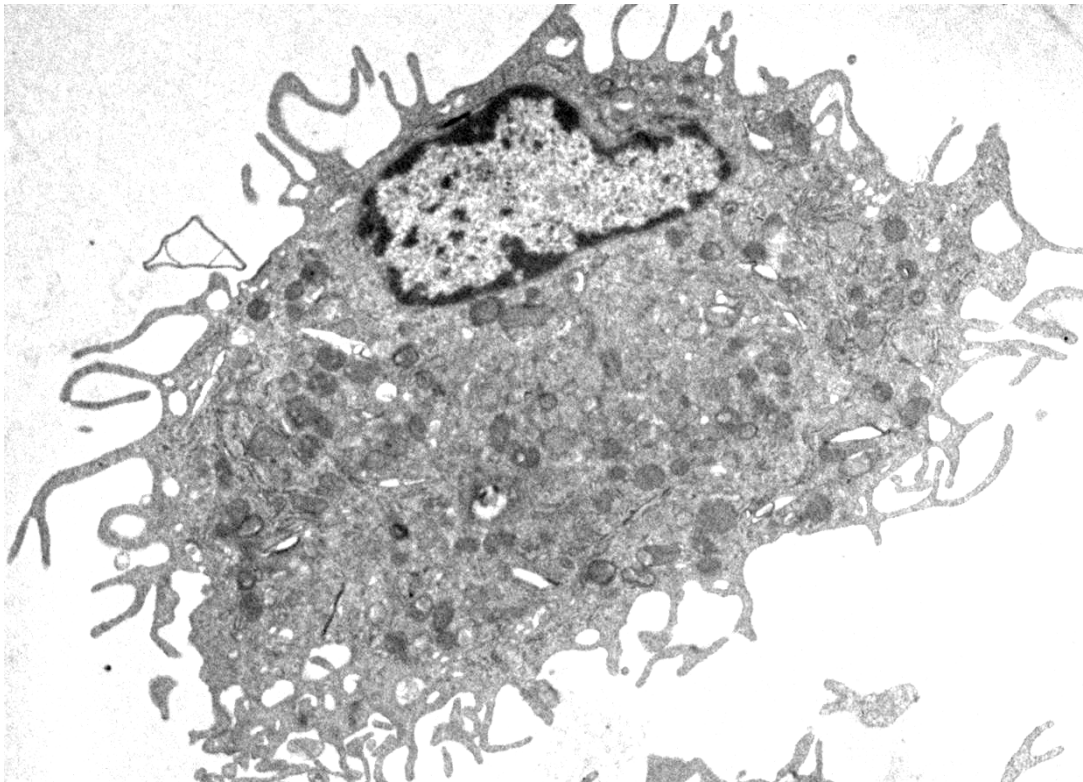


Early steps regulating proliferation and activation in macrophages



Ester Sánchez Tilló

Doctoral Thesis

2006

RESULTS

**M-CSF-induced proliferation
and LPS-dependent activation of
macrophages requires
Raf-1 phosphorylation to induce
MKP-1 expression**

**M-CSF-induced proliferation and LPS-dependent activation of macrophages
requires Raf-1 phosphorylation to induce MKP-1 expression**

Running title: Raf-1 directs MKP-1 expression in macrophages

Ester Sánchez-Tilló, Mónica Comalada, Consol Farrera, Annabel F. Valledor, Jorge
Lloberas and Antonio Celada*

Macrophage Biology Group, Institute of Biomedical Research-University of
Barcelona, Barcelona Science Park, Barcelona, Spain

*Antonio Celada, Institute of Biomedical Research, Barcelona Science Park, c/
Josep Samitier 1-5, E-08028 Barcelona, Spain. Phone 34 93 403 71 65; Fax 34 93
403 47 47; E-mail: acelada@ub.edu

This article can be found in:

The Journal of Immunology, 2006, 176: 6594-6602.

La proliferació induïda per M-CSF i l'activació depenent de LPS en macròfags requereix de la fosforilació de Raf-1 per induir l'expressió d'MKP-1

Resum

Els macròfags són unes cèl·lules essencials en les respostes immunitàries. En absència de senyals activadores, els macròfags derivats de medul·la òssia murina proliferen en la presència del seu factor de creixement específic, el factor estimulador de colònies (M-CSF). La presència de l'LPS implica l'aturada de la proliferació dels macròfags i el redireccionament cap a una resposta proinflamatòria. Tot i que l'activació de les ERKs és necessària tant per la proliferació com per l'activació dels macròfags, la fosforilació d'ERK presenta un perfil més tardà en resposta a agents activadors. En els macròfags primaris, la fosfatasa MKP-1 és crucial en la regulació de la cinètica d'activació de les MAPKs. En aquest treball mostrem que l'expressió de MKP-1 és depenent de l'activació de Raf-1. A més a més, hem observat que PKC ϵ , que prèviament havia estat implicat en la inducció de MKP-1, coimmunoprecipita amb formes fosforilades de Raf-1. De fet, la cinètica d'activació de Raf-1 es correlaciona amb la d'ERK. Tot i això, mentre que la fosforilació d'ERK per M-CSF és depenent de Raf-1, la resposta induïda per l'LPS presenta vies alternatives a Raf-1 per activar les ERKs. La inhibició de Raf-1 provoca un augment de l'expressió d'inhibidors de les quinases depenents de ciclina i una aturada de la progressió del cycle cel·lular. Per contra, no s'observen defectes en la inducció per LPS de citocines proinflamatòries ni en la de la sintasa de l'òxid nítric. Aquestes dades suggereixen nous mecanismes que determinen respostes contràries en la biologia del macròfag.

Resultats

L'activació de Raf-1 és necessària per la inducció de MKP-1 per M-CSF o LPS.

