

**IDENTIFICATION DES ACTIVATEURS POTENTIELS
DE LA PROTÉINE KINASE ZPK**

Gino Laberge, B.Sc.

**mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)**

**FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE**

Sherbrooke, Québec, Canada, Août 1999



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-56921-7

Ce manuscrit est affectueusement
dédié à mes parents pour leur
dévouement et leur joie de vivre.

Le 1/9/99, le jury suivant a accepté ce mémoire dans sa version finale.
date

Président-rapporteur: M. Claude Déry
Département de biologie _____

Membre: M. Denis LeBel
Département de biologie _____

Membre: M. Richard Blouin
Département de biologie _____

SOMMAIRE

Les protéines kinases sont principalement impliquées dans la transmission des signaux de la membrane jusqu'au noyau. Notre laboratoire s'intéresse à ces mécanismes et en particulier à l'un de ses membres nommé ZPK (zipper protein kinase). Cette dernière est une sérine/thréonine kinase appartenant à la famille des MLKs (mixed-lineage kinases). Des travaux antérieurs ont suggéré l'implication de la protéine ZPK dans la régulation des processus de prolifération et de différenciation cellulaire. La caractérisation de ses mécanismes d'action au sein des voies de signalisation reste encore inexploré. Nous savons cependant que la protéine kinase ZPK est impliquée dans l'activation de la voie des JNKs (c-jun N-terminal kinases).

Nous avons donc tenté d'éclaircir ces mécanismes en identifiant les agents susceptibles de stimuler l'activité de ZPK par la réalisation d'études d'activation. Ces analyses ont été effectuées en mesurant directement ou indirectement les modulations de son activité (endogène ou transfectée), suite à des stimulations, à l'aide d'essais kinases *in vitro*. L'identification précise de ces activateurs n'a pu être établie, principalement en raison de la difficulté à mesurer directement l'activité intrinsèque de ZPK. Cependant, la méthode indirecte du "pull down" a permis de suggérer l'implication de ZPK dans la voie des JNKs suite à des stimulations.

Par la suite, nous avons voulu vérifier l'existence d'une relation entre la localisation de ZPK et sa capacité d'activer la voie des JNKs. Les résultats semblent suggérer une telle corrélation sans toutefois nous permettre de la confirmer avec certitude.

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements sont pour mon directeur de recherche le Dr. Richard Blouin pour m'avoir donné une chance de travailler dans son laboratoire et d'avoir investi temps et argent pour l'accomplissement de ma maîtrise. Je voudrais le remercier pour sa grande disponibilité et son dévouement pour la réussite de mon projet. Je voudrais aussi souligner le soutien et la disponibilité de mes conseillers les Drs. Claude Déry et Denis Lebel.

Mes remerciements sont destinés à mon père, ma mère, mes deux soeurs ainsi que Martin et ma belle famille pour leur support moral et leurs encouragements tout au long de ces deux dernières années. Leur présence a été sans aucun doute essentielle à la réussite de mes études graduées.

Je voudrais finalement remercier sincèrement Mélanie Douziech, partenaire de laboratoire et conjointe de vie, sans qui je n'aurais jamais pu apprécier ces deux dernières années. Sa compagnie et ses encouragements m'ont apporté bien-être et courage pour réaliser ce projet.

Le département de biologie de l'Université de Sherbrooke a généreusement contribué à l'exécution de ce travail par l'entremise de bourses d'étude.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES	xi
INTRODUCTION	1
Les protéines kinases: domaine catalytique et régulation	2
De la membrane au noyau	6
Les récepteurs	6
Les domaines d'interaction.....	12
La transmission des signaux	14
La cascade des MAPKs.....	15
La voie des ERKs.....	17
La voie de p38.....	19
La voie des JNKs	19
Mécanisme de régulation de la transcription par JNK	23
La transformation oncogénique par JNK: activateur ou supresseur de tumeurs?	24
Régulation des voies.....	26
Les protéines adaptateurs	27
La famille des MLKs	29
Description du projet de maîtrise	34
CHAPITRE 1 - MATÉRIEL ET MÉTHODES	36
1.1 Lignées cellulaires et conditions de culture	36

1.2 Transfection des cellules.....	36
1.3 Stimulation des cellules	37
1.4. Extraits cellulaires et immunoprécipitations.....	38
1.4.1 Pour la forme endogène de ZPK	38
1.4.2 Pour la forme transfectée de ZPK	39
1.5 Gel de protéines, transfert sur membrane et immunobuvardage	40
1.6 Essais kinase	41
1.6.1 Pour la forme endogène de ZPK	41
1.6.2 Pour la forme transfectée de ZPK	42
1.7 Production de la protéine c-jun	43
1.7.1 Transformation du vecteur pGEX-c-jun	43
1.7.2 Détermination du meilleur clone pGEX-c-jun recombinant.....	44
1.7.3 Production et purification de la protéine de fusion GST-c-jun	44
1.8 Technique du "pull-down" à l'aide de la protéine de fusion GST-c-jun.....	45
 CHAPITRE 2 - RÉSULTATS.....	 47
2.1 Étude de l'activité kinase de ZPK endogène	47
2.2 Étude de l'activité kinase de ZPK transfectée	50
2.3 Mesure de l'activation de la protéine JNK endogène dans les cellules transfectées avec ZPK par la méthode du "pull down"	55
2.4 Étude de la relation existant entre la localisation de ZPK et l'activation de la voie des des JNKs.	56
 CHAPITRE 3 - DISCUSSION.....	 61
3.1 Identification des activateurs de ZPK endogène	62
3.2 Identification des activateurs de la forme transfectée de ZPK	63
3.3 Mesure de l'activité de JNK endogène dans des cellules transfectées avec ZPK.....	65
3.4 Relation entre la localisation de ZPK et l'activation de JNK endogène	66
3.5 Perspectives d'avenir.....	67

CONCLUSION	70
ANNEXE 1.....	72
BIBLIOGRAPHIE.....	73

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Unités de mesure :

cm	centimètre
<i>g</i>	force gravitationnelle
g	gramme
J	joule
kDa	kilodalton
L	litre
m	mètre
M	molaire
mA	milliampère
mg	milligramme
ml	millilitre
mm	millimètre
mM	millimolaire
nm	nanomètre
rpm	<i>rotation par minute</i>
U	unité
μCi	microcurie
μg	microgramme
μl	microlitre
μM	micromolaire
v/v	volume/volume
p/v	poids/volume

Autres :

ADN	<i>acide désoxyribonucléique</i>
ATP	<i>adénosine triphosphate</i>
cAPK	<i>cyclic AMP-dependent protein kinase</i>
CRIB	<i>cdc42/Rac interactive binding</i>
DLK	<i>dual leucine zipper bearing kinase</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DSE	<i>dyad symmetry element</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ERK	<i>extracellular response kinase</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
GCK	<i>germinal center kinase</i>
GDP	<i>guanosine diphosphate</i>
GTP	<i>guanosine triphosphate</i>
GRB2	<i>growth factor receptor-binding protein 2</i>
HPK1	<i>hematopoietic progenitor kinase 1</i>
HSP27	<i>heat shock protein 27</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IRK	<i>insulin receptor protein-tyrosine kinase</i>
ISGF	<i>interferon-stimulated gene factor</i>
ISRE	<i>interferon-stimulated response element</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
JIP-1	<i>JNK interacting protein-1</i>
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
LZK	<i>leucine zipper-bearing kinase</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKAP	<i>MAPK-activated kinase</i>
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MEKK	<i>MAPK/ ERK kinase kinase</i>

MKK	<i>MAPK kinase</i>
MLK	<i>mixed-lineage kinase</i>
MP1	<i>Mek partner 1</i>
MST	<i>MKN28-derived non-receptor type of serine/threonine kinase</i>
MUK	<i>MAPK-upstream kinase</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
PAK	<i>p21-activated kinase</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PKC	<i>protéine kinase C</i>
PTK-1	<i>protein tyrosine kinase 1</i>
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
SEK-1	<i>SAPK / ERK-kinase 1</i>
SH2	<i>src-homology 2</i>
SH3	<i>src-homology 3</i>
SPRK	<i>SH3 domain containing proline-rich kinase</i>
STATs	<i>signal transducer and activators of transcription</i>
TAK	<i>TGF-β-activated protein kinase</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TPL	<i>tumor progression locus</i>
ZPK	<i>zipper protein kinase</i>

LISTE DES TABLEAUX

1. Les acides aminés et leur symbole.....	72
---	----

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1. Représentation schématique du domaine kinase de la sous-unité catalytique de la cAPK	4
Figure 2. Représentation du récepteur PDGF β après son activation.	8
Figure 3. Modèle de transduction de signaux d'un récepteur à cytokines via les protéines JAKs après une fixation de l'IFN α	9
Figure 4. Mécanisme d'activation des récepteurs couplés à des protéines G.	11
Figure 5. Cascade des MAPKs.....	16
Figure 6. L'activation de la voie des ERKs par les récepteurs tyrosine kinases.	18
Figure 7. La voie de p38.....	20
Figure 8. La voie des JNKs.	22
Figure 9. Représentation schématique des complexes multiprotéiques impliquant JIP-1 (A), MP1 (B) et MEKK1 (C)..	28
Figure 10. Schéma d'activation de la famille des MLKs.....	30
Figure 11. Représentation schématique de la séquence primaire de ZPK.	33

RÉSULTATS

Figure 12. Représentation schématique des grandes étapes menant à l'étude de l'activité endogène de ZPK	48
Figure 13. Analyse de l'activité de ZPK endogène dans les cellules NIH 3T3.	49
Figure 14. Analyse de la forme transfectée de ZPK dans les cellules HEK 293..	51

Figure 15. Analyse de l'autophosphorylation et de la spécificité de substrat de ZPK transfectée.	53
Figure 16. Analyse de l'activité de ZPK transfectée dans les cellules HEK 293.....	54
Figure 17. Représentation schématique des grandes étapes menant à l'étude de l'implication de ZPK transfectée dans l'activation de JNK endogène par la technique du "pull-down".....	57
Figure 18. Étude de l'implication de ZPK transfectée dans l'activation de JNK endogène par la technique du "pull-down".. ..	58
Figure 19. Relation entre la localisation de ZPK et sa capacité à activer la voie des JNKs.. ..	60

INTRODUCTION

La cellule est en constante adaptation afin de maintenir un équilibre avec le milieu environnant. Par exemple, l'organisme unicellulaire doit s'adapter à des changements de disponibilité de nutriments ou à des conditions environnementales variables afin de maintenir son homéostasie cellulaire. Chez les organismes multicellulaires, les cellules doivent pouvoir interagir les unes avec les autres pour survivre, se développer et ainsi maintenir cette même homéostasie. La transduction des signaux est le processus par lequel une stimulation ou une perturbation est perçue et convertie dans la cellule en un signal, lequel converge vers des effecteurs finaux qui permettent une réponse cellulaire appropriée nécessitant l'expression ou la répression de gènes spécifiques. Il est important d'élucider les composantes de ces voies de signalisation et les mécanismes qui gouvernent la transmission de l'information. Pourquoi? En plus de comprendre comment les cellules normales répondent aux stimuli extracellulaires, de telles informations nous aideront à comprendre ce qui se passe dans les cellules anormales. Dans les maladies telles que le cancer et le diabète, les cellules ne répondent plus correctement aux stimuli extracellulaires résultant en une perte de contrôle de la croissance et de plusieurs autres mécanismes intracellulaires.

Chez les eucaryotes, la réaction de phosphorylation/déphosphorylation de protéines joue un rôle central dans la régulation de plusieurs processus cellulaires. Ces processus sont contrôlés réversiblement par les protéines kinases et les protéines phosphatases (Hunter, 1995). Celles-ci constituent les éléments majeurs des voies de transmission de signaux en réponse à des stimuli externes, puisqu'elles permettent de coupler les événements à la surface de la membrane via des récepteurs jusqu'au noyau où l'activité de facteurs de transcription est modifiée (Denhart, 1996). Des perturbations intracellulaires telles que des dommages à l'ADN (acide désoxyribonucléique) ou à la structure du cytosquelette, peuvent aussi être

perçues et transmises au noyau sous forme d'un signal spécifique via ces protéines. Aussi, elles sont impliquées dans la régulation de la croissance, la division cellulaire, la mobilité cellulaire, le métabolisme, l'apoptose, la reconnaissance cellule-cellule et l'expression des gènes.

Les protéines kinases représentent l'une des plus larges familles de protéines. Celle-ci a été subdivisée en plusieurs classes selon l'acide aminé accepteur du groupement phosphate lors de la réaction catalytique de chaque protéine (Hunter, 1991): (1) il y a les enzymes qui ajoutent des groupements phosphates sur les résidus tyrosines, lesquelles sont soit des récepteurs associés à la membrane, soit cytoplasmiques et (2) celles qui ajoutent des groupements phosphates sur des sérines et des thréonines que l'on retrouve habituellement sur la face interne de la membrane plasmique, dans le cytoplasme ou dans le noyau (Hanks *et al.*, 1988). Des expériences montrent qu'il existe aussi des protéines kinases capables de phosphoryler autant des résidus sérines/thréonines que des tyrosines sur un motif Thr-X-Tyr. Ces protéines sont connues sous le nom de kinases à double spécificité (Douville *et al.*, 1994; Dhanasekaran et Reddy, 1998). Il est même possible de diviser cette catégorie de protéines en 3 sous-groupes: (1) les kinases qui montrent une vraie double spécificité par la phosphorylation des résidus sérines/thréonines et tyrosines d'un substrat exogène; (2) les kinases qui exhibent une double spécificité seulement en autophosphorylation; (3) et les kinases qui possèdent les motifs et caractéristiques structurales des kinases à double spécificité.

Les protéines kinases: domaine catalytique et régulation

Le domaine catalytique des protéines kinases possède approximativement 250-300 acides aminés, ce qui correspond à un poids moléculaire d'environ 30 kDa (kilodalton) de la protéine. La séquence primaire du domaine kinase contient des résidus clés qui ont été hautement conservés durant l'évolution et qui participent à l'établissement de sa fonction.

Par conséquent, ceci implique une structure tridimensionnelle similaire et donc un mécanisme catalytique commun. Ce domaine kinase a été divisé en 12 sous-domaines (I-XII) hautement conservés, séparés par des régions faiblement conservées (Hanks *et al.*, 1988). Le coeur du domaine catalytique est constitué des domaines VI à IX qui portent la plus grande fréquence d'homologie entre les résidus. Le domaine catalytique remplit trois fonctions essentielles: premièrement, il oriente et lie le phosphate donneur de l'ATP (adénosine triphosphate) dans un complexe avec un cation divalent (Mg^{2+} ou Mn^{2+}). Deuxièmement, il oriente et lie le substrat et finalement il transfère le γ -phosphate de l'ATP sur le résidu accepteur de la protéine substrat. Les protéines kinases utilisent le γ -phosphate de l'ATP pour générer un phosphate monoester utilisant un groupement alcool (sur une sérine ou une thréonine) et/ou un groupement phénol (sur une tyrosine) comme accepteur du phosphate. Pour ce qui est de l'ion métallique (Mg^{2+}), celui-ci permet de stabiliser et d'orienter correctement le γ -phosphate nécessaire à la catalyse. Il favorise également le développement d'une charge négative durant la catalyse (Johnson *et al.*, 1998). Naturellement, la première cristallisation du domaine kinase de la sous-unité catalytique de la cAPK (cyclic AMP-dependent protein kinase) a permis de déterminer les résidus importants dans la réaction catalytique (voir figure 1). Par la suite, il a été possible d'affirmer que la partie N-terminale (I-IV) formée de feuillets- β était principalement impliquée dans la fixation et l'orientation du nucléotide alors que la partie C-terminale (V-IX), formée d'hélices- α , était responsable à la fois de la fixation du peptide substrat et de l'initiation du phosphotransfert (Hanks et Hunter, 1995; Bossemeyer, 1995).

Plusieurs mécanismes de régulation des protéines kinases ont été identifiés jusqu'à maintenant et ils impliquent autant le domaine catalytique que ses structures extracatalytiques. Par exemple, il existe le contrôle par l'addition de sous-unités protéiques qui réagissent en fonction d'une réponse à un second messager comme dans le cas de la cAPK. L'addition de ces sous-unités peuvent elles-mêmes être régulées par leur niveau d'expression dépendant de l'état fonctionnel de la cellule. Aussi, l'addition de domaines

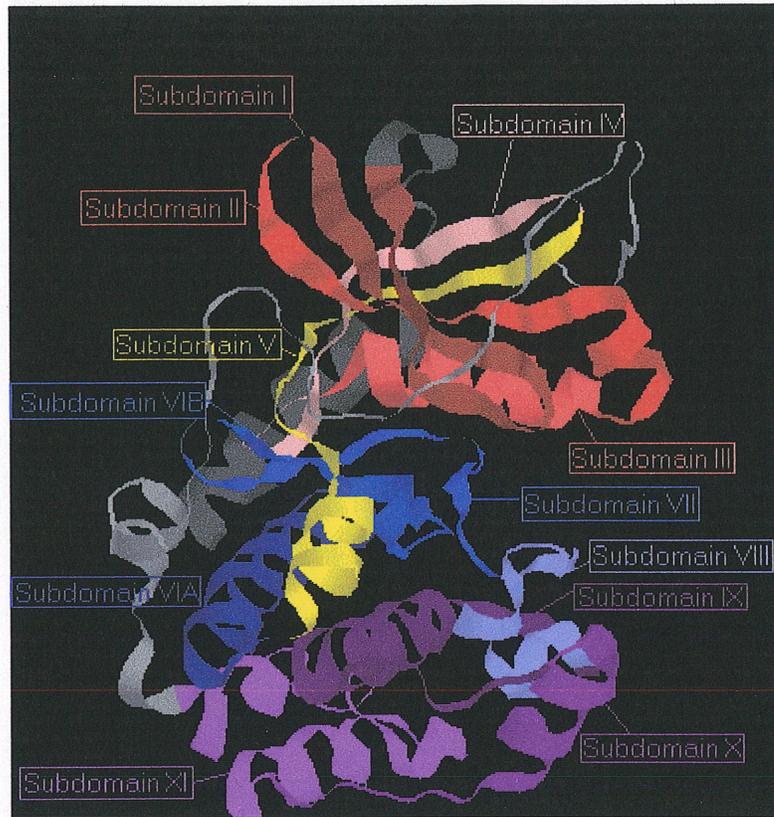


Figure 1. Représentation schématique du domaine kinase de la sous-unité catalytique de la cAPK . Ce schéma représente la structure tridimensionnelle des 12 sous-domaines de la cAPK.

particuliers permet de cibler les protéines kinases dans des localisations subcellulaires précises et certaines protéines peuvent agir comme inhibiteurs de leur activité kinase par un processus autorégulateur et ainsi moduler leur action. Finalement, le contrôle peut s'effectuer par la phosphorylation et la déphosphorylation par d'autres kinases ou phosphatases. Les sites de phosphorylation sont généralement distribués en carboxy et en amino terminal de la protéine, mais il semble aussi qu'un domaine situé dans la portion centrale du domaine kinase appelé le "segment d'activation" serait également un élément essentiel et crucial dans le contrôle de l'activité des protéines kinases (Jonhson *et al.*, 1996). Ce segment permet la phosphorylation de la protéine en des endroits précis et participe à la

conversion de l'enzyme d'un état inactif à un état actif. Ceci engendre un changement conformationnel de la protéine qui a pour effet de permettre l'exposition du substrat au domaine catalytique. Ceci a été bien démontré chez ERK2 (extracellular response kinase 2) (Canagarajah *et al.*, 1997).

Malgré l'existence d'une conservation des résidus entre les catégories de protéines kinases (celles qui phosphorylent en sérine/thréonine et celles en tyrosine), on peut se demander comment se fait la sélection du substrat pour chacun des enzymes? De par la structure de chacun des acides aminés phosphorylés, il est possible de croire que la fente catalytique d'une tyrosine kinase est dessinée pour positionner le groupement hydroxyle de la tyrosine comme accepteur du phosphate et ne peut effectuer le transfert de ce phosphate sur une sérine ou thréonine parce que celles-ci ne pénètrent pas assez profondément dans la fente catalytique. Les premières évidences supportant cette hypothèse ont été obtenues en comparant la structure tridimensionnelle de la cAPK à celle de l'IRK (insulin receptor protein-tyrosine kinase) (Taylor *et al.*, 1995). De plus, il a été démontré que la séquence primaire autour des acides aminés phosphorylés par la kinase jouait un rôle essentiel dans la reconnaissance du substrat (Pinna et Ruzzene, 1996). Ceci permet donc de gouverner l'autophosphorylation de la protéine et par le fait même son activité. Une autre question à laquelle on peut penser est par quel moyen les protéines kinases à double spécificité sont-elles capables de phosphoryler les 2 groupes? Jusqu'à maintenant, aucun indice sur ce mécanisme n'a été montré avec la comparaison des séquences primaires des différentes sortes de protéines cristallisées. Par contre, des travaux sur la protéine ERK2 ont montré que la phosphorylation des 2 résidus pourrait se faire séquentiellement en commençant par la tyrosine suivie par la thréonine (Haystead *et al.*, 1992).

De la membrane au noyau

Comme nous l'avons vu auparavant, la transduction du signal de la membrane au noyau permet de contrôler l'homéostasie cellulaire. Chez les eucaryotes, par exemple, le contrôle de la croissance cellulaire et du développement est régulé par des molécules de signalisation extracellulaire. Celles-ci activent par la suite des protéines tyrosine kinases membranaires ou cytoplasmiques, qui à leur tour stimulent les protéines de signalisation intracellulaires qui contrôlent biochimiquement les voies menant à la prolifération. Ces protéines tyrosine kinases jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Ceci s'explique par le fait que lorsque mutées dans différentes parties de leur structure, celles-ci deviennent constitutivement actives et favorisent la croissance en absence de stimuli extracellulaires occasionnant la transformation de la cellule (Rodrigues et Park, 1994; Porter et Vaillancourt, 1998). De par leur importance dans ces processus, il y a eu beaucoup d'avancements ces dernières années afin d'identifier les mécanismes par lesquels ces récepteurs tyrosine kinases régulent leurs cibles et comment ces récepteurs à la surface cellulaire communiquent avec les facteurs de transcription nucléaire (Pawson et Hunter, 1994).

Les récepteurs

Les récepteurs à la surface cellulaire reçoivent des messages de l'environnement via leur domaine extracellulaire qui contient des structures de fixation spécifiques pour des ligands. Lorsque des molécules spécifiques se lient à ces structures, cela entraîne une série d'événements intracellulaires. Depuis quelques années, ces mécanismes de translocation du signal externe via le récepteur semble s'effectuer par la formation de dimères et d'oligomères. Ces mécanismes s'appliquent à plusieurs catégories de récepteurs comme ceux possédant une activité tyrosine kinase ou sérine/thréonine kinase ainsi que les

récepteurs à cytokines. Les récepteurs tyrosine kinases et à cytokines seront décrits dans les prochaines lignes.

Les récepteurs tyrosine kinases sont formés d'un domaine transmembranaire qui sépare le domaine kinase intracellulaire du domaine extracellulaire, lequel contient les motifs spécifiques et essentiels à la liaison des différents ligands. Ces récepteurs appartiennent à différentes familles séparées selon le facteur de croissance avec lequel il peut se lier (platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), insulin-like growth factor (IGF), etc) (Heldin, 1995). Chez les récepteurs tyrosine kinases, la fixation d'un facteur de croissance entraîne la dimérisation qui est suivie par l'autophosphorylation du récepteur. Celle-ci se produit principalement par un mécanisme intermoléculaire, c'est-à-dire que les récepteurs se phosphorylent l'un l'autre en tyrosine. On explique cette phosphorylation par le changement dans la conformation du récepteur suite à cette dimérisation favorisant ainsi l'augmentation de leur activité kinase. Cette phosphorylation peut s'effectuer soit à l'intérieur, soit à l'extérieur du domaine kinase du récepteur. Ces phosphotyrosines constituent des sites d'ancrage pour les molécules de la transduction des signaux en aval, en formant des complexes via le domaine SH2 (src homology 2) de ces protéines (voir section sur les domaines d'interaction, p.12). Par exemple, plusieurs tyrosines phosphorylées peuvent être générées sur le récepteur à PDGF β (jusqu'à 8) suite à la fixation de son ligand afin de pouvoir interagir avec différentes protéines dont la PLC- γ , Src et Nck. (Schlessinger, 1994; Kazlauskas, 1994) (voir figure 2). Aussi, il ne faut pas oublier que la propagation d'un signal peut dépendre de l'homodimérisation ou de l'hétérodimérisation des récepteurs en cause. Ceci s'explique par le fait que le nombre et le type de récepteurs (différentes isoformes) exprimés à la surface cellulaire peut influencer cette dimérisation et ainsi permettre l'activation de différentes voies selon l'état de la cellule ou le type cellulaire.

