou extracellulaire (Wang & Giebisch, 1991; Drain *et al.*, 1994), des PDEs (Sette *et al.*, 1994; Sette & Conti, 1996), certaines petites protéines G monomériques (par exemple: Rap1 (Quilliam *et al.*, 1991; Lerosey *et al.*, 1991; Vossler *et al.*, 1997; Kawasaki *et al.*, 1998)), des facteurs de transcriptions (CREB, CREM, ATF1, NF-kB, SOX9 (Shirakawa & Mizel, 1989; Chrivia *et al.*, 1993; de Groot *et al.*, 1993; Kwok *et al.*, 1994; Loriaux *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 1996; Zhong *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2000; Servillo *et al.*, 2002)) et des régulateurs de ces facteurs de transcription (CBP) et DARPP32 (Kwok *et al.*, 1994; Fimia & Sassone-Corsi, 2001; Chin *et al.*, 2002) (Figure 1.20). À l'inverse, la phosphorylation d'autres protéines a pour conséquence leur inhibition. C'est le cas de certains récepteurs couplés aux protéines G (ex : β 2-adrénergique (Bouvier *et al.*, 1987; Fimia & Sassone-Corsi, 2001)), certaines adénylate cyclases (Iwami *et al.*, 1995), des phosphodiesterases (Giembycz & Barnes, 1991), certaines phospholipases C (PLC- β 2 (Yada *et al.*, 1989)), la sérine/thréonine kinase RAF (Hafner *et al.*, 1994), la petite protéine

G monomérique RhoA (Lang *et al.*, 1996), certaines protéines phosphatases de ERK1/2 (Blanco-Aparicio *et al.*, 1999) et plusieurs facteurs de transcription comme NF-AT ou GLI3/CI155 (Zwartkruis & Bos, 1999; Jia *et al.*, 2002) (figure 1.20).

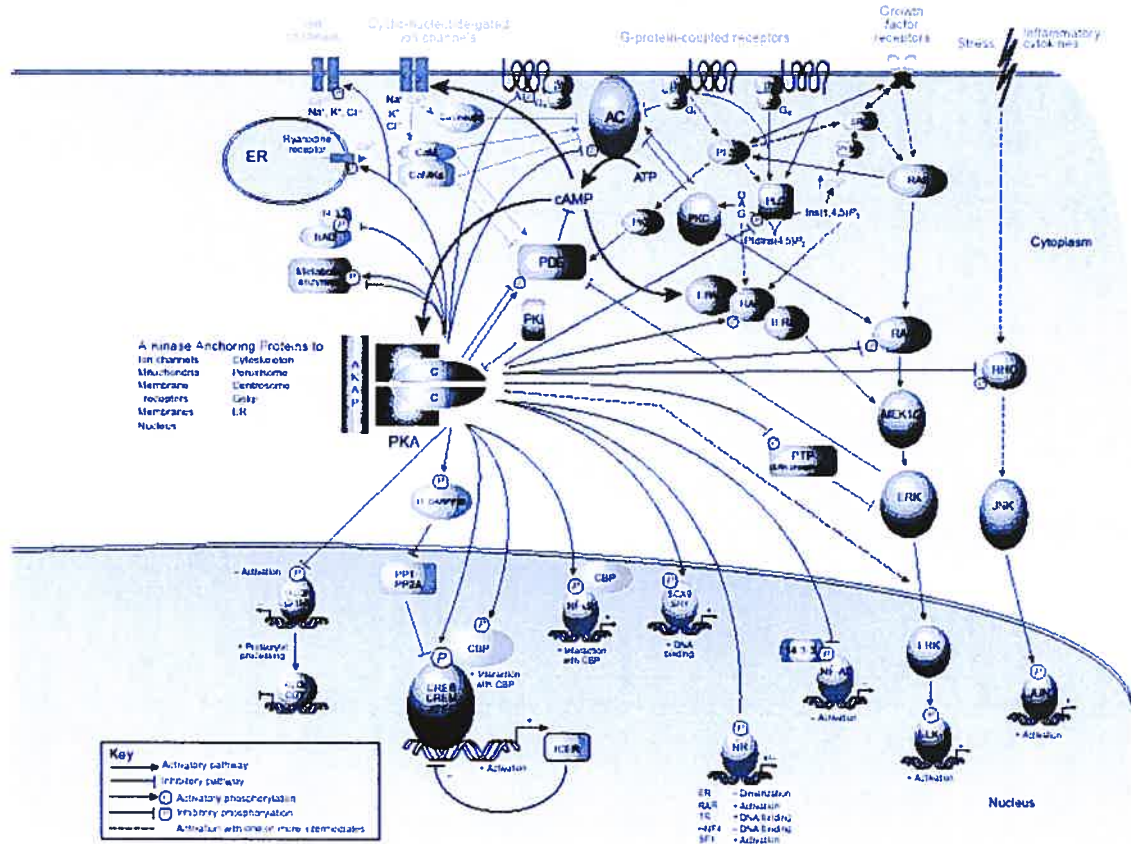


Figure 1.20. Voies de signalisation engendrées par le messager secondaire AMP cyclique (tiré de (Fimia & Sassone-Corsi, 2001)).

1.4.4.3. Epac

Longtemps, les effets de l'AMP cyclique ont été considérés comme étant exclusivement relayés par la PKA. Récemment, il a été démontré que l'AMP cyclique s'associe aussi à un échangeur de nucléotides spécifique à Rap1/2 nommé Epac (de Rooij *et al.*, 1998). Ainsi, l'AMP cyclique active Rap1 qui a pour fonction de réguler plusieurs processus cellulaires comme l'activation des plaquettes, l'activation des cellules B et la différenciation neuronale (Bos, 1998; Zwartkruis & Bos, 1999).

1.4.4.4. Canaux ioniques régulés par les nucléotides cycliques

L'AMP cyclique, tout comme le GMP cyclique, peut modifier l'activité de canaux ioniques. Ces canaux ont d'abord été identifiés en 1985 par la démonstration que le GMP cyclique pouvait directement activer les canaux ioniques « sensibles » à la lumière dans les bâtonnets (Fesenko *et al.*, 1985). Ces canaux font parti d'une grande famille de récepteurs qui comprend aussi les *pacemaker channels* ainsi que le Ether-a-gogo (EAG) et sa version humaine, les membres de la famille *eag-related channel* (HERG) qui sont des canaux potassiques (Kaupp & Seifert, 2002).

Les canaux activés par les nucléotides cycliques (CNG) sont, comme leur nom l'indique, des canaux qui sont directement activés par la liaison de l'AMP cyclique ou du GMP cyclique (Kaupp & Seifert, 2002). Ces canaux répondent plus ou moins spécifiquement à l'AMP ou le GMP cyclique et sont des canaux cationiques non sélectifs. Ils permettent l'entrée du Ca^{2+} et du Na^+ . Ces canaux permettent la transmission de signaux neuronaux par la dépolymérisation et l'hyperpolarisation des cellules neuronales du système olfactif, les photorécepteurs en cône ainsi que les cellules de la glande pinéale (Kaupp & Seifert, 2002).

1.4.5. Rôles physiologiques de l'AMP cyclique dans le muscle lisse vasculaire.

L'AMP cyclique via l'activation de la PKA, de Epac ou bien de canaux ioniques, influence une multitude de fonctions qui, dépendamment du type cellulaire, du tissu ou de l'organe étudié, peuvent avoir des conséquences diamétralement opposées. Par exemple, une caractéristique importante de l'AMP cyclique est sa capacité à promouvoir la croissance de certains types cellulaires alors qu'elle inhibe d'autres types. Jusqu'à présent certains des effets antiprolifératifs ou prolifératifs de l'AMP cyclique ont été attribués à la capacité de l'AMP cyclique d'empêcher ou de promouvoir l'activation de la voie RAF-MEK-ERK (Stork & Schmitt, 2002). Cependant, ceci n'est pas toujours le cas (Giasson *et al.*, 1997). Ainsi, les rôles de l'AMP cyclique présentés dans cette introduction se limiteront uniquement aux effets du nucléotide cyclique sur les cellules musculaires lisses vasculaires.

1.4.5.2. Vasodilatation

Un des effets bien connu de l'AMP cyclique est sa capacité à générer une réponse vasodilatatrice et même d'inhiber l'action vasoconstrictrice de certaines hormones. En fait, les hormones, les neurotransmetteurs et les autacoïdes activant des récepteurs couplés aux protéines $G_{\alpha s}$ ($G_{\alpha s}$ PCRs) ont la capacité d'induire une vasodilatation (Silver, 1985; Murray, 1990).

Le mécanisme vasodilatateur de l'AMP cyclique est relativement bien connu. Une augmentation du niveau d'AMP cyclique intracellulaire active la PKA, ce qui entraîne la phosphorylation de la *Myosin Light Chain Kinase* (MLCK) et la rend inactive. La MLCK est une protéine kinase qui est responsable de la phosphorylation de la chaîne légère de myosine (MLC *Myosin Light Chain*). Une fois phosphorylée, la MLC forme un complexe avec l'actine et entraîne la contraction des cellules. La MLCK est activée en réponse aux oscillations calciques. Ainsi, l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) s'associe à la calmoduline et, à son tour, ce nouveau complexe s'associe avec la MLCK et la rend active (Adelstein, 1983; Murray, 1990).

1.4.5.3. Inhibition de la croissance cellulaire

Bien que les effets vasodilatateurs de l'AMP cyclique soient bien caractérisés, un autre phénomène relié à la production de ce messenger secondaire est l'inhibition de la croissance cellulaire. Tel que mentionné précédemment, l'AMP cyclique peut favoriser ou empêcher la croissance de différents types cellulaires. Dans les VSMCs, l'AMP cyclique inhibe la croissance cellulaire induite par la quasi-totalité des facteurs de croissance (PDGF, EGF, bombésine, thrombine, Ang II, endothéline-1, etc. (données non présentées)). Bien que l'inhibition de la croissance des VSMCs soit un phénomène plutôt bien connu, il n'en demeure pas moins que les bases moléculaires décrivant ce processus suscitent encore des débats. Dans les VSMCs, il est proposé que l'AMP cyclique inhibe l'action proliférative de plusieurs facteurs de croissances par l'inhibition des MAP kinases (Osinski & Schror,

2000; Graves *et al.*, 1993) Cependant d'autres auteurs proposent le contraire (Takahashi *et al.*, 1996; Giasson *et al.*, 1997).

1.4.5.4. Inhibition de la migration cellulaire

L'élévation d'AMP cyclique dans les VSMCs interfère aussi avec la migration de ces cellules en réponse à plusieurs facteurs dont l'Ang II (Dubey *et al.*, 1995; Kohno *et al.*, 1997; Kohno *et al.*, 1999). Cependant, les mécanismes moléculaires de cette inhibition ne sont pas encore définis.





Chapitre 1. L'AMP cyclique inhibe l'activation des Janus Kinases par l'Ang II



2.1. MISE EN SITUATION.

L'AMP cyclique exerce un effet négatif sur la croissance des VSMCs, soit en réponse à certains facteurs de croissance, mais aussi aux agents hypertrophiques comme l'Ang II. Alors que l'AMP cyclique inhibe l'activation des MAP kinases ERK1 et 2 dans certains modèles cellulaires et que pour plusieurs cette inhibition semble justifier les effets antiprolifératifs de l'AMP cyclique, cette dernière n'interfère peu ou pas dans l'activation de cette même voie en réponse à l'Ang II dans les VSMCs (Giasson *et al.*, 1997). De plus, l'action hypertrophique de l'AMP cyclique ne semble pas être associée à une diminution de l'activation de plusieurs cascades de signalisation incluant la production d'inositol triphosphate (InsP3), l'induction de gènes précoces comme *c-fos*, *c-jun* et *egr-1* ou l'activation $p70^{S6K}$. En fait l'augmentation de l'AMP cyclique par la forskoline, l'isoproterenol, ou un inhibiteur de phosphodiesterase (IBMX, isobutylmethylxanthine) semble affecter l'induction de la phosphorylation en tyrosine par l'Ang II. En fait, l'inhibition de l'action hypertrophique de l'AMP cyclique est associée à une perte de phosphorylation en tyrosine de Tyk2 et de la paxilline en réponse à l'Ang II. Tyk2 est l'un des membres de la famille des Janus kinases alors que la paxilline est une protéine impliquée dans la formation de points d'adhésion focaux.

L'objectif de cet article était de faire le bilan des connaissances actuelles ainsi que d'apporter une nouvelle lumière sur les mécanismes de régulation croisés entre les cascades de signalisation engendrées par l'Ang II et l'AMP cyclique.

2.2 ARTICLE 1.**Functional cross-talk between the cyclic AMP and Jak/STAT signaling pathways in vascular smooth muscle cells.****Meloche S, Pelletier S, Servant MJ.**

Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal and Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada H2W 1T8

¹ Present address : Lady Davis Institute for Medical Research, Sir Mortimer B. Davis Jewish General Hospital, Montreal, Quebec, Canada H3T 1E2.

Keywords: cell growth, angiotensin II, signal transduction, cyclic AMP, protein kinase A, Janus kinases

Article publié dans *Molecular and Cellular Biochemistry* 2000

© Molecular and Cellular Biochemistry

ABSTRACT

Cyclic AMP is an ubiquitous second messenger that modulates growth factor cellular responses by interfering with different signal transduction pathways. In vascular smooth muscle cells, agents that raise cyclic AMP levels antagonize the hypertrophic effect of angiotensin II and other vasoactive factors. Cyclic AMP elevation also inhibits the chemotactic response of arterial smooth muscle cells to angiotensin II and opposes its vasoconstrictor action. These vascular effects of cyclic AMP are associated with inhibition of Janus kinases activity and modulation of tyrosine phosphorylation signaling. In this review, we discuss the molecular basis of the cross-talk between the cyclic AMP and Janus kinase pathways in vascular smooth muscle.

Keywords : signal transduction; Janus kinase; cyclic AMP; cellular hypertrophy; angiotensin II receptors; smooth muscle

Angiotensin II (Ang II), the primary effector of the renin-angiotensin system, is a multifunctional hormone that plays an important role in vascular function. In addition to its classical vasoconstrictor action, more recent studies demonstrated that Ang II stimulates the growth of a number of cell types, including vascular smooth muscle cells (SMC) (reviewed in [1-3]). *In vivo* studies have shown that chronic infusion of Ang II leads to the development of vascular hypertrophy in rats, whereas administration of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors or Ang II receptor antagonists prevents or regresses vascular hypertrophy in models of genetic and experimental hypertension [4]. Consistent with *in vivo* data, several laboratories have shown that Ang II stimulates protein synthesis and induces cellular hypertrophy, but not cell proliferation, in cultured aortic SMC [5-9]. Ang II also induces directed migration (chemotaxis) of vascular SMC [10, 11], although its effect is less prominent than that of platelet-derived growth factor (PDGF). The cellular mechanisms underlying these diverse actions of Ang II are not clearly understood but are likely to involve the activation of distinct signaling pathways.

Signal transduction pathways of the AT₁ receptor: an overview

Ang II exerts its physiological actions by interacting with specific membrane receptors in target cells. Two pharmacologically distinct subtypes of receptors, designated AT₁ and AT₂, have been described based on their affinity for the selective receptor antagonists losartan (AT₁) and PD123319 (AT₂) (reviewed in [12]). Pharmacological studies have indicated that the AT₁ receptor is the predominant subtype expressed in most adult tissues and is mediating the known biological effects of Ang II [13, 14]. The biological function of the AT₂ receptor remains controversial but recent studies suggest that it may counteract AT₁ receptor-mediated responses [15, 16]. The signaling pathways activated by the AT₂ receptor are still poorly understood and will not be reviewed here. Molecular cloning studies have revealed that the AT₁ and AT₂ receptor subtypes belong to the superfamily of seven transmembrane domain receptors [17-20].

Binding of Ang II to the AT₁ receptor stimulates heterotrimeric G proteins which couple the receptor to multiple effector enzymes in the plasma membrane. The best documented

signaling pathway of the AT₁ receptor is the stimulation of phospholipase C (PLC), which generates the two second messengers diacylglycerol and inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP₃) (reviewed in [21, 22]). Diacylglycerol is a physiological activator of protein kinase C (PKC) isoforms, while IP₃ binds to specific receptor-channels to release Ca⁺⁺ from intracellular stores. The activation of PLC by Ang II is most likely mediated by a member of the G_q family of G proteins [23, 24] which activate PLC-β isoenzymes in a pertussis toxin (PTX)-insensitive manner [25]. Multiple evidence plead in favor of a critical role for Ca⁺⁺ in the vasoconstrictor and hypertrophic action of Ang II (unpublished data). In addition to PLC, Ang II rapidly activates class IA phosphoinositide 3-kinase (PI3-kinase) to generate the lipid second messengers phosphatidylinositol (PtdIns) 3, 4-P₂ and PtdIns 3, 4, 5-P₃ ([26]; unpublished data). Activation of the PI3-kinase pathway is required for the stimulation of mRNA translation and protein synthesis by Ang II in vascular SMC ([26]; Voisin L, Giasson E and Meloche S, manuscript in preparation). In several of its target tissues, Ang II inhibits adenylyl cyclase via a PTX-sensitive G_i protein [27]. However, there is no evidence that Ang II modulates the activity of adenylyl cyclase in vascular SMC and PTX has no effect on Ang II-induced protein synthesis (unpublished data). Ang II has also been shown to activate phospholipase D, which hydrolyses phosphatidylcholine into phosphatidic acid and choline [28]. Phosphatidic acid is further metabolized to diacylglycerol by phosphatidate phosphohydrolase and may thus prolong diacylglycerol accumulation. The exact role of phospholipase D in the vascular effects of Ang II remains to be established. Finally, recent works have shown that Ang II stimulates the production of reactive oxygen species (ROS) in vascular SMC via a membrane-associated NADH/NAPDH oxidase system similar to the neutrophil NADPH oxidase [29, 30]. There is evidence that ROS are integral part of the signaling pathways which mediate the hypertrophic [30] and vasoconstrictor [31] actions of the hormone.

The immediate consequence of these early signals is the activation of a complex network of protein kinases which integrate and propagate the signals to the appropriate cellular compartments. Ang II has been shown to stimulate the activity of multiple serine/threonine kinases in vascular SMC, including PKC isoforms [32-34], the MAP kinases ERK1/ERK2

[35-37], JNK1/JNK2 ([38]; unpublished data) and p38 [31, 38, 39], p70 S6 kinase [9], Akt ([40]; unpublished data), Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II [41] and casein kinase I [42]. We have demonstrated that activation of ERK1/ERK2 [37] and p70 S6 kinase [9] is necessary for the stimulation of global protein synthesis by Ang II. More recently, we showed that the p38 MAP kinase pathway selectively modulates the vasoconstrictor action of Ang II in vascular smooth muscle [31]. In common with cytokine receptors, AT₁ receptor activation was also found to increase tyrosine phosphorylation of multiple substrates in vascular SMC (reviewed in [43]).

Importance of tyrosine phosphorylation in AT₁ receptor signaling

The reversible phosphorylation of proteins on tyrosine residues has been recognized for a long time as the primary mechanism by which receptor tyrosine kinases and cytokine receptors regulate the proliferation and differentiation of cells (reviewed in [44, 45]). It is only recently, however, that the importance of this signaling pathway has been appreciated in the case of G protein-coupled receptors. Initial studies by several independent groups revealed that agonists of G protein-coupled receptors such as thrombin, bombesin, vasopressin, endothelin, or lysophosphatidic acid (LPA) stimulate tyrosine phosphorylation of multiple substrates in their target cells [46-50]. Ang II was also reported to induce rapid tyrosine phosphorylation in liver epithelial cells [51], glomerular mesangial cells [47], vascular SMC [52-54], and cardiac fibroblasts [55]. The observation that tyrosine kinase inhibitors can block the stimulation of DNA synthesis induced by thrombin [56], endothelin [57], and bombesin [58] suggested for the first time that tyrosine phosphorylation plays an important role in the growth response to this class of receptors. Using a similar pharmacological approach, we have shown that selective inhibition of tyrosine phosphorylation with genistein and herbimycin A completely abolishes Ang II-stimulated protein synthesis in rat aortic SMC [54]. Interestingly, tyrosine kinase inhibitors were also found to block Ang II-mediated contraction of gastric smooth muscle strips [59], thereby suggesting that tyrosine phosphorylation plays a central role in both the vasoconstrictive and hypertrophic actions of Ang II.

In vascular SMC, treatment with Ang II increases the phosphotyrosine content of numerous proteins with apparent molecular masses ranging from 180 to 42 kDa. We have identified the major tyrosine phosphorylated substrate in vascular SMC as paxillin, a 68 kDa cytoskeletal protein localized to focal adhesions [60]. Other tyrosine phosphorylated proteins which have been identified in Ang II-stimulated vascular SMC include p125 focal-adhesion kinase (p125^{FAK}) [61-63], the adaptor protein Shc [63, 64], PLC γ 1 [65], Src [66], STATs [67], insulin receptor substrate 1 (IRS-1) [68], SHP-2 [68], the focal adhesion-associated kinase Pyk2 [63, 69], the focal adhesion proteins p130^{cas} [70-72] and tensin [72], and the receptor for epidermal growth factor (EGF) ([73]; Foisy S, Giasson E, Voisin I and Meloche S, manuscript in preparation). It is interesting to note that most of these signaling proteins are traditionally phosphorylated in response to the activation of receptor tyrosine kinases or cytokine receptors. Two mechanisms for activation of tyrosine kinases by the AT₁ receptor have been proposed. The first mechanism is by transactivation of a tyrosine kinase receptor, such as the EGF receptor, which then functions as a scaffold for assembly of other signaling molecules. Such a mechanism was first demonstrated in an elegant study showing that the EGF receptor is rapidly tyrosine-phosphorylated upon stimulation of Rat1 cells with endothelin, LPA and thrombin, and that inhibition of EGF receptor function suppresses MAP kinase activation and *c-fos* gene induction by these agonists [74]. More recently, Ang II was also shown to transactivate the EGF receptor tyrosine kinase in vascular SMC ([73]; Foisy S, Giasson E, Voisin I and Meloche S, manuscript in preparation). The second mechanism involves direct recruitment of tyrosine kinases to the AT₁ receptor. It has been reported that Ang II binding to the AT₁ receptor promotes the association of the tyrosine kinase Jak2 with the receptor (see below).

One family of tyrosine kinases that has emerged as an integral aspect of AT₁ receptor signaling in recent years is the Janus kinase (Jak) family. Two groups initially reported the unexpected observation that the G protein-coupled receptor agonist Ang II stimulates the Jak/STAT pathway in vascular SMC [67] and cardiac myocytes [75]. These findings have now been reproduced in many other studies ([63, 76-81]; and Fig. 2.1). Intriguingly, Bernstein and colleagues presented evidence that Jak2 forms a stable complex with the

intracellular carboxyl tail of the AT₁ receptor [67, 76]. Various lines of evidence suggest that the Jak/STAT pathway may play an important role in mediating some of the biological actions of the AT₁ receptor. For instance, treatment of vascular SMC with the tyrphostin AG490 or AG9, two potent inhibitors of Jak2 and Tyk2, significantly inhibits the growth promoting effect of Ang II (our unpublished observations). In a recent study, Pan et al. [80] reported that acute pressure overload activates the Janus kinases Jak1, Jak2 and Tyk 2 in the rat heart *in vivo*. The activation of Jak2 and Tyk2 was blocked by the AT₁ receptor antagonist E4177. It is worth mentioning that activation of the Jak/STAT pathway is not the exclusive privilege of the AT₁ receptor, as we have found that other agonists of G protein-coupled receptors stimulate tyrosine phosphorylation of Tyk2 in vascular SMC (Fig. 2.2).

The Jak/STAT pathway

Signaling by cytokine receptors depends upon their association with Janus kinases, which couple ligand binding to tyrosine phosphorylation of signaling proteins recruited to the receptor complex (reviewed in [45, 82, 83]). Among these are the signal transducers and activators of transcription (STATs), a family of transcription factors that contribute to the diversity of cytokine responses. Janus kinases form a small family of intracellular tyrosine kinases which is comprised of four members: Jak1, Jak2, Jak3, and Tyk2 (reviewed in [84, 85]). With the exception of Jak3, which is primarily expressed in hematopoietic cells, Janus kinases are ubiquitously expressed. The general mode of cytokine signaling is the following: ligand binding induces receptor oligomerization, resulting in trans-phosphorylation and activation of one or more Janus kinases. Activated Janus kinases in turn, phosphorylate STAT proteins (which are recruited to the tyrosine phosphorylated receptor through their SH2 domain) on a single tyrosine residue, inducing the homo or hetero-dimerization of the STATs and their translocation to the nucleus [86]. The activation of STATs has also been reported to occur through receptor tyrosine kinases [87] and, as mentioned precedingly, G protein-coupled receptors ([67, 75]; and Fig. 2.2).

The functional importance of the Janus kinases was first revealed by studies in cell lines defective in interferon signaling and confirmed by the development of knockout mouse strains. Jak3-deficient mice exhibit severe defects in lymphoid cell development [88-90]. Jak2 deficiency is embryonic lethal [91, 92], and Jak1 is perinatally lethal [93]. Embryonic fibroblasts derived from Jak1 and Jak2 deficient mice fail to respond to specific subsets of cytokine receptors. Conversely, overexpression or hyperactivation of Janus kinases has been associated with various forms of leukemias (see [84] for review).

Cyclic AMP antagonizes AT₁ receptor biological responses in vascular SMC

Cyclic AMP (cAMP) is a ubiquitous second messenger that is synthesized in cells by adenylyl cyclases in response to many extracellular stimuli. With few exceptions, the cellular effects of cAMP are mediated through activation of cAMP-dependent protein kinase (PKA), a multifunctional serine/threonine kinase [94]. In the absence of cAMP, PKA exists as an inactive tetrameric complex containing two regulatory subunits and two catalytic subunits. Binding of cAMP to the regulatory subunit decreases its affinity for the catalytic subunit and promotes dissociation into a dimer of regulatory subunits and two active catalytic subunits. Activated PKA is then able to phosphorylate target proteins in all cellular compartments. The magnitude and duration of the cAMP response is determined by the rate of cAMP hydrolysis by cyclic nucleotide phosphodiesterases [95].

cAMP signaling regulates a vast array of cellular processes. Notably, cAMP has been shown to modulate growth factor-induced responses by interfering with different signaling pathways. The best documented example is the ability of cAMP to inhibit or stimulate cell proliferation depending on the cell type. Elevation of intracellular cAMP stimulates the proliferation of thyrocytes, keratinocytes and Swiss 3T3 fibroblasts; in contrast, cAMP inhibits proliferation of NIH 3T3 fibroblasts, macrophages, lymphoid cells and many tumor cells (reviewed in [96-98]). Activation of the cAMP/PKA pathway also markedly inhibits the proliferation of vascular SMC both *in vitro* and *in vivo* ([99, 100]; unpublished data). Several mechanisms have been put forward to explain the anti-mitogenic action of cAMP.

A number of studies have proposed that cAMP inhibits cell proliferation by interfering with Ras-dependent activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinases extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1)/ERK2 [101-105]. Biochemical analysis of the various intermediates in the signaling cascade suggested that cAMP inhibits signal transmission at the level of Raf-1 [101, 102, 105]. However, treatment of other cell types with cAMP-raising agents was found to block growth factor-induced proliferation without preventing ERK1/ERK2 activation [106-108]. Similarly, elevation of cAMP levels was shown to inhibit the activation of p70 S6 kinase in certain cell types [107, 109], but not in others [106]. The cAMP/PKA signaling pathway also targets regulators of the cell cycle machinery. Treatment of macrophages with analogs of cAMP was found to raise the levels of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27^{Kip1}, thereby increasing its association with cyclin D-Cdk4 and preventing the activation of Cdk4 [110]. In fibroblast cells, the cell cycle arrest imposed by cAMP is associated with the inhibition of growth factor-dependent cyclin D1 induction and p27^{Kip1} degradation [111]. cAMP was also shown to downregulate *c-myc* mRNA expression in several cell types [112-114]. However, the significance of this observation is not known because constitutive expression of *c-myc* was insufficient to override the anti-proliferative effect of cAMP in macrophages [114]. It is likely that the targets of the cAMP/PKA pathway will vary depending on cell type origin and the nature of the mitogenic signals.

In addition to its well defined modulatory effect on cell multiplication, cAMP also exerts negative regulatory effects on the stimulation of protein synthesis by hypertrophic factors [63, 115, 116]. We have observed that a variety of agents known to elevate the intracellular concentration of cAMP potently inhibit the stimulatory effect of Ang II on protein synthesis in rat aortic SMC [63]. The inhibition was dose-dependent and was observed at all concentrations of Ang II. Other important physiological effects of Ang II are also subject to the modulatory action of cAMP in vascular SMC. Agents that raise cAMP levels cause a relaxation of arterial smooth muscle and antagonize the vasoconstrictor effect of Ang II [117]. cAMP also inhibits the chemotactic response of arterial SMC to Ang II *in*

vitro [10]. Thus, the cAMP signaling system impacts on several important cellular processes in vascular smooth muscle.

Cross-talk between cAMP and the Jak/STAT pathway

The cross-talk potential of the cAMP signaling system is known for more than two decades but the mechanisms by which cAMP exerts its inhibitory action on various cellular processes remain poorly understood. We have found that elevation of intracellular cAMP levels inhibits Ang II-stimulated protein synthesis in rat aortic SMC, without affecting the basal rate of protein synthesis [63]. To understand the molecular basis of this cross-talk, we have examined the effect of agents that raise cAMP levels on various AT₁ receptor-mediated signaling events [63]. Short-term cAMP treatment has no effect on the agonist binding properties of the AT₁ receptor, a finding consistent with the lack of optimal PKA consensus site in the sequence of the rat AT_{1A} and AT_{1B} receptors. We also found that cAMP elevation does not interfere with the activation of PLC or the induction of the early growth response genes *c-fos*, *c-jun*, and *egr-1* by Ang II. As mentioned precedingly, PKA activation has been shown to inhibit the ERK MAP kinase pathway in many cell types, including human arterial SMC [103]. Activation of the ERK pathway plays an important role in the regulation of mRNA translation and protein synthesis, by inducing the phosphorylation of the translation initiation factor eIF4E through activation of the protein kinase Mnk1 [118]. However, in contrast to the above studies, we [63] and others [116] did not observe any significant effect of cAMP-raising agents on Ang II-dependent activation of ERK1 and ERK2 in rat aortic SMC. Similarly, elevation of cAMP levels strongly inhibits thrombin-stimulated DNA synthesis in these cells without compromising the effect of thrombin on ERK1/ERK2 activation [108]. These observations clearly highlight the importance of the cell type (and species) in determining the overall influence of cAMP on other signaling systems, but also argue against the idea that the ERK MAP kinase pathway is a major target of the growth inhibitory action of cAMP. The p70 S6 kinase is another important regulator of translation [119]. Activation of p70 S6 kinase leads to increased phosphorylation of 40S ribosomal protein S6, an event which is believed to up-regulate the

translation of a family of mRNAs that include ribosomal proteins and elongation factors [120]. We found that raising cAMP levels does not interfere with the activation of p70 S6 kinase nor with the phosphorylation of the translational repressor 4E-binding protein 1 (4E-BP1), another downstream target of mTOR (mammalian target of rapamycin), in Ang II-stimulated rat aortic SMC ([63]; unpublished data). These findings also suggest that the growth inhibitory action of cAMP in these cells is not at the level of PI3-kinase, since full activation of p70 S6 kinase is dependent on phosphorylation of Thr 229 by PDK1 [121], a downstream effector of PI3-kinase [122].

Because of the importance of tyrosine phosphorylation signaling in the hypertrophic action of Ang II [54], we also examined the effect of cAMP-raising agents on tyrosine kinase-regulated pathways. We showed that cAMP elevation completely abolishes Ang II-dependent tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated protein paxillin in aortic SMC (Fig. 2.3). In contrast, cAMP does not prevent tyrosine phosphorylation of the adaptor protein Shc, another target of AT₁ receptor signaling. Most importantly, we found that cAMP elevation completely blocks Ang II-induced tyrosine phosphorylation of the Janus kinase Tyk2 in aortic SMC, without interfering with phosphorylation of the tyrosine kinases p125^{FAK} and Pyk2. These results revealed for the first time the existence of a functional cross-talk between the cAMP signaling system and the Jak/STAT pathway in vascular smooth muscle. Using a recently developed phospho-specific antibody to Tyk2, we have extended our original findings and demonstrated that cAMP blocks phosphorylation of Tyk2 on the activating Tyr 1054/Tyr 1055 residues (which directly reflects enzymatic activation) (Fig. 2.4). Because of the pivotal role played by Janus kinases in the regulation of normal cell growth by cytokines, it is tempting to speculate that Tyk2 may represent a critical target of the growth inhibitory action of cAMP in vascular SMC. In agreement with this idea, we have observed in preliminary studies that pharmacological inhibition of Janus kinases markedly reduces the stimulatory effect of Ang II on global protein synthesis (unpublished observations). Janus kinases are also good candidates for the inhibitory action of cAMP on vascular SMC chemotaxis. It has been recently reported that urokinase-type plasminogen activator (uPA) stimulates tyrosine

phosphorylation of Jak1 and Tyk2 in vascular SMC, and that the two kinases co-localize with uPA receptor at the leading edge of migrating cells after wounding [123]. In addition, genetic studies in zebrafish have shown that Jak1 activation is necessary for cell migration and anterior specification of the embryo [124]. All these observations suggest that Janus kinases are important regulators of cell migration. Interestingly, cAMP-elevating agents were also shown to inhibit interleukin-6-induced STAT activation in monocytes [125], and to inhibit interferon β -stimulated tyrosine phosphorylation of Jak1, Tyk2, STAT1 and STAT2 in the myeloma cell line U266 [126]. Thus, modulation of the Jak/STAT pathway by cAMP is likely to play an important role in the regulation of growth, immune and inflammatory responses.

The mechanisms whereby cAMP inhibits the activation of Tyk2 in vascular SMC is not known. Pharmacological evidence suggest that the effect of cAMP is mediated at least in part by PKA, since pre-incubation of aortic SMC with the PKA inhibitors Rp-cAMPS and H-89 restored Ang II-dependent activation of Tyk2 in cells exposed to prostaglandin E₁ (Fig. 2.5). One intriguing possibility is that PKA directly phosphorylates the Tyk2 kinase. Examination of the amino acid sequence of Janus kinases reveals that Tyk2, but not Jak1 or Jak2, contains a possible PKA recognition site at position 209. Phosphorylation of this site may induce a conformational change of the Tyk2 protein, preventing its subsequent phosphorylation on activating tyrosine residues. The mode of activation of Janus kinases by G protein-coupled receptors remains obscure but, by analogy with cytokine receptors, may require the oligomerization and trans-phosphorylation of Janus kinase molecules. If this is the case, then inactivation of Tyk2 by PKA could also interfere with the activation of other Janus kinase family members (such as Jak2) oligomerized with Tyk2. In this regard, it is noteworthy that recent findings suggest that G protein-coupled receptors also exist as dimeric structures in cell membranes [127]. A second possibility is that PKA directly or indirectly stimulates the activity of a protein tyrosine phosphatase which inactivates Janus kinases. For example, the tyrosine phosphatase SHP-1 binds to specific tyrosine phosphorylated residues in the cytoplasmic domain of the erythropoietin receptor via its SH2 domain and dephosphorylates Jak2 [128]. SHP-1 also binds directly to Jak2 and Tyk2

in intact cells, causing their dephosphorylation [129, 130]. The related phosphatase SHP-2 was also reported to associate with Jak1 in monocytes [125]. SHP-2^{-/-} fibroblasts show excessive activation of STATs by interferons, a response which is attenuated by reintroduction of SHP-2 protein [131]. It was also reported that phorbol ester treatment causes the tyrosine dephosphorylation of Tyk2 but not of Jak1 in interferon-stimulated monocytes [132]. Finally, a third possibility is that cAMP elevation may downregulate Janus kinase protein levels in vascular SMC. While such a mechanism would not explain the rapid inactivation of Tyk2 observed after short-term treatment with cAMP-raising agents, it may however contribute to the inhibition of cellular responses after long-term or chronic exposure. For example, a recent study showed that prostaglandin E₂ and agents that increase cAMP levels selectively decrease the abundance of Jak3 protein in T lymphocytes [133]. The suppression of Jak3 expression was correlated with impaired interleukin-2-dependent signaling and proliferation. Additional studies are clearly necessary to examine these various possibilities and others (Fig. 2.6).

Concluding remarks

It is clear that the cAMP/PKA signaling pathway can modulate or antagonize responses of vascular SMC to Ang II and other vasoconstrictor agents. Although the importance of this cross-talk in the physiological setting is less well characterized, a number of observations suggest that cAMP plays a major role in regulating vascular growth. For example, Indolfi et al. [100] reported that local administration of cAMP and phosphodiesterase-inhibitor drugs (aminophylline and amrinone) to rats markedly inhibits neointima formation after balloon injury *in vivo*. Another recent study showed that overexpression of prostacyclin synthase, the enzyme which catalyzes the synthesis of prostacyclin (PGI₂), in lung epithelial cells protects against the development of pulmonary hypertension in mice exposed to chronic hypoxia by preventing vasoconstriction and vessel wall hypertrophy [134]. A detailed understanding of how cAMP modulates vascular responses is clearly an important issue, and may prove useful for the identification of novel cellular targets for the treatment of vascular proliferative disorders.

ACKNOWLEDGEMENTS

Work in the author's laboratory was supported by grants from the Heart and Stroke Foundation of Canada and the Medical Research Council of Canada. S. Meloche is a Scientist of the Medical Research Council of Canada. M. J. Servant was recipient of a studentship from the Heart and Stroke Foundation of Canada.

REFERENCES

1. Schelling P, Fischer H, Ganten D: Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? *J. Hypertens.* 9: 3-15, 1991
2. Rosendorff C: The renin-angiotensin system and vascular hypertrophy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 28: 803-12, 1996
3. Pratt RE: Angiotensin II and the control of cardiovascular structure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10 Suppl 11: S120-8, 1999
4. Metsärinne KP, Stoll M, Falkenhahn M, Gohlke P, Unger T. Inhibiting the Effects of Angiotensin on Cardiovascular Hypertrophy. In: *Angiotensin Receptors*, edited by J. M. Saavedra and P. B. M. W. M. Timmermans. New York: Plenum Press, 1994, p. 235-253.
5. Geisterfer AAT, Peach MJ, Owens GK: Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ. Res.* 62: 749-756, 1988
6. Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM, Tsuda T: Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 13: 305-314, 1989
7. Itoh H, Pratt RE, Dzau VJ: Atrial natriuretic polypeptide inhibits hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 86: 1690-1697, 1990
8. Grainger DJ, Witchell CM, Weissberg PL, Metcalfe JC: Mitogens for adult rat aortic vascular smooth muscle cells in serum-free primary culture. *Cardiovasc. Res.* 28: 1238-1242, 1994
9. Giasson E, Meloche S: Role of p70 S6 protein kinase in angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 270: 5225-5231, 1995

10. Dubey RK, Jackson EK, Luscher TF: Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin I receptors. *J. Clin. Invest.* 96: 141-9, 1995
11. Xi XP, Graf K, Goetze S, Fleck E, Hsueh WA, Law RE: Central role of the MAPK pathway in ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 73-82, 1999
12. Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JAM, Smith RD: Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* 45: 205-251, 1993
13. Smith RD, Chiu AT, Wong PC, Herblin WF, Timmermans PBMWM: Pharmacology of nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 135-165, 1992
14. Brooks DP, Ruffolo RRJ. Functions mediated by peripheral angiotensin II receptors. In: *Angiotensin II Receptors Volume 1: Molecular Biology, Biochemistry, Pharmacology, and Clinical Perspectives* (1st ed.), edited by R. R. Ruffolo, Jr. Boca Raton: CRC Press, 1994, p. 71-102.
15. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ: Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* 33: 613-21, 1999
16. de Gasparo M, Siragy HM: The AT2 receptor: fact, fancy and fantasy. *Regul. Pept.* 81: 11-24, 1999
17. Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE: Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351: 233-236, 1991

18. Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T: Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 351: 230-233, 1991
19. Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, Inagami T: Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J. Biol. Chem.* 268: 24543-24546, 1993
20. Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ: Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J. Biol. Chem.* 268: 24539-24542, 1993
21. Catt KJ, Sandberg K, Balla T. Angiotensin II receptors and signal transduction mechanisms. In: *Cellular and Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System* (1st ed.), edited by M. K. Raizada, M. I. Phillips and C. Sumners. Boca Raton: CRC Press, 1993, p. 307-356.
22. Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassègue B, Alexander RW: Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle: New concepts. *Hypertension* 29: 366-373, 1997
23. Schelling JR, Nkemere N, Konieczkowski M, Martin KA, Dubyak GR: Angiotensin II activates the beta 1 isoform of phospholipase C in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 272: C1558-66, 1997
24. Ushio-Fukai M, Griendling KK, Akers M, Lyons PR, Alexander RW: Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *J. Biol. Chem.* 273: 19772-7, 1998

25. Exton JH: Phosphoinositide phospholipases and G proteins in hormone action. *Annu. Rev. Physiol.* 56: 349-369, 1994
26. Saward L, Zahradka P: Angiotensin II activates phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 81: 249-57, 1997
27. Edwards RM, Ruffolo RR, Jr. Angiotensin II receptor signal transduction mechanisms. In: *Angiotensin II Receptors Volume 1: Molecular Biology, Biochemistry, Pharmacology, and Clinical Perspectives* (1st ed.), edited by R. R. Ruffolo, Jr. Boca Raton: CRC Press, 1994, p. 53-70.
28. Lassègue B, Alexander RW, Clark M: Phosphatidylcholine is a major source of phosphatidic acid and diacylglycerol in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. *Biochem. J.* 292: 509-517, 1993
29. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 74: 1141-8, 1994
30. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK: Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* 32: 488-95, 1998
31. Meloche S, Landry J, Huot J, Houle F, Marceau F, Giasson E: The p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.*: in press, 2000
32. Lang U, Vallotton MB: Effects of angiotensin II and of phorbol ester on protein kinase C activity and on prostacyclin production in cultured rat aortic smooth-muscle cells. *Biochem. J.* 259: 477-83, 1989

33. Tsuda T, Alexander RW: Angiotensin II stimulates phosphorylation of nuclear lamins via a protein kinase C-dependent mechanism in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 265: 1165-70, 1990
34. Damron DS, Nadim HS, Hong SJ, Darvish A, Murray PA: Intracellular translocation of PKC isoforms in canine pulmonary artery smooth muscle cells by ANG II. *Am. J. Physiol.* 274: L278-88, 1998
35. Duff JL, Berk BC, Corson MA: Angiotensin II stimulates the pp44 and pp42 mitogen-activated protein kinases in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188: 257-264, 1992
36. Tsuda T, Kawahara Y, Ishida Y, Koide M, Shii K, Yokoyama M: Angiotensin II stimulates two myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinases in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 71: 620-630, 1992
37. Servant MJ, Giasson E, Meloche S: Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 271: 16047-16052, 1996
38. Kusuhara M, Takahashi E, Peterson TE, Abe J, Ishida M, Han J, Ulevitch R, Berk BC: p38 Kinase is a negative regulator of angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle cells: effects on Na⁺/H⁺ exchange and ERK1/2. *Circ. Res.* 83: 824-31, 1998
39. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK: p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 273: 15022-9, 1998

40. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griendling KK: Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 274: 22699-704, 1999
41. Abraham ST, Benscoter H, Schworer CM, Singer HA: In situ Ca²⁺ dependence for activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 271: 2506-13, 1996
42. Voisin L, Larose L, Meloche S: Angiotensin II stimulates serine phosphorylation of the adaptor protein nck: physical association with the serine/threonine kinases pak1 and casein kinase I. *Biochem. J.* 341: 217-23, 1999
43. Berk BC, Corson MA: Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ. Res.* 80: 607-16, 1997
44. Ullrich A, Schlessinger J: Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61: 203-12, 1990
45. Taniguchi T: Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 268: 251-255, 1995
46. Golden A, Brugge JS: Thrombin treatment induces rapid changes in tyrosine phosphorylation in platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 901-5, 1989
47. Force T, Kyriakis JM, Avruch J, Bonventre JV: Endothelin, vasopressin, and angiotensin II enhance tyrosine phosphorylation by protein kinase C-dependent and -independent pathways in glomerular mesangial cells. *J. Biol. Chem.* 266: 6650-6, 1991

48. Leeb-Lundberg LM, Song XH: Bradykinin and bombesin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation of a 120-kDa group of proteins in Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 266: 7746-9, 1991
49. Zachary I, Gil J, Lehmann W, Sinnett-Smith J, Rozengurt E: Bombesin, vasopressin, and endothelin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation in intact Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4577-81, 1991
50. Hordijk PL, Verlaan I, van Corven EJ, Moolenaar WH: Protein tyrosine phosphorylation induced by lysophosphatidic acid in Rat-1 fibroblasts. Evidence that phosphorylation of map kinase is mediated by the Gi-p21ras pathway. *J. Biol. Chem.* 269: 645-51, 1994
51. Huckle WR, Prokop CA, Dy RC, Herman B, Earp S: Angiotensin II stimulates protein-tyrosine phosphorylation in a calcium-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* 10: 6290-6298, 1990
52. Tsuda T, Kawahara Y, Shii K, Koide M, Ishida Y, Yokoyama M: Vasoconstrictor-induced protein-tyrosine phosphorylation in cultured vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 285: 44-48, 1991
53. Molloy CJ, Taylor DS, Weber H: Angiotensin II stimulation of rapid protein tyrosine phosphorylation and protein kinase activation in rat aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 268: 7338-7345, 1993
54. Leduc I, Haddad P, Giasson E, Meloche S: Involvement of a tyrosine kinase pathway in the growth-promoting effects of angiotensin II on aortic smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 48: 582-592, 1995

55. Schorb W, Peeler TC, Madigan NN, Conrad KM, Baker KM: Angiotensin II-induced protein tyrosine phosphorylation in neonatal rat cardiac fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 269: 19626-19632, 1994
56. Weiss RH, Niccittelli R: Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents thrombin-induced mitogenesis, but not intracellular free calcium release, in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 267: 5608-5613, 1992
57. Simonson MS, Herman WH: Protein kinase C and protein tyrosine kinase activity contribute to mitogenic signaling by endothelin-1. *J. Biol. Chem.* 268: 9347-9357, 1993
58. Seckl M, Rozengurt E: Tyrphostin inhibits bombesin stimulation of tyrosine phosphorylation, *c-fos* expression, and DNA synthesis in Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 268: 9548-9554, 1993
59. Hollenberg MD: Tyrosine kinase-mediated signal transduction pathways and the actions of polypeptide growth factors and G-protein-coupled agonists in smooth muscle. *Mol. Cell. Biochem.* 149-150: 77-85, 1995
60. Leduc I, Meloche S: Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated protein paxillin in aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 270: 4401-4404, 1995
61. Polte TR, Naftilan AJ, Hanks SK: Focal adhesion kinase is abundant in developing blood vessels and elevation of its phosphotyrosine content in vascular smooth muscle cells is a rapid response to angiotensin II. *J. Cell. Biochem.* 55: 106-119, 1994
62. Okuda M, Kawahara Y, Nakayama I, Hoshijima M, Yokoyama M: Angiotensin II transduces its signal to focal adhesions via angiotensin II type 1 receptors in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 368: 343-7, 1995

63. Giasson E, Servant MJ, Meloche S: Cyclic AMP-mediated inhibition of angiotensin II-induced protein synthesis is associated with suppression of tyrosine phosphorylation signaling in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 272: 26879-86, 1997
64. Linseman DA, Benjamin CW, Jones DA: Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 270: 12563-12568, 1995
65. Marrero MB, Paxton WG, Duff JL, Berk BC, Bernstein KE: Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C- gamma 1 in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 269: 10935-9, 1994
66. Ishida M, Marrero MB, Schieffer B, Ishida T, Berstein KE, Berk BC: Angiotensin II activates pp60^{c-src} in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 77: 1053-1059, 1995
67. Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, Bernstein KE: Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT₁ receptor. *Nature* 375: 247-250, 1995
68. Ali MS, Schieffer B, Delafontaine P, Bernstein KE, Ling BN, Marrero MB: Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation and activation of insulin receptor substrate 1 and protein-tyrosine phosphatase 1D in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 272: 12373-12379, 1997
69. Brinson AE, Harding T, Diliberto PA, He Y, Li X, Hunter D, Herman B, Earp HS, Graves LM: Regulation of a calcium-dependent tyrosine kinase in vascular smooth muscle cells by angiotensin II and platelet-derived growth factor. Dependence on calcium and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 273: 1711-8, 1998

70. Sayeski PP, Ali MS, Harp JB, Marrero MB, Bernstein KE: Phosphorylation of p130Cas by angiotensin II is dependent on c-Src, intracellular Ca²⁺, and protein kinase C. *Circ. Res.* 82: 1279-88, 1998
71. Takahashi T, Kawahara Y, Taniguchi T, Yokoyama M: Tyrosine phosphorylation and association of p130Cas and c-Crk II by ANG II in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 274: H1059-65, 1998
72. Ishida T, Ishida M, Suero J, Takahashi M, Berk BC: Agonist-stimulated cytoskeletal reorganization and signal transduction at focal adhesions in vascular smooth muscle cells require c-Src. *J. Clin. Invest.* 103: 789-97, 1999
73. Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, Motley ED, Kawakatsu H, Owada KM, Hirata Y, Marumo F, Inagami T: Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 273: 8890-6, 1998
74. Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A: Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379: 557-560, 1996
75. Bhat GJ, Thekkumkara TJ, Thomas WG, Conrad KM, Baker KM: Angiotensin II Stimulates *sis*-Inducing Factor-like DNA Binding Activity. *J. Biol. Chem.* 269: 31443-31449, 1994
76. Ali MS, Sayeski PP, Dirksen LB, Hayzer DJ, Marrero MB, Bernstein KE: Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 23382-8, 1997

77. Bhat GJ, Baker KM: Angiotensin II stimulates rapid serine phosphorylation of transcription factor Stat3. *Mol. Cell. Biochem.* 170: 171-6, 1997
78. Marrero MB, Schieffer B, Li B, Sun J, Harp JB, Ling BN: 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: 24684-90, 1997
79. McWhinney CD, Hunt RA, Conrad KM, Dostal DE, Baker KM: The type I angiotensin II receptor couples to Stat1 and Stat3 activation through Jak2 kinase in neonatal rat cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29: 2513-24, 1997
80. Pan J, Fukuda K, Kodama H, Makino S, Takahashi T, Sano M, Hori S, Ogawa S: Role of angiotensin II in activation of the JAK/STAT pathway induced by acute pressure overload in the rat heart. *Circ. Res.* 81: 611-7, 1997
81. Kodama H, Fukuda K, Pan J, Makino S, Sano M, Takahashi T, Hori S, Ogawa S: Biphasic activation of the JAK/STAT pathway by angiotensin II in rat cardiomyocytes. *Circ. Res.* 82: 244-50, 1998
82. Ihle JN: Cytokine receptor signalling. *Nature* 377: 591-594, 1995
83. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD: How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 227-64, 1998
84. Aringer M, Cheng A, Nelson JW, Chen M, Sudarshan C, Zhou YJ, O'Shea JJ: Janus kinases and their role in growth and disease. *Life Sci.* 64: 2173-86, 1999
85. Yeh TC, Pellegrini S: The Janus kinase family of protein tyrosine kinases and their role in signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 1523-34, 1999

86. Darnell JE, Jr.: STATs and gene regulation. *Science* 277: 1630-5, 1997
87. Leaman DW, Leung S, Li X, Stark GR: Regulation of STAT-dependent pathways by growth factors and cytokines. *FASEB J.* 10: 1578-88, 1996
88. Park SY, Saijo K, Takahashi T, Osawa M, Arase H, Hirayama N, Miyake K, Nakauchi H, Shirasawa T, Saito T: Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity* 3: 771-82, 1995
89. Nosaka T, van Deursen JM, Tripp RA, Thierfelder WE, Witthuhn BA, McMickle AP, Doherty PC, Grosveld GC, Ihle JN: Defective lymphoid development in mice lacking Jak3. *Science* 270: 800-2, 1995
90. Thomis DC, Gurniak CB, Tivol E, Sharpe AH, Berg LJ: Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3. *Science* 270: 794-7, 1995
91. Neubauer H, Cumano A, Muller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K: Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 93: 397-409, 1998
92. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, Vanin EF, Bodner S, Colamonici OR, van Deursen JM, Grosveld G, Ihle JN: Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 93: 385-95, 1998
93. Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, King KL, Sheehan KC, Yin L, Pennica D, Johnson EM, Jr., Schreiber RD: Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* 93: 373-83, 1998

94. Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W: cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 971-1005, 1990
95. Houslay MD, Milligan G: Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem. Sci.* 22: 217-24, 1997
96. Pastan IH, Johnson GS, Anderson WB: Role of cyclic nucleotides in growth control. *Annu. Rev. Biochem.* 491-523, 1975
97. Boynton AL, Whitfield JF. The role of cyclic AMP in cell proliferation: a critical assessment of the evidence. In: *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, edited by P. Greengard and G. A. Robison. New York: Raven Press, 1983, p. 193-294.
98. Dumont JE, Jauniaux JC, Roger PP: The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation. *Trends Biochem. Sci.* 14: 67-71, 1989
99. Assender JW, Southgate KM, Hallett MB, Newby AC: Inhibition of proliferation, but not of Ca²⁺ mobilization, by cyclic AMP and GMP in rabbit aortic smooth-muscle cells. *Biochem. J.* 288: 527-32, 1992
100. Indolfi C, Avvedimento EV, Di Lorenzo E, Esposito G, Rapacciuolo A, Giuliano P, Grieco D, Cavuto L, Stingone AM, Ciullo I, Condorelli G, Chiariello M: Activation of cAMP-PKA signaling *in vivo* inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury. *Nat. Med.* 3: 775-779, 1997
101. Burgering BMT, Pronk GJ, van Weeren PC, Charding P, Bos JL: cAMP antagonizes p21^{ras}-directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSos nucleotide exchange factor. *EMBO J.* 12: 4211-4220, 1993

102. Cook SJ, McCormick F: Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* 262: 1069-1072, 1993
103. Graves LM, Bornfeldt KE, Raines EW, Potts BC, MacDonald SG, Ross R, Krebs EG: Protein kinase A antagonizes platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10300-10304, 1993
104. Severson BR, Kong X, Lawrence JC, Jr.: Increasing cAMP attenuates activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10305-10309, 1993
105. Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ, Sturgill TW: Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3', 5'-monophosphate. *Science* 262: 1065-1069, 1993
106. Kahan C, Seuwen K, Meloche S, Pouyssegur J: Coordinate, biphasic activation of p44 mitogen-activated protein kinase and S6 kinase by growth factors in hamster fibroblasts. Evidence for thrombin-induced signals different from phosphoinositide turnover and adenylyl cyclase inhibition. *J. Biol. Chem.* 267: 13369-75, 1992
107. Monfar M, Lemon KP, Grammer TC, Cheatham L, Chung J, Vlahos CJ, Blenis J: Activation of pp70/85 S6 kinases in interleukin-2-responsive lymphoid cells is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and inhibited by cyclic AMP. *Mol. Cell. Biol.* 15: 326-337, 1995
108. Rao GN, Runge MS: Cyclic AMP inhibition of thrombin-induced growth in vascular smooth muscle cells correlates with decreased JNK1 activity and c-Jun expression. *J. Biol. Chem.* 271: 20805-10, 1996

109. Graves LM, Bornfeldt KE, Argast GM, Krebs EG, Kong X, Lin TA, Lawrence JC, Jr.: cAMP- and rapamycin-sensitive regulation of the association of eukaryotic initiation factor 4E and the translational regulator PHAS-I in aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7222-7226, 1995
110. Kato JY, Matsuoka M, Polyak K, Massague J, Sherr CJ: Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 79: 487-96, 1994
111. L'Allemain G, Lavoie JN, Rivard N, Baldin V, Pouyssegur J: Cyclin D1 expression is a major target of the cAMP-induced inhibition of cell cycle entry in fibroblasts. *Oncogene* 14: 1981-90, 1997
112. Trepel JB, Colamonici OR, Kelly K, Schwab G, Watt RA, Sausville EA, Jaffe ES, Neckers LM: Transcriptional inactivation of *c-myc* and the transferin receptor in dibutyryl cyclic AMP-treated HL-60 cells. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2644-2648, 1987
113. Heldin NR, Paulsson Y, Forsberg K, Heldin CH, Westermark B: Induction of cyclic AMP synthesis by forskolin is followed by a reduction in the expression of *c-myc* messenger RNA and inhibition of ³H-thymidine incorporation in human fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 138: 17-23, 1989
114. Rock CO, Cleveland JL, Jackowski S: Macrophage growth arrest by cyclic AMP defines a distinct checkpoint in the mid-G₁ stage of the cell cycle and overrides constitutive *c-myc* expression. *Mol. Cell. Biol.* 12: 2351-2358, 1992
115. Wolf G, Killen PD, Neilson EG: Intracellular signaling of transcription and secretion of type IV collagen after angiotensin II-induced cellular hypertrophy in cultured proximal tubular cells. *Cell Regul.* 2: 219-227, 1991

116. Takahashi T, Kawahara Y, Okuda M, Yokoyama M: Increasing cAMP antagonizes hypertrophic response to angiotensin II without affecting Ras and MAP kinase activation in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 397: 89-92, 1996
117. Randall VA, MacLennan SJ, Martin GR, Wilson VG: The effect of forskolin on 5-HT₁-like and angiotensin II-induced vasoconstriction and cyclic AMP content of the rabbit isolated femoral artery. *Br. J. Pharmacol.* 118: 627-34, 1996
118. Sonenberg N, Gingras AC: The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 268-75, 1998
119. Jefferies HBJ, Thomas G. Ribosomal protein S6 phosphorylation and signal transduction. In: *Translational Control*, edited by J. W. B. Hershey, M. B. Mathews and N. Sonenberg. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996, p. 389-409.
120. Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G: Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J.* 16: 3693-704, 1997
121. Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, Thomas G: Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science* 279: 707-10, 1998
122. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P: Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balph α . *Curr. Biol.* 7: 261-9, 1997
123. Dumler I, Weis A, Mayboroda OA, Maasch C, Jerke U, Haller H, Gulba DC: The Jak/Stat pathway and urokinase receptor signaling in human aortic vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 273: 315-21, 1998

124. Conway G, Margoliath A, Wong-Madden S, Roberts RJ, Gilbert W: Jak1 kinase is required for cell migrations and anterior specification in zebrafish embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3082-7, 1997
125. Sengupta TK, Schmitt EM, Ivashkiv LB: Inhibition of cytokines and JAK-STAT activation by distinct signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9499-504, 1996
126. David M, Petricoin E, 3rd, Lerner AC: Activation of protein kinase A inhibits interferon induction of the Jak/Stat pathway in U266 cells. *J. Biol. Chem.* 271: 4585-8, 1996
127. Salahpour A, Angers S, Bouvier M: Functional significance of oligomerization of G protein-coupled receptors. *Trends Endocr. Metab.*: in press, 2000
128. Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF: Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 80: 729-38, 1995
129. Yetter A, Uddin S, Krolewski JJ, Jiao H, Yi T, Platanius LC: Association of the interferon-dependent tyrosine kinase Tyk-2 with the hematopoietic cell phosphatase. *J. Biol. Chem.* 270: 18179-82, 1995
130. Jiao H, Berrada K, Yang W, Tabrizi M, Platanius LC, Yi T: Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2- domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Mol. Cell. Biol.* 16: 6985-92, 1996
131. You M, Yu DH, Feng GS: Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway. *Mol. Cell. Biol.* 19: 2416-24, 1999

132. Petricoin E, 3rd, David M, Igarashi K, Benjamin C, Ling L, Goelz S, Finbloom DS, Lerner AC: Inhibition of alpha interferon but not gamma interferon signal transduction by phorbol esters is mediated by a tyrosine phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* 16: 1419-24, 1996
133. Kolenko V, Rayman P, Roy B, Cathcart MK, O'Shea J, Tubbs R, Rybicki L, Bukowski R, Finke J: Downregulation of JAK3 protein levels in T lymphocytes by prostaglandin E2 and other cyclic adenosine monophosphate-elevating agents: impact on interleukin-2 receptor signaling pathway. *Blood* 93: 2308-18, 1999
134. Geraci MW, Gao B, Shepherd DC, Moore MD, Westcott JY, Fagan KA, Alger LA, Tudor RM, Voelkel NF: Pulmonary prostacyclin synthase overexpression in transgenic mice protects against development of hypoxic pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.* 103: 1509-15, 1999

FIGURES

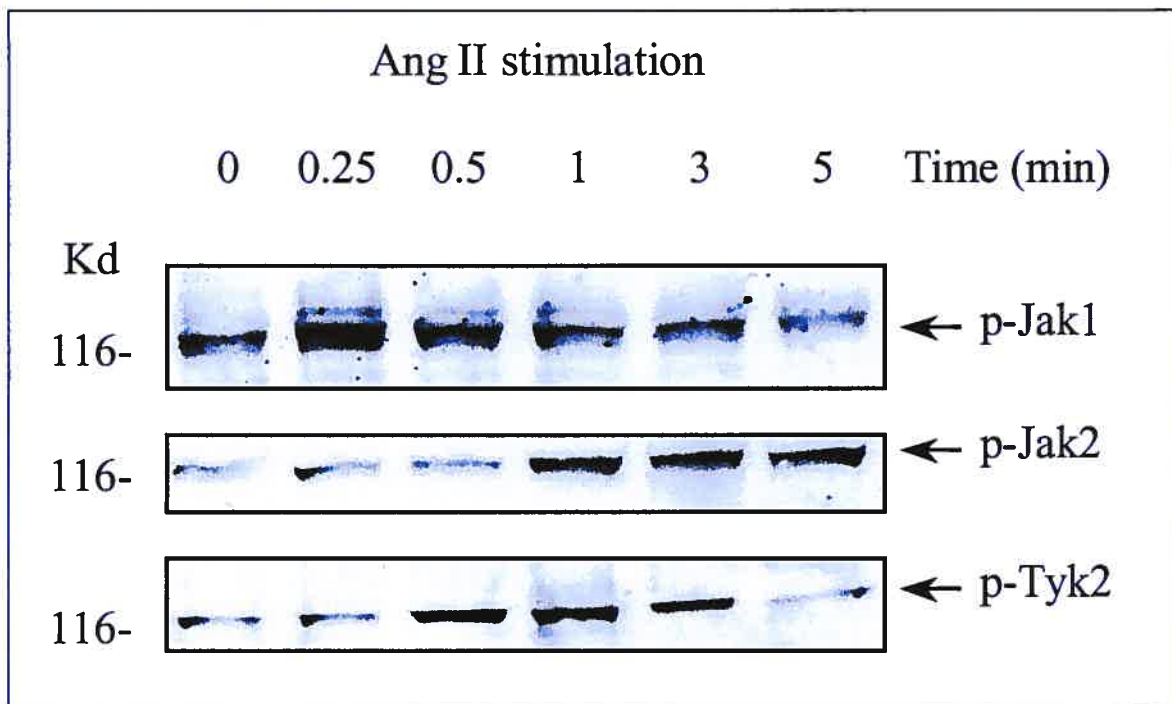


Figure 2.1. Ang II stimulates the activation of the Janus kinases Jak1, Jak2 and Tyk2 in vascular SMC. Quiescent rat aortic SMC were stimulated for the indicated times with 10 nM Ang II. Cellular lysates were prepared and analyzed by immunoblotting with phospho-specific antibodies selective for the activating tyrosine residues of Jak1, Jak2 and Tyk2.