Tot i que la proliferació i l'activació són respostes cel·lulars antagòniques en els macròfags, tant l'M-CSF com l'LPS indueixen l'expressió de la fosfatasa MKP-1, capaç de regular l'extensió de l'activació de les MAPKs (Valledor, Xaus et al. 1999; Valledor, Comalada et al. 2000; Valledor, Xaus et al. 2000). Hem utilitzat l'inhibidor de Raf-1, ZM 336372, que bloqueja la fosforilació tant en tirosina 341 com en serina 338 de Raf-1 necessàries per la seva activació (Marais, Light et al. 1995; Mason, Springer et al. 1999; Chong, Vikis et al. 2003), per estudiar la seva implicació en l'expressió d'MKP-1 (Fig. 1A i 1B). L'efecte del inhibidor es va comprovar amb un assaig d'activitat Raf-1 utilitzant MEK com a substrat (Fig. 1A). La participació de Raf-1, en els temps de màxima expressió d'MKP-1 en presència d'M-CSF i de LPS, es va estudiar per Northern, Western blot i PCR a

temps real (Fig. 1C i 1D), utilitzant dosis no tòxiques del inhibidor (Fig. 5B). L'efecte de Raf-1 sobre MKP-1 també es va corroborar utilitzant RNA d'interferència contra Raf-1, comparant-lo amb un control de transfecció (mock) i amb un siRNA contra un gen independent (Fig. 1E i 1F). Aquests estudis demostren que Raf-1 és necessari per l'expressió d'MKP-1 tant en presència d'M-CSF com de l'LPS (Fig. 1G).

L'estimulació amb M-CSF o LPS promou la interacció de Raf-1 amb PKC ϵ .

Estudis previs del nostre grup demostren que la PKC ϵ regula l'expressió d'MKP-1 en macròfags (Valledor, Xaus et al. 1999; Valledor, Xaus et al. 2000). En conseqüència, vàrem estudiar si hi havia una interacció entre Raf-1 i PKC ϵ durant la senyalització per M-CSF o LPS. Per fer-ho, vam immunoprecipitar PKC ϵ dels lisats cel·lulars i posteriorment vam fer un Western contra Raf-1 fosforilat en serina. Els resultats amb M-CSF (Fig. 2A) i amb LPS (Fig. 2B), demostren que ambdós estímuls presenten formes actives de Raf-1 que coimmunoprecipiten amb PKC ϵ , i que la única diferència que mostren és un patró d'activació de Raf-1 i PKC ϵ més temprà en el cas del M-CSF que en del LPS.

Tot i que Raf-1 s'ha vist implicada en l'activitat Raf-1, assaigs de Western blot de les formes fosforilades d'ERK (Fig. 4A), assaigs "in gel" quinasa (Fig. 4B) i RNA d'interferència de Raf-1 (Fig. 4G), demostren que l'activitat Raf-1 és totalment indispensable per activar a ERK en presència del M-CSF. Aquest efecte es va comprovar també utilitzant altres inhibidors de la funció de Raf-1, com l'arsenit sòdic (SA) i la geldanamycin (Chakravorty, Kato et al. 2001), que bloqueja la unió de Raf-1 a la xaperona hsp90 (Fig. 4C i D). Per contra, els resultats durant l'activació per l'LPS indiquen que l'activació d'ERK es pot dur a terme de forma independent de Raf-1 (Fig. 4E, F, G i H). En el cas d'activació, fins i tot s'observa un allargament de l'activació d'ERK-1/2, JNK i p38, que podria ser explicada per la manca de MKP-1, responsable de defosforilar les MAPKs.

L'activació de Raf-1 amb M-CSF és necessària per la proliferació i progressió del cicle cel·lular.

La implicació de Raf-1 en la proliferació dels macròfags es va estudiar utilitzant dosis creixents de ZM336372 i [3 H]-timidina com a indicador de síntesis d'ADN (Fig. 5A). Els resultats indiquen que la inhibició de Raf-1 provoca una aturada de la proliferació de forma depenent de dosis sense provocar apoptosi (Fig. 5B). Aquests resultats es van corroborar utilitzant arsenit sòdic (Fig. 5C) i RNA d'interferència (Fig. 5D).

La caracterització del cicle cel·lular amb iodur de propidi en presència de l'inhibidor de Raf-1 (Fig. 5E) indica que Raf-1 és necessària per l'entrada en fase S induïda per l'M-

CSF. L'estudi per PCR a temps real de l'efecte del ZM 336372 sobre diferents reguladors del cicle cel·lular, demostra que no afecta l'expressió de les ciclins D1, D2 i D3 (Fig. 5F), però provoca un augment de l'expressió dels inhibidors de les Cdks, p21^{Waf-1} i p27^{Kip-1} (Fig. 5G i H) que podria explicar l'aturada del cicle cel·lular.

L'activació de Raf-1 no és necessària per la producció de citocines induïdes per LPS.

Per estudis de Northern blot hem determinat que la inhibició de Raf-1 no compromet la inducció de citocines en resposta al LPS (Fig. 6A). Fins i tot, s'observa un augment de la producció de citocines que es podria explicar per un allargament de l'activació de les MAPKs en absència d'MKP-1 (Fig. 4F). Tampoc s'observa la implicació de Raf-1 en l'expressió de NOS2 per LPS (Fig. 6B i C). Tots aquests resultats indiquen que l'LPS activa vies alternatives a Raf-1 per activar la MAPK ERK i produir citocines proinflamatòries.

Discussió

En aquest treball hem mirat la implicació de Raf-1 en les diferents funcions dels macròfags. Durant la senyalització per M-CSF, Raf-1 participa en dues funcions crucials que regulen el patró d'activació d'ERK. En primer lloc, Raf-1 provoca una regulació positiva del mòdul MEK-ERK necessari per la proliferació dels macròfags com s'havia descrit amb anterioritat (Wojnowski, Stancato et al. 1998; Mikula, Schreiber et al. 2001). En segon lloc, Raf-1 està implicada en l'expressió de la fosfatasa MKP-1, que regula negativament l'activitat de les MAPKs (Wu and Bennett 2005). Per tant, la duració de l'activitat ERK induïda per M-CSF està sota el control de Raf-1.

Durant l'activació dels macròfags pel LPS, però, l'activitat Raf-1 és dispensable per la fosforilació d'ERK. De fet, en línies macrofàgiques com RAW 264.7 o en macròfags alveolars ja s'havia observat fosforilació d'ERK amb LPS sense activació de Raf-1 (Guthridge, Eidlen et al. 1997; Monick, Carter et al. 2000). Tot i que Raf-1 s'ha descrit com l'activador de MEK-1/2, també s'han descrit vies alternatives a Raf-1 com la serina/treonina quinasa Cot/Tpl2 (Salmeron, Ahmad et al. 1996; Waterfield, Zhang et al. 2003), el proto-oncogen Mos (Nebreda, Hill et al. 1993) i una MEKK de 73-kDa en cèl·lules PC-12 tractades amb EGF (Lange-Carter and Johnson 1994). En correlació amb l'observat, la producció de citocines proinflamatòries i la inducció de NOS2 per LPS tampoc requereix de l'activitat Raf-1. De fet, s'observa un augment de producció que es podria explicar per la desaparició de MKP-1 en presència del inhibidor de Raf-1. Estudis previs indiquen que MKP-1 podria estar limitant la producció de citocines limitant l'extensió de l'activitat de les MAPKs (Chen, Li et al. 2002; Zhao, Shepherd et al. 2005).