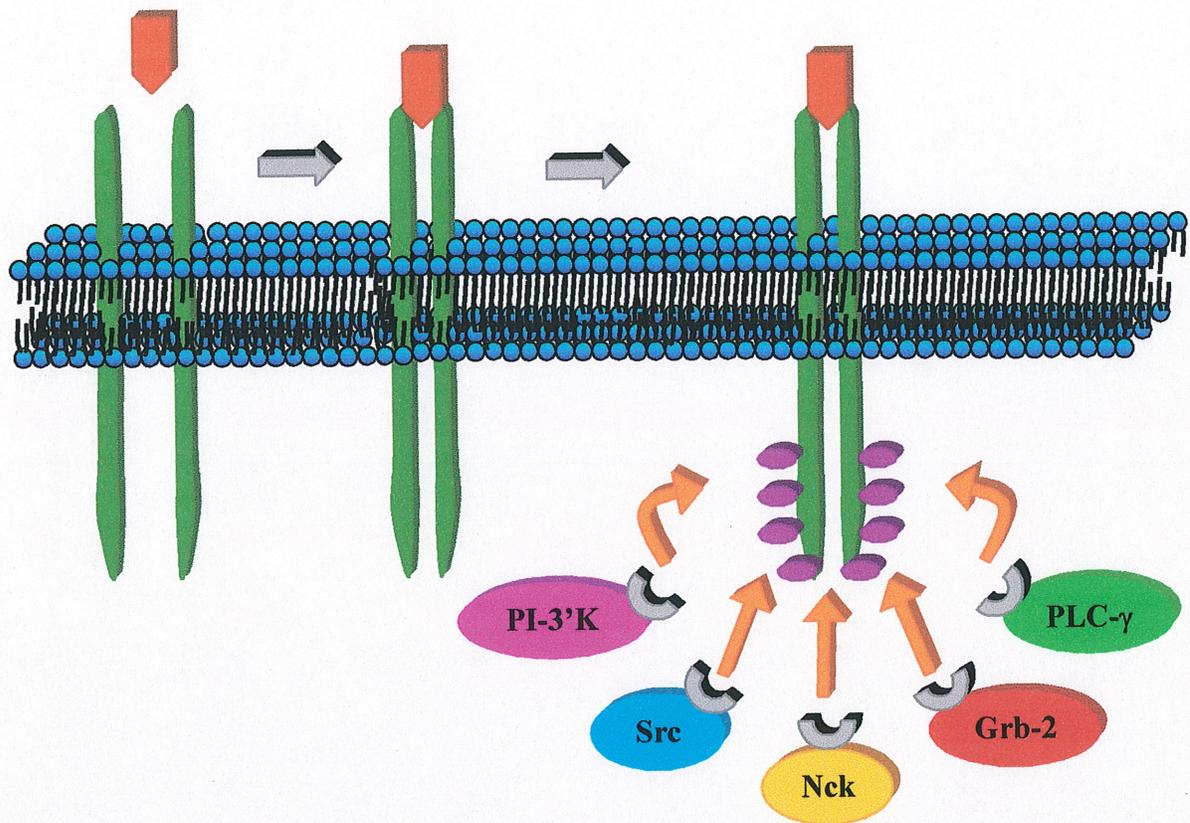


Figure 2. Représentation du récepteur PDGFβ après son activation. Les molécules de signalisation en aval qui contiennent des domaines SH2 (☞) se lient spécifiquement aux phosphotyrosines (●) du récepteur permettant ainsi de relier les récepteurs aux voies de signalisation intracellulaire.

Quant à la classe des récepteurs à cytokines, ceux-ci peuvent principalement interagir avec les interleukines et les interférons. Malgré que cette classe de récepteurs se distingue des récepteurs tyrosine kinases par l'absence d'un domaine catalytique intracellulaire, leurs mécanismes d'action sont similaires. La liaison d'une molécule extracellulaire induit une dimérisation ou une oligomérisation des récepteurs à cytokines permettant ainsi l'induction d'un signal intracellulaire. Ce signal est induit via des protéines cytoplasmiques associées aux domaines intracellulaires de ces récepteurs qui deviennent également actives. Cette signalisation pourrait se faire via des protéines kinase appelées les "Janus kinase" (JAK) (voir figure 3). Ces dernières s'activeraient suite à la dimérisation

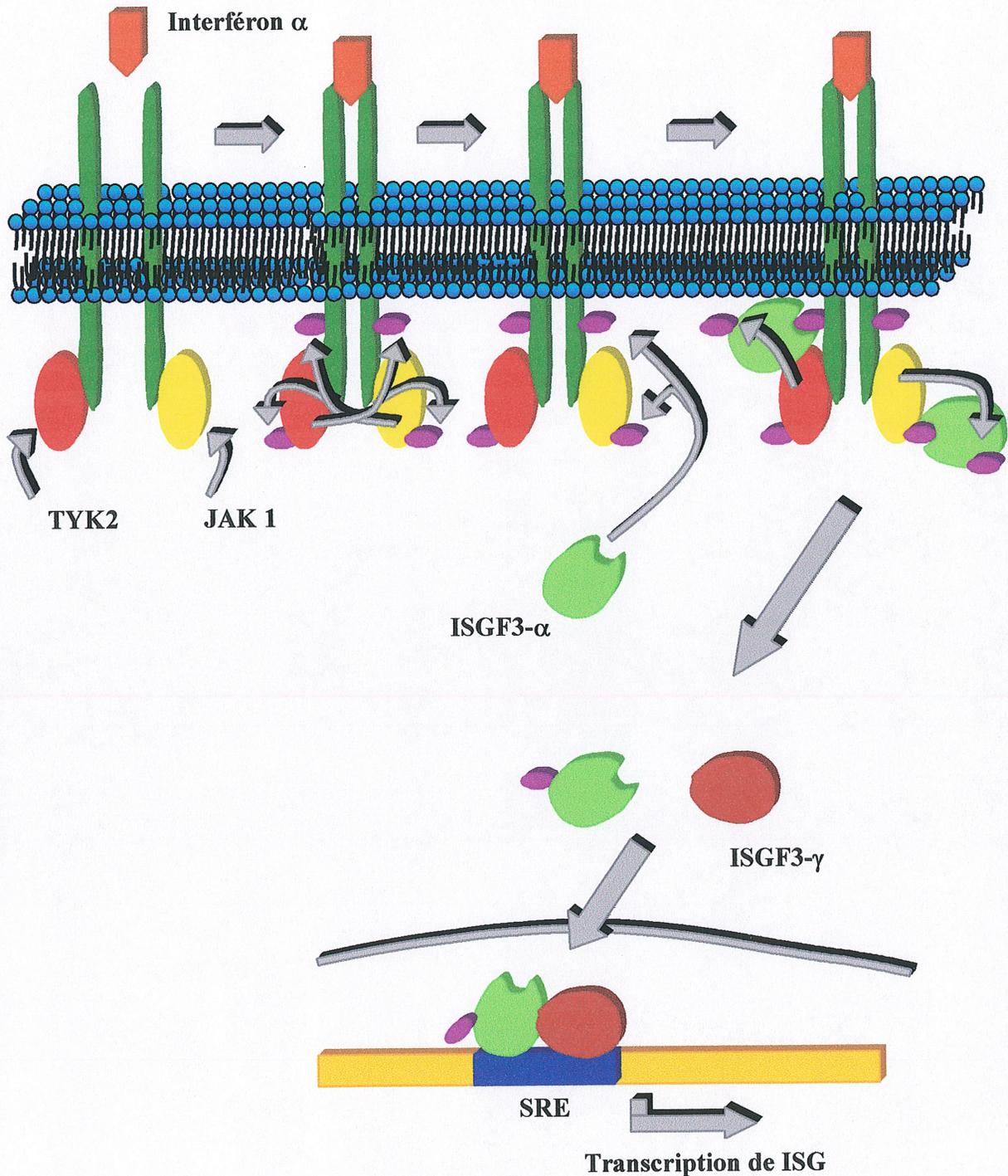


Figure 3. Modèle de transduction de signaux d'un récepteur à cytokines via les protéines JAKs après une fixation de l'IFN α . L'activation des protéines JAKs (TYK2 et JAK1) suivant la dimérisation du récepteur entraîne par la suite l'activation des protéines STATs (ISGF3) afin de stimuler une transcription spécifique. Phosphotyrosines (●).

des récepteurs à cytokines et phosphoryleraient plusieurs cibles de façon directe ou indirecte. Une de ces cibles serait le récepteur lui-même afin de créer des sites d'ancrage pour les protéines qui ont des domaines SH2. Une autre cible serait les protéines nommées "signal transducer and activators of transcription" (STATs) qui se regroupent pour former un complexe appelé ISGF3 (interferon-stimulated gene factor 3). Suite à l'activation du récepteur, ces protéines cytoplasmiques seraient recrutées à la membrane via leur domaine SH2 près du complexe JAK-récepteur pour ensuite être phosphorylées par les JAKs. Cette phosphorylation entraînerait la dissociation du complexe ISGF3 du récepteur et permettrait à ces protéines de s'homodimériser ou de s'hétérodimériser via leur domaine SH2. Celles-ci seront alors transloquées du cytoplasme au noyau où elles pourront spécifiquement stimuler la transcription (Taniguchi, 1995).

Il n'y a pas une grande différence entre les modes de signalisation des récepteurs tyrosine kinases et ceux des cytokines même si ces derniers n'ont pas de domaine kinase. Par exemple, les récepteurs à EGF et à PDGF activent via leur domaine tyrosine kinase la phosphorylation des protéines STATs peut-être via les protéines kinases JAKs. De plus, après l'activation des récepteurs à cytokines, les JAKs ou peut-être d'autres kinases pourraient entraîner l'activation des mêmes voies que celles suite à une activation des récepteurs tyrosine kinases grâce aux interactions phosphotyrosine-domaine SH2 (Heldin, 1995).

Il existe aussi des récepteurs qui ne se dimérisent pas suite à la liaison d'un ligand. Ces récepteurs sont appelés les récepteurs couplés à des protéines G. Ces dernières sont pourvues d'une activité catalytique GTPase qui permet l'échange du GDP (guanosine diphosphate) en GTP (guanosine triphosphate). Ces récepteurs constituent une famille de protéines contenant 7 hélices- α transmembranaires composées principalement de résidus hydrophobes enroulés entre les phases extracellulaires et intracellulaires (voir figure 4). Ces

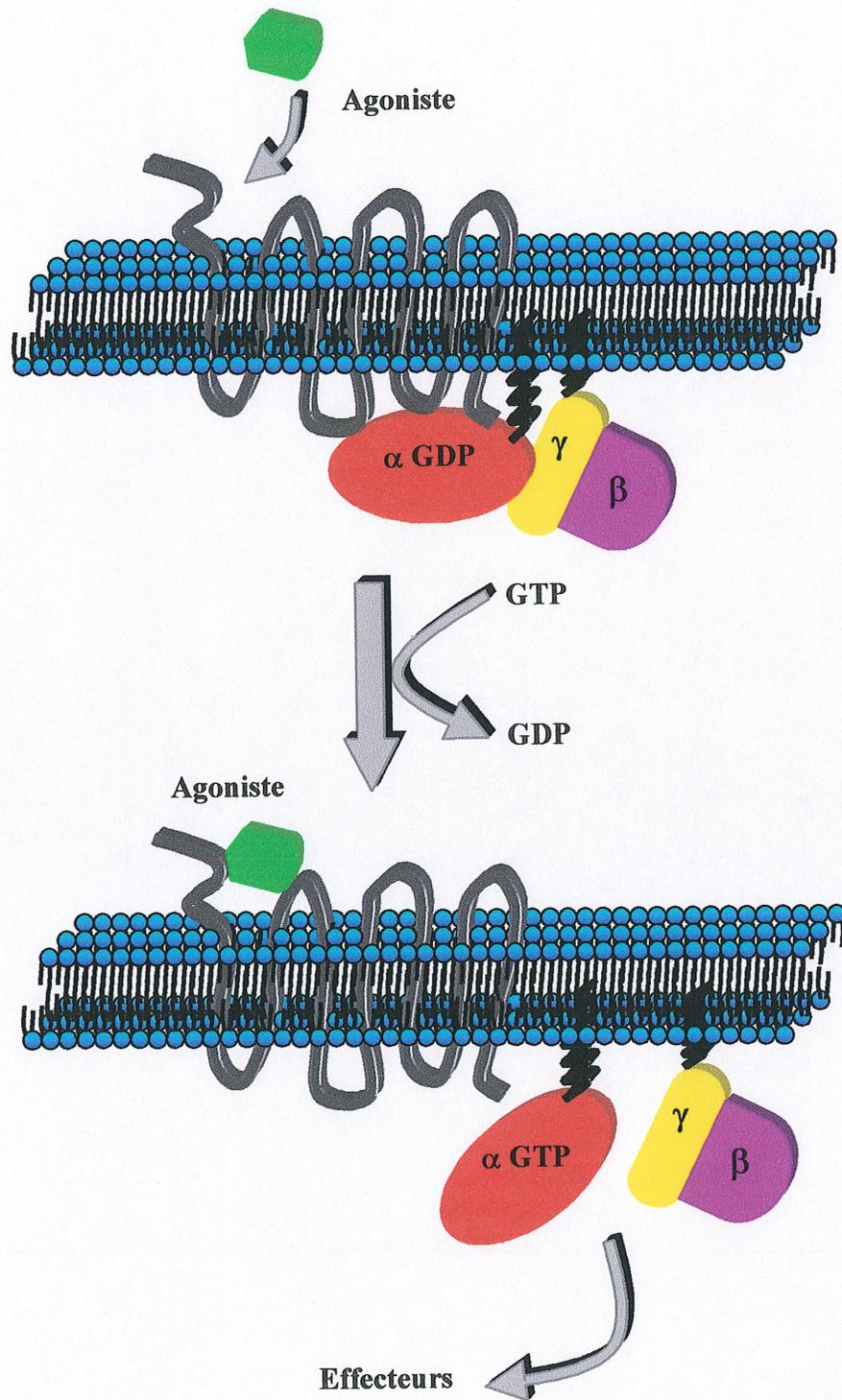


Figure 4. Mécanisme d'activation des récepteurs couplés à des protéines G. La fixation d'un ligand entraîne l'échange du GDP pour le GTP sur la sous-unité α , permettant ainsi de transmettre un signal aux voies de signalisation intracellulaire.

récepteurs sont couplés à des protéines G hétérotrimériques composées des sous-unités α , β et γ responsables d'initier une variété de voies de signalisation intracellulaires à partir de la membrane. Le mécanisme s'effectue comme suit: lorsque le récepteur couplé aux protéines G est inactif, la sous-unité α existe sous une forme liée au GDP. Lors de la liaison d'un agoniste extracellulaire au récepteur, il y a à la fois induction d'un changement conformationnel de celui-ci et des protéines G qui lui sont associées. Cela entraîne la diminution de l'affinité de la sous-unité α pour le GDP qui est alors remplacé par le GTP. Ce remplacement occasionne dès lors la dissociation de la sous-unité α du récepteur et des sous-unités β et γ pour ensuite effectuer leur rôle dans la transmission des signaux sur d'éventuels effecteurs. Par la suite, le mécanisme inverse s'effectue afin de permettre la réassociation des sous-unités au récepteur (Sugden et Clerk, 1997).

Les domaines d'interaction

Malgré l'homologie observée dans le domaine catalytique des protéines kinases, on ne peut en dire autant de leur partie extracatalytique qui se composent de plusieurs motifs assez variables leur conférant des mécanismes de contrôle différents. Plusieurs de ces domaines, présents dans les protéines de la signalisation cellulaire ont été identifiés et nous ont permis de mieux comprendre la précision, l'amplification et la spécificité des voies de transduction. Ces motifs permettent entre autres, de contrôler par changements de conformation, l'exposition du substrat au domaine catalytique et d'ainsi agir comme régions inhibitrices. De plus, elles peuvent non seulement aider certaines protéines kinases à atteindre leurs cibles plus en amont ou en aval de la cascade mais aussi à les localiser dans des régions subcellulaires particulières nécessaires à leur action. Les domaines modulent l'interaction entre les protéines et déterminent la voie d'un système de transduction de signaux en leur permettant la formation de complexes multiprotéiques. Les domaines d'interaction protéine-protéine les plus connus sont les motifs SH2 et SH3. Ces domaines mesurent entre 50 et 150 acides aminés et sont formés de résidus hautement conservés afin de

reconnaître spécifiquement leurs substrats. Ces motifs protéiques sont impliqués dans plusieurs cascades de signalisation faisant intervenir des protéines kinases, des protéines phosphatases et des protéines adaptateurs qui n'ont pas d'activité enzymatique (voir section sur les protéines adaptateurs, p.27). Les domaines SH3 sont aussi retrouvés dans certaines protéines du cytosquelette où ils peuvent médier un rôle régulateur sur l'architecture et le mouvement de la cellule (Cohen *et al.*, 1995).

Comme nous l'avons vu plus tôt, les récepteurs tyrosine kinases s'autophosphorylent suite à leur dimérisation et cette autophosphorylation est cruciale pour la transmission des signaux aux molécules en aval. Ce sont les protéines qui portent des domaines SH2 qui vont interagir avec ces phosphotyrosines. La spécificité d'interaction de ces domaines SH2 est déterminée par certains résidus situés au pourtour de la tyrosine phosphorylée. La phosphorylation des protéines contenant des domaines SH2 peut aussi contribuer au maintien de différentes voies de signalisation. Comme démontré plus haut dans le cas des JAKs, la phosphorylation des STATs entraîne la dimérisation entre les membres via leur domaine SH2 favorisant la translocation au noyau.

Le motif SH3 reconnaît pour sa part des régions riches en prolines dont la séquence consensus est PXXP. La spécificité de fixation est régulée de façon similaire aux domaines SH2 par les résidus situés de part et d'autre des prolines invariables (Schlessinger, 1994). Il existe aussi des protéines qui possèdent à la fois des domaines SH2 et SH3. Certaines expériences montrent une action coordonnée entre les deux motifs dans l'élaboration d'un mécanisme de signalisation, mais ceci reste à confirmer.

On retrouve les domaines SH2 et SH3 chez la plupart des organismes eucaryotes, à l'exception de la levure qui ne contient aucun domaine SH2. Des travaux sur le séquençage du génome de la levure ont montré qu'elle porte 113 gènes codant des protéines kinases, ce qui correspond à 2% de son génome total (Hunter et Plowman, 1997). Dans ce même

génomique, il y a plusieurs protéines kinases à double spécificité mais aucune vraie tyrosine kinase, suggérant que les récepteurs tyrosine kinases ont évolué en réponse au besoin de la signalisation cellule-cellule chez les organismes multicellulaires. On évalue la présence de 1000 gènes de protéines kinases dans le génome des mammifères (Hunter, 1987) et aujourd'hui seulement environ 450 sont connues. Le modèle de la levure a permis de faire avancer grandement la connaissance des mécanismes cellulaires impliquant les protéines kinases puisque l'organisation de base de la signalisation entre la levure et les organismes multicellulaires est hautement conservée (Madhani et Fink, 1998).

La transmission des signaux

Les signaux externes peuvent être détectés par la cellule soit au niveau de la membrane, soit à l'intérieur de celle-ci. À partir du premier signal, deux mécanismes généraux impliquant la phosphorylation de protéines ont évolué pour permettre une réponse rapide et précise jusqu'au noyau (Karin et Hunter, 1995; Kyriakis et Avruch, 1996a). Le premier mécanisme implique l'activation de facteurs de transcription situés dans le cytoplasme dans un état stable et qui sont transloqués au noyau suite à leur activation. C'est le cas notamment du facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor κ B) (Baeuerle et Baltimore, 1988). Le deuxième mécanisme régule l'activation de protéines kinases, du cytoplasme jusqu'au noyau, où ces dernières peuvent phosphoryler des facteurs de transcription cibles. Tel est le cas de la cAPK (cyclic AMP-dependent protein kinase) (Nigg *et al.*, 1985) et de la cascade des MAPKs (mitogen-activated protein kinase) (Seger *et al.*, 1995). Ce dernier mécanisme fait l'objet de la prochaine section.

La cascade des MAPKs

La catégorie des protéines à double spécificité joue un rôle essentiel dans les voies de signalisation intracellulaire que l'on appelle la cascade des MAPKs. Ce module de signalisation conservé chez les eucaryotes permet le cheminement d'un signal extracellulaire provenant d'un récepteur vers le noyau. De plus, certains membres de cette cascade pourrait agir comme "sensor" afin de détecter les stimuli et ainsi contribuer à réguler les voies de transduction. Habituellement, la cascade de phosphorylation $\text{MAPKKK} \rightarrow \text{MAPKK} \rightarrow \text{MAPK}$ fonctionne comme un module pour permettre à la MAPK, c'est-à-dire au dernier membre de la cascade, de phosphoryler d'autres kinases ou, suivant sa translocation au noyau, des facteurs de transcription (Treisman, 1996) (voir figure 5). Les MAPKs sont activées par phosphorylation de résidus thréonine et tyrosine par les MAPKKs, lesquelles sont activées par phosphorylation en sérine/thréonine par les MAPKKKs. Cette cascade de protéines médiée par les protéines kinases à double spécificité entraîne une spécificité d'activation puisque la plupart des kinases phosphorylent soit en Ser/Thr soit en Tyr. L'utilisation d'une cascade de phosphorylation est intéressante pour la transduction de signaux car elle permet une amplification, une rétroaction, des entrecroisements et des branchements (Hunter, 1995). Ce sont ces caractéristiques qui font qu'il est très difficile d'identifier le rôle et les substrats physiologiques de chacun des membres de la cascade. Cependant, grâce à l'approche moléculaire, plusieurs voies se sont dessinées (Cohen, 1995). On retrouve dans cette cascade, trois voies principales se distinguant par leurs activateurs. Il y a la voie des ERKs qui est principalement activée par des facteurs de croissance ainsi que l'ester de phorbol, contrairement à la voie des JNKs (c-jun N-terminal kinase) et de p38, aussi appelé les SAPKs (stress-activated protein kinase). Ces dernières sont activées soit par des stress cellulaires (choc osmotique, thermique et U.V.) (Dérillard *et al.*, 1994), soit en réponse à des agonistes relâchés ou produits en condition de stress ou d'infection (cytokines inflammatoires et $\text{TNF-}\alpha$) (Kyriakis *et al.*, 1994). Il y a aussi la voie de ERK5

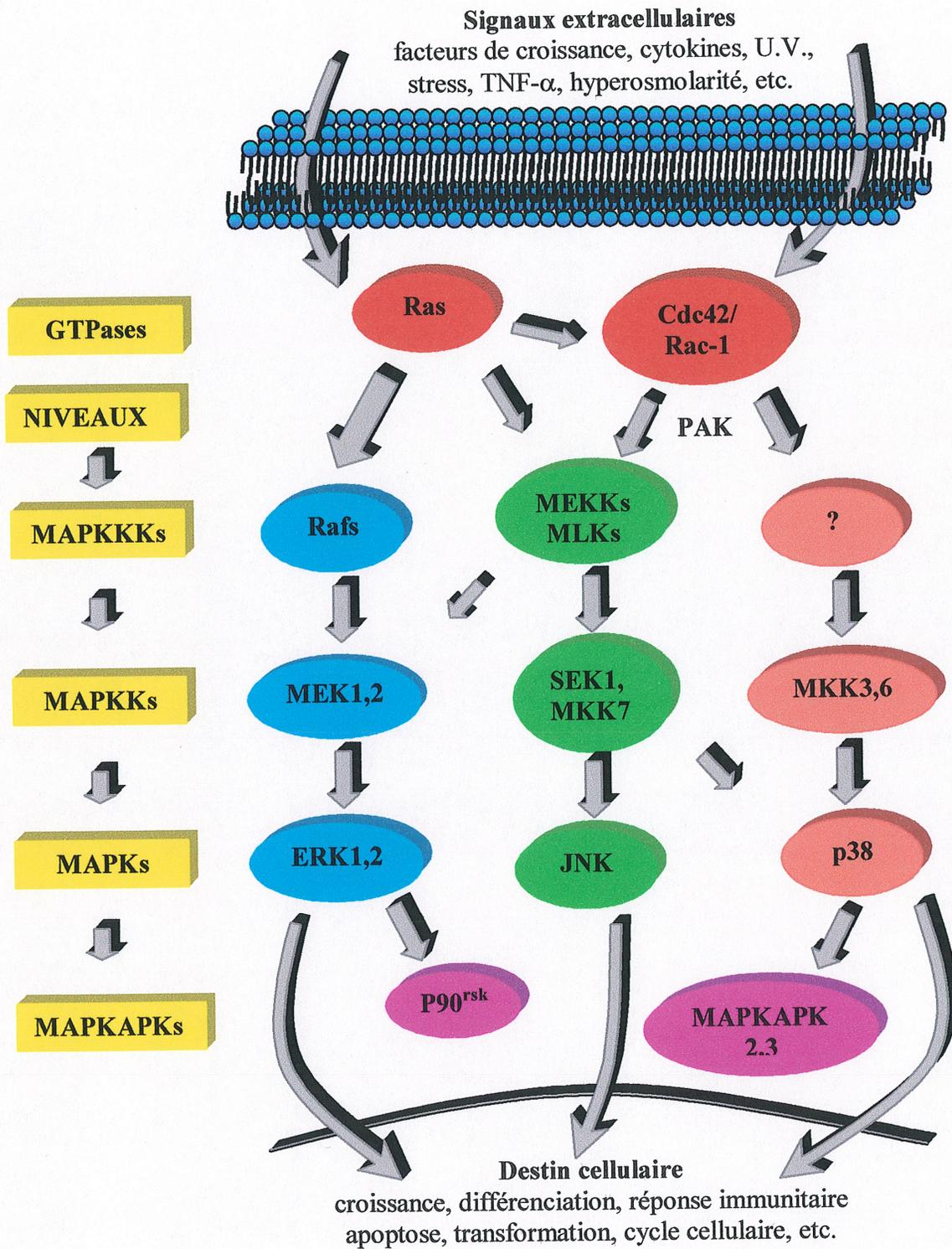


Figure 5. Cascade des MAPKs. La transmission des signaux de la membrane jusqu'au noyau se fait via une cascade de phosphorylation de protéines kinases du niveau MAPKKKs au niveau MAPKs. Cette cascade se divise en trois voies précises.

qui est une voie de signalisation indépendante de celle des ERKs qui peut être activée par un choc osmotique ou oxydatif (Zhou *et al.*, 1995; Abe *et al.*, 1996). D'autres voies existent vraisemblablement chez les mammifères car, 6 voies différentes ont été identifiées et caractérisées chez la levure.