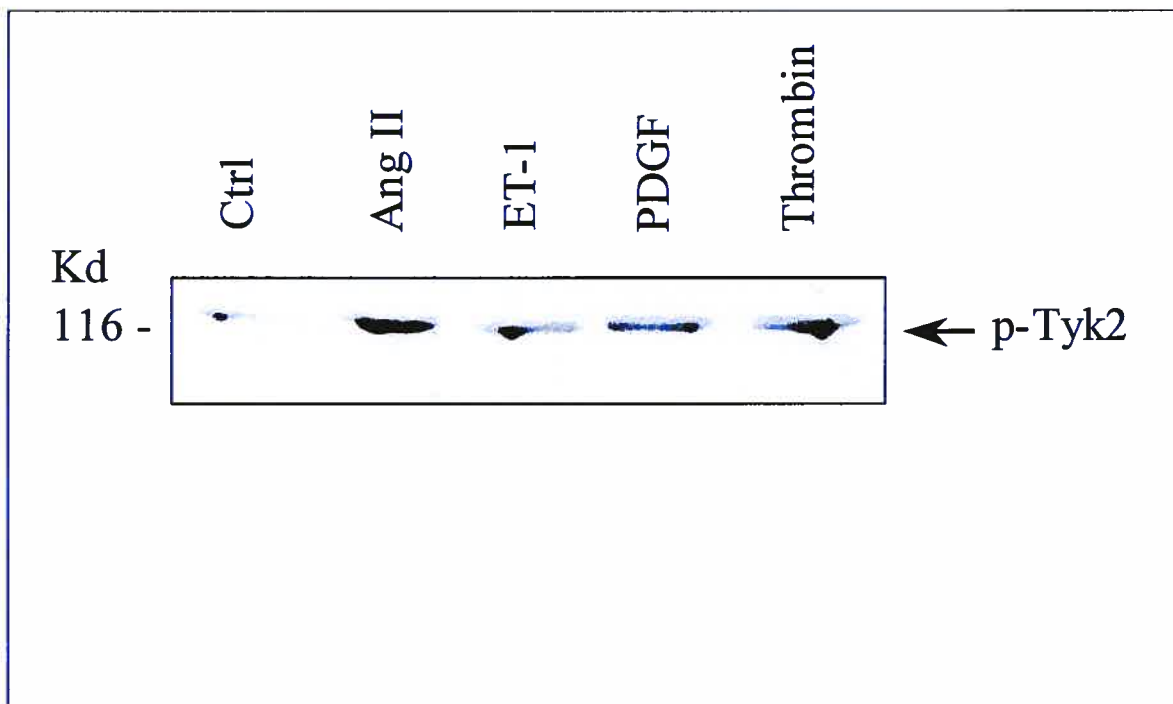


Figure 2.2. Activation of Tyk2 by agonists of G protein-coupled receptors and PDGF in aortic SMC. Quiescent rat aortic SMC were stimulated for 3 min with the following agonists: medium (Ctrl), Ang II (10 nM), endothelin-1 (ET-1, 100 nM), thrombin (1 U/ml), and PDGF-BB (PDGF, 50 ng/ml). Cellular lysates were prepared and analyzed by immunoblotting with a phospho-Tyk2 antibody (Tyr 1054/Tyr 1055).

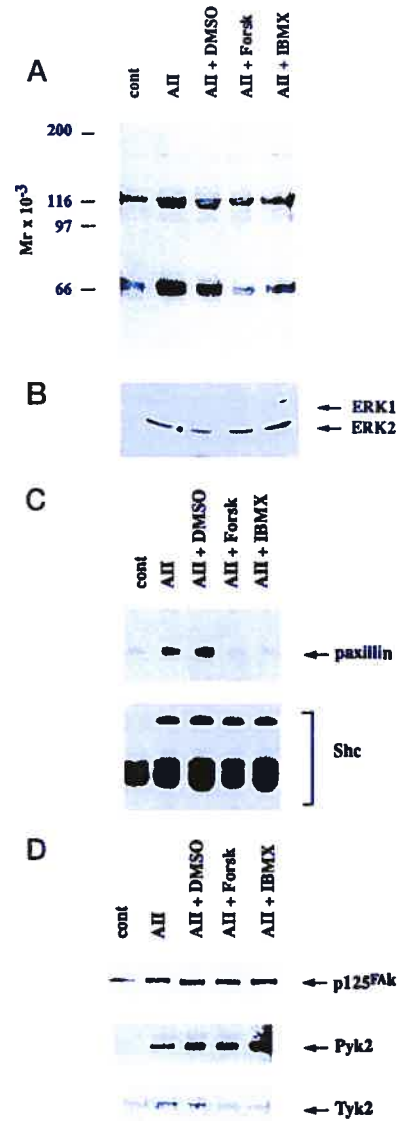


Figure 2.3. Elevation of cAMP inhibits Ang II-stimulated tyrosine phosphorylation in aortic SMC. Quiescent rat aortic SMC were pretreated for 30 min in the absence or presence of 10 μ M forskolin (Forsk) or 0.1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX). The cells were then stimulated or not (cont) with 10 nM Ang II for either 1 min (Shc, p125^{FAK}, Pyk2), 3 min (panel A, Tyk2), or 5 min (panel B, paxillin). (A) Protein tyrosine phosphorylation. Cellular lysates were analyzed by anti-phosphotyrosine immunoblotting. (B) Tyrosine phosphorylation of the MAP kinases ERK1/ERK2. Cell lysates were analyzed as in panel A. (C) Tyrosine phosphorylation of paxillin and Shc. Cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-paxillin or anti-Shc antibody and analyzed by immunoblotting with anti-phosphotyrosine. (D) Tyrosine phosphorylation of cytosolic tyrosine kinases. Cell lysates were subjected to immunoprecipitation with a specific antibody to p125^{FAK}, Pyk2, or Tyk2 and analyzed by immunoblotting with anti-phosphotyrosine. (Reproduced from *The Journal of Biological Chemistry* 1997, Vo. 272, pp. 26879-26886.)

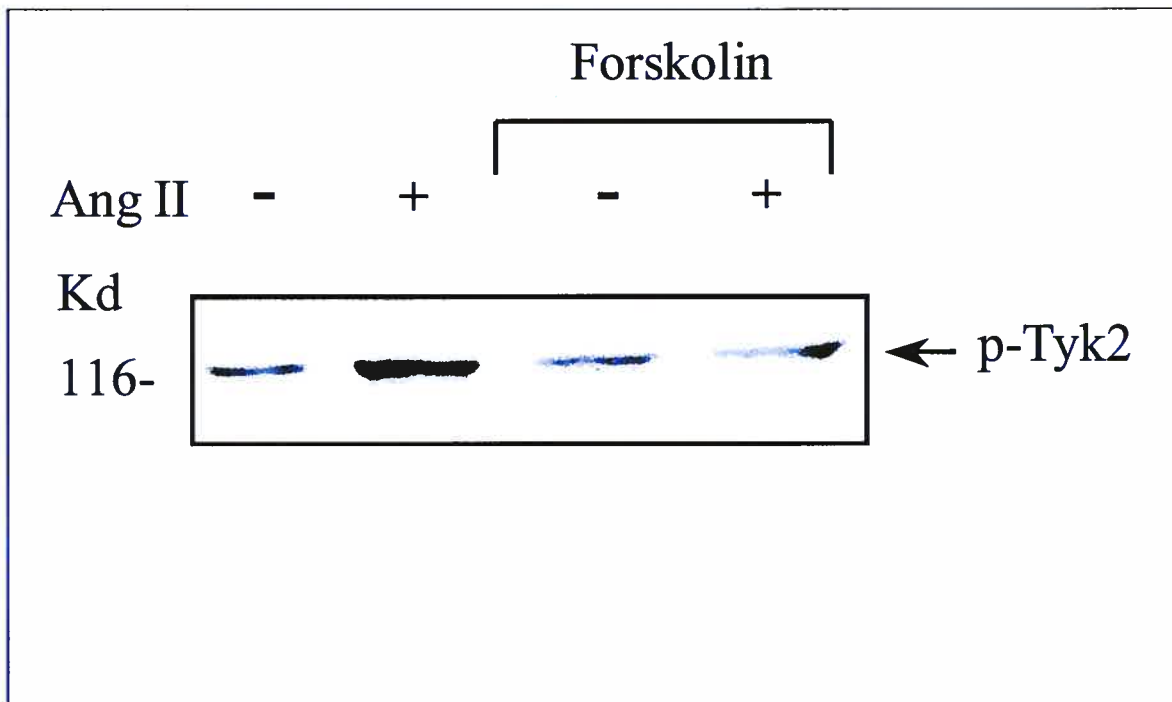


Figure 2.4. Elevation of cAMP inhibits Ang II-dependent activation of Tyk2 in aortic SMC. Quiescent rat aortic SMC were pretreated for 45 min in the absence or presence of 10 μ M forskolin and then stimulated or not for 3 min with 10 nM Ang II. Cellular lysates were prepared and analyzed by immunoblotting with a phospho-Tyk2 antibody (Tyr 1054/Tyr 1055).

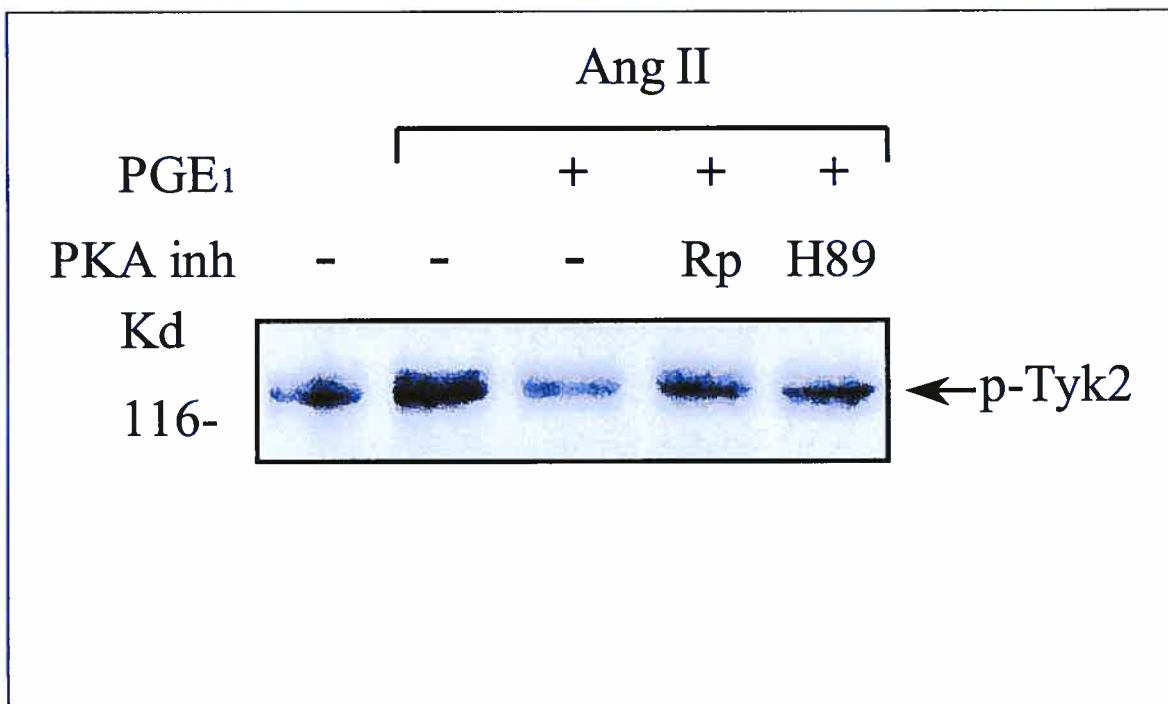


Figure 2.5. Incubation with PKA inhibitors reverses the inhibitory effect of cAMP on Ang II-stimulated Tyk2 activity in aortic SMC. Quiescent rat aortic SMC were pre-incubated for 60 min with the PKA inhibitors Rp-cAMPS (Rp, 100 μ M) or H-89 (1 μ M) prior to treatment with 1 μ M PGE₁ for 30 min. The cells were then stimulated or not for 3 min with 10 nM Ang II. Cellular lysates were prepared and analyzed by immunoblotting with a phospho-Tyk2 antibody (Tyr 1054/Tyr 1055).

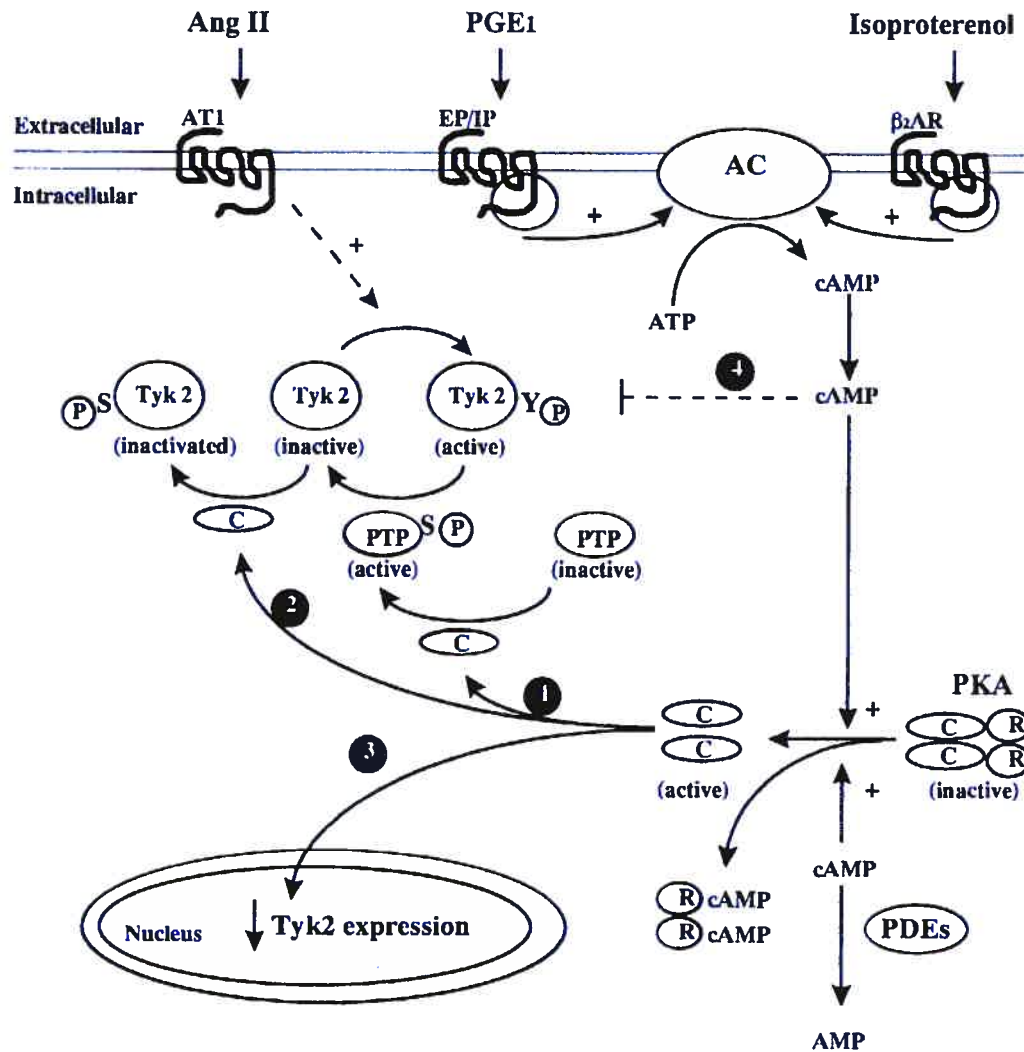



Figure 2.6. Proposed model of the cross-talk between cAMP and the Jak/STAT pathway in vascular SMC. This diagram summarizes various possibilities whereby elevation of intracellular cAMP levels may interfere with the activation of Tyk2 kinase by the Ang II AT₁ receptor. (1) PKA stimulates the activity of a protein tyrosine phosphatase which dephosphorylates and inactivates Janus kinases. (2) PKA directly phosphorylates Tyk2, which prevents its subsequent phosphorylation on activating tyrosine residues. (3) PKA downregulates the expression of Tyk2 protein. (4) cAMP inhibits Tyk2 activation by a PKA-independent mechanism. These mechanisms are not mutually exclusive. Abbreviations: PGE₁, prostaglandin E₁; EP/IP, prostaglandin receptor; AR, adrenergic receptor; AC, adenylyl cyclase; PDE, cyclic nucleotide phosphodiesterase; PTP, protein tyrosine phosphatase.





Chapitre 2. Rôle des petites protéines G de la famille Rho dans l'activation de la voie Jak/STAT par les GPCRs



3.1 MISE EN SITUATION

Afin de mieux comprendre le mécanisme par lequel l'AMP cyclique inhibe l'activation des Janus kinases par l'Ang II, il est essentiel de comprendre le mécanisme d'activation des Janus Kinases par les GPCRs. Les données recueillies à ce jour ont permis d'établir un modèle d'activation de Jak2 par le récepteur AT1 qui ressemble beaucoup à celui proposé pour les récepteurs des cytokines à l'exception de certains détails.

L'objectif du présent article était de définir les bases moléculaires de l'activation de la voie Jak/STAT par les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques.

3.2 ARTICLE 2**Rho family GTPases are required for activation of Jak/STAT signaling by G protein-coupled receptors.**

Stéphane Pelletier^{1,2}, François Duhamel^{1,2}, Philippe Coulombe^{1,3}, Michel R. Popoff⁴ and Sylvain Meloche^{1,2,3,*}

¹ Institut de recherches cliniques de Montréal, 110 Avenue des Pins Ouest, Montréal, Québec H2W 1R7, Canada and Departments of ² Pharmacology and ³ Molecular Biology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

⁴ Unité des Toxines Microbiennes, Institut Pasteur, 75724 Paris, Cedex 15, France

Running title: Regulation of Jak/STAT signaling by GPCRs

Article publié dans la revue Molecular and Cellular Biology 2003.

© Molecular and Cellular Biology 2003

ABSTRACT

In common with cytokine receptors and receptor tyrosine kinases, G protein-coupled receptors (GPCRs) signal to Janus kinases (Jaks) and signal transducers and activators of transcription (STATs). However, the early biochemical events linking GPCRs to this signalling pathway have been unclear. Here we show that GPCR-stimulated Rac activity and the subsequent generation of reactive oxygen species are necessary for activating tyrosine phosphorylation of Jaks and STAT-dependent transcription. The requirement for Rac activity can be overcome by addition of hydrogen peroxide. Expression of activated mutants of Rac1 is sufficient to activate Jak2 and STAT-dependent transcription, and the activation of Jak2 correlates with the ability of Rac1 to bind to NADPH oxidase subunit p67^{phox}. We further show that GPCR agonists stimulate tyrosine phosphorylation of STAT1 and STAT3 proteins in a Rac-dependent manner. The tyrosine phosphorylation of STAT3 is biphasic; the first peak of phosphorylation is weak and correlates with rapid activation of Jaks by GPCRs, whereas the second peak is stronger and requires the synthesis of an autocrine factor. Rho also plays an essential role in the induction of STAT transcriptional activity. Our results highlight a novel role for Rho GTPases in mediating the regulatory effects of GPCRs on STAT-dependent gene expression.

INTRODUCTION

Janus kinases (Jaks) are a small family of cytoplasmic tyrosine kinases that were initially identified as essential components of interferon receptor signalling (30,56). It is now known that all cytokine receptors induce the tyrosine phosphorylation and activation of Jaks, and that Jak activity is required for most cytokine responses. The Jak family consists of four members: Jak1, Jak2 and Tyk2, which are expressed ubiquitously, and Jak3, which is primarily found in hematopoietic cells (30,73). Stimulation of cells with cytokines induces receptor oligomerization and brings about the local aggregation of associated Jaks, resulting in their activation by trans-phosphorylation. Activated Jaks in turn phosphorylate the receptor cytoplasmic tails on tyrosine, providing docking sites for recruitment of specific signal transducers and activators of transcription (STATs) via their SH2 domain. Jaks then phosphorylate the recruited STAT proteins on tyrosine, inducing their dimerization and translocation to the nucleus where they bind to target DNA sequences (12). The Jak/STAT signalling pathway regulates a wide variety of biological responses, including development, differentiation, cell proliferation and survival, immune response, and oncogenesis (32).

Other families of cell surface receptors also activate the Jaks and STATs. Early studies have shown that the G protein-coupled receptor (GPCR) agonists thrombin and angiotensin II (Ang II) stimulate tyrosine phosphorylation of Jaks and STATs, and induce STAT DNA binding activity in target cells (7,42,53). These findings have now been substantiated and extended to other members of the GPCR family (21,33,41,43,52,65,70). However, unlike cytokine receptors, the cascade of events by which GPCRs activate the Jak/STAT pathway remains poorly understood. It has been reported that Jak2 physically associates with the Ang II AT₁ receptor and STAT factors upon agonist binding (3,42). The interaction of Jaks with chemokine receptors and with the platelet-activating factor receptor was also documented (41,43,65). In the case of the AT₁ receptor, the association of Jak2 appears to be dependent on the motif YIPP present in the cytoplasmic tail of the receptor (3). However, this motif is not conserved in any of the other GPCRs known to associate with Jaks, raising questions about the significance of this observation. Available evidence indicates that Jak2 must be

catalytically active to associate with the Ang II AT₁ receptor and to recruit STATs to the receptor (2,4). A kinase-inactive form of Jak2 with a mutation in sub-domain VIII fails to associate with the receptor and to activate STAT1 following Ang II stimulation (2). These observations imply that autophosphorylation of Jaks occurs prior to their recruitment to the GPCR and is an obligatory step for subsequent signalling.

Recent work has implicated reactive oxygen species (ROS) in the activation of the Jak/STAT pathway (55,60). ROS are produced in response to cytokines and growth factors, and function as second messengers in many cellular responses (19). A major source of ROS is the membrane-bound NADPH oxidase complex, which is present in phagocytic cells and in many other cell types (5). The activity of the phagocyte NADPH oxidase is regulated by the small GTPase Rac (8,9), suggesting that Rho family GTPases may contribute to the activation of the Jak/STAT pathway.

Here we show using a combination of bacterial toxins and dominant interfering mutants that Rac activity is necessary for activation of Jaks and STATs by GPCRs. The activation of Jaks is dependent on ROS generation and the requirement for Rac can be overcome by addition of oxidants. Expression of an activated mutant of Rac1 is sufficient to activate Jak2 and STAT-dependent transcription. Furthermore, we show that Rho is essential for transcriptional activation of STATs by GPCR agonists, but does not contribute to Jak activation or STAT tyrosine phosphorylation. These findings identify Rho GTPases as components of a novel pathway that link GPCRs to activation of Jak/STAT signalling.

MATERIALS AND METHODS.

Reagents, antibodies and plasmids

Ang II was purchased from Hukabel Scientific. Thrombin, dithiothreitol, N-acetyl-L-cysteine, diphenylene iodonium (DPI), sodium orthovanadate and Actinomycin D (ActD) were from Sigma-Aldrich. *C. difficile* toxin B, *C. botulinum* C3 transferase and platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) were from Calbiochem. The *C. sordellii* toxins LT82

and LT9048, Iota toxin and the fusion toxin Iota-C3 were purified as previously described (50). Rabbit polyclonal antibodies to Jak1 (sc-7228), Jak2 (sc-294), Tyk2 (sc-169), STAT1 (sc-346), STAT2 (sc-839), STAT4 (sc-486), STAT5 (sc-836), STAT6 (sc-981), phospho-STAT1(Tyr701) (sc-7988-R), phospho-STAT4(Ser721) (sc-16317), phospho-STAT5a/b(Ser726) (sc-12893) were from Santa-Cruz Biotechnology. Polyclonal antibodies to phospho-Jak1 (Tyr1022/Tyr1023), phospho-Jak2 (Tyr1007/Tyr1008) and phospho-STAT1 (Ser727), anti-human IL-6 receptor neutralizing antibody, interferon- γ (IFN- γ) and recombinant rat IL-6 were from BioSource International. Anti-phospho-Tyk2 (Tyr1054/Tyr1055), anti-phospho-STAT3 (Tyr705), anti-phospho-STAT3 (Ser727), anti-phospho-STAT5 (Tyr694) and anti-phospho-STAT6 (Tyr641) antibodies, anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) monoclonal antibody (mAb) E10 and anti-STAT3 mAb 7D1 were from Cell Signalling Technology. The anti-Myc monoclonal antibody was prepared in-house from 9E10 hybridoma producing cells. The pGL3-2xIFP53GAS-luc reporter plasmid was kindly provided by A. Koromilas (Lady Davis Research Institute) and has been described (69). pEFBOS expression vectors encoding Jak2 and Jak2 Δ VIII were kind gifts of D. Wojchowski (Pennsylvania State University) (74). The C3 expression vector pEF-Myc-C3 was a gift from R. Treisman (Imperial Cancer Research Fund Laboratories (29)). The pRK5 expression vectors for Myc-tagged RhoAL63, RhoAN19, Rac1L61, Rac1N17, Cdc42L61, Cdc42N17 and effector loop mutants of Rac1L61 were generously provided by N. Lamarche (McGill University) and have been described elsewhere (39). Bacterial expression plasmid for recombinant GST-Pak1 fusion protein was kindly provided by N. Lamarche.

Cell culture and transfections

Rat vascular SMC were cultured and synchronised by serum starvation as described previously (58). COS-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum. They were synchronised by incubation for 20-24 h in serum-free DMEM /Ham's F-12 medium containing 15 mM HEPES (pH 7.4), 0.1% bovine serum albumin, and transferrin. HeLa cells were grown in MEM supplemented with 10% foetal bovine serum. Vascular SMC grown in 24-well plates were transiently

transfected with expression plasmids using the FuGENE 6 transfection reagent (Roche Molecular Biochemicals). Sub-confluent COS-7 cells cultured in 60-mm dishes were transfected with a total of 6 µg of DNA using Lipofectamine reagent (Life Technologies).

Immunoblot analysis

Cell lysis and immunoblot analysis was performed as described previously (58). Immunoblotting with phospho-specific antibodies was carried out according to the manufacturer's specifications.

Reporter gene assays

For STAT-dependent reporter gene assays, vascular SMC seeded in 24-well plates were co-transfected with 500 ng of pGL2x3IFP53-GAS-luc reporter construct, 300 ng of pcDNA3.1-His/LacZ, and various amounts of indicated constructs. The total DNA amount was kept constant at 1.2 µg with empty vector. After 24 h, the cells were serum-starved for 48 h and stimulated with GPCR agonists for 24 h prior to harvest. For experiments with activated Rho GTPases, the cells were harvested after serum starvation for 18 h. The cells were washed with ice-cold PBS and scraped in 130 µl lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM dithiothreitol, 1% Triton X-100). Luciferase activity (100 µl extract) was assayed by addition of 100 µl luciferase buffer (125 mM Tris-HCl, pH 7.8, 25 mM MgCl₂, 5 mM ATP) and 100 µl luciferine solution (277 µg/ml, 5 mM KH₂PO₄, pH 8) using the AutoLumat LB 953 (Berthold). Transfection efficiency was normalised by measuring β-galactosidase activity using a spectrophotometric assay.

Small GTPase activation assays

The recombinant GST fusion protein of Pak1 (residues 56-272) was expressed in *E. coli* and purified on glutathione-agarose beads as described (54). Vascular SMC were washed twice with PBS and lysed in buffer G (25 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% Igepal CA-630, 50 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, 10⁻⁴ M phenylmethylsulfonyl fluoride, 10⁻⁶ M leupeptin, 10⁻⁶ M pepstatin A) for 30 min at 4°C.

Total lysate proteins (600 μg) were incubated for 1 h at 4°C with 10 μg of GST-Pak1 (for Rac and Cdc42 assays) bound to glutathione-agarose beads in a total volume of 800 μl . The beads were washed 3 times with lysis buffer, and the eluted proteins were resolved by SDS-gel electrophoresis. The amount of active GTP-loaded small GTPase bound was analysed by immunoblotting using the following primary antibodies: monoclonal anti-Rac antibody (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and rabbit polyclonal anti-Cdc42 antibody (2 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (Upstate Biotechnology).

RESULTS

Activation of Jak/STAT signaling by GPCRs in vascular smooth muscle cells.

We examined the ability of representative GPCRs to activate Jak family members in normal rat vascular smooth muscle cells (SMC). The activation of Jaks was monitored by immunoblotting with phospho-specific antibodies to the activation loop tyrosine residues (18,20,73). Treatment of cells with the GPCR agonists thrombin and Ang II resulted in the rapid activation of Jak1, Jak2 and Tyk2 (Fig. 1A). To determine whether thrombin and Ang II stimulate STAT transcriptional activity, we used a specific STAT-responsive reporter construct (pGL-2xIFP53GAS-luc) containing two copies of the interferon- γ activating sequence (GAS) element upstream of a β -globin minimal promoter (69). As shown in Fig. 1B, both GPCR agonists stimulated STAT-dependent transcription in VSMC, to an extent comparable to EGF and PDGF-BB stimulation (data not shown). To evaluate the contribution of Jak2 in mediating the activation of STATs by GPCRs, we co-transfected the STAT-responsive luciferase reporter together with expression vectors for wild-type Jak2 or a catalytically-inactive form of the kinase (Jak2 Δ VIII) into vascular SMC. Expression of wild-type Jak2 potentiated STAT activation by Ang II, whereas the Jak2 interfering mutant completely abolished the effect of Ang II and thrombin (Fig. 1C). These observations suggest that Jak2 is required for the transcriptional activation of STATs by GPCRs in vascular SMC.

We next examined the regulation of individual STAT family members by GPCR agonists. The activation of STATs was monitored by anti-phosphotyrosine immunoblotting of the precipitated protein or by immunoblotting with phospho-specific antibodies to the C-terminal tyrosine that mediates dimerization (23,26,28,59,68,72,73). Immunoblot analysis with isoform-specific antibodies revealed that vascular SMC express all members of the STAT family (data not shown). Addition of Ang II induced the activating tyrosine phosphorylation of STAT1 (Tyr701) and STAT3 (Tyr705) in these cells (Fig. 2, A and B). Although Ang II was previously reported to increase tyrosine phosphorylation of STAT2 (37), we were unable to detect its phosphorylation in vascular SMC, neither that of STAT4, STAT5 or STAT6 (data not shown). On the other hand, thrombin increased the tyrosine phosphorylation of STAT3, but not of STAT1 (Fig. 2, A and B). Control experiments using different cytokines and peroxyvanadate as stimuli confirmed that each individual STAT can be activated in these cells. Interestingly, we observed that the kinetics of STAT1 and STAT3 activation by GPCRs is different. Ang II-induced tyrosine phosphorylation of STAT1 has a rapid onset and is maintained for at least 2 h after stimulation (Fig. 2A). In contrast, GPCR-mediated tyrosine phosphorylation of STAT3 shows a biphasic profile. There is a rapid but transient peak of phosphorylation that reaches a maximum between 3-6 min and returns to basal levels by 15 min, followed by a second and stronger peak that appears at 60 min and persists for at least 2 h (Fig. 2B). The extent of STAT3 activation by GPCR agonists was comparable to that seen in response to EGF treatment (data not shown).

In addition to their phosphorylation on activating tyrosines, certain STAT isoforms are also regulated by phosphorylation of a C-terminal serine residue within the motif P-(M)-S-P (13). The functional consequence of STAT serine phosphorylation remains controversial. In some cases, mutation of this serine to alanine was found to reduce the transcriptional activity of STATs, whereas other reports suggested that it contributes to full transcriptional activation (13,38,67). We therefore examined the phosphorylation of these serine residues in STAT1 and STAT3 using phospho-specific antibodies. Treatment with Ang II rapidly increased the phosphorylation of STAT1 on Ser727, which persisted during the 2 hours of stimulation (Fig. 2A). Thrombin also promoted Ser727 phosphorylation of STAT1, despite the fact that

it does not significantly affect tyrosine phosphorylation. Similarly, both agonists stimulated phosphorylation of STAT3 on Ser727 with kinetics comparable to STAT1 (Fig. 2B).

Activation of Jaks by GPCRs is dependent on the generation of ROS

Recent studies have implicated ROS as integral components of the signalling mechanisms leading to activation of the Jak/STAT pathway (55,60). Of interest, the GPCR agonists Ang II and thrombin have been shown to increase production of ROS via a membrane-bound NADPH oxidase system present in vascular SMC (25,49). We therefore tested whether ROS generation is an essential step in the activation of Jaks by GPCRs. Pre-treatment of vascular SMC with the antioxidants N-acetyl-L-cysteine and dithiothreitol was found to markedly inhibit Ang II-stimulated Jak1, Jak2 and Tyk2 activation (Fig. 3A). Incubation with DPI, a potent inhibitor of flavin-containing enzymes, similarly prevented the activation of Jaks by Ang II and thrombin (Fig. 3B). This effect was specific, since DPI did not interfere with IFN- γ signaling (data not shown). One mechanism by which ROS may regulate protein kinase activity is through reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases following oxidation of their catalytic cysteine residue (14). This effect of ROS can be mimicked by hydrogen peroxide (10,14). To test this idea, we exposed vascular SMC to H₂O₂ and analysed the activation state of Jaks. Addition of H₂O₂ caused a rapid and robust activation of all three Jak isoforms (Fig. 3C). Consistent with these observations, inhibition of protein tyrosine phosphatase activity with vanadate also significantly increased Jaks activity (Fig. 3D). Together, these results suggest that ROS are both necessary and sufficient for activation of Jaks upon stimulation of vascular SMC by GPCRs.

Small GTPases of the Rho family are required for activation of the Jak/STAT pathway by GPCRs

Rho family GTPases are key components of signalling pathways that control cytoskeletal organisation, cell proliferation, and gene expression (8,64). Notably, Rac1 has been implicated recently in the regulation of STAT3 transcriptional activity (17,61). The Rac proteins are also known to regulate the catalytic activity of the NADPH oxidase complex (8,9). All these observations prompted us to examine the role of Rho GTPases in the

regulation of the Jak/STAT pathway. We used *Clostridium difficile* toxin B, a bacterial toxin that selectively glucosylates Rho, Rac and Cdc42 GTPases, and inhibits their function by preventing GTP binding (1,51). Incubation of vascular SMC with toxin B completely blocked the activation of Jak1, Jak2 and Tyk2 in response to the GPCR agonists Ang II and thrombin (Fig. 4A, left and middle columns). Importantly, treatment of cells with toxin B did not prevent the activation of Jak family members by H₂O₂ (Fig. 4A, right column). This result is consistent with the idea that ROS act downstream of Rho GTPases.

Incubation with toxin B suppressed Ang II-induced tyrosine phosphorylation of STAT1 and markedly attenuated its phosphorylation on Ser727 in vascular SMC (Fig. 4B). The toxin also prevented GPCR-stimulated tyrosine phosphorylation of STAT3, but did not affect the phosphorylation of the protein on Ser727 (Fig. 4, C and D). We next evaluated the consequences of inhibiting Rho GTPases function on the transcriptional activation of STATs. As shown in Fig. 4E, incubation with toxin B completely suppressed the induction of STAT-dependent transcription by GPCR agonists. Bacterial toxins interfering with small GTPases are known to provoke dramatic changes in cell morphology (51). To ascertain that *C. difficile* toxin B was working effectively, we always tested its effect on the morphology of vascular SMC. As expected, incubation with *C. difficile* toxin B caused dramatic changes in morphology leading to cell rounding and appearance of retraction filaments (Fig. 4F). However, under these conditions, toxin B had no effect on the activation of ERK1/2 mitogen-activated protein (MAP) kinases by Ang II and thrombin (Fig. 4G). Furthermore, incubation with the bacterial toxin did not interfere with IFN- γ -stimulated Jak1 activation or STAT1 tyrosine phosphorylation (Fig. 4H), confirming the specificity of its effect on GPCR signaling. Taken together, these data suggest that small GTPases of the Rho family are necessary for activating phosphorylation of Jak and STAT isoforms, and for the resulting induction of STAT-dependent transcription in response to GPCR engagement.

Rho is required for transcriptional activation of STATs by GPCRs

We next attempted to define the specific roles of Rho, Rac and Cdc42 in mediating the activation of Jak/STAT signalling by GPCRs. Since individual Jak family members appear

to be similarly regulated by GPCRs and Rho GTPases, and because of the essential role of Jak2 in the transcriptional activation of STATs, we only monitored the activity of Jak2 in subsequent experiments. It has been previously reported that stimulation of vascular SMC with Ang II or thrombin activates Rho (57,71). To evaluate the specific contribution of Rho proteins in Jak2 regulation we used *Clostridium botulinium* C3 transferase which ADP-ribosylates Rho at Asn-41 and inhibits its translocation to the membrane (1,51). Incubation of vascular SMC with C3 transferase failed to prevent Jak2 activation by GPCR agonists, whereas under similar experimental conditions exposure to toxin B completely abolished enzyme activity (Fig. 5A). To confirm these results, we used a fusion Iota-C3 toxin made by combining the binding subunit for Iota toxin (Ib) with a chimeric Ia-C3 transferase. This fusion toxin only exhibits C3 enzymatic activity and is internalized more rapidly and efficiently into cells via the Ib binding protein (51). We found that neither Ib alone, Iota toxin (Ia plus Ib) or Iota-C3 fusion toxin affected Jak2 activation by Ang II or thrombin (Fig. 5B). Incubation with Iota-C3 toxin also failed to inhibit GPCR-stimulated tyrosine phosphorylation or Ser727 phosphorylation of STAT1 and STAT3 (Fig. 5, C, D and E).

Surprisingly, incubation of vascular SMC with C3 transferase or Iota-C3 fusion protein blocked the induction of STAT-dependent transcription in response to both GPCR agonists (Fig. 5F). Consistent with this result, transfection of a dominant-negative mutant of Rho isoforms, RhoAN19, or Myc-tagged C3 transferase together with the STAT-dependent reporter completely abolished the transcriptional activation of STATs by GPCRs (Fig. 5, G and H). In contrast, incubation of cells with Iota-C3 toxin or expression of RhoAN19 failed to inhibit STAT transcriptional activation induced by IFN γ (Fig. 5, I and J). These results provide strong evidence for the specific involvement of Rho in the transcriptional activation of STATs by GPCRs.

Rac is required for activation of Jaks and STATs by GPCRs

The observation that toxin B but not C3 transferase inhibits activation of Jak2 and STAT1/3 by GPCRs point at the involvement of Rac and/or Cdc42 in this process. To address this hypothesis, we first determined whether GPCR agonists could activate Rac and Cdc42 in

vascular SMC. Stimulation with Ang II or thrombin caused a significant increase in GTP loading of Rac, as measured by association of the GTPase to the CRIB (Cdc42/Rac-interactive binding) domain of Pak1 (Fig. 6A). However, we were not able to detect any significant activation of Cdc42, which is well expressed in vascular SMC (Fig. 6B). Control experiments with GTP γ S confirmed that the Cdc42 assay, is working effectively.

We then exploited the use of two other bacterial toxins to examine the contribution of Rac and Cdc42 in signalling to Jaks. Lethal toxin (LT) from *Clostridium sordellii* strain 82 (LT82) glucosylates and inactivates Rac, Ras, Rap, Ral, and to a lesser extent R-Ras proteins, whereas LT from strain 9048 inactivates Rac, Cdc42, Ras, and weakly Rap and R-Ras proteins (1,16,51). Exposure of vascular SMC to either LT82 or LT9048 completely suppressed the activating tyrosine phosphorylation of Jak2 (Fig. 7A) and STAT1/3 (Fig. 7, B, C and D) upon stimulation with Ang II or thrombin. The two toxins also abrogated the stimulatory effect of GPCRs on Ser727 phosphorylation of STAT1 and STAT3 (Fig. 7, B, C and D). We next tested the effect of the toxins on STAT transcriptional activity. Incubation of cells with low concentrations of LT82 and LT9048 markedly reduced the induction of STAT-dependent transcription by GPCR agonists (Fig. 7E). The results with the bacterial toxins are summarized in Table 1. To confirm the involvement of Rac and Cdc42, we co-transfected the STAT-dependent reporter together with dominant-negative mutants of Rac1 and Cdc42 in vascular SMC. Expression of Rac1N17 or Cdc42N17 completely blocked the stimulatory effect of GPCR agonists on STAT-dependent transcription (Fig. 7F). However, the finding that both Rac1 and Cdc42 interfering mutants block STAT activity should be interpreted with caution, since the guanine nucleotide exchange factors that are inactivated by these mutants may regulate both Rac and Cdc42 isoforms (34,64).

As observed with *C. difficile* toxin B, the lethal toxins induced profound morphological changes in vascular SMC (Fig. 7G). However, incubation with the toxins had no effect on PDGF-BB-induced tyrosine phosphorylation of the PDGF receptor and of other downstream effectors (data not shown). Furthermore, the lethal toxins did not interfere with the stimulatory effect of IFN- γ on Jak1 and STAT1 tyrosine phosphorylation (Fig. 7H) or

STAT-dependent transcription (Fig. 7I), confirming their specificity. Similarly, overexpression of Rac1N17 and Cdc42N17 failed to inhibit IFN γ -induced STAT-driven transcription (Fig. 7J). We conclude from these results that Rac (and possibly Cdc42) is required for activation of Jaks and induction of STAT-dependent transcription by GPCRs.

Activation of Jak2 and STAT-dependent transcription by Rac and Rho

The results presented above indicate that Rho GTPases are essential components of the pathway linking GPCRs to the activation of Jaks and STATs. We next wished to determine whether activation of Rho family members is sufficient to modulate Jak/STAT signalling. For these experiments, COS-7 cells were co-transfected with Jak2 and expression vectors encoding activated forms of RhoA, Rac1 or Cdc42, and the activating phosphorylation of Jak2 was analyzed by immunoblotting. Expression of active RhoA63 had little effect on Jak2 phosphorylation, whereas the activated Rac1L61 and Cdc42L61 proteins markedly increased Jak2 activity (Fig. 8A). We also evaluated the effect of Rho GTPases on STAT activity in vascular SMC. Expression of increasing amounts of all three activated GTPases was found to significantly induce STAT-dependent transcription in serum-starved cells (Fig. 8B).

To further dissect the molecular mechanisms underlying the action of Rac on the Jak/STAT pathway, we analyzed the effect of effector loop mutants of Rac1 on the activity of Jak2. Introduction of the Y40C mutation into the effector loop of Rac disrupts its interaction with CRIB-containing proteins, such as Pak and WASP, but does not interfere with binding to NADPH oxidase subunit p67^{phox} or ROK. The F37A mutation blocks ROK interaction, while the Y40K inhibits the interaction of Rac with Pak and p67^{phox} but not with ROK (39) (Fig. 9A). Expression of Y40C- or F37A-substituted Rac1L61 in COS-7 cells significantly enhanced Jak2 tyrosine phosphorylation (Fig. 9A). In contrast, the Y40K mutant, which has lost interaction with p67^{phox}, was no longer able to activate Jak2. Consistent with the idea that Rac mediates GPCR-induced production of ROS, which in turn activate Jaks, we found that incubation of transfected COS-7 cells with dithiothreitol (Fig. 9B) or DPI (Fig. 9C) prevented Jak2 activation by Rac1Q61L. These results provide additional support for the

idea that Rac regulates the Jak/STAT pathway through activation of the NADPH oxidase and production of ROS.

Sustained activation of STAT3 by GPCRs requires synthesis of an autocrine factor

It has been recently suggested that Rac1 induces STAT3 activation by an indirect mechanism involving the autocrine production and action of IL-6 (17). In their study, the authors also observed that Rac1-mediated activation of STAT3 is sensitive to SOCS3 (suppressor of cytokine signaling-3), a known inhibitor of gp130 signaling (46). In the present study, we found that GPCR agonists activate STAT3 in a biphasic manner. The first peak of activation is weak and transient, and correlates with the activation of Jaks by GPCRs. In contrast, the second peak of activation is stronger and sustained, suggesting a possible requirement for the synthesis of an autocrine factor. To test this hypothesis, we first examined the effect of the transcriptional inhibitor ActD on GPCR-induced STAT3 tyrosine phosphorylation. Pre-treatment of vascular SMC with ActD completely abolished the late peak of STAT3 activation, but not the first peak (Fig. 10A). This result is consistent with the idea that long term activation of STAT3 is dependent on synthesis of a novel ligand and/or receptor.

Thrombin and Ang II were previously reported to induce IL-6 expression in vascular SMC (27,55,63). To verify the possibility that IL-6 mediates the long-term activation of STAT3 through an autocrine loop, we tested the effect of a neutralizing antibody to the human IL-6 receptor. The antibody did not affect stimulation of STAT3 tyrosine phosphorylation by either Ang II or thrombin (Fig. 10B). However, these findings should be interpreted with caution, since the neutralizing antibody may not recognize the rat IL-6 receptor. IL-6 also failed to activate STAT3 in vascular SMC, indicating that the concentration of receptor is limiting (data not shown). We next asked whether the IL-6 receptor neutralizing antibody could inhibit thrombin-induced STAT3 activation in a human cell line. The antibody effectively abolished the activation of STAT3 by thrombin in HeLa cells (Fig. 10C). However, IL-6 only weakly activated STAT3 in these cells. Together, our findings strongly

suggest that late and sustained activation of STAT3 by GPCRs is dependent on the autocrine production of a ligand by a Rac-dependent mechanism. IL-6 appears as a likely candidate.

DISCUSSION

In common with cytokine receptors, agonist stimulation of GPCRs results in tyrosine phosphorylation and activation of Jak and STAT family members. To date, several different GPCRs have been reported to activate the Jak/STAT pathway (7,21,33,41-43,52,53,65,70). However, the mechanism by which GPCRs activate this signaling pathway remains largely unknown. Here, we demonstrate for the first time that the small GTPases Rho and Rac are required for transcriptional activation of STATs by GPCRs. Previous studies have shown that Rho is activated by a wide variety of GPCR agonists, including Ang II and thrombin in vascular SMC (57,71). Although much less is known about the regulation of Rac and Cdc42 by this receptor family, agonists like fMet-Leu-Phe or sphingosine-1-phosphate have been shown to activate Rac and Cdc42 in their target cells (6,48). In this study, we observed that Ang II and thrombin increase GTP loading of Rac, but not Cdc42, in vascular SMC. Inhibition of Rac function with toxin B and lethal toxins, or by expression of dominant-negative Rac1 protein, was found to suppress the activating phosphorylation of Jaks and STATs, and the induction of STAT-dependent transcription in response to GPCRs. Consistent with findings by others (17,61), expression of activated Rac1 was sufficient to enhance the phosphorylation of Jaks and the transcriptional activity of STATs. We also showed that blocking the function of endogenous Rho with C3 transferase or dominant-negative RhoA prevents the transcriptional activation of STATs by GPCR agonists, without interfering with Jak activity or STAT phosphorylation. Collectively, our results lead to a working model in which the small GTPases Rac and Rho act in concert to mediate the regulatory effects of GPCRs on STAT-dependent gene expression (Fig. 11). While activated Rac1 and RhoA can signal independently, both are necessary for maximal transcriptional activation of STATs.

In addition to its well-described action on the actin cytoskeleton, Rac is also a known regulator of the NADPH oxidase, a multi-subunit enzyme complex of phagocytic cells that catalyses the production of superoxide (5,8,9). Rac interacts with cytochrome b to regulate the initial transfer of electrons from NADPH to FAD, and binds to the p67^{phox} subunit to induce the subsequent electron transfer to molecular oxygen (15). Similar NADPH oxidase-like enzymes have been found in a variety of cells of mesodermal origin, including vascular SMC, and Rac has been implicated in the generation of ROS by growth factors and cytokines in these cells (5,62). The results presented here suggest the existence of a linear signaling pathway Rac-NADPH oxidase-ROS that links GPCRs to Jak activation in vascular SMC (Fig. 11). This model is supported by the following observations: (i) GPCR agonists activate Rac in vascular SMC and Rac is both necessary and sufficient for Jak activation. (ii) Treatment with antioxidants or with the NADPH oxidase inhibitor DPI inhibits Jak activation by GPCR agonists and also by activated Rac1. (iii) Exposure to H₂O₂ activates the three Jak isoforms expressed in vascular SMC and by-passes the requirement for Rac activity. (iv) The effector loop mutation Y40K in the activated form of Rac1 (Rac1L61-Y40K), which prevents the interaction of Rac with p67^{phox}, is also unable to activate Jak2. It is noteworthy that many GPCRs known to activate the Jak/STAT pathway have also been shown to induce the formation of ROS, in addition to the receptors for Ang II and thrombin, these include the platelet-activating factor, bradykinin, alpha1-adrenergic, and endothelin-1 receptors (22,24,47,66). The pathway described here appears specific to GPCR signaling, since activation of Jak1 by the cytokine IFN γ was not influenced by inhibition of Rac or the NADPH oxidase.

The exact mechanism by which ROS production leads to activating phosphorylation of Jaks remains to be clarified, but one likely possibility is through inhibition of tyrosine phosphatase activity. Early reports have shown that treatment of cells with oxidants or SH-alkylating agents induces rapid tyrosine phosphorylation of numerous receptor tyrosine kinases, by preventing their dephosphorylation by tyrosine phosphatases (36). This occurs by reversible oxidation of a redox-sensitive cysteine residue present in the active site of these enzymes (10,11,14,40). Interestingly, among the tyrosine phosphatases shown to be

inactivated by oxidants are PTP-1B (40) and SHP-1 (11), two enzymes that were also found to negatively regulate Jak/STAT signalling (31,45). Thus, the generation of ROS may transiently inactivate tyrosine phosphatases and switch the equilibrium towards autophosphorylation of Jak tyrosine kinases. In support of this idea, we observed that addition of vanadate rapidly increases activating tyrosine phosphorylation of Jak family members in vascular SMC.

Our study also revealed that Rho is required for maximal transcriptional activation of STATs by GPCRs. This action of Rho is specific, since incubation of cells with Iota-C3 toxin or expression of RhoAN19 failed to inhibit STAT transcriptional activation induced by the cytokine IFN γ . However, Rho activity is dispensable for Jak activation, and for activating tyrosine phosphorylation or Ser727 phosphorylation of STAT1/3 by GPCR agonists. We also observed that a dominant-negative RhoA mutant does not block STAT-dependent transcription induced by activated Rac1L61, indicating that RhoA is not downstream of Rac (data not shown). Additional studies are clearly warranted to establish the precise mechanism by which Rho regulates STAT transcriptional activity.

Another important finding of this study was the observation that GPCR agonists stimulate tyrosine phosphorylation of STAT3 in a biphasic manner. A rapid but transient peak of tyrosine phosphorylation is followed by a much stronger and sustained phase of activation. The first peak correlates well with the transient activation of Jaks by GPCRs. Both the early and late activation phases of STAT3 are dependent on Rac (and possibly Cdc42) activity. The rapid activation of STAT3 by Ang II was previously reported to be sensitive to inhibition of NADPH oxidase (55). In contrast, we found that late activation of STAT3 is not significantly inhibited by DPI in vascular SMC (data not shown). These results suggest that long term activation of STAT3 may involve an effector of Rac distinct from the NADPH oxidase complex. We also provide evidence of the involvement of an autocrine factor in mediating the late effects of GPCRs on STAT3. One likely candidate for this factor is the cytokine IL-6. Previous work has shown that Rac1 induces STAT3 activation through the production and autocrine action of IL-6 in HeLa cells (17). In agreement with these

findings, a neutralizing IL-6 receptor antibody abolished the stimulatory effect of thrombin on late activation of STAT3 in HeLa cells. The IL-6 receptor antibody failed to inhibit GPCR-mediated STAT3 activation in vascular SMC, but this may be explained by the fact that the antibody is raised against the human form. We did not detect any effect of IL-6 on STAT3 in vascular SMC, indicating that expression of the receptor is probably limiting. Indeed, the mRNAs for the IL-6 receptor and gp130 subunits were not detected in vascular SMC (35,44). However, it is still possible that GPCR activation stimulate the production of both IL-6 and its receptor. Consistent with this idea, Faruki et al. showed that expression of RacV12 induces the expression of both IL-6 and IL-6 receptor in HeLa cells (17).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank A. Koromilas, N. Lamarche, R. Treisman and D. Wojchowski for reagents. We also thank A. Veillette for critical reading of the manuscript and discussion. This work was supported by a grant to SM from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR; MOP-14650). SP and PC are the recipients of studentships from the Heart and Stroke Foundation of Canada and the CIHR, respectively. SM is an Investigator of the CIHR.

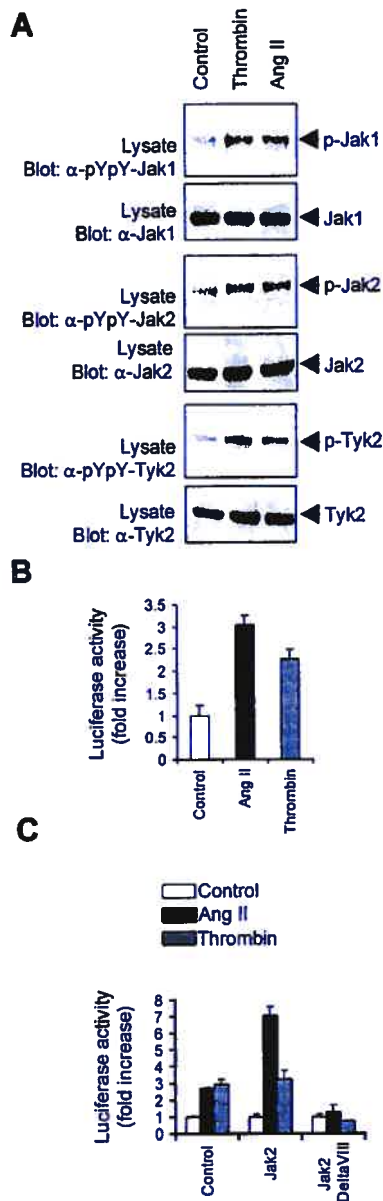


Figure 3.1. GPCR agonists stimulate Jak activity and STAT-dependent transcription in vascular SMC. **A**, Quiescent rat vascular SMC were stimulated or not (Control) with thrombin (1 U/ml) or Ang II (100 nM) for 3 min. The activation of Jaks was monitored by immunoblotting of total lysate proteins with phospho-specific antibodies to activation loop tyrosine residues. Expression levels of Jak1, Jak2 and Tyk2 were analysed by reprobing the membrane with isoform-specific antibodies. **B**, Vascular SMC were transfected with pGL-2xIFP53GAS-luc reporter plasmid. After 24 h, the cells were serum-starved 48 h and stimulated with Ang II or thrombin for 24 h. The activity of luciferase was measured and normalized to β -galactosidase. **C**, Vascular SMC were transfected with the pGL-2xIFP53GAS-luc reporter together with 500 ng of pcDNA3, pEF-BOS-Jak2 or pEF-BOS-Jak2 Δ VIII. Serum-starved cells were stimulated with Ang II or thrombin, and luciferase activity was measured. The luciferase data are presented as fold increase over unstimulated control and represent the mean \pm SE of triplicate determinations. Results in **A** are representative of five experiments. Results in **B** and **C** are representative of three independent experiments.

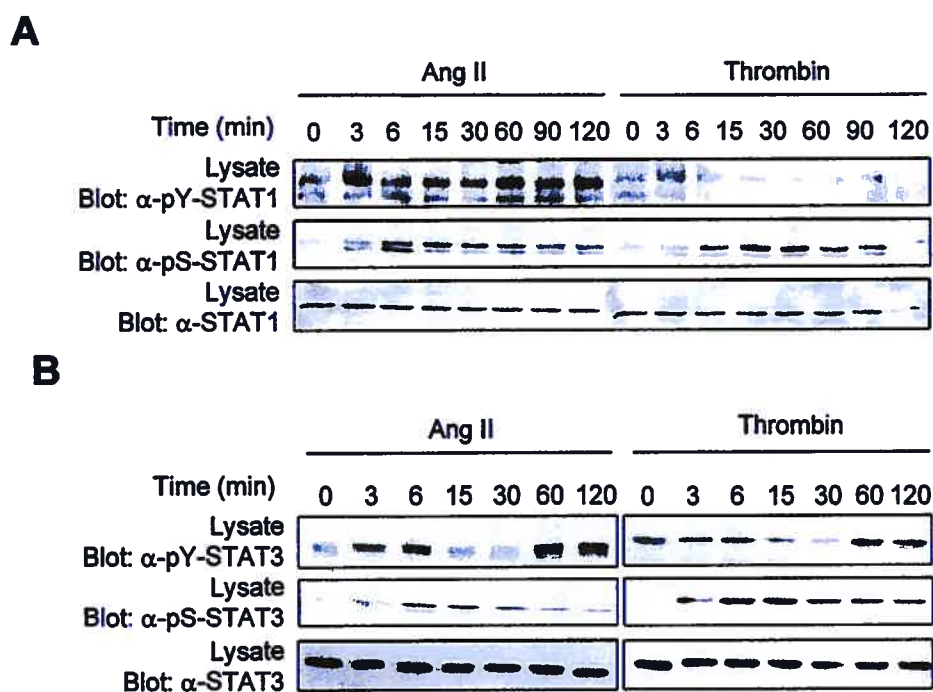


Figure 3.2. GPCRs stimulate tyrosine and serine phosphorylation of STAT1 and STAT3 in vascular SMC. Quiescent vascular SMC were stimulated with thrombin or Ang II for the indicated times. The activation of STAT1 (**A**) and STAT3 (**B**) was monitored by immunoblotting of total lysate proteins with phospho-specific antibodies to the C-terminal tyrosine of STAT1 (Tyr701) and STAT3 (Tyr705). Serine phosphorylation of STAT1 and STAT3 was monitored by immunoblotting with phospho-specific antibodies to Ser727. The expression levels of STATs 1 and 3 were analyzed by reprobing the membrane with isoform-specific antibodies. Results presented are representative of three experiments.

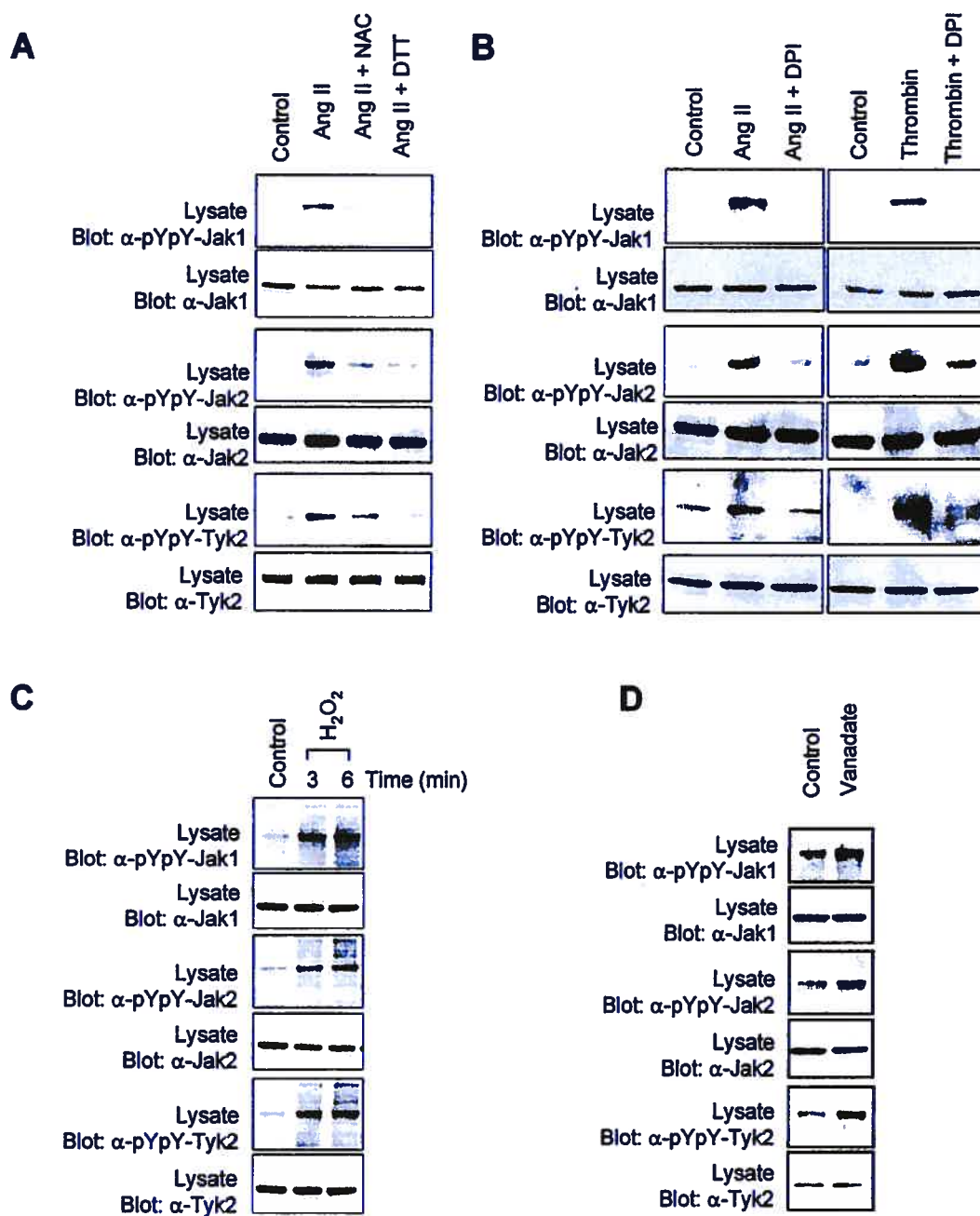
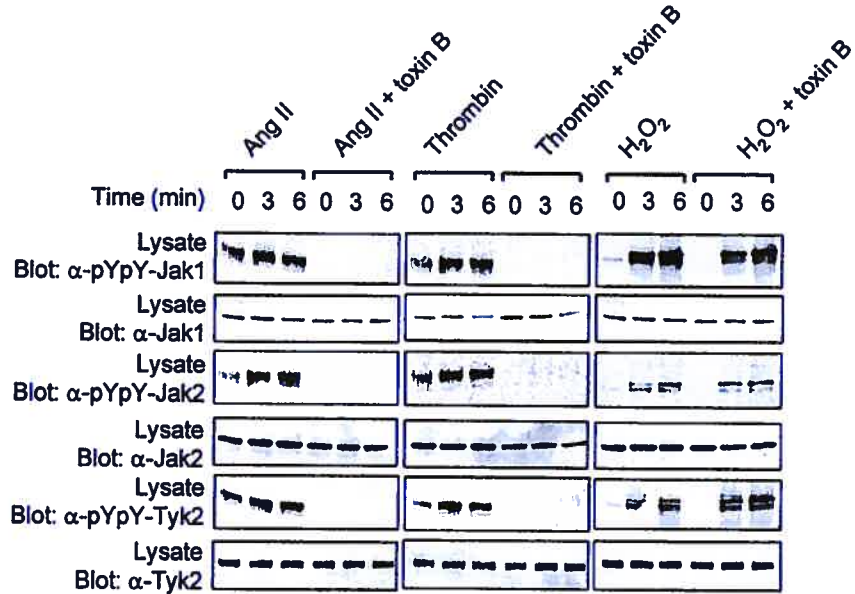
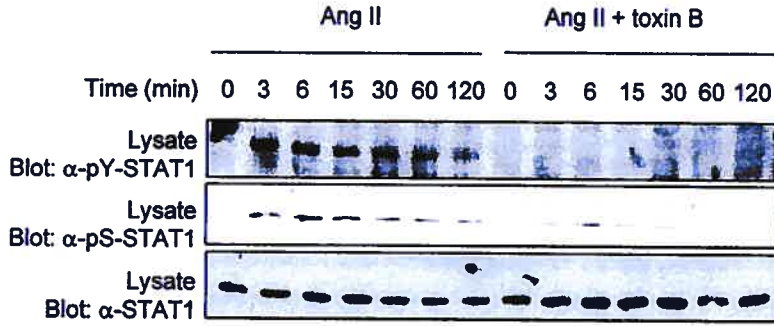


Figure 3.3. Activation of Jaks by GPCRs is dependent on the production of ROS. **A**, Quiescent vascular SMC were pre-treated or not for 30 min with the antioxidants N-acetyl-L-cysteine (NAC; 30 mM) or dithiothreitol (DTT; 30 mM), and then stimulated with Ang II for 3 min. **B**, Quiescent cells were pre-treated or not for 1 h with the NADPH oxidase inhibitor DPI (10 μ M) and stimulated with Ang II or thrombin for 3 min. **C**, Quiescent cells were incubated with 250 μ M H₂O₂ for the indicated times. **D**, Quiescent cells were incubated with 500 μ M vanadate for the indicated times. The activation of Jaks was monitored by immunoblotting of total lysate proteins with phospho-specific antibodies to activating tyrosine residues. Results are representative of at least three independent experiments.