Alternativament, també s'han descrit interaccions entre Raf-1 i PI3K, i s'ha suggerit que PI3K podria actuar també com a atenuador de la resposta proinflamatòria induïda pel LPS (Guha and Mackman 2002; Shelton, Steelman et al. 2003).

Per altra banda, la inducció d'MKP-1 pel LPS és un procés depenent de Raf-1, indicant que Raf-1 participa en la regulació de la duració de les MAPKs durant l'activació del macròfag. L'expressió ectòpica de v-raf en macròfags també induïx l'expressió d'MKP-1 (Krautwald, Buscher et al. 1995). La contribució d'MKP-1 en la desactivació de les MAPKs és molt controvertida (Sun, Charles et al. 1993; Wu and Bennett 2005). MKP-1 es va identificar *in vitro* com una fosfatasa específica d'ERK (Kassel, Sancono et al. 2001; Pervin, Singh et al. 2003; Yaglom, O'Callaghan-Sunol et al. 2003), però estudis posteriors indiquen que MKP-1 es pot induir per un gran nombre d'estímuls com mitògens, hormones, estressos oxidatius o de dany al DNA, LPS, citocines proinflamatòries i agents anti-inflamatoris (Keyse and Emslie 1992; Scimeca, Servant et al. 1997; Burgun, Esteve et al. 2000; Kassel, Sancono et al. 2001; Yaglom, O'Callaghan-Sunol et al. 2003). També s'ha vist que MKP-1, conjuntament amb altres fosfatases, pot defosforilar l'activitat de JNK i de p38 segons les circumstàncies (Muda, Boschert et al. 1996; Franklin and Kraft 1997; Tanoue, Yamamoto et al. 2001; Chen, Li et al. 2002; Zhao, Shepherd et al. 2005). Les diferències descrites en la funció d'MKP-1 poden dependre del tipus d'estímul, d'un pic d'activació o d'una inducció sostinguda o bé, del tipus cel·lular emprat. Nosaltres donem la hipòtesi que MKP-1 pot ser un regulador important de molts processos fisiològics com la proliferació, diferenciació, activació i apoptosi, de forma molt coordinada per mecanismes encara per definir (Bennett and Tonks 1997; Chen, Li et al. 2002; Chandrasekharan, Yang et al. 2004; Sakaue, Ogawa et al. 2004; Hamdi, Kool et al. 2005).

El mecanisme pel qual Raf-1 induïx l'expressió d'MKP-1 en macròfags probablement implica l'activació de PKC ϵ (Fig.7). En aquest treball demostrarem que Raf-1 interacciona i és mitjançer de l'activació de PKC ϵ en resposta al M-CSF i al LPS. Treballs previs en macròfags, van establir a PKC ϵ com a regulador de l'expressió d'MKP-1 (Valledor, Xaus et al. 1999; Comalada, Xaus et al. 2003). De fet, el promotor d'MKP-1 conté seqüències AP-1 de resposta a senyals de PKC (Valledor, Xaus et al. 1999), i la inhibició de l'activitat PKC allarga l'activitat ERK per la inhibició de MKP-1. Els estudis d'unió i regulació del promotor d'MKP-1 s'estan duent a terme actualment. Els resultats presentats, però, estan en concordància amb el reclutament de Raf-1 a la membrana per Ras, on pot interaccionar amb PKC (Marais, Light et al. 1995). De fet, la fosforilació de Raf-1 és depenent de la seva associació a la membrana (Valledor, Xaus et al. 1999) i la PKC ϵ es troba de forma constitutiva a la membrana dels macròfags (Valledor, Comalada et al. 2000).

Tot i que l'M-CSF i el LPS activen una diana comuna, la via ERK, s'observa una cinètica diferent d'activació i desactivació que correlaciona amb una funció diferent en el macròfag (Buscher, Hipskind et al. 1995; Valledor, Comalada et al. 2000). Un pic temprà d'activació d'ERK s'associa amb senyals proliferatives; mentre que l'activació implica una activació més tardana, un patró que també s'observa en MEK-1/2 i Raf-1. Per tant, aquests resultats indiquen que algun mecanisme per sobre de Raf-1 ha de ser responsable d'aquestes diferències. Com a exemple, s'ha descrit que Ras està implicat en l'activació de Raf-1 per M-CSF però no per LPS. En aquest cas, sembla que la fosfatidilcolina fosfolipasa C (PL-PLC) és la responsable de l'activació de Raf-1 (Buscher, Hipskind et al. 1995). Les diferències en la cinètica també es podrien deure a diferències en la unió del receptor; el receptor *c-fms* implica una dimerització no covalent i autofosforilació dels dominis tirosina quinasa (Hamilton 1997), mentre que el reconeixement del LPS implica la unió a la proteïna d'unio a LPS (LBP) i l'ensamblatge del TLR4/MD-2 amb CD14 (Shimazu, Akashi et al. 1999; Akashi, Shimazu et al. 2000).

La implicació de Raf-1 en proliferació també s'ha descrit en altres tipus cel·lulars. En fibroblasts, l'activitat Raf-1 és necessària per la transició de G1 a S, com es demostra per l'ús de constructes antisentit i mutants inhibidors de l'activitat de Raf-1 (Kerkhoff and Rapp 1997). De fet, formes oncogèniques actives de Raf-1 inicien la síntesis d'ADN i indueixen la transcripció de gens proliferatius (Jamal and Ziff 1990; Qureshi, Rim et al. 1991; Bruder, Heidecker et al. 1992). En aquest sentit, la deficiència de Raf-1 confirma que és necessària per la viabilitat dels embrions murins i per l'activació de ERK per mitogens en fibroblasts (Wojnowski, Stancato et al. 1998; Mikula, Schreiber et al. 2001). De totes formes, tot i que s'ha vist que Raf-1 oncogènic augmenta l'expressió de ciclina D1 en fibroblasts (Jamal and Ziff 1990), nosaltres no hem observat canvis en la seva expressió. De fet, semblaria que l'augment de p21^{Waf-1} i p27^{Kip-1} observat podria explicar l'arrest del cicle cel·lular vist en absència de Raf-1. D'acord amb les nostres dades, la forma activa de Raf-1 suprimeix l'expressió de p27^{Kip-1} en cèl·lules NIH3T3 (Kerkhoff and Rapp 1997). Les dades presentades eluciden els mecanismes utilitzats pels macròfags per a respondre a senyals proliferatives i activadores.