La voie des ERKs

La voie des ERKs est l'une des plus étudiée à cause de sa participation dans la régulation de plusieurs processus cellulaires tels la croissance, la différenciation cellulaire, l'oncogénèse et le cycle cellulaire (Davis, 1993; Crews et Erikson, 1993; Seger et Krebs, 1995). Le mécanisme d'activation résulte de la transmission à partir des récepteurs tyrosine kinases, des récepteurs couplés à des protéines G et des récepteurs à cytokines. Le mécanisme le plus documenté pour l'activation de la voie des ERKs passe par les récepteurs tyrosine kinases via Ras, lequel active par la suite la cascade Raf → MEK (MAPK/ERK kinase) → ERK (voir figure 6). Les premières étapes s'enclenchent suite à l'activation par un ligand, des récepteurs tyrosine kinases. Alors, ceux-ci se dimérisent et leurs domaines kinases cytoplasmiques se phosphorylent mutuellement sur des résidus tyrosines créant des sites d'ancrage pour les protéines contenant des domaines d'interaction SH2 comme SHC et GRB2 (growth factor receptor-binding protein 2). Cette dernière, étant étroitement liée à la protéine SOS, un facteur d'échange GDP/GTP spécifique à Ras qui est normalement cytoplasmique, est par le fait même recrutée à la membrane pour ensuite devenir un acteur important dans l'activation de la voie. En effet, SOS permet d'activer la protéine Ras suite à l'échange du GDP en GTP favorisant alors le recrutement de la protéine Raf au niveau de la membrane plasmique. Il y aura par la suite activation de celle-ci et des autres protéines de la cascade soient MEK et ERKs (Woodgett *et al.*, 1995; Marshall, 1994). Bien que Raf est très bien caractérisée dans la voie des ERKs, il existe d'autres protéines kinases qui sont également capables d'activer MEK, dont Mos et la PKC (protéine kinase C). La phosphorylation

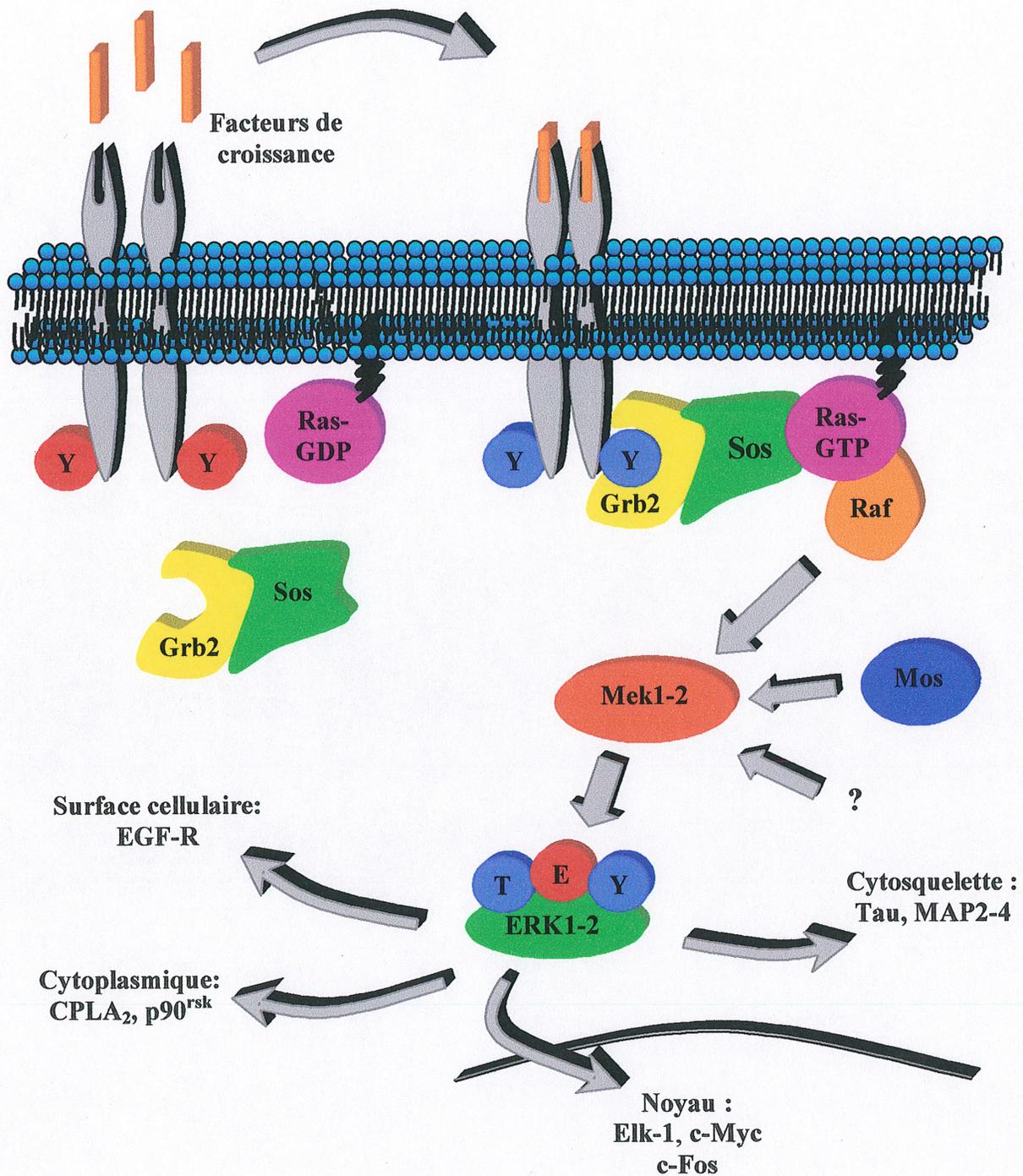


Figure 6. L'activation de la voie des ERKs par les récepteurs tyrosine kinases. Cette activation favorise le recrutement du complexe Grb2-Sos au niveau de la membrane permettant ainsi la conversion de la protéine Ras en une forme active. Cette dernière active à son tour les effecteurs en aval. Tyrosine non-phosphorylée (●) Tyrosine phosphorylée (●)

de ERK par MEK s'effectue au niveau de la séquence Thr-Glu-Tyr. Une fois activé, ERK peut alors phosphoryler des facteurs de transcription après avoir été transloqué au noyau ainsi que d'autres protéines, autant membranaires que cytoplasmiques.

La voie de p38

La voie de p38 a été initialement identifiée par son implication dans la protection contre les variations osmotiques. Elle est impliquée dans la réponse inflammatoire, dans la régulation ou la progression de l'apoptose, ainsi que dans plusieurs autres mécanismes intracellulaires (Fanger *et al.*, 1997; Paul *et al.*, 1997). MKK6 et MKK3 sont les principaux activateurs de p38 sur le motif Thr-Gly-Tyr. Toutefois, les activateurs localisés en amont de ceux-ci ne sont pas très bien connus dans les cellules de mammifères. Il y a certains membres de la famille des MAPKKs impliqués initialement dans l'activation de la voie des JNKs qui montrent une spécificité d'activation pour la voie de p38 (voir figure 7). Nous savons par contre que Cdc42 et Rac sont en amont de la cascade. Aussi, on sait que p38 est capable non seulement de réguler l'activité transcriptionnelle de certains facteurs afin d'augmenter l'activité de type AP-1, mais aussi de phosphoryler la protéine MAPKAP (MAPK-activated kinase) qui est responsable quant à elle de la phosphorylation de la protéine hsp25-27 (heat shock protein 27) (Stokoe *et al.*, 1992).

La voie des JNKs

Une autre voie de la cascade des MAPKs, est celle faisant intervenir les JNKs. Il a été démontré que cette voie pourrait agir avec celle de p38 mais des travaux supplémentaires seront nécessaires pour le confirmer. Le plus important membre, JNK, est codé par 3 gènes (*JNK1*, *JNK2*, *JNK3*), chacun d'eux étant soumis à différents mécanismes d'épissages alternatifs

Signaux extracellulaires
cytokines, U.V., stress, TNF- α ,
hyperosmolarité, etc.

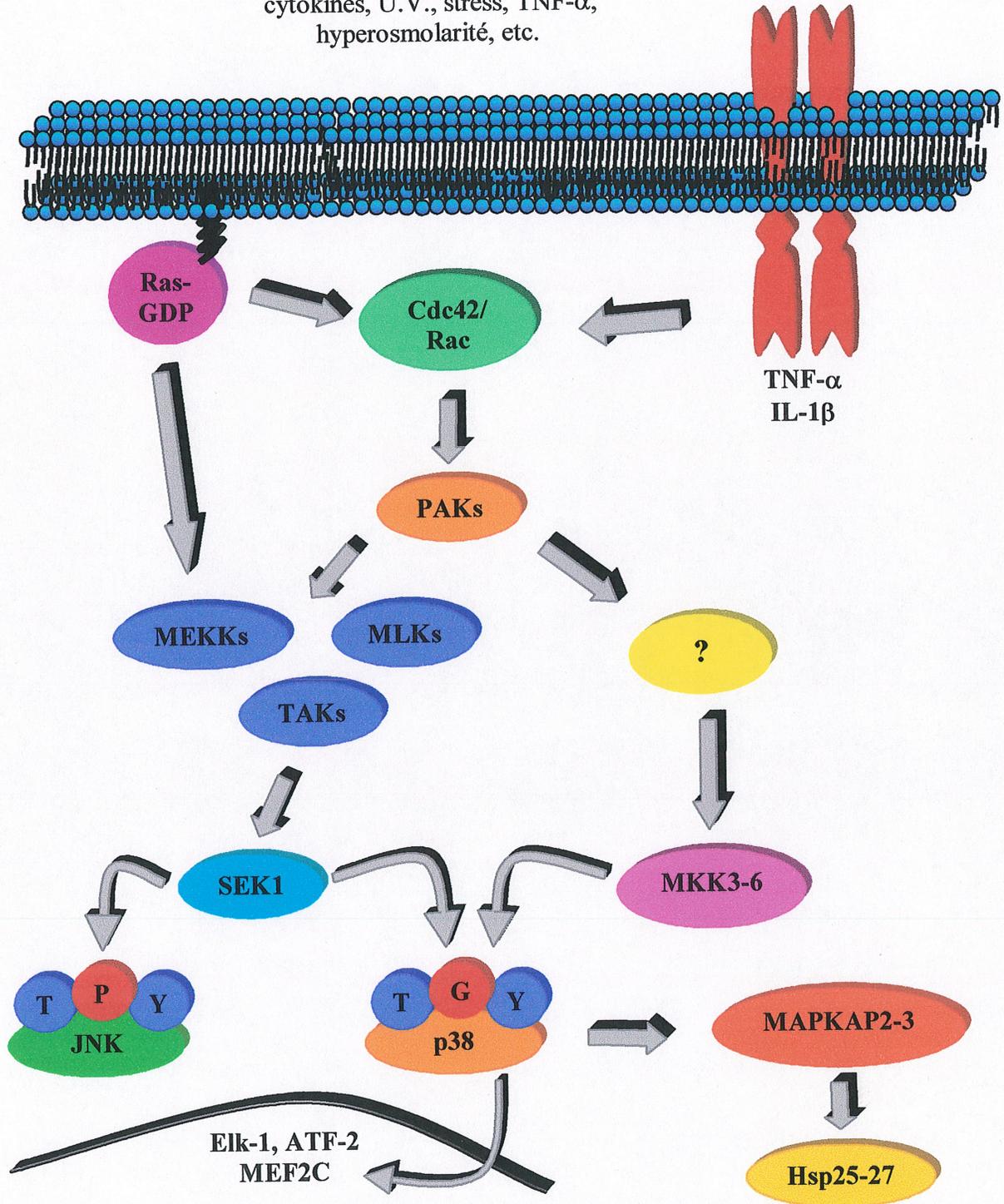


Figure 7. La voie de p38. Cette voie est activé en amont par les protéines Cdc42/Rac. Les protéines MKK3 et MKK6 sont les principaux activateurs de p38 mais il y a aussi SEK1.

dont celui en C-terminal nécessaire à générer des polypeptides de 46 et 54 kDa. Ces gènes ont environ 90 % d'homologie entre eux et 40% avec la famille des ERKs. Les protéines JNK1 et JNK2 sont exprimées ubiquitairement, contrairement à JNK3 qui est sélectivement exprimé dans le cerveau, le coeur et les testicules (Ip et Davis, 1998). L'activation de la voie des JNKs mène à l'inhibition de croissance cellulaire et possiblement au phénomène d'apoptose et de la transformation cellulaire, ceux-ci étant dépendant du type cellulaire (Paul *et al.*, 1997; Dhanasekaran et Reddy, 1998). Les principaux membres en amont de la cascade commencent à être de mieux en mieux connus. Il faut se rappeler le fait que la voie des JNKs est principalement activé par des stress ce qui ne nécessitent pas absolument la présence de récepteurs spécifiques contrairement à la voie des ERKs. Par contre, lorsque la voie est stimulée par les cytokines inflammatoires, se sont les récepteurs à cytokines qui entraînent l'activation. Bien que ces récepteurs, comme le récepteur à TNF α , n'ont pas d'activité tyrosine kinase, l'activation des cibles en aval est médiée par une famille de protéines TRAF-2 qui interagissent avec ce récepteur et qui sont recrutées suivant la trimérisation du récepteur en réponse à la liaison du ligand (Natoli *et al.*, 1997). Par la suite, il y a activation de la voie de JNK (Minden et Karin, 1997). D'un autre côté, la voie des JNKs est en partie régulée en amont par de petites protéines GTPases de la famille de Rho, Rac et Cdc42 qui permettent le couplage des récepteurs au noyau lors de certaines stimulations (voir figure 8). Il a été montré qu'un mutant Rac peut bloquer l'activation de JNK par Ha-Ras, le EGF et la protéine v-Src (Coso *et al.*, 1995; Minden *et al.*, 1995). Il existe plusieurs familles de MAPKKKs de la voie des JNKs qui pourraient coupler ces éléments en amont avec les effecteurs plus en aval, dont la famille des MEKKs (MAPK/ERK kinase kinases). La découverte de plusieurs isoformes dans cette famille a augmenté la complexité de la régulation à ce niveau. Comme par exemple, MEKK1 a été la première protéine identifiée en tant qu'activateur de MEK1 (un membre de la famille des ERKs). Toutefois, il a été déterminé qu'elle avait une plus grande spécificité d'activation pour la voie des JNKs. MEKK1 serait activé par PAK (p21-activated kinase) qui fixe Cdc42 actif, mais aucune évidence que PAK phosphoryle MEKK1 n'a été montrée. Aussi, MEKK1 pourrait interagir avec Ras activé et l'activité de celle-ci serait essentielle pour l'activation de MEKK1

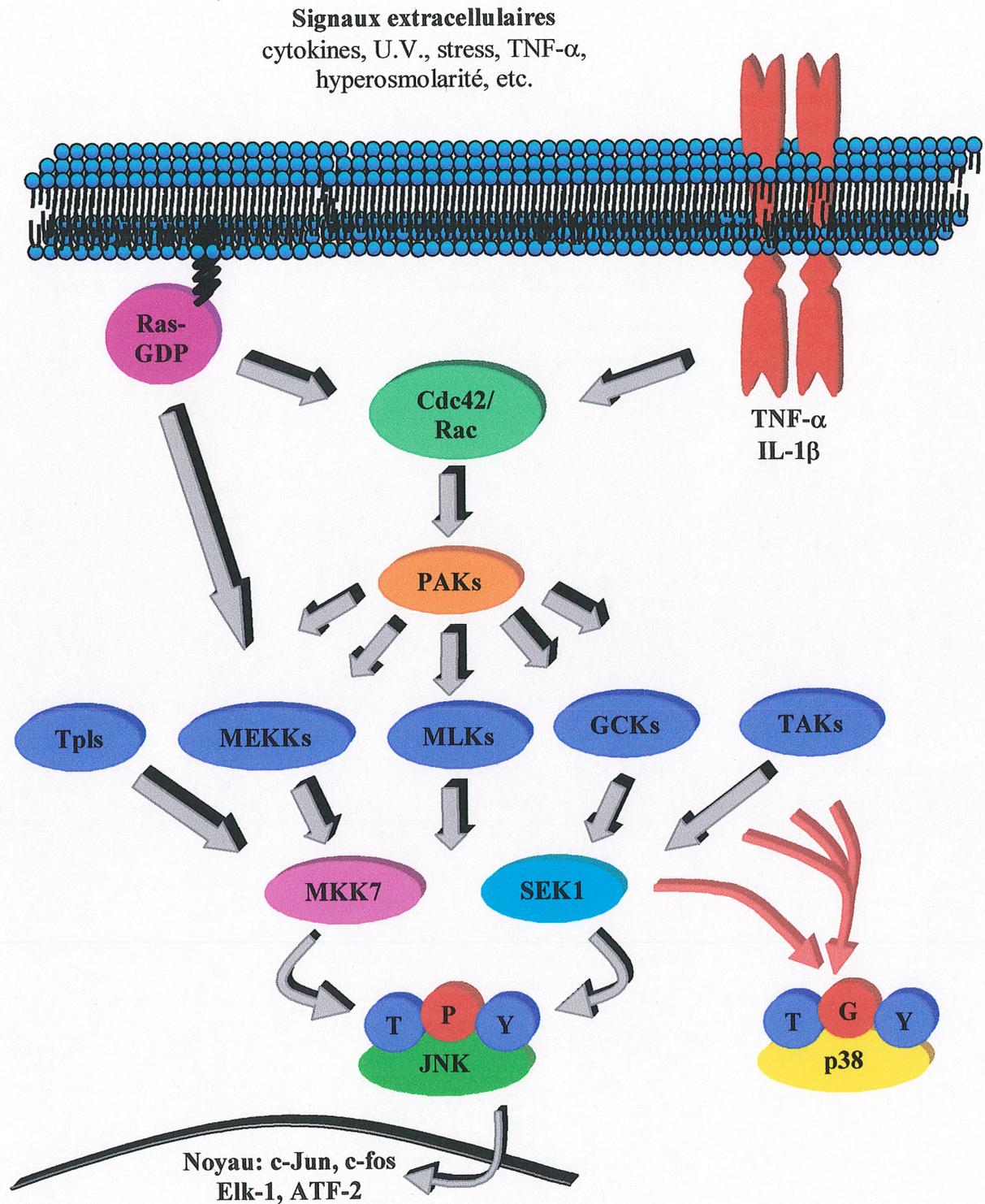


Figure 8. La voie des JNKs. L'activation de cette voie se fait principalement par les protéines Cdc42/Rac. Cette cascade de phosphorylation active par la suite les deux principaux activateurs de JNK, MKK7 et SEK1.

médiée par l'EGF. Ceci permettrait de coupler les récepteurs à la voie des JNKs. Malgré la spécificité de l'activation de JNK par MEKK1, certains autres membres de sa famille pourraient préférentiellement activer d'autres voies. À part les membres des MEKKs, plusieurs autres MAPKKs ont été identifiés comme activateur de la voie des JNKs tels que, la famille des GCKs (germinal center kinase), TAKs (TGF- β -activated protein kinase), Tpls (tumor progression locus) et des MLKs (mixed-lineage kinases). Plusieurs de ces membres pourraient coupler les événements plus en amont avec ceux plus en aval avec l'un des deux principaux activateurs des JNKs soit SEK1 (SAPK/ERK-kinase1) (appelé aussi MKK4) ou MKK7. Lawler (1998) a montré que SEK1 a une préférence de phosphorylation pour le résidu tyrosine, alors que MKK7 phosphoryle spécifiquement le résidu thréonine dans le motif Thr-Pro-Tyr du segment d'activation de JNK. De plus, SEK1 est aussi capable de phosphoryler p38, ce qui montre qu'il pourrait agir aussi comme un coordonnateur des deux voies (Kiefer *et al.*, 1996). Il a été montré que la partie N-terminale de SEK1 joue un rôle majeur dans la détermination de la spécificité car elle interagit directement avec JNK1, p38 α et MEKK1 (Xia *et al.*, 1998). Pour ce qui est de MKK7, celle-ci est activée par les mêmes stimuli que SEK1 mais aussi par IL-1 et le TNF (Tournier *et al.*, 1997). Aussi, il existe d'autres mécanismes qui sont capables de contribuer à l'activation de JNK. Par exemple, l'expression de JIP-1 (JNK interacting protein-1), une protéine cytoplasmique qui interagit avec JNK a montré qu'elle agissait comme une protéine adaptateur dans l'activation de la voie impliquant MKK7 ainsi que deux membres de la famille des MLKs (voir section sur les adaptateurs) (Whitmarsh *et al.*, 1998; Dickens *et al.*, 1997). Des études réalisées *in vitro* ont démontré l'existence de protéines capables d'inactiver JNK, lesquelles sont les sérines/thréonines et les tyrosines phosphatases. Cependant, leur capacité d'inactivation de la voie des JNKs n'a pas encore été démontrée *in vivo* (Neel et Tonks, 1997).

Mécanisme de régulation de la transcription par JNK

On remarque que JNK a une grande spécificité de phosphorylation sur plusieurs facteurs de transcription ce qui permet l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de type AP-1. Un des plus spécifiques, c-jun, est phosphorylé par JNK en sérine 63 et 73 pour ainsi augmenter son activité transcriptionnelle. Aussi, il a été montré que la demi-vie de ce facteur de transcription était assez courte. Par le fait même, l'activation de la voie de JNK et par conséquent la phosphorylation de c-jun, amène l'augmentation de sa demi-vie et ainsi son accumulation dans le noyau où il peut augmenter l'activité transcriptionnelle. Malgré l'activation de plusieurs facteurs de transcription par JNK, celui-ci participe aussi à la répression de certains facteurs de transcription. Un isoforme de la famille des facteurs de transcription NFAT (nuclear factor of activated T cells), NFAT4, est séquestré sous une forme latente au niveau du cytoplasme dans les cellules quiescentes. JNK lie la partie N-terminale de NFAT4 et la phosphoryle au niveau de 2 sites. La délétion de ces sites amène une accumulation constitutive de NFAT4 dans le noyau (Chow *et al.*, 1997).

Les facteurs de transcription contiennent un large éventail de structures de liaison à l'ADN tel que le motif zinc finger qui est impliqué dans la régulation des gènes contrôlés par les MAPKs. La compréhension des mécanismes biochimiques par lesquels la phosphorylation par les MAPKs peut réguler l'activité des facteurs de transcription et l'expression des gènes commence à être connue. Il a en effet été proposé que la phosphorylation affecterait la stabilité, la fixation à l'ADN, l'activation et le pouvoir répresseur des facteurs de transcription (Treisman, 1996).

La transformation oncogénique par JNK: activateur ou supresseur de tumeurs?

Plusieurs évidences montrent l'implication de la voie des JNKs dans la transformation des cellules. Par exemple, plusieurs protéines comme v-Crk et bcr-abl sont des oncogènes

capables d'activer fortement la voie des JNKs et l'expression de mutants dominants négatifs dans cette même voie réprime leur pouvoir oncogénique (Tanaka *et al.*, 1997; Raitano *et al.*, 1995). Ceci appuie fortement l'hypothèse de la participation de la voie des JNKs dans la transformation de certains types cellulaires. D'un autre côté, la perte de l'activation de la voie des JNKs peut aussi mener à la transformation des cellules d'où un rôle de suppresseurs de tumeurs. Sur la base de ces observations, on peut penser que la perte du pouvoir apoptotique de la voie des JNKs pourrait contribuer à amener la survie et par le fait même la transformation des cellules (Ip et Davis, 1998). Il est intrigant d'observer que dans deux lignées cellulaires tumorales dérivées de carcinomes de poumon et de pancréas, SEK1, un des principaux activateurs de JNK, porte une délétion dans la région codante de son gène (Teng *et al.*, 1997). De plus, une mutation a été détectée au sein du gène codant SEK1 dans un groupe de tumeurs du pancréas, du sein, du colon et des testicules et celle-ci entraîne, dans la majorité des cas, la perte de la fonction de la protéine (Teng *et al.*, 1997). Ces données suggèrent donc que SEK1 et possiblement d'autres membres de la voie de JNK, pourraient être considérés comme des suppresseurs de tumeurs. Naturellement, le pouvoir oncogénique possible de JNK autant comme activateur que suppresseur de tumeurs reste à être démontré. Son rôle pourrait vraisemblablement varier en fonction du type cellulaire et de l'environnement dans lequel la cellule se trouve.

Pour ce qui est du rôle de JNK dans l'induction de la mort cellulaire, celui-ci demeure encore obscure malgré le grand nombre de publications dans ce domaine. Ceci tient au fait que JNK est capable d'agir à la fois comme agent pro- et anti-apoptotique. Cela peut dépendre non seulement du type cellulaire mais aussi de l'isoforme de JNK en cause. Il a été démontré qu'un isoforme dominant négatif spécifique est capable d'inhiber l'apoptose induite par les U.V. mais pas un autre (Butterfield *et al.*, 1997). On retrouve par contre certains systèmes qui ont été très bien documentés à propos des voies de signalisation impliquées dans l'induction de l'apoptose comme celui des PC-12. Cette induction, médiée par la privation de NGF (nerve growth factor) dans les cellules PC-12 différenciées, entraîne

simultanément une activation des voies de JNK et de p38 et une inactivation de la voie des ERKs (Xia *et al.*, 1995).