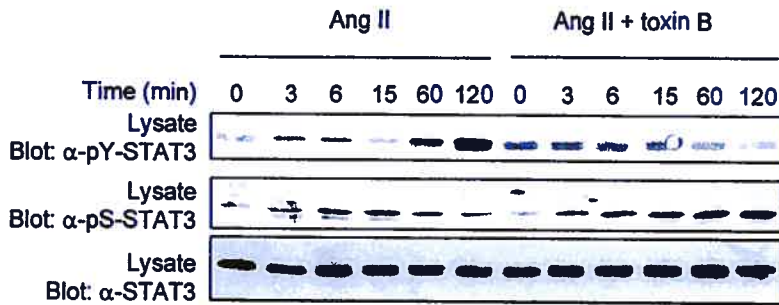
A



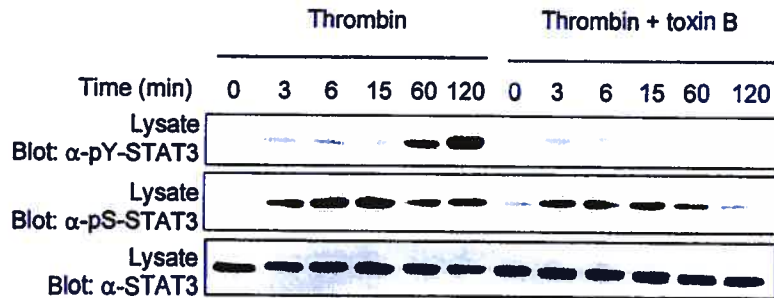
B



C



D



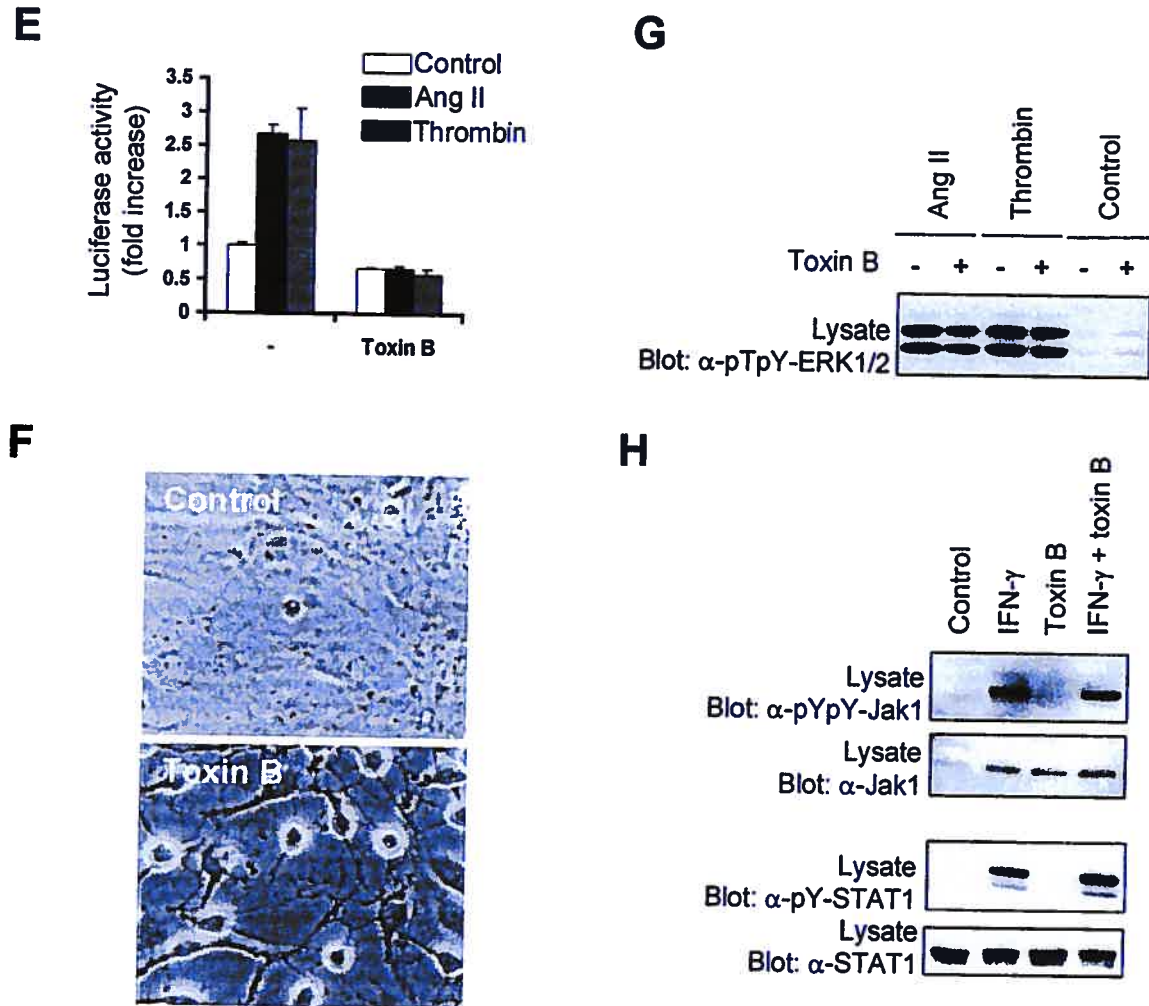


Figure 3.4. Rho GTPases are required for activation of the Jak/STAT pathway by GPCRs. **A to D**, Quiescent vascular SMC were pre-treated or not for 3 h with *C. difficile* toxin B (5 ng/ml), and then stimulated with Ang II, thrombin or H₂O₂ for the indicated times. The activation of Jaks (**A**), STAT1 (**B**) and STAT3 (**C** and **D**) was monitored by immunoblotting of total lysate proteins with phospho-specific antibodies to activating tyrosine residues. Ser727 phosphorylation of STAT1/3 was assessed by immunoblotting with phospho-specific antibodies (**B**, **C** and **D**). **E**, Vascular SMC were transfected with pGL-2xIFP53GAS-luc reporter plasmid. Serum-starved cells were pre-treated or not for 6 h with toxin B (0.5 ng/ml), and then stimulated with Ang II or thrombin for 24 h. The activity of luciferase was measured and normalized to β -galactosidase. Data are expressed as fold increase over unstimulated control and represent the mean \pm SE of triplicate determinations. Results in **A** to **E** are representative of three independent experiments. **F**, Phase contrast micrographs showing the effect of toxin B on the morphology of vascular SMC. **G**, Quiescent cells were pre-treated or not with toxin B, and then stimulated with Ang II or thrombin for 5 min. The activating phosphorylation of Erk1/Erk2 was monitored by immunoblotting of lysate proteins with a phospho-specific antibody. **H**, Quiescent vascular SMC were pre-treated or not with toxin B, and then stimulated with IFN γ for 15 min. The activation of Jak1 and STAT1 was monitored as described above.

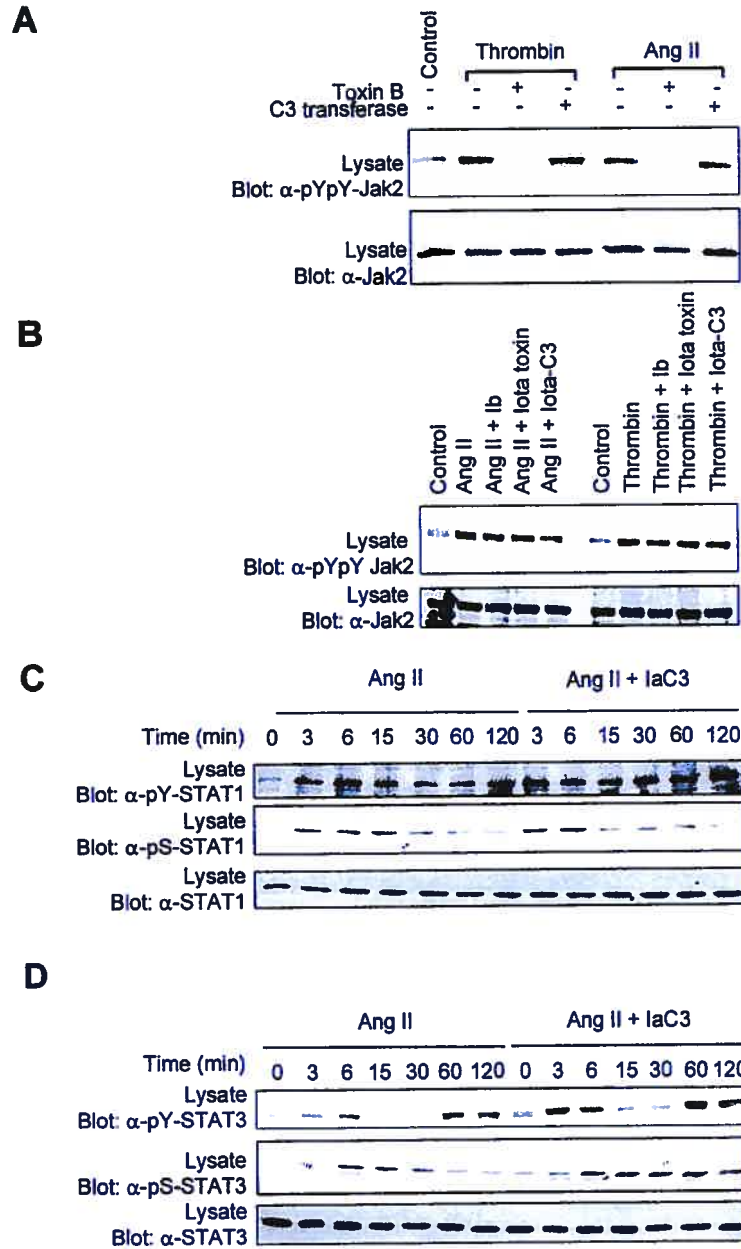


Figure 3.5. Rho is necessary for the transcriptional activation of STATs by GPCRs.

A, Quiescent vascular SMC were pre-treated or not for 3 h with *C. difficile* toxin B (5 ng/ml) or for 48 h with *C. botulinum* C3 transferase (20 μg/ml). **B**, Quiescent cells were pre-treated or not for 24 h with Iota toxin subunit Ib (7 μg/ml), Iota toxin (Ia and Ib) (7 μg/ml of each subunit) or Iota-C3 fusion protein (7 μg/ml of Ia-C3 and Ib). The cells were then stimulated with Ang II or thrombin for 3 min. The activation of Jak2 was monitored by immunoblotting of lysate proteins with a phospho-specific antibody to activating tyrosine residues. **C to E**, Quiescent cells were pre-treated or not for 24 h with Iota-C3 fusion protein, and then stimulated with Ang II or thrombin for the indicated times. The activation and serine phosphorylation of STAT1 (**C**) and STAT3 (**D** and **E**) were monitored by immunoblotting with phospho-specific antibodies.

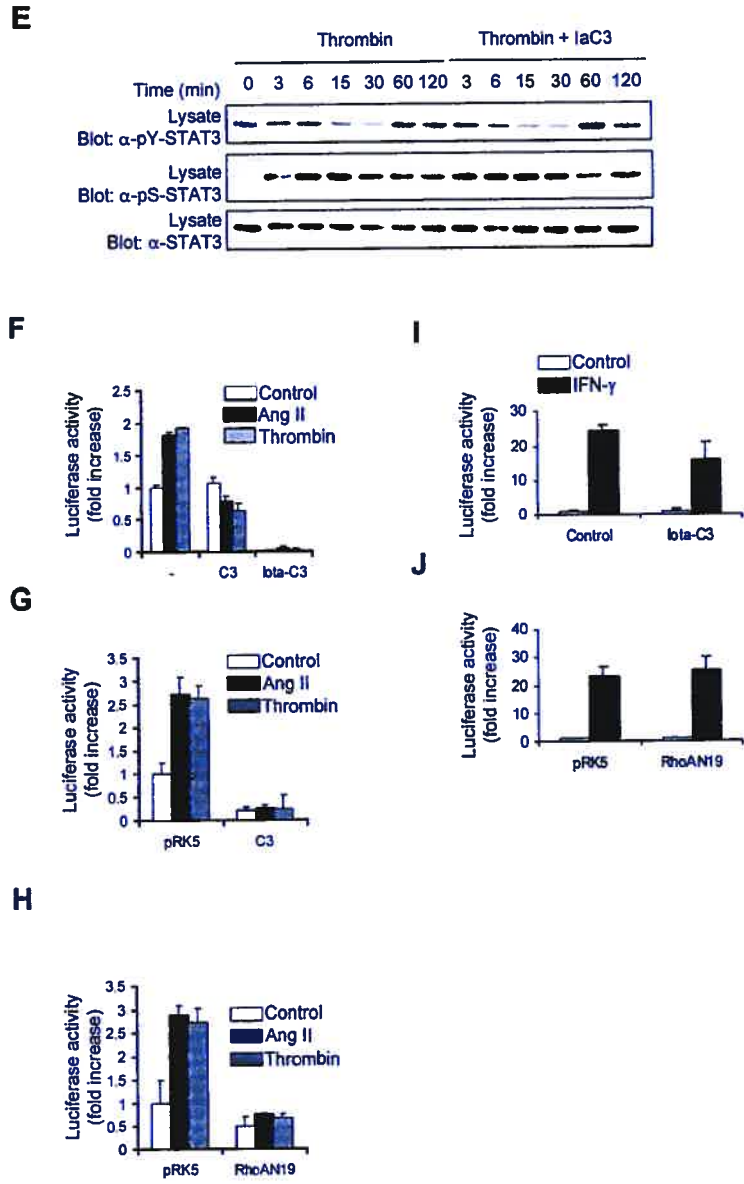


Figure 3.5. (continued) **F**, Vascular SMC were transfected with pGL-2xIFP53GAS-luc reporter plasmid. Serum-starved cells were pre-treated or not for 48 h with C3 transferase (10 μ g/ml) or for 6 h with I α C-3 fusion toxin, and then stimulated with Ang II or thrombin for 24 h. The activity of luciferase was measured and normalised to β -galactosidase. **G** and **H**, Vascular SMC were transfected with the pGL-2xIFP53GAS-luc reporter together with 500 ng of pEF-Myc-C3 transferase (**G**) or pRK5-MycRhoAN19 (**H**). Serum-starved cells were stimulated with Ang II or thrombin for 24 h, and luciferase activity was measured. Luciferase data are presented as fold increase over unstimulated control and represent the mean \pm SE of triplicate determinations. Results in **A** to **H** are representative of three independent experiments. **I**, Vascular SMC were transfected with pGL-2xIFP53GAS-luc reporter plasmid. Serum-starved cells were pre-treated or not with I α C-3 fusion toxin, and then stimulated with IFN γ for 6 h. The activity of luciferase was measured and normalised to β -galactosidase. **J**, Vascular SMC were transfected with the GAS reporter together with 500 ng of pRK5-MycRhoAN19. Serum-starved cells were stimulated with IFN γ for 6 h, and luciferase activity was measured. Results are representative of three experiments.

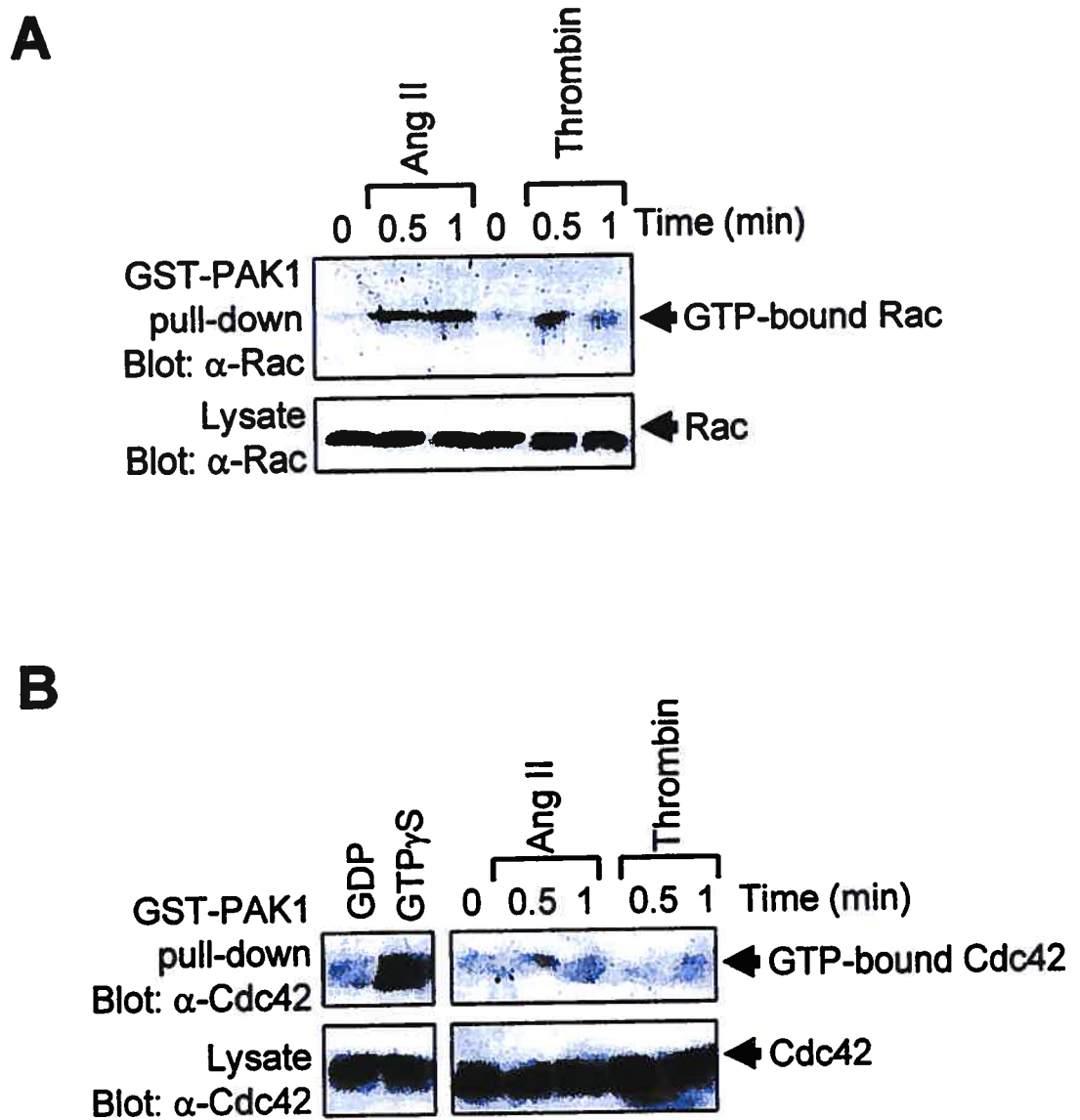


Figure 3.6. GPCR agonists activate Rac but not Cdc42 in vascular SMC. A and B, Quiescent vascular SMC were stimulated with Ang II or thrombin for the times indicated. The activity of Rac1 (A) and Cdc42 (B) was determined by measuring the amount of GTP-loaded protein bound to GST-Pak as described in Methods. Control assays were carried out by incubating lysates of unstimulated cells with either GTP γ S (positive control) or GDP (negative control) for 15 min at 25°C prior to incubation with GST-Pak1 beads. Results are representative of three experiments.

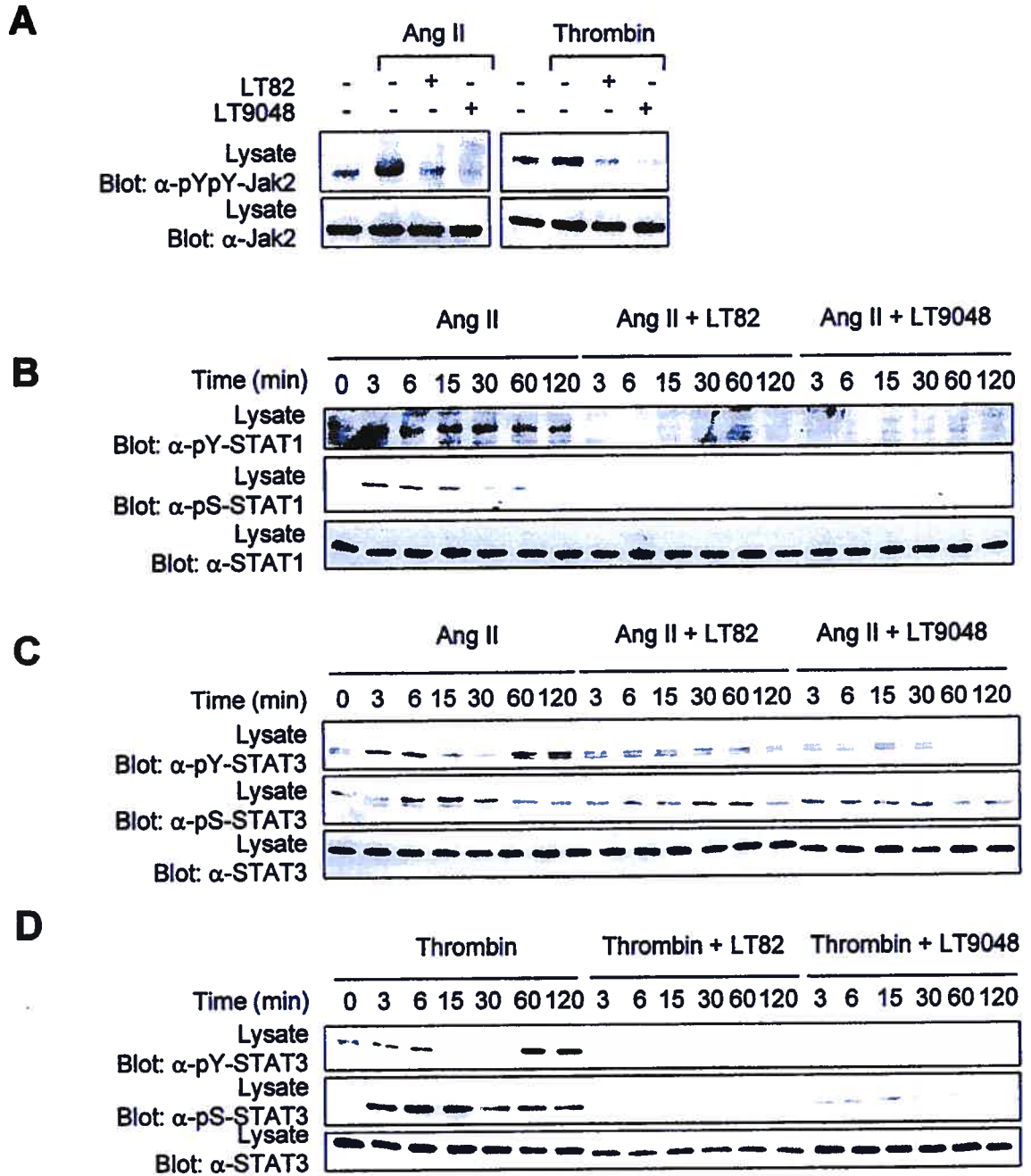


Figure 3.7. Role of Rac and Cdc42 in Jak2 activation and induction of STAT-dependent transcription by GPCRs. **A**, Quiescent vascular SMC were pre-treated or not for 4 h with *C. sordellii* LT82 (5 μ g/ml) or LT9048 (5 μ g/ml), and then stimulated with thrombin or Ang II for 3 min. The activation of Jak2 was monitored by immunoblotting of lysate proteins with a phospho-specific antibody. **B** to **D**, Quiescent cells were pre-treated or not for 4 h with LT82 or LT9048, and then stimulated with Ang II or thrombin for the indicated times. The activation and serine phosphorylation of STAT1 (**B**) and STAT3 (**C** and **D**) were monitored by immunoblotting with phospho-specific antibodies.

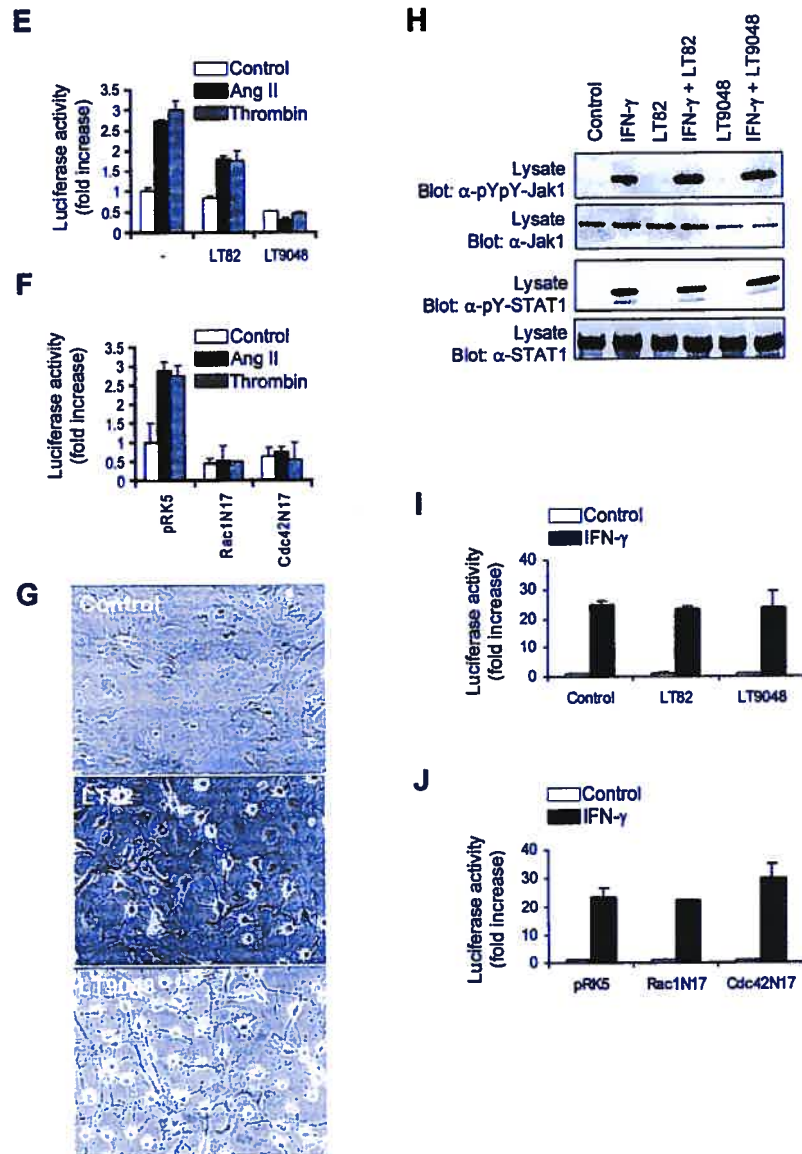


Figure 3.7. (continued) **E**, Vascular SMC were transfected with pGL-2xIFP53GAS-luc reporter plasmid. Serum-starved cells were pre-treated or not for 4 h with LT82 or LT9048, and then stimulated with Ang II or thrombin for 24 h. The activity of luciferase was measured and normalized to β -galactosidase. **F**, Vascular SMC were transfected with the pGL-2xIFP53GAS-luc reporter together with 500 ng of pRK5-MycRac1N17 or pRK5-MycCdc42N17. Serum-starved cells were stimulated with Ang II or thrombin, and luciferase activity was measured. Luciferase data are presented as fold increase over unstimulated control and represent the mean \pm SE of triplicate determinations. Results in **A** to **F** are representative of three independent experiments. **G**, Phase contrast micrographs showing the effects of LT82 and LT9048 on the morphology of vascular SMC. **H**, Quiescent cells were pre-treated or not with LT82 or LT9048, and then stimulated with IFN γ for 15 min. The activation of Jak1 and STAT1 was monitored as described above. **I**, Vascular SMC were transfected with the GAS reporter, and treated or not with LT82 or LT9048. Serum-starved cells were then stimulated with IFN γ for 6 h, and luciferase activity was measured. **J**, Vascular SMC were transfected with the GAS reporter together with 500 ng of pRK5-MycRac1N17 or pRK5-Cdc42N17. Serum-starved cells were stimulated with IFN γ for 6 h, and luciferase activity was measured. Results are representative of three experiments.

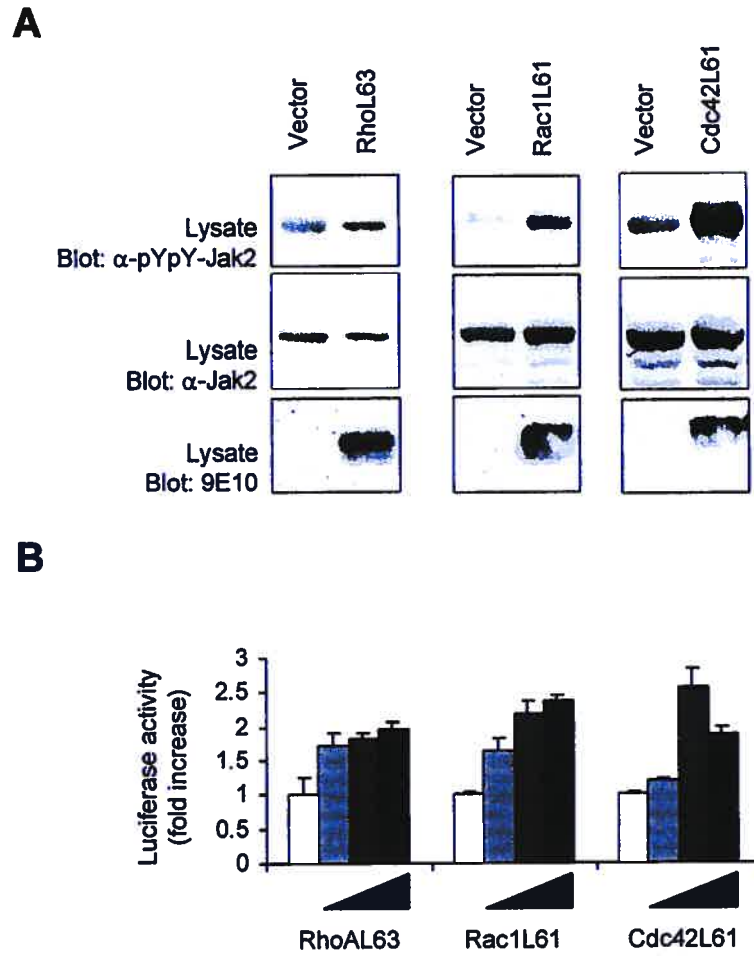


Figure 3.8. Activation of Jak2 and STAT-dependent transcription by Rho GTPases. **A**, COS-7 cells were transfected with pEF-BOS-Jak2 (250 ng) together with 250 ng of pRK5-MycRhoAL63 (left panel), pRK5-MycRac1L61 (middle panel) or pRK5-MycCdc42L61 (right panel). The cells were serum-starved for 24 h and the activation of Jak2 was monitored by immunoblotting of total lysate proteins with a phospho-specific antibody to activating tyrosine residues. Expression level of Jak2 and Rho GTPases was analyzed by immunoblotting with anti-Jak2 and anti-Myc antibodies, respectively. **B**, Vascular SMC were transfected with the pGL-2xIFP53GAS-luc reporter together with increasing amounts (from 50 to 400 ng) of pRK5-MycRhoAL63, pRK5-MycRac1L61 or pRK5-MycCdc42L61. The cells were serum-starved for 18 h and luciferase activity was measured. Results are representative of three independent experiments.

A

	Rac1L61A37	Rac1L61C40	Rac1L61K40	Rac1L61
p65 ^{Pak} binding	+	-	-	+
p67 ^{phox} binding	+	+	-	+
p160 ^{ROK} binding	-	+	+	+
p65 ^{Pak} activation	+	-	-	+
JNK activation	+	-	-	+
Rho activation	-	+	+	+

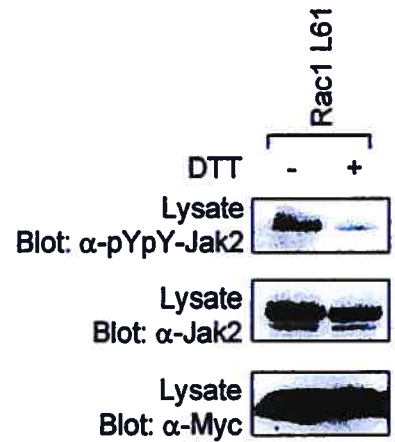
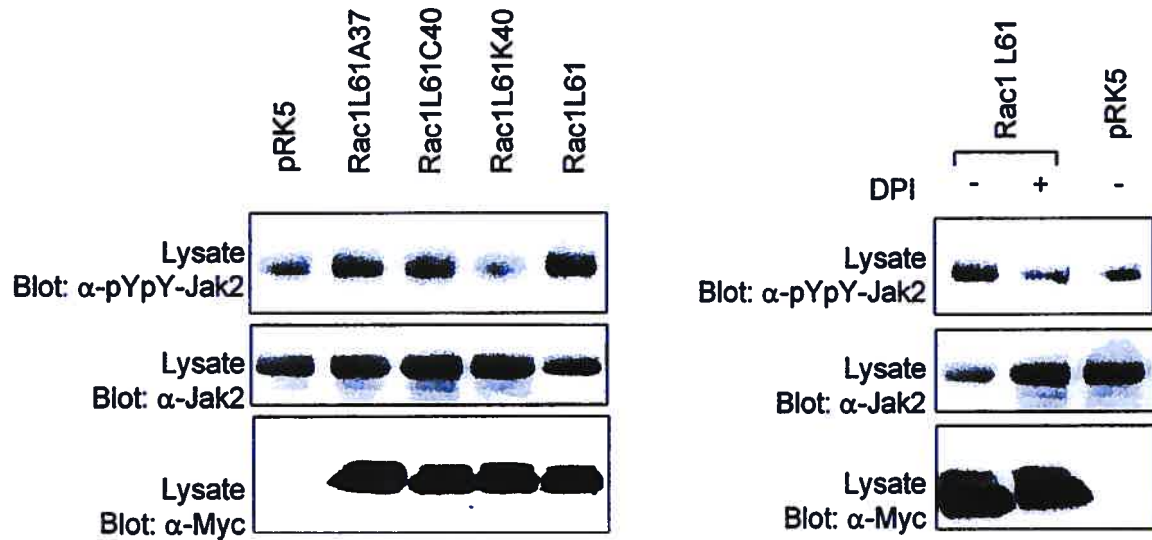
B**C**

Figure 3.9. Effect of Rac1 effector loop mutants on Jak2 activity. **A**, COS-7 cells were transfected with pEF-BOS-Jak2 (100 ng) together with 250 ng of the indicated mutants of Rac1. The cells were serum-starved for 24 h and the activation of Jak2 was monitored by immunoblotting with a phospho-specific antibody. Expression levels of Jak2 and Rac were analyzed by immunoblotting with anti-Jak2 and anti-Myc antibodies, respectively. **B** and **C**, As in **(A)**, except that COS-7 cells were treated for 1 h with dithiothreitol (DTT; 30 mM) or DPI (10 μM) prior to harvesting. Results are representative of three independent experiments.

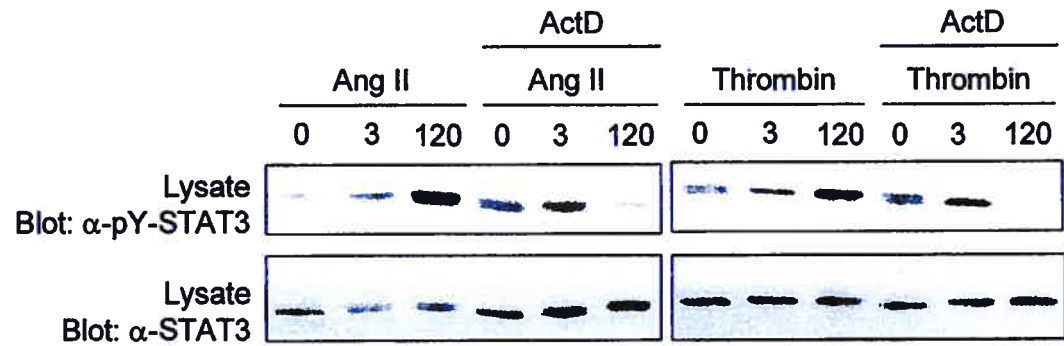
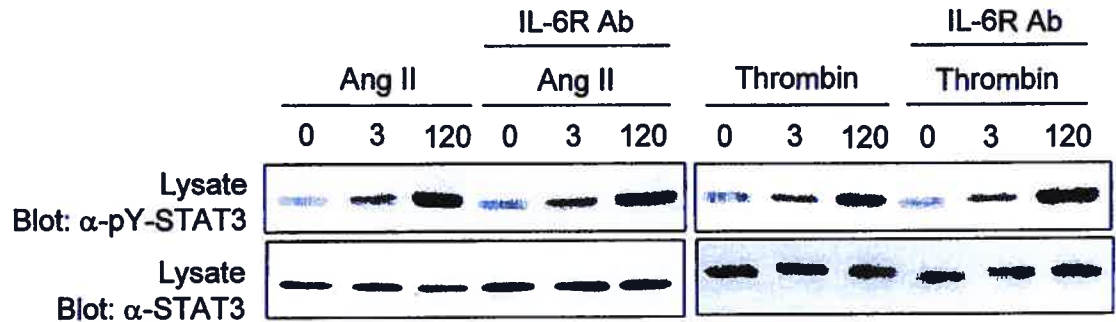
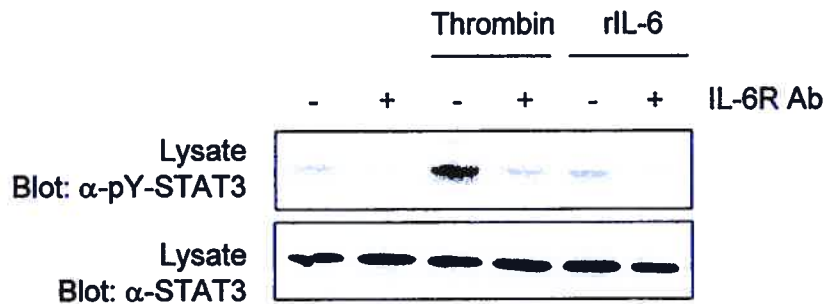
A**B****C**

Figure 3.10. Evidence that late phase activation of STAT3 is mediated by an autocrine factor. **A**, Vascular SMC were treated or not with ActD (5 μg/ml) for 60 min, and then stimulated with Ang II or thrombin for the times indicated. Activation of STAT3 was monitored by immunoblotting of lysate proteins with a phospho-specific antibody. **B**, Quiescent vascular SMC were incubated for 60 min in the absence or presence of a neutralizing antibody to IL-6 receptor, prior to stimulation with Ang II or thrombin. Activation of STAT3 was monitored as above. **C**, Growth-arrested HeLa cells were incubated or not with the IL-6 receptor antibody, and then stimulated with thrombin for 2 h. Activation of STAT3 was monitored as above. Results are representative of three experiments.

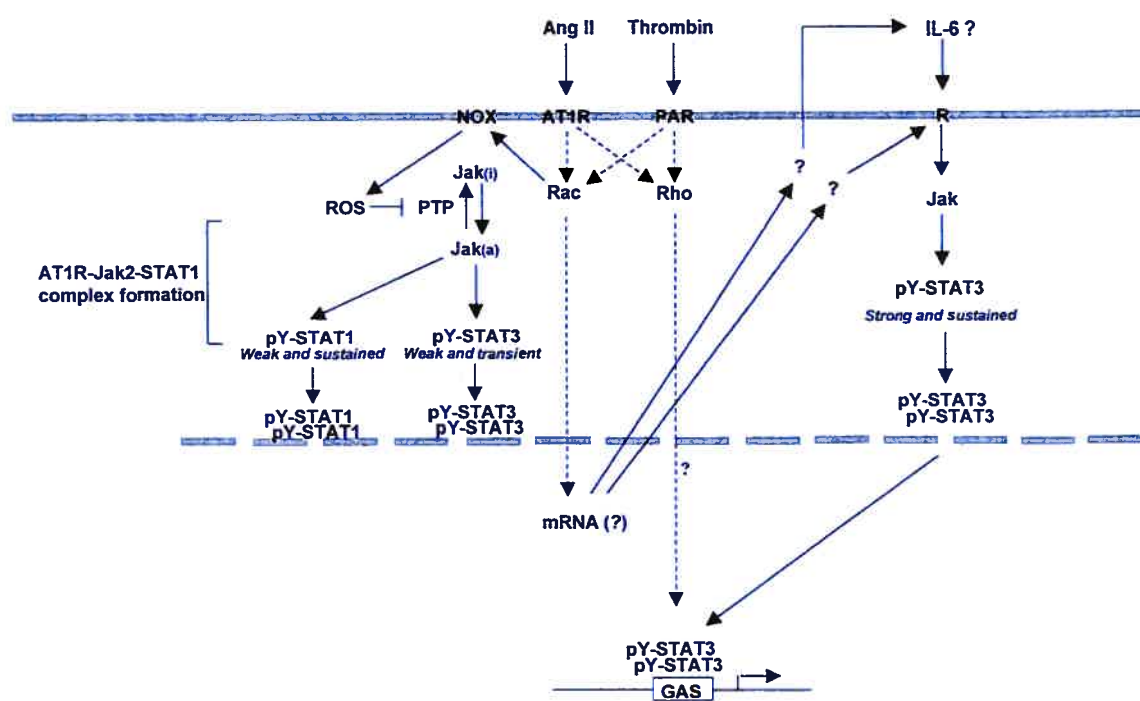


Figure 3.11. Proposed model for the role of Rho GTPases in the regulation of Jak activation and STAT-dependent transcription in response to GPCR engagement.

TABLE 1. Substrate selectivity of different bacterial toxins and their effects on activation of Jaks and STATs by GPCRs

Toxin	Inhibition ^a of:											STAT transcriptional activity
	Rho	Rac	Cdc42	Ras	Ral	Rap	Jak2 (YY1007/1008)	STAT1 (Y701)	STAT1 (S727)	STAT3 (Y705)	STAT3 (S727)	
<i>C. difficile</i> toxin B	++	++	++	-	-	-	++	++	+	++	-	++
<i>C. sordellii</i> LT82	-	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>C. sordellii</i> LT9048	-	++	++	++	+/-	+	++	++	++	++	++	++
<i>C. botulinum</i> C3 transferase	++	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	++
Iota Ib	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	-
Iota Ib + Ia	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	-
Ib + Ia-C3	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++

^a Symbols: ++, strong inhibition; +, moderate inhibition; -, no inhibitory effect; +/-, weak inhibition; ND, not determined.

REFERENCES

1. **Aktories, K., G. Schmidt, and I. Just.** 2000. Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol.Chem.* **381**:421-426.
2. **Ali, M. S., P. P. Sayeski, and K. E. Bernstein.** 2000. Jak2 acts as both a STAT1 kinase and as a molecular bridge linking STAT1 to the angiotensin II AT1 receptor. *J.Biol.Chem.* **275**:15586-15593.
3. **Ali, M. S., P. P. Sayeski, L. B. Dirksen, D. J. Hayzer, M. B. Marrero, and K. E. Bernstein.** 1997. Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. *J.Biol.Chem.* **272**:23382-23388.
4. **Ali, M. S., P. P. Sayeski, A. Safavi, M. Lyles, and K. E. Bernstein.** 1998. Janus kinase 2 (Jak2) must be catalytically active to associate with the AT1 receptor in response to angiotensin II. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **249**:672-677.
5. **Babior, B. M.** 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**:1464-1476.
6. **Benard, V., B. P. Bohl, and G. M. Bokoch.** 1999. Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *J.Biol.Chem.* **274**:13198-13204.
7. **Bhat, G. J., T. J. Thekkumkara, W. G. Thomas, K. M. Conrad, and K. M. Baker.** 1994. Angiotensin II stimulates sis-inducing factor-like DNA binding activity. Evidence that the AT1A receptor activates transcription factor-Stat91 and/or a related protein. *J.Biol.Chem.* **269**:31443-31449.
8. **Bishop, A. L. and A. Hall.** 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem.J.* **348 Pt 2**:241-255.

9. **Bokoch, G. M.** 1994. Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP-binding proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.* **6**:212-218.
10. **Caselli, A., R. Marzocchini, G. Camici, G. Manao, G. Moneti, G. Pieraccini, and G. Ramponi.** 1998. The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H₂O₂. *J.Biol.Chem.* **273**:32554-32560.
11. **Cunnick, J. M., J. F. Dorsey, L. Mei, and J. Wu.** 1998. Reversible regulation of SHP-1 tyrosine phosphatase activity by oxidation. *Biochem.Mol.Biol.Int.* **45**:887-894.
12. **Darnell, J. E., Jr.** 1997. STATs and gene regulation. *Science* **277**:1630-1635.
13. **Decker, T. and P. Kovarik.** 2000. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* **19**:2628-2637.
14. **Denu, J. M. and K. G. Tanner.** 1998. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* **37**:5633-5642.
15. **Diebold, B. A. and G. M. Bokoch.** 2001. Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat.Immunol.* **2**:211-215.
16. **El Hadj, N. B., M. R. Popoff, J. C. Marvaud, B. Payrastre, P. Boquet, and B. Geny.** 1999. G-protein-stimulated phospholipase D activity is inhibited by lethal toxin from *Clostridium sordellii* in HL-60 cells. *J.Biol.Chem.* **274**:14021-14031.
17. **Faruqi, T. R., D. Gomez, X. R. Bustelo, D. Bar-Sagi, and N. C. Reich.** 2001. Rac1 mediates STAT3 activation by autocrine IL-6. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**:9014-9019.
18. **Feng, J., B. A. Witthuhn, T. Matsuda, F. Kohlhuber, I. M. Kerr, and J. N. Ihle.** 1997. Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol.Cell Biol.* **17**:2497-2501.

19. **Finkel, T.** 1998. Oxygen radicals and signaling. *Curr.Opin.Cell Biol.* **10**:248-253.
20. **Gauzzi, M. C., L. Velazquez, R. McKendry, K. E. Mogensen, M. Fellous, and S. Pellegrini.** 1996. Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase. *J.Biol.Chem.* **271**:20494-20500.
21. **Giasson, E., M. J. Servant, and S. Meloche.** 1997. Cyclic AMP-mediated inhibition of angiotensin II-induced protein synthesis is associated with suppression of tyrosine phosphorylation signaling in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* **272**:26879-26886.
22. **Goldman, R., S. Moshonov, and U. Zor.** 1999. Calcium-dependent PAF-stimulated generation of reactive oxygen species in a human keratinocyte cell line. *Biochim.Biophys.Acta* **1438**:349-358.
23. **Guilleux, F., C. Pallard, I. Dusanter-Fourt, H. Wakao, L. A. Haldosen, G. Norstedt, D. Levy, and B. Groner.** 1995. Prolactin, growth hormone, erythropoietin and granulocyte-macrophage colony stimulating factor induce MGF-Stat5 DNA binding activity. *EMBO J.* **14**:2005-2013.
24. **Greene, E. L., V. Velarde, and A. A. Jaffa.** 2000. Role of reactive oxygen species in bradykinin-induced mitogen-activated protein kinase and c-fos induction in vascular cells. *Hypertension* **35**:942-947.
25. **Griendling, K. K., C. A. Minieri, J. D. Ollerenshaw, and R. W. Alexander.** 1994. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* **74**:1141-1148.
26. **Gupta, S., H. Yan, L. H. Wong, S. Ralph, J. Krolewski, and C. Schindler.** 1996. The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN-alpha signals. *EMBO J.* **15**:1075-1084.

27. **Han, Y., M. S. Runge, and A. R. Brasier.** 1999. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ.Res.* **84**:695-703.
28. **Heim, M. H., I. M. Kerr, G. R. Stark, and J. E. Darnell, Jr.** 1995. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science* **267**:1347-1349.
29. **Hill, C. S., J. Wynne, and R. Treisman.** 1995. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* **81**:1159-1170.
30. **Ihle, J. N.** 1995. Cytokine receptor signalling. *Nature* **377**:591-594.
31. **Jiao, H., K. Berrada, W. Yang, M. Tabrizi, L. C. Plataniias, and T. Yi.** 1996. Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Mol.Cell Biol.* **16**:6985-6992.
32. **Jove, R.** 2000. STAT Signaling. *Oncogene* **19**: 2466-2656.
33. **Ju, H., V. J. Venema, H. Liang, M. B. Harris, R. Zou, and R. C. Venema.** 2000. Bradykinin activates the Janus-activated kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway in vascular endothelial cells: localization of JAK/STAT signalling proteins in plasmalemmal caveolae. *Biochem.J.* **351**:257-264.
34. **Kjoller, L. and A. Hall.** 1999. Signaling to Rho GTPases. *Exp.Cell Res.* **253**:166-179.
35. **Klouche, M., S. Bhakdi, M. Hemmes, and S. Rose-John.** 1999. Novel path to activation of vascular smooth muscle cells: up-regulation of gp130 creates an autocrine activation loop by IL-6 and its soluble receptor. *J.Immunol.* **163**:4583-4589.
36. **Knebel, A., H. J. Rahmsdorf, A. Ullrich, and P. Herrlich.** 1996. Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.* **15**:5314-5325.

37. **Kodama, H., K. Fukuda, J. Pan, S. Makino, M. Sano, T. Takahashi, S. Hori, and S. Ogawa.** 1998. Biphasic activation of the JAK/STAT pathway by angiotensin II in rat cardiomyocytes. *Circ.Res.* **82**:244-250.
38. **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**:91-100.
39. **Lamarche, N., N. Tapon, L. Stowers, P. D. Burbelo, P. Aspenstrom, T. Bridges, J. Chant, and A. Hall.** 1996. Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* **87**:519-529.
40. **Lee, S. R., K. S. Kwon, S. R. Kim, and S. G. Rhee.** 1998. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J.Biol.Chem.* **273**:15366-15372.
41. **Lukashova, V., C. Asselin, J. J. Krolewski, M. Rola-Pleszczynski, and J. Stankova.** 2001. G-protein-independent activation of Tyk2 by the platelet-activating factor receptor. *J.Biol.Chem.* **276**:24113-24121.
42. **Marrero, M. B., B. Schieffer, W. G. Paxton, L. Heerdt, B. C. Berk, P. Delafontaine, and K. E. Bernstein.** 1995. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* **375**:247-250.
43. **Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, A. Aragay, G. del Real, A. M. Martin, A. J. Vila-Coro, A. Serrano, F. Mayor, Jr., and A. Martinez.** 1998. The chemokine monocyte chemoattractant protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor. *J.Immunol.* **161**:805-813.

44. **Mullberg, J., T. Geib, T. Jostock, S. H. Hoischen, P. Vollmer, N. Voltz, D. Heinz, P. R. Galle, M. Klouche, and S. Rose-John.** 2000. IL-6 receptor independent stimulation of human gp130 by viral IL-6. *J.Immunol.* **164**:4672-4677.
45. **Myers, M. P., J. N. Andersen, A. Cheng, M. L. Tremblay, C. M. Horvath, J. P. Parisien, A. Salmeen, D. Barford, and N. K. Tonks.** 2001. TYK2 and JAK2 are substrates of protein tyrosine phosphatase 1B. *J.Biol.Chem.*
46. **Nicholson, S. E., T. A. Willson, A. Farley, R. Starr, J. G. Zhang, M. Baca, W. S. Alexander, D. Metcalf, D. J. Hilton, and N. A. Nicola.** 1999. Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *EMBO J.* **18**:375-385.
47. **Nishio, E. and Y. Watanabe.** 1997. The involvement of reactive oxygen species and arachidonic acid in alpha 1-adrenoceptor-induced smooth muscle cell proliferation and migration. *Br.J.Pharmacol.* **121**:665-670.
48. **Paik, J. H., S. Chae, M. J. Lee, S. Thangada, and T. Hla.** 2001. Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of alpha vb. *J.Biol.Chem.* **276**:11830-11837.
49. **Patterson, C., J. Ruef, N. R. Madamanchi, P. Barry-Lane, Z. Hu, C. Horaist, C. A. Ballinger, A. R. Brasier, C. Bode, and M. S. Runge.** 1999. Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J.Biol.Chem.* **274**:19814-19822.
50. **Popoff, M. R.** 1987. Purification and characterization of *Clostridium sordellii* lethal toxin and cross-reactivity with *Clostridium difficile* cytotoxin. *Infect.Immun.* **55**:35-43.

51. **Richard, J. F., L. Petit, M. Gibert, J. C. Marvaud, C. Bouchaud, and M. R. Popoff.** 1999. Bacterial toxins modifying the actin cytoskeleton. *Int.Microbiol.* **2**:185-194.
52. **Rodriguez-Frade, J. M., A. J. Vila-Coro, A. Martin, M. Nieto, F. Sanchez-Madrid, A. E. Proudfoot, T. N. Wells, A. Martinez, and M. Mellado.** 1999. Similarities and differences in RANTES- and (AOP)-RANTES-triggered signals: implications for chemotaxis. *J.Cell Biol.* **144**:755-765.
53. **Rodriguez-Linares, B. and S. P. Watson.** 1994. Phosphorylation of JAK2 in thrombin-stimulated human platelets. *FEBS Lett.* **352**:335-338.
54. **Royal, I., N. Lamarche-Vane, L. Lamorte, K. Kaibuchi, and M. Park.** 2000. Activation of cdc42, rac, PAK, and rho-kinase in response to hepatocyte growth factor differentially regulates epithelial cell colony spreading and dissociation. *Mol.Biol.Cell* **11**:1709-1725.
55. **Schieffer, B., M. Luchtefeld, S. Braun, A. Hilfiker, D. Hilfiker-Kleiner, and H. Drexler.** 2000. Role of NAD(P)H oxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signaling and cytokine induction. *Circ.Res.* **87**:1195-1201.
56. **Schindler, C. and J. E. Darnell, Jr.** 1995. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu.Rev.Biochem.* **64**:621-651.
57. **Seasholtz, T. M., M. Majumdar, D. D. Kaplan, and J. H. Brown.** 1999. Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ.Res.* **84**:1186-1193.
58. **Servant, M. J., P. Coulombe, B. Turgeon, and S. Meloche.** 2000. Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J.Cell Biol.* **148**:543-556.

59. **Shuai, K., C. M. Horvath, L. H. Huang, S. A. Qureshi, D. Cowburn, and J. E. Darnell, Jr.** 1994. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* **76**:821-828.
60. **Simon, A. R., U. Rai, B. L. Fanburg, and B. H. Cochran.** 1998. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Am.J.Physiol* **275**:C1640-C1652.
61. **Simon, A. R., H. G. Vikis, S. Stewart, B. L. Fanburg, B. H. Cochran, and K. L. Guan.** 2000. Regulation of STAT3 by direct binding to the Rac1 GTPase. *Science* **290**:144-147.
62. **Sundaresan, M., Z. X. Yu, V. J. Ferrans, D. J. Sulciner, J. S. Gutkind, K. Irani, P. J. Goldschmidt-Clermont, and T. Finkel.** 1996. Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem.J.* **318 (Pt 2)**:379-382.
63. **Tokunou, T., T. Ichiki, K. Takeda, Y. Funakoshi, N. Iino, H. Shimokawa, K. Egashira, and A. Takeshita.** 2001. Thrombin induces interleukin-6 expression through the cAMP response element in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **21**:1759-1763.
64. **Van Aelst, L. and C. D'Souza-Schorey.** 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* **11**:2295-2322.
65. **Vila-Coro, A. J., J. M. Rodriguez-Frade, D. A. Martin, M. C. Moreno-Ortiz, A. Martinez, and M. Mellado.** 1999. The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J.* **13**:1699-1710.
66. **Wedgwood, S., R. W. Dettman, and S. M. Black.** 2001. ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **281**:L1058-L1067.
67. **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.

68. **Wick, K. R. and M. T. Berton.** 2000. IL-4 induces serine phosphorylation of the STAT6 transactivation domain in B lymphocytes. *Mol.Immunol.* **37**:641-652.
69. **Wong, A. H., J. E. Durbin, S. Li, T. E. Dever, T. Decker, and A. E. Koromilas.** 2001. Enhanced antiviral and antiproliferative properties of a STAT1 mutant unable to interact with the protein kinase PKR. *J.Biol.Chem.* **276**:13727-13737.
70. **Wong, M., S. Uddin, B. Majchrzak, T. Huynh, A. E. Proudfoot, L. C. Platanias, and E. N. Fish.** 2001. Rantes activates Jak2 and Jak3 to regulate engagement of multiple signaling pathways in T cells. *J.Biol.Chem.* **276**:11427-11431.
71. **Yamakawa, T., S. Tanaka, K. Numaguchi, Y. Yamakawa, E. D. Motley, S. Ichihara, and T. Inagami.** 2000. Involvement of Rho-kinase in angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **35**:313-318.
72. **Yamamoto, K., F. W. Quelle, W. E. Thierfelder, B. L. Kreider, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, O. Silvennoinen, and J. N. Ihle.** 1994. Stat4, a novel gamma interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation. *Mol.Cell Biol.* **14**:4342-4349.
73. **Yeh, T. C. and S. Pellegrini.** 1999. The Janus kinase family of protein tyrosine kinases and their role in signaling. *Cell Mol.Life Sci.* **55**:1523-1534.
74. **Zhuang, H., Z. Niu, T. C. He, S. V. Patel, and D. M. Wojchowski.** 1995. Erythropoietin-dependent inhibition of apoptosis is supported by carboxyl-truncated receptor forms and blocked by dominant-negative forms of Jak2. *J.Biol.Chem.* **270**:14500-14504.

**Chapitre 3. Inhibition de Rac par l'AMP cyclique :
impact sur la morphologie des cellules musculaires lisses
vasculaire, la signalisation et la réponse hypertrophique
de l'Ang II**

4.1. MISE EN SITUATION

La poursuite des travaux visant la caractérisation des effets négatifs de l'AMP cyclique sur l'activation des Jaks a conduit à des résultats difficilement interprétables. Cependant, certaines observations ont mené à une explication tangible permettant d'expliquer à la fois l'action anti-proliférative, anti-hypertrophique et anti-migratoire de l'AMP cyclique ainsi que l'inhibition de l'activation des Janus kinases par l'Ang II.

L'élévation d'AMP cyclique dans les VSMCs conduit à des changements morphologiques majeurs nommés *arbirization*, *stellation* ou bien encore le phenotype de l'AMP cyclique (*cAMP phenotype*). Ces changements morphologiques sont caractérisés par un désordre dans l'organisation des filaments d'actine, la perte des points d'adhésion focaux et la formation de minuscules anneaux d'actine filamenteuse. Comme les petites protéines G de la famille Rho sont fréquemment responsables de l'organisation de l'Actine et l'activation de la voie Jak/STAT par l'Ang II et la thrombine, nous avons émis l'hypothèse que Rac pourrait être inhibé en réponse à l'élévation d'AMP cyclique. Nous avons démontré que l'inhibition de la petite protéine G Rac par l'utilisation de toxines bactériennes et de cDNA encodants une forme dominante-négative conduit également à la stellation des VSMCs. À l'inverse, l'introduction de forme active de Rac1 dans les VSMCs renverse les effets de l'AMP cyclique sur la stellation et la formation d'anneaux d'actine. Finalement, nous avons démontré que la capacité de Rac à outrepasser les effet de l'AMP cyclique réside dans la capacité de cette petite protéine G à activer la Rho-kinase. Ces résultats font ressortir deux points majeurs : 1) l'AMP cyclique inhibe l'action de Rac et permet ainsi d'expliquer l'effet inhibiteur de l'AMP cyclique sur la croissance et la migration dans lesquelles Rac joue un rôle prépondérant et 2) de mettre en évidence, pour la première fois in vivo, que Rac peut conduire à l'activation de la Rho-kinase et que cette dernière contribue à l'étalement des VSMCs et la formation de lamellipodes et de renflements membrannaires.

4.2. ARTICLE 3.

Cyclic AMP induces arborization of Vascular Smooth Muscle Cells by Inhibiting the Rac-ROCK Signalling Pathway.

^{1,2}Stéphane Pelletier, ³Natalie Lamarche and ^{1,2,4,5}Sylvain Meloche.

¹Institut de Recherches Cliniques de Montréal and ²Departement of Pharmacology and ⁴Molecular Biology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. ³ Department of Anatomy and cell Biology, McGill University, Montréal, Québec, Canada.

⁵Author for correspondance

Sylvain Meloche

Institut de Recherches Cliniques de Montréal

110, Avenue des Pins Ouest

Montréal, Québec

Canada

H2W 1R7

SUMMARY

Cyclic AMP signaling regulates a vast array of signaling pathways leading to numerous, and sometimes opposite, phenomena in various cell types. In vascular smooth muscle cells (SMCs) these include inhibition of cell growth and migration as well as inhibition of contraction. cAMP elevating agents also induce profound morphological changes referred to as “the cAMP phenotype”, stellation or arborization. We show here that arborization of vascular SMCs is associated with disruption of actin bundles and loss of focal adhesion contacts. We did gain information about the molecular basis underlying these morphological changes in vascular SMCs using various bacterial toxins and dominant negative mutants of the Rho family GTPases. Similarly to cAMP, inhibition of Rac function induces the “cAMP phenotype” in vascular SMCs. In counterpart, ectopic expression of an activated mutant of Rac1 (Rac1L61) impairs forskolin-induced cAMP phenotype. Together, these observations suggest that cAMP elevating agents inhibited Rac function at the level of Rac or upstream to Rac activation rather than by inhibiting downstream effectors of the Small GTPase. Consistent with this finding, pre-treatment of the vascular SMCs with Forskolin prevented Ang II-induced GTP loading of Rac. We also found that the ability of Rac to counteract the cAMP phenotype resides in its ability to activate the p160^{ROCK} (ROCK) since an active mutant of Rac1, which no longer activate the Rho-kinase (Rac1L61A37), failed to impair forskolin-induced cAMP phenotype. Consistent with this finding, inhibition of ROCK activity by Y-27632 also induces stellation of vascular SMCs. Taken together, these results indicate that cAMP elevating agents induce profound morphological changes in vascular SMCs by inhibiting basal Rac/ROCK signaling. Furthermore, inhibition of Rac/ROCK signaling pathway in vascular SMCs may have important consequence on various cell fate including migration, cell growth and contraction.

INTRODUCTION

Cyclic AMP (cAMP) is a ubiquitous second messenger that is synthesized in cells by adenylyl cyclases (AC) in response to various stimuli. It is now well established that cAMP signaling regulates a vast array of cellular processes. Depending on the cellular origin and the Differentiation state of the cells, cAMP is found to cause either growth inhibition or growth stimulation. For example, elevation of intracellular cAMP stimulates the proliferation of thyrocytes, keratinocytes, epithelial cells, hepatoocytes, and Swiss 3T3 cells; in contrast, it inhibits cell proliferation in fibroblasts, SMCs, lymphoid cells, and many tumorous cells (Pastan *et al.*, 1975; Dumont *et al.*, 1989; Taylor *et al.*, 1990; Assender *et al.*, 1992; Indolfi *et al.*, 1997). In addition to its effect on cell proliferation, cAMP signaling can also partially reverse the phenotype of transformed fibroblasts as well as other cancer cells.

cAMP signaling not only affects cell growth and migration but also impairs smooth muscle cell contraction. To date, the mechanism whereby cAMP inhibits smooth muscle contraction is through the activation of the cAMP-dependent kinase (PKA), which in turn phosphorylates the Myosin Light Chain Kinase (MLCK) thus reducing its activity. MLCK is one of the key components of the smooth muscle contractile apparatus. This enzyme catalyzes the phosphorylation of the light chain of the myosin. In its phosphorylated form the myosin interacts with actin to produce contraction (Adelstein, 1983). Growing body of evidence also argues in favour that actin polymerization and the integrity of the focal adhesion complexes are integral component of the contractile apparatus in SMCs (Gerthoffer *et al.*, 1989; Gunst *et al.*, 1992; Tseng *et al.*, 1997; Youn *et al.*, 1998; Gerthoffer and Gunst, 2001). Interestingly, cAMP has been reported to rapidly induces actin depolymerization and disruption of focal adhesion complexes (Ramakers and Moolenaar, 1998a) (Goldman and Abramson, 1990a; Goldman and Abramson, 1990b; Aharoni *et al.*, 1993; Dong *et al.*, 1998; Busca *et al.*, 1998; Sandau *et al.*, 2001; Hirshman *et al.*, 2001).

Regulation of filamentous (F)-actin organization and focal adhesion complexes is under control of many signaling proteins including the Rho family GTPases (Ridley and

Hall, 1992; Ridley *et al.*, 1992a; Mabuchi *et al.*, 1993a; Hotchin and Hall, 1995; Nobes and Hall, 1995; Kozma *et al.*, 1995). This family comprises at least ten members, and some additional isoforms: Rho (A, B, C isoforms), Rac (1, 2, 3 isoforms), Cdc42 (Cdc42Hs, G25K isoforms), Rnd1 (Rho6), Rnd2 (Rho7), Rnd3 (RhoE), RhoD, RhoG, TC10 and TTF (Bishop and Hall, 2000). Among these, the most extensively characterized isoforms are RhoA, Rac1 and 2 and Cdc42. These Small GTPases act as molecular switch cycling between inactive (GDP-bound) and active (GTP-bound) forms (Bishop and Hall, 2000). The major function of Rho family GTPases is to regulate assembly and organization of the cytoskeleton (Hall, 1998) thus playing important role in a variety of cellular processes involving cytoskeleton reorganization. These include cytokinesis (Mabuchi *et al.*, 1993b; Drechsel *et al.*, 1997; Prokopenko *et al.*, 2000), phagocytosis (Cox *et al.*, 1997a; Cox *et al.*, 1997b), pinocytosis (Ridley *et al.*, 1992b), cell migration (Nobes and Hall, 1999), morphogenesis (Settleman, 1999) and axon guidance (Luo *et al.*, 1997). Rho GTPases also regulate various biochemical events in cells such as activation of NF- κ B, serum response factor (SRF) and STAT transcription factors (Hill *et al.*, 1995; Perona *et al.*, 1997) (Turkson *et al.*, 1999; Simon *et al.*, 2000; Schuringa *et al.*, 2000; Pelletier *et al.*, 2003), activation of the c-jun N-terminal kinase and p38 MAP kinases signaling pathways (Coso *et al.*, 1995; Minden *et al.*, 1995a; Schuringa *et al.*, 2000), activation of the NADPH oxidase complex (Abo *et al.*, 1991), cell cycle progression (Olson *et al.*, 1995), cell-cell contact (Braga, 1999; Kaibuchi *et al.*, 1999), cell polarity (Johnson, 1999), mast cell secretion (Norman *et al.*, 1996) and transformation (Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997).