**c-Jun N-Terminal Protein Kinase 1 (JNK1)
is required for MKP1 (DUSP1) expression in
macrophages and for LPS-dependent
activation**

c-Jun N-Terminal Protein Kinase 1 (JNK1) is required for MKP1 (DUSP1) expression in macrophages and for LPS-dependent activation

Running title: MKP1 (DUSP1) induced expression by M-CSF and LPS requires JNK1 isoform

Ester Sánchez-Tilló¹, Mónica Comalada¹, Jordi Xaus¹, Consol Farrera¹, Annabel F. Valledor¹, Carme Caelles², Jorge Lloberas¹ and Antonio Celada^{1,3}

Macrophage Biology Group¹ and Cell Signalling Group², Institute for Research in Biomedicine-University of Barcelona, Barcelona Science Park, Barcelona, Spain.

**Corresponding author: Antonio Celada, Institute of Biomedical Research, Barcelona Science Park, C/ Josep Samitier 1-5, E-08028 Barcelona, Spain. Phone 34 93 403 71 65; Fax 34 93 403 47 47; E-mail: acelada@ub.edu

Keywords: macrophages, protein kinases/phosphatases, proliferation, activation, signal transduction.

Abbreviations: M-CSF, macrophage colony stimulating factor; LPS, lipopolysaccharide; ERK, extracellular regulated kinase; JNK, c-Jun NH₂-terminal protein kinase; MKP1, mitogen-activated protein kinase phosphatase-1; PKC, protein kinase C.

Acknowledgements: This work was supported by a grant from the *Ministerio de Ciencia y Tecnología* BFU2004-05725/BMC to A.C. We also thank Tanya Yates for editing the manuscript. MKP1 knock-outs were kindly gifted by Andrew C.B. Cato.

Abstract

Macrophages proliferate in presence of their growth factor, M-CSF, in a process dependent on early and short ERK activation. LPS addition induces macrophage activation, stops proliferation and delays ERK activation inducing an inflammatory response. Proliferating or activating responses are balanced by the extent and duration of ERK phosphorylation that is regulated by mitogen kinase phosphatase MKP1 (DUSP1). The transcriptional induction of this phosphatase by both M-CSF and LPS is dependent on JNK. The lack of induction of this phosphatase due to JNK inhibition prolonged ERK-1/2 and p38 activation. The two JNK genes *jnk1* and *jnk2* are constitutively expressed in macrophages. However, only JNK1 isoform is activated and as determined in single knock-out mice is necessary for MKP1 induction by M-CSF and LPS. JNK1 was also required for proinflammatory cytokine biosynthesis (TNF- α , IL-1 β and IL-6) and NO production induced by LPS. This requirement is independent on the role controlling MKP-1 induction as determined in MKP1 knockout mice. These data indicate an selfregulation of MAPKs through induction of phosphatases. Our results demonstrate a critical role for JNK1 as regulator of MKP1 induction and a direct role in the LPS-dependent macrophage activation.

Introduction

Macrophages differentiate and proliferate in the presence of macrophage-colony factor (M-CSF) (Stanley, Berg et al. 1997). However, the proliferation of macrophages is blocked when they become activated by Gram-negative lipopolysaccharide (LPS) or by IFN- γ (Weinstein, Sanghera et al. 1992). Activation causes many biochemical and morphological modifications such as the expression of inducible nitric oxide synthase (NOS2) and the biosynthesis and release of proinflammatory cytokines, including tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 1 (IL-1 β) and IL-6 (Sanghera, Weinstein et al. 1996; Meng and Lowell 1997). The response of macrophages to both growth factor M-CSF and bacterial component LPS requires the phosphorylation of the three members of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family (Chang 2001). The serine/threonine MAP kinases include extracellular signal-regulated protein kinase (ERK-1/2), the stress activated protein kinases (SAPK), p38MAPK and c-Jun NH2-terminal protein kinases (JNK) (Barr and Bogoyevitch 2001). These MAP kinases are responsible for transmitting extracellular signals from the membrane to the nucleus, leading to phosphorylation of several transcription factors and regulation of gene expression (Yang, Sharrocks et al. 2003). Although ERK-1/2 are the main MAPKs involved in macrophage proliferation (Brunet, Roux et al. 1999), the three MAPKs are required in the induction and production

of proinflammatory cytokines and NOS2 by LPS through transcriptional and post-transcriptional regulatory mechanisms (Carter, Monick et al. 1999; Xaus, Comalada et al. 2000).

The correct spatio-temporal regulation of MAP kinase signaling activation is crucial in determining the biological cellular responses to growth or activating factors (Marshall 1995; Valledor, Comalada et al. 2000). In mammalian cells, inactivation of MAPKs through dephosphorylation of phosphotyrosine and phosphothreonine residues is carried out by the MAP kinase phosphatases (MKPs or DUSP) (Camps, Nichols et al. 2000; Keyse 2000). Eleven MKP family members have been identified so far, differing in tissue-specific expression, subcellular localization, posttranslational regulation and substrate specificity within the MAPK family (Keyse 1995; Camps, Nichols et al. 2000; Keyse 2000). Of these, nuclear MKP1, also termed DUSP1, is encoded by an immediate-early response gene (Sun, Charles et al. 1993) induced in macrophages upon stimulation with M-CSF (Valledor, Xaus et al. 1999) or LPS (Valledor, Xaus et al. 2000). Although MKP1 was identified initially as an *in vitro* ERK-specific phosphatase (Sun, Charles et al. 1993; Brondello, McKenzie et al. 1995), it is also capable, depending on the cell type, of dephosphorylating the activity of other components of the MAPK pathway such as JNK and p38MAPK, thus suppressing signaling downstream of MAPKs at the level of gene transcription and proliferation (Franklin and Kraft 1997; Hirsch and Stork 1997; Matsuguchi, Musikacharoen et al. 2001).