Régulation des voies

La découverte d'une interaction directe entre la forme active du protooncogène Ras et de la protéine kinase Raf-1 constitue le premier exemple que les petites GTPases régulent un large éventail de fonctions cellulaires en interagissant avec des molécules à proximité de la cascade des kinases. L'activation préférentielle des SAPKs par des stress, comparativement à une pauvre activation par les mitogènes, suggèrent fortement que les régulateurs en amont des voies de ERK et SAPK sont séparées (Kyriakis et Avruch, 1996b). L'étude des voies de transduction des signaux est complexe en raison principalement du fait que certaines voies de signalisation sont activées à un temps donné en réponse à une stimulation précise. Il semble que la balance qui existe entre ces voies et l'activation différentielle de chacune détermine une réponse fonctionnelle et par le fait même le destin de la cellule. De plus, la même voie de signalisation peut aussi avoir des fonctions différentes dépendamment du type cellulaire. Un de ces exemples nous vient de l'étude de la fonction de la voie des ERKs. Bien que l'activation de cette voie est reliée à la stimulation mitogénique des fibroblastes, celle-ci peut médier une réponse complètement différentes dans les PC-12. Dans ces cellules, la voie des ERKs est médiée par le NGF, lequel implique l'arrêt de la croissance et la différenciation en cellules neuronales.

D'un autre côté, la voie des JNKs et de p38 semble être activées par les mêmes activateurs mais il existe quelques différences. Entre autres, il y a le délai d'activation de chacun pour un même agoniste. La plupart des études de régulation des différentes voies par les kinases sont effectuées en transfection transitoire; il serait intéressant de voir comment s'effectue cette régulation de façon endogène. Aussi, la découverte de multiples membres de la famille des MAPKs et leur habileté à phosphoryler et à activer *in vitro* plusieurs cibles,

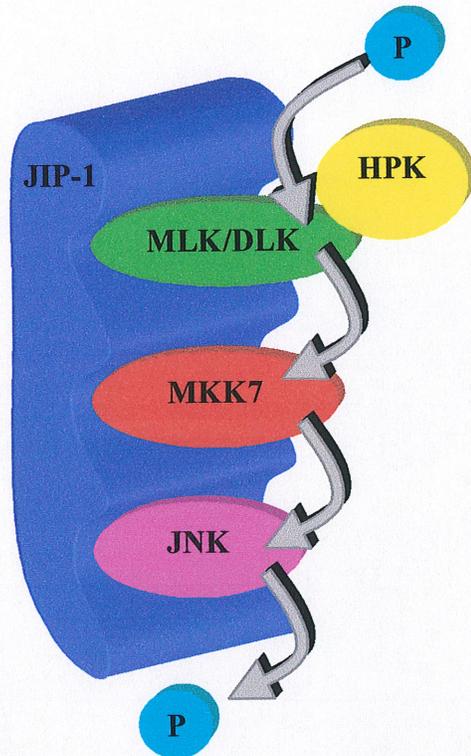
entraîne de nombreux problèmes mécanistiques au niveau de la spécificité dans l'action de la cascade de signalisation intracellulaire.

Les protéines adapteurs

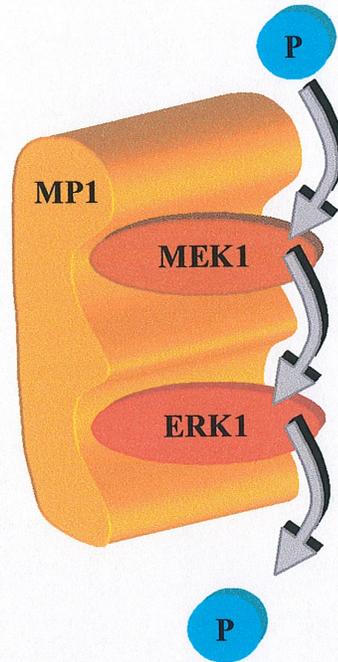
Pour remédier à ce problème, la cellule a évolué de manière à développer plusieurs mécanismes pour ainsi donner une spécificité d'action dans le contrôle de ces voies de signalisation. Comme nous l'avons vu précédemment, les domaines d'interaction SH2 et SH3 peuvent dicter l'activation précise de certaines voies, cependant il existe aussi des protéines qui peuvent compléter leur mécanisme. On les appelle les protéines adapteurs ou d'ancrage. Ces protéines n'ont habituellement pas d'activité catalytique mais contribuent à la spécificité des événements de la transduction des signaux en recrutant les enzymes actives dans les réseaux de signalisation ou en les plaçant près de leurs substrats respectifs (Pawson et Scott, 1997). Les premières découvertes de ces protéines ont été effectuées chez la levure. Par la suite, plusieurs nouvelles protéines ont été identifiées dans les cellules de mammifères et semblent participer à la transmission des signaux des MAPKs.

Ces nouvelles protéines agissent d'une manière spécifique en activant sélectivement certains membres d'une voie particulière de la cascade des MAPKs tout en excluant les membres des autres voies (Elion, 1998) (voir figure 9). Comme mentionné auparavant, JIP-1, est une protéine adaptateur spécifique pour la voie des JNKs. JIP-1 interagit avec MKK7, MLK3, DLK (dual leucine zipper bearing kinase) et HPK1 (hematopoietic progenitor kinase 1). L'étude du mécanisme de JIP-1 montre qu'elle participe à l'augmentation de l'activation de JNK par MKK7 et MLK3 (Whitmarsh *et al.*, 1998). L'implication des autres membres qui interagissent avec JIP-1 dans les mécanismes d'activation n'a pas encore été montrée. Aussi, il y a MP1 (Mek partner 1), une protéine adaptateur spécifique pour la voie des ERKs. Elle permet de lier spécifiquement MEK1 et ERK1 et de promouvoir l'activation de ces membres (Schaeffer *et al.*, 1998). Un autre candidat, MEKK1, pourrait agir comme protéine

A



B



C

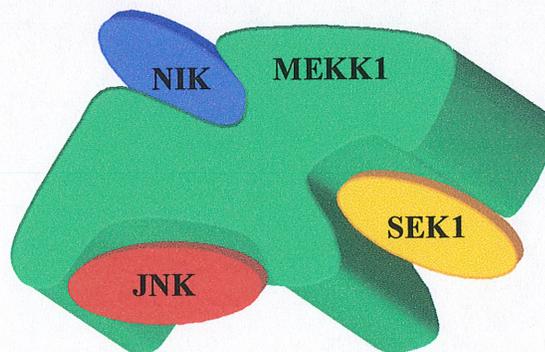


Figure 9. Représentation schématique des complexes multiprotéiques impliquant JIP-1 (A), MP1 (B) et MEKK1 (C). Ces protéines agissent en regroupant plusieurs membres d'une voie spécifique afin de faciliter la transmission d'un signal. Groupement phosphate (●).

adapteur dans la cascade des JNKs. MEKK1 est capable de lier NIK, une protéine de la famille des STE20p qui est capable à son tour de lier une autre protéine adaptateur appelée NCK. Cette dernière, étant la cible de plusieurs récepteurs à facteurs de croissance, pourrait permettre de lier les récepteurs via MEKK1 à la voie des JNKs. De plus, MEKK1 est capable de lier JNK et SEK1 (Whitmarsh et Davis, 1998) (voir figure 9).

Comme on peut le constater, la stimulation d'une cellule cause une translocation de plusieurs protéines kinases dans de nouveaux sites. Cette compartimentalisation résulte en grande partie à la liaison de ces kinases à des protéines spécifiques d'ancrage au niveau de leur site correspondant où ainsi elles peuvent exercer leur fonction physiologique. Cette fonction peut être accomplie par la formation d'un réseau complexe multiprotéique permettant l'activation des voies spécifiques de signalisation (Mochly-Rosen, 1995; Tsunoda *et al.*, 1998).

La famille des MLKs

La famille des MLKs, une sous-classe de MAPKKKs, est constituée de 5 membres : MLK-1, MLK-2/MST (MKN28-derived non-receptor type of sérine/thréonine kinase), MLK-3/SPRK (SH3 domain containing proline-rich kinase)/PTK-1 (protein tyrosine kinase 1), LZK (leucine zipper-bearing kinase) et ZPK (zipper protein kinase)/DLK (dual leucine zipper bearing kinase)/MUK (MAPK-upstream kinase). Les gènes de ces protéines ont tous été clonés par la technique de PCR (polymerase chain reaction) en utilisant des oligonucléotides dégénérescents basés sur des acides aminés hautement conservés dans le domaine catalytique des tyrosines kinases (Wilks, 1989). Ils se différencient des autres groupes de protéines kinases principalement par leurs caractéristiques structurales distinctes. Les 5 membres contiennent un domaine kinase qui ressemble à celui des sérine/thréonine et tyrosine kinases suivi d'un double domaine "leucine/isoleucine zipper". Bien que la fonction de cette dernière structure dans les protéines kinase n'est pas encore très bien connue, son

existence dans les facteurs de transcription est associée à la liaison de l'ADN et à la dimérisation (Landschulz *et al.*, 1998). De plus, ce sont des protéines qui ne possèdent pas de domaine transmembranaire ni de séquence signal. Elles sont aussi assez volumineuses, caractérisées par un poids moléculaire d'environ 100 kDa et elles ont toutes été identifiées en tant que principaux activateurs de la voie des JNKs et de p38 (Fanger *et al.*, 1997) (voir figure 10). On peut diviser cette famille en 2 sous-groupes de protéines. MLK-1, MLK-2/MST et MLK-3/SPRK/PTK-1 forment le premier groupe alors que LZK, ZPK/DLK/MUK forment le deuxième.

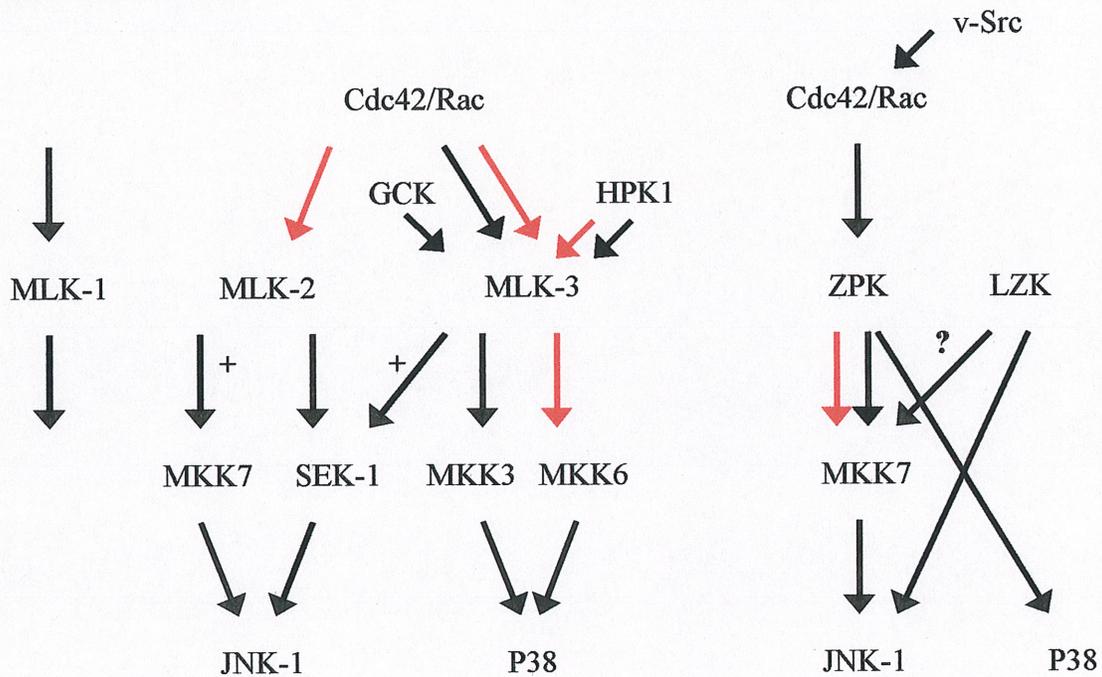


Figure 10. Schéma d'activation de la famille des MLKs. Les flèches rouges indiquent une interaction protéine-protéine tandis que les flèches noires représentent une activation.

Le premier groupe est caractérisé par la similarité de leur domaine kinase et de certaines structures particulières. Par exemple, les trois membres possèdent du côté N-terminal de leur domaine kinase un domaine SH3 (src-homology 3). MLK-2 et MLK-3 possèdent en aval du motif leucine zipper un site de liaison aux protéines Rac1/Cdc42, appelé CRIB (cdc42/Rac interacting binding) (Burbelo *et al.*, 1995). MLK-1 et MLK-2 humain, qui font partie de ce groupe, ont été les premiers membres de la famille des MLKs à être clonés

(Dorow et al., 1993). À ce jour, peu de travaux ont été effectués sur MLK 1 mis à part la localisation de son gène sur le chromosome 14q24.3-31 (Dorow et al., 1993) ainsi qu'une étude sur la régulation de son expression au niveau développemental et fonctionnel dans les cellules- β pancréatiques (DeAizpurua et al., 1997).

Pour ce qui est de MLK-2/MST, deux articles sur son clonage ont été publiés (Dorow et al., 1995; Katoh et al., 1995). Son gène est localisé sur le chromosome 19q13.1-q13.2 et des analyses de "Northern Blot" ont permis de détecter majoritairement l'expression du gène dans plusieurs tissus notamment le cerveau, le muscle squelettique, les testicules et un peu dans le pancréas (Dorow et al., 1995; Katoh et al., 1995). Des études d'activation ont permis de montrer que MLK-2 était capable de phosphoryler spécifiquement *in vitro* SEK-1 en thréonine 223 et d'activer SEK-1 et JNK-1 par cotransfection dans les cellules COS-1 (Hirai et al., 1997). Par contre, d'autres études ont montré que MLK-2 auraient une plus grande spécificité de phosphorylation et d'activation sur la protéine MKK7 que SEK-1 *in vitro* et *in vivo* et que son domaine kinase serait responsable dans la détermination de cette spécificité (Cuenda et Dorow, 1998; Hirai et al., 1998). Par la suite, deux groupes ont tenté de déterminer par différentes méthodes les protéines qui pouvaient interagir avec MLK-2. Le premier a déterminé que la partie N-terminal de MLK-2 interagissait avec la β -tubuline et la prohibitine (Rasmussen et al., 1997; Rasmussen et al., 1998). Par la suite, grâce au système des deux hybrides, le deuxième groupe a découvert que MLK-2 interagissait avec plusieurs protéines : Cdc42, Rac, l'hippocalcine, 14-3-3 ϵ , KIF3A et KAP3 (Nagata et al., 1998). Dans cette même étude, ils ont colocalisé MLK-2 le long des microtubules avec JNK activé.

Le dernier membre de ce groupe, MLK-3, a été cloné par trois groupes (Ezoe et al., 1994; Ing et al., 1994; Gallo et al., 1994) et elle est la protéine dont les mécanismes d'activation sont les plus étudiés. Ces mêmes groupes ont détecté l'expression du gène *MLK-3* dans le coeur, le cerveau, le placenta, les poumons, le foie, le muscle squelettique, les

reins et le pancréas. Le gène *MLK-3* est localisé sur le chromosome 11 q13.1-13.3 (Ezoe *et al.*, 1994; Lassam *et al.*, 1997). Par la suite, des essais d'activation ont permis de conclure que *MLK-3* était capable d'activer JNK par l'intermédiaire de SEK-1 (Rana *et al.*, 1996; Teramoto *et al.*, 1996; Tibbles *et al.*, 1996). Cette activation semblerait s'initier par les protéines Rac/Cdc42 en amont de la cascade des JNKs (Teramoto *et al.*, 1996). De plus, l'activation de JNK par GCK, HPK1 et C3G est inhibée par un mutant de *MLK-3* (Tibbles *et al.*, 1996; Kiefer *et al.*, 1996; Tanaka et Hanafusa, 1998). Plusieurs partenaires protéiques de *MLK-3* ont été découverts. On sait que *MLK-3* est capable d'interagir avec Rac et Cdc42 (Teramoto *et al.*, 1996; Nagata *et al.*, 1998), KIF3A et KAP3 (Nagata *et al.*, 1998), SEK-1 et MKK6 (Tibbles *et al.*, 1996), HPK1 (Kiefer *et al.*, 1996) et ZPK (Tanaka et Hanafusa, 1998). De plus, JIP-1 qui est une protéine adaptateur, semble être le plus important partenaire de *MLK-3* de part sa sélectivité d'activation de JNK avec MKK7, un partenaire intermédiaire et essentiel (Whitmarsh *et al.*, 1998) (voir figure 9). De récents travaux sur la fonction du "leucine zipper" de *MLK-3* ont permis d'affirmer que cette structure était essentielle à la dimérisation de la protéine et par le fait même à l'activation de la voie des JNKs (Leung et Lassam, 1998). D'autres travaux sur l'activation de la voie des JNKs/SAPKs dans les lymphocytes T montrent une participation de *MLK-3* dans l'induction de l'activateur de l'interleukine-2 via son élément DSE (dyad symmetry element) (Hoffmeyer *et al.*, 1998).

Le deuxième groupe de la famille des MLKs, formés de LZK et ZPK/DLK/MUK est principalement caractérisé par des homologies de séquence. Le premier membre LZK est une protéine récemment clonée et dont l'expression du gène est retrouvée dans le pancréas mais aussi dans le cerveau, le foie et le placenta (Sakuma *et al.*, 1997). Ce même groupe a aussi déterminé que LZK se retrouve majoritairement associée aux membranes et qu'elle est capable d'augmenter la phosphorylation de c-jun et d'activer JNK endogène.

Le second membre de ce sous-groupe, ZPK/DLK/MUK, est celui sur lequel notre laboratoire s'intéresse particulièrement. Son gène a été cloné par différents groupes et ce à

partir de plusieurs espèces. Il a été cloné chez l'humain (Reddy et Pleasure, 1994;), la souris (Holzman *et al.*, 1994) (Beaudoin *et al.*, 1994) et le rat (Hirai *et al.*, 1996). ZPK possède, comme mentionné auparavant, les structures particulières de la famille des MLKs. Une représentation de la séquence primaire est représentée à la figure 11. Les gènes ZPK murin et humain sont situés respectivement sur le chromosome 15 (Watanabe *et al.*, 1997) et 12q13 (Reddy *et al.*, 1995) et ont 95% d'homologie entre eux. Ils sont exprimés dans plusieurs tissus dont les reins, les intestins, le pancréas, les ovaires, les testicules, mais leur site préférentiel d'expression est le cerveau (Reddy *et al.*, 1994; Holzman *et al.*, 1994; Blouin *et al.*, 1996). Des études plus approfondies ont permis de constater que l'expression de ZPK était régulée de façon temporelle et spatiale au cours du développement embryonnaire (Nadeau *et al.*, 1997). Elle est également exprimée préférentiellement dans les tissus différenciés (Blouin *et al.*, 1996). Du point de vue fonctionnelle, ZPK active JNK et p38 par cotransfection dans plusieurs lignées cellulaires (Hirai *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 1996). L'activation de JNK par ZPK serait médiée par l'activateur MKK7 (Merrit *et al.*, 1999). On a remarqué que l'expression de ZPK, catalytiquement inactif, pourrait empêcher l'activation de JNK par v-Src, Cdc42/Rac1 (Fan *et al.*, 1996) et C3G (Tanaka et Hanafusa, 1998). Cette dernière activation par C3G semble se faire séquentiellement via MLK-3 et ZPK et implique une interaction entre ces deux mêmes protéines (Tanaka et Hanafusa, 1998). Pour ce qui est de l'interaction entre ZPK et JIP-1 (protéine adaptateur), aucun mécanisme d'activation de JNK par ZPK n'a été montré (Whitmarsh *et al.*, 1998).



Figure 11: Représentation schématique de la séquence primaire de ZPK. GP représente un domaine riche en glycine-proline et GSP un domaine riche en glycine-sérine-proline. Le domaine leucine-zipper comporte deux motifs séparés par une séquence de 25 acides aminés. Le domaine catalytique est composé de diverses caractéristiques propres aux sérine/thréonine kinases et aux tyrosine kinases.

Notre laboratoire a localisé ZPK au niveau de l'appareil de Golgi (Douziech *et al.*, 1999). Cette étude de localisation permettra certainement d'apporter une fonction et un mécanisme d'action particulier à ZPK. Il a été montré que dans le système nerveux, la dépolarisation de la membrane amenait une déphosphorylation de ZPK (Mata *et al.*, 1996). Dans cette même étude, ils ont démontré que ZPK se retrouvait associé aux membranes sous un état dimérique et non-phosphorylé alors que dans le cytoplasme elle était monomérique à la fois sous l'état phosphorylé et non-phosphorylé. Il serait donc possible de penser à un mécanisme d'action impliquant une activation via une relocalisation des membranes au cytoplasme. À part son implication dans la dépolarisation de la membrane, ZPK serait impliquée dans la régénération des os (Matsui *et al.*, 1996), du foie (Douziech *et al.*, 1998) ainsi que dans la régulation de la croissance (Bergeron *et al.*, 1997) et la différenciation cellulaire (Daigle, 1998).

Description du projet de maîtrise

Les premières études d'activation effectuées sur ZPK ont été réalisées dans des cellules transfectées de façon transitoire. Celles-ci ont montré son implication dans la voie de transduction de JNK. En tenant compte du fait que cette voie est principalement activée par des stress, nous avons ainsi émis l'hypothèse de travail suivante: la protéine kinase ZPK est activée en réponse à des stimulations extracellulaires, lesquelles favorisent également l'activation de la voie de JNK. Les deux objectifs principaux de mon travail de maîtrise ont été d'identifier les activateurs potentiels de ZPK et de déterminer la relation entre sa localisation et sa capacité à activer la voie de JNK. Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons utilisé plusieurs méthodes dont l'essai kinase *in vitro* qui nous a permis de mesurer les modulations de l'activité de ZPK.

Les études sur l'activation de ZPK ont toutes été effectuées dans un système de cellules cultivées *in vitro*. Au départ, nous avons tenté de mesurer l'activité de ZPK endogène puisque nous possédions tous les outils nécessaires à cette étude. Nous avons un anticorps polyclonal contre ZPK et une lignée cellulaire (NIH 3T3) qui exprimait assez fortement la protéine. Par la suite, l'étude s'est orientée vers la mesure de l'activité de la forme transfectée de ZPK dans les lignées cellulaires COS-1 ou HEK 293. Une seconde méthode, plus indirecte, appelée la technique du "pull-down" a également été utilisée afin d'analyser l'implication de ZPK dans l'activation de la protéine JNK endogène suite à des stimulations. Cette méthode a nécessité la production d'une protéine de fusion c-jun complexée à la glutathione S-transférase.

Finalement, j'ai aussi participé à la caractérisation du rôle de ZPK au niveau de l'appareil de Golgi. Mon travail a principalement consisté à montrer qu'une perturbation de la localisation de ZPK pouvait affecter l'activation de la voie des JNKs en réponse aux stimuli extracellulaires.

CHAPITRE 1

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1 Lignées cellulaires et conditions de culture

Toutes les lignées cellulaires, c'est-à-dire les NIH 3T3 (fibroblastes de souris), COS-1 (cellules épithéliales de singe) et HEK 293 (cellules épithéliales humaine) ont été cultivées dans du milieu "Dulbecco's Modified Eagle's Medium" (DMEM) (GIBCO BRL, États-Unis) complémenté de 8 à 10 % de "Fetal Bovine Serum" (FBS) (GIBCO BRL, États-Unis). De plus, des antibiotiques tels que la pénicilline (10 U/ml), la streptomycine (10 µg/ml) et l'amphotéricine B (GIBCO BRL, États-Unis) ont été ajoutés au milieu de culture. Les cellules ont été cultivées sous une atmosphère de 5 % de CO₂ dans une chambre humidifiée.

1.2 Transfection des cellules

Les expériences de transfection ont été effectuées de façon transitoire dans des pétris de 60 mm par la méthode à la Lipofectamine (GIBCO BRL, États-Unis) selon le protocole recommandé par le manufacturier. En général, environ 500 000 cellules ont étéensemencées la veille du début de la transfection. Le jour même de la transfection, il fallait préalablement incuber l'ADN avec la Lipofectamine avant de mettre cette préparation en contact avec les cellules. Pour ce faire, 5 µg d'ADN de pcDNA3-ZPK-HA ou de pMT₂-JNK-HA (selon l'expérience) dilué dans 300 µl de DMEM contenant 0.5 % FBS ont été ajoutés à 15 µl de Lipofectamine également diluée dans 300 µl de DMEM contenant 0.5 % FBS. Le mélange a

alors été incubé pour une période d'environ 20 minutes avant d'être complété avec 2 ml de DMEM 0.5 % FBS et d'être ajouté aux cellules préalablement rincées avec ce même milieu. Après 6 heures d'incubation, les cellules ont été rincées et incubées avec du DMEM 10 % FBS pendant 42 heures avant de faire les extraits cellulaires. Pour les expériences d'essais kinase, certains pétris ont été préalablement incubés dans du DMEM 0.5 % FBS environ 16 heures avant l'extraction.

1.3 Stimulation des cellules

Les études d'activation ont été effectuées soit sur des cellules non-transfectées, soit transfectées. Celles-ci ont été soumises à différents traitements afin de mesurer leur effet sur l'activité de ZPK. Ces traitements duraient 30 minutes et comportaient, entre autres, le sérum (FBS : 20 %), l'anisomycine (10 µg/ml) (Sigma, Canada), l'éthanol (0.1%), le choc thermique (42 °C), le choc osmotique (NaCl : 0.7 M). Après ces stimulations, les cellules ont été immédiatement placées sur la glace, rincées deux fois avec du PBS froid (1 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl et 2.7 mM KCl, (pH 7.4)) et lysées avec le tampon adéquat pour l'expérience en cours. Pour ce qui est des traitements aux U.V., les cellules ont été soumises à une dose de 40 J/m² avec un appareil Stratalinker (Sratagene, Canada) suivi d'une incubation de 30 minutes à 37 °C. En ce qui a trait à l'étude réalisée avec la brefeldine A (BFA) (Sigma, Canada), les cellules ont été traitées 30 minutes soit avec 2 µg/ml de BFA, soit avec un volume équivalent d'éthanol avant d'être soumises au choc thermique.