In various cell types, including vascular SMCs, cAMP elevating agents has been reported to induce profound morphological changes referred to as “cAMP phenotype” or stellation or arborization (Dong *et al.*, 1998; Busca *et al.*, 1998; Padmanabhan and Shelanski, 1998; Ramakers and Moolenaar, 1998b). In most, if not all cell types studied to date, the “cAMP phenotype” has been attributed to the depolymerization of actin filament, due to the inhibition of RhoA functions (Dong *et al.*, 1998; Busca *et al.*, 1998; Padmanabhan and Shelanski, 1998; Ramakers and Moolenaar, 1998b). We had undertaken this study to examine whether cAMP signaling interferes with Rho GTPases to induce stellation in

vascular SMCs. Using bacterial toxins or dominant negative mutants of the Rho family GTPases, we found that inhibition of Rac (but not Rho) induces stellate morphology in vascular SMCs. We also provide strong evidence that cAMP inhibits Rac functions upstream or at the level of the GTPase itself by reducing its GTP loading. Using effector loop mutants of the activated Rac1, we also found that activation of the p160^{ROCK} by Rac1L61 is required to prevent cAMP-induced stellation in vascular SMCs. These results suggest that Rac-dependent activation of the p160^{ROCK} is required for the normal morphology of vascular SMCs and this is confirmed by the observation that inhibition of the p160^{ROCK} activity also lead to the “cAMP phenotype”. These results also indicate that cAMP-elevating agents, by preventing Rac functions, impair many important, and in some case degenerative, cellular processes in vascular SMCs such as contraction, migration, and growth.

RESULTS

Cyclic AMP elevation induces stellate morphology of vascular SMCs.

In numerous cell types, increased level of intracellular cAMP is associated with morphological changes referred to as “cAMP phenotype”, stellation or arborization (Dong *et al.*, 1998; Busca *et al.*, 1998; Padmanabhan and Shelanski, 1998; Ramakers and Moolenaar, 1998b). Under normal conditions, vascular SMCs manifested SMC-like morphology (Figure 1A, Medium). The cells are flat and tightly adherent to the cell culture well. Treatment of vascular SMCs with a β 2-adrenergic receptor agonist, isoproterenol, or the activator of adenylyl cyclase forskolin induces profound and rapid morphological changes characterized by cell rounding and arborization resembling to neurite outgrowth (figure 1A and B). This morphological change is observed within 15 min, peak at 1h and is reverted to normal cell shapes (untreated-like cells) after 24h of treatment (Figure 1A). Changes in cytoplasm morphology are also observed in cells treated with other cAMP elevating agents such phosphodiesterase inhibitors (IBMX, 1mM) or rolipram (100 μ M) as well as in the presence of cAMP mimicking agent 8-Br-cAMP (1mM) (Data not shown). We further show that arborization of vascular SMCs is seen either in the presence or absence of serum (Fig 1B). Nevertheless, morphological changes are better seen in absence of serum suggesting that serum may contain factors preventing this effect such as lysophosphatidic acid (LPA), or any other growth factors.

cAMP is generally believed to signal through cAMP-dependent protein kinase (PKA). However, it is now well established that cAMP may activate several cAMP-binding proteins other than PKA. These are the cAMP receptor of *Dictyostelium discoideum*, which participates in the regulation of the development of this unicellular eukaryote (Klein *et al.*, 1988), the *S*-adenosyl homocysteine hydrolase, which participates in the regulation of protein methylation (Hohman *et al.*, 1985), the cyclic nucleotide-gated channels involved in transduction of olfactory and visual signals (Goulding *et al.*, 1992) and the cAMP-activated

guanine-nucleotide exchange factors (GEF) (Epac I or cAMP-GEF I and CNrasGEF), which activate specifically the monomeric G proteins of the Ras family, Rap-1 and Ras, respectively (de Rooij *et al.*, 1998). It is actually hard to discriminate the effect mediated by one of the various effector for cAMP except in term of the PKA / non PKA-dependent signaling. To test whether PKA is required in mediating morphological rearrangement by cAMP, cells were pre-treated or not with the PKA inhibitor, H89 (10 μ M), and then stimulated with increasing concentrations of forskolin. We found that pre-treatment of serum-deprived vascular SMCs with H-89 significantly impaired forskolin-induced stellation at any concentrations of forskolin used (Fig 1C). Similarly, Isoproterenol-induced stellate morphology is significantly reversed by pre-treatment of cells with the PKA inhibitor (figure 1D). Together, these results indicated that cAMP elevating agents promote severe morphological changes in vascular SMCs through a mechanism involving PKA.

The stellate morphology is characterized by the loss of actin bundles and focal adhesion complexes.

Analysis of Filamentous (F)-actin composition, by indirect immunofluorescence (IF) using rhodamine-conjugated phalloidin, revealed that the “cAMP phenotype” is associated with the loss of actin bundles (fig 2A Upper panel). In absence of serum, vascular SMCs are tightly adherent to the glass cover slips and show numerous stress fibers crossing the cytoplasm, lamellipodia on cell border and in some cases filipodia can be visualized (Figure 2A, Control). In the presence of forskolin, organized actin is completely absent and F-actin staining appears as fragmented spots through out the cytoplasm, which is “unstretched”, and closer to the nucleus (Fig 2A, forskolin). Using confocal microscopy, we also made the observations that forskolin treatments increase cell thickness (9.9 μ m, at the nucleus) and the nucleus is upper in the cell compared to untreated cells (6 μ m, at the nucleus) (Figure 2B). These results indicate that cAMP elevation in vascular SMCs destroy actin bundles and let the cytoplasm to retract through the nucleus. We also observed that forskolin treatment promotes the formation of “ring-like” structure of F-actin (Figure 2C).

Forskolin not only disrupted bundles of actin but also affects focal adhesion complexes. These complexes can be visualized by indirect immunofluorescence using anti-vinculin or anti-paxillin antibodies. In non-stimulated cells, vinculin-containing focal adhesion complexes are distributed at the anchorage of the cells to the glass cover slip as revealed by multiple punctuated staining (Fig 2A, Control). In forskolin-treated cells, vinculin staining diffused throughout the cytoplasm indicating the loss of focal adhesion complexes (Fig 2A, Forskolin). Consistent with these findings, treatment of vascular SMCs with forskolin impaired tyrosine phosphorylation of the paxillin (Data not shown), which is an important feature of focal adhesion assembly (reviewed in (Turner, 2000)).

In order to test whether depolymerization of actin is a consequence of “cAMP phenotype” or reversal of actin polymerisation leads to “cAMP phenotype” we monitored the impact of cytochalasin D, a well known inhibitor of F-actin assembly, on vascular SMCs morphology. Treatment of vascular SMCs with cytochalasin D (100nM, 2h) disrupted actin bundles and led to a nearly complete stellate morphology (Figure 2D, cytochalasin D). This indicates that disorganization of F-actin by forskolin stimulation is most likely responsible for the morphological changes in vascular SMCs.

Inhibition of Rac function promotes cAMP phenotype of vascular SMCs.

Inhibition of RhoA functions by cAMP elevating agents and the consequent cytoskeletal organization has been proposed for various cell types (Dong *et al.*, 1998; Busca *et al.*, 1998; Ramakers and Moolenaar, 1998b). To test the possibility that inhibition of Rho by cAMP accounts for forskolin-induced stellation of vascular SMCs we tested whether inhibition of Rho in these cells also induces cAMP phenotype. C3-transferase is a bacterial toxin from *Clostridium botulinum* known to ADP-ribosylates Rho at Asn-41 and inhibits its translocation to the membrane thus inhibiting its activity (Richard *et al.*, 1999; Aktories *et al.*, 2000). As shown in Figure 3A and B, treatment of vascular SMCs with C3-transferase, for over 48 h, does not induce stellation of vascular SMCs. Under similar conditions, C3-transferase is effective in inhibiting Ang II-induced STAT driven

transcription in vascular SMCs (Pelletier *et al.*, 2003). Consistently, treatment of vascular SMCs with a fusion Iota-C3 toxin, which is more rapidly internalized into cells and exhibit C3 activity (Richard *et al.*, 1999) failed to promote cAMP phenotype whereas it may inhibit GPCR-induced STAT-driven transcription (Pelletier *et al.*, 2003). These results indicate that, by contrast to many other cell types, inhibition of Rho by the C3-transferase is not sufficient to induce stellate morphology in serum-deprived vascular SMCs.

Actin organization is also under control of other members of Rho family GTPases such as Rac and Cdc42. In order to test whether Rac or Cdc42 inhibition may lead to cAMP phenotype in vascular SMCs, we evaluated the effect of the *Clostridium difficile* Toxin B (ToxB) on vascular SMCs morphology. ToxB is a bacterial toxin that selectively glucosylates Rho, Rac and Cdc42, and inhibits their function by preventing GTP binding (Richard *et al.*, 1999; Aktories *et al.*, 2000). Figure 3A and B shows that, in contrast to C3-transferase, ToxB induces morphological changes similar to the cAMP phenotype. The observation that ToxB but not C3-transferase induced stellation of vascular SMCs indicates that inhibition of Rac and/or Cdc42 induces cAMP phenotype in serum-deprived vascular SMCs. Consistent with this hypothesis, treatment of serum-deprived vascular SMCs with the *Clostridium sordellii* Lethal Toxins (LTs) from strain 82 (LT82) or LT from strain 9048 (LT9048) induced morphological changes similar to Toxin B and forskolin (Figure 3A and B). LT82 glucosylates and inactivates Rac, Ras, Rap, Ral, and to a lesser extent R-Ras proteins whereas LT9048 is known to inactivate Rac, Cdc42, Ras, and weakly Rap and R-Ras proteins. Because Rac is the common target of all these three bacterial toxins (ToxB and LTs), these results strongly suggest that inhibition of Rac by these bacterial toxins also promotes “cAMP phenotype” in vascular SMCs (See table 1). Figure 3B shows quantitative analysis of figure 3A and revealed that similarly to forskolin, ToxB, and both LTs induces stellate morphology in over 75% of vascular SMCs whereas similar phenotype is observed in less than 15% of the cells when exposed to Iota-C3 or C3 (figure 3B).

To improve these observations, effects of dominant-negative mutants of the RhoA (RhoAN19), Rac1 (Rac1N17) and Cdc42 (Cdc42N17) have been tested on vascular SMCs morphology. Expression of dominant-negative mutants of RhoA (Myc-RhoAN19) and the

dominant negative mutant of Cdc42 (Cdc42N17) in vascular SMCs failed to induce “stellate morphology”, whereas dominant-negative mutant of Rac1 (Myc-Rac1N17) did (Figure 3C). Quantitative analysis revealed that similarly to treatment with forskolin, expression of Rac1N17 induces cAMP phenotype in vascular SMCs. By contrast, expression of RhoAN19 failed to induce stellation. Quantitative analysis revealed that less than 20% of the cells expressing RhoAN19 show stellate morphology whereas this percentage increases to over 75% and 35% in cells expressing dominant negative Rac and Cdc42 respectively (Figure 3D). Together, these results clearly show that, similarly to forskolin stimulation, inhibition of Rac activity, either by using bacterial toxins or dominant negative mutant of Rac1 promotes “stellate morphology” in vascular SMCs.

cAMP elevating agents inhibit Rac function.

Because inhibition of Rac mimicked the effect of forskolin in vascular SMCs, we asked whether forskolin-induced arborization is attributed to Rac inhibition. In order to do this, we tested the ability of an active mutant of Rac1 (Rac1L61) to impair forskolin-induced cAMP phenotype in vascular SMCs. As previously reported (Nobes & Hall, 1995), expression of Rac1L61 in vascular SMCs induces actin polymerization leading to the formation of lamellipodia, membrane ruffling and to stress fibers (Figure 4A). We found that ectopic expression of Rac1L61 effectively induces formation of lamellipodia and membrane ruffling in vascular SMCs and in some cases stress fibers can be visualized (Figure 4A, Rac1L61 Control). Expression of Rac1L61 also completely impairs forskolin-induced cell arborization whereas expression of a Myc-Tagged GFP failed (Figure 4A Myc6GFP Forskolin). Quantitative analysis revealed that forskolin induces stellation of over 80% of cells expressing the Myc-Tag GFP whereas this percentage drops to less than 5% in Rac1L61 expressing cells (Figure 4B). The ability of Rac1L61 to counteract forskolin's effect revealed that cAMP signaling may interfere with the activation of the Small GTPase rather than inhibiting a downstream effector of Rac as it has been proposed for RhoA (Lang *et al.*, 1996).

cAMP inhibits Ang II-induced Rac GTP loading in vascular SMCs

Small GTPases of the Rho family, like all other GTPases, cycle between an active (GTP-bound) or inactive (GDP-bound) forms (except for the Rnd proteins (reviewed in (Bishop and Hall, 2000)). We already reported that stimulation of vascular SMCs by Ang II rapidly and strongly induces GTP loading of Rac (Rac1 or 2) (Pelletier *et al.*, 2003). To test whether cAMP elevating agents interfere with Rac function by influencing its GTP-bound form, we monitored the effect of forskolin on Ang II-induced GTP loading of Rac. Figure 5 shows that stimulation of the cells with Ang II rapidly and strongly increases GTP loading of Rac as measured by the association of the GTPase to the CRIB (Cdc42/Rac-interactive binding) domain of Pak1 (Pelletier *et al.*, 2003; Royal *et al.*, 2000). Pre-treatment of the cells with forskolin mostly inhibited the GTP loading of Rac proteins in vascular SMCs (Figure 5). This result suggests that the cAMP/PKA signaling either interferes with Rac GTP binding or increases that rate of GTP hydrolysis by the GTPase.

The cAMP phenotype is prevented by a Rac-ROCK signaling pathway.

Rac proteins has been shown to bind and activate multiple proteins of diverse activities. These include serine/threonine as well as tyrosine kinases, lipid kinases, phosphatases, lipases and scaffolding proteins (reviewed in (Bishop and Hall, 2000)). In order to define which signaling pathway is required to prevent forskolin-induced stellate morphology, we tested the ability of various effector loop mutants of constitutively activated Rac1 in preventing induction of cAMP phenotype. Introduction of the Y40C mutation into the effector loop of Rac disrupts its interaction with CRIB-containing proteins, such as Pak, WASP and POSH, but does not interfere with binding to NADPH oxidase subunit p67^{phox} or p160^{ROCK} (Lamarche *et al.*, 1996). The F37A mutation blocks p160^{ROCK} interaction, while the Y40K inhibits the interaction of Rac with Pak and p67^{phox} but not with p160^{ROCK} (Lamarche *et al.*, 1996). Ectopic expression of Rac1L61C40 and

rac1L61K40 mutants into vascular SMCs prevented forskolin-induced stellate morphology (Figure 6A). As previously reported (Lamarche *et al.*, 1996), both mutants induce lamellipodia formation and membrane ruffling. By contrast, expression of Rac1L61A37 failed to prevent forskolin-induced stellate morphology (Figure 6A) suggesting that activation of p160^{ROCK} by Rac is a prerequisite to prevent morphological changes induced by cAMP elevating agents. Quantitative analysis revealed that forskolin induces stellation of over 80% of cells expressing the Rac1L61A37 construct whereas this percentage drops to less than 5% in Rac1L61, rac1L61C40 and rac1L61K40 expressing cells (Figure 6B). In addition, we observed that Rac1L61 expressing cells are still able to prevent focal adhesion disassembly while Rac1L61A37 failed. This indicates that disruption of focal adhesion complexes by forskolin resides in its ability to inhibit the Rac/ROCK signaling pathway.

To define whether p160^{ROCK} activity is necessary to maintain normal phenotype of vascular SMCs in culture, we tested the ability of a specific ROCK I and II inhibitor (Y-27632) on vascular SMCs morphology (Uehata *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 2000). We found that treatment of vascular SMCs with Y-27632 (10 μ M) induces profound morphological changes similar to those observed with forskolin (10 μ M) (Figure 7A). Indeed, Y-27632 completely disrupts actin bundles and focal adhesion complexes (Figure 7B). These results confirm the central role played by the Rho-kinase in focal adhesion assembly and cell spreading.

DISCUSSION

cAMP and cAMP phenotype in vascular SMCs.

In response to cAMP, vascular SMCs undergo rapid morphological changes referred as cAMP phenotype, stellate shape or arborization. This morphological change has been visualized in numerous cell types including fibroblasts (Lamb *et al.*, 1988), smooth muscle cells (Chaldakov *et al.*, 1989), osteoblastic cells (Egan *et al.*, 1991), melanoma cells (Preston *et al.*, 1987), mesengial cells (Kreisberg *et al.*, 1984), astrocytes (Baorto *et al.*, 1992), and epithelial cells (Ortiz *et al.*, 1973) and in various neurone-related cells (Miller and Ruddle, 1974;Heidemann *et al.*, 1985;Rydel and Greene, 1988). Although, arborized cells seem appropriate in astrocytes and neurons, it is not the case in vascular SMCs.

Normal vascular SMCs are tightly attached to the glass coverslips and show actin stress fibers, lamellipodia, and in some cases filipodia as well as focal adhesion complexes. In vascular SMCs, the appearance of multiple dendrite-like structures, the loss of focal adhesion complexes and depolymerization of F-actin characterize forskolin-induced cAMP phenotype. Experimental evidences showed that actin disassembly is sufficient to induce stellation in vascular SMCs suggesting an essential role for the actin cytoskeleton in maintaining normal (spread) morphology of vascular SMCs. Actin polymerization and focal adhesion complexes are under control of Rho family GTPases. Interestingly, we found that, similarly to cAMP elevating agents, inhibition of Rac functions (but not Rho) using bacterial toxins or dominant negative mutants promotes stellate morphology, actin disassembly and loss of focal adhesion complexes. Furthermore, expression of an activated mutant of Rac1 (Rac1L61) impairs forskolin-induced cAMP phenotype. These results clearly indicate that inhibition of Rac functions is a required event leading to stellate morphology. In addition, the observation that expression of Rac1L61 is sufficient to impair forskolin-induced cAMP phenotype revealed that inhibiton of Rac function is not due to inhibition of a downstream effector but rather to the inhibition of the GTPase itself or an upstream signaling. In support of this sentence, we also found that cAMP impair angiotensin II-induced GTP loading of Rac. However, the molecular basis of this inhibition

has not been questioned here. Nonetheless, these results suggest that forskolin may impair GTP loading of Rac by either inhibiting upstream signaling or by activating of a GTPase activating protein (GAP).

In response to cAMP elevating agents, epithelial-like cells (SH-EP cells) also undergo stellation. Pre-treatment of these cells with thrombin impairs cAMP-induced stellate morphology which is reverted by the presence of the C3-transferase. They also show that expression of an active mutant of Rho (RhoAV14) overcome cAMP effects on cell shape (Dong *et al.*, 1998). Similarly, inhibition of a Rho/ROCK signaling cascade is required for cAMP-induced melanoma cell differentiation and arborization (Busca *et al.*, 1998). In these cells, Forskolin-induced stellation is mimicked by either C3-transferase or the toxin B from *C. botulinum*. Expression of an active mutant of RhoA (RhoAV14), or an active form of Rho kinase (p160^{ROCK}) impairs forskolin-induced stellate morphology. However, Buscà and coworkers revealed that an active mutant of Rac also impairs cAMP-induced arborization of melanoma cells. Since Rac can activate Rho (Nobes and Hall, 1995), it remains possible that cAMP may also impair Rac activity and thus Rho activation in melanoma cells as proposed by the authors. However, we found that expression of an active mutant of RhoA (RhoAL63) in vascular SMCs induces cell rounding apparently due to high stress fiber formation (data not shown) suggesting that it may not be required for cell spreading. Furthermore, inhibition of Rho by ectopic expression of RhoAN19, incubation of the cells with Iota-C3 or C3 has no effect on gross morphology of vascular SMCs. Furthermore, it has been reported that in response to cAMP elevating agents, PKA phosphorylates RhoA and consequently reduces its activity (Lang *et al.*, 1996). Therefore, if the ability of Rac to impair cAMP phenotype would have required the activation of Rho, Rac1L61 would have not been able to impair forskolin's effect on cell morphology. These results strongly support a model in which Rac, without the need of Rho, impairs cAMP phenotype in vascular SMCs.

A Rac/ROCK signaling.

One of the major biological effects mediated by Rac is to control the polymerization of actin at the leading edge of the plasma membrane, leading to the extension of lamellipodia and the subsequent formation of membrane ruffles (Ridley and Hall, 1992). Also, a hierarchical relationship between Cdc42, Rac and Rho has been suggested in Swiss 3T3 cells (Ridley and Hall, 1992; Nobes and Hall, 1995). Based on actin organization, it has been proposed that Cdc42 may activate Rac which in turn can activate Rho. However, recent observations also argue in favor that some effectors proposed to specifically interact with Rho can also bind to Rac. For example, Rac has been reported to bind and to activate the p160^{ROCK} and PRK2 (Lamarche *et al.*, 1996; Vincent and Settleman, 1997). Similarly, Rac and Cdc42 can both bind and activate PAK to stimulate PAK activity (Minden *et al.*, 1995b). Consistent with these observations, we found that active mutant of Rac1 which lack the ability to associate with p160^{ROCK} is unable to counteract forskolin-induced cAMP phenotype. Consistent with this observation, inhibition of p160^{ROCK} by Y-27632 also promotes cAMP phenotype in vascular SMCs. These results let us propose a model in which cAMP interferes with basal Rac activity (or activation) and this inhibition leads to a loss in p160^{ROCK} activity leading to actin disorganization and finally to arborization.

Inhibition of Rac downstream signaling by cAMP.

An important aspect of this study is the ability of cAMP to impair Rac activation and activity. In serum-deprived vascular SMCs, we found that inhibition of Rac by either bacterial toxin, dominant negative or cAMP has important impact on cell morphology. Beside this, inhibition of Rac by cAMP may have important consequences on many signaling downstream to Rac. GTP-bound Rac interact and activates the p21-activated kinase (PAK) leading to the activation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) and the stress activated protein kinase SAPK (p38 MAPkinase). Rac also bind and appears as an essential component of the NADPH oxidase complex which generate reactive oxygen species (ROS). Generally viewed as toxic byproducts of cell metabolism, ROS play essential role in host defence and is also now recognized as a second messenger in non-phagocytic cells

such as fibroblast or vascular SMCs. ROS are required for growth factor induce cell multiplication and hypertrophy. In vascular SMCs, rapid activation of the Jak/STAT signaling by GPCRs also required activation of a Rac/NADPH oxidase/ROS system (Pelletier *et al.*, In Press). In counterpart, cAMP impairs Ang II-induced rapid Jak activity (Giasson *et al.*, 1997; Meloche *et al.*, 2000), NADPH oxidase activity and ROS generation in neutrophils (Ahmed *et al.*, 1995) and GTP loading of Rac in platelets (Gratacap *et al.*, 2001)(present study).

Negative cross-talk between cAMP signaling and Rho GTPases functions.

Vascular SMCs growth, migration and contraction are important aspects of multiple cardiovascular disorders such as hypertension, atherosclerosis and restenosis after angioplasty. Small GTPases of the Rho family play key roles in all these phenomena (reviewed in (Nieuw Amerongen and van Hinsbergh, 2001)). Indeed, Rho GTPases are required for cell growth in all cell types studied (Olson *et al.*, 1995). Rho GTPases are also involved in SMC contraction (Nieuw Amerongen and van Hinsbergh, 2001). It is now well established that Rho and p160^{ROCK} are key regulators of cell contraction (Hirata *et al.*, 1992; Knebel *et al.*, 1996; Nieuw Amerongen and van Hinsbergh, 2001) and it is believe that Rac and Cdc42 may also play critical role in SMCs contraction. Beside Myosin Light chain phosphorylation, their role in cell contraction is not well established (Leung *et al.*, 1998; Nieuw Amerongen and van Hinsbergh, 2001). Rho GTPases are also required for cell migration. Although the role of Rac and Cdc42 in cell migration are well established, the role of Rho is less understood. Rac is involved in both cell protrusion at the leading edge and also required for cell retraction at the trailing edge via Pak (Sells *et al.*, 1999). Cdc42 is required for chemottractant gradient sensing and polarity of the cell (Nobes and Hall, 1999). A minimal Rho activity is required for cell migration whereas high degree of activation appears to inhibit cell migration (Nobes and Hall, 1999; Fukata *et al.*, 1999; Sawada *et al.*, 2000). Of interests, cAMP elevating agents are known to impairs all these phenomena in vascular smooth muscle cells (Pastan *et al.*, 1975; Dumont *et al.*, 1989; Taylor *et al.*, 1990; Assender *et al.*, 1992; Indolfi *et al.*, 1997).

Negative cross-talk between cyclic AMP and vascular SMCs growth.

Several mechanisms have been put forward to explain the anti-hypertrophic or anti-mitogenic action of cAMP signaling. Studies have proposed that, cAMP signaling inhibits growth factors-induced cell proliferation by interfering with the Ras-dependent activation of the MAP kinases Erk1/2 (Burgering *et al.*, 1993; Cook and McCormick, 1993; Graves *et al.*, 1993; Sevetson *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1993). On the other hand, other studies reported that cAMP signaling did block growth factors-induced cell growth without affecting MAP kinases Erk1/2 activation (Takahashi *et al.*, 1996; Giasson *et al.*, 1997; Meloche *et al.*, 2000). Similarly, cAMP signaling was reported to inhibit cell growth by inhibiting activation of the p70 S6 kinase in certain cell types but not in others (Kahan *et al.*, 1992; Monfar *et al.*, 1995). Many other growth controlling proteins were reported to be regulated by cAMP elevating agents such as JNK1 (Rao and Runge, 1996), EIF-4E (Graves *et al.*, 1995) and various cell cycle regulators (Trepel *et al.*, 1987; Rock *et al.*, 1992; Kato *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1996; Randall *et al.*, 1996; L'Allemain *et al.*, 1997). At the light of the present data and other previously reported ones (Giasson *et al.*, 1997; Meloche *et al.*, 2000), it is tempting to proposed that inhibition of vascular SMC growth and migration is presumably due to inhibition of Rac rather than inhibition of ERK1/2 MAP kinases, IP3 generation, p70S6K activation and other signaling pathways that are not directly downstream to the Small GTPases of the Rho family.

To our knowledge, this is the first study demonstrating that cAMP elevating agents interfere with Rac activation and having important impact on cytoskeletal organization and many signaling pathways. This observation may explain the inhibitory effect of cAMP elevating agents on vascular SMCs growth, motility and contraction.

METHODS

Material.

Ang II was purchased from Hukabel Scientific. Sodium orthovanadate, Isoproterenol were purchased from Sigma-Aldrich. *C. difficile* toxin B, *C. botulinum* C3 transferase and platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) and the p160ROCK inhibitor Y-27632 were from Calbiochem. The *C. sordellii* toxins LT82 and LT9048, Iota toxin and the fusion toxin Iota-C3 were purified as previously described (Popoff, 1987) and generously given by Dr Michel R. Popoff (Institut Pasteur Paris, France). Polyclonal and monoclonal anti-Myc antibodies (sc-40 and sc-789) were from Santa-Cruz Biotechnology. The monoclonal anti-Rac antibody was purchased from Upstate Biotechnology. The anti-paxillin monoclonal antibody clone 349 was purchased from Transduction laboratories. Rhodamine-conjugated phalloidin was purchased from Molecular Probes. FITC-conjugated anti-rabbit and anti-mouse antibody, and rhodamine-conjugated anti-rabbit and anti-mouse antibody were purchased from Jackson's Laboratory.

cDNAs and plasmids

The pRK5 expression vectors for Myc-tagged RhoAL63, RhoAN19, Rac1L61, Rac1N17, Cdc42L61, Cdc42N17, effector loop mutants of Rac1L61 and bacterial expression plasmid for recombinant GST-Pak1CRIB fusion protein have been described previously (Lamarche *et al.*, 1996). Plasmids encoding wild-type and kinase deficient p160^{ROCK} have been described elsewhere (Lamarche *et al.*, 1996)

Cell culture and transfection.

Rat vascular SMC were cultured and synchronized by serum starvation as described previously (Servant *et al.*, 2000). Vascular SMC were transiently transfected with expression plasmids using the FuGENE 6 transfection reagent (Roche Molecular Biochemicals). For immunofluorescence study, glass coverslips were treated with gelatin (0.1%) to increase adhesion rate of the cells.

Rac activation assays.

The recombinant GST fusion proteins of Pak1 (residues 56-272) was expressed in *E. coli* and purified on glutathione-agarose beads as described (Pelletier *et al.*, 2003). Vascular SMC were washed twice with PBS and lysed in buffer G (25 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% Igepal CA-630, 50 mM MgCl₂, 5 mM EDTA and 10% glycerol) for 30 min at 4^oC. Total lysate proteins (600µg) were incubated for 1h at 4^oC with 10 µg of GST-Pak1 bound to glutathione-agarose beads in a total volume of 800 µl. The beads were washed 3 times with buffer G, and the eluted proteins were resolved by SDS-gel electrophoresis. The amount of active GTP-loaded small GTPase bound was analysed by immunoblotting using monoclonal anti-Rac antibody (2 µg ml⁻¹) (Upstate Biotechnology).

Immunofluorescence Microscopy

For immunofluorescence analysis, vascular SMCs were plated on glass coverslips in 6 well plates and transfected as described previously [456] with a total of 4.8 ug of the corresponding plasmids per well. 18-20 h post-transfection, cells were treated or not with the cyclic AMP elevating agent forskolin for 45 min before immunofluorescence analysis were performed as described elsewhere with some modifications (Lamarche *et al.*, 1996). Briefly, Vascular SMCs were rinsed in PBS and fixed for 20 min in freshly prepared 3.7% (w/v) paraformaldehyde. All steps were carried out at room temperature, and coverslips were washed with PBS between each of the steps. After quenching in PBS containing 0.1M glycine for 5 min, cells were permeabilized in a solution of 0.1% Triton X-100 for 5 min. Cells were next double stained as following. Cells were first incubated with a solution of PBS containing 1% BSA and TRITC-conjugated phalloidin (Molecular Probes) for 30 min. Next, cells were incubated in the presence of the primary polyclonal antibodies anti-myc (sc-789, Santa-Cruz Biotechnologies), monoclonal anti Myc (9E10, sc-40, Santa-Cruz Biotechnologies), a monoclonal anti-vinculin (hVIN-1, Sigma-Aldrich) or anti-paxillin (Clone 349, Transduction Laboratories) diluted in PBS containing 1% BSA, for 60 min at 37°C. Coverslips were transferred to a second antibody mixture composed of FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody (Jacksons Laboratory). Coverslips were

mounted by inverting them onto 25 μ l of mounting medium (N-propylgalate; 5mg/ml, Glycerol 50% (w/v) and Tris-HCl; 100mM, pH 8.5). After 2 hr at room temperature, the coverslips were examined on a Zeiss axiophot microscope using Zeiss 40 \times 1.3 and 63 \times 1.4 oil immersion objectives. Fluorescence images were recorded on Kodak T-MAX 400ASA film.

Other Methods.

Protein concentrations were measured using the BCA protein assay kit (Pierce) with bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis.

The results are expressed as the mean \pm s.e.mean. The degree of significance of differences between experimental groups was performed by the ANOVA test followed by Dunnet or Bonferroni post-test analysis using GraphPad Software version 2.01. P values less than 5% were considered significant.

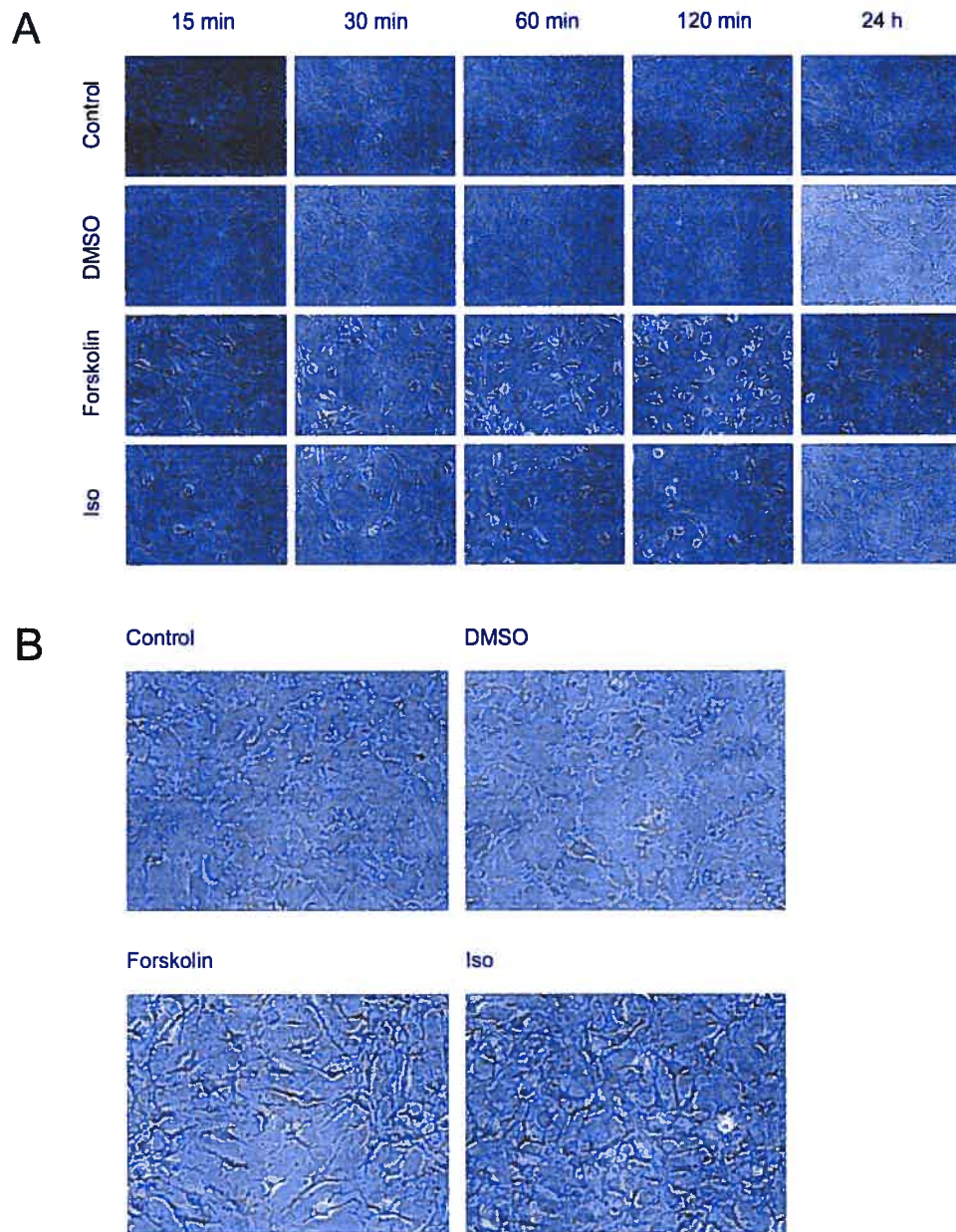


FIGURE 4.1. cAMP elevating agents induce profound morphological changes in vascular SMCs.

A. Confluent rat vascular SMCs were left untreated or treated with either Dimethylsulfoxide (DMSO 0.1%), Forskolin (10 μ M), or Isoproterenol (10 μ M) and gross morphological changes were monitored by phase contrast microscopy.

B. Serum deprived vascular SMCs were left untreated or treated with Forskolin (10 μ M) or Isoproterenol (10 μ M) for 1 h and gross morphological changes were monitored by phase contrast microscopy.

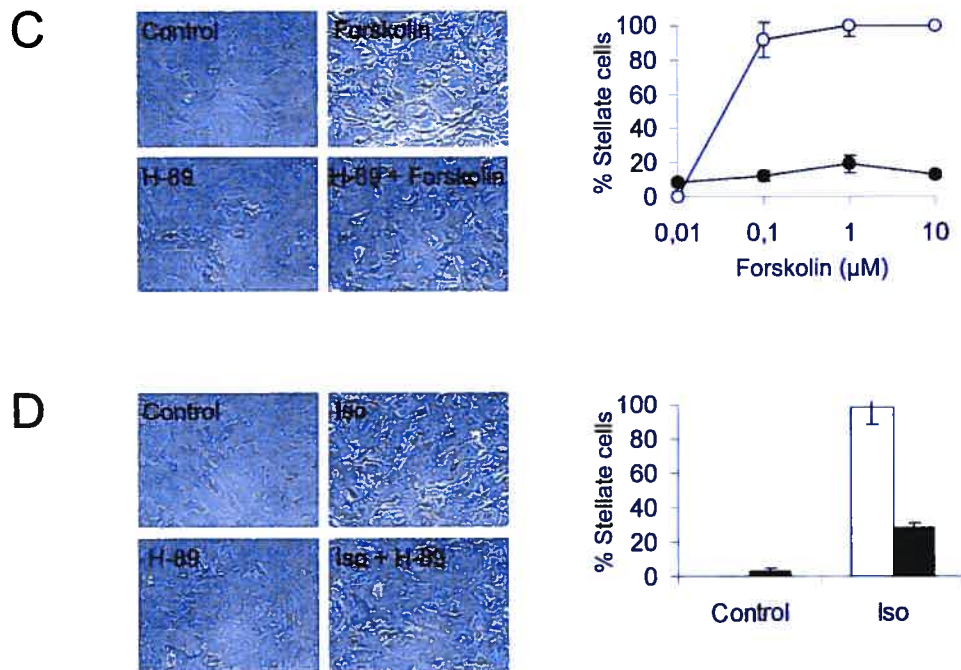


FIGURE 4.1 (continued)

C. PKA mediates cAMP-induced stellation. Serum-deprived vascular SMCs were left untreated (Control) or treated with the protein kinase A inhibitor (H89, 10 μM) before cells were stimulated or not with forskolin (Forskolin, 10 μM) (left panel). The right panel show quantification of forskolin-induced stellation in absence (open circle) or in the presence of H-89 (1h pre-treatment).

D. Serum deprived vascular SMCs were left untreated or treated with H89 (0 μM) for 1h before cells were stimulated or not with Isoproterenol (10 μM) (Left panel). The right panel show quantification of forskolin-induced stellation in absence (Open bars) or in the presence of H-89 (black bars).

Cells showing "cAMP phenotype" were scored positive and the graphs are expressed as % cells showing stellation (%Stellate cells). These experiments have been performed three times in triplicate values.

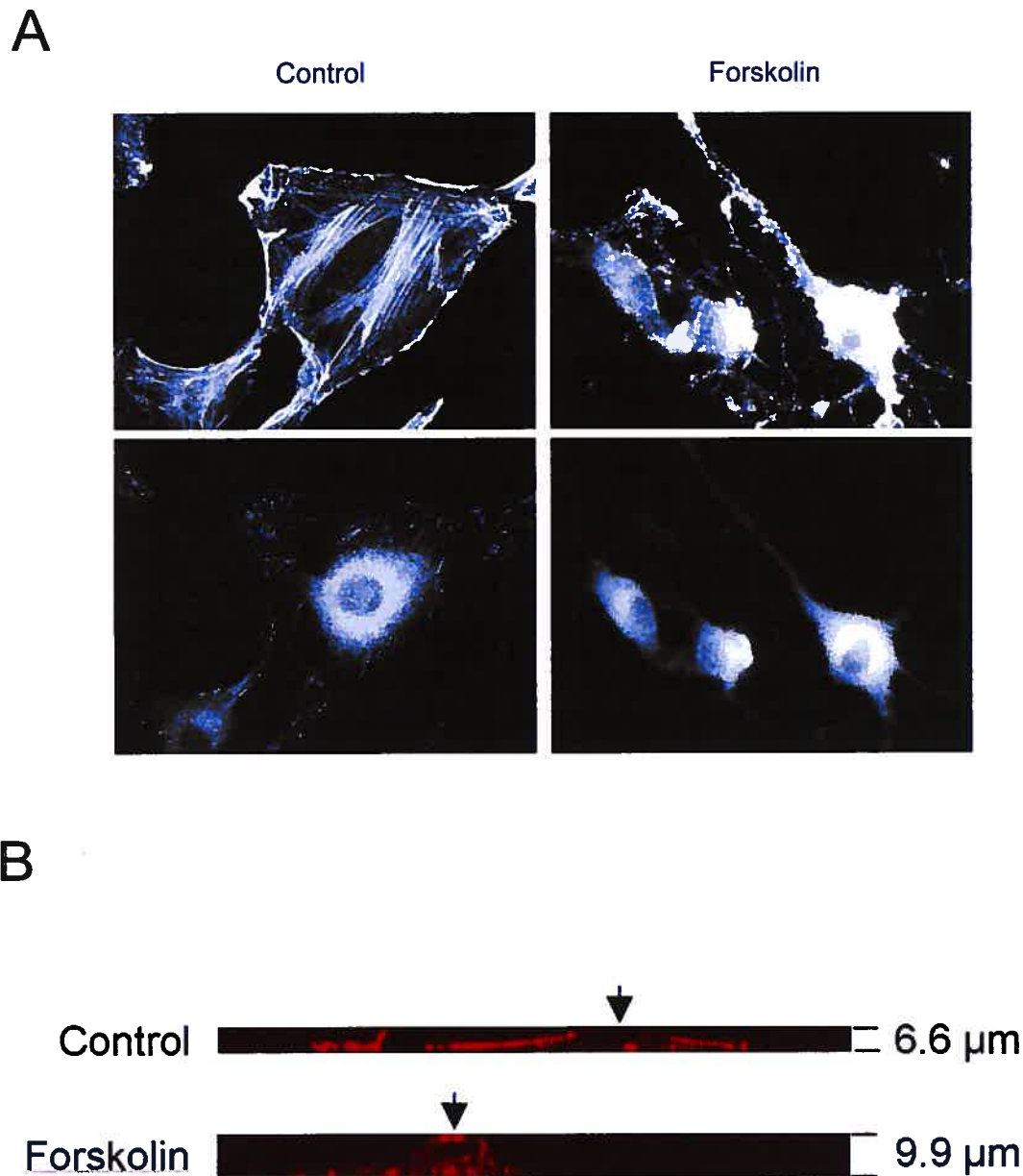
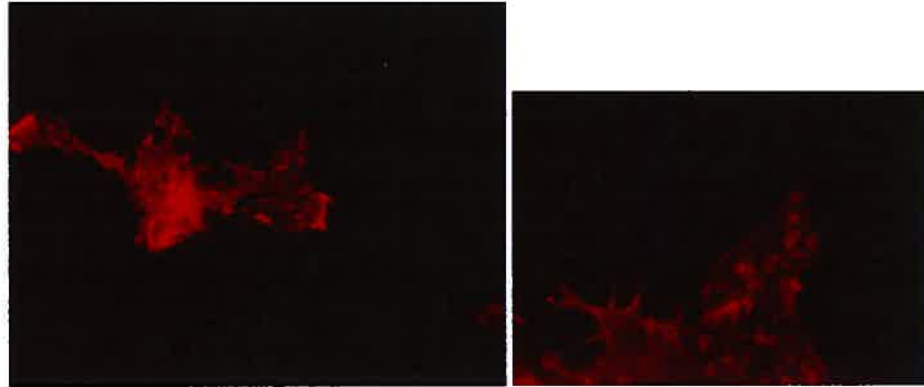


FIGURE 4.2. cAMP induced “stellate morphology” is associated with the loss of F-actin organization and focal adhesion complexes.

A. Vascular SMCs plated on glass coverslips were serum-deprived for 18-24 h were left untreated (Control) or treated with 10 μ M Forskolin (Forskolin). After 1h of stimulation, cells were fixed as described in methods. F-actin was visualised with rhodamine-conjugated phalloidin (upper panels) and focal adhesions were visualised with an anti-vinculin antibody (bottom panels)

B. Cross section of untreated or forskolin-treated vascular SMCs. The thickness of the cells has been measured by confocal microscopy and the red staining was done using rhodamine-conjugated phalloidin.

C



D

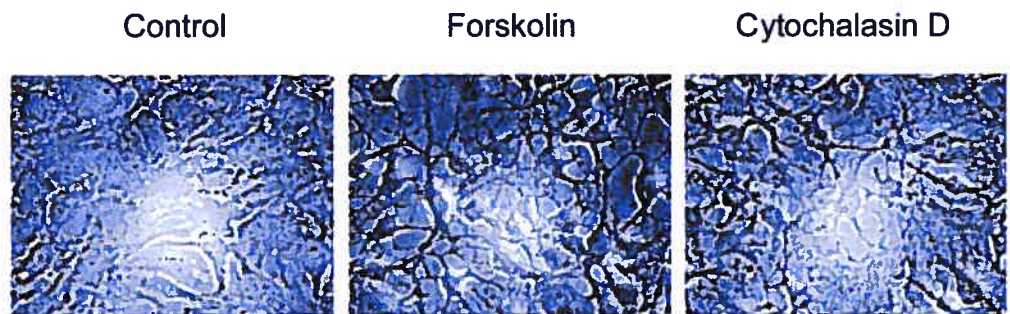
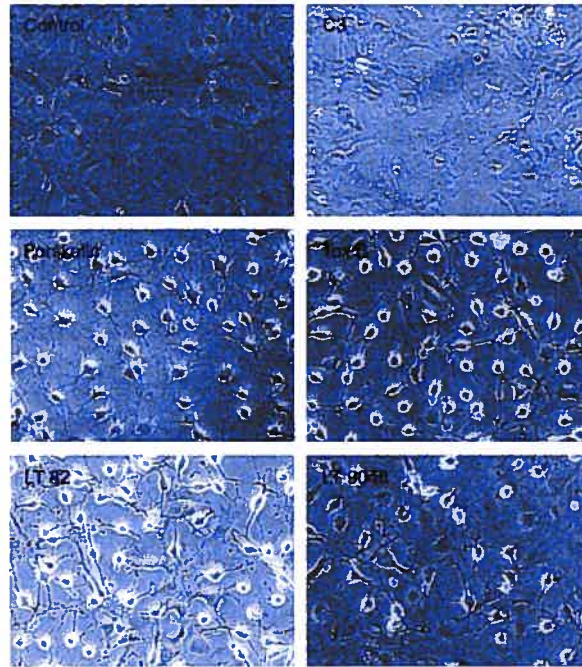


FIGURE 4.2. (continued)

C. Ring-like structure of F-actin in vascular SMC upon forskolin-treatment (Right panel: a 3 fold magnification of the left panel).

D. Vascular SMCs were left untreated (control) or treated with forskolin ($10\mu\text{M}$, 1h) or Cytochalasin D ($1\mu\text{M}$, 1h,) gross morphological changes were monitored by phase contrast microscopy.

A



B

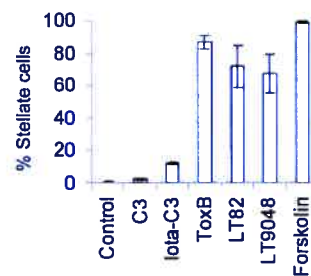


FIGURE 4.3. Inhibition of Rac activity mimicks forskolin-induced stellate shape.

A. Serum-deprived vascular SMCs were left untreated or treated with *C. botulinum* C3-transferase (50 μ g/ml, 24h), *C. difficile* Toxin B (Toxin B, 5ng/ml, 2h), *C. sordellii* lethal Toxin (Strain 82, LT82, 5 μ g/ml, 4h), *C. sordellii* lethal toxin (strain 9048, LT9048, 5 μ g/ml, 4h) or Forskolin (10 μ M, 1h) and cell shape changes were monitored by phase contrast microscopy.

B. Quantification of panel **A**. Cells showing "cAMP phenotype" were scored positive for stellate shape and the graphs are expressed as % Stellate cells (% stellate cells).

C

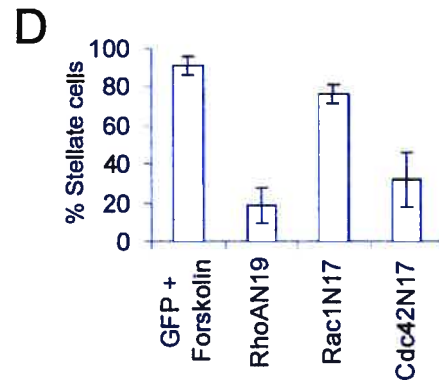
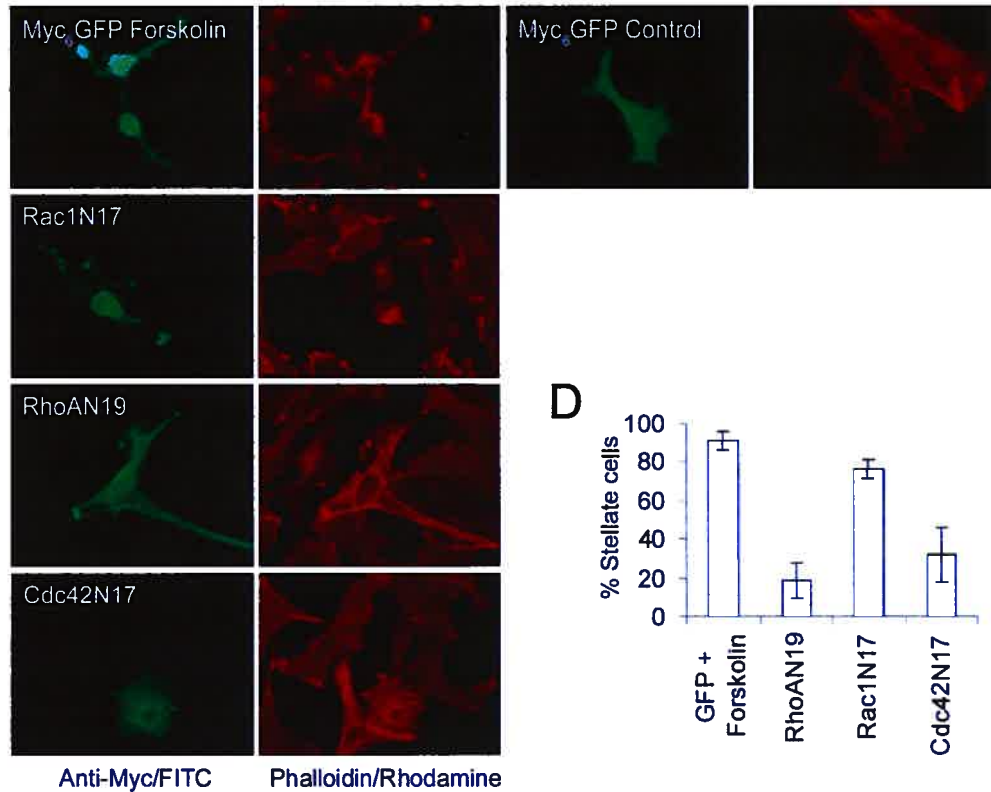
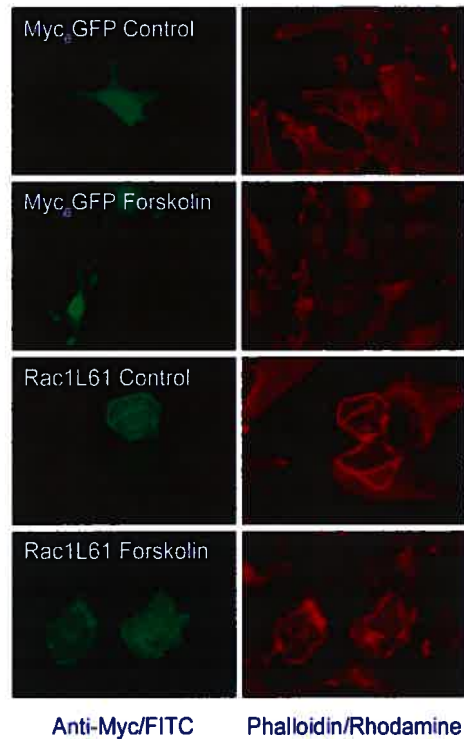


FIGURE 4.3. (continued) C. Vascular SMCs plated on glass coverslips were transfected with plasmids encoding a Myc₆ epitopes-tagged Green-Fluorescent-Protein (Myc₆-GFP), a dominant-negative mutant of RhoA (Myc-RhoA N19), a dominant-negative mutant of Rac1 (Myc-Rac1N17) or a dominant-negative mutant of Cdc42 (Cdc42N17). 6 h following transfections, cells were serum-deprived for 18h and were left untreated (Control) or treated with Forskolin (Forskolin, 10 μ M) for 1 h before immunofluorescence was performed as described in Methods. Left panels (green) show cells expressing Myc-tagged construct and right panels (red) show F-actin staining.

D. Quantification of panel C. Cells showing "cAMP phenotype" were scored positive for stellate shape and the graphs are expressed as % stellate cells. These experiments were performed 3 times and a total of 150 cells were scored in each experiment.

A



B

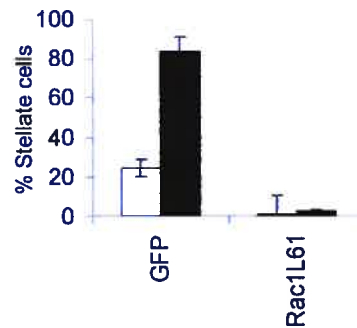


FIGURE 4.4. Constitutively active mutant of Rac1 impairs cAMP-induced stellate morphology.

A. vascular SMCs plated on glass coverslips were transfected with plasmids encoding either a Myc₆-GFP or a constitutively active mutant of Rac1 (Myc-Rac1L61). 6 h following transfections, cells were serum-deprived for 18h and were left untreated (Control) or treated with Forskolin (Forskolin, 10 μ M) for 1 h before immunofluorescence was performed as described in Methods. Myc₆-GFP or Myc-Rac1L61 expressing cells were visualized using anti-Myc antibody (left panels) and F-actin was visualised with rhodamine-conjugated phalloidin (right panels).

B. Quantification of panel A. Cells showing "cAMP phenotype" were scored positive for stellate shape and the graphs are expressed as % stellate cells. These experiments were performed 5 times and a total of 150 cells were scored in each experiment.

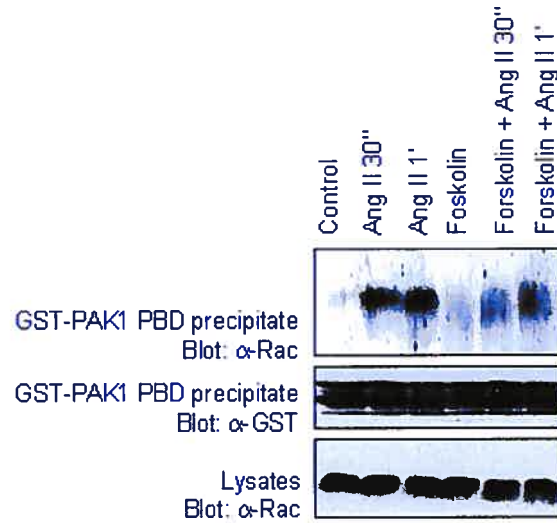


FIGURE 4.5. Forskolin impairs Ang II-induced GTP loading of Rac. Vascular SMCs were left untreated or pre-treated with 10 μ M forskolin (Forskolin) for 45 min and then stimulated or not (Control) with Ang II for the indicated times. The activity of Rac1 was determined by measuring the amount of GTP-loaded protein bound to GST-Pak as described in Methods. Results are representative of three independent experiments.

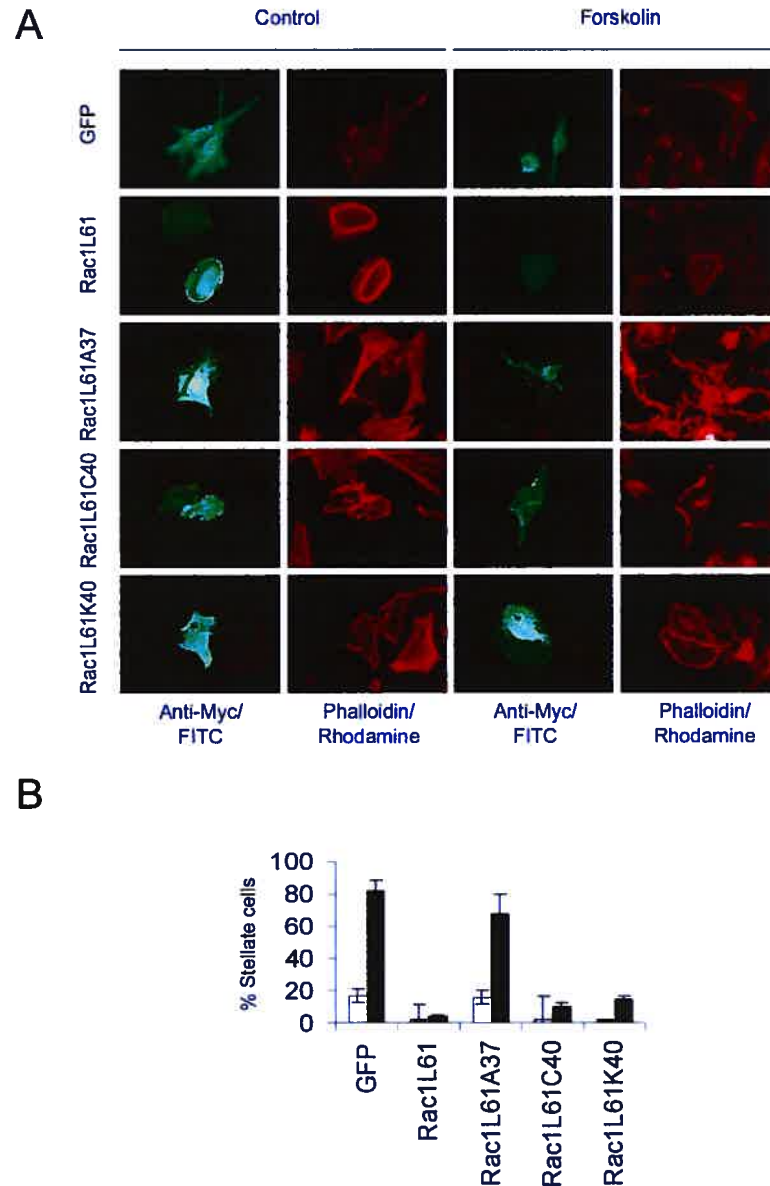


FIGURE 4.6. Essential role for the p160^{ROCK} in RacL61-impaired cAMP-induced stellate morphology.

A. Vascular SMCs plated on glass coverslips were transfected with plasmids encoding Myc6-GFP (GFP), Rac1L61 or three different effector loop mutants of a constitutively active mutant of Rac1 which fail to associate with either the p160^{ROCK} (Rac1L61A37), the p65 PAK (Rac1L61C40 and Rac1L61K40), POSH (Rac1L61C40) or to associate with the p67 phox (Rac1L61K40). 6 h following transfections, cells were serum-deprived for 18h and were left untreated (Control) or treated with Forskolin (Forskolin, 10 μ M) for 1 h before immunofluorescence was performed as described in Methods. Myc-tagged constructs expressing cells (green) were visualised with anti-Myc antibody and F-actin was visualised with rhodamine-conjugated phalloidin (red).

B. Quantification of panel A. Cells showing “cAMP phenotype” were scored positive for stellate shape and the graphs are expressed as % stellate cells. These experiments were performed 5 times and a total of 150 cells were scored in each experiment.

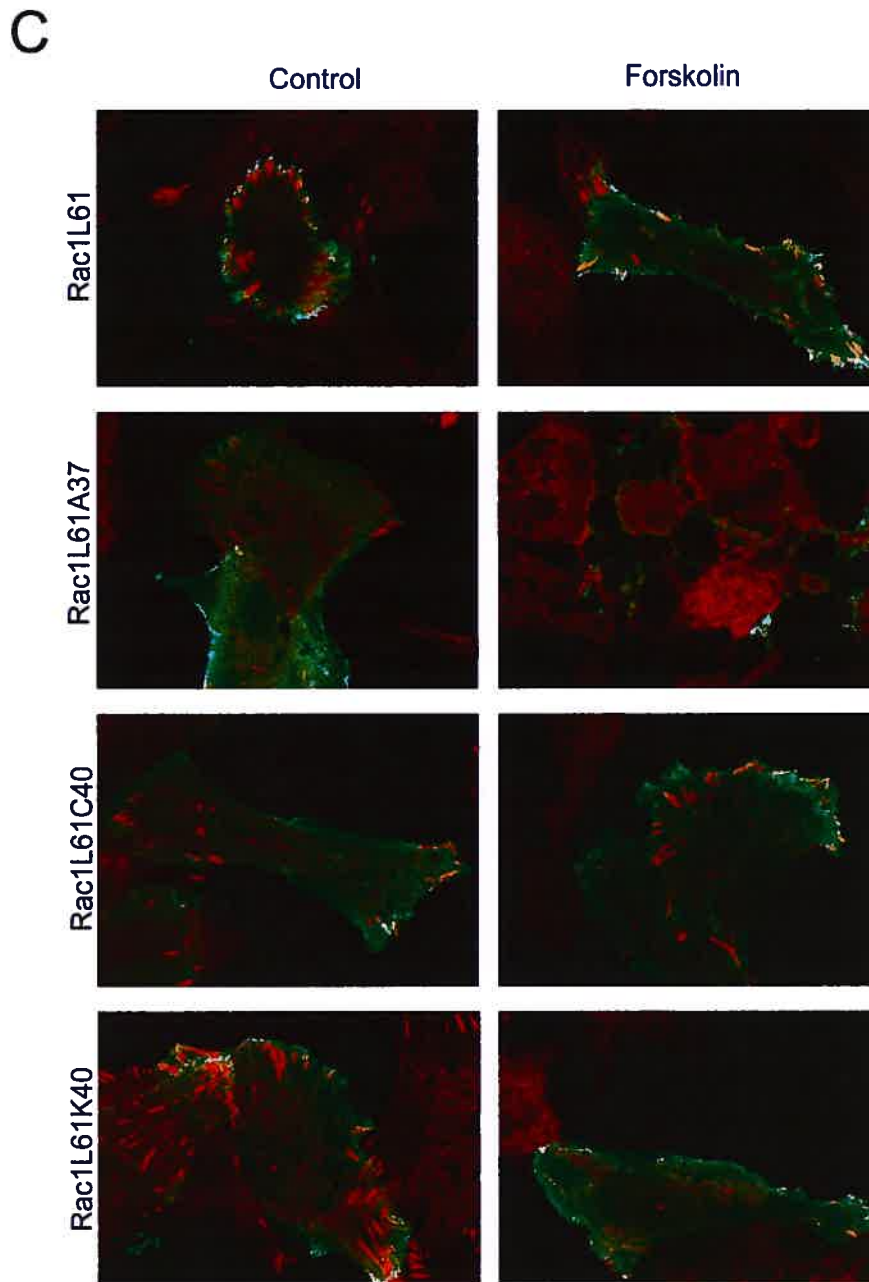


FIGURE 4.6. (continued)

C. Vascular SMCs plated on glass coverslips were transfected with plasmids encoding Rac1L61 or three different effector loop mutants of a constitutively active mutant of Rac1 which fail to associate with either the p160ROCK (Rac1L61A37), the p65 PAK (Rac1L61C40 and Rac1L61K40), POSH (Rac1L61C40) or to associate with the p67phox (Rac1L61K40). 6 h following transfections, cells were serum-deprived for 18h and were left untreated (Control) or treated with Forskolin (Forskolin, 10 μ M) for 1 h before immunofluorescence was performed as described in Methods. Myc-tagged constructs expressing cells (green) were visualised with anti-Myc antibody and focal adhesion contacts were visualised with α -vinculin antibody (red).