Consequently, the mechanisms responsible for regulating MKP1 expression are determinant in the inactivation of MAP kinases in macrophages and their responses. In some cell types such as fibroblasts, MKP1 induction is dependent on ERK-1/2 activation (Brondello, Brunet et al. 1997). By contrast, the results in our group using bone marrow macrophages showed that the activation of MEK/ERK-1/2 cascade is not required for the induction of MKP1 (Valledor, Xaus et al. 1999; Valledor, Xaus et al. 2000). In those studies, we also found that of all PKC isoforms expressed in macrophages, only PKC ϵ was involved in MKP1 transcriptional induction by M-CSF or LPS and consequently in the negative control of ERK activity (Valledor, Xaus et al. 1999; Valledor, Xaus et al. 2000; Stawowy, Goetze et al. 2003).

In this report, we have studied the role of all MAPK family members in the regulation of the MKP1 in primary cultures of macrophages. We observed that only JNK and specifically the JNK1 isoform, is involved in MKP1 induction by both M-CSF and LPS, thus regulating the activation of the other MAPKs. In addition, we demonstrate a role of JNK1 in mediating the expression of inducible nitric oxide synthase (NOS2), chemokines and pro-inflammatory cytokines during LPS and TNF- α activation. These results show that the JNK1 isoform plays a crucial role in macrophage biology.

Materials and methods

Reagents. LPS, actinomycin D, propidium iodide, Wortmannin, LY294002, anti-ERK^P Thr183/Tyr185 and anti- β -actin Abs were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). In several experiments, the results obtained with commercial LPS were compared with highly purified LPS from *Salmonella abortus equi*, kindly donated by Dr. C. Galanos (Max Planck Institute, Freiburg, Germany) (Merlin, Sing et al. 2001), and no differences were found. Recombinant M-CSF and IFN- γ were from R&Systems Inc. (Minneapolis, MN). Murine TNF- α (10 ng/ml) was obtained from Preprotech (London, UK). The p38^P (Thr180/Tyr182) MAP kinase Ab was from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). The anti-JNK1, JNK2 and MKP1 Abs were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). PD98059, GF109203X, SB2030580, SP600125 and NOS2 Ab were from Calbiochem (San Diego, CA). Secondary HRP anti-mouse (MP Biomedicals, Irvine, CA) and anti-rabbit (Sigma) Abs were used.

Cell Culture. Bone marrow macrophages were obtained from six-week old BALB/c mice (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain) and cultured as previously described (Celada, Gray et al. 1984). Macrophages were cultured during 6 days in DMEM (BioWhittaker-Cambrex, Emerainville, France), supplemented with 20% fetal calf serum (FCS) (Sigma-Aldrich) and 30% L-cell conditioned media. The use of animals was approved by the Animal Research Committee of the University of Barcelona (number 2523). Macrophages (80-90% confluent) were synchronized by culture with 10% FCS during 18 hours (Celada, Gray et al. 1984). Macrophages from PKC ϵ - and MKP-1 knock-out mice (Dorfman, Carrasco et al. 1996; Castrillo, Pennington et al. 2001) were obtained in the same way.

Cell surface staining. Analysis of cell surface receptors was performed as described (Herrero, Marques et al. 2001). 1×10^6 cells/ml were incubated with primary antibodies against Ly-71 (F4/80) and CD11b (Mac-1) FITC Abs (eBioscience, San Diego, CA), after blocking Fc γ receptors with anti-CD16/CD32 (Fc γ III/II receptor) Ab (Pharmingen, San Diego, CA). Detection was done directly or after incubation with FITC anti-rabbit IgG (Sigma). Cells were fixed with paraformaldehyd solution previous to flow cytometry analysis (Epics XL, Coulter Corporation, Hialeah, FL). Each figure is representative of three independent experiments with triplicates expressed as the mean \pm S.D. Dead cells, characteristic for low forward and side light scatter, were excluded. Blocking and direct incubation with secondary Ab was used as negative control.

Apoptosis assay. Cell viability was assessed by particle counting using FACS (Coulter Multisizer II, Midland, Canada) and confirmed by trypan blue exclusion. Cell death was also assessed by FACS analysis using the rAnnex V-FITC kit (Bender MedSystems, Burlingame, CA) following manufacturer's instructions. Actinomycin D (Act D) was used as positive control of apoptosis. Each point was performed in triplicate and the results were expressed as the mean value \pm S.D.

Western blot analysis. Total cytoplasmic extracts were made by lysing cells as previously described (Xaus, Cardo et al. 1999). SDS-PAGE was performed and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-C, Amersham Biosciences, UK). After blocking, incubation with primary Abs and secondary Ab was carried on, and detection was done using EZ-ECL kit (Biological Industries, Kibbutz beit Haemek, Israel) and exposed to X-ray films (Agfa, Mortsel, Belgium). β -actin was used as loading control. Analysis of maximal expression was determined with a Molecular Analyst System (Bio-Rad Labs., Richmond, CA).

"In gel" kinase assay. ERK activity was analyzed as previously described using 50-100 μ g of total protein obtained as described above and separated by 12,5% SPD-PAGE containing 0,1 mg/ml of myelin basic protein (MBP) (Sigma) as substrate co-polymerized in the gel (Valledor, Comalada et al. 2000). After several washes, denaturing and renaturing, phosphorylation assay was performed with 50 μ M ATP and 100 μ Ci γ ³²P-ATP (Amersham).

JNK activity assay. JNK activity was measured as previously described (Caelles, Gonzalez-Sancho et al. 1997). Briefly, cell were lysed and immunoprecipitated with protein A-sepharose and anti-JNK1 or anti-JNK2 Ab. After several washes, the reaction was performed with 1 μ g GST-c-jun (1-169) (MBL, Woburn, MA) as JNK substrate, 20 μ M ATP and 1 μ Ci γ ³²P-ATP. SDS-PAGE electrophoresis was performed and exposed to Agfa X-ray films.

RNA extraction and Northern blot analysis. Total RNA was extracted with the RNA Kit EZ-RNA (Biological Industries). 10-15 μ g were separated in agarose gel containing formaldehyde and transferred to nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences). Probes for MKP1, IL-6, IL-1 β , TNF- α and 18S were labeled with ³²P- α -dCTP (Amersham Pharmacia Biotech) using the random prime labeling system (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). 18S was used as loading control.

Real Time PCR. cDNA was obtained from 1 µg of total RNA using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI) as described (Marques, Bruce et al. 2004). The primers sequences used for MKP1, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and NOS2 were design with Primer Express software (Applied Biosystems). The primers were indicated in Table I. Real time PCR was carried out with 2X SYBR Green PCR Master Mix using the ABI Prism 7900 detection system (Applied Biosystems, Foster city, CA). Thermal cycling conditions were 94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 30s for 35 cycles. Data were expressed as relative mRNA values normalized to β -actin expression levels in each sample. Results represent one of three independent experiments performed in triplicate.