1.4. Extraits cellulaires et immunoprécipitations

1.4.1 Pour la forme endogène de ZPK

Les cellules NIH 3T3 ont été utilisées afin d'analyser la présence et l'activité de ZPK endogène. À confluence, ces cellules ont été lysées dans 1 ml de PBS contenant 1 % Triton X-100 et des inhibiteurs de protéases (1 µg/ml aprotinine, 1 µg/ml leupeptine et 1 mM phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF)). Les cellules ont été par la suite passées à travers une aiguille de calibre 23 3-4 fois avant d'être incubées à 4 °C pendant 30 minutes sous agitation. Par la suite, les extraits ont été centrifugés à 13000 rpm pendant 15 minutes dans une microfuge et les surnageant ont été dosés selon la méthode en microplaque avec le "Bio-Rad protein assay" (Bio-Rad Laboratories, États-unis). Les extraits ont alors été déposés sur gel SDS-PAGE (20 à 60 µg), ou utilisés pour une immunoprécipitation (voir plus loin).

Les extraits cellulaires qui ont été fractionnés, c'est-à-dire où la fraction membranaire a été séparé de la fraction cytoplasmique, ont été lysées dans 1 ml de PBS contenant 5 mM EDTA et des inhibiteurs de protéases (1 µg/ml aprotinine, 1 µg/ml leupeptine et 1 mM PMSF). Les cellules ont été par la suite homogénéisées dans un homogénéisateur de type B (environ 40 coups) puis ultracentrifugées à 100 000 g (30 000 rpm) pendant une heure à 4 °C à l'aide une ultracentrifugeuse de type Beckman (Canada) et du rotor SW 50.1. Le surnageant a été gardé comme fraction cytoplasmique tandis que le culot comme fraction membranaire. Afin d'extraire les protéines associées aux membranes du culot, celles-ci ont été resuspendues dans le même tampon PBS-EDTA avec des inhibiteurs de protéases contenant cette fois-ci 1 % Triton. L'extrait a été incubé 30 minutes à 4 °C avec agitation puis ultracentrifugé à 100 000 g à nouveau. Le surnageant a été utilisé comme fraction

membranaire. Les deux fractions (cytoplasmique et membranaire) ont alors été dosés et chargés sur gel SDS-PAGE de 7 %.

Pour faire l'immunoprécipitation de ZPK, environ 0.5 à 1.5 mg de protéines totales de chaque extrait a été utilisé et complété à des volumes égaux. L'anticorps anti-ZPK (anti-zaza) (Daigle, 1998) a été ajouté (1.5 μ l) à chaque tube puis incubé pendant 1 heure à 4 °C avec agitation suivi par l'ajout de 50 μ l de protéine-A agarose (Boehringer Mannheim, Canada) et d'une incubation supplémentaire de deux heures sous les mêmes conditions. Le complexe immunoprécipité a ensuite été lavée deux fois avec le tampon de lyse (PBS+Triton X-100) et deux fois avec du PBS contenant des inhibiteurs de protéases. Le culot a finalement été resuspendu dans du tampon d'échantillon 2X (2 % (w/v) SDS, 1.4 M β -mercaptoéthanol, 100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20 % (v/v) glycérol, 0.01 % (v/v) bromophénol bleu), chauffé 5 minutes à 95 °C et chargé sur un gel SDS-PAGE de 7 %.

1.4.2 Pour la forme transfectée de ZPK

Les cellules utilisées pour l'étude de transfection sont soit les COS-1, soit les HEK 293. Les extraits et les immunoprécipitations ont été effectués de façon similaire à ceux réalisés lors de l'étude sur ZPK endogène. Les cellules ont été lysées dans un tampon (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 0.5 % sodium déoxycholate) contenant des inhibiteurs de protéases (1 μ g/ml aprotinine, 1 μ g/ml leupeptine et 1 mM PMSF) et de phosphatases (0.2 mM sodium orthovanadate, 1 mM NaF, 1 mM sodium pyrophosphate).

L'immunoprécipitation a été effectuée avec l'anti-HA (2 µg/tube) (Boehringer Mannheim, Canada). Pour les lavages, le complexe immunoprécipité a été lavé deux fois dans un tampon à haute concentration en sel (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.1 % Nonidet P-40, 0.05 % sodium déoxycholate) et deux fois dans un tampon à faible concentration en sel (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 % Nonidet P-40, 0.05 % sodium déoxycholate).

1.5 Gel de protéines, transfert sur membrane et immunobuvardage

La préparation des gels de protéines (SDS-PAGE) est basée sur la méthode de Laemmli (1970). La migration a été effectuée à 150 Volts jusqu'à l'obtention d'une séparation adéquate basée sur la visualisation des marqueurs de poids moléculaires (Amersham, Canada). Après la migration des extraits cellulaires ou des complexes immunoprécipités, le gel a été transféré sur une membrane de polyvinyl-difluoride (PVDF) (Boehringer Mannheim, Canada) avec un appareil spécialisé de type semi-sec appelé "semi-phor" (Hoefler Scientific Instrument, États-unis) selon la méthode recommandée par le manufacturier. La membrane nécessaire au transfert devait préalablement être incubée pendant 5 secondes dans du méthanol 100 %, 5 minutes dans de l'eau distillée et finalement de 10 à 15 minutes dans du tampon de transfert TB (5.81 g Tris Base, 2.93 g Glycine, 0.375g SDS et 200 ml de méthanol pour 1 L de Tampon). Le gel a également été incubé dans le tampon TB de 10–15 minutes afin de s'équilibrer avec celui-ci. Le transfert a été effectué pendant 50 à 55 minutes à 0.8 mA/cm². Par la suite, la membrane a été incubée toute la nuit à 4 °C dans le tampon TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween-20) contenant 5 % de lait en poudre (Carnation, Canada).

La technique d'immunobuvardage ("Western Blot") a été effectuée selon le protocole inclus dans la trousse de chemiluminescence ECL+ (Amersham, Canada). La membrane a été incubé avec le premier anticorps pendant 1 heure. Les anticorps utilisés selon l'expérience étaient l'anti-ZPK (1:2000), l'anti-JNK (1:1000) (New England BioLab, États-Unis) et l'anti-HA (0.2 µg/ml) (Boehringer Mannheim, Canada). Le deuxième anticorps (anti-lapin pour ZPK et JNK et anti-souris pour HA) (Amersham, Canada) a été incubé pendant une heure à une dilution de 1:10 000. La révélation a été effectuée grâce au deuxième anticorps couplé à une peroxydase qui a permis la détection de signaux par autoradiographie.

1.6 Essais kinase

1.6.1 Pour la forme endogène de ZPK

Après la stimulation, les cellules NIH 3T3 ont été lysées et la protéine ZPK endogène a été immunoprécipitée selon les méthodes décrites à la section 1.4.1. Deux lavages supplémentaires du complexe immunoprécipité avec le tampon kinase (25 mM HEPES, pH 7.2, 10 % glycérol, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 0.1 mM Na₃VO₄) contenant des inhibiteurs de protéases (1 µg/ml aprotinine, 1 µg/ml leupeptine et 1 mM PMSF) ont dû être réalisés avant d'amorcer la réaction. Chaque échantillon a été resuspendu dans 50 µl du tampon kinase auquel 60 µM d'ATP froid (Pharmacia Biotech, Canada), 10 µCi [γ-³²P] ATP (Amersham, Canada) et 5 µg de "myelin basic protein" (MBP) (GIBCO BRL, États-Unis) ont été ajoutés. Le tout a été incubé à 30 °C pendant 20 minutes et la réaction a été arrêtée suivant l'ajout de 10 µl de tampon d'échantillon 6X (0.35 M Tris-HCl, pH 6.8, 10.28 % (w/v) SDS, 36 % (v/v) glycérol, 5 % β-mercaptoéthanol, 0.012 % (w/v) bromophénol bleu). Les échantillons ont par la suite été chauffés à 95 °C pendant 5 minutes et chargés sur un gel

SDS-PAGE de 7 %. La visualisation des protéines phosphorylées (MBP : 20 kDa) a été effectuée par autoradiographie du gel préalablement séché.

1.6.2 Pour la forme transfectée de ZPK

Après la stimulation, les cellules COS-1 ou HEK 293 ont été lysées et la protéine ZPK transfectée a été immunoprécipitée selon les méthodes décrite à la section 1.4.2. Deux lavages supplémentaires du complexe immunoprécipité avec le tampon kinase (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.1 mM sodium orthovanadate, 1 µg/ml aprotinine, 1 µg/ml leupeptine et 1 mM PMSF) ont dû être réalisés avant d'amorcer la réaction. Par la suite, chaque échantillon a été resuspendu dans 40 µl de ce tampon contenant 15 µM ATP froid et 10 µCi [γ -³²P] ATP. Aucun substrat n'a été ajouté lors des études d'autophosphorylation. Pour ce qui est des autres expériences, les substrats utilisés étaient, entre autres, 5 µg de MBP, 4 µg de caséine (Sigma, Canada) ou 1 µg de protéine de fusion GST-SEK1 (Upstate Biotechnology, États-Unis). Le tout a été incubé à 30°C pendant 20 minutes et la réaction a été arrêtée suivant l'ajout de 10 µl de tampon d'échantillon 6X. Les échantillons ont par la suite été chauffés à 95 °C pendant 5 minutes et chargés sur un gel SDS-PAGE de 7 %. La visualisation des protéines phosphorylées a été effectuée par autoradiographie du gel préalablement séché.

1.7 Production de la protéine c-jun

1.7.1 Transformation du vecteur pGEX-c-jun

Afin de produire la protéine de fusion c-jun, il a fallu transformer la construction pGEX-c-jun (un don du laboratoire du Dre Nathalie Rivard) dans une souche d'*Escherichia coli*, nommée BL21 (Pharmacia Biotech, Canada). Le génotype de cette souche bactérienne est: F⁻ ompT gal [dcm] [lon] hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻; an E. coli B strain) avec DE3, un prophage λ portant le gène de la T7 RNA polymérase.

L'expression du vecteur pGEX dans cette souche spécifique a permis la production d'une protéine fusionnée à la glutathione S-transférase suivant l'induction à l'isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) (Pharmacia Biotech, Canada). La transformation a été effectuée à l'aide de bactéries compétentes BL21, lesquelles ont été produites selon le protocole établi par la compagnie Pharmacia Biotech. Ceci s'effectue en mélangeant environ 10 ng du vecteur pGEX-c-jun avec 50 µl de bactéries compétentes BL21, le tout a été incubé 30 minutes sur la glace. L'échantillon subit par la suite un choc thermique à 42 °C pendant 90 secondes. Après avoir remis le tube 2 minutes sur la glace, 500 µl de milieu de culture LB (Luria-Bertani) (10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 10 g/L NaCl, (pH 7)) contenant de l'ampicilline (USB, États-Unis) à une concentration de 100 µg/ml préalablement tempéré à 37 °C a été ajouté et celui-ci a été incubé à 37 °C pendant 1 heure avec agitation. Finalement, environ 200 µl de ces bactéries transformées ont été étalées sur pétris d'agar LB (10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 10 g/L NaCl, 15 g/L d'agar, (pH 7)) contenant encore de l'ampicilline à la même concentration qu'auparavant et incubées 15-16 heures à 37 °C (Maniatis, 1982).

1.7.2 Détermination du meilleur clone pGEX-c-jun recombinant

Afin de produire la plus grande quantité de protéines de fusion, il a fallu déterminer le clone qui la produisait efficacement. Il a suffi de repiquer quelques colonies de la souche BL21 transformées avec le vecteur pGEX-c-jun dans 2 ml de milieu LB avec de l'ampicilline pendant 15-16 heures et d'analyser leur niveau d'expression respectif. C'est-à-dire à partir de ces sous-cultures, 150 µl a été prélevé et incubé avec 3 ml de milieu LB jusqu'à une densité optique de 0.6-0.8 unités à 600 nm. Lorsque cette valeur a été atteinte, chaque tube a été divisé en deux afin d'obtenir un tube contrôle et un tube induit à l'IPTG (0.1 mM). Après une incubation de 3 heures, 50 µl a ensuite été prélevé pour tester la meilleure induction. Ceci a été effectué en centrifugeant les bactéries à 5000 rpm à 4 °C pendant 15 minutes. Le surnageant a été retiré et 40 µl de tampon d'échantillon a été utilisé pour resuspendre le culot, lequel a été chauffé à 95 °C pendant 5 minutes. Finalement, les échantillons ont été chargés sur gel SDS-PAGE de 12 % puis colorer au "GELCODE Blue Stain Reagent" (BioLynx, Canada) selon la méthode décrite par le manufacturier. L'analyse du gel a permis de déterminer le clone producteur de la plus grande quantité de protéine c-jun (environ 32 kDa).

1.7.3 Production et purification de la protéine de fusion GST-c-jun

Une culture de 25 ml du meilleur clone producteur a été utilisée pour ensemercer 225 ml de milieu (LB) supplémenté d'ampicilline. L'incubation a été poursuivie à 37 °C jusqu'à une densité optique se situant entre 1 et 2 unités à 600 nm après quoi 0.1 mM d'IPTG a été ajouté à la suspension de façon à permettre l'induction de l'expression pendant 3.5 heures. À la fin de la période de culture, les bactéries ont été centrifugées à 5000 rpm pendant 15 minutes à 4°C et le culot a été resuspendu dans 10 ml de PBS contenant 10 mM EDTA et des inhibiteurs de protéases (1 µg/ml aprotinine, 1 µg/ml leupeptine et 1 mM PMSF).

Par la suite, la suspension de bactéries a subi un traitement aux ultrasons avec un "High Intensity Ultrasonic Processor" (Fisher, États-Unis) pendant 3 minutes avec une alternance de 10 secondes sur glace et 10 secondes de sonication. Après trois étapes de congélation-décongélation rapide dans la glace sèche, la suspension a été traitée à la DNase 1 (225 à 300 U) (Pharmacia Biotech, Canada) pendant 20 minutes à 37°C. Suite à la digestion, du Triton X-100 à une concentration finale de 1 % a été ajouté et incubé à 4 °C avec agitation pendant 30 minutes. La suspension a été ensuite centrifugée à une vitesse de 15000 rpm pendant 15 minutes avant d'être chargée sur une colonne de Gluthathione Sepharose 4B (2 ml de matrice) (Pharmacia Biotech, Canada) préalablement équilibrée avec le tampon de lyse. Cette préparation a ensuite été incubée pendant 30 minutes avec agitation à 25 °C afin d'assurer la fixation optimale de la protéine de fusion à la matrice. Celle-ci a par la suite été lavée avec le tampon PBS contenant 1 % Triton (150 ml) jusqu'à l'obtention dans le "flow through" d'une densité optique de 0 unité à 280 nm. L'élution de la protéine de fusion c-jun a été effectuée avec 5 ml de 100 mM HEPES (pH 7) contenant 50 mM de glutathione réduite (Pharmacia Biotech, Canada). Des fractions de 1 ml ont été récoltées puis dosées par la méthode en microplaque avec le "Bio-Rad protein assay" (BioRad Laboratories, Canada). Les fractions contenant la protéine d'intérêt ont été combinées et dialysées durant 15-16 heures à 4 °C dans 2 litres de tampon Tris 10 mM, pH 7.5 contenant 10 % de glycérol. Le lendemain, cette dialyse s'est poursuivie pour une période additionnelle de 5 heures dans du tampon frais.

1.8 Technique du "pull-down" à l'aide de la protéine de fusion GST-c-jun

Afin de réaliser la technique du "pull-down", la protéine GST-c-jun (430 µg) a dû être fixée préalablement aux billes de glutathione sépharose (1 ml) durant 1 heure à la température de la pièce. Plusieurs lavages au PBS ont été par la suite effectués dans le but de se débarrasser du c-jun non lié avant de resuspendre cette préparation dans 1 ml de PBS. Dès

lors, la protéine fixée a pu être utilisée pour réaliser la technique du "pull-down". Cette dernière permettait de purifier JNK endogène à partir d'un extrait cellulaire total grâce à son affinité pour c-jun, lequel constitue l'un de ses substrats spécifiques.

La technique du "pull-down" a été réalisée au moyen de cellules NIH 3T3 transfectées ou non avec ZPK (section 1.2), lesquelles ayant été extraites selon la méthode décrite à la section 1.4.1. Le tampon de lyse nécessaire à la réalisation de cette technique (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 % glycérol, 1 % Triton-X-100) contenait des inhibiteurs de protéases (5 µg/ml leupeptine, 5 µg/ml d'aprotinine et 1mM PMSF) et de phosphatases (40 mM β-glycérophosphate, 50 mM NaF, 200 µM sodium orthovanadate). Par la suite, un volume de 50 µl de protéine GST-c-jun fixée a été ajouté aux extraits cellulaires pour ensuite être incubés pendant 3 heures à 4 °C avec agitation. Cette suspension a été lavée à 2 reprises avec le tampon de lyse puis a été soit déposée sur gel SDS-PAGE, soit utilisée dans le but de réaliser un essai kinase. Afin de réaliser cet essai, la suspension a été lavée à 2 reprises avec le tampon kinase (20 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1µg/ml leupeptine, 1 µg/ml d'aprotinine et 1 mM PMSF) avant d'être resuspendue dans 40µl de ce même tampon supplémenté de 50 mM ATP froid et 5µCi. [γ -³²P] ATP. La réaction de phosphorylation a été effectuée à 30 °C pendant 30 minutes après quoi 10 µl de tampon d'échantillon 6X ont été ajoutés afin d'inhiber la réaction. L'analyse de c-jun phosphorylée a été effectuée par autoradiographie après la migration des échantillons sur gel SDS-PAGE. Aussi, le décompte des niveaux de phosphorylation de c-jun a été effectué par compteur à scintillation en excisant la bande correspondante du gel SDS-PAGE.

CHAPITRE 2

RÉSULTATS

2.1 Étude de l'activité kinase de ZPK endogène

Les premières études dans le but d'identifier les activateurs de la protéine kinase ZPK ont été effectuées dans la lignée cellulaire NIH 3T3. L'utilisation de l'essai kinase *in vitro* a permis d'aller mesurer directement l'effet de diverses stimulations sur l'activité de ZPK. Les grandes étapes de cette expérience sont schématisées à la figure 12. ZPK a été immunoprécipitée à l'aide de l'anti-ZPK complexé à la protéine-A agarose. Après quelques lavages, la présence de ZPK au sein du complexe immunoprécipité a été analysée par immunobuvardage avant d'entreprendre par la suite l'étude de l'activité.

La figure 13A illustre l'analyse par immunobuvardage des immunocomplexes réalisés à l'aide du sérum pré-immun et de l'anti-ZPK. La présence de ZPK est détectée à environ 150 kDa (puits 1 et 2). La réalisation d'un immunobuvardage sur des extraits cellulaires permet également de visualiser ZPK à la même hauteur (puits 3 et 4). Une bande à environ 55 kDa est aussi détectée par l'anti-ZPK. Suite au fractionnement cellulaire de ces mêmes extraits, cette bande se retrouve dans la fraction cytoplasmique alors que la bande correspondant à ZPK (bande à 150) se retrouve dans la fraction membranaire (puits 5 et 6).

Pour mesurer l'activité endogène de ZPK dans les cellules NIH 3T3, l'essai kinase *in vitro* a été analysé sur gel SDS-PAGE (figure 13B). Les cellules ont d'abord été stimulées

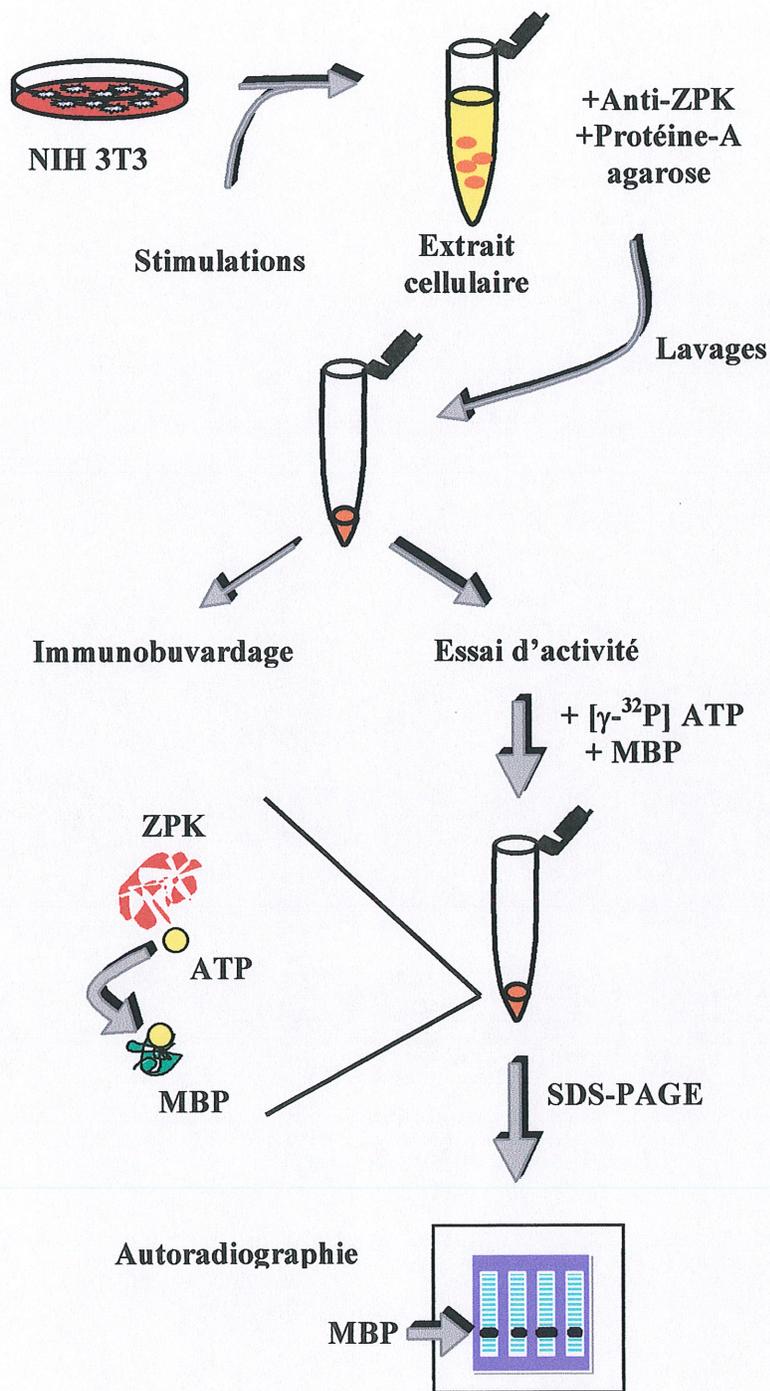


Figure 12. Représentation schématique des grandes étapes menant à l'étude de l'activité endogène de ZPK. La protéine kinase ZPK a été immunoprécipitée à partir des cellules NIH 3T3 avec l'anti-ZPK pour ensuite être analysée à la fois par immunobuvardage et par essai kinase *in vitro*. L'essai nécessitait l'utilisation du MBP comme substrat, lequel était visualisable suivant sa phosphorylation par autoradiographie.

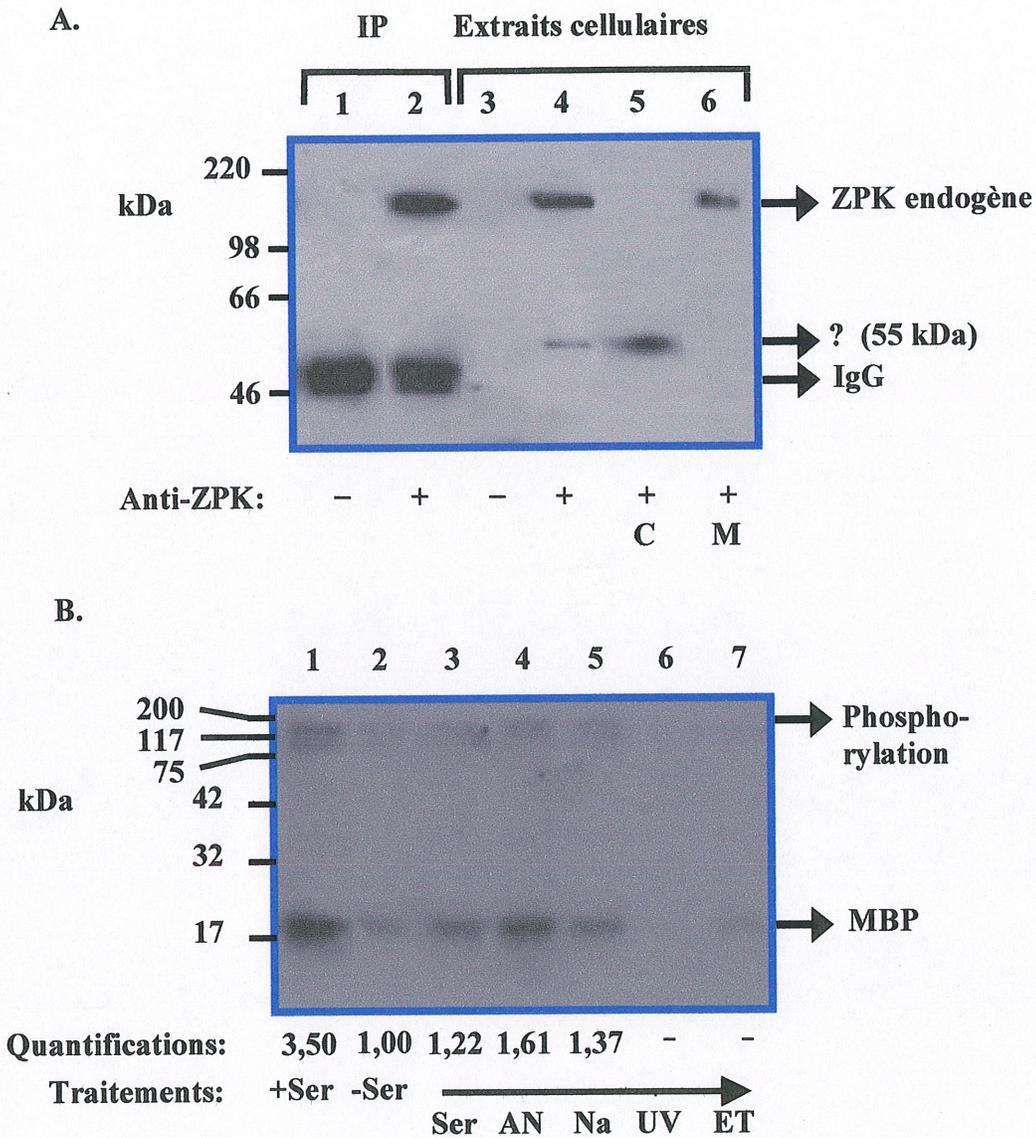


Figure 13. Analyse de l'activité de ZPK endogène dans les cellules NIH 3T3. **A.** Immunobuvardage sur des immunoprécipitations (IP) (puits 1 et 2) et sur des extraits cellulaires (puits 3-6) avec soit l'anti-ZPK (+), soit un sérum pré-immun (-). Les extraits cellulaires ont de plus été analysés après fractionnement par ultracentrifugation de manière à récupérer les fractions cytosolique (C) et membranaire (M). **B.** Autoradiogramme de l'essai kinase *in vitro* de ZPK en réponse à des traitements tels le sérum (Ser), l'anisomycine (AN), le NaCl (Na), les U.V. (UV) et l'éthanol (ET) pendant 30 minutes. Les quantifications sont estimées par rapport au nombre de pixels total.