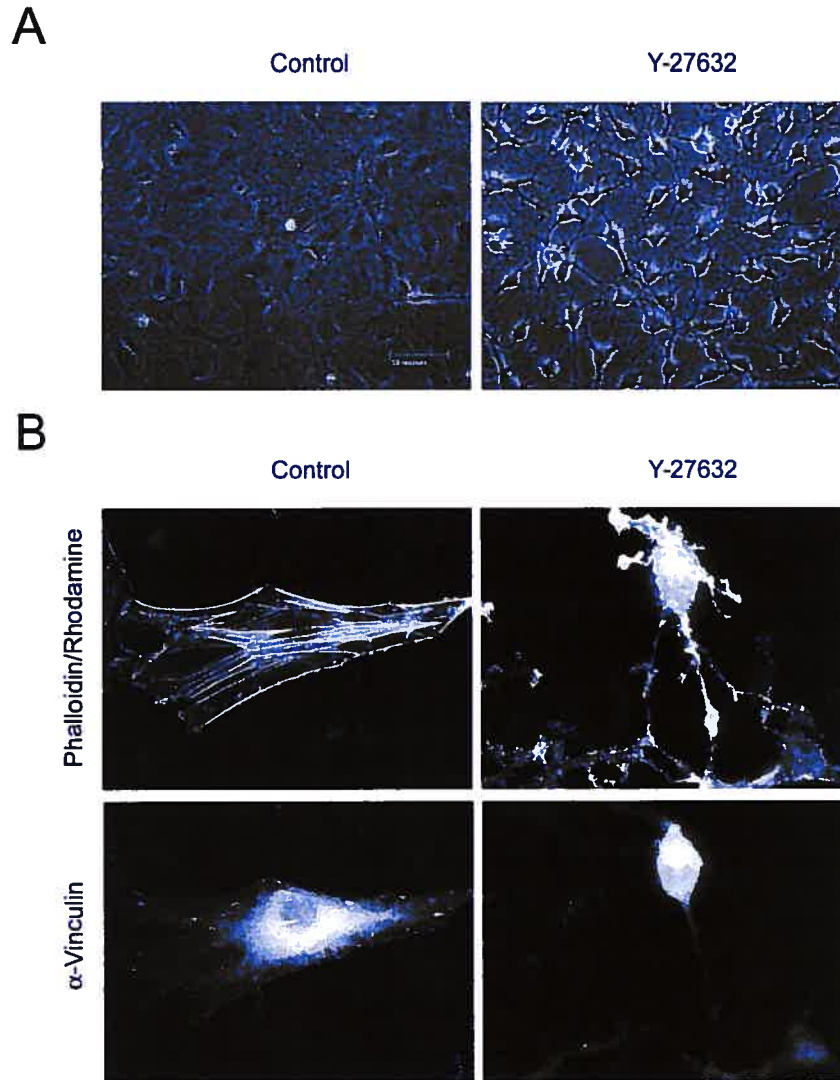


FIGURE 4.7. Inhibition of ROCK kinase activity with Y-27632 induces “stellate morphology” in vascular SMCs.

A. Serum deprived vascular SMCs were left untreated or treated with Y-27632 ($10\mu\text{M}$) for 1 h and gross morphological changes were monitored by phase contrast microscopy.

B. Serum-starved vascular SMCs plated on glass coverslips were left untreated or treated with Y-27632 ($10\mu\text{M}$, 1h) and cells were fixed as described in methods. F-actin was visualized with rhodamine-conjugated phalloidin (upper panel) and focal adhesion complexes were visualized using anti-vinculin antibody (lower panel).

Table 4.1. Effect of bacterial toxins on Small GTPases activity and stellation of vascular SMCs.

	Rho	Rac	Cdc42	Ras	Rap	Ral	Stellation
C3-transferase	+++	-	-	-	-	-	-
Iota-C3	+++	-	-	-	-	-	-
Ia	-	-	-	-	-	-	-
Ib	-	-	-	-	-	-	-
Ia + Ib	-	-	-	-	-	-	-
ToxB	+++	+++	+++	-	-	-	+++
LT82	-	+++	-	+++	+++	+++	+++
LT9048	-	+++	+++	+++	+/-	+	+++

REFERENCES

- Abo,A., Pick,E., Hall,A., Totty,N., Teahan,C.G., Segal,A.W. (1991). Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 353, 668-670.
- Adelstein,R.S. (1983). Regulation of contractile proteins by phosphorylation. *J.Clin.Invest* 72, 1863-1866.
- Aharoni,D., Dantes,A., Amsterdam,A. (1993). Cross-talk between adenylate cyclase activation and tyrosine phosphorylation leads to modulation of the actin cytoskeleton and to acute progesterone secretion in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 133, 1426-1436.
- Ahmed,M.U., Hazeki,K., Hazeki,O., Katada,T., Ui,M. (1995). Cyclic AMP-increasing agents interfere with chemoattractant-induced respiratory burst in neutrophils as a result of the inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase rather than receptor-operated Ca²⁺ influx. *J.Biol.Chem.* 270, 23816-23822.
- Aktories,K., Schmidt,G., Just,I. (2000). Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol.Chem.* 381, 421-426.
- Assender,J.W., Southgate,K.M., Hallett,M.B., Newby,A.C. (1992). Inhibition of proliferation, but not of Ca²⁺ mobilization, by cyclic AMP and GMP in rabbit aortic smooth-muscle cells. *Biochem.J.* 288 (Pt 2), 527-532.
- Baorto,D.M., Mellado,W., Shelanski,M.L. (1992). Astrocyte process growth induction by actin breakdown. *J.Cell Biol.* 117, 357-367.
- Bishop,A.L., Hall,A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem.J.* 348 Pt 2, 241-255.
- Braga,V.M. (1999). Small GTPases and regulation of cadherin dependent cell-cell adhesion. *Mol.Pathol.* 52, 197-202.

- Burgering,B.M., Pronk,G.J., van Weeren,P.C., Chardin,P., Bos,J.L. (1993). cAMP antagonizes p21ras-directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSos nucleotide exchange factor. *EMBO J.* 12, 4211-4220.
- Busca,R., Bertolotto,C., Abbe,P., Englaro,W., Ishizaki,T., Narumiya,S., Boquet,P., Ortonne,J.P., Ballotti,R. (1998). Inhibition of Rho is required for cAMP-induced melanoma cell differentiation. *Mol.Biol.Cell* 9, 1367-1378.
- Chaldakov,G.N., Nabika,T., Nara,Y., Yamori,Y. (1989). Cyclic AMP- and cytochalasin B-induced arborization in cultured aortic smooth muscle cells: its cytopharmacological characterization. *Cell Tissue Res.* 255, 435-442.
- Cook,S.J., McCormick,F. (1993). Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* 262, 1069-1072.
- Coso,O.A., Chiariello,M., Yu,J.C., Teramoto,H., Crespo,P., Xu,N., Miki,T., Gutkind,J.S. (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81, 1137-1146.
- Cox,D., Chang,P., Zhang,Q., Reddy,P.G., Bokoch,G.M., Greenberg,S. (1997). Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J.Exp.Med.* 186, 1487-1494.
- Davies,S.P., Reddy,H., Caivano,M., Cohen,P. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem.J.* 351, 95-105.
- de Rooij,J., Zwartkruis,F.J., Verheijen,M.H., Cool,R.H., Nijman,S.M., Wittinghofer,A., Bos,J.L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396, 474-477.
- Dong,J.M., Leung,T., Manser,E., Lim,L. (1998). cAMP-induced morphological changes are counteracted by the activated RhoA small GTPase and the Rho kinase ROKalpha. *J.Biol.Chem.* 273, 22554-22562.

- Drechsel,D.N., Hyman,A.A., Hall,A., Glotzer,M. (1997). A requirement for Rho and Cdc42 during cytokinesis in *Xenopus* embryos. *Curr.Biol.* 7, 12-23.
- Dumont,J.E., Jauniaux,J.C., Roger,P.P. (1989). The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation. *Trends Biochem.Sci.* 14, 67-71.
- Egan,J.J., Gronowicz,G., Rodan,G.A. (1991). Cell density-dependent decrease in cytoskeletal actin and myosin in cultured osteoblastic cells: correlation with cyclic AMP changes. *J.Cell Biochem.* 45, 93-100.
- Fukata,Y., Oshiro,N., Kinoshita,N., Kawano,Y., Matsuoka,Y., Bennett,V., Matsuura,Y., Kaibuchi,K. (1999). Phosphorylation of adducin by Rho-kinase plays a crucial role in cell motility. *J.Cell Biol.* 145, 347-361.
- Gerthoffer,W.T., Gunst,S.J. (2001). Invited review: focal adhesion and small heat shock proteins in the regulation of actin remodeling and contractility in smooth muscle. *J.Appl.Physiol* 91, 963-972.
- Gerthoffer,W.T., Murphey,K.A., Gunst,S.J. (1989). Aequorin luminescence, myosin phosphorylation, and active stress in tracheal smooth muscle. *Am.J.Physiol* 257, C1062-C1068.
- Giasson,E., Servant,M.J., Meloche,S. (1997). Cyclic AMP-mediated inhibition of angiotensin II-induced protein synthesis is associated with suppression of tyrosine phosphorylation signaling in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* 272, 26879-26886.
- Goldman,J.E., Abramson,B. (1990). Cyclic AMP-induced shape changes of astrocytes are accompanied by rapid depolymerization of actin. *Brain Res.* 528, 189-196.
- Goulding,E.H., Ngai,J., Kramer,R.H., Colicos,S., Axel,R., Siegelbaum,S.A., Chess,A. (1992). Molecular cloning and single-channel properties of the cyclic nucleotide-gated channel from catfish olfactory neurons. *Neuron* 8, 45-58.

- Gratacap,M.P., Payraastre,B., Nieswandt,B., Offermanns,S. (2001). Differential regulation of Rho and Rac through heterotrimeric G-proteins and cyclic nucleotides. *J.Biol.Chem.* 276, 47906-47913.
- Graves,L.M., Bornfeldt,K.E., Argast,G.M., Krebs,E.G., Kong,X., Lin,T.A., Lawrence,J.C., Jr. (1995). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92 , 7222-7226.
- Graves,L.M., Bornfeldt,K.E., Raines,E.W., Potts,B.C., Macdonald,S.G., Ross,R., Krebs,E.G. (1993). Protein kinase A antagonizes platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 10300-10304.
- Gunst,S.J., Gerthoffer,W.T., al Hassani,M.H. (1992). Ca²⁺ sensitivity of contractile activation during muscarinic stimulation of tracheal muscle. *Am.J.Physiol* 263, C1258-C1265.
- Hall,A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.
- Heidemann,S.R., Joshi,H.C., Schechter,A., Fletcher,J.R., Bothwell,M. (1985). Synergistic effects of cyclic AMP and nerve growth factor on neurite outgrowth and microtubule stability of PC12 cells. *J.Cell Biol.* 100, 916-927.
- Hill,C.S., Wynne,J., Treisman,R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 81, 1159-1170.
- Hirata,K., Kikuchi,A., Sasaki,T., Kuroda,S., Kaibuchi,K., Matsuura,Y., Seki,H., Saida,K., Takai,Y. (1992). Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J.Biol.Chem.* 267, 8719-8722.
- Hirshman,C.A., Zhu,D., Panettieri,R.A., Emala,C.W. (2001). Actin depolymerization via the beta-adrenoceptor in airway smooth muscle cells: a novel PKA-independent pathway. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 281, C1468-C1476.

- Hohman,R.J., Veron,M., Guitton,M.C. (1985). Change in NAD⁺/NADH content of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase upon NAD⁺ reversible inactivation by cAMP and 2'-deoxyadenosine. *Curr.Top.Cell Regul.* 26, 233-245.
- Horio,T., Kohno,M., Kano,H., Ikeda,M., Yasunari,K., Yokokawa,K., Minami,M., Takeda,T. (1995). Adrenomedullin as a novel antimigration factor of vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 77, 660-664.
- Hotchin,N.A., Hall,A. (1995). The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J.Cell Biol.* 131, 1857-1865.
- Indolfi,C., Avvedimento,E.V., Di Lorenzo,E., Esposito,G., Rapacciuolo,A., Giuliano,P., Grieco,D., Cavuto,L., Stingone,A.M., Ciullo,I., Condorelli,G., Chiariello,M. (1997). Activation of cAMP-PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury. *Nat.Med.* 3, 775-779.
- Indolfi,C., Di Lorenzo,E., Rapacciuolo,A., Stingone,A.M., Stabile,E., Leccia,A., Torella,D., Caputo,R., Ciardiello,F., Tortora,G., Chiariello,M. (2000). 8-chloro-cAMP inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and neointima formation induced by balloon injury in vivo. *J.Am.Coll.Cardiol.* 36, 288-293.
- Johnson,D.I. (1999). Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 63, 54-105.
- Jones,D.A., Benjamin,C.W., Linseman,D.A. (1995). Activation of thromboxane and prostacyclin receptors elicits opposing effects on vascular smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol.Pharmacol.* 48, 890-896.
- Kahan,C., Seuwen,K., Meloche,S., Pouyssegur,J. (1992). Coordinate, biphasic activation of p44 mitogen-activated protein kinase and S6 kinase by growth factors in hamster fibroblasts. Evidence for thrombin-induced signals different from phosphoinositide turnover and adenylylcyclase inhibition. *J.Biol.Chem.* 267, 13369-13375.

- Kaibuchi,K., Kuroda,S., Fukata,M., Nakagawa,M. (1999). Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases. *Curr.Opin.Cell Biol.* *11*, 591-596.
- Kato,J.Y., Matsuoka,M., Polyak,K., Massague,J., Sherr,C.J. (1994). Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* *79*, 487-496.
- Klein,P.S., Sun,T.J., Saxe,C.L., III, Kimmel,A.R., Johnson,R.L., Devreotes,P.N. (1988). A chemoattractant receptor controls development in *Dictyostelium discoideum*. *Science* *241*, 1467-1472.
- Knebel,A., Rahmsdorf,H.J., Ullrich,A., Herrlich,P. (1996). Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.* *15*, 5314-5325.
- Kozma,R., Ahmed,S., Best,A., Lim,L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol.Cell Biol.* *15*, 1942-1952.
- Kreisberg,J.I., Venkatachalam,M.A., Patel,P.Y. (1984). Cyclic AMP-associated shape change in mesangial cells and its reversal by prostaglandin E2. *Kidney Int.* *25*, 874-879.
- L'Allemain,G., Lavoie,J.N., Rivard,N., Baldin,V., Pouyssegur,J. (1997). Cyclin D1 expression is a major target of the cAMP-induced inhibition of cell cycle entry in fibroblasts. *Oncogene* *14*, 1981-1990.
- Lamarche,N., Tapon,N., Stowers,L., Burbelo,P.D., Aspenstrom,P., Bridges,T., Chant,J., Hall,A. (1996). Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* *87*, 519-529.
- Lamb,N.J., Fernandez,A., Conti,M.A., Adelstein,R., Glass,D.B., Welch,W.J., Feramisco,J.R. (1988). Regulation of actin microfilament integrity in living nonmuscle

cells by the cAMP-dependent protein kinase and the myosin light chain kinase. *J.Cell Biol.* *106*, 1955-1971.

Lang,P., Gesbert,F., Delespine-Carmagnat,M., Stancou,R., Pouchelet,M., Bertoglio,J. (1996). Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J.* *15*, 510-519.

Leung,T., Chen,X.Q., Tan,I., Manser,E., Lim,L. (1998). Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol.Cell Biol.* *18*, 130-140.

Luo,L., Jan,L.Y., Jan,Y.N. (1997). Rho family GTP-binding proteins in growth cone signalling. *Curr.Opin.Neurobiol.* *7*, 81-86.

Mabuchi,I., Hamaguchi,Y., Fujimoto,H., Morii,N., Mishima,M., Narumiya,S. (1993). A rho-like protein is involved in the organisation of the contractile ring in dividing sand dollar eggs. *Zygote.* *1*, 325-331.

Meloche,S., Pelletier,S., Servant,M.J. (2000). Functional cross-talk between the cyclic AMP and Jak/STAT signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Mol.Cell Biochem.* *212*, 99-109.

Miller,R.A., Ruddle,F.H. (1974). Enucleated neuroblastoma cells form neurites when treated with dibutyryl cyclic AMP. *J.Cell Biol.* *63*, 295-299.

Minden,A., Lin,A., Claret,F.X., Abo,A., Karin,M. (1995). Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* *81*, 1147-1157.

Monfar,M., Lemon,K.P., Grammer,T.C., Cheatham,L., Chung,J., Vlahos,C.J., Blenis,J. (1995). Activation of pp70/85 S6 kinases in interleukin-2-responsive lymphoid cells is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and inhibited by cyclic AMP. *Mol.Cell Biol.* *15*, 326-337.

- Nieuw Amerongen,G.P., van Hinsbergh,V.W. (2001). Cytoskeletal effects of rho-like small guanine nucleotide-binding proteins in the vascular system. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 21, 300-311.
- Nobes,C.D., Hall,A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
- Nobes,C.D., Hall,A. (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J.Cell Biol.* 144, 1235-1244.
- Norman,J.C., Price,L.S., Ridley,A.J., Koffer,A. (1996). The small GTP-binding proteins, Rac and Rho, regulate cytoskeletal organization and exocytosis in mast cells by parallel pathways. *Mol.Biol.Cell* 7, 1429-1442.
- Olson,M.F., Ashworth,A., Hall,A. (1995). An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* 269, 1270-1272.
- Ortiz,J.R., Yamada,T., Hsie,A.W. (1973). Induction of the stellate configuration in cultured iris epithelial cells by adenosine and compounds related to adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 70, 2286-2290.
- Padmanabhan,J., Shelanski,M.L. (1998). Process formation in astrocytes: modulation of cytoskeletal proteins. *Neurochem.Res.* 23, 377-384.
- Pastan,I.H., Johnson,G.S., Anderson,W.B. (1975). Role of cyclic nucleotides in growth control. *Annu.Rev.Biochem.* 44, 491-522.
- Perona,R., Montaner,S., Saniger,L., Sanchez-Perez,I., Bravo,R., Lacal,J.C. (1997). Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* 11, 463-475.

- Popoff,M.R. (1987). Purification and characterization of *Clostridium sordellii* lethal toxin and cross-reactivity with *Clostridium difficile* cytotoxin. *Infect.Immun.* 55, 35-43.
- Preston,S.F., Volpi,M., Pearson,C.M., Berlin,R.D. (1987). Regulation of cell shape in the Cloudman melanoma cell line. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, 5247-5251.
- Prokopenko,S.N., Saint,R., Bellen,H.J. (2000). Untying the Gordian knot of cytokinesis. Role of small G proteins and their regulators. *J.Cell Biol.* 148, 843-848.
- Ramakers,G.J., Moolenaar,W.H. (1998). Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid. *Exp.Cell Res.* 245, 252-262.
- Randall,V.A., MacLennan,S.J., Martin,G.R., Wilson,V.G. (1996). The effect of forskolin on 5-HT₁-like and angiotensin II-induced vasoconstriction and cyclic AMP content of the rabbit isolated femoral artery. *Br.J.Pharmacol.* 118, 627-634.
- Rao,G.N., Runge,M.S. (1996). Cyclic AMP inhibition of thrombin-induced growth in vascular smooth muscle cells correlates with decreased JNK1 activity and c-Jun expression. *J.Biol.Chem.* 271, 20805-20810.
- Richard,J.F., Petit,L., Gibert,M., Marvaud,J.C., Bouchaud,C., Popoff,M.R. (1999). Bacterial toxins modifying the actin cytoskeleton. *Int.Microbiol.* 2, 185-194.
- Ridley,A.J., Hall,A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.
- Ridley,A.J., Paterson,H.F., Johnston,C.L., Diekmann,D., Hall,A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410.
- Rock,C.O., Cleveland,J.L., Jackowski,S. (1992). Macrophage growth arrest by cyclic AMP defines a distinct checkpoint in the mid-G1 stage of the cell cycle and overrides constitutive c-myc expression. *Mol.Cell Biol.* 12, 2351-2358.

- Royal,I., Lamarche-Vane,N., Lamorte,L., Kaibuchi,K., Park,M. (2000). Activation of cdc42, rac, PAK, and rho-kinase in response to hepatocyte growth factor differentially regulates epithelial cell colony spreading and dissociation. *Mol.Biol.Cell* *11*, 1709-1725.
- Rybalkin,S.D., Rybalkina,I., Beavo,J.A., Bornfeldt,K.E. (2002). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C promotes human arterial smooth muscle cell proliferation. *Circ.Res.* *90*, 151-157.
- Rydel,R.E., Greene,L.A. (1988). cAMP analogs promote survival and neurite outgrowth in cultures of rat sympathetic and sensory neurons independently of nerve growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *85*, 1257-1261.
- Sandau,K.B., Gantner,F., Brune,B. (2001). Nitric oxide-induced F-actin disassembly is mediated via cGMP, cAMP, and protein kinase A activation in rat mesangial cells. *Exp.Cell Res.* *271*, 329-336.
- Sawada,N., Itoh,H., Ueyama,K., Yamashita,J., Doi,K., Chun,T.H., Inoue,M., Masatsugu,K., Saito,T., Fukunaga,Y., Sakaguchi,S., Arai,H., Ohno,N., Komeda,M., Nakao,K. (2000). Inhibition of rho-associated kinase results in suppression of neointimal formation of balloon-injured arteries. *Circulation* *101*, 2030-2033.
- Schuringa,J.J., Jonk,L.J., Dokter,W.H., Vellenga,E., Kruijer,W. (2000). Interleukin-6-induced STAT3 transactivation and Ser727 phosphorylation involves Vav, Rac-1 and the kinase SEK-1/MKK-4 as signal transduction components. *Biochem.J.* *347 Pt 1*, 89-96.
- Sells,M.A., Boyd,J.T., Chernoff,J. (1999). p21-activated kinase 1 (Pak1) regulates cell motility in mammalian fibroblasts. *J.Cell Biol.* *145*, 837-849.
- Servant,M.J., Coulombe,P., Turgeon,B., Meloche,S. (2000). Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J.Cell Biol.* *148*, 543-556.
- Settleman,J. (1999). Rho GTPases in development. *Prog.Mol.Subcell.Biol.* *22*, 201-229.

- Sevetson,B.R., Kong,X., Lawrence,J.C., Jr. (1993). Increasing cAMP attenuates activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 10305-10309.
- Simon,A.R., Vikis,H.G., Stewart,S., Fanburg,B.L., Cochran,B.H., Guan,K.L. (2000). Regulation of STAT3 by direct binding to the Rac1 GTPase. *Science* 290, 144-147.
- Takahashi,T., Kawahara,Y., Okuda,M., Yokoyama,M. (1996). Increasing cAMP antagonizes hypertrophic response to angiotensin II without affecting Ras and MAP kinase activation in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 397, 89-92.
- Taylor,S.S., Buechler,J.A., Yonemoto,W. (1990). cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu.Rev.Biochem.* 59, 971-1005.
- Trepel,J.B., Colamonici,O.R., Kelly,K., Schwab,G., Watt,R.A., Sausville,E.A., Jaffe,E.S., Neckers,L.M. (1987). Transcriptional inactivation of c-myc and the transferrin receptor in dibutyryl cyclic AMP-treated HL-60 cells. *Mol.Cell Biol.* 7, 2644-2648.
- Tseng,S., Kim,R., Kim,T., Morgan,K.G., Hai,C.M. (1997). F-actin disruption attenuates agonist-induced [Ca²⁺], myosin phosphorylation, and force in smooth muscle. *Am.J.Physiol* 272, C1960-C1967.
- Turkson,J., Bowman,T., Adnane,J., Zhang,Y., Djeu,J.Y., Sekharam,M., Frank,D.A., Holzman,L.B., Wu,J., Sebt,S., Jove,R. (1999). Requirement for Ras/Rac1-mediated p38 and c-Jun N-terminal kinase signaling in Stat3 transcriptional activity induced by the Src oncoprotein. *Mol.Cell Biol.* 19, 7519-7528.
- Turner,C.E. (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat.Cell Biol.* 2, E231-E236.
- Uehata,M., Ishizaki,T., Satoh,H., Ono,T., Kawahara,T., Morishita,T., Tamakawa,H., Yamagami,K., Inui,J., Maekawa,M., Narumiya,S. (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389, 990-994.

Van Aelst,L., D'Souza-Schorey,C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* *11*, 2295-2322.

Vincent,S., Settleman,J. (1997). The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac GTPases and regulates actin cytoskeletal organization. *Mol.Cell Biol.* *17*, 2247-2256.

Wu,J., Dent,P., Jelinek,T., Wolfman,A., Weber,M.J., Sturgill,T.W. (1993). Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* *262*, 1065-1069.

Youn,T., Kim,S.A., Hai,C.M. (1998). Length-dependent modulation of smooth muscle activation: effects of agonist, cytochalasin, and temperature. *Am.J.Physiol* *274*, C1601-C1607.

Discussion

Historiquement, l'activation de la voie Jak/STAT était associée exclusivement à la réponse aux cytokines de type I et II. Il est maintenant évident que cette voie de signalisation est empruntée par d'autres types d'agonistes comme certaines hormones, autacoïdes ou facteurs de croissance agissant sur d'autres familles de récepteurs. Les travaux présentés dans cette thèse nous ont d'abord permis de démontrer et aussi de confirmer les données suggérant que les GPCRs activent la voie de signalisation Jak/STAT (Rodriguez-Linares & Watson, 1994). De plus, ils ont permis l'élaboration d'un nouveau modèle d'activation de cette voie non seulement différent de celui emprunté par les récepteurs des cytokines de Type I et II, mais aussi différent (pas nécessairement à l'encontre) de celui proposé pour les GPCRs (Abo *et al.*, 1992; Cunnick *et al.*, 1998; Leonard & O'Shea, 1998; O'Shea *et al.*, 2002). Finalement, ces travaux ont démontré l'existence d'une signalisation croisée inhibitrice (*negative Cross-talk*) entre l'AMP cyclique et la petite protéine G monomérique Rac (Pelletier *et al.*, 2003b). Cette observation permet une meilleure compréhension de l'action inhibitrice de l'AMP cyclique sur la migration, la croissance et la contractilité des VSMCs ainsi que l'activation de la voie Jak/STAT par les GPCRs.

5.1. Activation de la voie Jak/STAT par les récepteurs des cytokines, les récepteurs tyrosine kinases et les GPCRs

5.1.1. Activation par les récepteurs des cytokines de Type I et II

L'activation de la voie Jak/STAT par les récepteurs des cytokines de type I et II est très semblable d'une cytokine à une autre. La liaison du ligand au récepteur favorise l'oligomérisation des différentes sous-unités formant le récepteur et permet ainsi la transphosphorylation des Jaks déjà associées au récepteur. Suite à la transphosphorylation des Jaks et leur activation, elles phosphorylent aussi le récepteur. Cette phosphorylation génère des sites de liaison qui permettent l'association de STATs au récepteur par

l'entremise de leur domaine SH2. Cette association permet aux Jaks de phosphoryler les STATs. Alors phosphorylés en tyrosine, les STATs dimérisent et sont relocalisées au noyau où elles s'associent aux promoteurs de gènes cibles et activent leur transcription (Leonard & O'Shea, 1998; O'Shea *et al.*, 2002).

5.1.2. Activation par les $G_{q/11}$ et $G_{i/o}$ PCRs

Les récepteurs de chemokines (Vila-Coro *et al.*, 1999; Rodriguez-Frade *et al.*, 1999) et le récepteur AT1 de l'Ang II se sont avérés de bons modèles pour l'étude des mécanismes d'activation de la voie Jak/STAT par les GPCRs. Jusqu'à ce jour, le mécanisme d'activation de cette cascade de signalisation par le récepteur AT1 s'est révélé très similaire à celui proposé pour les cytokines de type I et II. Par la suite, un mécanisme similaire a été proposé pour d'autres agonistes de GPCRs soit les chemokines SDF-1 et RANTES de même que le PAF (Vila-Coro *et al.*, 1999; Rodriguez-Frade *et al.*, 1999; Lukashova *et al.*, 2001). Cependant, certains détails ont attiré notre attention. Premièrement, l'incapacité d'une forme catalytiquement inactive de Jak2 (Jak2 Δ VIII) de s'associer avec le récepteur AT1 (Ali *et al.*, 1998) suggère que l'association entre la kinase et le GPCR requiert l'activité catalytique de cette kinase. Deuxièmement, l'incapacité d'une forme catalytiquement inactive de Jak2 à être phosphorylée en tyrosine, suite à une stimulation par l'Ang II (Ali *et al.*, 1998) implique aussi que la kinase doit s'autophosphoryler en réponse à l'agoniste. Ensemble, ces deux observations suggèrent que l'activation et l'autophosphorylation de Jak2 sont les pré-requis à son association avec le récepteur AT1. Troisièmement, il est proposé qu'un mutant du récepteur AT1, ne permettant plus l'association de la kinase au récepteur a toujours la capacité d'induire la phosphorylation en tyrosine de la kinase (Sayeski *et al.*, 2001). Dans un même ordre d'idées une mutation de Jak2, qui entraîne la perte d'association de la kinase au récepteur, demeure phosphorylée en réponse à l'Ang II (Sayeski *et al.*, 2001). Ces données indiquent clairement que l'activation de Jak2 par le récepteur AT1 est indépendante de son interaction avec le récepteur et requiert son activité catalytique. Par conséquent, le récepteur doit envoyer un signal afin

d'activer la tyrosine kinase. Ainsi, l'activation de Jak2 par les GPCRs ne suit pas les mêmes règles que l'activation de cette kinase par les récepteurs des cytokines.

Nos travaux ont d'abord permis d'établir le lien entre les GPCRs et l'activation des Jaks (Pelletier *et al.*, 2003). Ces travaux ont permis l'élaboration d'un modèle d'activation de la voie Jak/STAT plus complexe que celui préalablement suggéré. Suite à la stimulation des récepteurs AT1 ou PAR-1, les Jaks 1, 2 et Tyk2 sont rapidement activées. L'activation de ces Jaks (du moins Jak2) est requise pour l'activation rapide des STATs 1 et 3. L'activation de STAT3 par les deux agonistes est transitoire et biphasique alors que celle de STAT1 par l'Ang II est soutenue. Alors que la première phase d'activation de STAT3 est la résultante directe de l'activation des GPCRs, la seconde nécessite la synthèse d'un facteur autocrine.

5.1.2.1. Activation précoce de la voie Jak/STAT par les GPCRs.

En réponse aux agonistes Ang II et thrombine, les récepteurs AT1 et PAR-1 activent, par un mécanisme encore mal défini, la petite protéine G monomérique Rac. Une fois active, Rac s'associe et active plusieurs effecteurs dont le complexe NADPH oxydase. Rac est l'une des composantes essentielles de ce complexe enzymatique et, une fois mis en place, ce complexe est responsable de la génération de radicaux libres oxygénés (ROS). Mis à part leur rôle essentiel dans les processus de phagocytose, les radicaux libres oxygénés ont la capacité d'agir comme messagers secondaires, au même titre que l'AMP cyclique ou l'InsP3 (Suh *et al.*, 1999; Lambeth *et al.*, 2000; Banfi *et al.*, 2003). En signalisation, il est proposé que les ROS ont pour fonction d'inhiber les protéines tyrosine phosphatases (PTPs) par l'oxydation de leur cystéine catalytique. Cette oxydation est possible en raison de l'environnement chargé du domaine catalytique de cette famille de phosphatases (Meng *et al.*, 2002). De façon similaire, l'inactivation de PTPs par le peroxyde d'hydrogène (la principale forme de radicaux libres oxygénés produite par les VSMCs) ou le vanadate (un inhibiteur non sélectif de PTPs) conduit également à l'activation des kinases Jak1, Jak2 et Tyk2 (Simon *et al.*, 1998; Pelletier *et al.*, 2003). Finalement, l'activation rapide de ces PTKs permet la phosphorylation des STATs 1 et 3.

Les PTPs SHP-1, SHP-2, PTP-1B, TC-PTP et CD45 sont connues pour déphosphoryler les Jaks. Il est donc fort probable que l'une ou plusieurs d'entre elles soient inhibées en réponse aux agonistes de GPCRs comme l'Ang II et la thrombine. Ainsi, à l'aide d'essais phosphatases en gels modifiés selon Meng *et al.*, 2002, il serait possible de déterminer les PTPs inhibées en réponse aux GPCRs.

5.1.2.2. Activation transitoire versus soutenue de la voie Jak/STAT

L'activation de STAT1 par l'Ang II est légèrement différente de celle observée pour STAT3. Alors que l'activation de STAT1 est rapide et soutenue (Figure 3.2), celle de STAT3 est biphasique. Plusieurs scénarios peuvent expliquer ce phénomène. D'abord, il est possible que la liaison de STAT1 au récepteur AT1 permette à la kinase Jak2 de phosphoryler plus efficacement STAT1 et ainsi maintenir un état de phosphorylation à plus long terme AT1 (Ali *et al.*, 1997a; Ali *et al.*, 2000). En ce qui concerne STAT3, aucune indication ne permet de conclure que STAT3 s'associe au récepteur.

Ce phénomène peut être dû à l'inhibition de la phosphorylation en tyrosine de STAT3 en raison de sa phosphorylation en sérine. En effet, nos résultats démontrent que suite à l'activation des récepteurs PAR-1 et AT1, STAT3 est rapidement phosphorylée sur la sérine 727 possiblement via une voie de signalisation dépendante de Ras (Tableau 3.1). La phosphorylation en sérine 727 a pour effet de décroître la phosphorylation en Tyr 705 de STAT3 par un mécanisme encore peu caractérisé (Chung *et al.*, 1997). Bien que la phosphorylation en sérine 727 semble avoir un effet bénéfique sur l'activité transcriptionnelle, telle que mesurée à l'aide de mutant S727A, il est possible que si cette phosphorylation a lieu dans le cytoplasme ou dans le mauvais compartiment cellulaire elle peut avoir un effet négatif (Chung *et al.*, 1997).

Alors que la phosphorylation en sérine influence l'état de phosphorylation en tyrosine de STAT3, ce n'est pas le cas pour STAT1 (Zhu *et al.*, 1997). La phosphorylation de STAT1 en sérine 727 n'a pas d'influence sur l'activité transcriptionnelle de STAT1 ni sur la

phosphorylation de la Tyr701. En accord avec l'hypothèse que la phosphorylation en sérine puisse favoriser la déphosphorylation ou empêcher la phosphorylation de la Tyr705 de STAT3, les travaux de Bhat *et al.*, 1995 montrent qu'un prétraitement à l'Ang II inhibe la phosphorylation en tyrosine de STAT3 en réponse à l'IL-6. Cet effet inhibiteur est renversé par un inhibiteur de la voie MEK/ERK, le PD98059 (Bhat *et al.*, 1995). De plus, on remarque que la phosphorylation de la Tyr705 de STAT3 diminue alors que celle de la sérine 727 devient maximale (Pelletier *et al.*, 2003) (Figure 3.2).

5.1.2.3. Activation tardive de la voie Jak/STAT par les GPCRs

La première phase d'activation de STAT3 est suivie d'une déphosphorylation rapide et finalement STAT3 est à nouveau phosphorylée sur la Tyr705. Cette deuxième phase d'activation (tardive) nécessite la synthèse d'un facteur autocrine puisqu'elle est inhibée par la présence d'un inhibiteur de la machinerie transcriptionnelle (Figure 3.10). Nous proposons que ce facteur soit l'IL-6 puisqu'un anticorps neutralisant dirigé contre le récepteur de l'IL-6 inhibe l'activation tardive de STAT3 en réponse à la thrombine dans les cellules HeLa (figure 3.10). En raison de la spécificité de l'anticorps neutralisant, il s'est avéré impossible de confirmer cette hypothèse dans les VSMCs (Pelletier *et al.*, 2003).

Bien qu'il reste à identifier le ligand nécessaire à l'activation tardive de STAT3 dans les VSMCs, il est important de constater que tout comme la première phase d'activation, cette deuxième phase requiert aussi l'activité de Rac en réponse à l'Ang II et la thrombine (Pelletier *et al.*, 2003). Il a été proposé qu'une forme constitutivement active de Rac active la voie Jak/STAT par la synthèse de l'IL-6 dans les HeLa (Faruqi *et al.*, 2001). Selon le modèle proposé par le groupe du Dr Nancy Reich (Faruqi *et al.*, 2001), Rac activerait STAT3 via l'activation du facteur de transcription NF- κ B et la transcription de plusieurs gènes dont celui de l'IL-6. Cependant, la stimulation des VSMCs ou des HeLa par l'IL-6 ne conduit pas à l'activation de STAT3. En fait, nos données et celles de Faruqi *et al.* suggèrent que l'activation de Rac ne conduit pas uniquement à la synthèse de l'IL-6 mais aussi à la synthèse de son récepteur dans les HeLa (Faruqi *et al.*, 2001) (Figure 5.1). La

stimulation des VSMCs par l'Ang II ou la thrombine conduit également à l'augmentation de l'expression de l'IL-6 et de son récepteur α (Figure 5.1). En plus d'influencer l'expression de l'IL-6, l'Ang II et la thrombine stimulent aussi l'expression de l'IL-11 sur une période plus longue. Cependant, la stimulation des VSMCs par ces agonistes n'influence pas l'expression de gp130 (Figure 5.1). Ainsi, ces observations laissent suggérer que l'activation tardive de STAT3 par l'Ang II et la thrombine requiert à la production d'IL-6 et même d'IL-11.

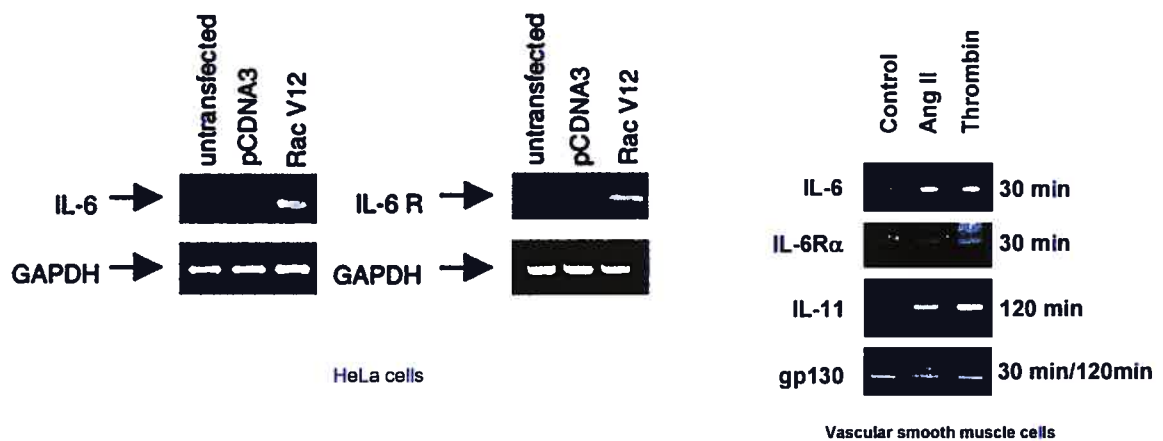


Figure 5.1. Rac, tout comme l'Ang II ou la thrombine induit l'expression du récepteur α de l'IL-6 (IL-6R α) dans les cellules HeLa et les VSMCs. A. La transfection de Rac1V12 dans les HeLa conduit à l'augmentation de l'expression de l'IL-6 et du récepteur de l'IL-6 (Tiré de Faruqi *et al.*, 2001). B. La stimulation des VSMCs par l'ang II et la thrombine stimule l'expression du récepteur α de l'IL-6 et de l'IL-6. Les VSMCs ont été stimulées 30 et 120 min et l'expression de l'IL-6, de gp130, du récepteur de l'IL-6 ainsi que l'IL-11 a été déterminée par RT-PCR.

Bien que l'activation précoce de la voie Jak/STAT par les récepteurs AT1 et PAR-1 requiert une cascade de signalisation impliquant la génération de radicaux libres par Rac, l'inactivation de phosphatases et finalement l'autophosphorylation des Jaks, il semble que l'activation tardive, forte et soutenue de STAT3 ne requiert pas la même cascade de signalisation. L'expression d'une forme active de Rac mène à l'activation de STAT3 dans les cellules COS-1, les cellules HeLa et les VSMCs (Simon *et al.*, 2000; Faruqi *et al.*, 2001; Pelletier *et al.*, 2003). Afin d'étudier les voies de signalisation nécessaires à l'activation de STAT3 par Rac, nous avons eu recours à l'utilisation de mutants constitutivement actifs de

Rac1 dont certains acides aminés de la boucle effectrice ont été modifiés (Lamarche *et al.*, 1996; Tapon *et al.*, 1998). La forme constitutivement active de Rac1 (Rac1L61) a la capacité de s'associer à tous les effecteurs connus de Rac soit la p65PAK, la p67^{phox}, la p160^{ROK} et POSH, ce qui permet l'activation de ces derniers (Lamarche *et al.*, 1996; Tapon *et al.*, 1998). En plus cette forme active de Rac permet l'activation du facteur de transcription NF-κB par un mécanisme jusqu'à présent mal caractérisé (Tapon *et al.*, 1998). L'introduction d'une alanine au lieu de la phénylalanine en position 37 (Rac1L61A37) empêche l'interaction entre Rac1 et p160^{ROK} et l'activation de Rho. Cependant, cette forme active s'associe et active encore la p65PAK, la p67^{phox}, POSH et NF-κB (Lamarche *et al.*, 1996; Tapon *et al.*, 1998). La mutation de la tyrosine 40 en cystéine (Rac1L61C40) empêche l'association et l'activation de la p65PAK, POSH et NF-κB alors que l'association et l'activation de la p160ROK, la p67PHOX et l'activation de Rho demeure (figure 5.2) (Lamarche *et al.*, 1996; Tapon *et al.*, 1998). Finalement, la substitution en position 40 pour une lysine conduit à la perte de l'interaction et l'activation de la p67^{phox} et PAK (Lamarche *et al.*, 1996) (figure 3.9 et 5.2). Ainsi, en réponse à l'expression de ces différentes formes actives de Rac, nous avons élaboré un modèle dans lequel Jak2 semble activée principalement par Rac1L61 ainsi que les formes Rac1L61A37 et L61C40 bien qu'à des niveaux légèrement inférieurs. Cependant, la forme L61K40, qui ne s'associe plus avec la p67^{phox} et qui, par conséquent, ne génère plus de ROS, est incapable de promouvoir l'autophosphorylation de Jak2. Ces données suggèrent donc que l'activation de Jak2 par Rac dépend principalement de la p67^{phox}. Ces données corrént bien avec le modèle d'activation précoce des Jaks par l'Ang II ou la thrombine. Cependant, il y a une ombre au tableau.

L'expression de ces différentes formes actives de Rac ont des effets différents sur la transcription dépendante des STATs. En effet, l'expression de Rac1L61, Rac1L61C40 et Rac1L61K40 activent la transcription dépendante des STATs alors que l'expression de

	Rac1L61A37	Rac1L61C40	Rac1L61K40	Rac1L61
p65 ^{PAK} binding	+	-	-	+
p67 ^{phox} binding	+	+	-	+
p160 ^{ROK} binding	-	+	+	+
p65 ^{PAK} activation	+	-	-	+
JNK activation	+	-	-	+
Rho activation	-	+	+	+
NF-κB activation	-?	+	?	+

Figure 5.2. Les formes mutantes de Rac1L61 interagissent avec différents effecteurs de Rac. Le mutant Rac1 interagit et/ou mène à l'activation (+) de la p65^{PAK}, p67^{phox}, p160 ROK, JNK, Rho et NF-κB alors que Rac1L61A37 interagit et active uniquement la p65^{PAK}, p67^{phox}, et JNK. L'activation de NF-κB par ce mutant n'est pas encore bien caractérisé. Le mutant Rac1L61C40 interagit et/ou active la p160 ROK, la p67^{phox}, Rho et le facteur de transcription NF-κB. Le mutant Rac1L61K40 interagit et active uniquement la p67^{phox} et Rho. L'activation de NF-κB par ce mutant n'a pas été étudié.

Rac1L61A37 en est incapable (figure 5.3). De façon similaire, l'expression de Rac1L61A37 dans les HeLa ou les COS-1 est incapable d'activer la transcription STAT-dépendante alors que le mutant Rac1L61K40 ou la forme constitutivement active (Rac1L61) l'est encore (Simon *et al.*, 2000; Faruqi *et al.*, 2001) (Voir figure 5.3). Ces résultats indiquent que bien que l'activation de la p67^{phox} soit essentielle à la phosphorylation rapide des Jaks, il semble que l'activation complète de cette voie de signalisation en réponse à un Rac actif nécessite l'activation d'autres effecteurs.

L'activité transcriptionnelle dépendante des STATs est augmentée en réponse à un Rac actif ainsi qu'en réponse aux mutants Rac1L61C40 et Rac1L61K40 mais, elle est peu ou pas augmentée en réponse à Rac1L61A37 (figure 5.3). Les groupes de Reich et Simon (Simon *et al.*, 2000; Faruqi *et al.*, 2001) ont aussi remarqué que le mutant Rac1L61A37 n'active plus STAT3 et deux explications différentes ont été apportées pour expliquer ce phénomène. Les uns proposent que Rac active STAT3 par l'entremise de NF-κB (Faruqi *et al.*, 2001) et les autres proposent qu'il existe une interaction directe entre

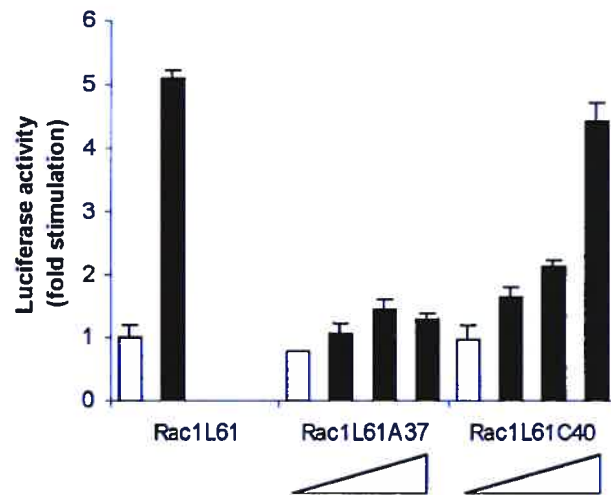


Figure 5.3. Les mutants de la boucle effectrice de Rac1L61 activent différemment la transcription STAT dépendante. Les VSMCs ont été transfectées à l'aide des différents mutants de Rac1L61 ainsi que le gène rapporteur pGL2xIFP53GAS-Luc et l'activité transcriptionnelle des STAT a été mesurée par l'activité luciférase. On observe que le mutant Rac1L61A37 est le moins puissant afin de stimuler les STATs contrairement aux mutants C40 et K40(données non montrées). De plus, l'induction de l'activité transcriptionnelle STAT dépendante est plus faible par ces mutants en comparaison à Rac1L61wt.

Rac et STAT3 (Simon *et al.*, 2000). Contrairement à ces données, nos résultats indiquent que Rac, par l'activation de la Rho-kinase, active STAT3 et que cette kinase joue un rôle important dans l'activation de STAT3 par les agonistes Ang II et Thrombine (figure 5.4). En fait ces allégations sont supportées par 1) l'incapacité de Rac1L61A37 à activer la transcription dépendante des STATs et 2) l'inhibition de la phosphorylation sur la tyr705 de STAT3 en réponse à l'Ang II ou la thrombine en présence de Y-27632, un inhibiteur de la Rho-Kinase (Uehata *et al.*, 1997) (Figure5.4). Pour le moment, il nous est impossible de spécifier à quel niveau la Rho-kinase joue un rôle dans l'activation de STAT3. Cependant, il est fort à parier qu'elle est responsable de la transcription du facteur autocrine. Peut-être est-elle responsable de l'activation de NF-kB qui, selon certains, joue un rôle majeur dans l'activation de STAT3 par la forme active de Rac (Faruqi *et al.*, 2001) (Figure 5.5).

Il reste beaucoup à faire afin de définir les mécanismes d'activation de la voie Jak/STAT par les $G_{q/11}$ et $G_{i/o}$ PCR. En plus de caractériser la ou les voies de signalisation

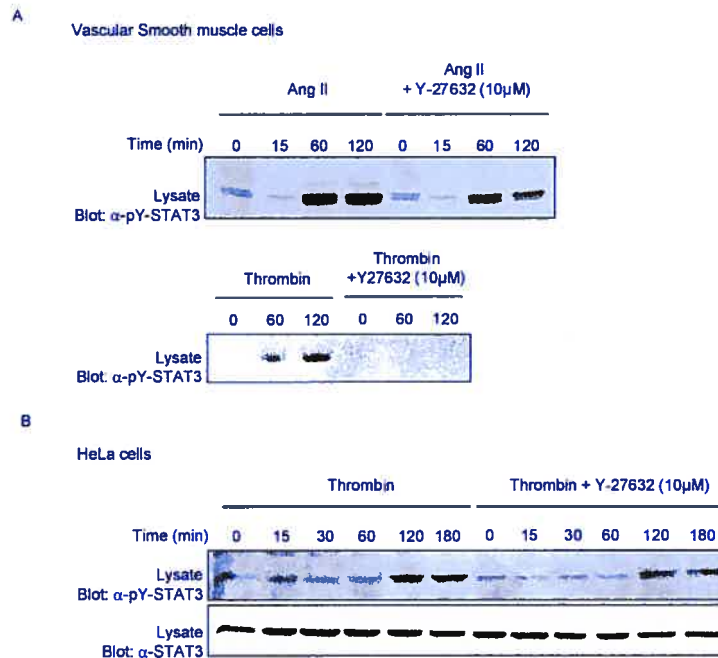


Figure 5.4. La Rho-kinase est en partie requise à l'activation de STAT3 en réponse aux agonistes Ang II et thrombine. A. Les VSMCs ont été prétraitées 1h en absence ou en présence de Y-27632 (10 μ M) et ensuite stimulées par l'Ang II ou la thrombine pour les temps indiqués. L'activation de STAT3 a été mesurée à l'aide de l'anticorps phosphospécifique dirigé contre la tyr705 de STAT3. B. Les HeLa ont été prétraitées ou non durant 1h avec le Y-27632 et ensuite stimulées avec la thrombine pour les temps indiqués et l'activation de STAT3 a été mesurée comme en A.

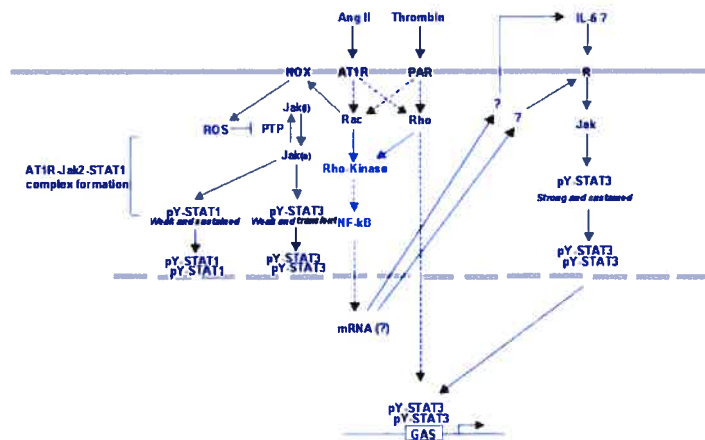


Figure 5.5. Hypothèse de travail concernant le mécanisme d'activation de la voie Jak/STAT par la petite protéine G Rac. L'activation de Rac entraîne l'activation de la Rho-kinase. Cette dernière entraîne l'activation de NF- κ B et l'expression du gène de l'IL-6 et/ou du récepteur de l'IL-6. Ceci a pour effet de reconstituer la voie IL-6/IL-6R/Jak/STAT.

engendrées par Rac qui mène à l'activation de la voie Jak/STAT, il faudra aussi définir le mécanisme d'activation de Rac par ces GPCRs.

L'activation de Rac en réponse à l'Ang II ou la thrombine a fait l'objet de très peu d'études (Seshiah *et al.*, 2002). En réponse à d'autres agonistes de GPCRs, Rac est activée par l'entremise des protéines $G_{\alpha i}$ (Benard *et al.*, 1999; Geijssen *et al.*, 1999; Belisle & Abo, 2000). Par exemple, dans les cellules endothéliales, les sous-unité $\beta\gamma$ des protéines $G_{\alpha i}$ ainsi que la PI3-kinase semblent impliquées dans ce mécanisme (Brass & Molino, 1997; Geijssen *et al.*, 1999; Belisle & Abo, 2000). Le produit de la PI3-kinase, le PtdInsP3 serait responsable de l'activation de Rac. Récemment, Welch *et al.* ont cloné un nouveau GEF (P-Rex1) qui est activé par les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines $G_{\gamma/o}$ ainsi que par le produit de la PI3-kinase, le PtdInsP3 (Welch *et al.*, 2002). En plus de ce GEF, les membres de la famille Vav et Tiam1 sont aussi activés par le PtdInsP3 (Fleming *et al.*, 2000; Das *et al.*, 2000). Il est fort à parier que l'un de ces trois GEF est responsable de l'activation de Rac et subséquemment de l'activation de la voie Jak/STAT en réponse à l'Ang II ou la thrombine dans les VSMCs. De façon intéressante, des résultats préliminaires suggèrent que l'activation de STAT3 par l'Ang II est relayée, du moins en partie, par une cascade de signalisation impliquant la PI3-kinase (Figure 5.6).

5.1.3. Activation de la voie Jak/STAT par les $G_{\alpha s}$ PCRs

Les récepteurs couplés aux protéines $G_{\alpha q}$ ou $G_{\alpha i}$ ($G_{\alpha q/i}$ PCRs), comme les récepteurs PAR-1 et AT1, activent la voie Jak/STAT par l'entremise de petites protéines G de la famille Rho (Pelletier *et al.*, 2003). Longuement décrite dans les paragraphes précédents, l'activation de la voie Jak/STAT (principalement Jak/STAT3) par ces récepteurs comporte deux phases : l'une rapide et directe et l'autre tardive requérant l'expression d'un ou plusieurs facteurs autocrines. À l'inverse, les agonistes de $G_{\alpha s}$ PCRs comme l'isoprotérénol ou la prostaglandine E_1 (PGE1) sont incapables d'activer rapidement les Janus kinases 1 et 2 ou même Tyk2 (Giasson *et al.*, 1997) (figure 5.7). Au contraire, le prétraitement des VSMCs par l'isoprotérénol, la PGE1, le rolipram ou la forskoline interfère avec l'activation de Jak2

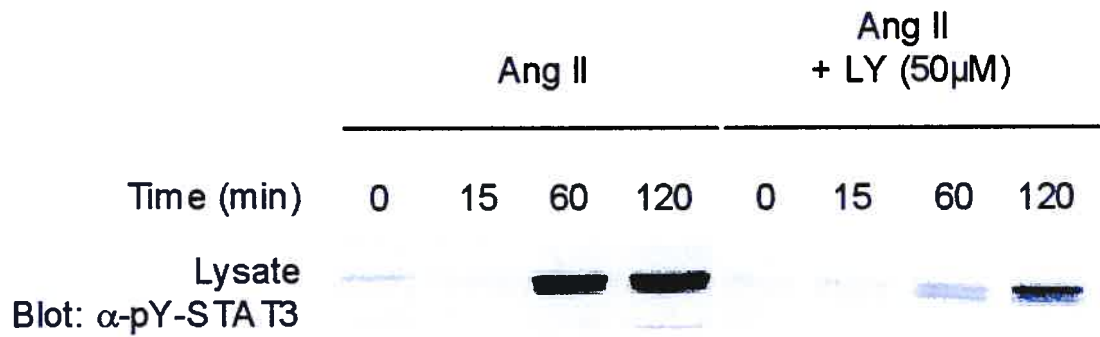


Figure 5.6. Implication de la PI3-kinase dans l'activation à long terme de la voie Jak/STAT par les GPCRs. Les VSMCs ont été prétraitées par le LY294002 (50µM) durant 1h et ensuite stimulées par l'Ang II pour les temps indiqués. L'activation de STAT3 a été déterminée à l'aide de l'anticorps phosphospécifique contre la tyrosine 705 phosphorylée.

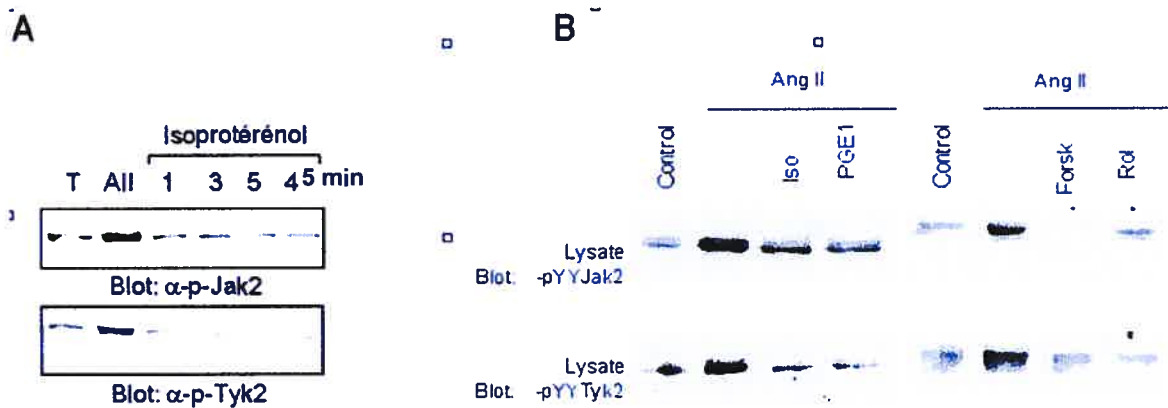


Figure 5.7. L'augmentation d'AMP cyclique inhibe l'activation des Jaks par l'Ang II. A. L'isoprotérénol est incapable d'activer Jak2 et Tyk2 dans les VSMCs. B. Le prétraitement des VSMCs par des agents qui augmentent l'AMP cyclique interfère avec l'activation de Jak2 et Tyk2 dans les VSMCs.

et Tyk2 en réponse à l'Ang II (Giasson *et al.*, 1997; Meloche *et al.*, 2000) (Figure 5.7). Des travaux préliminaires ont démontrés que l'élévation d'AMP cyclique dans les VSMCs prévenait l'action hypertrophique de l'Ang II et que ces effets sont associés à une perte de phosphorylation en tyrosine des protéines Tyk2 et paxilline (Giasson *et al.*, 1997). Par la suite, nous avons démontré que la perte de phosphorylation en tyrosine de Tyk2 était associée à la perte de phosphorylation des tyrosines de la boucle activatrice de Tyk2 (Meloche *et al.*, 2000). Plusieurs mécanismes ont alors été proposés afin de décrire ce *Cross-Talk* négatif et sont présentés au Chapitre 2 et discutés dans la section 5.2.



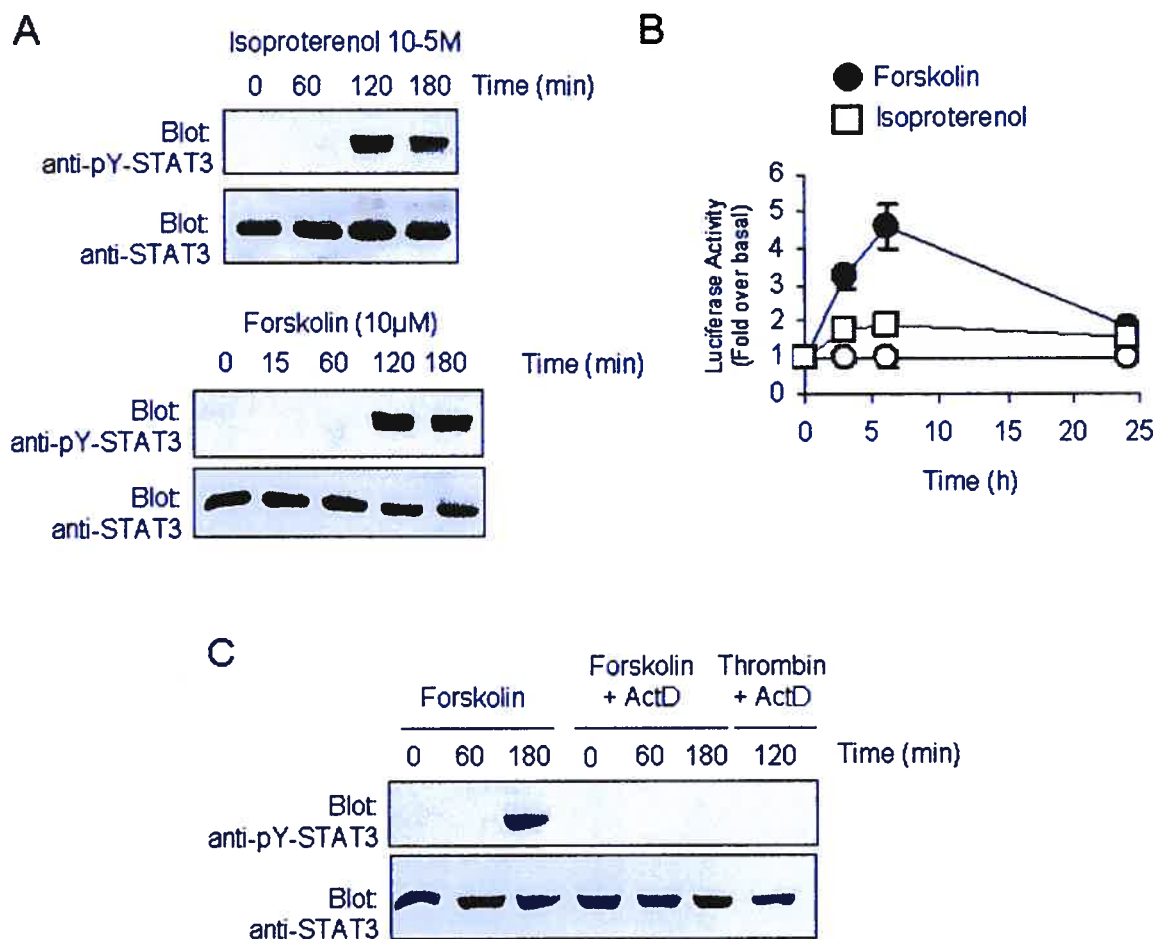


Figure 5.8. La simulation à long terme des VSMCs par l'isoprotérénol ou la forskoline conduit aussi à l'activation de STAT3 dans les VSMCs. A. Les VSMCs ont été stimulées par l'isoprotérénol (10 µM) ou la forskoline (10 µM) pour les temps indiqués et l'activation de STAT3 a été mesurée à l'aide de l'anticorps phosphospécifique contre la tyrosine 705 phosphorylée. B. Les VSMCs ont été transfectées avec les plasmides pGL-2xIFP53GAS-luc avec pcDNA3.1-His/LacZ. 48 h suivant la transfection, les cellules ont été stimulées avec la forskoline (10 µM) ou l'isoprotérénol (10 µM) pour les temps indiqués et l'activité luciférase a été déterminée tel que décrit dans (Pelletier *et al.*, 2003). C. Les VSMCs ont été prétraitées en présence ou non d'actinomycine D (ActD, 50 µg/ml) 1h et ensuite stimulées avec la forskoline (10 µM) ou la thrombine (1 U/ml) pour les temps indiqués. L'activation de STAT3 a été déterminée à l'aide de l'anticorps phosphospécifique contre la tyrosine 705.

L'isoprotérénol et la PGE1 sont incapables d'activer rapidement la voie Jak/STAT dans les VSMCs comme le font les agonistes de $G_{q/11}$ ou $G_{i/o}$ PCR (figure 5.7). À la lumière de nos résultats, ceci peut être dû à l'incapacité de l'isoprotérénol ou de la PGE1 d'activer Rac et à

générer des ROS. Cependant, l'activation du récepteur β 2-adrénérique par l'isoprotérénol de même que l'activation d'AC par la forskoline sont capables d'activer STAT3 après plusieurs heures de stimulation.

En réponse à un traitement prolongé à l'isoprotérénol ou à la forskoline, STAT3 est phosphorylée sur la Tyr705 et on observe une augmentation de la transcription dépendante de STATs (figure 5.8). Tout comme la deuxième phase d'activation de STAT3 par l'Ang II et la thrombine, l'augmentation d'AMP cyclique intracellulaire conduit aussi à l'activation de STAT3 par le biais d'un facteur autocrine (Figure 5.8). Contrairement au mécanisme requis par l'Ang II ou la thrombine, la Rho-kinase n'est pas impliquée dans ce processus (donnée non présentées). En fait, il est fort à parier que l'AMP cyclique active STAT3 via l'activation de la protéine kinase A et favorise la transcription du gène de l'IL-6 (Dendorfer *et al.*, 1994; Dendorfer *et al.*, 1995; Grassl *et al.*, 1999). De plus, nous avons observé une augmentation de l'expression de l'IL-6 et de l'IL-11 en réponse à la forskoline (Figure 5.9).