Statistical analysis. To calculate the statistical differences between the control and treated samples, we used the Student's paired t-test. Values of $p < 0.05$ or lower were considered significant.

Results

Although ERK-1/2 activation is required for both macrophage proliferation and activation, the kinetics of their phosphorylation as well as their activation correlates with different macrophage responses (Valledor, Comalada et al. 2000). In macrophages stimulated with M-CSF or LPS, the induction of the MKP1 phosphatase correlates with the dephosphorylation of ERK-1/2 (Valledor, Xaus et al. 1999; Valledor, Xaus et al. 2000). Because of inefficient transfection of primary cultures of macrophages (Celada, Borrás et al. 1996), we studied the effect of MAP kinase activation on MKP1 induction with the use of specific inhibitors. In several cellular models, PD 098059, SB 203580 and SP 600125 were used as selective inhibitors of the activation of MEK/ERK, p38 and all JNK isoforms, respectively (Alessi, Cuenda et al. 1995; Cuenda, Rouse et al. 1995; Bennett, Sasaki et al. 2001). These compounds also inhibit the MAP kinases in our model of macrophages (Fig. 1A, B and C).

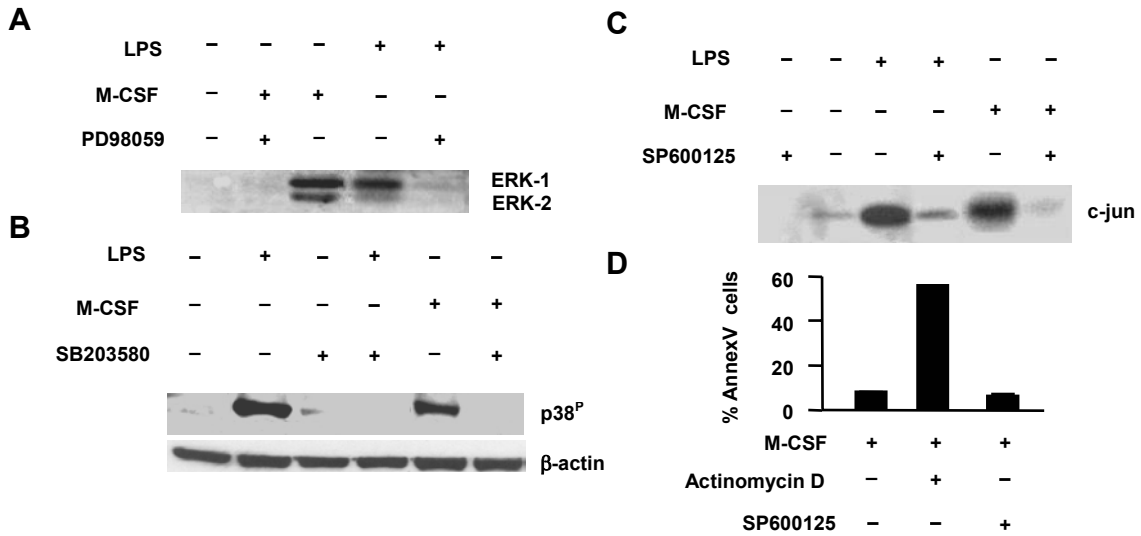


Figure 1. PD98059, SB203580 and SP600125 were used as inhibitors of ERK-1/2, p38 and JNK MAP kinases activated by M-CSF and LPS. Macrophages were pretreated for 1h with the different reagents and then stimulated for 30 min with M-CSF (3200 U/ml) or LPS (10 ng/ml). A) PD 98059 (50 μM) inhibited ERK-1/2 activation as determined by “in gel” kinase assay. B) SB 203580 (5 μM) inhibited p38 phosphorylation as determined by Western blot using an antibody against the phosphorylated form. β-actin was used as control of loading and transfer. C) JNK activity was inhibited by SP 600125 (20 μM) as determined by a kinase assay. D) SP 600125 is not toxic for macrophages. Determination of Annexin V positive cells stimulated with M-CSF in the presence of SP 600125. Actinomycin D (5 μg/ml) was used as positive control of apoptosis. All the figures are representative of independent experiments that were repeated three to five times with similar results.

To test the role of MAPK on MKP1 induction by M-CSF and LPS, we inhibited p38 or ERK-1/2. No effect was found (Fig. 2A and 2B). Interestingly, when we studied the role of JNK on MKP1 protein expression, we observed that JNK activation was required (Fig. 2C and 2D). Northern blot analysis for MKP1 showed that the inhibition of JNK blocked mRNA induction (Fig. 2E and 2F). The dependence of JNK was also checked by Real-Time PCR (data not shown). Because the half live of mRNA of MKP-1 is short (Lin and Yang 2006), we wanted to determine if the decrease in the levels of mRNA are due to an inhibition of the production of mRNA degradation in the presence or absence of inhibitors of JNK. The cells were treated for 30 minutes with M-CSF or LPS and then actinomycin D was added at a concentration (5 μg/ml) sufficient to block all further RNA synthesis, as determined by [³H]UTP incorporation (Celada and Maki 1989), and then RNA was isolated from aliquots of cells at 15, 30 and 60 minutes after the addition of actinomycin D, which allowed us to estimate the half-life of MKP1. These mRNA are very unstable and the inhibition of JNK does not show any modification of the half-

life of mRNA (Fig. 2G and 2H). These results demonstrate that the reduction of the levels of mRNA was due to a decrease at the level of transcription.

In macrophages treated with either M-CSF or LPS, SP 600125 did not modify the induction of ERK-1/2 activation as determined by in-gel kinase assay containing MBP as substrate (Fig. 3A) or by Western blot using specific antibodies to the phosphorylated form of ERK-1/2 (Fig. 3B). Although the activity of these kinases is not modified, the length of activation was prolonged, showing an effect of JNK inhibition on the other MAPKs. Similar effects were seen in p38 phosphorylation induced by M-CSF (Fig. 3C) or LPS (Fig. 3D). However, when we tested the involvement of ERK and p38 activation in the JNK activity no modifications were seen (Fig. 3E and 3F). These results suggest that JNK activity was not required for the activation of the other MAPKs and supports the critical role of JNK as regulator of MKP1 phosphatase which controls the length of activity of other MAPKs.