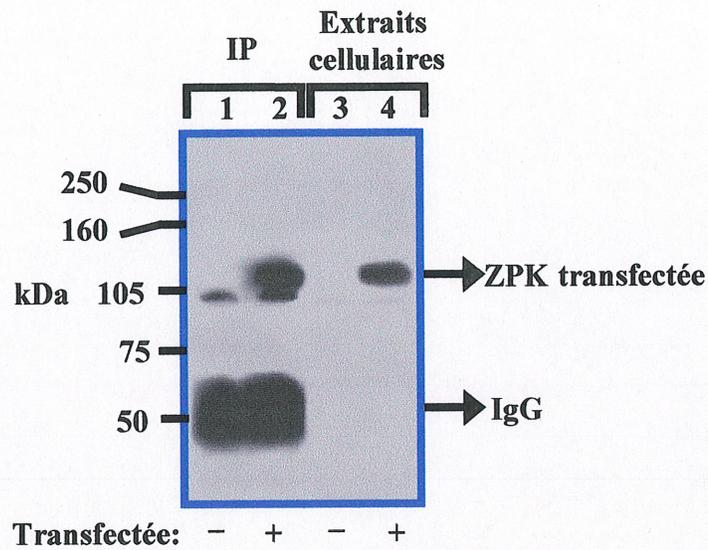
avec différents traitements pour ensuite mesurer par autoradiographie le niveau de phosphorylation du MBP. Les traitements ont été effectués sur des cellules incubées pour une période de 16 heures sans sérum afin de diminuer le bruit de fond. L'analyse des niveaux de phosphorylation du MBP montre que lorsque les cellules sont mises sans sérum (-Ser) pendant au moins 16 heures, l'activité de ZPK diminue de 3,5 fois comparativement aux cellules proliférant normalement (+Ser) (puits 1 et 2). En ce qui a trait aux traitements, l'activité de ZPK augmente de 1,22 fois suite à la stimulation des cellules par l'ajout de sérum (20 %), de 1,61 fois pour l'anisomycine (10 μ g/ml) et de 1,37 fois pour le NaCl (0.7 M) (puits 3, 4 et 5). Toutefois, son activité ne semble pas être affectée par les U.V. (40 J/m²) et l'éthanol (0.1%) (puits 6 et 7). Les niveaux d'activité sont toujours comparés avec celui des cellules sans sérum dans lesquelles il est possible de détecter faiblement une bande phosphorylée dont le poids moléculaire s'apparente à celui de ZPK.

2.2 Étude de l'activité kinase de ZPK transfectée

La seconde approche intentée afin d'identifier les activateurs de ZPK nécessitait l'utilisation de la protéine transfectée. La protéine kinase ZPK devait préalablement être exprimée dans les cellules COS-1 ou HEK 293 environ 2 jours avant les stimulations pour ensuite procéder à un essai kinase *in vitro*. Afin d'immunoprécipiter seulement ZPK transfectée, l'anticorps anti-HA qui reconnaît un épitope spécifique situé dans la portion carboxy-terminal de celle-ci, a été utilisé.

La présence de ZPK transfectée a été vérifiée par immunobuvardage dans les cellules HEK 293 à l'aide de l'anticorps anti-HA à la fois sur des immunocomplexes et des extraits cellulaires. Cette analyse, représentée à la figure 14A, montre la présence de ZPK à environ 130 kDa autant lors d'une immunoprécipitation (puits 1 et 2) que dans des extraits cellulaires

A.



B.

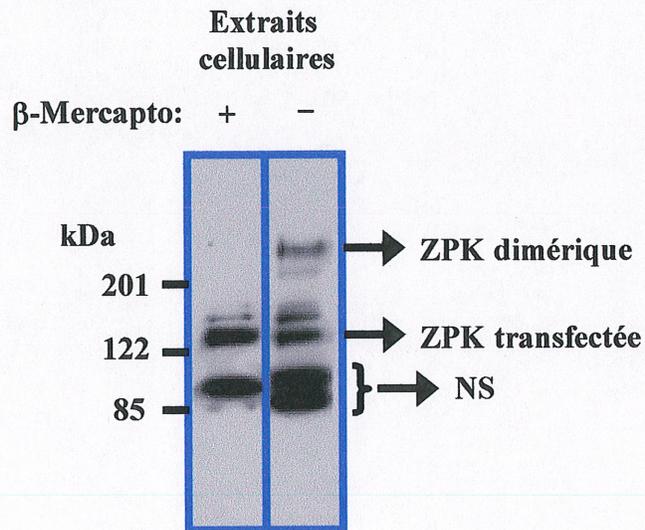


Figure 14. Analyse de la forme transfectée de ZPK dans les cellules HEK 293. A. Immunobuvardage sur des immunoprécipitations (IP) (puits 1 et 2) et sur des extraits cellulaires (puits 3 et 4) avec l'anti-HA dans des cellules transfectées (+) ou non (-). B. Immunobuvardage avec l'anti-HA sur des extraits cellulaires transfectées resuspendus dans du tampon d'échantillon contenant (+) ou non (-) du β -mercaptoéthanol. NS: non spécifique.

totaux (puits 3 et 4). De plus, une analyse en présence et en absence de β -mercaptoéthanol sur des extraits cellulaires permet de noter l'apparition sur gel SDS-PAGE d'une bande supplémentaire située à environ au double du poids moléculaire de ZPK transfectée (figure 14B).

L'étude de l'activité de ZPK transfectée a débuté par l'analyse de l'autophosphorylation et de la spécificité de phosphorylation de la protéine *in vitro* sur différents substrats. Pour ce qui est de l'autophosphorylation, celle-ci a été obtenue en effectuant un essai kinase *in vitro* dans les cellules COS-1 en omettant l'ajout d'un substrat dans le tube d'essai. Il est possible d'observer après autoradiographie du gel SDS-PAGE, une bande phosphorylée à la hauteur du poids moléculaire de ZPK (figure 15A, puits 3). L'utilisation de contrôles négatifs, c'est-à-dire de cellules non-transfectées ou transfectées avec le vecteur vide, montre la spécificité de l'essai (puits 1 et 2). Concernant l'étude de l'activité de ZPK sur différents substrats, celle-ci a été effectuée dans les cellules HEK 293 afin de déterminer le meilleur substrat pour les éventuelles études de stimulation. Comme il est montré à la figure 15B, ZPK semble avoir plus de spécificité pour le MBP (puits 1 et 2) que pour la caséine (puits 3 et 4). Cependant, la protéine recombinante SEK-1 est tout à fait non-spécifique (puits 5 et 6). Cette augmentation de spécificité est observée en comparant les cellules non-transfectées à celles transfectées. La présence de ZPK est de plus confirmée par la détection d'une bande phosphorylée à 130 kDa.

Le MBP a été utilisé afin de mesurer l'effet de différents traitements sur l'activité de ZPK transfectée en essai kinase *in vitro* dans les cellules HEK 293. À la figure 16A, le niveau de phosphorylation du MBP suite à la transfection de ZPK, augmente faiblement de 0,1 fois (puits 1 et 2) chez les cellules qui prolifèrent normalement (+Ser) et de 0,5 fois en condition sans sérum (puits 3). Pour ce qui est des différents traitements, le choc osmotique (NaCl, 0.7 M) (puits 5) augmente l'activité de ZPK transfectée de 22,6 fois comparativement

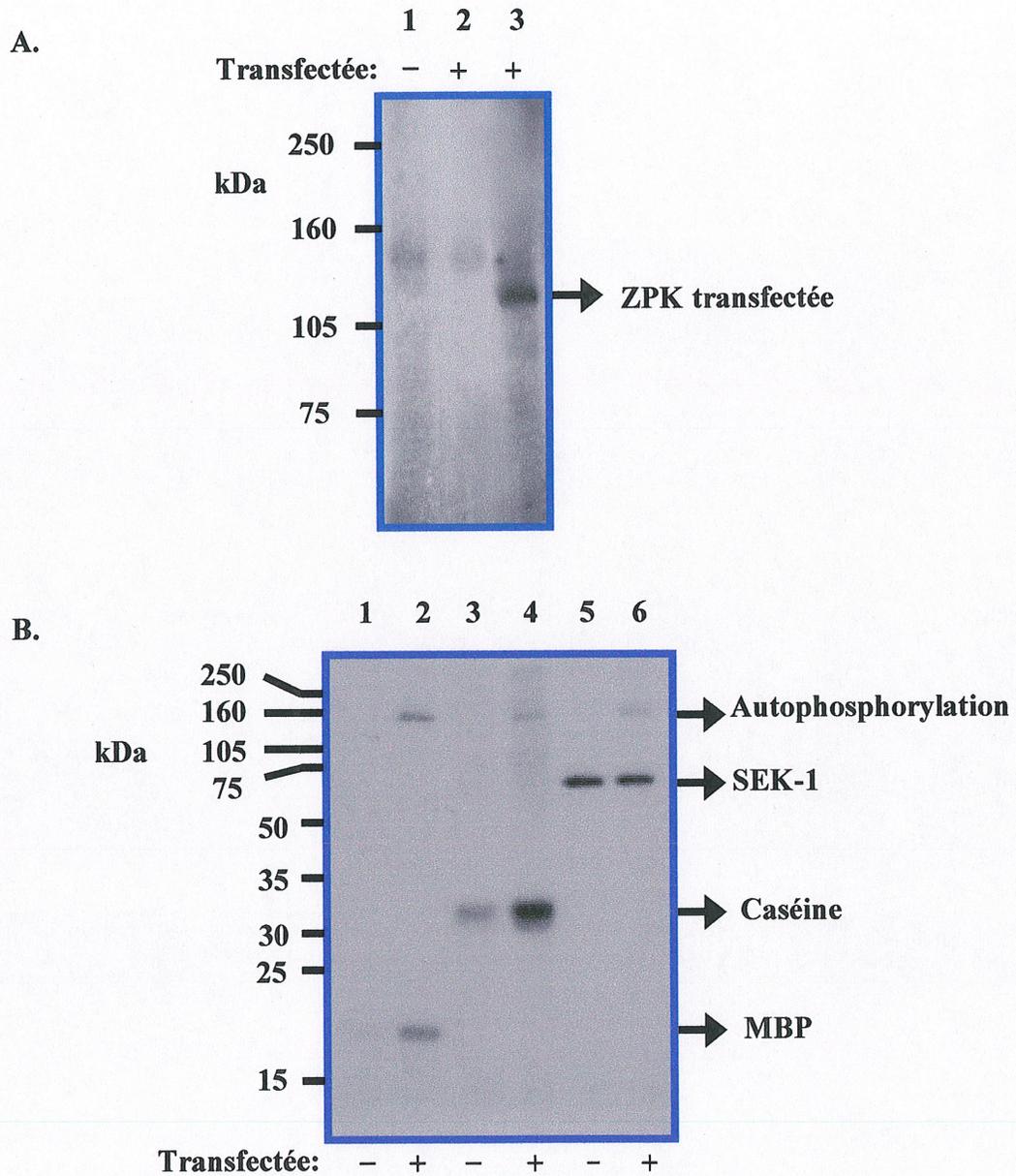


Figure 15. Analyse de l'autophosphorylation et de la spécificité de substrat de ZPK transfectée. A. Autoradiogramme de l'autophosphorylation de ZPK dans les cellules COS-1 non-transfectées (puits 1), transfectée avec le vecteur vide (puits 2) ou le vecteur contenant l'ADNc de ZPK (puits 3). B. Autoradiogramme de l'essai kinase *in vitro* dans les cellules HEK 293 non-transfectée (puits 1,3,5) ou transfectée (puits 2,4,6) avec ZPK sur différents substrats tels le MBP, la caséine et SEK-1.

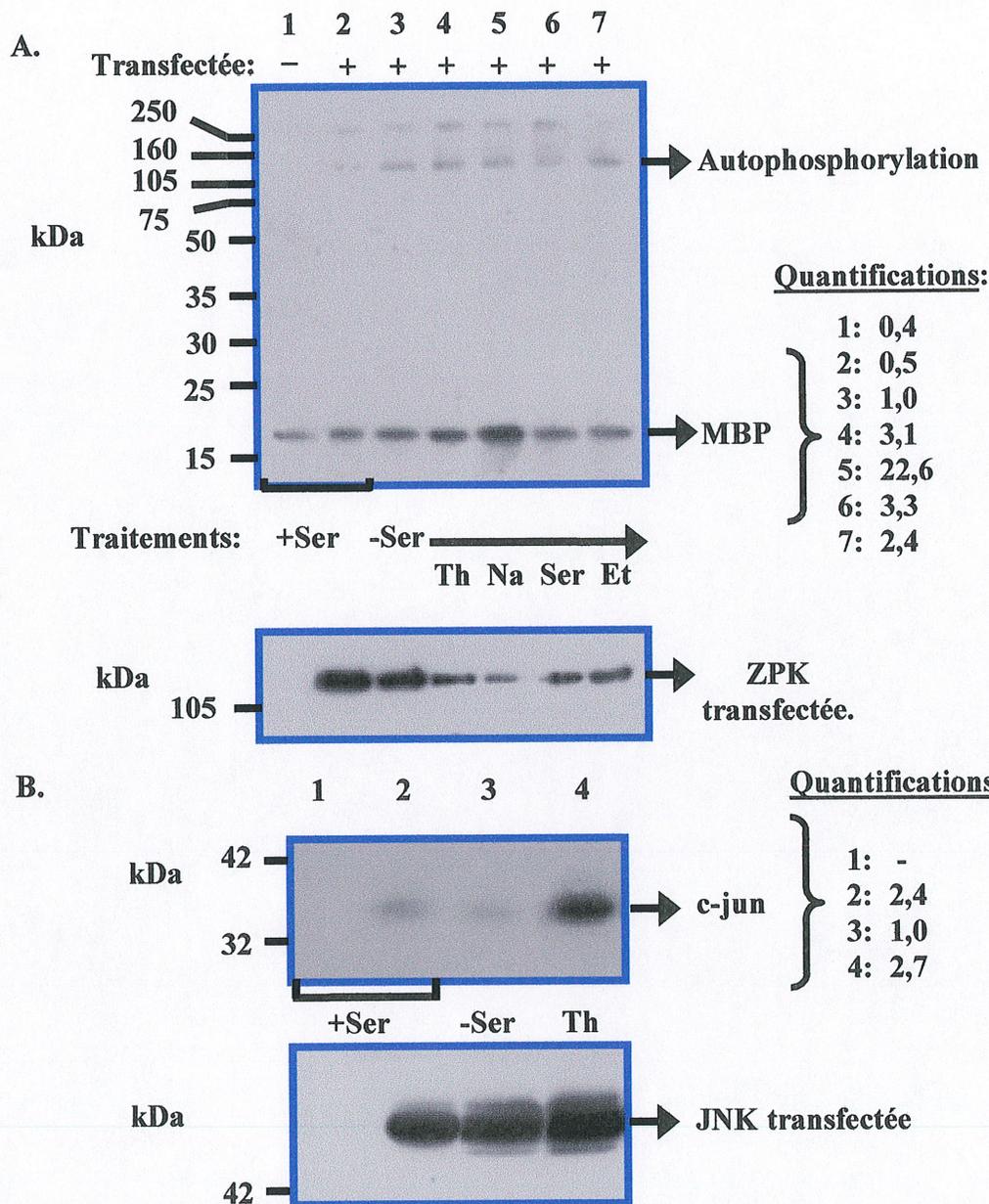


Figure 16. Analyse de l'activité de ZPK transfectée dans les HEK 293. **A.** Autoradiogramme de l'essai kinase *in vitro* de ZPK transfectée en réponse à des traitements tels le choc thermique (Th), le NaCl (Na), le sérum (Ser) et l'éthanol (ET) pendant 30 minutes (autoradiogramme supérieur). Immunobuvardage des extraits cellulaires correspondant à chacune des conditions avec l'anti-HA (autoradiogramme inférieur). **B.** Contrôle de l'essai kinase *in vitro* en utilisant en transfection soit le vecteur vide (puits 1), soit la protéine kinase JNK (puits 2,3,4) et son substrat spécifique c-jun (autoradiogramme supérieur). Immunobuvardage des extraits cellulaires correspondant à chacune des conditions avec l'anti-JNK (autoradiogramme inférieur). Les quantifications sont estimées par rapport au nombre de pixels total.

aux autres traitements tels le choc thermique (42 °C), le sérum (20 %) et l'éthanol (0.1%) qui n'augmente que de 3,1, 2,4 et 3,3 respectivement (puits 4, 6 et 7). La vérification des quantités de ZPK transfectée par immunobuvardage montre que certains puits ne contiennent pas exactement la même proportion de protéines et par conséquent le niveau de phosphorylation du MBP pourrait être sous-estimé dans certains puits. Cependant, les quantifications ont été calculées de manière à tenir compte de ces variations. Afin de s'assurer de la validité de la technique, un contrôle utilisant la protéine JNK transfectée et son substrat spécifique, c-jun, a été utilisé (figure 16B). Dans ce cas, l'essai kinase *in vitro* a été réalisé dans les mêmes conditions que celles utilisées lors des essais avec la protéine ZPK transfectée. L'autoradiogramme montre les niveaux variables de phosphorylation de c-jun et par le fait même l'activité de JNK. Lorsque les cellules prolifèrent normalement, l'activité de JNK est à un niveau basal (puits 2). Toutefois, cette activité diminue de 2,4 fois lorsque les cellules sont incubées en absence de sérum (puits 3) contrairement aux cellules subissant un choc thermique (42 °C) où l'activité est stimulée à raison de 2,7 fois (puits 4). Ceci est facilement démontrable par le haut niveau de phosphorylation de c-jun. On peut donc affirmer que l'essai permet effectivement d'analyser l'activité d'une protéine particulière de la voie des JNKs.

2.3 Mesure de l'activation de la protéine JNK endogène dans les cellules transfectées avec ZPK par la méthode du "pull down"

Plusieurs études antérieures ont démontré la capacité de ZPK à activer la voie des JNKs. En se basant sur ce fait et toujours dans l'optique d'identifier des activateurs de ZPK, une méthode indirecte connue sous le nom de "pull down", a été utilisée. Cette stratégie est basée sur la spécificité de JNK pour son substrat c-jun. L'utilisation d'une protéine recombinante GST-c-jun (environ 32 kDa), couplée à des billes de glutathione-sépharose, a facilité la purification de la protéine kinase JNK endogène à partir d'un extrait cellulaire. Ceci est intéressant puisqu'il devient facile de mesurer l'activité de celle-ci en réponse à des stimulations particulières. En comparant l'activité de JNK endogène dans des cellules

transfectées ou non avec ZPK, il est donc possible de vérifier l'implication de ZPK dans l'activation de la voie des JNKs. Les grandes étapes de cette technique et l'immunobuvardage sur la protéine JNK après le "pull down" sont représentées à la figure 17.

Les résultats de cette étude effectuée dans les cellules NIH 3T3 sont analysés en regardant les différents niveaux de phosphorylation du substrat de JNK, c-jun, après stimulations (figure 18A). En comparant les cellules non-transfectées avec celles transfectées lorsque celles-ci prolifèrent normalement (+Ser), on peut remarquer que l'activité de JNK endogène augmente (puits 1 et 2). Pour ce qui est des cellules cultivées en absence de sérum pendant au moins 16 heures (-Ser) et celles traitées à l'aide d'un choc thermique (42 °C) ou par l'ajout d'anisomycine (10 µg/ml), il ne semble pas y avoir d'augmentation de l'activité (puits 4,6,8) causée par la transfection de ZPK. Par contre, si une analyse plus détaillée est effectuée (figure 18B) par compteur à scintillation liquide, on observe une faible augmentation de l'activité de JNK endogène suite aux traitements lorsque ZPK est présente. Cette augmentation est de l'ordre de 1,17 à 1,2 et est similaire à celle dans les cellules qui prolifèrent normalement en présence de ZPK.

2.4 Étude de la relation existant entre la localisation de ZPK et l'activation de la voie des JNKs.

Dans le deuxième volet de ma maîtrise, des travaux dans notre laboratoire sur la localisation intracellulaire de ZPK m'ont amené à étudier sa fonction physiologique. ZPK a été localisée au niveau de l'appareil de Golgi des cellules NIH 3T3 (Douziech *et al.*, 1999). Mon objectif était de montrer l'importance de cette localisation dans le maintien du rôle de ZPK dans la transduction des signaux. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique du "pull down" dans des cellules traitées à la bréfeldine A (BFA), un agent qui brise de façon réversible l'appareil de Golgi. En mesurant l'activité de JNK endogène suite à des traitements à la BFA dans les cellules NIH 3T3, nous pourrions ainsi établir une corrélation

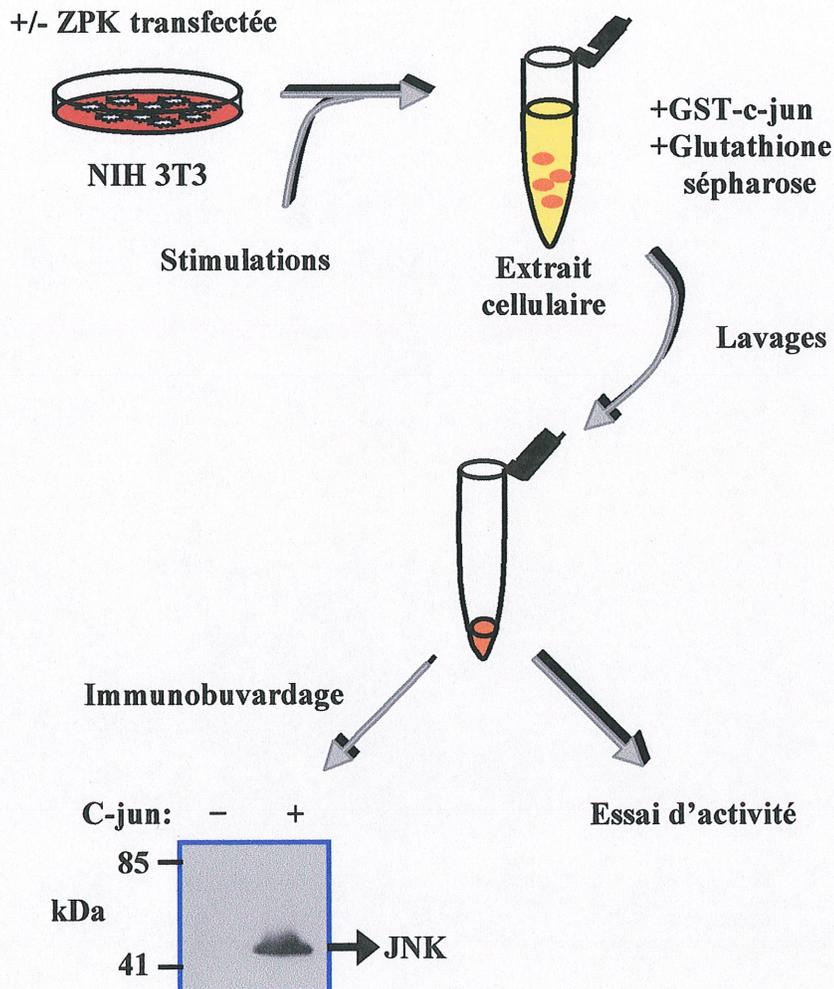


Figure 17. Représentation schématique des grandes étapes menant à l'étude de l'implication de ZPK transfectée dans l'activation de JNK endogène par la technique du "pull-down". La protéine kinase JNK endogène a été purifiée à partir des cellules NIH 3T3 (transfectée ou non avec la protéine kinase ZPK) grâce à l'utilisation de la protéine recombinante c-jun. Cette purification a été vérifiée par immunobuvardage avec l'anti-JNK. Par la suite, des essais d'activité ont été effectués.