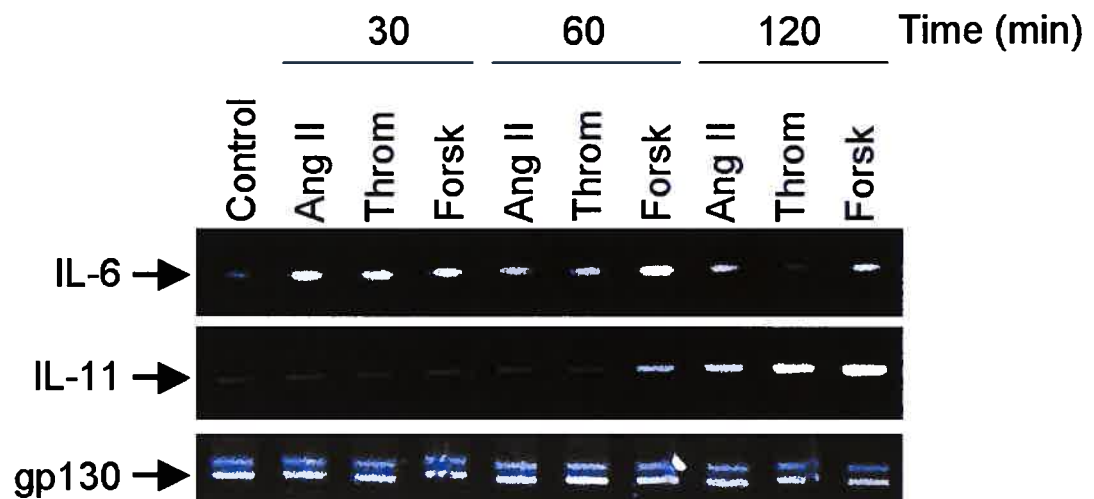


Figure 5.9. La stimulation des VSMCs par l'Ang II, la Thrombine et l'élévation d'AMP cyclique stimule l'expression de l'IL-6 et de l'IL-11. Les VSMCs ont été stimulées 30, 60 et 120 min par l'Ang II, la thrombine (Throm) ou la forskoline (Forsk) et l'expression de l'IL-6, de l'IL-11 et de gp130 a été déterminée par RT-PCR.

5.1.4. Activation de la voie Jak/STAT par les RTKs.

L'activation de la voie Jak/STAT n'est pas une propriété unique des cytokines ou des GPCRs. Cette voie est aussi activée en réponse à certains facteurs de croissance dont l'EGF et le PDGF (Ihle, 1996). Jusqu'à présent, plusieurs modèles ont décrit l'activation des STATs en réponse à ces récepteurs. Il a été suggéré qu'en réponse à l'EGF, les STATs 1, 3 et 5 sont activées et il semble que l'activation de ces STATs est indépendante des Jaks (Ihle, 1996). Des travaux récents suggèrent aussi que l'activation de la voie Jak/STAT par l'EGF requiert l'activation de Rac (Simon *et al.*, 2000).

5.2. Rôles biologiques de la voie Jak/STAT dans la réponse aux GPCRs

La voie de signalisation Jak/STAT est associée presque exclusivement aux effets physiologiques des cytokines de Type I et II (Leonard & O'Shea, 1998; O'Shea *et al.*, 2002). Il est maintenant évident que cette voie de signalisation est aussi activée par certains GPCRs et RTKs. Cependant le rôle de cette voie de signalisation en réponse aux GPCRs et RTKs n'est pas encore bien défini.

5.2.1. Rôle de STAT1 dans la réponse à l'Ang II

STAT1 est activée en réponse à plusieurs cytokines mais semble jouer un rôle essentiel et non redondant uniquement en réponse aux IFNs (Meraz *et al.*, 1996; Durbin *et al.*, 1996). Les IFNs ont généralement un rôle négatif sur la croissance cellulaire. Cette action antiproliférative est due à l'activation de STAT1 puisqu'en son absence, les IFNs peuvent promouvoir la croissance (Nguyen *et al.*, 2000).

Le rôle des STATs en réponse aux GPCRs est à ce jour peu caractérisé. Évidemment, le rôle de chacune de ces STATs l'est encore moins. L'Ang II est une hormone qui induit la synthèse protéique globale dans les VSMCs (Servant *et al.*, 1996). Cependant, elle est un mitogène faible en comparaison au PDGF-BB (Servant *et al.*, 2000). L'Ang II n'est pas le seul agent hypertrophique dans les VSMCs. La thrombine, l'endothéline, la bombésine, l'EGF ainsi que plusieurs autres agonistes stimulent la synthèse protéique dans les VSMCs

(Huckle & Earp, 1994; Andrawis *et al.*, 1996) et données non présentées). Cependant, si nous comparons la puissance de l'Ang II à celle de la thrombine sur l'induction de synthèse protéique dans les VSMCs, il apparaît que la thrombine est légèrement plus puissante que l'Ang II (données non présentées). L'Ang II et la thrombine activent toutes deux les mêmes voies de signalisation, à l'exception de STAT1. Ainsi, en raison de l'action antiproliférative de STAT1, il est tentant de spéculer que cette légère différence soit due à l'activation de ce facteur de transcription. Par contre, les données recueillies à ce jour par le groupe de Marrero, suggèrent que STAT1 joue un rôle essentiel dans l'action hypertrophique en réponse à l'Ang II (Marrero *et al.*, 1997). Cependant, les données recueillies par ce groupe sont préliminaires et une étude beaucoup approfondie du rôle de cette STAT en réponse à l'Ang II doit être effectuée.

Afin d'étudier le rôle de STAT1 dans la réponse à l'Ang II, diverses approches peuvent être envisagées en tenant compte de la difficulté à transfecter les VSMCs. La mise au point de vecteurs rétroviraux encodant différentes protéines SOCS (SOCS-1, 3 et 6) permettra vraisemblablement d'indiquer le rôle général de la voie Jak/STAT en réponse aux agonistes de GPCRs comme l'Ang II et la thrombine. Afin d'étudier le rôle spécifique de STAT1 en réponse à l'Ang II, un vecteur rétroviral encodant un RNAi (siRNA, *small interfering RNA*) dirigé contre STAT1 devrait permettre de diminuer considérablement son expression. Ainsi, il sera possible de juger de son implication sur l'action hypertrophique, la migration et éventuellement la contraction de vaisseaux sanguins ou bien même le rôle *in vivo* de cette STAT en réponse à l'Ang II. Plus intéressant encore, des souris déficientes en STAT1 sont disponibles (Meraz *et al.*, 1996). Grâce à ces souris, il serait relativement simple d'étudier le rôle de cette STAT en réponse à l'Ang II *in vivo* et *in vitro*. En effet, l'isolation de VSMCs de ces souris permettrait d'étudier le rôle de cette STAT sur la croissance ainsi que la migration des VSMCs en réponse aux GPCRs ainsi que d'autres facteurs de croissance.

5.2.2. Rôles de STAT3 en réponse à l'Ang II et la thrombine

À l'inverse de STAT1, STAT3 joue un rôle essentiel lors du développement embryonnaire puisque les souris déficientes en STAT3 meurent au jour 7.5 de gestation (Takeda *et al.*, 1997; Akira, 1999). STAT3 joue un rôle important dans divers processus cellulaires comme la migration, la croissance et la survie cellulaire ainsi que dans le développement de certains cancers (Sakai & Kraft, 1997; Sano *et al.*, 1999; Bowman *et al.*, 2000; Levy & Gilliland, 2000; Grad *et al.*, 2000). De plus, la simple dimérisation de STAT3 peut conduire à la transformation de fibroblastes (Bromberg *et al.*, 1999).

Tel que mentionné ci haut, l'Ang II et la thrombine sont des agents hypertrophiques dans les VSMCs (Weiss & Maduri, 1993; McNamara *et al.*, 1993; Servant *et al.*, 1996). En raison du rôle de STAT3 sur la croissance et la survie cellulaire, il est possible que l'action hypertrophique de l'Ang II et de la thrombine requièrent l'activation de cette STAT. Cependant, tout comme pour STAT1, le rôle de ce facteur de transcription en réponse aux GPCRs demeure mal caractérisé. Certaines données suggèrent que cette STAT joue un rôle dans l'action hypertrophique de l'Ang II (Marrero *et al.*, 1997).

De façon similaire à STAT1, un vecteur rétroviral encodant un RNAi dirigé contre STAT3 permettrait d'évaluer l'implication de cette STAT sur l'action hypertrophique, la migration et la contraction de vaisseaux sanguins. De même, le rôle *in vivo* de cette STAT dans la resténose post-angioplastie ou autres pathologies vasculaires pourrait être étudié.

Une autre approche consisterait à développer des souris déficiente en STAT3 dans les VSMCs à l'aide de la technologie Cre-Lox. Des souris transgéniques exprimant la Cre-recombinase dans les VSMCs existent déjà (Kuhbandner *et al.*, 2000). De plus, des souris dont le gène encodant STAT3 flanqué de sites LOX sont aussi disponibles (Akira, 1999; Sano *et al.*, 1999; Chapman *et al.*, 1999; Akira, 2000; Chapman *et al.*, 2000; Alonzi *et al.*, 2001; Schweizer *et al.*, 2002). Ainsi, par le croisement de ces deux souches de souris, il serait possible de générer des souris déficientes en STAT3 au niveau des cellules musculaire lisses ce qui permettrait d'étudier le rôle *in vivo* de STAT3 dans le développement du lit vasculaire ainsi qu'en réponse à l'Ang II, la thrombine ou tout autre agoniste. De plus, ces souris pourraient servir à plusieurs autres groupe de recherche

travaillant sur d'autres tissus contenant du muscle lisse comme les voies respiratoires et l'appareil digestif.

5.3. Régulation croisée négative entre l'AMP cyclique et l'activation de Tyk2 par l'Ang II.

L'activation de Tyk2 par l'Ang II est contrecarrée par l'augmentation d'AMP cyclique intracellulaire (Giasson *et al.*, 1997; Meloche *et al.*, 2000). Cette action antagoniste de l'AMP cyclique est relayée par la PKA puisque deux inhibiteurs de cette kinase renversent l'action inhibitrice de l'AMP cyclique sur l'activation de Tyk2 par l'Ang II. Plusieurs hypothèses ont été mises de l'avant afin d'expliquer cette régulation négative. Nous avons alors proposé que 1) la PKA pourrait phosphoryler Tyk2 et la rendre inactive; 2) la signalisation par l'AMP cyclique pourrait augmenter l'expression d'un régulateur négatif de la voie Jak/STAT, en l'occurrence une protéine de la famille SOCS; 3) l'AMP cyclique, via la PKA pourrait activer une PTP; et finalement 4) l'AMP cyclique pourrait interférer avec l'activation des kinases par un nouveau mécanisme (Figure 2.6).

Plusieurs expériences ont été planifiées afin de vérifier ces hypothèses. Suite à ces expériences, il nous a été possible de démontrer que l'expression d'une SOCS ou de tout autre régulateur négatif n'était pas impliqué dans ce processus puisque l'action antagoniste de l'AMP cyclique n'est renversée par un inhibiteur de la transcription (figure 5.10). Aussi, il nous a été impossible de montrer que Tyk2 était phosphorylée par la PKA *in vitro*. Certains résultats nous ont laissé croire que l'action antagoniste de l'AMP cyclique sur l'activation de Tyk2 se situait en amont de l'activation de la tyrosine kinase et qu'elle impliquait possiblement l'activation de PTPs. Cependant, nos résultats n'ont jamais été parfaitement concluants. Malgré tout, ils ont permis de démontrer l'existence d'une régulation croisée négative entre l'AMP cyclique et Rac, un joueur clé dans l'activation de la voie Jak/STAT par les GPCRs (Pelletier *et al.*, 2003) .

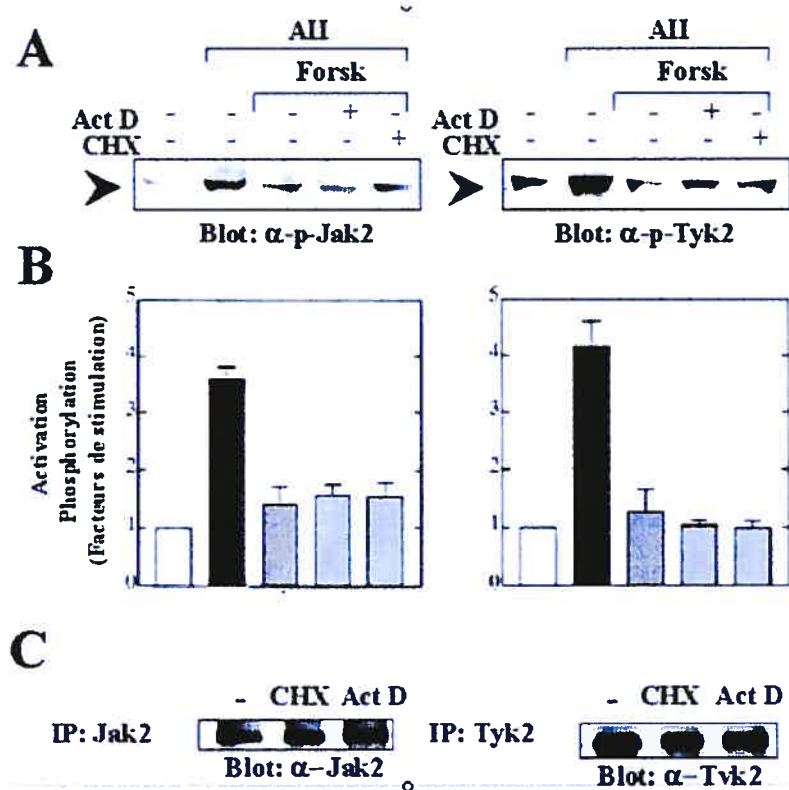


Figure 5.10. L'inhibition de l'activation de Jak2 et de Tyk2 par la forskoline ne requiert pas la synthèse et l'expression d'un régulateur négatif. A. Les VSMCs ont été prétraitées en présence ou non d'actinomycine D (50 μ g/ml) ou de cycloheximide (50 μ g/ml) pour 1 h et ensuite traitées à la forskoline (10 μ M) pour 1 h. Suite à ces préincubations, les VSMCs ont été stimulées par l'Ang II (100 nM) pour 3 min et l'activation de Jak2 et Tyk2 a été mesurée à l'aide d'anticorps phosphospécifiques dirigés contre la forme active de Jak2 ou Tyk2. B. Quantification de A. C. La CHX ou l'ActD n'affecte pas l'expression de Jak2 ni de Tyk2 dans les conditions expérimentales utilisées.

5.4. Régulation croisée négative entre l'AMP cyclique et Rac

L'élévation d'AMP cyclique dans les VSMCs conduit à des changements morphologiques dramatiques. Ces changements morphologiques sont connus sous le nom d'arborisation (*arborization*), de phénotype de l'AMP cyclique (*cAMP phenotype*) ou encore de stellation (*stellation*) (Padmanabhan & Shelanski, 1998). Nous avons démontré que ces changements morphologiques sont associés à l'inhibition de la petite protéine G Rac. En fait, nos données indiquent que l'AMP cyclique, par un mécanisme impliquant la PKA, inhibe l'action de la petite GTPase Rac. Cette inhibition entraîne la perte d'activité de la Rho-Kinase avec

comme résultat la modification de l'organisation de l'actine filamenteuse et l'arborisation des VSMCs (Pelletier *et al.*, 2003b). L'inhibition de Rac par l'AMP cyclique et les changements morphologiques qui en découlent sont fort intéressants, mais ils ne sont que la pointe de l'iceberg. À notre avis, l'inactivation de Rac par l'AMP cyclique a un impact majeur sur la croissance, la migration (chimiotactisme, invasion), la phagocytose ainsi que plusieurs autres fonctions cellulaires où Rac joue un rôle de premier plan.

5.4.1. Rac et croissance cellulaire.

Les GTPases de la famille Rho sont essentielles à la croissance cellulaire. La progression dans le cycle cellulaire dépend des Cdks (*Cyclin-dependent kinases*) dont l'activité varie au cours du cycle cellulaire (Sherr, 1996). La progression de la phase G1 à S requiert l'activation de Ras. Ras active la cascade Raf-MEK-ERK qui est responsable de l'activation de Cdk4 et Cdk6 tôt dans la phase G1 par l'entremise de l'expression du gène de la cycline D1 et l'assemblage des complexes cyclineD-Cdk4/6 (Cheng *et al.*, 1998; Kerkhoff & Rapp, 1998). Ras n'agit pas seul dans ce processus. Rac est un partenaire essentiel. Rac, via l'activation de NF- κ B, est requis afin d'induire suffisamment l'expression de la cycline D1, qui est requise pour l'entrée en phase S (Joyce *et al.*, 1999). Ainsi il est proposé que l'activation de Rac, en collaboration avec la cascade des MAP kinases ERK1 et 2, mène à la production nécessaire et suffisante de cycline D1 pour stimuler la transition G1/S. La capacité de Rac à coopérer avec Ras réside dans sa capacité à générer des ROS (Irani *et al.*, 1997). Dans les VSMCs, l'inhibition de la production de ROS empêche Rac d'activer le promoteur de la cycline D1 (Page *et al.*, 1999). Comme le prétraitement des VSMCs par la forskoline ne prévient pas l'activation des MAP kinases ERK1 et 2 (Atfi *et al.*, 1997; Giasson *et al.*, 1997) (données non montrées), il est possible de croire que, contrairement à ce qui est observé dans plusieurs types cellulaires, (Cook & McCormick, 1993; Stewart *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001; Boucher *et al.*, 2001; Schmitt & Stork, 2001; Lee *et al.*, 2001; Enserink *et al.*, 2002), l'AMP cyclique inhibe la croissance des VSMCs en interférant non pas avec l'activation des MAP kinases mais plutôt avec celle de Rac.

5.4.2. Migration des VSMCs.

Rac et Cdc42 jouent un rôle très important dans la migration cellulaire puisqu'elles sont responsables de générer la force motrice ainsi que la polarisation des cellules lors de la migration dirigée (chimiotactisme) (Nelson *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1998; Nobes & Hall, 1999). Le rôle de Rho dans la croissance cellulaire est moins clair.

La migration cellulaire est impliquée dans une multitude de processus cellulaires physiologiques ainsi que pathophysiologiques. En plus de la formation de métastases et de réactions inflammatoires incontrôlées comme l'asthme ou l'arthrite, la migration cellulaire est aussi impliquée dans diverses pathologies vasculaires dont la resténose post-angioplastie ou tout simplement la sténose (Welt & Rogers, 2002). Ces pathologies sont très semblables et requièrent toutes deux la prolifération et la migration des VSMCs, ainsi que l'infiltration de leucocytes etc. L'augmentation d'AMP cyclique dans les VSMCs réduit considérablement la resténose post-angioplastie en diminuant la croissance, la migration ainsi que l'hypertrophie des VSMCs (Indolfi *et al.*, 1997; Indolfi *et al.*, 2000; Alt *et al.*, 2000). De plus, l'AMP cyclique inhibe aussi l'infiltration des leucocytes ainsi que leur activation (Naik, 1984; Underwood *et al.*, 1993; Alves *et al.*, 1996). À la lumière de ces observations, il est fort probable que les effets bénéfiques de l'AMP cyclique soient associés, du moins en partie, à l'inhibition de Rac.

5.4.3. Rho GTPases et contraction des VSMCs

La contraction des VSMCs est principalement associée à l'activation de Rho et de Rho-kinase (Uehata *et al.*, 1997; Narumiya *et al.*, 2000; Etienne-Manneville & Hall, 2002). L'action vasodilatatrice de l'AMP cyclique dans les VSMCs est probablement associée à l'inhibition de Rho puisque que Rac et Cdc42 semblent peu impliquées dans ce processus (Etienne-Manneville & Hall, 2002). Cependant nos résultats (Chapitre 3) soulèvent l'hypothèse que Rac, par l'entremise de la Rho-kinase, pourrait être impliquée dans ce phénomène.

5.4.4. Mécanisme d'inhibition de Rac par l'AMP cyclique.

Nos données démontrent que l'activation de la PKA par l'AMP cyclique est responsable de changements morphologiques majeurs dans les VSMCs (Pelletier *et al.*, 2003b). Nos données indiquent aussi que l'inhibition des effets de Rac par l'AMP cyclique se situe en amont ou directement au niveau de Rac. En effet, l'expression d'une forme active de Rac (Rac1L61) renverse les effets de l'AMP cyclique sur la morphologie cellulaire. Il est à noter que l'expression d'une forme active de Cdc42 (Cdc42L61) renverse aussi la stellation induite par l'AMP cyclique. Cependant, l'expression d'une forme active de RhoA (RhoAL63) conduit principalement à l'arrondissement des cellules. De plus, nos résultats indiquent que le prétraitement des VSMCs par la forskoline prévient la liaison du GTP à Rac puisque cette dernière ne peut plus lier la protéine de fusion GST-PAK-CRIB (Figure 4.5). Cependant, nos données n'indiquent pas à quel niveau l'AMP cyclique (par l'entremise de la PKA) interfère avec l'activation de Rac.

Plusieurs mécanismes peuvent conduire à l'inhibition de Rac par l'AMP cyclique. Il est possible que l'activation de la PKA inhibe l'activité d'un GEF ou bien qu'elle augmente l'activité d'une GAP. Dans les deux cas, ceci aurait pour effet de diminuer la liaison de GTP à Rac. Cependant, puisque le GEF responsable de l'activation basale de Rac (ou celui activé par l'Ang II) dans ces cellules n'est pas identifié, il est difficile d'évaluer l'impact qu'aurait l'AMP cyclique sur son activité. Ainsi, le manque de connaissance de ce GEF, tout comme les voies de signalisation menant à son activation, sont un obstacle majeur à la compréhension des effets négatifs de l'AMP cyclique sur l'activation de Rac. De façon similaire, la méconnaissance des GAPs responsables de l'hydrolyse du GTP en GDP de Rac rend la caractérisation des effets négatifs de l'AMP cyclique sur Rac plus difficile.

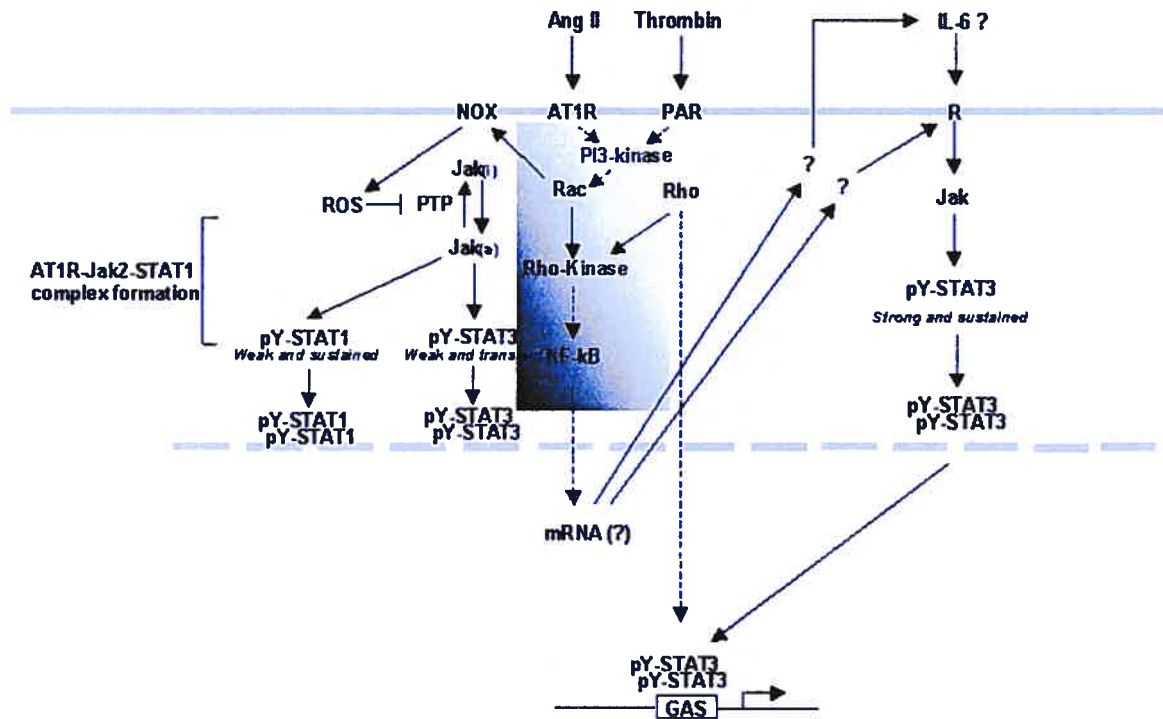


Figure 5.11. Hypothèse de travail concernant le mécanisme d'activation de la voie Jak/STAT par la petite protéine G Rac. L'activation de la voie Jak/STAT par les GPCRs semble complexe et requérir plusieurs cascades de signalisation. Nous proposons que l'activation de la PI3-kinase active certains GEFs (ex. : Vav1, 2 et/ou 3, Tiam1 ou bien P-Rex1). Ces derniers entraînent l'activation de Rac qui, à son tour, active la Rho-kinase ainsi que la NADPH oxydase. D'une part, ceci conduit à l'inhibition de PTPs et d'autre part à l'activation de NF-κB et l'expression du gène de l'IL-6 et/ou du récepteur de l'IL-6. Ceci a pour effet de reconstituer la voie IL-6/IL-6R/Jak/STAT.

Suite à l'observation que l'inhibition de la PI-3 kinase par le LY294002 inhibe aussi l'activation de STAT3 par l'Ang II, nous proposons qu'un GEF, activable par les produits de la PI3-kinase, puisse être responsable de l'activation de Rac et par la suite STAT3 selon le modèle proposé à la Figure 5.11. De façon intéressante, l'incubation de VSMCs en présence de LY294002 conduit à des changements morphologiques identiques à ceux observés en présence de forskoline ou d'isoprotérénol (Figure 5.12). Ces données suggèrent que l'AMP cyclique puisse interférer dans l'activation de cette lipide kinase. En accord avec cette hypothèse, l'inhibition du *Burst* oxydatif dans les éosinophiles par l'élévation d'AMP cyclique est associé à l'inhibition de l'activité PI3-kinase (Ahmed *et al.*, 1995). Ainsi, il est possible qu'un mécanisme semblable soit à l'origine de ces changements

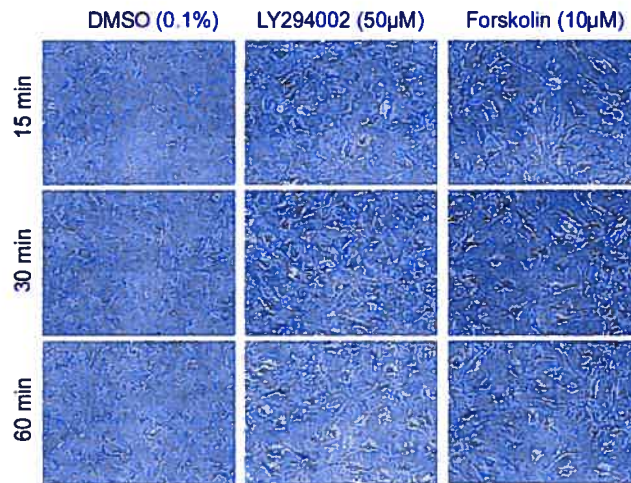


Figure 5.12. L'inhibition de la PI3-kinase induit la stellation des VSMCs. Les VSMCs ont été traitées en présence de DMSO (0,1%), de LY294002 (50 μ M) ou de forskoline (10 μ M) pour les temps indiqués et les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope à contraste de phases.

morphologiques. Jusqu'à présent, trois GEFs (et leurs sous-type s'il y a lieu) sont activés par les produit de la PI3-kinase. Ces GEFs sont Vav (Vav1, Vav2 et Vav3), Tiam1 et P-Rex1 (Fleming *et al.*, 2000; Das *et al.*, 2000; Welch *et al.*, 2002).

5.4.5. Une voie de signalisation Rac-ROCK.

Nos résultats suggèrent aussi que Rac active la Rho-kinase. Découverte suite à un criblage par double hybride ayant comme appât une forme active de Rho, la Rho-kinase a été longtemps reconnue pour être spécifiquement activée par Rho (Leung *et al.*, 1995; Leung *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 1996; Nakagawa *et al.*, 1996). Cependant, des données plus récentes indiquent que la Rho-kinase peut lier une forme active de Rac (Lamarche *et al.*, 1996). Nos travaux indiquent aussi qu'une forme active de Rac s'associe à une protéine de fusion comportant le domaine de liaison à Rho de ROCK (GST-ROK-Rho-Binding domain) (donnés non présentées). L'activation de ROCK par Rac est requise afin de contrer les effets de l'AMP cyclique sur les VSMCs (Chapitre 3, Pelletier *et al.*, 2003b). Aussi, il semble que cette kinase soit aussi impliquée dans l'activation tardive de STAT3 par les GPCRs (Pelletier *et al.*, 2003). Nos résultats, ainsi que ceux obtenus par Lamarche *et al.*,

1996 et Vincent *et al.*,1997, sont les premiers à proposer que la Rho-kinase soit aussi un effecteur physiologique de Rac.

Comme Rho, Rac induit la polymérisation de l'actine. Cependant, l'activation de Rho conduit principalement à la formation de fibres de stress (Figure 5.13) alors que celle de

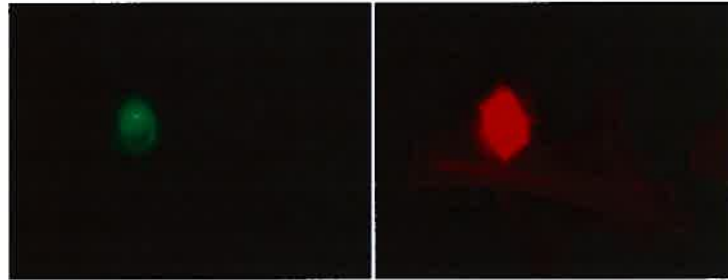


Figure 5.13. l'expression d'un mutant actif de Rho dans les VSMCs conduit à la formation de fibres de stress et à l'arrondissement des cellules.

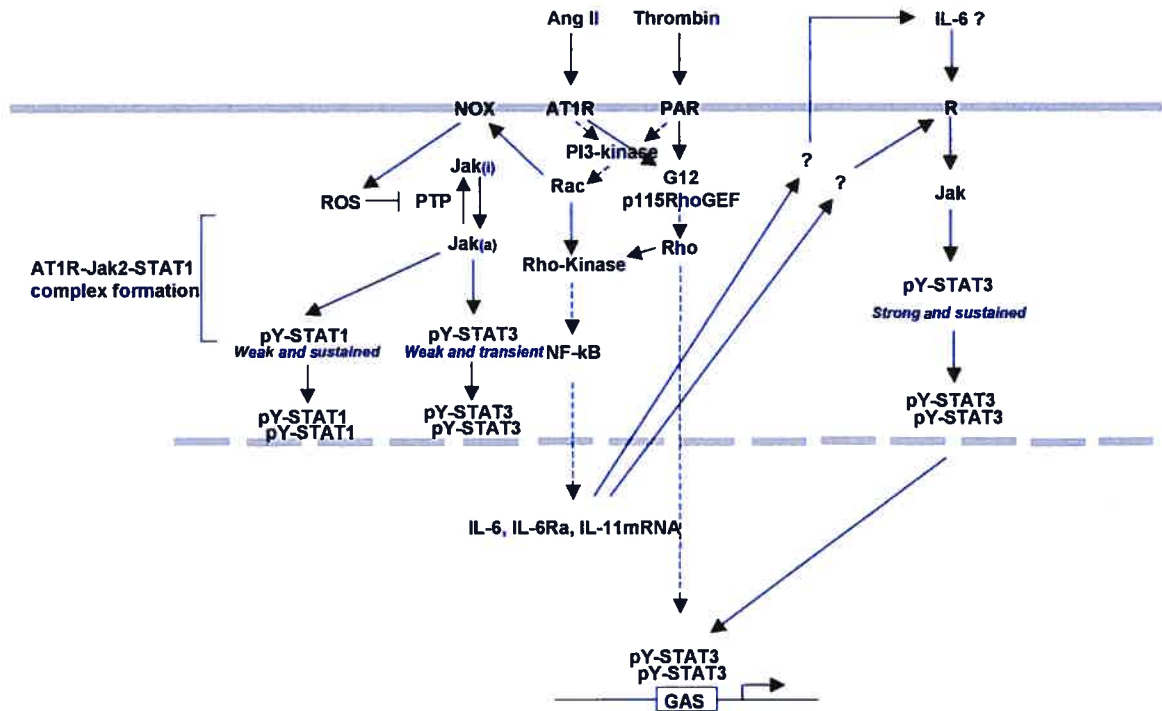


Figure 5.14. Modèle d'activation de la voie Jak/STAT par les Gq/11 et Gi/oPCRs.

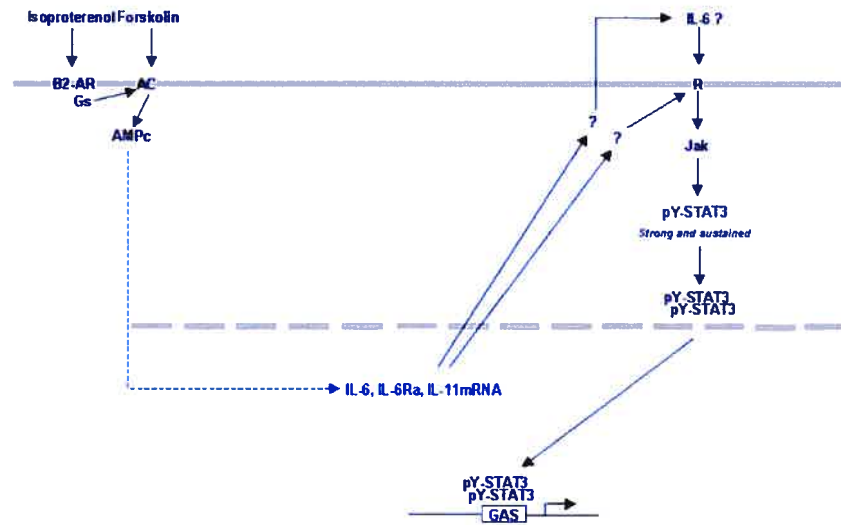


Figure 5.15. Mécanisme d'activation de la voie Jak/STAT par les GsPCRs et le messager secondaire AMP cyclique.

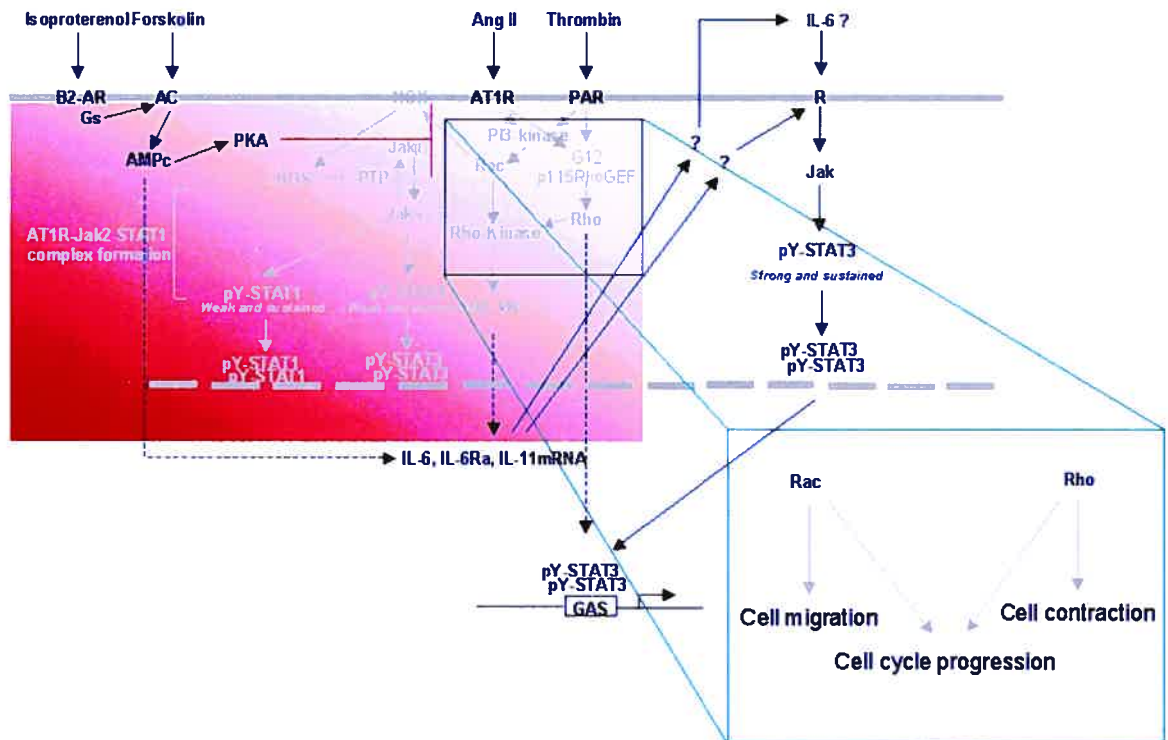


Figure 5.16. L'élévation d'AMP cyclique affecte l'activation de Rac et ainsi l'activation rapide de la voie Jak/STAT, la progression dans le cycle cellulaire, la migration cellulaire.

Rac à la formation d'actine filamenteuse au pourtour des VSMCs (Pelletier *et al.*, 2003b). Dans les deux cas, la Rho-kinase semble requise. Par contre, l'activation de cette kinase mène à deux formes distinctes d'organisation de l'actine filamenteuse. Il est possible que la localisation des petites protéines G joue un important dans ce phénomène. Ces dernières pourraient influencer la localisation de la kinase et conduire à la polymérisation de l'actine à certains endroits bien spécifiques.

Conclusion

Nos travaux ont conduit à l'identification de nouveaux mécanismes de transmission de signaux intracellulaires qu'empruntent les GPCRs afin d'activer la voie de signalisation Jak/STAT. Nous avons identifié Rac comme un élément clé de l'activation de cette voie de signalisation (Figure 5.14 et 5.15). Cependant les détails du mécanisme restent encore à élucider. L'identification de Rac dans ce processus nous a aussi permis d'élaborer un modèle expliquant les effets inhibiteurs de l'AMP cyclique sur l'activation rapide des Jaks par l'Ang II. Nos travaux indiquent que l'élévation d'AMP cyclique empêche l'Ang II d'activer Rac et par conséquent Tyk2 et Jak2. Finalement, l'inhibition de la voie Rac-Rho-kinase par l'AMP cyclique conduit à la stellation des VSMCs (Figure 5.16).

L'identification de Rac comme joueur central dans l'activation de certaines voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire, la croissance, la migration, ainsi que la contraction indique que cette petite protéine pourrait être une cible de choix pour le développement de substances pharmacologiques visant à inhiber son action. Ainsi, diverses pathologies comme l'hypertension, l'athérosclérose, la resténose ainsi que diverses réactions inflammatoires pourraient être mieux contrôlées.

Bibliographie

- ABDUL-MANAN N., AGHAZADEH B., LIU G.A., MAJUMDAR A., OUERFELLI O., SIMINOVITCH K.A. & ROSEN M.K. (1999) Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the 'Wiskott-Aldrich syndrome' protein *Nature* **399**, 379-383.
- ABE J., KUSUHARA M., ULEVITCH R.J., BERK B.C. & LEE J.D. (1996) Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J.Biol.Chem.* **271**, 16586-16590.
- ABE J., TAKAHASHI M., ISHIDA M., LEE J.D. & BERK B.C. (1997) c-Src is required for oxidative stress-mediated activation of big mitogen-activated protein kinase 1. *J.Biol.Chem.* **272**, 20389-20394.
- ABO A., BOYHAN A., WEST I., THRASHER A.J. & SEGAL A.W. (1992) Reconstitution of neutrophil NADPH oxidase activity in the cell-free system by four components: p67-phox, p47-phox, p21rac1, and cytochrome b-245. *J.Biol.Chem.* **267**, 16767-16770.
- ABO A., PICK E., HALL A., TOTTY N., TEAHAN C.G. & SEGAL A.W. (1991) Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* **353**, 668-670.
- ABO A., QU J., CAMMARANO M.S., DAN C., FRITSCH A., BAUD V., BELISLE B. & MINDEN A. (1998) PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *EMBO J.* **17**, 6527-6540.
- ABRAHAM L.A. & MACKIE E.J. (1999) Modulation of osteoblast-like cell behavior by activation of protease-activated receptor-1. *J.Bone Miner.Res.* **14**, 1320-1329.

- ABRAHAM R.T. (2002) Identification of TOR signaling complexes: more TORC for the cell growth engine. *Cell* **111**, 9-12.
- ABRAHAM S.T., BENSCOTER H.A., SCHWORER C.M. & SINGER H.A. (1997) A role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in the mitogen- activated protein kinase signaling cascade of cultured rat aortic vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* **81**, 575-584.
- ADELSTEIN R.S. (1983) Regulation of contractile proteins by phosphorylation. *J.Clin.Invest* **72**, 1863-1866.
- AHMED M.U., HAZEKI K., HAZEKI O., KATADA T. & UI M. (1995) Cyclic AMP-increasing agents interfere with chemoattractant-induced respiratory burst in neutrophils as a result of the inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase rather than receptor-operated Ca²⁺ influx. *J.Biol.Chem.* **270**, 23816-23822.
- AHN S, NELSON CD, GARRISON TR, MILLER WE, LEFKOWITZ RJ. (2003) Desensitization, internalization, and signaling functions of beta-arrestins demonstrated by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**,1740-1744.
- AKAISHI H., TAKEDA K., KAISHO T., SHINEHA R., SATOMI S., TAKEDA J. & AKIRA S. (1998) Defective IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain expression in Stat3- deficient T lymphocytes. *Int.Immunol.* **10**, 1747-1751.
- AKIRA S. (1999) Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells* **17**, 138-146.
- AKIRA S. (2000) Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* **19**, 2607-2611.
- AKIRA S., NISHIO Y., INOUE M., WANG X.J., WEI S., MATSUSAKA T., YOSHIDA K., SUDO T., NARUTO M. & KISHIMOTO T. (1994) Molecular cloning of

APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91- related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* **77**, 63-71.

AKTORIES K, SCHMIDT G, JUST I. (2000) Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol. Chem.* **381**,421-6.

ALBERTS A.S., MONTMINY M., SHENOLIKAR S. & FERAMISCO J.R. (1994) Expression of a peptide inhibitor of protein phosphatase 1 increases phosphorylation and activity of CREB in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol.Cell Biol.* **14**, 4398-4407.

ALI M.S., SAYESKI P.P. & BERNSTEIN K.E. (2000) Jak2 acts as both a STAT1 kinase and as a molecular bridge linking STAT1 to the angiotensin II AT1 receptor. *J.Biol.Chem.* **275**, 15586-15593.

ALI M.S., SAYESKI P.P., DIRKSEN L.B., HAYZER D.J., MARRERO M.B. & BERNSTEIN K.E. (1997a) Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. *J.Biol.Chem.* **272**, 23382-23388.

ALI M.S., SAYESKI P.P., SAFAVI A., LYLES M. & BERNSTEIN K.E. (1998) Janus kinase 2 (Jak2) must be catalytically active to associate with the AT1 receptor in response to angiotensin II. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **249**, 672-677.

ALI M.S., SCHIEFFER B., DELAFONTAINE P., BERNSTEIN K.E., LING B.N. & MARRERO M.B. (1997b) Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation and activation of insulin receptor substrate 1 and protein-tyrosine phosphatase 1D in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* **272**, 12373-12379.

ALLEN W.E., ZICHA D., RIDLEY A.J. & JONES G.E. (1998) A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J.Cell Biol.* **141**, 1147-1157.

- ALLIN C. & GERWERT K. (2001) Ras catalyzes GTP hydrolysis by shifting negative charges from gamma- to beta-phosphate as revealed by time-resolved FTIR difference spectroscopy. *Biochemistry* **40**, 3037-3046.
- ALONZI T., MARITANO D., GORGONI B., RIZZUTO G., LIBERT C. & POLI V. (2001) Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation [correction of activation] in the liver. *Mol. Cell Biol.* **21**, 1621-1632.
- ALT E., HAEHNEL I., BEILHARZ C., PRIETZEL K., PRETER D., STEMBERGER A., FLIEDNER T., ERHARDT W. & SCHOMIG A. (2000) Inhibition of neointima formation after experimental coronary artery stenting: a new biodegradable stent coating releasing hirudin and the prostacyclin analogue iloprost. *Circulation* **101**, 1453-1458.
- ALVES A.C., PIRES A.L., CRUZ H.N., SERRA M.F., DIAZ B.L., CORDEIRO R.S., LAGENTE V. & MARTINS M.A. (1996) Selective inhibition of phosphodiesterase type IV suppresses the chemotactic responsiveness of rat eosinophils in vitro. *Eur.J.Pharmacol.* **312**, 89-96.
- AMANO M., MUKAI H., ONO Y., CHIHARA K., MATSUI T., HAMAJIMA Y., OKAWA K., IWAMATSU A. & KAIBUCHI K. (1996) Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N. *Science* **271**, 648-650.
- ANDRAWIS N.S., WANG E. & ABERNETHY D.R. (1996) Endothelin-1 induces an increase in total protein synthesis and expression of the smooth muscle alpha-actin gene in vascular smooth muscle cells. *Life Sci.* **59**, 523-528.
- ANTONACCIO M.J. & NORMANDIN D. (1994) Role of Ca²⁺ in the vascular contraction caused by a thrombin receptor activating peptide. *Eur.J.Pharmacol.* **256**, 37-44.

- ANTONACCIO M.J., NORMANDIN D., SERAFINO R. & MORELAND S. (1993) Effects of thrombin and thrombin receptor activating peptides on rat aortic vascular smooth muscle. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **266**, 125-132.
- ANWAY M.D., RAVINDRANATH N., DYM M. & GRISWOLD M.D. (2002) Identification of a murine testis complementary DNA encoding a homolog to human A-kinase anchoring protein-associated sperm protein. *Biol.Reprod.* **66**, 1755-1761.
- AOKI N. & MATSUDA T. (2000) A cytosolic protein-tyrosine phosphatase PTP1B specifically dephosphorylates and deactivates prolactin-activated STAT5a and STAT5b. *J.Biol.Chem.* **275**, 39718-39726.
- ARAGAY A.M., COLLINS L.R., POST G.R., WATSON A.J., FERAMISCO J.R., BROWN J.H. & SIMON M.I. (1995) G12 requirement for thrombin-stimulated gene expression and DNA synthesis in 1321N1 astrocytoma cells. *J.Biol.Chem.* **270**, 20073-20077.
- ARBER S., BARBAYANNIS F.A., HANSER H., SCHNEIDER C., STANYON C.A., BERNARD O. & CARONI P. (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* **393**, 805-809.
- ARGETSINGER L.S., CAMPBELL G.S., YANG X., WITTHUHN B.A., SILVENNOINEN O., IHLE J.N. & CARTER-SU C. (1993) Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* **74**, 237-244.
- ARGETSINGER L.S. & CARTER-SU C. (1996) Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol Rev.* **76**, 1089-1107.
- ASPENSTROM P. (1997) A Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton. *Curr.Biol.* **7**, 479-487.

- ASPENSTROM P., LINDBERG U. & HALL A. (1996) Two GTPases, Cdc42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr.Biol.* **6**, 70-75.
- ATFI A., DJELLOUL S., CHASTRE E., DAVIS R. & GESPACH C. (1997) Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in transforming growth factor beta-mediated signaling. *J.Biol.Chem.* **272**, 1429-1432.
- AZAM M., ERDJUMENT-BROMAGE H., KREIDER B.L., XIA M., QUELLE F., BASU R., SARIS C., TEMPST P., IHLE J.N. & SCHINDLER C. (1995) Interleukin-3 signals through multiple isoforms of Stat5. *EMBO J.* **14**, 1402-1411.
- AZIM A.C., BARKALOW K., CHOU J. & HARTWIG J.H. (2000) Activation of the small GTPases, rac and cdc42, after ligation of the platelet PAR-1 receptor. *Blood* **95**, 959-964.
- BABICH M., KING K.L. & NISSENSON R.A. (1990) Thrombin stimulates inositol phosphate production and intracellular free calcium by a pertussis toxin-insensitive mechanism in osteosarcoma cells. *Endocrinology* **126**, 948-954.
- BABIOR B.M. (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**, 1464-1476.
- BACH E.A., AGUET M. & SCHREIBER R.D. (1997) The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu.Rev.Immunol.* **15**, 563-591.
- BAFFY G., YANG L., RAJ S., MANNING D.R. & WILLIAMSON J.R. (1994) G protein coupling to the thrombin receptor in Chinese hamster lung fibroblasts. *J.Biol.Chem.* **269**, 8483-8487.
- BAGRODIA S. & CERIONE R.A. (1999) Pak to the future. *Trends Cell Biol.* **9**, 350-355.

- BAHOU W.F., KUTOK J.L., WONG A., POTTER C.L. & COLLIER B.S. (1994) Identification of a novel thrombin receptor sequence required for activation-dependent responses. *Blood* **84**, 4195-4202.
- BAILLIE GS, SOOD A, MCPHEE I, GALL I, PERRY SJ, LEFKOWITZ RJ, AND HOUSLAY MD. Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesteraserecruitment regulates -adrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 940-945.
- BAIRD A.M., LUCAS J.A. & BERG L.J. (2000) A profound deficiency in thymic progenitor cells in mice lacking Jak3. *J.Immunol.* **165**, 3680-3688.
- BALDWIN J.M., SCHERTLER G.F. & UNGER V.M. (1997) An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *J.Mol.Biol.* **272** , 144-164.
- BALMFORTH A.J., SHEPHERD F.H., WARBURTON P. & BALL S.G. (1997) Evidence of an important and direct role for protein kinase C in agonist-induced phosphorylation leading to desensitization of the angiotensin AT1A receptor. *Br.J.Pharmacol.* **122**, 1469-1477.
- BANFI B., CLARK R.A., STEGER K. & KRAUSE K.H. (2003) Two Novel Proteins Activate Superoxide Generation by the NADPH Oxidase NOX1. *J.Biol.Chem.* **278**, 3510-3513.
- BANYARD J., ANAND-APTE B., SYMONS M. & ZETTER B.R. (2000) Motility and invasion are differentially modulated by Rho family GTPases. *Oncogene* **19**, 580-591.
- BAR-SHAVIT R., BENEZRA M., ELDOR A., HY-AM E., FENTON J.W., WILNER G.D. & VLODAVSKY I. (1990) Thrombin immobilized to extracellular matrix is a

potent mitogen for vascular smooth muscle cells: nonenzymatic mode of action. *Cell Regul.* **1**, 453-463.

BAR-SHAVIT R., KAHN A., FENTON J.W. & WILNER G.D. (1983) Chemotactic response of monocytes to thrombin. *J.Cell Biol.* **96**, 282-285.

BAUDOUIN M., DEVYNCK M.A. & MEYER P. (1972) Angiotensin receptors in smooth muscle cells. *Adv.Nephrol.Necker Hosp.* **2**, 181-189.

BEAVO J.A., CONTI M. & HEASLIP R.J. (1994) Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Mol.Pharmacol.* **46**, 399-405.

BELHAM C.M., SCOTT P.H., TWOMEY D.P., GOULD G.W., WADSWORTH R.M. & PLEVIN R. (1997) Evidence that thrombin-stimulated DNA synthesis in pulmonary arterial fibroblasts involves phosphatidylinositol 3-kinase-dependent p70 ribosomal S6 kinase activation. *Cell Signal.* **9**, 109-116.

BELISLE B. & ABO A. (2000) N-Formyl peptide receptor ligation induces rac-dependent actin reorganization through Gbeta gamma subunits and class Ia phosphoinositide 3-kinases. *J.Biol.Chem.* **275**, 26225-26232.

BELL L. & MADRI J.A. (1990) Influence of the angiotensin system on endothelial and smooth muscle cell migration. *Am.J.Pathol.* **137**, 7-12.

BENARD V., BOHL B.P. & BOKOCH G.M. (1999) Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *J.Biol.Chem.* **274**, 13198-13204.

BENDER A. & PRINGLE J.R. (1989) Multicopy suppression of the cdc24 budding defect in yeast by CDC42 and three newly identified genes including the ras-related gene RSR1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 9976-9980.

- BENKA M.L., LEE M., WANG G.R., BUCKMAN S., BURLACU A., COLE L., DEPINA A., DIAS P., GRANGER A., GRANT B. & . (1995) The thrombin receptor in human platelets is coupled to a GTP binding protein of the G alpha q family. *FEBS Lett.* **363**, 49-52.
- BERGSMA D.J., ELLIS C., KUMAR C., NUTHULAGANTI P., KERSTEN H., ELSHOURBAGY N., GRIFFIN E., STADEL J.M. & AIYAR N. (1992) Cloning and characterization of a human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **183**, 989-995.
- BERK B.C., VEKSHTEN V., GORDON H.M. & TSUDA T. (1989) Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **13**, 305-314.
- BHAT G.J. & BAKER K.M. (1998) Cross-talk between angiotensin II and interleukin-6-induced signaling through Stat3 transcription factor. *Basic Res.Cardiol.* **93 Suppl 3**, 26-29.
- BHAT G.J., THEKKUMKARA T.J., THOMAS W.G., CONRAD K.M. & BAKER K.M. (1994) Angiotensin II stimulates sis-inducing factor-like DNA binding activity. Evidence that the AT1A receptor activates transcription factor-Stat91 and/or a related protein. *J.Biol.Chem.* **269**, 31443-31449.
- BHAT G.J., THEKKUMKARA T.J., THOMAS W.G., CONRAD K.M. & BAKER K.M. (1995) Activation of the STAT pathway by angiotensin II in T3CHO/AT1A cells. Cross-talk between angiotensin II and interleukin-6 nuclear signaling. *J.Biol.Chem.* **270**, 19059-19065.
- BHATTACHARYA S., ECKNER R., GROSSMAN S., OLDREAD E., ARANY Z., D'ANDREA A. & LIVINGSTON D.M. (1996) Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon- alpha. *Nature* **383**, 344-347.

- BINARI R. & PERRIMON N. (1994) Stripe-specific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in *Drosophila*. *Genes Dev.* **8**, 300-312.
- BISHOP A.L. & HALL A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem.J.* **348 Pt 2**, 241-255.
- BIZIOS R., LAI L., FENTON J.W. & MALIK A.B. (1986) Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils. *J.Cell Physiol* **128**, 485-490.
- BLANCO-APARICIO C., TORRES J. & PULIDO R. (1999) A novel regulatory mechanism of MAP kinases activation and nuclear translocation mediated by PKA and the PTP-SL tyrosine phosphatase. *J.Cell Biol.* **147**, 1129-1136.
- BOKOCH G.M. (1994) Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP-binding proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.* **6**, 212-218.
- BOKOCH G.M. & DIEBOLD B.A. (2002) Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood* **100**, 2692-2696.
- BOKOCH G.M., VLAHOS C.J., WANG Y., KNAUS U.G. & TRAYNOR-KAPLAN A.E. (1996) Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem.J.* **315 (Pt 3)**, 775-779.
- BOS J.L. (1998) All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *EMBO J.* **17**, 6776-6782.
- BOUCHER M.J., DUCHESNE C., LAINE J., MORISSET J. & RIVARD N. (2001) cAMP protection of pancreatic cancer cells against apoptosis induced by ERK inhibition. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **285**, 207-216.
- BOUSSIOTIS V.A., BARBER D.L., NAKARAI T., FREEMAN G.J., GRIBBEN J.G., BERNSTEIN G.M., D'ANDREA A.D., RITZ J. & NADLER L.M. (1994)

Prevention of T cell anergy by signaling through the gamma c chain of the IL-2 receptor. *Science* **266**, 1039-1042.

BOUTON M.C., JANDROT-PERRUS M., MOOG S., CAZENAVE J.P., GUILLIN M.C. & LANZA F. (1995b) Thrombin interaction with a recombinant N-terminal extracellular domain of the thrombin receptor in an acellular system. *Biochem.J.* **305 (Pt 2)**, 635-641.

BOUTON M.C., PLANTIER J.L., DEMBAK M., GUILLIN M.C., RABIET M.J. & JANDROT-PERRUS M. (1995a) Role of the thrombin insertion loop 144-155. Study of thrombin mutations W148G, K154E and a thrombin-based synthetic peptide. *Eur.J.Biochem.* **229**, 526-532.

BOUVIER M., LEEB-LUNDBERG L.M., BENOVIC J.L., CARON M.G. & LEFKOWITZ R.J. (1987) Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation. II. Effects of agonist occupancy on phosphorylation of alp. *J.Biol.Chem.* **262**, 3106-3113.

BOWMAN T., BROOME M.A., SINIBALDI D., WHARTON W., PLEDGER W.J., SEDIVY J.M., IRBY R., YEATMAN T., COURTNEIDGE S.A. & JOVE R. (2001) Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 7319-7324.

BOWMAN T., GARCIA R., TURKSON J. & JOVE R. (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19**, 2474-2488.

BRASS L.F., AHUJA M., BELMONTE E., PIZARRO S., TARVER A. & HOXIE J.A. (1994) The human platelet thrombin receptor. Turning it on and turning it off. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **714**, 1-12.

BRASS L.F. & MOLINO M. (1997) Protease-activated G protein-coupled receptors on human platelets and endothelial cells. *Thromb.Haemost.* **78**, 234-241.

- BRISCOE J., ROGERS N.C., WITTHUHN B.A., WATLING D., HARPUR A.G., WILKS A.F., STARK G.R., IHLE J.N. & KERR I.M. (1996) Kinase-negative mutants of JAK1 can sustain interferon-gamma-inducible gene expression but not an antiviral state. *EMBO J.* **15**, 799-809.
- BROMBERG J.F. & DARNELL J.E., Jr. (1999) Potential roles of Stat1 and Stat3 in cellular transformation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **64**, 425-428.
- BROMBERG J.F., WRZESZCZYNSKA M.H., DEVGAN G., ZHAO Y., PESTELL R.G., ALBANESE C. & DARNELL J.E., Jr. (1999) Stat3 as an oncogene. *Cell* **98**, 295-303.
- BROWN J.L., STOWERS L., BAER M., TREJO J., COUGHLIN S. & CHANT J. (1996) Human Ste20 homologue hPAK1 links GTPases to the JNK MAP kinase pathway. *Curr. Biol.* **6**, 598-605.
- BUNTING K.D., BRADLEY H.L., HAWLEY T.S., MORIGGL R., SORRENTINO B.P. & IHLE J.N. (2002) Reduced lymphomyeloid repopulating activity from adult bone marrow and fetal liver of mice lacking expression of STAT5. *Blood* **99**, 479-487.
- BURBELO P.D., SNOW D.M., BAHOU W. & SPIEGEL S. (1999) MSE55, a Cdc42 effector protein, induces long cellular extensions in fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**, 9083-9088.
- BURNS K.D., INAGAMI T. & HARRIS R.C. (1993) Cloning of a rabbit kidney cortex AT1 angiotensin II receptor that is present in proximal tubule epithelium. *Am. J. Physiol* **264**, F645-F654
- BURNS L., CLARK K.L., BRADLEY J., ROBERTSON M.J. & CLARK A.J. (1994) Molecular cloning of the canine angiotensin II receptor. An AT1-like receptor with reduced affinity for DuP753. *FEBS Lett.* **343**, 146-150.

- BUSTELO X.R., CRESPO P., LOPEZ-BARAHONA M., GUTKIND J.S. & BARBACID M. (1997) Cbl-b, a member of the Sli-1/c-Cbl protein family, inhibits Vav- mediated c-Jun N-terminal kinase activation. *Oncogene* **15**, 2511-2520.
- CANDOTTI F., OAKES S.A., JOHNSTON J.A., GILIANI S., SCHUMACHER R.F., MELLA P., FIORINI M., UGAZIO A.G., BADOLATO R., NOTARANGELO L.D., BOZZI F., MACCHI P., STRINA D., VEZZONI P., BLAESE R.M., O'SHEA J.J. & VILLA A. (1997) Structural and functional basis for JAK3-deficient severe combined immunodeficiency. *Blood* **90**, 3996-4003.
- CANDOTTI F., OAKES S.A., JOHNSTON J.A., NOTARANGELO L.D., O'SHEA J.J. & BLAESE R.M. (1996) In vitro correction of JAK3-deficient severe combined immunodeficiency by retroviral-mediated gene transduction. *J.Exp.Med.* **183**, 2687-2692.
- CAO X., SHORES E.W., HU-LI J., ANVER M.R., KELSALL B.L., RUSSELL S.M., DRAGO J., NOGUCHI M., GRINBERG A., BLOOM E.T. & . (1995) Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity*. **2**, 223-238.
- CARNEY D.H., GLENN K.C. & CUNNINGHAM D.D. (1978) Conditions which affect initiation of animal cell division by trypsin and thrombin. *J.Cell Physiol* **95**, 13-22.
- CARNEY K. (1992) Home blood anticoagulant monitoring--a physician alliance result. *Caring*. **11**, 48-49.
- CARPENTER C.L., AUGER K.R., DUCKWORTH B.C., HOU W.M., SCHAFFHAUSEN B. & CANTLEY L.C. (1993) A tightly associated serine/threonine protein kinase regulates phosphoinositide 3-kinase activity. *Mol.Cell Biol.* **13**, 1657-1665.

- CARRERA A., GERTON G.L. & MOSS S.B. (1994) The major fibrous sheath polypeptide of mouse sperm: structural and functional similarities to the A-kinase anchoring proteins. *Dev.Biol.* **165**, 272-284.
- CASEY P.J., SOLSKI P.A., DER C.J. & BUSS J.E. (1989) p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 8323-8327.
- CHAMLEY-CAMPBELL J.H., CAMPBELL G.R. & ROSS R. (1981) Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens. *J.Cell Biol.* **89**, 379-383.
- CHANOCK S.J., EL BENNA J., SMITH R.M. & BABIOR B.M. (1994) The respiratory burst oxidase. *J.Biol.Chem.* **269**, 24519-24522.
- CHAPMAN R.S., LOURENCO P., TONNER E., FLINT D., SELBERT S., TAKEDA K., AKIRA S., CLARKE A.R. & WATSON C.J. (2000) The role of Stat3 in apoptosis and mammary gland involution. Conditional deletion of Stat3. *Adv.Exp.Med.Biol.* **480**, 129-138.
- CHAPMAN R.S., LOURENCO P.C., TONNER E., FLINT D.J., SELBERT S., TAKEDA K., AKIRA S., CLARKE A.R. & WATSON C.J. (1999) Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev.* **13**, 2604-2616.
- CHEN J., ISHII M., WANG L., ISHII K. & COUGHLIN S.R. (1994) Thrombin receptor activation. Confirmation of the intramolecular tethered liganding hypothesis and discovery of an alternative intermolecular liganding mode. *J.Biol.Chem.* **269**, 16041-16045.
- CHEN L., NICHOLS W.W., MATTSSON C., TEGER-NILSSON A.C., SALDEEN T.G. & MEHTA J.L. (1996a) Inogatran, a novel direct low molecular weight thrombin

inhibitor, given with, but not after, tissue-plasminogen activator, improves thrombolysis. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **277**, 1276-1283.

CHEN L.B. & BUCHANAN J.M. (1975) Mitogenic activity of blood components. I. Thrombin and prothrombin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **72**, 131-135.

CHEN L.B., TENG N.N. & BUCHANAN J.M. (1976) Mitogenicity of thrombin and surface alterations on mouse splenocytes. *Exp.Cell Res.* **101**, 41-46.

CHEN M., CHENG A., CHEN Y.Q., HYMEL A., HANSON E.P., KIMMEL L., MINAMI Y., TANIGUCHI T., CHANGELIAN P.S. & O'SHEA J.J. (1997a) The amino terminus of JAK3 is necessary and sufficient for binding to the common gamma chain and confers the ability to transmit interleukin 2-mediated signals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 6910-6915.

CHEN X., LI W., YOSHIDA H., TSUCHIDA S., NISHIMURA H., TAKEMOTO F., OKUBO S., FOGO A., MATSUSAKA T. & ICHIKAWA I. (1997b) Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse. *Am.J.Physiol* **272**, F299-F304

CHEN Y., GRALL D., SALCINI A.E., PELICCI P.G., POUYSSEGUR J. & OBBERGHEN-SCHILLING E. (1996b) Shc adaptor proteins are key transducers of mitogenic signaling mediated by the G protein-coupled thrombin receptor. *EMBO J.* **15**, 1037-1044.

CHENG J., BALDASSARE J.J. & RABEN D.M. (1999) Dual coupling of the alpha-thrombin receptor to signal-transduction pathways involving phosphatidylinositol and phosphatidylcholine metabolism. *Biochem.J.* **337** (Pt 1), 97-104.

CHENG M., SEXL V., SHERR C.J. & ROUSSEL M.F. (1998) Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 1091-1096.