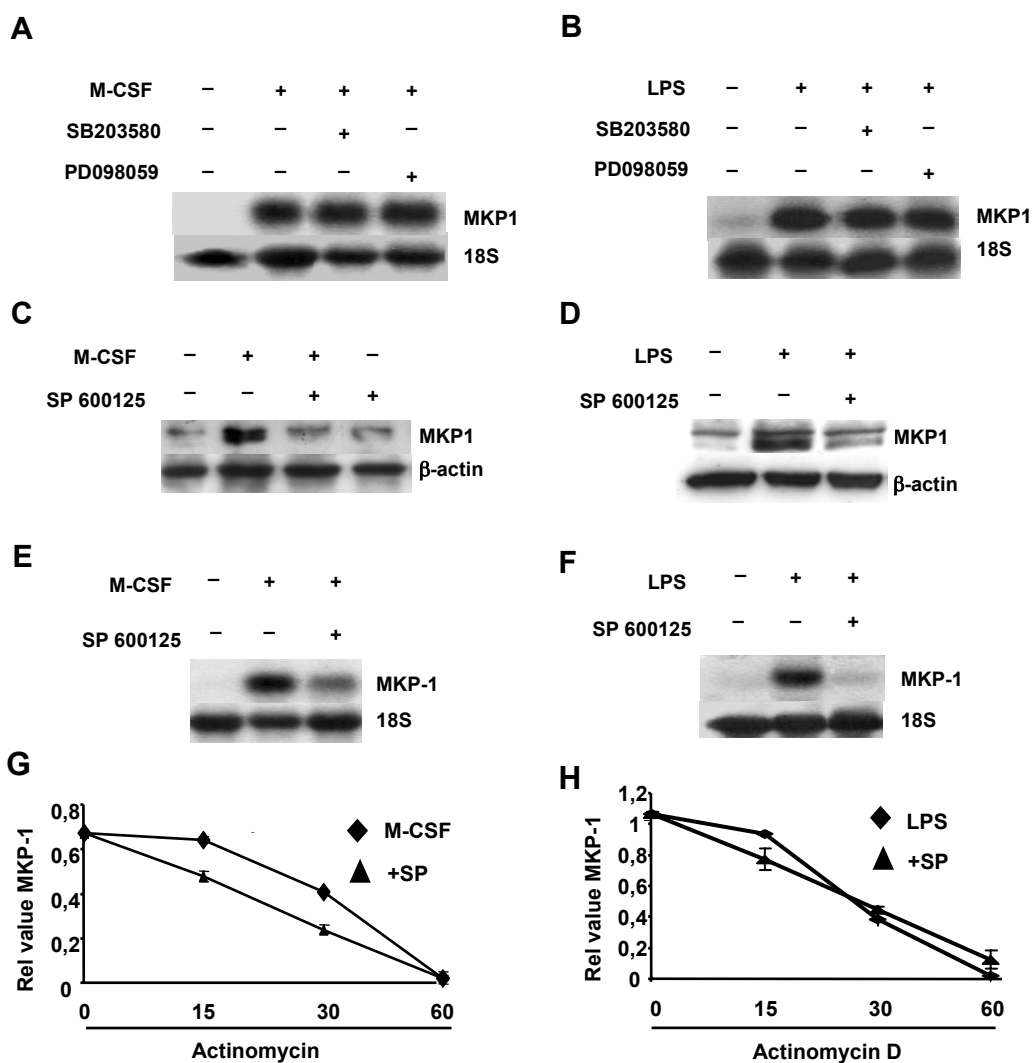


Figure 2. JNK MAP kinase is required for MKP1 expression induced by M-CSF or LPS. A and B) ERK-1/2 and p38 are not involved in MKP1 induction by M-CSF or LPS. Northern blot analysis of MKP1 expression of

macrophages pretreated with the indicated inhibitors and then stimulated with M-CSF (30 min) or LPS (45 min). C and D) JNK is implicated in MKP1 expression by M-CSF and LPS. Western blot of MKP1 from cells pretreated with SP 600125 and stimulated with M-CSF (45 min) or with LPS (60 min). E and F) Northern blot of MKP1 phosphatase from cells incubated in the presence or absence of SP 600125. β -actin was used as control. All the figures are representative of three independent experiments. G and H) SP 600125 does not increase MKP-1 degradation by M-CSF or LPS. MKP-1 Real-Time PCR in presence of M-CSF and LPS in SP 600125 1h pretreated or not macrophages. After 30 min for M-CSF and 45 min with LPS, Actinomycin was added at indicated times.

We also wanted to know the role of JNK during LPS activation. Total RNA from 1 hour pretreated macrophages with SP 600125 and LPS stimulated cells at indicated times was analyzed for proinflammatory cytokine expression by Northern blot (Fig. 4A). The expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 was severely compromised when in macrophages the JNK activity was inhibited. These results were confirmed using Real-Time PCR (data not show). Furthermore, SP 600125 treatment caused a substantial reduction of LPS induced NOS2 expression by Western blot (Fig. 4B). These data suggests that JNK activation mediates macrophage activation by LPS.

To define whether the role of JNK in cytokine induction was a direct or was mediated through MKP-1 regulation, we used macrophages from mice with MKP1 disrupted gene (Dorfman, Carrasco et al. 1996). In these cells LPS induced JNK activity similar to macrophages of wild type mice (Fig. 4C). The LPS induced proinflammatory cytokines expression in MKP1 knockout cells was analyzed using Northern blots (Fig. 5D). An increased expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 was found in these macrophages. This demonstrates that the effect of JNK in LPS activation of macrophages is unrelated to the impaired MKP-1 regulation.