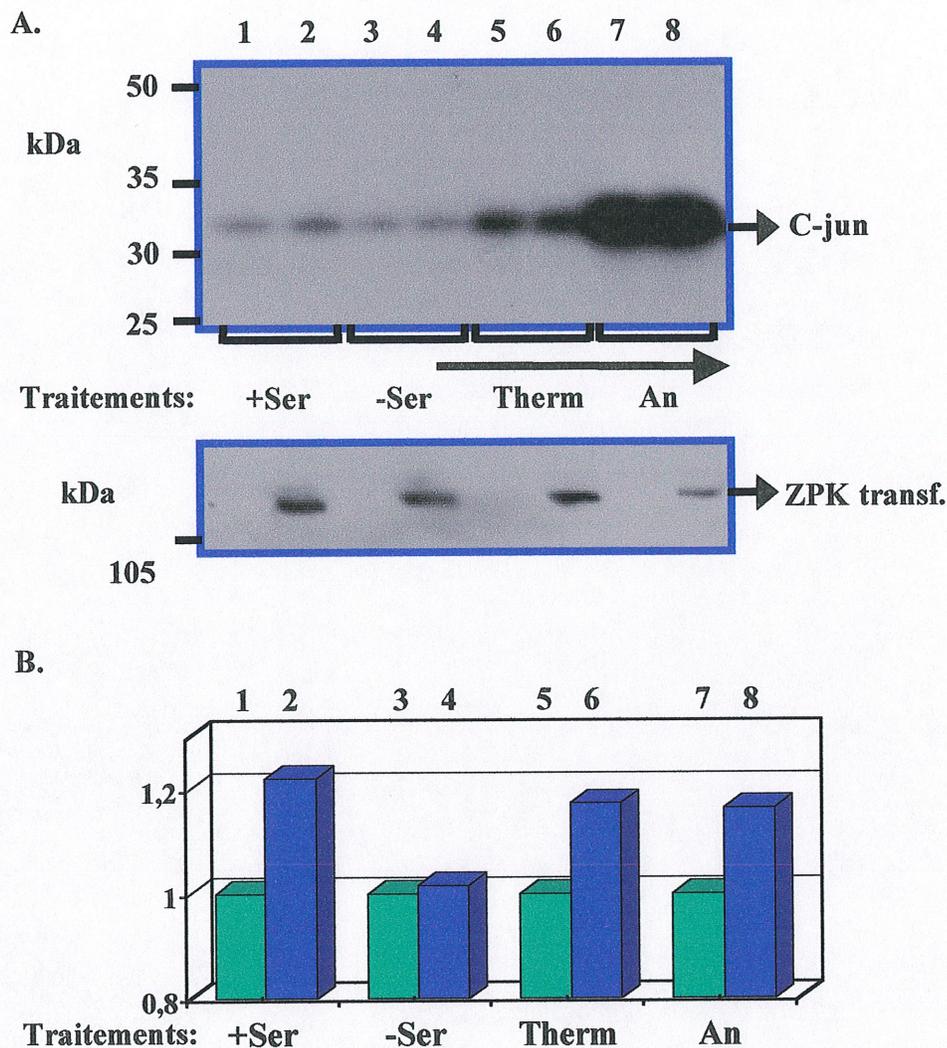


Figure 18. Étude de l'implication de ZPK transfectée dans l'activation de JNK endogène par la technique du "pull-down". **A.** Autoradiogramme de l'essai kinase *in vitro* de JNK endogène dans les cellules NIH 3T3 transfectées soit avec le vecteur vide (puits 1,3,5,7), soit avec ZPK (puits 2,4,6,8). Des stimulations telles que le choc thermique (Therm) et l'anisomycine (An) ont été effectuées (autoradiogramme supérieur). Immunobuvardage des extraits cellulaires correspondant à chacune des conditions avec l'anti-HA (autoradiogramme inférieur). **B.** Histogramme des niveaux de phosphorylation de c-jun évalués par compteur à scintillation liquide. La valeur de 1 a été donnée à chaque échantillon provenant de cellules non-transfectées. L'expérience a été réalisée à une seule reprise.

entre le maintien de l'intégrité de l'appareil de Golgi (et des protéines associées) et sa capacité (JNK) à activer la voie des JNKs.

Les résultats de cet essai de "pull-down" sur des cellules normales, traitées à l'éthanol (0.1%) ou à la BFA (2 $\mu\text{g/ml}$) suivi ou non par un choc thermique sont représentés à la figure 19A. Dans les cellules qui prolifèrent normalement, JNK possède une activité basale et est facilement activable par le choc thermique (puits 1 et 2). L'activité de JNK endogène est comparée entre les cellules traitées à l'éthanol (puits 3) (contrôle) et celle traitées à la BFA (puits 5) car cette dernière devait être resuspendue dans l'éthanol. Le niveau de phosphorylation de c-jun diminue. Si l'on compare les deux mêmes traitements chez les cellules ayant subi par la suite un choc thermique, la stimulation de JNK semble avoir eu lieu mais demeure plus faible dans les cellules traitées à la BFA. Le décompte des niveaux de phosphorylation de c-jun présenté dans l'histogramme à la figure 19B montre une faible diminution de 0.2 entre les cellules traitées à l'éthanol et celles traitées à la BFA. De plus, les cellules sont quand même stimulées d'environ 0.5 fois dans les deux cas.

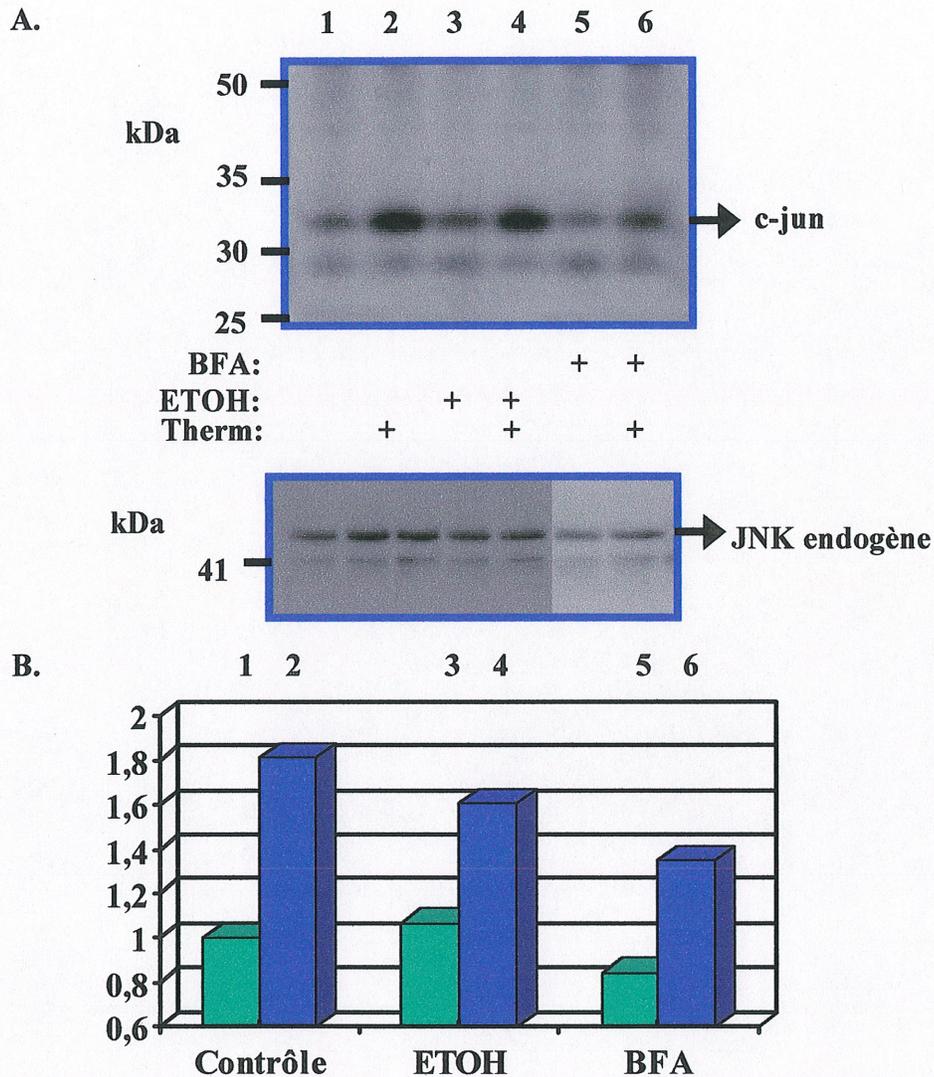


Figure 19. Relation entre la localisation de ZPK et sa capacité à activer la voie des JNKs. A. Autoradiogramme de l'essai kinase *in vitro* de JNK endogène dans les cellules NIH 3T3 traitées à l'éthanol (ETOH) (contrôle), à la bréfeldine A (BFA) ayant subi (2,4,6) ou non (1,3,5) un choc thermique (Therm) de 30 minutes (autoradiogramme supérieur). Immunobuvardage des extraits cellulaires correspondant à chacune des conditions avec l'anti-JNK (autoradiogramme inférieur). B. Histogramme des niveaux de phosphorylation de c-jun évalués par compteur à scintillation liquide. L'expérience a été réalisée à une seule reprise.

CHAPITRE 3

DISCUSSION

Depuis plusieurs années, les scientifiques ont tenté d'identifier et de caractériser les molécules participant à la régulation de la transmission des signaux entre la surface cellulaire et le noyau. Pour y parvenir, ils se sont régulièrement tournés vers des études d'activation. À cette fin, ils devaient déterminer pour chaque protéine kinase dans quelles conditions et par quels agents elle était activée. Entre autres, l'identification des activateurs spécifiques des différents membres appartenant à la famille des MAPKs (ERK, JNK et p38) a permis de mieux comprendre et d'élaborer les principales voies de signalisation. Grâce à ces études, il est possible maintenant de savoir pour une stimulation précise, quelles voies de signalisation sont activées et lesquelles ne le sont pas. Ceci nous permet donc de comprendre comment une cellule fonctionne et réagit lorsqu'elle est stimulée par un quelconque agent. Ces informations sont importantes pour comprendre les processus cellulaires associés à l'apparition de maladies telles que le cancer.

Contrairement aux protéines kinases MAPKs, celles associées aux niveaux supérieurs (MAPKKs, MAPKKKs) sont moins caractérisées et leur fonction physiologique demeure indéterminée. Il en est de même pour la protéine sérine/thréonine kinase ZPK qui constitue l'objet d'étude de notre laboratoire. Toutefois, certains travaux ont permis de suggérer sa participation dans la régulation des processus de prolifération et de différenciation cellulaire. Afin de mieux comprendre son implication dans ces processus et par le fait même lui attribuer une fonction physiologique, nous avons tenté de mesurer son activité kinase intrinsèque en réponse à certaines stimulations. Cette étude était principalement orientée vers l'activation de la voie des JNKs puisqu'il a déjà été démontré antérieurement que ZPK avait

la capacité de l'activer (Hirai *et al.*, 1996). Ainsi mon projet de recherche a porté principalement d'une part sur l'identification d'activateurs potentiels de la protéine kinase ZPK, et d'autre part sur la détermination de la relation entre sa localisation et sa capacité d'activer JNK.

3.1 Identification des activateurs de ZPK endogène

Les premières tentatives pour identifier les activateurs de ZPK se sont effectuées de façon endogène dans la lignée cellulaire NIH 3T3. Cette lignée exprime assez fortement la protéine ce qui nous donne un bon outil d'analyse. L'essai kinase *in vitro* a été utilisé tout au long des études d'activation. L'analyse des résultats a montré que l'activité de ZPK augmente faiblement suite à des traitements avec le sérum, l'anisomycine et le NaCl lorsqu'elle est mesurée par essai kinase *in vitro*. Plusieurs autres expériences (non présentées) telles que des essais kinases en gel utilisant comme substrat le MBP et la caséine, ont été effectuées avec les cellules NIH 3T3 afin de mesurer les modulations de l'activité de ZPK. Cependant, aucun résultat n'a été obtenu, suggérant ainsi l'existence d'un problème de renaturation de la protéine au cours de la manipulation. Par la suite, nous nous sommes dirigés vers des expériences qui ont permis de mesurer l'autophosphorylation de ZPK endogène. Que se soit lors d'études de "mobility shift", de marquage au ^{32}P *in vivo* ou avec des anticorps anti-phospho(Ser-Thr), nous n'avons jamais réussi à constater une modulation de l'activité intrinsèque de ZPK suite à des stimulations. Il est par conséquent difficile d'affirmer si les résultats obtenus *in vitro* sont concrets. Ceci est de plus secondé par l'absence d'une reproductibilité entre les essais. Les explications que l'on peut tirer de ces observations sont nombreuses. Il s'agit premièrement de savoir si notre protéine a une activité catalytique lorsque qu'elle est immunoprécipitée. Ceci pourrait être observable par la visualisation d'une bande phosphorylée de poids moléculaire similaire à ZPK qui pourrait nous montrer son autophosphorylation suite à l'essai. Dans notre cas, nous observons une bande faiblement phosphorylée qui ne nous permet pas d'affirmer avec certitude que cela est

bien de l'autophosphorylation de ZPK. On peut donc penser que l'activité de ZPK est très faible *in vitro*. Une autre explication serait au niveau des différentes stimulations utilisées. Nous avons utilisé dans la plupart des cas des stimulations typiques de la voie des JNKs. Toutefois, il est possible de croire que ZPK est spécifique pour un nombre restreint de stimulations que nous n'avons pas utilisées. Un autre aspect susceptible d'expliquer l'absence d'activité de ZPK suite à une stimulation serait l'utilisation d'un mauvais substrat. Nous ne savons pas si la protéine ZPK endogène a de l'affinité pour le MBP. Nous avons réussi à détecter la phosphorylation du MBP, mais il faudrait être certain que cette dernière provient spécifiquement de ZPK et non d'une protéine contaminante qui serait présente dans l'immunoprécipitation. À cette fin, il faudrait analyser par immunoprécipitation des cellules préalablement marquées à la méthionine ^{35}S , de façon à s'assurer de sa pureté.

L'analyse de la protéine ZPK dans le complexe immunoprécipité a été essentielle pour vérifier sa présence. Celle-ci nous a révélé que l'anticorps (anti-ZPK) reconnaissait bien la protéine endogène. L'analyse sur des extraits cellulaires totaux (conditions dénaturantes) montre de plus que cet anticorps reconnaît une autre protéine d'environ 55 kDa. Cette protéine n'a pas encore été identifiée mais nous croyons qu'il s'agit d'un produit de clivage de la protéine ZPK. Il a déjà été montré que plusieurs protéines kinases sont la cible d'enzymes protéolytiques telles que les caspases (Cardone *et al.*, 1997). Le clivage de MEKK1 par exemple, une MAPKKK, a pour effet de libérer son domaine catalytique et de rendre cette protéine active (Widmann *et al.*, 1998). ZPK pourrait aussi être assujettie à un clivage protéolytique qui permettrait son activation.

3.2 Identification des activateurs de la forme transfectée de ZPK

L'identification des activateurs de ZPK a aussi été réalisée dans les lignées cellulaires COS-1 et HEK 293 surexprimant cette protéine par transfection. Des analyses ont

préalablement été effectuées afin de s'assurer de la présence de ZPK transfectée dans les immunoprécipitations. Ceci a été facilement observable par immunobuvardage et a confirmé que l'efficacité de transfection ainsi que l'anticorps utilisé dans les expériences étaient valables. Il a été de plus remarqué que ZPK formait un dimère en transfection tout comme l'avait déjà montré Mata (1996). Plus récemment, Leung (1998) a montré que la dimérisation de MLK3, un autre membre de la famille des MLKs, était requise pour son activation.

En ce qui concerne l'étude de l'activité de la forme transfectée de ZPK, nous avons pu constater que son autophosphorylation était facilement détectable par autoradiographie. On peut donc penser que ZPK transfectée est hautement active suite à sa transfection dans la lignée cellulaire COS-1. Nous avons obtenu des résultats similaires dans la lignée cellulaire HEK 293. L'affinité de phosphorylation de ZPK a par la suite été testée sur différents substrats tels que le MBP, la caséine et la protéine recombinante SEK-1. Le MBP et la caséine possèdent la capacité d'être phosphorylés par ZPK transfectée contrairement à la protéine SEK-1, qui aurait pu être une cible en aval dans la cascade des JNKs. Ces résultats sont en accord avec ceux de Merritt (1999) puisqu'aucune affinité de phosphorylation de ZPK envers SEK-1 n'a pu être observée. Le MBP a été par la suite utilisé pour des essais kinases *in vitro*. Ces essais ont démontré que ZPK était activée par plusieurs agents tels que le choc thermique, le sérum et surtout le choc osmotique (NaCl). Malgré ceci, il faut interpréter ces résultats avec beaucoup de prudence à cause de leur manque de reproductibilité. Nous n'avons pas réussi à obtenir des modulations constantes de l'activité entre les essais, comparativement à ceux effectués avec la protéine kinase JNK et son substrat c-jun dans les mêmes conditions. Il est difficile d'expliquer ces résultats parce que ZPK transfectée semble s'autophosphoryler dans l'essai ce qui suggère la possibilité d'une activité *in vitro*. Il se pourrait que ZPK transfectée est active à son maximum et même si l'on stimule les cellules, celle-ci n'est pas en mesure de répondre davantage. Ce phénomène est très souvent observé lors d'études d'activation des protéines kinases transfectées comme dans le cas de MLK2 (Cuenda et Dorow, 1998). Nous avons par la suite observé que ZPK

transfectée ne se localisait pas dans l'appareil de Golgi. Il est difficile à ce moment de savoir quels sont les facteurs responsables de cette anomalie mais on peut tout de même imaginer que la forme ZPK transfectée n'adopte pas la même conformation que son homologue endogène. En conséquence, il est possible que ZPK soit dans l'impossibilité de répondre aux stimulations si celle-ci ne se retrouve pas dans son emplacement naturel. Dernièrement, il a été démontré que lorsqu'une protéine kinase était délocalisée de son site habituel, celle-ci ne pouvait médier correctement son action au sein de la cascade de transduction (Mochly-Rosen, 1995). Il est probablement important autant pour ZPK que pour toute autre protéines kinases d'être adéquatement situées afin d'exercer une action spécifique.

3.3 Mesure de l'activité de JNK endogène dans des cellules transfectées avec ZPK

Nous avons par la suite essayé de mettre au point un essai d'activité indirect à l'aide de la protéine kinase endogène JNK et de la forme transfectée de ZPK. Cette technique, connue sous le nom de "pull-down", nous a permis de contourner l'essai d'activité sur ZPK directement et de mesurer celle de JNK endogène. Cette dernière est facilement détectable grâce à la production en bactéries de son substrat spécifique c-jun. Nous avons détecté lors de cet essai que la forme transfectée de ZPK augmente faiblement l'activité de JNK endogène. Nous remarquons également une faible augmentation de l'activité de JNK dans des cellules stimulées, préalablement transfectées avec ZPK. Ces résultats suggèrent que ZPK transfectée est impliquée dans la réponse intracellulaire au sein de la voie des JNKs lors des stimulations. Malgré le fait que cette participation ne semble pas jouer un rôle majeur, celle-ci n'en demeure pas moins présente. Cette faible participation peut être le résultat d'une mauvaise expression du vecteur contenant l'ADNc de ZPK, laquelle n'est pas très efficace dans les cellules NIH 3T3. L'efficacité de transfection des cellules constitue une seconde explication. Les cellules non-transfectées, à cause de leur abondance, peuvent possiblement provoquer un bruit de fond qui a pour effet de nuire à la détection de l'augmentation de l'activité de JNK.

3.4 Relation entre la localisation de ZPK et l'activation de JNK endogène

Après avoir déterminé la localisation intracellulaire de ZPK au niveau de l'appareil de Golgi dans la lignée cellulaire NIH 3T3 (Douziech *et al.*, 1999), nous nous sommes interrogés sur l'importance de cette compartimentalisation pour l'accomplissement de sa fonction dans la transmission des signaux. À cette fin, nous avons étudié l'effet de la BFA sur l'activation de JNK endogène dans le but de suggérer un rôle physiologique à ZPK. Nous avons remarqué que l'activité de JNK diminue lorsque les cellules, proliférant normalement, sont traitées à la BFA. Cette diminution est un peu surprenante puisque JNK a toujours été associée aux protéines réagissant positivement aux stress cellulaires d'où son second nom de SAPK ("stress-activated protein kinase"). Le traitement des cellules à la BFA entraîne la ségrégation des saccules du Golgi dans le réticulum endoplasmique ainsi que le collapsus du "trans Golgi network" au niveau du centre organisateur des microtubules (MTOC) (Pelham, 1991). Cette désorganisation cause un stress intracellulaire pouvant possiblement provoquer l'activation des voies de signalisation des MAPKs. Dans le cas de JNK, la diminution de son activité suggère que le traitement à la BFA occasionne un changement dans la distribution des protéines impliquées dans la voie des JNKs. Or, sachant que JNK activée est située le long des microtubules (Nagata *et al.*, 1998), des structures étroitement liées à l'appareil de Golgi, il est facile de penser que des protéines kinases localisées dans cet organe ne sont plus en mesure de maintenir l'activation de la protéine kinase JNK. Aussi, la diminution de l'activité de JNK pourrait être une cause plus indirecte suite au traitement à la BFA. Par exemple, les perturbations causées par la BFA stimuleraient l'activité de protéines phosphatases qui déphosphoryleraient JNK et par conséquent diminueraient son activité. Lorsque les cellules traitées à la BFA sont par la suite stimulées par un choc thermique, il est curieux d'observer que l'activation de JNK endogène s'effectue quand même. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les protéines responsables de l'activation de JNK lors du choc thermique ne sont pas toutes affectées par le traitement à la BFA. Il serait très intéressant de tenter de déterminer pour quelles stimulations l'activité de JNK endogène n'est pas augmentée dans les cellules préalablement traitées à la BFA. Cela permettrait de savoir, lors

de quelles stimulations, les protéines localisées dans l'appareil de Golgi sont impliquées dans l'activation de la voie de JNK.

Le rôle de ZPK dans ces mécanismes demeure encore indéterminé. De plus amples travaux seront nécessaires afin de prouver que ZPK est un acteur important dans l'activation de la cascade des JNKs lors de ces traitements. Nous pourrions étudier par exemple sa localisation ainsi que celle des autres membres de la voie des JNKs suite à un traitement à la BFA, parallèlement avec différentes stimulations. L'identification de ces localisations pourrait être réalisée par immunohistochimie. Des immunoprécipitations à partir d'extraits cellulaires pourraient également être effectuées pour vérifier l'existence d'interactions entre ces protéines. Ces expérimentations nous permettraient de voir si ces protéines d'une part colocalisent et d'autre part, si elles sont associées ou non lors des traitements à la BFA et ainsi expliquer la diminution de l'activité de JNK. En ce qui a trait à la forme transfectée de ZPK, il sera difficile d'étudier son rôle puisque celle-ci ne se localise pas dans l'appareil de Golgi. Nous pourrions cependant contrecarrer cette anomalie en incluant dans la séquence primaire de ZPK une séquence signal permettant à la protéine exogène de s'associer à l'appareil de Golgi et ainsi mimer la forme endogène.

3.5 Perspectives d'avenir

Les problèmes rencontrés lors des essais kinases *in vitro* peuvent être étroitement reliés au substrat utilisé. Le MBP est un substrat largement utilisé pour les protéines kinases mais semble faiblement spécifique pour la famille des MLKs. Il faudrait donc tenter de trouver les substrats *in vivo* de ZPK afin de permettre de mesurer efficacement les modulations de son activité en réponse aux stimuli. Une méthode de biologie moléculaire fréquemment utilisée pour l'identification de partenaires protéiques est le système des deux hybrides. Récemment, une protéine nommée MKK7 a été identifiée et semble être

phosphorylable par ZPK (Merritt *et al.*, 1999). MKK7, un des deux principaux activateurs de JNK, pourrait être le membre qui interrelie ZPK à JNK. Il serait intéressant de reproduire *in vitro*, la cascade qui est accomplie entre ces membres *in vivo*, afin de pouvoir mesurer les modulations de l'activité de ZPK. En produisant en bactéries les protéines MKK7, JNK et c-jun, tout en utilisant ZPK endogène ou transfectée provenant de cellules stimulées, nous pourrions reproduire *in vitro* la cascade de phosphorylation entre les membres (ZPK→MKK7→JNK→c-jun) et détecter les différents niveaux de phosphorylation de c-jun.

Il faudrait par la suite étudier les mécanismes d'action de la protéine ZPK. Elle semble posséder un mode de régulation spécifique si l'on en juge de par sa structure primaire. Elle possède un domaine "leucine zipper" du côté carboxy-terminal de son domaine catalytique qui doit probablement agir sur l'activité intrinsèque de la protéine. Il serait possible d'étudier par transfection la fonction de cette partie de la protéine en utilisant des mutants de délétion de cette structure. Ces travaux ont déjà été effectués chez MLK3 pour démontrer l'importance du "leucine zipper" lors de son activation (Leung et Lassam, 1998).