- CHERFILS J. & CHARDIN P. (1999) GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem.Sci.* **24**, 306-311.
- CHIN K.V., YANG W.L., RAVATN R., KITA T., REITMAN E., VETTORI D., CVIJIC M.E., SHIN M. & IACONO L. (2002) Reinventing the wheel of cyclic AMP: novel mechanisms of cAMP signaling. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **968**, 49-64.
- CHITNIS T., NAJAFIAN N., BENOUC., SALAMA A.D., GRUSBY M.J., SAYEGH M.H. & KHOURY S.J. (2001) Effect of targeted disruption of STAT4 and STAT6 on the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Clin.Invest* **108**, 739-747.
- CHOU M.M. & BLENIS J. (1996) The 70 kDa S6 kinase complexes with and is activated by the Rho family G proteins Cdc42 and Rac1. *Cell* **85**, 573-583.
- CHOUDHURY G.G., MARRA F. & ABOUD H.E. (1996) Thrombin stimulates association of src homology domain containing adaptor protein Nck with pp125FAK. *Am.J.Physiol* **270**, F295-F300
- CHRIVIA J.C., KWOK R.P., LAMB N., HAGIWARA M., MONTMINY M.R. & GOODMAN R.H. (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**, 855-859.
- CHUNG J., UCHIDA E., GRAMMER T.C. & BLENIS J. (1997) STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol.Cell Biol.* **17**, 6508-6516.
- CICHOWSKI K., MCCORMICK F. & BRUGGE J.S. (1992) p21rasGAP association with Fyn, Lyn, and Yes in thrombin-activated platelets. *J.Biol.Chem.* **267**, 5025-5028.
- COLAMONICI O.R., UYTENDAELE H., DOMANSKI P., YAN H. & KROLEWSKI J.J. (1994) p135tyk2, an interferon-alpha-activated tyrosine kinase, is physically associated with an interferon-alpha receptor. *J.Biol.Chem.* **269**, 3518-3522.

- COLLER B.S., WARD P., CERUSO M., SCUDDER L.E., SPRINGER K., KUTOK J. & PRESTWICH G.D. (1992) Thrombin receptor activating peptides: importance of the N-terminal serine and its ionization state as judged by pH dependence, nuclear magnetic resonance spectroscopy, and cleavage by aminopeptidase M. *Biochemistry* **31**, 11713-11720.
- COLLINS L.R., MINDEN A., KARIN M. & BROWN J.H. (1996) Galpha12 stimulates c-Jun NH2-terminal kinase through the small G proteins Ras and Rac. *J.Biol.Chem.* **271**, 17349-17353.
- COLLINS L.R., RICKETTS W.A., OLEFSKY J.M. & BROWN J.H. (1997) The G12 coupled thrombin receptor stimulates mitogenesis through the Shc SH2 domain. *Oncogene* **15**, 595-600.
- COLLINS S.P. & UHLER M.D. (1997) Characterization of PKIgamma, a novel isoform of the protein kinase inhibitor of cAMP-dependent protein kinase. *J.Biol.Chem.* **272**, 18169-18178.
- CONNOR J.H., QUAN H.N., RAMASWAMY N.T., ZHANG L., BARIK S., ZHENG J., CANNON J.F., LEE E.Y. & SHENOLIKAR S. (1998) Inhibitor-1 interaction domain that mediates the inhibition of protein phosphatase-1. *J.Biol.Chem.* **273**, 27716-27724.
- CONWAY G., MARGOLIATH A., WONG-MADDEN S., ROBERTS R.J. & GILBERT W. (1997) Jak1 kinase is required for cell migrations and anterior specification in zebrafish embryos. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 3082-3087.
- COOK S.J. & MCCORMICK F. (1993) Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* **262**, 1069-1072.
- COPELAND N.G., GILBERT D.J., SCHINDLER C., ZHONG Z., WEN Z., DARNELL J.E., Jr., MUI A.L., MIYAJIMA A., QUELLE F.W., IHLE J.N. & . (1995)

Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes.
Genomics **29**, 225-228.

COSO O.A., CHIARIELLO M., YU J.C., TERAMOTO H., CRESPO P., XU N., MIKI T. & GUTKIND J.S. (1995) The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**, 1137-1146.

CUNNICK J.M., DORSEY J.F., MEI L. & WU J. (1998) Reversible regulation of SHP-1 tyrosine phosphatase activity by oxidation. *Biochem.Mol.Biol.Int.* **45**, 887-894.

D'SOUZA-SCHOREY C., BOSHANS R.L., MCDONOUGH M., STAHL P.D. & VAN AELST L. (1997) A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *EMBO J.* **16**, 5445-5454.

DANIAL N.N. & ROTHMAN P. (2000) JAK-STAT signaling activated by Abl oncogenes. *Oncogene* **19**, 2523-2531.

DANIEL T.O., GIBBS V.C., MILFAY D.F., GAROVOY M.R. & WILLIAMS L.T. (1986) Thrombin stimulates c-sis gene expression in microvascular endothelial cells. *J.Biol.Chem.* **261**, 9579-9582.

DANIELS R.H., HALL P.S. & BOKOCH G.M. (1998) Membrane targeting of p21-activated kinase 1 (PAK1) induces neurite outgrowth from PC12 cells. *EMBO J.* **17**, 754-764.

DARNELL J.E., Jr., KERR I.M. & STARK G.R. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-1421.

DAS B., SHU X., DAY G.J., HAN J., KRISHNA U.M., FALCK J.R. & BROEK D. (2000) Control of intramolecular interactions between the pleckstrin homology and Dbl homology domains of Vav and Sos1 regulates Rac binding. *J.Biol.Chem.* **275**, 15074-15081.

- DATTA S.R., BRUNET A. & GREENBERG M.E. (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* **13**, 2905-2927.
- DAUB H., WEISS F.U., WALLASCH C. & ULLRICH A. (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein- coupled receptors. *Nature* **379**, 557-560.
- DAVID M., CHEN H.E., GOELZ S., LARNER A.C. & NEEL B.G. (1995) Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol. Cell Biol.* **15**, 7050-7058.
- DE CLERCK F. & VAN NUETEN J.M. (1983) Platelet-mediated vascular contractions. Inhibition by flunarizine, a calcium-entry blocker. *Biochem.Pharmacol.* **32**, 765-771.
- DE GASPARO M., CATT K.J., INAGAMI T., WRIGHT J.W. & UNGER T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol.Rev.* **52**, 415-472.
- DE GROOT R.P., DERUA R., GORIS J. & SASSONE-CORSI P. (1993) Phosphorylation and negative regulation of the transcriptional activator CREM by p34cdc2. *Mol.Endocrinol.* **7**, 1495-50.
- DE MEY J.G., CLAEYS M. & VANHOUTTE P.M. (1982) Endothelium-dependent inhibitory effects of acetylcholine, adenosine triphosphate, thrombin and arachidonic acid in the canine femoral artery. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **222**, 166-173.
- DE ROOIJ J., ZWARTKRUIS F.J., VERHEIJEN M.H., COOL R.H., NIJMAN S.M., WITTINGHOFER A. & BOS J.L. (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474-477.

- DE VOS A.M., ULTSCH M. & KOSSIAKOFF A.A. (1992) Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* **255**, 306-312.
- DEBLOIS D., DRAPEAU G., PETITCLERC E. & MARCEAU F. (1992) Synergism between the contractile effect of epidermal growth factor and that of des-Arg9-bradykinin or of alpha-thrombin in rabbit aortic rings. *Br.J.Pharmacol.* **105**, 959-967.
- DECKER T. & KOVARIK P. (2000) Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* **19**, 2628-2637.
- DELAFONTAINE P., ANWAR A., LOU H. & KU L. (1996) G-protein coupled and tyrosine kinase receptors: evidence that activation of the insulin-like growth factor I receptor is required for thrombin-induced mitogenesis of rat aortic smooth muscle cells. *J.Clin.Invest* **97**, 139-145.
- DENDORFER U., OETTGEN P. & LIBERMANN T.A. (1994) Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide. *Mol.Cell Biol.* **14**, 4443-4454.
- DENDORFER U., OETTGEN P. & LIBERMANN T.A. (1995) Interleukin-6 Gene Expression by Prostaglandins and Cyclic AMP Mediated by Multiple Regulatory Elements. *Am.J.Ther.* **2**, 660-665.
- DERRY J.M., OCHS H.D. & FRANCKE U. (1994) Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* **78**, 635-644.
- DESRIVIERES S., COOKE F.T., PARKER P.J. & HALL M.N. (1998) MSS4, a phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase required for organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **273**, 15787-15793.

- DHAND R., HILES I., PANAYOTOU G., ROCHE S., FRY M.J., GOUT I., TOTTY N.F., TRUONG O., VICENDO P., YONEZAWA K. & . (1994) PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *EMBO J.* **13**, 522-533.
- DIEBOLD B.A. & BOKOCH G.M. (2001) Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat.Immunol.* **2**, 211-215.
- DISANTO J.P., MULLER W., GUY-GRAND D., FISCHER A. & RAJEWSKY K. (1995) Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 377-381.
- DONNELLY D., FINDLAY J.B. & BLUNDELL T.L. (1994) The evolution and structure of aminergic G protein-coupled receptors. *Receptors.Channels* **2**, 61-78.
- DONOVAN F.M., PIKE C.J., COTMAN C.W. & CUNNINGHAM D.D. (1997) Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *J.Neurosci.* **17**, 5316-5326.
- DORSEUIL O., QUINN M.T. & BOKOCH G.M. (1995) Dissociation of Rac translocation from p47phox/p67phox movements in human neutrophils by tyrosine kinase inhibitors. *J.Leukoc.Biol.* **58**, 108-113.
- DRAIN P., DUBIN A.E. & ALDRICH R.W. (1994) Regulation of Shaker K⁺ channel inactivation gating by the cAMP- dependent protein kinase. *Neuron* **12**, 1097-1109.
- DRANSFIELD D.T., YEH J.L., BRADFORD A.J. & GOLDENRING J.R. (1997) Identification and characterization of a novel A-kinase-anchoring protein (AKAP120) from rabbit gastric parietal cells. *Biochem.J.* **322** (Pt 3), 801-808.
- D'SOUZA-SCHOREY C, BOSHANS RL, MCDONOUGH M, STAHL PD, VAN AELST L. (1997) A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *EMBO J.* **16**, 5445-5454.

- DUBEY R.K., JACKSON E.K. & LUSCHER T.F. (1995) Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin1 receptors. *J.Clin.Invest* **96**, 141-149.
- DURBIN J.E., HACKENMILLER R., SIMON M.C. & LEVY D.E. (1996) Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* **84**, 443-450.
- EDA M., YONEMURA S., KATO T., WATANABE N., ISHIZAKI T., MADAULE P. & NARUMIYA S. (2001) Rho-dependent transfer of Citron-kinase to the cleavage furrow of dividing cells. *J.Cell Sci.* **114**, 3273-3284.
- EGUCHI S., DEMPSEY P.J., FRANK G.D., MOTLEY E.D. & INAGAMI T. (2001) Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK. *J.Biol.Chem.* **276**, 7957-7962.
- EGUCHI S., NUMAGUCHI K., IWASAKI H., MATSUMOTO T., YAMAKAWA T., UTSUNOMIYA H., MOTLEY E.D., KAWAKATSU H., OWADA K.M., HIRATA Y., MARUMO F. & INAGAMI T. (1998) Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* **273**, 8890-8896.
- EHRET G.B., REICHENBACH P., SCHINDLER U., HORVATH C.M., FRITZ S., NABHOLZ M. & BUCHER P. (2001) DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites. *J.Biol.Chem.* **276**, 6675-6688.
- EIDE T., COGHLAN V., ORSTAVIK S., HOLSVE C., SOLBERG R., SKALHEGG B.S., LAMB N.J., LANGE BERG L., FERNANDEZ A., SCOTT J.D., JAHNSEN T. & TASKEN K. (1998) Molecular cloning, chromosomal localization, and cell cycle-

dependent subcellular distribution of the A-kinase anchoring protein, AKAP95.
Exp. Cell Res. **238**, 305-316.

ENDO T.A., MASUHARA M., YOKOUCHI M., SUZUKI R., SAKAMOTO H., MITSUI K., MATSUMOTO A., TANIMURA S., OHTSUBO M., MISAWA H., MIYAZAKI T., LEONOR N., TANIGUCHI T., FUJITA T., KANAKURA Y., KOMIYA S. & YOSHIMURA A. (1997) A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* **387**, 921-924.

ENSERINK J.M., CHRISTENSEN A.E., DE ROOIJ J., VAN TRIEST M., SCHWEDE F., GENIESER H.G., DOSKELAND S.O., BLANK J.L. & BOS J.L. (2002) A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat. Cell Biol.* **4**, 901-906.

ESSAYAN D.M. (1999) Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) inhibitors and immunomodulation. *Biochem.Pharmacol.* **57**, 965-973.

ESSLER M., AMANO M., KRUSE H.J., KAIBUCHI K., WEBER P.C. & AEPFELBACHER M. (1998) Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells. *J.Biol.Chem.* **273**, 21867-21874.

ESTHER C.R., Jr., HOWARD T.E., MARINO E.M., GODDARD J.M., CAPECCHI M.R. & BERNSTEIN K.E. (1996a) Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Lab Invest* **74**, 953-965.

ESTHER C.R., Jr., HOWARD T.E., ZHOU Y., CAPECCHI M.R., MARRERO M.B. & BERNSTEIN K.E. (1996b) Lessons from angiotensin-converting enzyme-deficient mice. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* **5**, 463-467.

- ETIENNE-MANNEVILLE S. & HALL A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635.
- EVA A. & AARONSON S.A. (1985) Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature* **316**, 273-275.
- FANGER G.R., JOHNSON N.L. & JOHNSON G.L. (1997) MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42. *EMBO J.* **16**, 4961-4972.
- FARUQI T.R., GOMEZ D., BUSTELO X.R., BAR-SAGI D. & REICH N.C. (2001) Rac1 mediates STAT3 activation by autocrine IL-6. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 9014-9019.
- FENG J., WITTHUHN B.A., MATSUDA T., KOHLHUBER F., KERR I.M. & IHLE J.N. (1997) Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol.Cell Biol.* **17**, 2497-2501.
- FESENKO E.E., KOLESNIKOV S.S. & LYUBARSKY A.L. (1985) Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* **313**, 310-313.
- FIMIA G.M. & SASSONE-CORSI P. (2001) Cyclic AMP signalling. *J.Cell Sci.* **114**, 1971-1972.
- FLEMING I.N., GRAY A. & DOWNES C.P. (2000) Regulation of the Rac1-specific exchange factor Tiam1 involves both phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent components. *Biochem.J.* **351**, 173-182.
- FRANK S.J., GILLILAND G., KRAFT A.S. & ARNOLD C.S. (1994) Interaction of the growth hormone receptor cytoplasmic domain with the JAK2 tyrosine kinase. *Endocrinology* **135**, 2228-2239.

- FRANK S.J., YI W., ZHAO Y., GOLDSMITH J.F., GILLILAND G., JIANG J., SAKAI I. & KRAFT A.S. (1995) Regions of the JAK2 tyrosine kinase required for coupling to the growth hormone receptor. *J.Biol.Chem.* **270**, 14776-14785.
- FRANTSVE J., SCHWALLER J., STERNBERG D.W., KUTOK J. & GILLILAND D.G. (2001) Socs-1 inhibits TEL-JAK2-mediated transformation of hematopoietic cells through inhibition of JAK2 kinase activity and induction of proteasome-mediated degradation. *Mol.Cell Biol.* **21**, 3547-3557.
- FRASER I.D., TAVALIN S.J., LESTER L.B., LANGE BERG L.K., WESTPHAL A.M., DEAN R.A., MARRION N.V. & SCOTT J.D. (1998) A novel lipid-anchored A-kinase Anchoring Protein facilitates cAMP-responsive membrane events. *EMBO J.* **17**, 2261-2272.
- FREEMAN J.L., ABO A. & LAMBETH J.D. (1996) Rac "insert region" is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65. *J.Biol.Chem.* **271**, 19794-19801.
- FRIEDMANN M.C., MIGONE T.S., RUSSELL S.M. & LEONARD W.J. (1996) Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 2077-2082.
- FU X.Y. (1992) A transcription factor with SH2 and SH3 domains is directly activated by an interferon alpha-induced cytoplasmic protein tyrosine kinase(s). *Cell* **70**, 323-335.
- FU X.Y., SCHINDLER C., IMPROTA T., AEBERSOLD R. & DARNELL J.E., Jr. (1992) The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 7840-7843.

- FUJITANI Y., HIBI M., FUKADA T., TAKAHASHI-TEZUKA M., YOSHIDA H., YAMAGUCHI T., SUGIYAMA K., YAMANAKA Y., NAKAJIMA K. & HIRANO T. (1997) An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT. *Oncogene* **14**, 751-761.
- FUJIYAMA A. & TAMANOI F. (1990) RAS2 protein of *Saccharomyces cerevisiae* undergoes removal of methionine at N terminus and removal of three amino acids at C terminus. *J.Biol.Chem.* **265**, 3362-3368.
- FUJIYAMA A., TSUNASAWA S., TAMANOI F. & SAKIYAMA F. (1991) S-farnesylation and methyl esterification of C-terminal domain of yeast RAS2 protein prior to fatty acid acylation. *J.Biol.Chem.* **266**, 17926-17931.
- FUKATA M., KURODA S., FUJII K., NAKAMURA T., SHOJI I., MATSUURA Y., OKAWA K., IWAMATSU A., KIKUCHI A. & KAIBUCHI K. (1997) Regulation of cross-linking of actin filament by IQGAP1, a target for Cdc42. *J.Biol.Chem.* **272**, 29579-29583.
- FUKATA Y., OSHIRO N., KINOSHITA N., KAWANO Y., MATSUOKA Y., BENNETT V., MATSUURA Y. & KAIBUCHI K. (1999) Phosphorylation of adducin by Rho-kinase plays a crucial role in cell motility. *J.Cell Biol.* **145**, 347-361.
- FUKUHARA S., MURGA C., ZOHAR M., IGISHI T. & GUTKIND J.S. (1999) A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J.Biol.Chem.* **274**, 5868-5879.
- GABORIK Z., SZASZAK M., SZIDONYA L., BALLA B., PAKU S., CATT K.J., CLARK A.J. & HUNYADY L. (2001) Beta-arrestin- and dynamin-dependent endocytosis of the AT1 angiotensin receptor. *Mol.Pharmacol.* **59**, 239-247.
- GAUZZI M.C., VELAZQUEZ L., MCKENDRY R., MOGENSEN K.E., FELLOUS M. & PELLEGRINI S. (1996) Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires

phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase. *J.Biol.Chem.* **271**, 20494-20500.

GEIJSEN N., VAN DELFT S., RAAIJMAKERS J.A., LAMMERS J.W., COLLARD J.G., KOENDERMAN L. & COFFER P.J. (1999) Regulation of p21rac activation in human neutrophils. *Blood* **94**, 1121-1130.

GEISTERFER A.A., PEACH M.J. & OWENS G.K. (1988) Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ.Res.* **62**, 749-756.

GERMANI A., ROMERO F., HOULARD M., CAMONIS J., GISSELBRECHT S., FISCHER S. & VARIN-BLANK N. (1999) hSiah2 is a new Vav binding protein which inhibits Vav-mediated signaling pathways. *Mol.Cell Biol.* **19**, 3798-3807.

GETHER U. & KOBILKA B.K. (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J.Biol.Chem.* **273**, 17979-17982.

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

GIASSON E. & MELOCHE S. (1995) Role of p70 S6 protein kinase in angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* **270**, 5225-5231.

GIASSON E., SERVANT M.J. & MELOCHE S. (1997) Cyclic AMP-mediated inhibition of angiotensin II-induced protein synthesis is associated with suppression of tyrosine phosphorylation signaling in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* **272**, 26879-26886.

GIEMBYCZ M.A. & BARNES P.J. (1991) Selective inhibition of a high affinity type IV cyclic AMP phosphodiesterase in bovine trachealis by AH 21-132. Relevance to the

spasmolytic and anti-spasmogenic actions of AH 21-132 in the intact tissue. *Biochem.Pharmacol.* **42**, 663-677.

GIL M.P., BOHN E., O'GUIN A.K., RAMANA C.V., LEVINE B., STARK G.R., VIRGIN H.W. & SCHREIBER R.D. (2001) Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 6680-6685.

GILLE H. & DOWNWARD J. (1999) Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression. *J.Biol.Chem.* **274**, 22033-22040.

GILMAN A.G. (1984) G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell* **36**, 577-579.

GIORDANETTO F. & KROEMER R.T. (2002) Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising JAK homology domains 1 through 7. *Protein Eng* **15**, 727-737.

GOSSER Y.Q., NOMANBHOY T.K., AGHAZADEH B., MANOR D., COMBS C., CERIONE R.A. & ROSEN M.K. (1997) C-terminal binding domain of Rho GDP-dissociation inhibitor directs N-terminal inhibitory peptide to GTPases. *Nature* **387**, 814-819.

GOUILLEUX F., WAKAO H., MUNDT M. & GRONER B. (1994) Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *EMBO J.* **13**, 4361-4369.

GRAD J.M., ZENG X.R. & BOISE L.H. (2000) Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT. *Curr.Opin.Oncol.* **12**, 543-549.

GRASSL C., LUCKOW B., SCHLONDORFF D. & DENDORFER U. (1999) Transcriptional regulation of the interleukin-6 gene in mesangial cells. *J.Am.Soc.Nephrol.* **10**, 1466-1477.

- GRAVES L.M., BORNFELDT K.E., RAINES E.W., POTTS B.C., MACDONALD S.G., ROSS R. & KREBS E.G. (1993) Protein kinase A antagonizes platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 10300-10304.
- GREENLUND A.C., FARRAR M.A., VIVIANO B.L. & SCHREIBER R.D. (1994) Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J.* **13**, 1591-1600.
- GUO D.F., SUN Y.L., HAMET P. & INAGAMI T. (2001) The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins. *Cell Res.* **11**, 165-180.
- GURNIAK C.B. & BERG L.J. (1996) Murine JAK3 is preferentially expressed in hematopoietic tissues and lymphocyte precursor cells. *Blood* **87**, 3151-3160.
- GUSCHIN D., ROGERS N., BRISCOE J., WITTHUHN B., WATLING D., HORN F., PELLEGRINI S., YASUKAWA K., HEINRICH P., STARK G.R. & . (1995) A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *EMBO J.* **14**, 1421-1429.
- GUTIERREZ L., MAGEE A.I., MARSHALL C.J. & HANCOCK J.F. (1989) Post-translational processing of p21ras is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis. *EMBO J.* **8**, 1093-1098.
- HAFIZI S., CHESTER A.H. & YACOUB M.H. (1997) Molecular mechanisms of vascular smooth muscle cell growth. *Curr.Opin.Cardiol.* **12**, 495-503.
- HAFNER S., ADLER H.S., MISCHAK H., JANOSCH P., HEIDECKER G., WOLFMAN A., PIPPIG S., LOHSE M., UEFFING M. & KOLCH W. (1994) Mechanism of inhibition of Raf-1 by protein kinase A. *Mol.Cell Biol.* **14**, 6696-6703.
- HAMMES S.R. & COUGHLIN S.R. (1999) Protease-activated receptor-1 can mediate responses to SFLLRN in thrombin-desensitized cells: evidence for a novel

mechanism for preventing or terminating signaling by PAR1's tethered ligand. *Biochemistry* **38**, 2486-2493.

HANOUNE J. & DEFER N. (2001) Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **41**, 145-174.

HARASHIMA A., SUZUKI M., OKOCHI A., YAMAMOTO M., MATSUO Y., MOTODA R., YOSHIOKA T. & ORITA K. (2002) CD45 tyrosine phosphatase inhibits erythroid differentiation of umbilical cord blood CD34+ cells associated with selective inactivation of Lyn. *Blood* **100**, 4440-4445.

HARPUR A.G., ANDRES A.C., ZIEMIECKI A., ASTON R.R. & WILKS A.F. (1992) JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene* **7**, 1347-1353.

HART M.J., EVA A., ZANGRILLI D., AARONSON S.A., EVANS T., CERIONE R.A. & ZHENG Y. (1994) Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product. *J.Biol.Chem.* **269**, 62-65.

HART M.J., SHARMA S., ELMASRY N., QIU R.G., MCCABE P., POLAKIS P. & BOLLAG G. (1996) Identification of a novel guanine nucleotide exchange factor for the Rho GTPase. *J.Biol.Chem.* **271**, 25452-25458.

HARTWIG J.H., BOKOCH G.M., CARPENTER C.L., JANMEY P.A., TAYLOR L.A., TOKER A. & STOSSEL T.P. (1995) Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell* **82**, 643-653.

HEIN L., BARSH G.S., PRATT R.E., DZAU V.J. & KOBILKA B.K. (1995a) Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature* **377**, 744-747.

- HEIN L., DZAU V.J. & BARSH G.S. (1995b) Linkage mapping of the angiotensin AT2 receptor gene (*Agtr2*) to the mouse X chromosome. *Genomics* **30**, 369-371.
- HEYWORTH P.G., BOHL B.P., BOKOCH G.M. & CURNUTTE J.T. (1994) *Rac* translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558. *J.Biol.Chem.* **269**, 30749-30752.
- HORVAI A.E., XU L., KORZUS E., BRARD G., KALAFUS D., MULLEN T.M., ROSE D.W., ROSENFELD M.G. & GLASS C.K. (1997) Nuclear integration of JAK/STAT and Ras/AP-1 signaling by CBP and p300. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 1074-1079.
- HORVATH C.M. (2000) STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem.Sci.* **25**, 496-502.
- HORVATH C.M. & DARNELL J.E. (1997) The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**, 233-239.
- HOTTA K., TANAKA K., MINO A., KOHNO H. & TAKAI Y. (1996) Interaction of the Rho family small G proteins with kinectin, an anchoring protein of kinesin motor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **225**, 69-74.
- HOU J., SCHINDLER U., HENZEL W.J., HO T.C., BRASSEUR M. & MCKNIGHT S.L. (1994) An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* **265**, 1701-1706.
- HOU J., SCHINDLER U., HENZEL W.J., WONG S.C. & MCKNIGHT S.L. (1995) Identification and purification of human Stat proteins activated in response to interleukin-2. *Immunity.* **2**, 321-329.
- HOU S.X., ZHENG Z., CHEN X. & PERRIMON N. (2002) The Jak/STAT pathway in model organisms: emerging roles in cell movement. *Dev.Cell* **3**, 765-778.

- HOXIE J.A., AHUJA M., BELMONTE E., PIZARRO S., PARTON R. & BRASS L.F. (1993) Internalization and recycling of activated thrombin receptors. *J.Biol.Chem.* **268**, 13756-13763.
- HU W., BELLONE C.J. & BALDASSARE J.J. (1999) RhoA stimulates p27(Kip) degradation through its regulation of cyclin E/CDK2 activity. *J.Biol.Chem.* **274**, 3396-3401.
- HUANG L.J., CONSTANTINESCU S.N. & LODISH H.F. (2001) The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol.Cell* **8**, 1327-1338.
- HUANG W., ZHOU X., LEFEBVRE V. & DE CROMBRUGGHE B. (2000) Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Mol.Cell Biol.* **20**, 4149-4158.
- HUBBARD S.R., WEI L., ELLIS L. & HENDRICKSON W.A. (1994) Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* **372**, 746-754.
- HUCKLE W.R. & EARP H.S. (1994) Regulation of cell proliferation and growth by angiotensin II. *Prog.Growth Factor Res.* **5**, 177-194.
- HUNG D.T., VU T.H., NELKEN N.A. & COUGHLIN S.R. (1992) Thrombin-induced events in non-platelet cells are mediated by the unique proteolytic mechanism established for the cloned platelet thrombin receptor. *J.Cell Biol.* **116**, 827-832.
- HUNYADY L., BOR M., BALLA T. & CATT K.J. (1994) Identification of a cytoplasmic Ser-Thr-Leu motif that determines agonist-induced internalization of the AT1 angiotensin receptor. *J.Biol.Chem.* **269**, 31378-31382.

- HUNYADY L., BOR M., BALLA T. & CATT K.J. (1995b) Critical role of a conserved intramembrane tyrosine residue in angiotensin II receptor activation. *J.Biol.Chem.* **270**, 9702-9705.
- HUNYADY L., BOR M., BAUKAL A.J., BALLA T. & CATT K.J. (1995a) A conserved NPLFY sequence contributes to agonist binding and signal transduction but is not an internalization signal for the type 1 angiotensin II receptor. *J.Biol.Chem.* **270**, 16602-16609.
- ICHIKI T., LABOSKY P.A., SHIOTA C., OKUYAMA S., IMAGAWA Y., FOGO A., NIIMURA F., ICHIKAWA I., HOGAN B.L. & INAGAMI T. (1995) Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* **377**, 748-750.
- IHLE J.N. (1996) STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* **84**, 331-334.
- IHLE J.N. (2001) The Stat family in cytokine signaling. *Curr.Opin.Cell Biol.* **13**, 211-217.
- IHLE J.N., WITTHUHN B.A., QUELLE F.W., YAMAMOTO K. & SILVENNOINEN O. (1995) Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu.Rev.Immunol.* **13**, 369-398.
- IMADA K., BLOOM E.T., NAKAJIMA H., HORVATH-ARCIDIACONO J.A., UDY G.B., DAVEY H.W. & LEONARD W.J. (1998) Stat5b is essential for natural killer cell-mediated proliferation and cytolytic activity. *J.Exp.Med.* **188**, 2067-2074.
- INDOLFI C., AVVEDIMENTO E.V., DI LORENZO E., ESPOSITO G., RAPACCIUOLO A., GIULIANO P., GRIECO D., CAVUTO L., STINGONE A.M., CIULLO I., CONDORELLI G. & CHIARIELLO M. (1997) Activation of cAMP-PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury. *Nat.Med.* **3**, 775-779.

- INDOLFI C., DI LORENZO E., RAPACCIUOLO A., STINGONE A.M., STABILE E., LECCIA A., TORELLA D., CAPUTO R., CIARDIELLO F., TORTORA G. & CHIARIELLO M. (2000) 8-chloro-cAMP inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and neointima formation induced by balloon injury in vivo. *J.Am.Coll.Cardiol.* **36**, 288-293.
- IRANI K. (2000) Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ.Res.* **87**, 179-183.
- IRANI K., XIA Y., ZWEIER J.L., SOLLOTT S.J., DER C.J., FEARON E.R., SUNDARESAN M., FINKEL T. & GOLDSCHMIDT-CLERMONT P.J. (1997) Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* **275**, 1649-1652.
- ISHIDA M., MARRERO M.B., SCHIEFFER B., ISHIDA T., BERNSTEIN K.E. & BERK B.C. (1995) Angiotensin II activates pp60c-src in vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* **77**, 1053-1059.
- ISHII K., CHEN J., ISHII M., KOCH W.J., FREEDMAN N.J., LEFKOWITZ R.J. & COUGHLIN S.R. (1994) Inhibition of thrombin receptor signaling by a G-protein coupled receptor kinase. Functional specificity among G-protein coupled receptor kinases. *J.Biol.Chem.* **269**, 1125-1130.
- ISHII K., GERSZTEN R., ZHENG Y.W., WELSH J.B., TURCK C.W. & COUGHLIN S.R. (1995) Determinants of thrombin receptor cleavage. Receptor domains involved, specificity, and role of the P3 aspartate. *J.Biol.Chem.* **270**, 16435-16440.
- ISHIZAKI T., NAITO M., FUJISAWA K., MAEKAWA M., WATANABE N., SAITO Y. & NARUMIYA S. (1997) p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Lett.* **404**, 118-124.

- ITAZAKI K., SHIGERI Y. & FUJIMOTO M. (1993) Molecular cloning and characterization of the angiotensin receptor subtype in porcine aortic smooth muscle. *Eur.J.Pharmacol.* **245**, 147-156.
- ITO M., OLIVERIO M.I., MANNON P.J., BEST C.F., MAEDA N., SMITHIES O. & COFFMAN T.M. (1995) Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 3521-3525.
- ITOH K., YOSHIOKA K., AKEDO H., UEHATA M., ISHIZAKI T. & NARUMIYA S. (1999) An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat.Med.* **5**, 221-225.
- IWAMI G., KAWABE J., EBINA T., CANNON P.J., HOMCY C.J. & ISHIKAWA Y. (1995) Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A. *J.Biol.Chem.* **270**, 12481-12484.
- JACKSON P.K. (2001) A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev.* **15**, 3053-3058.
- JAYADEV S., SMITH R.D., JAGADEESH G., BAUKAL A.J., HUNYADY L. & CATT K.J. (1999) N-linked glycosylation is required for optimal AT1a angiotensin receptor expression in COS-7 cells. *Endocrinology* **140**, 2010-2017.
- JHA K.N. & SHIVAJI S. (2002) Identification of the major tyrosine phosphorylated protein of capacitated hamster spermatozoa as a homologue of mammalian sperm a kinase anchoring protein. *Mol.Reprod.Dev.* **61**, 258-270.
- JIA J., AMANAI K., WANG G., TANG J., WANG B. & JIANG J. (2002) Shaggy/GSK3 antagonizes Hedgehog signalling by regulating Cubitus interruptus. *Nature* **416**, 548-552.
- JOBERTY G., PERLUNGHER R.R. & MACARA I.G. (1999) The Borgs, a new family of Cdc42 and TC10 GTPase-interacting proteins. *Mol.Cell Biol.* **19**, 6585-6597.

- JOHANSON S.O., NACCACHE P.A. & CROUCH M.F. (1999) A p85 subunit-independent p110alpha PI 3-kinase colocalizes with p70 S6 kinase on actin stress fibers and regulates thrombin-stimulated stress fiber formation in swiss 3T3 cells. *Exp.Cell Res.* **248**, 223-233.
- JOHN J., RENSLAND H., SCHLICHTING I., VETTER I., BORASIO G.D., GOODY R.S. & WITTINGHOFFER A. (1993) Kinetic and structural analysis of the Mg(2+)-binding site of the guanine nucleotide-binding protein p21H-ras. *J.Biol.Chem.* **268**, 923-929.
- JOHN S., ROBBINS C.M. & LEONARD W.J. (1996) An IL-2 response element in the human IL-2 receptor alpha chain promoter is a composite element that binds Stat5, Elf-1, HMG-I(Y) and a GATA family protein. *EMBO J.* **15**, 5627-5635.
- JOHNSTON J.A., BACON C.M., FINBLOOM D.S., REES R.C., KAPLAN D., SHIBUYA K., ORTALDO J.R., GUPTA S., CHEN Y.Q., GIRI J.D. & . (1995) Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 8705-8709.
- JOHNSTON J.A., KAWAMURA M., KIRKEN R.A., CHEN Y.Q., BLAKE T.B., SHIBUYA K., ORTALDO J.R., MCVICAR D.W. & O'SHEA J.J. (1994) Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin. *Nature* **370**, 151-153.
- JONESON T. & BAR-SAGI D. (1997) Ras effectors and their role in mitogenesis and oncogenesis. *J.Mol.Med.* **75**, 587-593.
- JONESON T. & BAR-SAGI D. (1998) A Rac1 effector site controlling mitogenesis through superoxide production. *J.Biol.Chem.* **273**, 17991-17994.

- JONESON T., MCDONOUGH M., BAR-SAGI D. & VAN AELST L. (1996) RAC regulation of actin polymerization and proliferation by a pathway distinct from Jun kinase. *Science* **274**, 1374-1376.
- JOSEPH G., GORZALCZANY Y., KOSHKIN V. & PICK E. (1994) Inhibition of NADPH oxidase activation by synthetic peptides mapping within the carboxyl-terminal domain of small GTP-binding proteins. Lack of amino acid sequence specificity and importance of polybasic motif. *J.Biol.Chem.* **269**, 29024-29031.
- JOSEPH G. & PICK E. (1995) "Peptide walking" is a novel method for mapping functional domains in proteins. Its application to the Rac1-dependent activation of NADPH oxidase. *J.Biol.Chem.* **270**, 29079-29082.
- JOYAL J.L., ANNAN R.S., HO Y.D., HUDDLESTON M.E., CARR S.A., HART M.J. & SACKS D.B. (1997) Calmodulin modulates the interaction between IQGAP1 and Cdc42. Identification of IQGAP1 by nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *J.Biol.Chem.* **272**, 15419-15425.
- JOYCE D., BOUZAHZAH B., FU M., ALBANESE C., D'AMICO M., STEER J., KLEIN J.U., LEE R.J., SEGALL J.E., WESTWICK J.K., DER C.J. & PESTELL R.G. (1999) Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *J.Biol.Chem.* **274**, 25245-25249.
- KAGAMI S., NAKAJIMA H., KUMANO K., SUZUKI K., SUTO A., IMADA K., DAVEY H.W., SAITO Y., TAKATSU K., LEONARD W.J. & IWAMOTO I. (2000) Both stat5a and stat5b are required for antigen-induced eosinophil and T-cell recruitment into the tissue. *Blood* **95**, 1370-1377.
- KAHN M.L., ZHENG Y.W., HUANG W., BIGORNIA V., ZENG D., MOFF S., FARESE R.V., Jr., TAM C. & COUGHLIN S.R. (1998) A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* **394**, 690-694.

- KAIBUCHI K., KURODA S., FUKATA M. & NAKAGAWA M. (1999) Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases. *Curr.Opin.Cell Biol.* **11**, 591-596.
- KAMIZONO S., HANADA T., YASUKAWA H., MINOGUCHI S., KATO R., MINOGUCHI M., HATTORI K., HATAKEYAMA S., YADA M., MORITA S., KITAMURA T., KATO H., NAKAYAMA K. & YOSHIMURA A. (2001) The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2. *J.Biol.Chem.* **276**, 12530-12538.
- KANTHOU C., KANSE S.M., KAKKAR V.V. & BENZAKOUR O. (1996) Involvement of pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins in alpha-thrombin signalling on cultured human vascular smooth muscle cells. *Cell Signal.* **8**, 59-66.
- KARAGHIOSOFF M., NEUBAUER H., LASSNIG C., KOVARIK P., SCHINDLER H., PIRCHER H., MCCOY B., BOGDAN C., DECKER T., BREM G., PFEFFER K. & MULLER M. (2000) Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity.* **13**, 549-560.
- KAUPP U.B. & SEIFERT R. (2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev.* **82**, 769-824.
- KAWAMURA M., MCVICAR D.W., JOHNSTON J.A., BLAKE T.B., CHEN Y.Q., LAL B.K., LLOYD A.R., KELVIN D.J., STAPLES J.E., ORTALDO J.R. & . (1994) Molecular cloning of L-JAK, a Janus family protein-tyrosine kinase expressed in natural killer cells and activated leukocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 6374-6378.
- KAWANABE Y., OKAMOTO Y., MIWA S., HASHIMOTO N. & MASAKI T. (2002) Molecular mechanisms for the activation of voltage-independent Ca²⁺ channels by endothelin-1 in chinese hamster ovary cells stably expressing human endothelin(A) receptors. *Mol.Pharmacol.* **62**, 75-80.

- KAWASAKI H., SPRINGETT G.M., MOCHIZUKI N., TOKI S., NAKAYA M., MATSUDA M., HOUSMAN D.E. & GRAYBIEL A.M. (1998) A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**, 2275-2279.
- KERKHOFF E. & RAPP U.R. (1998) Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene* **17**, 1457-1462.
- KHOSRAVI-FAR R., SOLSKI P.A., CLARK G.J., KINCH M.S. & DER C.J. (1995) Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Mol.Cell Biol.* **15**, 6443-6453.
- KIMURA K., ITO M., AMANO M., CHIHARA K., FUKATA Y., NAKAFUKU M., YAMAMORI B., FENG J., NAKANO T., OKAWA K., IWAMATSU A. & KAIBUCHI K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **273**, 245-248.
- KJELDGAARD M., NYBORG J. & CLARK B.F. (1996) The GTP binding motif: variations on a theme. *FASEB J.* **10**, 1347-1368.
- KLINGBEIL P., FRAZZETTO G. & BOUWMEESTER T. (2001) Xgravin-like (Xgl), a novel putative a-kinase anchoring protein (AKAP) expressed during embryonic development in *Xenopus*. *Mech.Dev.* **100**, 323-326.
- KLINGMULLER U., LORENZ U., CANTLEY L.C., NEEL B.G. & LODISH H.F. (1995) Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* **80**, 729-738.
- KNAUS U.G., HEYWORTH P.G., EVANS T., CURNUTTE J.T. & BOKOCH G.M. (1991) Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science* **254**, 1512-1515.
- KOBAYASHI K., KURODA S., FUKATA M., NAKAMURA T., NAGASE T., NOMURA N., MATSUURA Y., YOSHIDA-KUBOMURA N., IWAMATSU A. &

- KAIBUCHI K. (1998) p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase. *J.Biol.Chem.* **273**, 291-295.
- KODAMA H., FUKUDA K., PAN J., MAKINO S., SANO M., TAKAHASHI T., HORI S. & OGAWA S. (1998) Biphasic activation of the JAK/STAT pathway by angiotensin II in rat cardiomyocytes. *Circ.Res.* **82**, 244-250.
- KOHLHUBER F., ROGERS N.C., WATLING D., FENG J., GUSCHIN D., BRISCOE J., WITTHUHN B.A., KOTENKO S.V., PESTKA S., STARK G.R., IHLE J.N. & KERR I.M. (1997) A JAK1/JAK2 chimera can sustain alpha and gamma interferon responses. *Mol.Cell Biol.* **17**, 695-706.
- KOHNO M., YASUNARI K., MINAMI M., KANO H., MAEDA K., MANDAL A.K., INOKI K., HANEDA M. & YOSHIKAWA J. (1999) Regulation of rat mesangial cell migration by platelet-derived growth factor, angiotensin II, and adrenomedullin. *J.Am.Soc.Nephrol.* **10**, 2495-2502.
- KOHNO M., YOKOKAWA K., KANO H., YASUNARI K., MINAMI M., HANEHIRA T. & YOSHIKAWA J. (1997) Adrenomedullin is a potent inhibitor of angiotensin II-induced migration of human coronary artery smooth muscle cells. *Hypertension* **29**, 1309-1313.
- KOLLURI R., TOLIAS K.F., CARPENTER C.L., ROSEN F.S. & KIRCHHAUSEN T. (1996) Direct interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with the GTPase Cdc42. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 5615-5618.
- KOTENKO S.V., IZOTOVA L.S., POLLACK B.P., MUTHUKUMARAN G., PAUKKU K., SILVENNOINEN O., IHLE J.N. & PESTKA S. (1996) Other kinases can substitute for Jak2 in signal transduction by interferon-gamma. *J.Biol.Chem.* **271**, 17174-17182.

- KOZMA R., AHMED S., BEST A. & LIM L. (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* **15**, 1942-1952.
- KRANENBURG O., VERLAAN I., HORDIJK P.L. & MOOLENAAR W.H. (1997) Gi-mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway involves a 100 kDa tyrosine-phosphorylated Grb2 SH3 binding protein, but not Src nor Shc. *EMBO J.* **16**, 3097-3105.
- KRASILNIKOV M.A. (2000) Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochemistry (Mosc.)* **65**, 59-67.
- KREBS D.L. & HILTON D.J. (2001) SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* **19**, 378-387.
- KREGE J.H., JOHN S.W., LANGENBACH L.L., HODGIN J.B., HAGAMAN J.R., BACHMAN E.S., JENNETTE J.C., O'BRIEN D.A. & SMITHIES O. (1995) Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE- deficient mice. *Nature* **375**, 146-148.
- KROLEWSKI J.J., LEE R., EDDY R., SHOWS T.B. & DALLA-FAVERA R. (1990) Identification and chromosomal mapping of new human tyrosine kinase genes. *Oncogene* **5**, 277-282.
- KRYMSKAYA V.P., PENN R.B., ORSINI M.J., SCOTT P.H., PLEVIN R.J., WALKER T.R., ESZTERHAS A.J., AMRANI Y., CHILVERS E.R. & PANETTIERI R.A., Jr. (1999) Phosphatidylinositol 3-kinase mediates mitogen-induced human airway smooth muscle cell proliferation. *Am.J.Physiol* **277**, L65-L78

- KU D.D. & DAI J. (1997) Expression of thrombin receptors in human atherosclerotic coronary arteries leads to an exaggerated vasoconstrictory response in vitro. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **30**, 649-657.
- KU D.D., ZALESKI J.K., LIU S. & BROCK T.A. (1993) Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am.J.Physiol* **265**, H586-H592
- KUBALAK S.W. & WEBB J.G. (1993) Angiotensin II enhancement of hormone-stimulated cAMP formation in cultured vascular smooth muscle cells. *Am.J.Physiol* **264**, H86-H96
- KUHBANDNER S., BRUMMER S., METZGER D., CHAMBON P., HOFMANN F. & FEIL R. (2000) Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle. *Genesis.* **28**, 15-22.
- KULIOPULOS A., COVIC L., SEELEY S.K., SHERIDAN P.J., HELIN J. & COSTELLO C.E. (1999) Plasmin desensitization of the PAR1 thrombin receptor: kinetics, sites of truncation, and implications for thrombolytic therapy. *Biochemistry* **38**, 4572-4585.
- KWOK R.P., LUNDBLAD J.R., CHRIVIA J.C., RICHARDS J.P., BACHINGER H.P., BRENNAN R.G., ROBERTS S.G., GREEN M.R. & GOODMAN R.H. (1994) Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* **370**, 223-226.
- KYRIAKIS J.M. & AVRUCH J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* **81**, 807-869.
- LAMARCHE N., TAPON N., STOWERS L., BURBELO P.D., ASPENSTROM P., BRIDGES T., CHANT J. & HALL A. (1996) Rac and Cdc42 induce actin

polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* **87**, 519-529.

LAMBETH J.D., CHENG G., ARNOLD R.S. & EDENS W.A. (2000) Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem.Sci.* **25**, 459-461.

LANG P., GESBERT F., DELESPINE-CARMAGNAT M., STANCOU R., POUCHELET M. & BERTOGLIO J. (1996) Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J.* **15**, 510-519.

LAPORTE S.A., SERVANT G., RICHARD D.E., ESCHER E., GUILLEMETTE G. & LEDUC R. (1996) The tyrosine within the NPX_nY motif of the human angiotensin II type 1 receptor is involved in mediating signal transduction but is not essential for internalization. *Mol.Pharmacol.* **49**, 89-95.

LAWLESS V.A., ZHANG S., OZES O.N., BRUNS H.A., OLDHAM I., HOEY T., GRUSBY M.J. & KAPLAN M.H. (2000) Stat4 regulates multiple components of IFN-gamma-inducing signaling pathways. *J.Immunol.* **165**, 6803-6808.

LECINE P., ALGARTE M., RAMEIL P., BEADLING C., BUCHER P., NABHOLZ M. & IMBERT J. (1997) Elf-1 and Stat5 bind to a critical element in a new enhancer of the human interleukin-2 receptor alpha gene. *Mol. Cell Biol.* **17**, 2351

LEE J.H., JOHNSON P.R., ROTH M., HUNT N.H. & BLACK J.L. (2001) ERK activation and mitogenesis in human airway smooth muscle cells. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **280**, L1019-L1029

LEMMON M.A. & FERGUSON K.M. (2000) Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem.J.* **350 Pt 1**, 1-18.

- LENTSCH A.B., KATO A., DAVIS B., WANG W., CHAO C. & EDWARDS M.J. (2001) STAT4 and STAT6 regulate systemic inflammation and protect against lethal endotoxemia. *J.Clin.Invest* **108**, 1475-1482.
- LEONARD W.J. (1996b) STATs and cytokine specificity. *Nat.Med.* **2**, 968-969.
- LEONARD W.J. (1996a) The molecular basis of X-linked severe combined immunodeficiency: defective cytokine receptor signaling. *Annu.Rev.Med.* **47**, 229-239.
- LEONARD W.J. & O'SHEA J.J. (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annu.Rev.Immunol.* **16**, 293-322.
- LERNER D.J., CHEN M., TRAM T. & COUGHLIN S.R. (1996) Agonist recognition by proteinase-activated receptor 2 and thrombin receptor. Importance of extracellular loop interactions for receptor function. *J.Biol.Chem.* **271**, 13943-13947.
- LEROSEY I., PIZON V., TAVITIAN A. & DE GUNZBURG J. (1991) The cAMP-dependent protein kinase phosphorylates the rap1 protein in vitro as well as in intact fibroblasts, but not the closely related rap2 protein. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **175**, 430-436.
- LEUNG T., CHEN X.Q., MANSER E. & LIM L. (1996) The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol.Cell Biol.* **16**, 5313-5327.
- LEUNG T., MANSER E., TAN L. & LIM L. (1995) A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J.Biol.Chem.* **270**, 29051-29054.
- LEVY D.E. & GILLILAND D.G. (2000) Divergent roles of STAT1 and STAT5 in malignancy as revealed by gene disruptions in mice. *Oncogene* **19**, 2505-2510.

- LI D.Y., ZHANG Y.C., PHILIPS M.I., SAWAMURA T. & MEHTA J.L. (1999) Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation. *Circ.Res.* **84**, 1043-1049.
- LI H., ADAMIK R., PACHECO-RODRIGUEZ G., MOSS J. & VAUGHAN M. (2003) Protein kinase A-anchoring (AKAP) domains in brefeldin A-inhibited guanine nucleo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*
- LI X., LEE J.W., GRAVES L.M. & EARP H.S. (1998) Angiotensin II stimulates ERK via two pathways in epithelial cells: protein kinase C suppresses a G-protein coupled receptor-EGF receptor transactivation pathway. *EMBO J.* **17**, 2574-2583.
- LI X., LEUNG S., KERR I.M. & STARK G.R. (1997) Functional subdomains of STAT2 required for preassociation with the alpha interferon receptor and for signaling. *Mol.Cell Biol.* **17**, 2048-2056.
- LIN J.X. & LEONARD W.J. (2000) The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene* **19**, 2566-2576.
- LIN J.X., MIGONE T.S., TSANG M., FRIEDMANN M., WEATHERBEE J.A., ZHOU L., YAMAUCHI A., BLOOM E.T., MIETZ J., JOHN S. & . (1995) The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity.* **2**, 331-339.
- LINSEMAN D.A., BENJAMIN C.W. & JONES D.A. (1995) Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* **270**, 12563-12568.
- LIU B., GROSS M., TEN HOEVE J. & SHUAI K. (2001) A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 3203-3207.

- LIU B., LIAO J., RAO X., KUSHNER S.A., CHUNG C.D., CHANG D.D. & SHUAI K. (1998) Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 10626-10631.
- LIU N., MERTANI H.C., NORSTEDT G., TORNELL J. & LOBIE P.E. (1997) Mode of the autocrine/paracrine mechanism of growth hormone action. *Exp.Cell Res.* **237**, 196-206.
- LIU X., ROBINSON G.W., GOUILLEUX F., GRONER B. & HENNIGHAUSEN L. (1995) Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 8831-8835.
- LOOK D.C., PELLETIER M.R., TIDWELL R.M., ROSWIT W.T. & HOLTZMAN M.J. (1995) Stat1 depends on transcriptional synergy with Sp1. *J.Biol.Chem.* **270**, 30264-30267.
- LORIAUX M.M., BRENNAN R.G. & GOODMAN R.H. (1994) Modulatory function of CREB.CREM alpha heterodimers depends upon CREM alpha phosphorylation. *J.Biol.Chem.* **269**, 28839-28843.
- LOUNSBURY K.M., CASEY P.J., BRASS L.F. & MANNING D.R. (1991) Phosphorylation of Gz in human platelets. Selectivity and site of modification. *J.Biol.Chem.* **266**, 22051-22056.
- LUKASHOVA V., ASSELIN C., KROLEWSKI J.J., ROLA-PLESZCZYNSKI M. & STANKOVA J. (2001) G-protein-independent activation of Tyk2 by the platelet-activating factor receptor. *J.Biol.Chem.* **276**, 24113-24121.
- LUO H., ROSE P., BARBER D., HANRATTY W.P., LEE S., ROBERTS T.M., D'ANDREA A.D. & DEAROLF C.R. (1997) Mutation in the Jak kinase JH2

domain hyperactivates Drosophila and mammalian Jak-Stat pathways. *Mol. Cell Biol.* **17**, 1562-1571.

LUTTRELL LM, ROUDABUSH FL, CHOY EW, MILLER WE, FIELD ME, PIERCE KL, LEFKOWITZ RJ. (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**,2449-2454.

MACCHI P., VILLA A., GILIANI S., SACCO M.G., FRATTINI A., PORTA F., UGAZIO A.G., JOHNSTON J.A., CANDOTTI F., O'SHEA J.J. & . (1995) Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature* **377**, 65-68.

MACFARLANE S.R., SEATTER M.J., KANKE T., HUNTER G.D. & PLEVIN R. (2001) Proteinase-activated receptors. *Pharmacol.Rev.* **53**, 245-282.

MACHESKY L.M., MULLINS R.D., HIGGS H.N., KAISER D.A., BLANCHOIN L., MAY R.C., HALL M.E. & POLLARD T.D. (1999) Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 3739-3744.

MACREZ-LEPRETRE N., KALKBRENNER F., MOREL J.L., SCHULTZ G. & MIRONNEAU J. (1997) G protein heterotrimer G α 13 β 1 γ 3 couples the angiotensin AT1A receptor to increases in cytoplasmic Ca $^{2+}$ in rat portal vein myocytes. *J.Biol.Chem.* **272**, 10095-10102.

MACREZ N., MOREL J.L., KALKBRENNER F., VIARD P., SCHULTZ G. & MIRONNEAU J. (1997) A betagamma dimer derived from G13 transduces the angiotensin AT1 receptor signal to stimulation of Ca $^{2+}$ channels in rat portal vein myocytes. *J.Biol.Chem.* **272**, 23180-23185.

- MACREZ N., MOREL J.L. & MIRONNEAU J. (1999) Specific $\alpha_1\beta_3\gamma_5$ protein involvement in endothelin receptor- induced phosphatidylinositol hydrolysis and Ca^{2+} release in rat portal vein myocytes. *Mol.Pharmacol.* **55**, 684-692.
- MAEKAWA M., ISHIZAKI T., BOKU S., WATANABE N., FUJITA A., IWAMATSU A., OBINATA T., OHASHI K., MIZUNO K. & NARUMIYA S. (1999) Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* **285**, 895-898.
- MAJUMDAR M., SEASHOLTZ T.M., GOLDSTEIN D., DE LANEROLLE P. & BROWN J.H. (1998) Requirement for Rho-mediated myosin light chain phosphorylation in thrombin-stimulated cell rounding and its dissociation from mitogenesis. *J.Biol.Chem.* **273**, 10099-10106.
- MALCOLM K.C., CHAMBARD J.C., GRALL D., POUYSSEGUR J. & OBBERGHEN-SCHILLING E. (2000) Independent activation of endogenous p21-activated protein kinase-3 (PAK3) and JNK by thrombin in CCL39 fibroblasts. *J.Cell Physiol* **185**, 235-243.
- MARINISSEN M.J. & GUTKIND J.S. (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol.Sci.* **22**, 368-376.
- MARRERO M.B., PAXTON W.G., DUFF J.L., BERK B.C. & BERNSTEIN K.E. (1994) Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C- gamma 1 in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* **269**, 10935-10939.
- MARRERO M.B., PAXTON W.G., SCHIEFFER B., LING B.N. & BERNSTEIN K.E. (1996b) Angiotensin II signalling events mediated by tyrosine phosphorylation. *Cell Signal.* **8**, 21-26.

- MARRERO M.B., SCHIEFFER B., LI B., SUN J., HARP J.B. & LING B.N. (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**, 24684-24690.
- MARRERO M.B., SCHIEFFER B., MA H., BERNSTEIN K.E. & LING B.N. (1996a)
ANG II-induced tyrosine phosphorylation stimulates phospholipase C- gamma 1 and Cl-channels in mesangial cells. *Am.J.Physiol* **270**, C1834-C1842
- MARRERO M.B., SCHIEFFER B., PAXTON W.G., HEERDT L., BERK B.C., DELAFONTAINE P. & BERNSTEIN K.E. (1995) Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* **375**, 247-250.
- MARRERO M.B., VENEMA V.J., JU H., EATON D.C. & VENEMA R.C. (1998)
Regulation of angiotensin II-induced JAK2 tyrosine phosphorylation: roles of SHP-1 and SHP-2. *Am.J.Physiol* **275**, C1216-C1223
- MARTE B.M. & DOWNWARD J. (1997) PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem.Sci.* **22**, 355-358.
- MATOSAKI T, NAKANISHI H, TAKAI Y. (2000). Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades. *Cell Signal.* **12**,515-524.
- MATSUI T., AMANO M., YAMAMOTO T., CHIHARA K., NAKAFUKU M., ITO M., NAKANO T., OKAWA K., IWAMATSU A. & KAIBUCHI K. (1996) Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J.* **15**, 2208-2216.
- MATSUI T., MAEDA M., DOI Y., YONEMURA S., AMANO M., KAIBUCHI K., TSUKITA S. & TSUKITA S. (1998) Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal

threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J.Cell Biol.* **140**, 647-657.

MATSUKAWA A., KAPLAN M.H., HOGABOAM C.M., LUKACS N.W. & KUNKEL S.L. (2001) Pivotal role of signal transducer and activator of transcription (Stat)4 and Stat6 in the innate immune response during sepsis. *J.Exp.Med.* **193**, 679-688.

MCBRIDE K.M., BANNINGER G., MCDONALD C. & REICH N.C. (2002) Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha. *EMBO J.* **21**, 1754-1763.

MCBRIDE K.M., MCDONALD C. & REICH N.C. (2000) Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *EMBO J.* **19**, 6196-6206.

MCCANN R.L. & HAGEN P.O. (1980) Effects of rabbit platelets on vascular smooth muscle cell DNA synthesis. *Atherosclerosis* **35**, 461-469.

MCDONALD PH, CHOW CW, MILLER WE, LAPORTE SA, FIELD ME, LIN FT, DAVIS RJ, LEFKOWITZ RJ. (2000) Beta-arrestin-2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science.* **290**:1574-7.

MCNAMARA C.A., SAREMBOCK I.J., GIMPLE L.W., FENTON J.W., COUGHLIN S.R. & OWENS G.K. (1993) Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J.Clin.Invest* **91**, 94-98.

MCNICOL A. & ROBSON C.A. (1997) Thrombin receptor-activating peptide releases arachidonic acid from human platelets: a comparison with thrombin and trypsin. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **281**, 861-867.

MCWHINNEY C.D., DOSTAL D. & BAKER K. (1998) Angiotensin II activates Stat5 through Jak2 kinase in cardiac myocytes. *J.Mol.Cell Cardiol.* **30**, 751-761.

- MELOCHE S, LANDRY J, HUOT J, HOULE F, MARCEAU F, GIASSON E. p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **279**, H741-751.
- MELOCHE S., PAGES G. & POUYSSEGUR J. (1992) Functional expression and growth factor activation of an epitope-tagged p44 mitogen-activated protein kinase, p44mapk. *Mol.Biol.Cell* **3**, 63-71.
- MELOCHE S., PELLETIER S. & SERVANT M.J. (2000) Functional cross-talk between the cyclic AMP and Jak/STAT signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Mol.Cell Biochem.* **212**, 99-109.
- MENG T.C., FUKADA T. & TONKS N.K. (2002) Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol.Cell* **9**, 387-399.
- MERAZ M.A., WHITE J.M., SHEEHAN K.C., BACH E.A., RODIG S.J., DIGHE A.S., KAPLAN D.H., RILEY J.K., GREENLUND A.C., CAMPBELL D., CARVER-MOORE K., DUBOIS R.N., CLARK R., AGUET M. & SCHREIBER R.D. (1996) Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* **84**, 431-442.
- MIGONE T.S., LIN J.X., CERESETO A., MULLOY J.C., O'SHEA J.J., FRANCHINI G. & LEONARD W.J. (1995) Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I. *Science* **269**, 79-81.
- MIKI H., MIURA K. & TAKENAWA T. (1996) N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J.* **15**, 5326-5335.
- MIKI H., SUETSUGU S. & TAKENAWA T. (1998) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J.* **17**, 6932-6941.

- MINDEN A., LIN A., CLARET F.X., ABO A. & KARIN M. (1995) Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* **81**, 1147-1157.
- MITSUI H., MARUYAMA T., KIMURA S. & TAKUWA Y. (1998) Thrombin activates two stress-activated protein kinases, c-Jun N-terminal kinase and p38, in HepG2 cells. *Hepatology* **27**, 1362-1367.
- MITSUI T., YOKOYAMA S., SHIMIZU Y., KATSUURA M., AKIBA K. & HAYASAKA K. (1997) Defective signal transduction through the thromboxane A2 receptor in a patient with a mild bleeding disorder: deficiency of the inositol 1,4,5-triphosphate formation despite normal G-protein activation. *Thromb.Haemost.* **77**, 991-995.
- MIYAZAKI T., KAWAHARA A., FUJII H., NAKAGAWA Y., MINAMI Y., LIU Z.J., OISHI I., SILVENNOINEN O., WITTHUHN B.A., IHLE J.N. & . (1994) Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science* **266**, 1045-1047.
- MOLINO M., BAINTON D.F., HOXIE J.A., COUGHLIN S.R. & BRASS L.F. (1997) Thrombin receptors on human platelets. Initial localization and subsequent redistribution during platelet activation. *J.Biol.Chem.* **272**, 6011-6017.
- MORIGGL R., BERCHTOLD S., FRIEDRICH K., STANDKE G.J., KAMMER W., HEIM M., WISSLER M., STOCKLIN E., GOUILLEUX F. & GRONER B. (1997) Comparison of the transactivation domains of Stat5 and Stat6 in lymphoid cells and mammary epithelial cells. *Mol.Cell Biol.* **17**, 3663-3678.
- MOWEN K.A., TANG J., ZHU W., SCHURTER B.T., SHUAI K., HERSCHMAN H.R. & DAVID M. (2001) Arginine methylation of STAT1 modulates IFN α /beta-induced transcription. *Cell* **104**, 731-741.

- MUI A.L., WAKAO H., O'FARRELL A.M., HARADA N. & MIYAJIMA A. (1995) Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. *EMBO J.* **14**, 1166-1175.
- MULLER M., BRISCOE J., LAXTON C., GUSCHIN D., ZIEMIECKI A., SILVENNOINEN O., HARPUR A.G., BARBIERI G., WITTHUHN B.A., SCHINDLER C. & . (1993) The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon- alpha/beta and -gamma signal transduction. *Nature* **366**, 129-135.
- MURPHY T.J., ALEXANDER R.W., GRIENGLING K.K., RUNGE M.S. & BERNSTEIN K.E. (1991) Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* **351**, 233-236.
- MURRAY K.J. (1990) Cyclic AMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacol.Ther.* **47**, 329-345.
- MUSSO T., JOHNSTON J.A., LINNEKIN D., VAREGIO L., ROWE T.K., O'SHEA J.J. & MCVICAR D.W. (1995) Regulation of JAK3 expression in human monocytes: phosphorylation in response to interleukins 2, 4, and 7. *J.Exp.Med.* **181**, 1425-1431.
- MYERS M.P., ANDERSEN J.N., CHENG A., TREMBLAY M.L., HORVATH C.M., PARISIEN J.P., SALMEEN A., BARFORD D. & TONKS N.K. (2001) TYK2 and JAK2 are substrates of protein tyrosine phosphatase 1B. *J.Biol.Chem.* **276**, 47771-47774.
- NAGATA K., PULS A., FUTTER C., ASPENSTROM P., SCHAEFER E., NAKATA T., HIROKAWA N. & HALL A. (1998) The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3. *EMBO J.* **17**, 149-158.

- NAIK S.R. (1984) Increased cyclic AMP-phosphodiesterase activity during inflammation and its inhibition by anti-inflammatory drugs. *Eur.J.Pharmacol.* **104**, 253-259.
- NAKA T., NARAZAKI M., HIRATA M., MATSUMOTO T., MINAMOTO S., AONO A., NISHIMOTO N., KAJITA T., TAGA T., YOSHIZAKI K., AKIRA S. & KISHIMOTO T. (1997) Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* **387**, 924-929.
- NAKAGAWA O., FUJISAWA K., ISHIZAKI T., SAITO Y., NAKAO K. & NARUMIYA S. (1996) ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett.* **392**, 189-193.
- NAKAJIMA H., LIU X.W., WYNshaw-BORIS A., ROSENTHAL L.A., IMADA K., FINBLOOM D.S., HENNIGHAUSEN L. & LEONARD W.J. (1997) An indirect effect of Stat5a in IL-2-induced proliferation: a critical role for Stat5a in IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain induction. *Immunity.* **7**, 691-701.
- NAKAMURA Y., RUSSELL S.M., MESS S.A., FRIEDMANN M., ERDOS M., FRANCOIS C., JACQUES Y., ADELSTEIN S. & LEONARD W.J. (1994) Heterodimerization of the IL-2 receptor. *Nature* **369**, 330-333.
- NAKANISHI-MATSUI M., ZHENG Y.W., SULCINER D.J., WEISS E.J., LUDEMAN M.J. & COUGHLIN S.R. (2000) PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature* **404**, 609-613.
- NAKANO K., TAKAISHI K., KODAMA A., MAMMOTO A., SHIOZAKI H., MONDEN M. & TAKAI Y. (1999) Distinct actions and cooperative roles of ROCK and mDia in Rho small G protein-induced reorganization of the actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol.Biol.Cell* **10**, 2481-2491.