Un autre aspect pouvant aussi être étudié constitue le clivage de la protéine ZPK. Cette dernière pourrait être régulée en fonction de son clivage. L'analyse par immunobuvardage a montré une protéine de 55 kDa se situant dans le cytoplasme contrairement à ZPK qui elle, se retrouve associée aux membranes de l'appareil de Golgi (Douziech *et al.*, 1999). Ce clivage protéolytique pourrait permettre à ZPK de libérer un fragment au niveau du cytoplasme dans le but d'effectuer sa fonction. Cette hypothèse nécessite donc l'identification des protéines susceptibles de la cliver. Cette étude pourrait s'effectuer grâce à l'expression de ZPK dans un système de traduction *in vitro*. Il s'agirait de prendre le produit de cette traduction, le soumettre à différentes enzymes protéolytiques purifiées *in vitro* et de le déposer sur électrophorèse SDS-PAGE afin d'observer le patron de

bandes obtenues. À première vue, ZPK ne semble pas posséder de sites spécifiques pour les enzymes protéolytiques telles que les caspases normalement impliquées dans l'activation des cytokines proinflammatoires et l'apoptose (Salvesen et Dixit, 1997). Cependant, de nouveaux sites non-conventionnels sont à chaque jour identifiés dans différentes protéines (Samejima *et al.*, 1999).

Le rôle physiologique de ZPK devra être plus approfondie *in vivo*. Nous pourrions nous tourner vers l'analyse de l'implication de ZPK dans la modulation des fonctions associées à l'appareil de Golgi. Il a déjà été montré que plusieurs protéines kinases sont impliquées dans le processus de sécrétion constitutive des protéines (Westermann *et al.*, 1996; Davidson *et al.*, 1992). Des expériences telles que la mesure du relâchement des GAGs (glucosaminoglycane) et le transport du sulfate dans l'appareil de Golgi pourraient être effectuées afin d'investiguer la fonction potentielle de ZPK dans cet organe.

CONCLUSION

Les études d'activation sur les protéines kinases sont importantes puisqu'elles permettent de déterminer par quels moyens une cellule répond adéquatement à des stimuli externes. Ces analyses ont permis de caractériser plusieurs protéines et de leur attribuer un rôle spécifique dans l'une ou l'autre des nombreuses voies de signalisation intracellulaire. Dans le cas présent, mon projet d'étude sur ZPK/DLK/MUK n'a malheureusement pu amener une meilleure compréhension de son mécanisme d'activation. L'ensemble des résultats obtenus suggère que ZPK possède des caractéristiques fonctionnelles particulières qui ne semblent pas s'apparenter aux autres membres du niveau MAPKKK. Il nous a été en effet impossible de mesurer avec constance une quelconque activité en réponse aux stimulations.

En effet, mon premier objectif était d'identifier les activateurs potentiels de ZPK. Cependant, en étant incapable de mesurer son activité intrinsèque, nous étions dans l'impossibilité d'y parvenir. L'utilisation d'une méthode indirecte par "pull down" a toutefois permis de suggérer l'implication de ZPK dans l'activation de la voie des JNKs. Des travaux sur l'activation des protéines kinases sont très complexes lorsqu'ils sont effectués sur une protéine récemment clonée et que l'on ne connaît pas encore exactement son substrat spécifique. Par contre, ces études nous ont permis d'observer différents comportements de la protéine et de nous informer sur d'éventuels mécanismes d'action que cette protéine pourrait adopter au cours de la transmission des signaux.

Mon deuxième objectif de travail visait à étudier la relation existant entre la localisation de ZPK et sa capacité à activer la voie des JNKs. Les résultats que nous avons

obtenus suggèrent effectivement une corrélation puisque la BFA semble perturber l'activation de la voie des JNKs. De nombreuses manipulations devront donc être réalisées afin de confirmer ou non la participation de ZPK dans la voie des JNKs.

Malgré les difficultés rencontrées, il va s'en dire que cette étude doit être accomplie car la détection de l'activité d'une protéine kinase constitue un outil essentiel à la détermination de son rôle dans la transmission des signaux. L'identification des facteurs régulant l'activité de ZPK permettra sans aucun doute d'apporter des éclaircissements sur sa participation dans les processus de prolifération, de différenciation et d'apoptose.

ANNEXE 1

Tableau 1. Les acides aminés et leur symbole.

ACIDES AMINÉS			CODONS			
A	Ala	Alanine	GCA	GCC	GCG	GCTC
C	Cys	Cystéine	TGC	TGT		
D	Asp	Aspartate	GAC	GAT		
E	Glu	Glutamate	GAA	GAG		
F	Phe	Phénylalanine	TTC	TTT		
G	Gly	Glycine	GGA	GGC	GGG	GGT
H	His	Histidine	CAC	CAT		
I	Ile	Isoleucine	ATA	ATC	ATT	
K	Lys	Lysine	AAA	AAG		
L	Leu	Leucine	TTA	TTG	CTA	CTC CTG CTT
M	Met	Méthionine	ATG			
N	Asn	Asparagine	AAC	AAT		
P	Pro	Proline	CCA	CCC	CCG	CCT
Q	Gln	Glutamine	CAA	CAG		
R	Arg	Arginine	AGA	AGG	CGA	CGC CGG CGT
S	Ser	Sérine	AGC	AGT	TCA	TCC TCG TCT
T	Thr	Thréonine	ACA	ACC	ACG	ACT
V	Val	Valine	GTA	GTC	GTG	GTT
W	Trp	Tryptophane	TGG			
Y	Tyr	Tyrosine	TAC	TAT		

BIBLIOGRAPHIE

ABE, J-I., 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.

BAEUERLE, P.A., BALTIMORE, D. 1998. I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science.* 242: 540-546.

BEAUDOIN, J., NADEAU, A., BERGERON, P., GRONDIN, G., AND BLOUIN, R. 1994. Identification of a novel putative protein kinase preferentially expressed in brain and the pancreas. *Mol. Biol. Cell* 5: 150a.

BERGERON, P., DOUZIECH, M., DAIGLE, N., BLOUIN R. 1997. Inhibition of cell growth by overexpression of the ZPK gene. *Biochem. Bioph. Res. Commun.* 231: 153-155.

BLOUIN, R., BEAUDOIN, J., BERGERON, P., NADEAU, A., GRONDIN, G. 1996. Cell-specific expression of the ZPK gene in adulte mouse tissues. *DNA Cell Biol.* 15: 631-642.

BOSSMEYER, D. 1995. Protein kinase – structure and function. *FEBS Letters* 369: 57-61.

BURBELO, P.D., DRECHSEL, D., HALL, A. 1995. A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J. Biol. Chem.* 270: 29071-29074.

BUTTERFIELD, L., BROOKE, S., MAAS, L., HEASLEY, L.E. 1997. C-jun NH₂-terminal kinase regulation of the apoptotic response of small cell lung cancer cells to ultraviolet radiation. *J. Biol. Chem.* 272: 10110-10116.

CANAGARAJAH, B.J., KHOKHLATCHEV, A., COBB, M.H., GOLDSMITH, E.J. 1997. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90: 859-869.

CHOW, C., RINCON, M., CAVANAGH, J., DICKENS, M., DAVIS, R.D. 1997. Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* 278: 1638-1641.

COHEN, G.B., REN, R., BALTIMORE, D. 1995. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* 80: 237-248.

COSO, O.A., CHIARIELLO, M., YU, J., 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.

CREW, C.M., ERIKSON, R.L. 1993. Extracellular signals and reversible protein phosphorylation: What to Mek of it all. *Cell* 74: 215-217.

CUENDA, A., DOROW, D.S. 1998. Differential activation of stress-activated protein kinase kinase SKK4/MKK7 and SKK1/MKK4 by the mixed-lineage kinase-2 and mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) kinase-1. *Biochem. J.* 333: 11-15.

DAIGLE, N. 1998. Analyse de l'expression du gène *ZPK* dans la lignée de cellules P19 et production d'un anticorps. Université de Sherbrooke. Sherbrooke. 67 pages.

DAVIDSON, H.W., MCGOWAN, C.H., ET BALCH, W.E. 1992. Evidence for the regulation of exocytic transport by protein phosphorylation. *J. Cell. Biol.* 116: 1343-1355.

DAVIS, R.J. 1993. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 268: 14553-14556.

DEAIZPURUA, H.J., CRAM, D.S., NASELLI, G., DEVEREUX, L., DOROW, D.S. 1997. Expression of mixed lineage kinase-1 in pancreatic β -cell lines at different stages of maturation and during embryonic pancreas development. *J. Biol. Chem.* 272: 16364-16373.

DENHART, D.T. 1996. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multicomplex signalling. *Biochem. J.* 318: 729-747.

DÉRIJARD, B., HIBI, M., WU, I., BARRETT, T., SU, B., DENG, T., KARIN, M., DAVIS, R.J. 1994. JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-jun activation domain. *Cell* 76: 1025-1037.

DHANASEKARAN, N., REDDY, E.P. 1998. Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* 17: 1447-1455.

DICKENS, M., ROGERS, J.S., CAVANAGH, J., RAITANO, A., XIA, Z., HALPERN, J.R., GREENBERG, M.E., SAWYERS, C.L., DAVIS, R.J. 1997. A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* 277: 693-696.

DOROW, D.S., DEVEREUX, L., DIETZSCH, E., DE DRETSE, T. 1993. Identification of a new family of human epithelial protein kinase containing two leucine/isoleucine-zipper domains. *Eur. J. Biochem.* 213: 701-710.

DOROW, D.S., DEVEREUX, L., TU, G., PRICE, G., NICHOLL, J.K., SUTHERLAND, G.R., SIMPSON, R.J. 1995. Complete nucleotide sequence, expression, and chromosomal localisation of human mixed-lineage kinase 2. *Eur. J. Biochem.* 234: 492-500.

DOUZIECH, D., GRONDIN, G., LORANGER, A., MARCEAU, N., BLOUIN, R. 1998. Zonal induction of mixed lineage kinase ZPK/DLK/MUK gene expression in regenerating mouse liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249: 927-932.

DOUZIECH, M., LABERGE, G., GRONDIN, G., DAIGLE, N ET BLOUIN, R. 1999. Localization of the mixed-lineage kinase DLK/MUK/ZPK to the Golgi apparatus in NIH 3T3 cells. *J. Histochem. Cytochem.* (sous presse).

ELION, E.A. 1998. Routing MAP kinase cascades. *Science* 281: 1625-1626.

EZOE, K., LEE, S., STRUNK, K.M., SPRITZ, R.A. 1994. PTK1, a novel protein kinase required for proliferation of human melanocytes. *Oncogene* 9: 935-938.

FAN, G., MERRITT, S.S., KORTENJANN, M., SHAW, P.E., HOLZMANN, L.B. 1996. Dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) activates p46^{SAPK} and p38^{mapk} but not ERK2. *J. Biol. Chem.* 40: 24788-24793.

FANGER, G.R., GERWINS, P., WIDMANN, C, JARPE, M.B., JOHNSON, G.L. 1997. MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and Tpls: upstream regulators of the c-jun amino-terminal kinases? *Curr. Opin. Gen. Dev.* 7: 67-74.

GALLO, K.A., MARK, M.R., SCADDEN, D.T., WANG, Z., GU, Q., GODOWSKI, P.J. 1994. Identification and characterization of SPRK, a novel src-homology 3 domain-containing proline-rich kinase with serine/threonine kinase activity. *J. Biol. Chem.* 21: 15092-15100.

HANKS, S.K., QUINN, A.M., HUNTER, T. 1988. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42-52.

HANKS, S.K., HUNTER, T. 1995. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB* 9: 576-596.

HAYSTEAD, T.A.J., DENT, P., WU, J., HAYSTEAD, C.M.M., STURGILL, T.W. 1992. Ordered phosphorylation of p42^{mapk} by MAP kinase kinase. *FEBS* 306: 17-22.

HELDIN, C.H. 1996. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80: 213-223.

HIRAI, S-I., ISAWA, M., OSADA, S-I., SPYROU, G., OHNO, S. 1996. Activation of the JNK pathway related protein kinase, MEKK and MUK. *Oncogene* 12: 641-650.

HIRAI, S., KATOH, M., TERADA, M., KYRIAKIS, J. M., ZON, L.I., RANA, A., AVRUCH, J., OHNO, S. 1997. MST/MLK2, a member of the mixed lineage kinase family, directly phosphorylates and activates SEK1, an activator of c-jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 272: 15167-15173.

HIRAI, S., NODA, K., MORIGUCHI, T., NISHIDA, E., YAMASHITA, A., DEYAMA, T., FUKUYAMA, K., OHNO, S. 1998. Differential activation of two JNK activators, MKK7 and SEK1, by MKN28-derived nonreceptor serine/threonine kinase/mixed lineage kinase 2. *J. Biol. Chem.* 273: 7406-7412.

HOFFMEYER, A., AVOTS, A., FLORY, E., WEBER, C.K., SERFLING, E., RAPP, U.R. 1998. The GABP-responsive element of the interleukin-2 enhancer is regulated by JNK/SAPK-activating pathways in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 273: 10112-10119.

HOLZMAN, L.B., MERRITT, S.E., FAN, G. 1994. Identification, molecular cloning, and characterization of dual leucine zipper bearing kinase. *J. Biol. Chem.* 269: 30808-30817.

HUNTER, T. 1987. A thousand and one protein kinases. *Cell* 50: 823-25.

HUNTER, T. 1991. Protein kinase classification. *Methods Enzymol.* 200: 3-37.

HUNTER, T. 1995. Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yan of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225-236.

HUNTER, T., PLOWMAN, G.D. 1997. The protein kinases of budding yeast : six score and more. *Trends. Biochem. Sci.* 22: 18-22.

ING, Y.L., LEUNG, I.W.L., HENG, H.H.Q., TSUI, L., LASSAM, N.J. 1994. MLK-3: Identification of a widely-expressed protein kinase bearing an SH3 domain and a leucine zipper-basic region domain. *Oncogene* 9: 1745-1750.

IP, Y.T., DAVIS, R.J. 1998. Signal transduction by the c-jun N-terminal kinase (JNK) – from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 205-219.

JONHSON, L.N., NOBLE, M.E.M., OWEN, D.J. 1996. Active and inactive protein kinase: Structural basis for regulation. *Cell* 85: 149-158.

JONHSON, L.N., LOWE, E.D., NOBLE, M.E.M., OWEN, D.J. 1998. The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS letters* 430: 1-11.

KARIN, M., HUNTER, T. 1995. Transcriptional control by protein phosphorylation : signal transmission from cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.* 5: 747-757.

KATOH, M., HIRAI, M., SUGIMURA, T., TERADA, M. 1995. Cloning and characterization of MST, a novel (putative) serine/threonine kinase with SH3 domain. *Oncogene* 10: 1447-1450.

KAZLAUSKAS, A. 1994. Receptor tyrosine kinases and their targets. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 4: 5-14.

KIEFER, F., TIBBLES, L.A., ANAFI, M., JANSENN, A., ZANKE, B.W., LASSAM, N., PAWSON, T., WOODGETT, J.R., ISCOVE, N.N. 1996. HPK1, a hematopoietic protein kinase activating the SAPK/JNK pathway. *EMBO J.* 15: 7013-7025.

KIEFER, F., TIBBLES, L.A., LASSAM, N., ZANKE, B., ISCOVE, N., WOODGETT, J.R. 1997. Regulation of transcription and translation. *Biochem. Soc. Trans.* 25: 491-498.

KYRIAKIS, J.M., BANERJEE, P., NIKOLAKAKI, E., DAI, T., RUBIE, E.A., AHMAD, M.F., AVRUCH, J., WOODGETT, J.R. 1994. The stress-activated protein kinase subfamily of c-jun kinases. *Nature* 369: 156-160.

KYRIAKIS, J.M., AVRUCH, J. 1996a. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *BioEssays* 18: 567-577.

KYRIAKIS, J.M., AVRUCH, J. 1996b. Sounding the alarm: Protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J. Biol. Chem.* 271: 24313-24316.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

LANDSCHULZ, W.H., JOHNSON, P.F., MCKNIGHT, S.L. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240: 1759-1763.

LASSAM, N.J., LIN, Z., SHENNAN, M.G., COURSEAU, A., THE, B.T., GAUDRAY, P., LARSSON, C. 1997. Fine mapping of the MLK-3 gene within 11q13 and its exclusion as the MEN1 susceptibility gene. *Human Genetics* 99: 776-780.

LAWLER, S., FLEMING, Y., GOEDERT, M., COHEN, P. 1998. Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases *in vitro*. *Curr. Biol.* 8: 1387-1390.

LEUNG, I.W., LASSAM, N. 1998. Dimerization via tandem leucine zippers is essential for the activation of mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MLK-3. *J. Biol. Chem.* 273: 324408-32415.

MADHANI, H., FINK, G.R. 1998. The riddle of MAP kinase signaling specificity. *TIG.* 14: 151-155.

MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., AND SAMBROOK, J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Editeurs: Cold Spring Harbor, NY. Cold spring Harbor Laboratory. 545p.

MARSHALL, C.J. 1994. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4: 82-89.

MATA, M., MERRIT, S.E., FAN, G., GENG, YU, G.G., HOLZMANN, L.B. 1996. Characterization of dual leucine zipper-bearing kinase, a mixed lineage kinase present in synaptic terminals whose phosphorylation is regulated by membrane depolarization via calcineurin. *J. Biol. Chem.* 271: 16888-16896.

MATSUI, N., SARKAR, G., SHUTO, T., MARRS, J., BONK, J.T., MIZUNO, K., BOLANDER, M.E. 1996. Identification of a dual leucine zipper kinase involved in rat fracture repair. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229: 571-576.

MERRIT, S.E., MATA, M., NIHALANI, D., ZHU, C., HU, X., HOLZMAN, L.B. 1999. The mixed lineage kinase DLK utilizes MKK7 and not MKK4 as substrate. *J. Biol. Chem.* 274: 10195-10202.

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.

MINDEN, A., KARIN, M. 1997. Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1333: F85-F104.

MOCHLY-ROSEN, D. 1995. Localization of protein kinases by anchoring proteins : a theme in signal transduction. *Science* 268: 247-251.

NADEAU, A., GRONDIN, G., BLOUIN, R. 1997. *In situ* hybridization analysis of ZPK gene expression during murine embryogenesis. *J. Histochem. Cytochem.* 45: 107-118.

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 Journal.* 17: 149-158.

NATOLI, G., COSTANZO, A., LANNI, A., TEMPLETON, D.J., WOODGETT, J.R., BALSANO, C., LEVRERO, M. 1997. Activation of SAPK/ JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF-2-dependent pathway. *Science* 275: 200-203.

NEEL, B.G., TONKS, N.K. 1997. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Cur. Opin. Cell. Biol.* 9: 193-204.

NIGG, E.A., HILZ, H., EPPENBERGER, H.M., DUTLY, F. 1985. Rapid and reversible translocation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase type II from the Golgi complex to nucleus. *EMBO. J.* 4 : 2801-2806.

PAUL, A., WILSON, S., BELHAM, C.M., ROBINSON, C.J.M., SCOTT, P.H., GOULD, G.W., PLEVIN, R. 1997. Stress-activated protein kinases : activation, regulation and fonction. *Cell Signal.* 9: 403-410.

PAWSON, T., HUNTER, T. 1994. Oncogenes and cell proliferation. *Cur. Opin. Gen. Dev.* 4: 1-4.

PAWSON, T., SCOTT, J.D. 1997. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278: 2075-2080.

PELHAM, H.R. 1991. Multiple targets for brefeldin A. *Cell* 67: 449-451.

PINNA, L.A., RUZZENE, M. 1996. How do proteins recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* 1314: 191-225.

PORTER, A.C., VAILLANCOURT, R.R. 1998. Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene* 16: 1343-1352.

RAITANO, A.B., HALPERN, J.R., HAMBUCH, T.M., SAWYERS, C.L. 1995. The Bcr-Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11746-11750.

RANA, AJAY., GALLO, KATHLEEN., GODOWSKI, P., HIRAI, S., OHNO, S., ZON, L., KYRIAKIS, J.M., AVRUCH, J. 1996. The mixed lineage kinase SPRK phosphorylates and activates the stress-activated protein kinase activator, SEK-1. *J. Biol. Chem.* 271: 19025-19028.

RASMUSSEN, R.K., JI, H., EDDES, J.S., MORITZ, R.L., REID, G.E., SIMPSON, R.J., DOROW, D.S. 1997. Two-dimensional electrophoretic analysis of human breast carcinoma proteins : mapping of proteins that bind to the SH3 domain of lineage kinase MLK2. *Electrophoresis* 18: 588-598.

RASMUSSEN, R.K., JI, H., EDDES, J.S., MORITZ, R.L., REID, G.E., SIMPSON, R.J., DOROW, D.S. 1998. Two-dimensional electrophoretic analysis of mixed lineage kinase 2 N-terminal domain binding protein. *Electrophoresis* 19: 809-817.

REDDY, U.R., PLEASURE, D. 1994. Cloning of a novel putative protein kinase having a leucine zipper domain from brain human brain. *Biochem. Bio. Res. Commun.* 202: 613-620.

REDDY, U.R., NYCUM, L., SLAVC, I., BIEGEL, J.A. 1995. Localization of the human zipper protein kinase gene (ZPK) to chromosome 12q13 by fluorescence *in situ* hybridization and somatic cell hybrid analysis. *Genomics* 25: 597-598.

RODRIGUES, G.A., PARK, M. 1994. Oncogenic activation of tyrosine kinases. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 4: 15-24.

SAKUMA, H., IKEDA, A., OKA, S., KOZUTSUMI, Y., ZANETTA, J., KAWASAKI, T. 1997. Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding a new member of mixed lineage protein kinase from human brain. *J. Biol. Chem.* 272: 28622-28629.

SALVESEN, G.S., DIXIT, V.M. 1997. Caspases: Intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91: 443-446.

SAMEJIMA, K., SVINGEN, P.A., BASI, G.S., KOTTKE, T., MESNER, P.W., STEWART, L., DURRIEU, F., POIRIER, G.G., ALNEMRI, E.S., CHAMPOUX, J.J., KAUFMANN, S.H., EARNSHAW, W.C. 1999. Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274: 4335-4340.

SCHAEFFER, H.J., CATLING, A.D., EBLEN, S.T., COLLIER, L.S., KRAUSS, A., WEBER, M.J. 1998. MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* 281: 1668-1671.

SCHLESSINGER, J. 1994. SH2/ SH3 signaling protein. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 4: 25-30.

SEGER, R., KREBS, E.G. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9:726-735.

STOKOE, D., ENGEL, K., CAMPBELL, D.G., COHEN, P., GAESTEL, M. 1992. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Letters* 313: 307-313.

SUGDEN, P.H., CLERK, A. 1997. Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal.* 9: 337-351.

TANAKA, S., OUCHI, T., HANAFUSA, H. 1997. Downstream of Crk adaptor signaling pathway : activation of Jun kinase by v-Crk through the guanine nucleotide exchange protein C3G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2356-2361.

TANAKA, S., HANAFUSA, H. 1998. Guanine-nucleotide exchange protein C3G activates JNK1 by a Ras-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 273: 1281-1284.

TANIGUCHI, T. 1995. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 268: 251-255.

TAYLOR, S.S., RADZIO-ANDZELM, E., HUNTER, T. 1995. How do protein kinase discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase. *FASEB J.* 9: 1255-1266.

TENG, D.H., PERRY, W.L., HOGAN, J.K., BAUMGARD, M., BELL, R., BERRY, S., DAVIS, T., FRANK, D., FRYE, C., HATTIER, T *et al.* 1997. Human mitogen-activated protein kinase 4 as a candidate tumor supressor. *Cancer Res.* 57: 4177-4182.

TERAMOTO, H., COSO, O.A., MIYATA, H., IGISHI, T., MIKI, T., GUTGIND, J.S. 1996. Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-jun N-terminal kinase/Stress-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 271: 27225-27228.

TIBBLES, L.A., ING, Y.L., KIEFER, F., CHAN, J., ISCOVE, N., WOODGETT, J.R., LASSAM, N.L. 1996. MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6. *EMBO J.* 15: 7026-7035.

TOURNIER, C., WHITMARSH, A.J., CAVANAGH, J., BARRETT, T., DAVIS, R.J. 1997. Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-jun NH₂-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 7337-7342.

TREISMAN, R. 1996. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 205-215.

TSUNODA, S., SIERRALTA, J., ZUKER, C.S. 1998. Specificity in signaling pathways : assembly into multimolecular signaling complexes. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 8: 419-422.

WATANABE, T., YANAGISAWA, M., MATSUBARA, N., OBINATA, M., MATSUI, Y. 1997. Assignment of the murine protein kinase DLK to chromosome 15 in the vicinity of the bt/ Koa locus by genetic linkage analysis. *Genomics* 40: 375-376.

WESTERMANN, P., KNOBLICH, M., MAIER, O., LINDSCHAU, C., ET HALLER, H. 1996. Protein kinase C bound to the golgi apparatus supports the formation of constitutive transport vesicles. *Biochem. J.* 320: 651-658.

WHITMARSH, A.J., CAVANAGH, J., TOURNIER, C., YASUDA, J., DAVIS, R.J. 1998. A mammalian scaffold complex that selectively mediates map kinase activation. *Science* 281: 1671-1674.

WHITMARSH, A.J., DAVIS, R. J. 1998. Structural organisation of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *TIBS*. 23: 481-485.

WILKS, A.F. 1989. Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1603-1607.

WOODGETT, J.R., AVRUCH, J., KYRIAKIS, J.M. 1995. Regulation of nuclear transcription factors by stress signals. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* 22: 281-283.

XIA, Z., DICKENS, M., RAINGEAUD, J., DAVIS, R.J., GREENBERG, M.E. 1995. Opposing effects of ERK and MAP kinases on apoptosis. *Science* 270: 1326-1331.

XIA, Y., WU, Z., SU, B., MURRAY, B., KARIN, M. 1998. JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension. *Genes & Dev.* 12: 3369-3381.

ZHOU, G., BAO, Z.Q., DIXON, J.E. 1995. Component of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 270: 12665-12669.