- NARUMIYA S., ISHIZAKI T. & UEHATA M. (2000) Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632. *Methods Enzymol.* **325**, 273-284.
- NEGRESCU E.V., DE QUINTANA K.L. & SIESS W. (1995) Platelet shape change induced by thrombin receptor activation. Rapid stimulation of tyrosine phosphorylation of novel protein substrates through an inte. *J.Biol.Chem.* **270**, 1057-1061.
- NELSON J., ALLEN W.E., SCOTT W.N., BAILIE J.R., WALKER B., MCFERRAN N.V. & WILSON D.J. (1995) Murine epidermal growth factor (EGF) fragment (33-42) inhibits both EGF- and laminin-dependent endothelial cell motility and angiogenesis. *Cancer Res.* **55**, 3772-3776.
- NELSON K.L., ROGERS J.A., BOWMAN T.L., JOVE R. & SMITHGALL T.E. (1998) Activation of STAT3 by the c-Fes protein-tyrosine kinase. *J.Biol.Chem.* **273**, 7072-7077.
- NEUBAUER H., CUMANO A., MULLER M., WU H., HUFFSTADT U. & PFEFFER K. (1998) Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* **93**, 397-409.
- NGUYEN K.B., COUSENS L.P., DOUGHTY L.A., PIEN G.C., DURBIN J.E. & BIRON C.A. (2000) Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox. *Nat.Immunol.* **1**, 70-76.
- NICHOLSON S.E., WILLSON T.A., FARLEY A., STARR R., ZHANG J.G., BACA M., ALEXANDER W.S., METCALF D., HILTON D.J. & NICOLA N.A. (1999) Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *EMBO J.* **18**, 375-385.

- NOBES C.D. & HALL A. (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62.
- NOBES C.D. & HALL A. (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J.Cell Biol.* **144**, 1235-1244.
- NODA K., FENG Y.H., LIU X.P., SAAD Y., HUSAIN A. & KARNIK S.S. (1996) The active state of the AT1 angiotensin receptor is generated by angiotensin II induction. *Biochemistry* **35**, 16435-16442.
- NODA K., SAAD Y. & KARNIK S.S. (1995) Interaction of Phe8 of angiotensin II with Lys199 and His256 of AT1 receptor in agonist activation. *J.Biol.Chem.* **270**, 28511-28514.
- NOGUCHI M., YI H., ROSENBLATT H.M., FILIPOVICH A.H., ADELSTEIN S., MODI W.S., MCBRIDE O.W. & LEONARD W.J. (1993) Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* **73**, 147-157.
- NYSTEDT S., EMILSSON K., WAHLESTEDT C. & SUNDELIN J. (1994) Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 9208-9212.
- O'SHEA J.J. (1997) Jaks, STATs, cytokine signal transduction, and immunoregulation: are we there yet? *Immunity.* **7**, 1-11.
- O'SHEA J.J., GADINA M. & SCHREIBER R.D. (2002) Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* **109 Suppl**, S121-S131
- OAKES S.A., CANDOTTI F., JOHNSTON J.A., CHEN Y.Q., RYAN J.J., TAYLOR N., LIU X., HENNIGHAUSEN L., NOTARANGELO L.D., PAUL W.E., BLAESE R.M. & O'SHEA J.J. (1996) Signaling via IL-2 and IL-4 in JAK3-deficient severe

combined immunodeficiency lymphocytes: JAK3-dependent and independent pathways. *Immunity*. **5**, 605-615.

OFFERMANN S., LAUGWITZ K.L., SPICHER K. & SCHULTZ G. (1994) G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 504-508.

OFFERMANN S., MANCINO V., REVEL J.P. & SIMON M.I. (1997) Vascular system defects and impaired cell chemokinesis as a result of Galpha13 deficiency. *Science* **275**, 533-536.

OGINO Y., TANAKA K. & SHIMIZU N. (1996) Direct evidence for two distinct G proteins coupling with thrombin receptors in human neuroblastoma SH-EP cells. *Eur.J.Pharmacol.* **316**, 105-109.

OHMORI T., YATOMI Y., ASAZUMA N., SATOH K. & OZAKI Y. (2000) Involvement of proline-rich tyrosine kinase 2 in platelet activation: tyrosine phosphorylation mostly dependent on alphaIIb beta3 integrin and protein kinase C, translocation to the cytoskeleton and association with Shc through Grb2. *Biochem.J.* **347**, 561-569.

OHYAMA K., YAMANO Y., SANO T., NAKAGOMI Y., HAMAKUBO T., MORISHIMA I. & INAGAMI T. (1995) Disulfide bridges in extracellular domains of angiotensin II receptor type IA 2. *Regul.Pept.* **57**, 141-147.

OKUDA M., KAWAHARA Y., NAKAYAMA I., HOSHIJIMA M. & YOKOYAMA M. (1995) Angiotensin II transduces its signal to focal adhesions via angiotensin II type 1 receptors in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **368**, 343-347.

OLIVARES-REYES J.A., SMITH R.D., HUNYADY L., SHAH B.H. & CATT K.J. (2001) Agonist-induced signaling, desensitization, and internalization of a

phosphorylation-deficient AT1A angiotensin receptor. *J.Biol.Chem.* **276**, 37761-37768.

- OLIVERIO M.I., BEST C.F., KIM H.S., ARENDSHORST W.J., SMITHIES O. & COFFMAN T.M. (1997) Angiotensin II responses in AT1A receptor-deficient mice: a role for AT1B receptors in blood pressure regulation. *Am.J.Physiol* **272**, F515-F520
- OLSEN S.R. & UHLER M.D. (1991) Inhibition of protein kinase-A by overexpression of the cloned human protein kinase inhibitor. *Mol.Endocrinol.* **5**, 1246-1256.
- OLSON M.F., PASTERIS N.G., GORSKI J.L. & HALL A. (1996) Faciogenital dysplasia protein (FGD1) and Vav, two related proteins required for normal embryonic development, are upstream regulators of Rho GTPases. *Curr.Biol.* **6**, 1628-1633.
- OLSON M.F., PATERSON H.F. & MARSHALL C.J. (1998) Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature* **394**, 295-299.
- ORLOV R.S. & PLEKHANOV I.P. (1968) [The effect of hypertensin on the electrical and mechanical activity of the smooth muscle cells in blood vessels]. *Dokl.Akad.Nauk SSSR* **181**, 1292-1293.
- ORSTAVIK S., EIDE T., COLLAS P., HAN I.O., TASKEN K., KIEFF E., JAHNSEN T. & SKALHEGG B.S. (2000) Identification, cloning and characterization of a novel nuclear protein, HA95, homologous to A-kinase anchoring protein 95. *Biol.Cell* **92**, 27-37.
- OSINSKI M.T. & SCHROR K. (2000) Inhibition of platelet-derived growth factor-induced mitogenesis by phosphodiesterase 3 inhibitors: role of protein kinase A in vascular smooth muscle cell mitogenesis. *Biochem.Pharmacol.* **60**, 381-387.

- OTSUKI Y., TANAKA M., YOSHII S., KAWAZOE N., NAKAYA K. & SUGIMURA H. (2001) Tumor metastasis suppressor nm23H1 regulates Rac1 GTPase by interaction with Tiam1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 4385-4390.
- OUCHI T., LEE S.W., OUCHI M., AARONSON S.A. & HORVATH C.M. (2000) Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN-gamma target genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 5208-5213.
- PADMANABHAN J. & SHELANSKI M.L. (1998) Process formation in astrocytes: modulation of cytoskeletal proteins. *Neurochem.Res.* **23**, 377-384.
- PAGE K., LI J., HODGE J.A., LIU P.T., VANDEN HOEK T.L., BECKER L.B., PESTELL R.G., ROSNER M.R. & HERSHENSON M.B. (1999) Characterization of a Rac1 signaling pathway to cyclin D(1) expression in airway smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* **274**, 22065-22071.
- PARGANAS E., WANG D., STRAVOPODIS D., TOPHAM D.J., MARINE J.C., TEGLUND S., VANIN E.F., BODNER S., COLAMONICI O.R., VAN DEURSEN J.M., GROSVELD G. & IHLE J.N. (1998) Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* **93**, 385-395.
- PARK C., LI S., CHA E. & SCHINDLER C. (2000) Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity.* **13**, 795-804.
- PAULSON M., PRESS C., SMITH E., TANESE N. & LEVY D.E. (2002) IFN-Stimulated transcription through a TBP-free acetyltransferase complex escapes viral shutoff. *Nat.Cell Biol.* **4**, 140-147.
- PAXTON W.G., MARRERO M.B., KLEIN J.D., DELAFONTAINE P., BERK B.C. & BERNSTEIN K.E. (1994) The angiotensin II AT1 receptor is tyrosine and serine

phosphorylated and can serve as a substrate for the src family of tyrosine kinases. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **200**, 260-267.

PEACH M.J. (1977) Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev.* **57**, 313-370.

PELLETIER S., DUHAMEL F., COULOMBE P., POPOFF M.R. & MELOCHE S. (2003) Rho family GTPases are required for activation of Jak/STAT signaling by g protein-coupled receptors. *Mol.Cell Biol.* **23**, 1316-1333.

PELLETIER S., LAMARCHE-VANE N., & MELOCHE S. (2003b, submitted). Cyclic AMP induces arborization of Vascular Smooth Muscle Cells by Inhibiting the Rac-ROCK Signalling Pathway.

PERONA R., MONTANER S., SANIGER L., SANCHEZ-PEREZ I., BRAVO R. & LACAL J.C. (1997) Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* **11**, 463-475.

PERRY SJ, BAILLIE GS, KOHOUT TA, MCPHEE I, MAGIERA MM, ANG KL, MILLER WE, MCLEAN AJ, CONTI M, HOUSLAY MD, LEFKOWITZ RJ. Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science.* **298**, 834-836.

PRENZEL N., ZWICK E., DAUB H., LESERER M., ABRAHAM R., WALLASCH C. & ULLRICH A. (1999) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* **402**, 884-888.

QIU R.G., CHEN J., KIRN D., MCCORMICK F. & SYMONS M. (1995b) An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* **374**, 457-459.

QIU R.G., CHEN J., MCCORMICK F. & SYMONS M. (1995a) A role for Rho in Ras transformation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 11781-11785.

- QUELLE F.W., SATO N., WITTHUHN B.A., INHORN R.C., EDER M., MIYAJIMA A., GRIFFIN J.D. & IHLE J.N. (1994) JAK2 associates with the beta c chain of the receptor for granulocyte- macrophage colony-stimulating factor, and its activation requires the membrane-proximal region. *Mol.Cell Biol.* **14**, 4335-4341.
- QUILLIAM L.A., MUELLER H., BOHL B.P., PROSSNITZ V., SKLAR L.A., DER C.J. & BOKOCH G.M. (1991) Rap1A is a substrate for cyclic AMP-dependent protein kinase in human neutrophils. *J.Immunol.* **147**, 1628-1635.
- QURESHI S.A., LEUNG S., KERR I.M., STARK G.R. & DARNELL J.E., Jr. (1996) Function of Stat2 protein in transcriptional activation by alpha interferon. *Mol.Cell Biol.* **16**, 288-293.
- RAMANA C.V., GIL M.P., SCHREIBER R.D. & STARK G.R. (2002) Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol.* **23**, 96-101.
- RANE S.G. & REDDY E.P. (1994) JAK3: a novel JAK kinase associated with terminal differentiation of hematopoietic cells. *Oncogene* **9**, 2415-2423.
- RAO G.N. & BERK B.C. (1992) Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ.Res.* **70**, 593-599.
- RAO G.N., DELAFONTAINE P. & RUNGE M.S. (1995) Thrombin stimulates phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor, insulin receptor substrate-1, and phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* **270**, 27871-27875.
- REBECCHI M.J. & SCARLATA S. (1998) Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* **27**, 503-528.
- REID T., FURUYASHIKI T., ISHIZAKI T., WATANABE G., WATANABE N., FUJISAWA K., MORII N., MADAULE P. & NARUMIYA S. (1996) Rhotekin, a

new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain. *J.Biol.Chem.* **271**, 13556-13560.

REINTON N., COLLAS P., HAUGEN T.B., SKALHEGG B.S., HANSSON V., JAHNSEN T. & TASKEN K. (2000b) Localization of a novel human A-kinase-anchoring protein, hAKAP220, during spermatogenesis. *Dev.Biol.* **223**, 194-204.

REINTON N., ORSTAVIK S., HAUGEN T.B., JAHNSEN T., TASKEN K. & SKALHEGG B.S. (2000a) A novel isoform of human cyclic 3',5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase, c alpha-s, localizes to sperm midpiece. *Biol.Reprod.* **63**, 607-611.

REN X.D., BOKOCH G.M., TRAYNOR-KAPLAN A., JENKINS G.H., ANDERSON R.A. & SCHWARTZ M.A. (1996) Physical association of the small GTPase Rho with a 68-kDa phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in Swiss 3T3 cells. *Mol.Biol.Cell* **7**, 435-442.

RESAT H., STRAATSMA T.P., DIXON D.A. & MILLER J.H. (2001) The arginine finger of RasGAP helps Gln-61 align the nucleophilic water in GAP-stimulated hydrolysis of GTP. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 6033-6038.

REUNING U., LITTLE S.P., DIXON E.P. & BANG N.U. (1994) Effect of thrombin, the thrombin receptor activation peptide, and other mitogens on vascular smooth muscle cell urokinase receptor mRNA levels. *Blood* **84**, 3700-3708.

REUTHER J.Y., REUTHER G.W., CORTEZ D., PENDERGAST A.M. & BALDWIN A.S., Jr. (1998) A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev.* **12**, 968-981.

RICHARD JF, PETIT L, GIBERT M, MARVAUD JC, BOUCHAUD C, POPOFF MR. (1999) Bacterial toxins modifying the actin cytoskeleton. *Int Microbiol.* **2**,185-94.

- RICHTER M.F., DUMENIL G., UZE G., FELLOUS M. & PELLEGRINI S. (1998) Specific contribution of Tyk2 JH regions to the binding and the expression of the interferon alpha/beta receptor component IFNAR1. *J.Biol.Chem.* **273**, 24723-24729.
- RIDLEY A.J., COMOGLIO P.M. & HALL A. (1995) Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. *Mol.Cell Biol.* **15**, 1110-1122.
- RIDLEY A.J. & HALL A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-399.
- RIDLEY A.J., PATERSON H.F., JOHNSTON C.L., DIEKMANN D. & HALL A. (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-410.
- RITTINGER K., WALKER P.A., ECCLESTON J.F., NURMAHOMED K., OWEN D., LAUE E., GAMBLIN S.J. & SMERDON S.J. (1997) Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature* **388**, 693-697.
- RODRIGUEZ-FRADE J.M., VILA-CORO A.J., MARTIN A., NIETO M., SANCHEZ-MADRID F., PROUDFOOT A.E., WELLS T.N., MARTINEZ A. & MELLADO M. (1999) Similarities and differences in RANTES- and (AOP)-RANTES-triggered signals: implications for chemotaxis. *J.Cell Biol.* **144**, 755-765.
- RODRIGUEZ-LINARES B. & WATSON S.P. (1994) Phosphorylation of JAK2 in thrombin-stimulated human platelets. *FEBS Lett.* **352**, 335-338.

- ROHATGI R., MA L., MIKI H., LOPEZ M., KIRCHHAUSEN T., TAKENAWA T. & KIRSCHNER M.W. (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42- dependent signals to actin assembly. *Cell* **97**, 221-231.
- RON D., ZANNINI M., LEWIS M., WICKNER R.B., HUNT L.T., GRAZIANI G., TRONICK S.R., AARONSON S.A. & EVA A. (1991) A region of proto-dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24, and the human breakpoint cluster gene, bcr. *New Biol.* **3**, 372-379.
- RUSSELL S.M., JOHNSTON J.A., NOGUCHI M., KAWAMURA M., BACON C.M., FRIEDMANN M., BERG M., MCVICAR D.W., WITTHUHN B.A., SILVENNOINEN O. & . (1994) Interaction of IL-2R beta and gamma c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID. *Science* **266**, 1042-1045.
- RUSSELL S.M., TAYEBI N., NAKAJIMA H., RIEDY M.C., ROBERTS J.L., AMAN M.J., MIGONE T.S., NOGUCHI M., MARKERT M.L., BUCKLEY R.H. & . (1995) Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science* **270**, 797-800.
- SAHAI E., ALBERTS A.S. & TREISMAN R. (1998) RhoA effector mutants reveal distinct effector pathways for cytoskeletal reorganization, SRF activation and transformation. *EMBO J.* **17**, 1350-1361.
- SAKAI I. & KRAFT A.S. (1997) The kinase domain of Jak2 mediates induction of bcl-2 and delays cell death in hematopoietic cells. *J.Biol.Chem.* **272**, 12350-12358.
- SANDERS L.C., MATSUMURA F., BOKOCH G.M. & DE LANEROLLE P. (1999) Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* **283**, 2083-2085.
- SANO M., FUKUDA K., KODAMA H., TAKAHASHI T., KATO T., HAKUNO D., SATO T., MANABE T., TAHARA S. & OGAWA S. (2000) Autocrine/Paracrine

secretion of IL-6 family cytokines causes angiotensin II-induced delayed STAT3 activation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **269**, 798-802.

SANO S., ITAMI S., TAKEDA K., TARUTANI M., YAMAGUCHI Y., MIURA H., YOSHIKAWA K., AKIRA S. & TAKEDA J. (1999) Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO J.* **18**, 4657-4668.

SASAKI K., YAMANO Y., BARDHAN S., IWAI N., MURRAY J.J., HASEGAWA M., MATSUDA Y. & INAGAMI T. (1991) Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* **351**, 230-233.

SATO T.K., OVERDUIN M. & EMR S.D. (2001) Location, location, location: membrane targeting directed by PX domains. *Science* **294**, 1881-1885.

SAYESKI P.P., ALI M.S., FRANK S.J. & BERNSTEIN K.E. (2001) The angiotensin II-dependent nuclear translocation of Stat1 is mediated by the Jak2 protein motif 231YRFRR. *J.Biol.Chem.* **276**, 10556-10563.

SAYESKI P.P., ALI M.S., HAWKS K., FRANK S.J. & BERNSTEIN K.E. (1999b) The angiotensin II-dependent association of Jak2 and c-Src requires the N-terminus of Jak2 and the SH2 domain of c-Src. *Circ.Res.* **84**, 1332-1338.

SAYESKI P.P., ALI M.S., SAFAVI A., LYLES M., KIM S.O., FRANK S.J. & BERNSTEIN K.E. (1999a) A catalytically active Jak2 is required for the angiotensin II-dependent activation of Fyn. *J.Biol.Chem.* **274**, 33131-33142.

SCARPETTA M.A. & UHLER M.D. (1993) Evidence for two additional isoforms of the endogenous protein kinase inhibitor of cAMP-dependent protein kinase in mouse. *J.Biol.Chem.* **268**, 10927-10931.

- SCHEFFZEK K., LAUTWEIN A., KABSCH W., AHMADIAN M.R. & WITTINGHOFER A. (1996) Crystal structure of the GTPase-activating domain of human p120GAP and implications for the interaction with Ras. *Nature* **384**, 591-596.
- SCHEFFZEK K., STEPHAN I., JENSEN O.N., ILLENBERGER D. & GIERSCHIK P. (2000) The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. *Nat.Struct.Biol.* **7**, 122-126.
- SCHELLING J.R., NKEMERE N., KONIECZKOWSKI M., MARTIN K.A. & DUBYAK G.R. (1997) Angiotensin II activates the beta 1 isoform of phospholipase C in vascular smooth muscle cells. *Am.J.Physiol* **272**, C1558-C1566
- SCHIAVONE M.T., KHOSLA M.C. & FERRARIO C.M. (1990) Angiotensin-[1-7]: evidence for novel actions in the brain. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **16 Suppl 4**, S19-S24
- SCHIEFFER B., BERNSTEIN K.E. & MARRERO M.B. (1996a) The role of tyrosine phosphorylation in angiotensin II mediated intracellular signaling and cell growth. *J.Mol.Med.* **74**, 85-91.
- SCHIEFFER B., LUCHTEFELD M., BRAUN S., HILFIKER A., HILFIKER-KLEINER D. & DREXLER H. (2000) Role of NAD(P)H oxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signaling and cytokine induction. *Circ.Res.* **87**, 1195-1201.
- SCHIEFFER B., PAXTON W.G., MARRERO M.B. & BERNSTEIN K.E. (1996b) Importance of tyrosine phosphorylation in angiotensin II type 1 receptor signaling. *Hypertension* **27**, 476-480.
- SCHIFFRIN E.L. (2002) Beyond blood pressure: the endothelium and atherosclerosis progression. *Am.J.Hypertens.* **15**, 115S-122S.

- SCHMIDT A. & HALL A. (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.* **16**, 1587-1609.
- SCHMITT J.M. & STORK P.J. (2001) Cyclic AMP-mediated inhibition of cell growth requires the small G protein Rap1. *Mol.Cell Biol.* **21**, 3671-3683.
- SCHMITZ U., ISHIDA T., ISHIDA M., SURAPISITCHAT J., HASHAM M.I., PELECH S. & BERK B.C. (1998) Angiotensin II stimulates p21-activated kinase in vascular smooth muscle cells: role in activation of JNK. *Circ.Res.* **82**, 1272-1278.
- SCHWALLER J., PARGANAS E., WANG D., CAIN D., ASTER J.C., WILLIAMS I.R., LEE C.K., GERTHNER R., KITAMURA T., FRANTSVE J., ANASTASIADOU E., LOH M.L., LEVY D.E., IHLE J.N. & GILLILAND D.G. (2000) Stat5 is essential for the m. *Mol.Cell* **6**, 693-704.
- SCHWEIZER U., GUNNERSEN J., KARCH C., WIESE S., HOLTSMANN B., TAKEDA K., AKIRA S. & SENDTNER M. (2002) Conditional gene ablation of Stat3 reveals differential signaling requirements for survival of motoneurons during development and after nerve injury in the adult. *J.Cell Biol.* **156**, 287-297.
- SEASHOLTZ T.M., MAJUMDAR M. & BROWN J.H. (1999) Rho as a mediator of G protein-coupled receptor signaling. *Mol.Pharmacol.* **55**, 949-956.
- SEILER S.M., PELUSO M., MICHEL I.M., GOLDENBERG H., FENTON J.W., RIEKINGER D. & NATARAJAN S. (1995) Inhibition of thrombin and SFLLR-peptide stimulation of platelet aggregation, phospholipase A2 and Na⁺/H⁺ exchange by a thrombin receptor antagonist. *Biochem.Pharmacol.* **49**, 519-528.
- SEKI N., UEKI N., YANO K., SAITO T., MASUHO Y. & MURAMATSU M. (2000) cDNA cloning of a novel human gene NAKAP95, neighbor of A-kinase anchoring protein 95 (AKAP95) on chromosome 19p13.11-p13.12 region 9. *J.Hum.Genet.* **45**, 31-37.

- SELLS M.A., KNAUS U.G., BAGRODIA S., AMBROSE D.M., BOKOCH G.M. & CHERNOFF J. (1997) Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr.Biol.* **7**, 202-210.
- SERVANT M.J., COULOMBE P., TURGEON B. & MELOCHE S. (2000) Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J.Cell Biol.* **148**, 543-556.
- SERVANT M.J., GIASSON E. & MELOCHE S. (1996) Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* **271** , 16047-16052.
- SERVILLO G., DELLA FAZIA M.A. & SASSONE-CORSI P. (2002) Coupling cAMP signaling to transcription in the liver: pivotal role of CREB and CREM. *Exp.Cell Res.* **275**, 143-154.
- SESHIAH P.N., WEBER D.S., ROCIC P., VALPPU L., TANIYAMA Y. & GRIENDLING K.K. (2002) Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ.Res.* **91**, 406-413.
- SETTE C. & CONTI M. (1996) Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase. Involvement of serine 54 in the enzyme activation. *J.Biol.Chem.* **271**, 16526-16534.
- SETTE C., VICINI E. & CONTI M. (1994) The ratPDE3/IVd phosphodiesterase gene codes for multiple proteins differentially activated by cAMP-dependent protein kinase. *J.Biol.Chem.* **269**, 18271-18274.
- SEXL V., PIEKORZ R., MORIGGL R., ROHRER J., BROWN M.P., BUNTING K.D., ROTHAMMER K., ROUSSEL M.F. & IHLE J.N. (2000) Stat5a/b contribute to

interleukin 7-induced B-cell precursor expansion, but abl- and bcr/abl-induced transformation are independent of stat5. *Blood* **96**, 2277-2283.

SHARFE N., DADI H.K., O'SHEA J.J. & ROIFMAN C.M. (1997) Jak3 activation in human lymphocyte precursor cells. *Clin.Exp.Immunol.* **108**, 552-556.

SHEN X., HONG F., NGUYEN V.A. & GAO B. (2000) IL-10 attenuates IFN-alpha-activated STAT1 in the liver: involvement of SOCS2 and SOCS3. *FEBS Lett.* **480**, 132-136.

SHERR C.J. (1996) Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672-1677.

SHIBASAKI Y., ISHIHARA H., KIZUKI N., ASANO T., OKA Y. & YAZAKI Y. (1997) Massive actin polymerization induced by phosphatidylinositol-4- phosphate 5-kinase in vivo. *J.Biol.Chem.* **272**, 7578-7581.

SHIBASAKI Y., MATSUBARA H., NOZAWA Y., MORI Y., MASAKI H., KOSAKI A., TSUTSUMI Y., UCHIYAMA Y., FUJIYAMA S., NOSE A., IBA O., TATEISHI E., HASEGAWA T., HORIUCHI M., NAHMIAS C. & IWASAKA T. (2001) Angiotensin II type 2 receptor inhibits epidermal growth factor receptor transactivation by increasing association of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Hypertension* **38**, 367-372.

SHIMODA K., KATO K., AOKI K., MATSUDA T., MIYAMOTO A., SHIBAMORI M., YAMASHITA M., NUMATA A., TAKASE K., KOBAYASHI S., SHIBATA S., ASANO Y., GONDO H., SEKIGUCHI K., NAKAYAMA K., NAKAYAMA T., OKAMURA T., OKAMURA S., NIHO Y. & NAKAYAMA K. (2000) Tyk2 plays a restricted role in IFN alpha signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function. *Immunity.* **13**, 561-571.

- SHIRAKAWA F. & MIZEL S.B. (1989) In vitro activation and nuclear translocation of NF-kappa B catalyzed by cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol. Cell Biol.* **9**, 2424-2430.
- SILVENNOINEN O., IHLE J.N., SCHLESSINGER J. & LEVY D.E. (1993) Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature* **366**, 583-585.
- SILVER P.J. (1985) Regulation of contractile activity in vascular smooth muscle by protein kinases. *Rev. Clin. Basic Pharm.* **5**, 341-395.
- SIMON A.R., RAI U., FANBURG B.L. & COCHRAN B.H. (1998) Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Am. J. Physiol.* **275**, C1640-C1652
- SIMON A.R., VIKIS H.G., STEWART S., FANBURG B.L., COCHRAN B.H. & GUAN K.L. (2000) Regulation of STAT3 by direct binding to the Rac1 GTPase. *Science* **290**, 144-147.
- SIMONCIC P.D., LEE-LOY A., BARBER D.L., TREMBLAY M.L. & MCGLADE C.J. (2002) The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of janus family kinases 1 and 3. *Curr. Biol.* **12**, 446-453.
- SLICE L.W., WONG H.C., STERNINI C., GRADY E.F., BUNNETT N.W. & WALSH J.H. (1994) The conserved NPXnY motif present in the gastrin-releasing peptide receptor is not a general sequestration sequence. *J. Biol. Chem.* **269**, 21755-21761.
- SNOW J.W., ABRAHAM N., MA M.C., ABBEY N.W., HERNDIER B. & GOLDSMITH M.A. (2002) STAT5 promotes multilineage hematolymphoid development in vivo through effects on early hematopoietic progenitor cells. *Blood* **99**, 95-101.
- SPERISEN P., WANG S.M., SOLDAINI E., PLA M., RUSTERHOLZ C., BUCHER P., CORTHESEY P., REICHENBACH P. & NABHOLZ M. (1995) Mouse interleukin-2 receptor alpha gene expression. Interleukin-1 and interleukin-2 control transcription via distinct cis-acting elements. *J. Biol. Chem.* **270**, 10743-10753.

- SPOERNER M., HERRMANN C., VETTER I.R., KALBITZER H.R. & WITTINGHOFER A. (2001) Dynamic properties of the Ras switch I region and its importance for binding to effectors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 4944-4949.
- STAHL N., BOULTON T.G., FARRUGGELLA T., IP N.Y., DAVIS S., WITTHUHN B.A., QUELLE F.W., SILVENNOINEN O., BARBIERI G., PELLEGRINI S. & . (1994) Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* **263**, 92-95.
- STAHL N., FARRUGGELLA T.J., BOULTON T.G., ZHONG Z., DARNELL J.E., Jr. & YANCOPOULOS G.D. (1995) Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine- based motifs in cytokine receptors. *Science* **267**, 1349-1353.
- STARR R., WILLSON T.A., VINEY E.M., MURRAY L.J., RAYNER J.R., JENKINS B.J., GONDA T.J., ALEXANDER W.S., METCALF D., NICOLA N.A. & HILTON D.J. (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* **387**, 917-921.
- STEWART A.G., HARRIS T., FERNANDES D.J., SCHACHTE L.C., KOUTSOUBOS V., GUIDA E., RAVENHALL C.E., VADIVELLO P. & WILSON J.W. (1999) Beta2-adrenergic receptor agonists and cAMP arrest human cultured airway smooth muscle cells in the G(1) phase of the cell cycle: role of proteasome degradation of cyclin D1. *Mol.Pharmacol.* **56**, 1079-1086.
- STOCKLIN E., WISLER M., GOUILLEUX F. & GRONER B. (1996) Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* **383**, 726-728.
- STORK P.J. & SCHMITT J.M. (2002) Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* **12**, 258-266.
- STUBBS M.T. & BODE W. (1993) A model for the specificity of fibrinogen cleavage by thrombin. *Semin.Thromb.Hemost.* **19**, 344-351.

- SUETSUGU S., MIKI H. & TAKENAWA T. (1998) The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *EMBO J.* **17**, 6516-6526.
- SUETSUGU S., MIKI H. & TAKENAWA T. (1999) Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **260**, 296-302.
- SUGAYA T., NISHIMATSU S., TANIMOTO K., TAKIMOTO E., YAMAGISHI T., IMAMURA K., GOTO S., IMAIZUMI K., HISADA Y., OTSUKA A. & . (1995) Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice with hypotension and hyperreninemia. *J.Biol.Chem.* **270**, 18719-18722.
- SUH Y.A., ARNOLD R.S., LASSEGUE B., SHI J., XU X., SORESCU D., CHUNG A.B., GRIENGLING K.K. & LAMBETH J.D. (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* **401**, 79-82.
- SUN P., LOU L. & MAURER R.A. (1996) Regulation of activating transcription factor-1 and the cAMP response element-binding protein by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type I, II, and IV. *J.Biol.Chem.* **271**, 3066-3073.
- SUNDARESAN M., YU Z.X., FERRANS V.J., IRANI K. & FINKEL T. (1995) Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* **270**, 296-299.
- SUNDARESAN M., YU Z.X., FERRANS V.J., SULCINER D.J., GUTKIND J.S., IRANI K., GOLDSCHMIDT-CLERMONT P.J. & FINKEL T. (1996) Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem.J.* **318 (Pt 2)**, 379-382.
- SUZUKI A., KOZAWA O., SHINODA J., WATANABE Y., SAITO H. & OISO Y. (1996) Thrombin induces proliferation of osteoblast-like cells through phosphatidylcholine hydrolysis. *J.Cell Physiol* **168**, 209-216.

- SUZUKI M., FURUUCHI K., TONOKI H., OZAKI T., IIZUKA K., MURAKAMI T., KITABATAKE A. & KAWAGUCHI H. (1999) A novel A-kinase anchoring protein in the heart interacts with G alpha 13. *Jpn.Heart J.* **40**, 199-208.
- TAKAHASHI T., KAWAHARA Y., OKUDA M. & YOKOYAMA M. (1996) Increasing cAMP antagonizes hypertrophic response to angiotensin II without affecting Ras and MAP kinase activation in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **397**, 89-92.
- TAKAHASHI T. & SHIRASAWA T. (1994) Molecular cloning of rat JAK3, a novel member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *FEBS Lett.* **342**, 124-128.
- TAKAHASHI T., TANIGUCHI T., KONISHI H., KIKKAWA U., ISHIKAWA Y. & YOKOYAMA M. (1999) Activation of Akt/protein kinase B after stimulation with angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Am.J.Physiol* **276**, H1927-H1934
- TAKAI Y., SASAKI T. & MATOZAKI T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* **81**, 153-208.
- TAKASAGO T., IMAGAWA T., FURUKAWA K., OGURUSU T. & SHIGEKAWA M. (1991) Regulation of the cardiac ryanodine receptor by protein kinase- dependent phosphorylation. *J.Biochem.(Tokyo)* **109**, 163-170.
- TAKEDA K., CLAUSEN B.E., KAISHO T., TSUJIMURA T., TERADA N., FORSTER I. & AKIRA S. (1999) Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity.* **10**, 39-49.
- TAKEDA K., NOGUCHI K., SHI W., TANAKA T., MATSUMOTO M., YOSHIDA N., KISHIMOTO T. & AKIRA S. (1997) Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 3801-3804.

- TANIMOTO K., SUGIYAMA F., GOTO Y., ISHIDA J., TAKIMOTO E., YAGAMI K., FUKAMIZU A. & MURAKAMI K. (1994) Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J.Biol.Chem.* **269**, 31334-31337.
- TAPON N., NAGATA K., LAMARCHE N. & HALL A. (1998) A new rac target POSH is an SH3-containing scaffold protein involved in the JNK and NF-kappaB signalling pathways. *EMBO J.* **17**, 1395-1404.
- TAY-UYBOCO J., POON M.C., AHMAD S. & HOLLENBERG M.D. (1995) Contractile actions of thrombin receptor-derived polypeptides in human umbilical and placental vasculature: evidence for distinct receptor systems. *Br.J.Pharmacol.* **115**, 569-578.
- TERABE M., MATSUI S., NOBEN-TRAUTH N., CHEN H., WATSON C., DONALDSON D.D., CARBONE D.P., PAUL W.E. & BERZOFSKY J.A. (2000) NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat.Immunol.* **1**, 515-520.
- TERAMOTO H., COSO O.A., MIYATA H., IGISHI T., MIKI T. & GUTKIND J.S. (1996a) Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family. *J.Biol.Chem.* **271**, 27225-27228.
- TERAMOTO H., CRESPO P., COSO O.A., IGISHI T., XU N. & GUTKIND J.S. (1996b) The small GTP-binding protein rho activates c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases in human kidney 293T cells. Evidence for a Pak-independent signaling pathway. *J.Biol.Chem.* **271**, 25731-25734.
- THOMAS W.G., QIAN H., CHANG C.S. & KARNIK S. (2000) Agonist-induced phosphorylation of the angiotensin II (AT(1A)) receptor requires generation of a conformation that is distinct from the inositol phosphate-signaling state. *J.Biol.Chem.* **275**, 2893-2900.

- THOMAS W.G., THEKKUMKARA T.J. & BAKER K.M. (1996) Molecular mechanisms of angiotensin II (AT1A) receptor endocytosis. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol Suppl* **3**, S74-S80
- TIRUPPATHI C., YAN W., SANDOVAL R., NAQVI T., PRONIN A.N., BENOVIC J.L. & MALIK A.B. (2000) G protein-coupled receptor kinase-5 regulates thrombin-activated signaling in endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 7440-7445.
- TOHGO A, PIERCE KL, CHOY EW, LEFKOWITZ RJ, LUTTRELL LM. (2002) beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* **277**, 9429-9436.
- TOLIAS K.F., CANTLEY L.C. & CARPENTER C.L. (1995) Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J.Biol.Chem.* **270**, 17656-17659.
- TOLIAS K.F., COUVILLON A.D., CANTLEY L.C. & CARPENTER C.L. (1998) Characterization of a Rac1-RhoGDI-associated lipid kinase signaling complex. *Mol.Cell Biol.* **18**, 762-770.
- TOLIAS K.F., HARTWIG J.H., ISHIHARA H., SHIBASAKI Y., CANTLEY L.C. & CARPENTER C.L. (2000) Type Ialpha phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. *Curr.Biol.* **10**, 153-156.
- TOMINAGA T. & BARBER D.L. (1998) Na-H exchange acts downstream of RhoA to regulate integrin-induced cell adhesion and spreading. *Mol.Biol.Cell* **9**, 2287-2303.
- TOMINAGA T., ISHIZAKI T., NARUMIYA S. & BARBER D.L. (1998) p160ROCK mediates RhoA activation of Na-H exchange. *EMBO J.* **17**, 4712-4722.
- TORTOLANI P.J., LAL B.K., RIVA A., JOHNSTON J.A., CHEN Y.Q., REAMAN G.H., BECKWITH M., LONGO D., ORTALDO J.R., BHATIA K. & . (1995) Regulation of JAK3 expression and activation in human B cells and B cell malignancies. *J.Immunol.* **155**, 5220-5226.

- TOUYZ R.M. & SCHIFFRIN E.L. (2000) Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol.Rev.* **52**, 639-672.
- TREJO J., HAMMES S.R. & COUGHLIN S.R. (1998) Termination of signaling by protease-activated receptor-1 is linked to lysosomal sorting. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 13698-13702.
- TSUCHIDA S., MATSUSAKA T., CHEN X., OKUBO S., NIIMURA F., NISHIMURA H., FOGO A., UTSUNOMIYA H., INAGAMI T. & ICHIKAWA I. (1998) Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes. *J.Clin.Invest* **101**, 755-760.
- TURNER C.E., PIETRAS K.M., TAYLOR D.S. & MOLLOY C.J. (1995) Angiotensin II stimulation of rapid paxillin tyrosine phosphorylation correlates with the formation of focal adhesions in rat aortic smooth muscle cells. *J.Cell Sci.* **108 (Pt 1)**, 333-342.
- UCHIYAMA-TANAKA Y., MATSUBARA H., NOZAWA Y., MURASAWA S., MORI Y., KOSAKI A., MARUYAMA K., MASAKI H., SHIBASAKI Y., FUJIYAMA S., NOSE A., IBA O., HASAGAWA T., TATEISHI E., HIGASHIYAMA S. & IWASAKA T. (2001) Angiotensin II signaling and HB-EGF shedding via metalloproteinase in glomerular mesangial cells. *Kidney Int.* **60**, 2153-2163.
- UEHATA M., ISHIZAKI T., SATOH H., ONO T., KAWAHARA T., MORISHITA T., TAMAKAWA H., YAMAGAMI K., INUI J., MAEKAWA M. & NARUMIYA S. (1997) Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* **389**, 990-994.
- UNDERWOOD D.C., OSBORN R.R., NOVAK L.B., MATTHEWS J.K., NEWSHOLME S.J., UNDEM B.J., HAND J.M. & TORPHY T.J. (1993) Inhibition of antigen-

induced bronchoconstriction and eosinophil infiltration in the guinea pig by the cyclic AMP-specific phosphodiesterase inhibitor, rolipram. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **266**, 306-313.

UNGUREANU D., SAHARINEN P., JUNTILA I., HILTON D.J. & SILVENNOINEN O. (2002) Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Mol.Cell Biol.* **22**, 3316-3326.

USHIO-FUKAI M., ALEXANDER R.W., AKERS M. & GRIENGLING K.K. (1998) p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J.Biol.Chem.* **273**, 15022-15029.

USHIO-FUKAI M., ALEXANDER R.W., AKERS M., YIN Q., FUJIO Y., WALSH K. & GRIENGLING K.K. (1999) Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* **274**, 22699-22704.

USHIO-FUKAI M., GRIENGLING K.K., BECKER P.L., HILENSKI L., HALLERAN S. & ALEXANDER R.W. (2001a) Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **21**, 489-495.

USHIO-FUKAI M., HILENSKI L., SANTANAM N., BECKER P.L., MA Y., GRIENGLING K.K. & ALEXANDER R.W. (2001b) Cholesterol depletion inhibits epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II in vascular smooth muscle cells: role of cholesterol-rich microdomains and focal adhesions in angiotensin II signaling. *J.Biol.Chem.* **276**, 48269-48275.

VAN AELST L., JONESON T. & BAR-SAGI D. (1996) Identification of a novel Rac1-interacting protein involved in membrane ruffling. *EMBO J.* **15**, 3778-3786.

- VELAZQUEZ L., FELLOUS M., STARK G.R. & PELLEGRINI S. (1992) A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell* **70**, 313-322.
- VELAZQUEZ L., MOGENSEN K.E., BARBIERI G., FELLOUS M., UZE G. & PELLEGRINI S. (1995) Distinct domains of the protein tyrosine kinase tyk2 required for binding of interferon-alpha/beta and for signal transduction. *J.Biol.Chem.* **270**, 3327-3334.
- VENEMA R.C., JU H., VENEMA V.J., SCHIEFFER B., HARP J.B., LING B.N., EATON D.C. & MARRERO M.B. (1998a) Angiotensin II-induced association of phospholipase Cgamma1 with the G- protein-coupled AT1 receptor. *J.Biol.Chem.* **273**, 7703-7708.
- VENEMA R.C., VENEMA V.J., EATON D.C. & MARRERO M.B. (1998b) Angiotensin II-induced tyrosine phosphorylation of signal transducers and activators of transcription 1 is regulated by Janus-activated kinase 2 and Fyn kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. *J.Biol.Chem.* **273**, 30795-30800.
- VERBSKY J.W., BACH E.A., FANG Y.F., YANG L., RANDOLPH D.A. & FIELDS L.E. (1996) Expression of Janus kinase 3 in human endothelial and other non- lymphoid and non-myeloid cells. *J.Biol.Chem.* **271**, 13976-13980.
- VEXLER Z.S., SYMONS M. & BARBER D.L. (1996) Activation of Na⁺-H⁺ exchange is necessary for RhoA-induced stress fiber formation. *J.Biol.Chem.* **271**, 22281-22284.
- VILA-CORO A.J., RODRIGUEZ-FRADE J.M., MARTIN D.A., MORENO-ORTIZ M.C., MARTINEZ A. & MELLADO M. (1999) The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J.* **13**, 1699-1710.

- VINCENT S. & SETTLEMAN J. (1997) The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac GTPases and regulates actin cytoskeletal organization. *Mol.Cell Biol.* **17**, 2247-2256.
- VINKEMEIER U., COHEN S.L., MOAREFI I., CHAIT B.T., KURIYAN J. & DARNELL J.E., Jr. (1996) DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO J.* **15**, 5616-5626.
- VOISIN L., LAROSE L. & MELOCHE S. (1999) Angiotensin II stimulates serine phosphorylation of the adaptor protein Nck: physical association with the serine/threonine kinases Pak1 and casein kinase I. *Biochem.J.* **341** (Pt 1), 217-223.
- VOSSLER M.R., YAO H., YORK R.D., PAN M.G., RIM C.S. & STORK P.J. (1997) cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* **89**, 73-82.
- VU T.K., HUNG D.T., WHEATON V.I. & COUGHLIN S.R. (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **64**, 1057-1068.
- WALKER T.R., MOORE S.M., LAWSON M.F., PANETTIERI R.A., Jr. & CHILVERS E.R. (1998) Platelet-derived growth factor-BB and thrombin activate phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B: role in mediating airway smooth muscle proliferation. *Mol.Pharmacol.* **54**, 1007-1015.
- WALTER M.R., WINDSOR W.T., NAGABHUSHAN T.L., LUNDELL D.J., LUNN C.A., ZAUODNY P.J. & NARULA S.K. (1995) Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor. *Nature* **376**, 230-235.

- WANG L., LIU F. & ADAMO M.L. (2001) Cyclic AMP inhibits extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways by inhibiting Rap1. *J.Biol.Chem.* **276**, 37242-37249.
- WANG W.H. & GIEBISCH G. (1991) Dual modulation of renal ATP-sensitive K⁺ channel by protein kinases A and C. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 9722-9725.
- WATANABE G., SAITO Y., MADAULE P., ISHIZAKI T., FUJISAWA K., MORII N., MUKAI H., ONO Y., KAKIZUKA A. & NARUMIYA S. (1996) Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rhopilin as targets of small GTPase Rho. *Science* **271**, 645-648.
- WATANABE N., KATO T., FUJITA A., ISHIZAKI T. & NARUMIYA S. (1999) Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat.Cell Biol.* **1**, 136-143.
- WATANABE N., MADAULE P., REID T., ISHIZAKI T., WATANABE G., KAKIZUKA A., SAITO Y., NAKAO K., JOCKUSCH B.M. & NARUMIYA S. (1997) p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* **16**, 3044-3056.
- WATLING D., GUSCHIN D., MULLER M., SILVENNOINEN O., WITTHUHN B.A., QUELLE F.W., ROGERS N.C., SCHINDLER C., STARK G.R., IHLE J.N. & . (1993) Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway. *Nature* **366**, 166-170.
- WEBER J.D., HU W., JEFcoat S.C., Jr., RABEN D.M. & BALDASSARE J.J. (1997) Ras-stimulated extracellular signal-related kinase 1 and RhoA activities coordinate platelet-derived growth factor-induced G1 progression through the independent regulation of cyclin D1 and p27. *J.Biol.Chem.* **272**, 32966-32971.

- WEI Y., ZHANG Y., DEREWENDA U., LIU X., MINOR W., NAKAMOTO R.K., SOMLYO A.V., SOMLYO A.P. & DEREWENDA Z.S. (1997) Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. *Nat.Struct.Biol.* **4**, 699-703.
- WEISS R.H. & MADURI M. (1993) The mitogenic effect of thrombin in vascular smooth muscle cells is largely due to basic fibroblast growth factor. *J.Biol.Chem.* **268**, 5724-5727.
- WELCH H.C., COADWELL W.J., ELLSON C.D., FERGUSON G.J., ANDREWS S.R., ERDJUMENT-BROMAGE H., TEMPST P., HAWKINS P.T. & STEPHENS L.R. (2002) P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P₃- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell* **108**, 809-821.
- WELT F.G. & ROGERS C. (2002) Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **22**, 1769-1776.
- WEN R., WANG D., MCKAY C., BUNTING K.D., MARINE J.C., VANIN E.F., ZAMBETTI G.P., KORSMEYER S.J., IHLE J.N. & CLEVELAND J.L. (2001) Jak3 selectively regulates Bax and Bcl-2 expression to promote T-cell development. *Mol.Cell Biol.* **21**, 678-689.
- WESTWICK J.K., LAMBERT Q.T., CLARK G.J., SYMONS M., VAN AELST L., PESTELL R.G. & DER C.J. (1997) Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol.Cell Biol.* **17**, 1324-1335.
- WIDMANN C., GIBSON S., JARPE M.B. & JOHNSON G.L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* **79**, 143-180.
- WILEY J.C., WAILES L.A., IDZERDA R.L. & MCKNIGHT G.S. (1999) Role of regulatory subunits and protein kinase inhibitor (PKI) in determining nuclear

localization and activity of the catalytic subunit of protein kinase A.
J.Biol.Chem. **274**, 6381-6387.

WILKS A.F., HARPUR A.G., KURBAN R.R., RALPH S.J., ZURCHER G. & ZIEMIECKI A. (1991) Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol.Cell Biol.* **11**, 2057-2065.

WINTZ S., GUPTA S.K., QIAN N.X., HEASLEY L.E., NEMENOFF R.A. & JOHNSON G.L. (1994) Expression of a mutant Gi2 alpha subunit inhibits ATP and thrombin stimulation of cytoplasmic phospholipase A2-mediated arachidonic acid release independent of Ca²⁺ and mitogen-activated protein kinase regulation. *J.Biol.Chem.* **269**, 1889-1895.

WITCZAK O., SKALHEGG B.S., KERYER G., BORNENS M., TASKEN K., JAHNSEN T. & ORSTAVIK S. (1999) Cloning and characterization of a cDNA encoding an A-kinase anchoring protein located in the centrosome, AKAP450. *EMBO J.* **18**, 1858-1868.

WITTHUHN B.A., QUELLE F.W., SILVENNOINEN O., YI T., TANG B., MIURA O. & IHLE J.N. (1993) JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* **74**, 227-236.

WITTHUHN B.A., SILVENNOINEN O., MIURA O., LAI K.S., CWIK C., LIU E.T. & IHLE J.N. (1994) Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature* **370**, 153-157.

WRIGHT J.W., KREBS L.T., STOBBS J.W. & HARDING J.W. (1995) The angiotensin IV system: functional implications. *Front Neuroendocrinol.* **16**, 23-52.

- WURSTER A.L., TANAKA T. & GRUSBY M.J. (2000) The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene* **19**, 2577-2584.
- XU X., SUN Y.L. & HOEY T. (1996) Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* **273**, 794-797.
- XUE H.H., FINK D.W., Jr., ZHANG X., QIN J., TURCK C.W. & LEONARD W.J. (2002) Serine phosphorylation of Stat5 proteins in lymphocytes stimulated with IL-2. *Int.Immunol.* **14**, 1263-1271.
- YADA Y., NAGAO S., OKANO Y. & NOZAWA Y. (1989) Inhibition by cyclic AMP of guanine nucleotide-induced activation of phosphoinositide-specific phospholipase C in human platelets. *FEBS Lett.* **242**, 368-372.
- YAMAMOTO K., QUELLE F.W., THIERFELDER W.E., KREIDER B.L., GILBERT D.J., JENKINS N.A., COPELAND N.G., SILVENNOINEN O. & IHLE J.N. (1994) Stat4, a novel gamma interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation. *Mol.Cell Biol.* **14**, 4342-4349.
- YAMASHITA H., NEVALAINEN M.T., XU J., LEBARON M.J., WAGNER K.U., ERWIN R.A., HARMON J.M., HENNIGHAUSEN L., KIRKEN R.A. & RUI H. (2001) Role of serine phosphorylation of Stat5a in prolactin-stimulated beta- casein gene expression. *Mol.Cell Endocrinol.* **183**, 151-163.
- YASUKAWA H., SASAKI A. & YOSHIMURA A. (2000) Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu.Rev.Immunol.* **18**, 143-164.
- YOSHIMURA A., OHKUBO T., KIGUCHI T., JENKINS N.A., GILBERT D.J., COPELAND N.G., HARA T. & MIYAJIMA A. (1995) A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J.* **14**, 2816-2826.

- ZHANG H., WANG L., KAO S., WHITEHEAD I.P., HART M.J., LIU B., DUUS K., BURRIDGE K., DER C.J. & SU L. (1999) Functional interaction between the cytoplasmic leucine-zipper domain of HIV-1 gp41 and p115-RhoGEF. *Curr.Biol.* **9**, 1271-1274.
- ZHANG J., ZHANG J., BENOVIC J.L., SUGAI M., WETZKER R., GOUT I. & RITTENHOUSE S.E. (1995a) Sequestration of a G-protein beta gamma subunit or ADP-ribosylation of Rho can inhibit thrombin-induced activation of platelet phosphoinositide 3-kinases. *J.Biol.Chem.* **270**, 6589-6594.
- ZHANG J.J., VINKEMEIER U., GU W., CHAKRAVARTI D., HORVATH C.M. & DARNELL J.E., Jr. (1996) Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon gamma signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 15092-15096.
- ZHANG S., HAN J., SELLS M.A., CHERNOFF J., KNAUS U.G., ULEVITCH R.J. & BOKOCH G.M. (1995b) Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J.Biol.Chem.* **270**, 23934-23936.
- ZHAO Y., WAGNER F., FRANK S.J. & KRAFT A.S. (1995) The amino-terminal portion of the JAK2 protein kinase is necessary for binding and phosphorylation of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor beta c chain. *J.Biol.Chem.* **270**, 13814-13818.
- ZHENG Y., BAGRODIA S. & CERIONE R.A. (1994) Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85. *J.Biol.Chem.* **269**, 18727-18730.
- ZHENG Y., GLAVEN J.A., WU W.J. & CERIONE R.A. (1996) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate provides an alternative to guanine nucleotide exchange factors by stimulating the dissociation of GDP from Cdc42Hs. *J.Biol.Chem.* **271**, 23815-23819.

- ZHONG H., VOLL R.E. & GHOSH S. (1998) Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol.Cell* **1**, 661-671.
- ZHONG Z., WEN Z. & DARNELL J.E., Jr. (1994b) Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 4806-4810.
- ZHONG Z., WEN Z. & DARNELL J.E., Jr. (1994a) Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* **264**, 95-98.
- ZHOU Y.J., HANSON E.P., CHEN Y.Q., MAGNUSON K., CHEN M., SWANN P.G., WANG R.L., CHANGELIAN P.S. & O'SHEA J.J. (1997) Distinct tyrosine phosphorylation sites in JAK3 kinase domain positively and negatively regulate its enzymatic activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 13850-13855.
- ZHU J., GUO L., WATSON C.J., HU-LI J. & PAUL W.E. (2001) Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J.Immunol.* **166**, 7276-7281.
- ZHU X., WEN Z., XU L.Z. & DARNELL J.E., Jr. (1997) Stat1 serine phosphorylation occurs independently of tyrosine phosphorylation and requires an activated Jak2 kinase. *Mol.Cell Biol.* **17**, 6618-6623.
- ZHU Z., ZHANG S.H., WAGNER C., KURTZ A., MAEDA N., COFFMAN T. & ARENDSHORST W.J. (1998) Angiotensin AT1B receptor mediates calcium signaling in vascular smooth muscle cells of AT1A receptor-deficient mice. *Hypertension* **31**, 1171-1177.

ZOHN I.E., YU H., LI X., COX A.D. & EARP H.S. (1995) Angiotensin II stimulates calcium-dependent activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol. Cell Biol.* **15**, 6160-6168.

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

Annexe 1.

Liste des publications.

1. **Pelletier S.**, B. Battistini, P. Sirois. Adenosine-induced inhibition of basal endothelin-1 production from guinea-pig tracheal epithelial cells: a mechanism involving the release of cyclic AMP. Pulm. Pharmacol. Ther. 11:237-42, 1998.
2. **Pelletier S.**, B. Battistini, A. Jeng and P. Sirois. Effects of CGS 26303 on LPS and IL-1 β stimulated release of Endothelin-1 from guinea-pig tracheal epithelial cells. J. Cardiovasc. Pharm. 31: S10-S12, 1998.
3. Perron, M.-S. F. J. Gobeil, **S. Pelletier**, D. Regoli and P. Sirois. Involvement of Bradykinin B1 and B2 receptors in pulmonary leukocyte accumulation induced by Sephadex bead in Guinea-pig. Eur. J. Pharmacol. 376:83-91, 1999.
4. Blain J.-F., K. Maghni, **S. Pelletier** and P. Sirois. Evidences for the activation of complement in guinea-pig treated with Sephadex beads. Inflam. Res. 48:386-392, 1999.
5. **Pelletier S.**, A. Villeneuve, J. Dubé, F. J. Gobeil, S. G. Bernier B. Battistini, G. Guillemette and P. Sirois. Adenosine induces cyclic-AMP formation and inhibits endothelin-1 production/secretion in guinea-pig tracheal epithelial cells through A_{2B} adenosine receptor. Br. J. Pharmacol. 129:243-250, 2000.
6. Meloche S., **S. Pelletier**, M.J. Servant. Functional cross-talk between cyclic AMP and Jak/Stat signalling pathways in vascular smooth muscle cells. Mol. Cell. Biochem. 212:99-109, 2000.
7. **Pelletier S.**, J. Dubé, A. Villeneuve, F. J. Gobeil, Q. Yang, B. Battistini, G. Guillemette and P. Sirois. Prostaglandin E₂ induces cyclic-AMP formation and inhibits endothelin-1

production/secretion in guinea-pig tracheal epithelial cells through EP₄ receptor. Br. J. Pharmacol. 132: 999-1008, 2001.

8. Rouleau J. L., G. Kapuku, **S. Pelletier**, H. Gosselin, A. Adam, C. Gagnon, C. Lambert, S. Meloche. Superior cardioprotective effects of Ramipril as compared with Losartan in right ventricular pressure overload in the rabbit: importance of kinins and influence of Angiotensin II Type 1 receptor signalling pathway. Circulation 104: 939-944, 2001.
9. **Pelletier S.**, F. Duhamel, P. Coulombe, M.R. Popoff and S. Meloche. Rho family GTPases are required for activation of Jak/STAT signalling by G protein-coupled receptors. Mol. Cell. Biol. 24 :1316-1333, 2003.
10. Coulombe P., G. Rodier, **S. Pelletier**, J. Pellerin and S. Meloche. The Ubiquitin/Proteasome-dependent degradation of ERK3 defines a novel paradigm in MAP kinases regulation. Mol. Cell. Biol. 23: 4542-4558.
11. **Pelletier S.**, N. Lamarche and S. Meloche. Cyclic AMP impairs the Normal Phenotype of Vascular Smooth Muscle Cells by Inhibiting the Rac-ROCK Signalling Pathway. Mol Biol Cell (en modification).

Annexe 2.

Résumés de communications.

1. Stéphane Pelletier, Bruno Battistini, Solange Cloutier, Arco Y. Jeng et Pierre Sirois. Effets d'inhibiteurs d'endoprotéases sur la synthèse stimulé d'endothelin-1 par les cellules épithéliales de trachée de cobaye en culture. XXXIXe Réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, 16, 17 et 18 octobre 1997, Trois-Rivières, Québec. Médecine Sciences 13 (Suppl. 2): 11, 1997. (french)
2. Stéphane Pelletier, Bruno Battistini, Solange Cloutier, Arco Y. Jeng and Pierre Sirois. Effects of CGS 26303 on LPS- and IL-1 β -stimulated release of Endothelin-1 from guinea-pig tracheal epithelial cells. Endothelin-5, 13-17 September 1997, Kyoto, Japan.
3. Stéphane Pelletier, Edith Giasson et Sylvain Meloche. Bases moléculaires de l'action anti-hypertrophique de l'AMP cyclique dans le muscle lisse vasculaire. Club de Recherches Cliniques du Québec, 28-29-30-septembre 2000, Bromont, Québec. (french)
4. Quan Yang, Bruno Batistini, Stéphane Pelletier, Sylvie Bernier, Gaetan Guillemette et Pierre Sirois. Effects of Beta-2 adrenergic agonists, adenylyl cyclase activator and a cAMP analogue on the basal and LPS-stimulated release of ET- 1 from guinea-pig tracheal epithelial cells. Endothelin-5, 13-17 September 1997, Kyoto, Japan.
5. Marie-Soleil Perron, Bruno Battistini, Stéphane Pelletier, Witold Neugebauer, Dominico Regoli et Pierre Sirois. Effects of B1 and B2 antagonists on the migration of leukocytes in Sephadex-induced pulmonary inflammation in guinea-pigs. Inspiraplex January 1997, Montréal, Québec, Canada.
6. Stéphane Pelletier, Annie Villeneuve, Bruno Batistini, Solange Cloutier, and Pierre Sirois. Adenosine increased adenosine 3':5'-cyclic monophosphate formation through the A_{2B}-Adenosine receptor in tracheal epithelial cells. Relationship to endothelin-1 secretion. ALA/ATS INTERNATIONAL, April 24-29 1998. Chicago, Illinois, USA.
7. Stéphane Pelletier, Solange Cloutier, Annie Villeneuve, Sylvie G. Bernier, Gaétan Guillemette and Pierre Sirois. Prostaglandin E₂ increased adenosine 3':5'-cyclic monophosphate formation through the EP4-prostaglandin receptor on tracheal epithelial cells. Relationship to endothelin-1 secretion. ALA/ATS INTERNATIONAL, April 24-29 1998. Chicago, Illinois, USA.

8. Stéphane Pelletier, Solange Cloutier, Annie Villeneuve, Bruno Battistini, Gaétan Guillemette and Pierre Sirois. The A_{2B}-adenosine receptor mediates cAMP generation and inhibition of endothelin-1 production/secretion in tracheal epithelial cells. 9th International Conference, Inflammation Research Association, November 1-5 1998, Hershey, Pennsylvania, USA.
9. Stéphane Pelletier, Solange Cloutier, Annie Villeneuve, Bruno Battistini, Silvie G. Bernier, Gaétan Guillemette and Pierre Sirois. Activation of the EP₄-prostaglandin receptor subtype increases cAMP generation and inhibits ET-1 production/secretion by tracheal epithelial cells. 9th International Conference, Inflammation Research Association, November 1-5 1998, Hershey, Pennsylvania, USA.
10. Jean Dubé, Stéphane Pelletier et Pierre Sirois. Caractérisation des récepteurs à l'adénosine des cellules épithéliales de trachée de cobaye. XXXXI^e Réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, Château Montébello, Montebello, Québec. *Médecine Sciences* 15 (Suppl. 2): 29, 1999. (French)
11. Stéphane Pelletier, Edith Giasson et Sylvain Meloche. Bases moléculaires de l'effet antagonistique des agents vasorelaxants sur l'action hypertrophique de l'angiotensine II. Journée Gabriel L. Plaa, May 5th 2000, Montréal, Québec. (French)
12. Jean Dubé, Stéphane Pelletier and Pierre Sirois. Role of constitutive A_{2b} and inducible A₁ adenosine receptors in guinea-pig tracheal epithelial cells. 11th International Conference, Inflammation Research Association, 2000, Hershey, Pennsylvania, USA.
13. Stéphane Pelletier and Sylvain Meloche. Inhibitory cross-talk between cyclic AMP signalling and AT₁ receptor / Janus kinases signalling in vascular smooth muscle cells: relationship to cell growth. EB 2001 March 30th to April 4th 2001, Orlando, Florida, USA. *FASEB J* 15:A234 Abstract #211.1.
14. Stéphane Pelletier and Sylvain Meloche Functional antagonism between cyclic AMP signalling and Janus kinases signalling in vascular smooth muscle cells: relationship to cell growth. Research Day, IRCM, May 24th, 2001.
15. Stéphane Pelletier, François Duhamel, Michel R. Popoff and Sylvain Meloche. Regulation of Jak/STAT signalling by GPCR through Small GTPases. Great Lakes GPCR retreat and Club des récepteurs à sept domaines transmembranaires, Bromont, Québec (October 26th to 28th 2001).

16. Stéphane Pelletier, François Duhamel, Michel R.Popoff and Sylvain Meloche. Regulation of Jak/STAT signalling by GPCRs through Rho GTPases. EB 2002 April 19th to April 24th 2001, New Orleans, LA, USA. FASEB J 16:A578 Abstract #448.9.
17. Stéphane Pelletier, François Duhamel, Michel R.Popoff and Sylvain Meloche. Les petites protéines G de la famille Rho sont essentielles à l'activation de la voie Jak/STAT par les Récepteurs couplés aux protéine G. Journée Gabriel L. Plaa, May 10th 2002, Montréal, Québec. (french)
18. Stéphane Pelletier, François Duhamel, Philippe Coulombe, Michel R.Popoff and Sylvain Meloche. Regulation of Jak/STAT signalling by GPCRs through Rho GTPases. Research Day, IRCM, May 20, 2002.
19. Stéphane Pelletier, François Duhamel, Philippe Coulombe, Michel R.Popoff and Sylvain Meloche. Rho GTPases are required for activation of the Jak/STAT signalling pathway by G Protein-Coupled Receptor. Great Lakes GPCR retreat and Club des récepteurs à sept domaines transmembranaires du Québec, October 18th to 20th 2002.

Annexe 3.

Prix, mentions, Bourses

Bourse U. de Montréal. / F.E.S.	1999
Ph.D. Scholarship	
Heart and Stroke Foundation of Canada	2000-
Ph.D. Scholarship	
Bourse IRCM,	2001
Ph.D. Scholarship (declined)	
PFIZER CANADA,	2001
Best poster presentation, Ph.D., Research Day, IRCM	
ASPET,	2002
Graduate student travel Award at Experimental Biology	
Journée de la Recherche Gabriel L. Plaa,	2002
Best Poster Presentation, Department of Pharmacology	
Boeringer Ingelheim Canada Ltée,	2003
Best poster presentation, Ph.D., Research Day, IRCM	

11486575
V.160



Université de Montréal

Bibliothèque