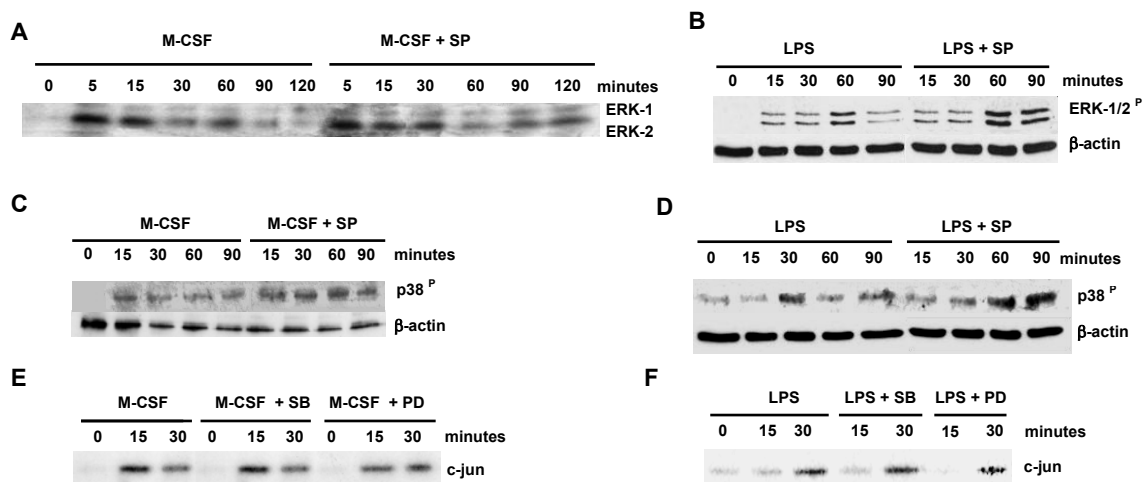


Figure 3. Inhibition of JNK activation causes an elongation of activation of other MAPKs. A) JNK inhibition delays M-CSF induced ERK deactivation. Macrophages were pretreated with SP 600125, stimulated

with M-CSF for the indicated times and ERK activity determined by an in gel kinase assay using MBP as copolymerized substrate. B) Elongated ERK-1/2 activation in JNK inhibited and LPS stimulated macrophages. Western blot analysis of ERK-1/2 phosphorylation of macrophages pretreated with SP 600125 and stimulated with LPS at indicated times. C and D) p38 phosphorylation is extended in JNK inhibited macrophages. Phosphorylated p38 was determined by Western blot analysis of macrophages pretreated with SP 600125 and stimulated with M-CSF or LPS. E and F) JNK activation is independent of ERK or p38. JNK activity was determined in macrophages stimulated with M-CSF or LPS in the presence of SB 203580 or PD 98059. All the figures are representative of independent experiments that were repeated three to five times with similar results.

Up to now, 10 different isoforms resulting from three encoding genes of JNK, *jnk1*, *jnk2* and *jnk3*, have been characterized (Kyriakis, Banerjee et al. 1994; Gupta, Barrett et al. 1996; Barr and Bogoyevitch 2001). JNK1 and JNK2 are ubiquitously expressed whereas JNK3 is restricted to brain, testis and heart (Gupta, Barrett et al. 1996; Davis 2000). We wanted to determine which JNK isoforms were predominantly expressed when macrophages proliferate or become activated by LPS. Using PCR with specific primer pairs (Table I) the mRNA levels of each isoform were determined. Both JNK1 and JNK2 were constitutively identified (Fig. 5A). However, JNK3 was not expressed on macrophages even after treatment with M-CSF or LPS. Therefore we focused our studies in the activation of these isoforms. For JNK1 two different protein products were detected. While the p46 was constitutively present, the p54 was detected preferentially after M-CSF treatment (Fig. 5B). For JNK2 only p54 was detected and was not modified by the treatments with M-CSF, LPS or TNF- α (Fig. 5C).

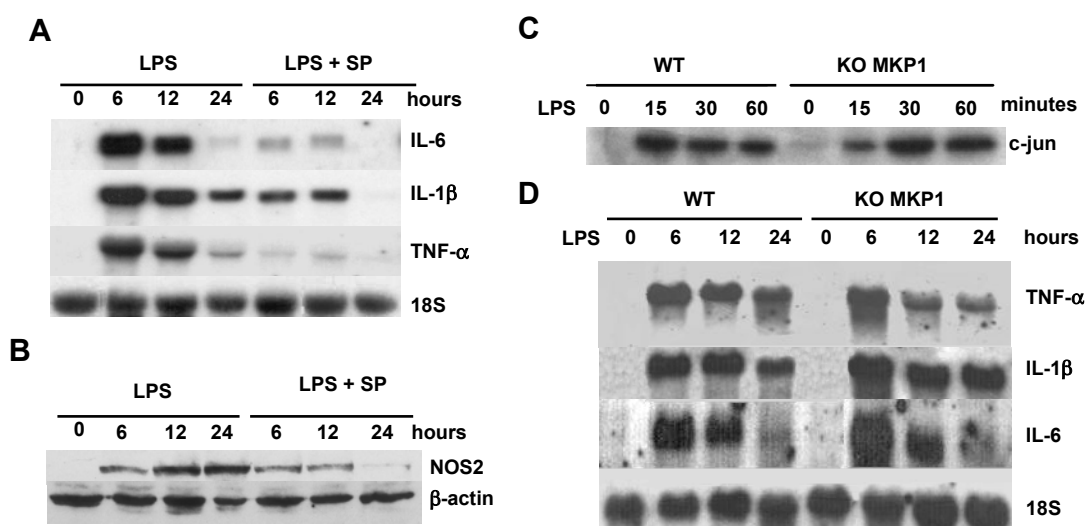


Figure 4. JNK is required for LPS-dependent activation. A) JNK is involved in LPS-dependent proinflammatory cytokine production. IL-6, TNF- α and IL-1 β gene expression were determined by Northern

blot analysis. B) JNK is required for LPS-dependent expression of NOS2. Western blot of NOS2 protein from total cell lysates of LPS stimulated cells in the presence of SP 600125. C) MKP1 deficient macrophages present intact LPS induced JNK activity. JNK activation was determined by JNK assay of LPS stimulated macrophages at indicated times. D) MKP1 absence slightly increases LPS-induced cytokine expression. Northern blot analysis of TNF- α , IL-1 β and IL-6 gene expression of LPS stimulated macrophages derived from wild type and MKP1 deficient mice. All the figures are representative of independent experiments that were repeated three to five times with similar results.

To evaluate which JNK isoform was active during proliferation or during activation, we immunoprecipitate the anti-JNK isoform and then phosphorylation assays using c-Jun as substrate were performed. Both stimuli, LPS and M-CSF, induced a strong activation of JNK1 isoform with a similar time course (Fig. 5D). Under these experimental conditions no JNK2 activity was detected.

To confirm these data macrophage from single JNK knock-out mice were used. The maturation of bone marrow derived macrophages was characterized measuring F4/80 and Mac-1 surface expression, as markers of macrophage terminal differentiation (Pahl, Scheibe et al. 1993; McKnight, Macfarlane et al. 1996). The analysis using cytometry did not revealed significant differences in the macrophages of the two single JNK knock-out mice in comparison to wild type (Fig. 6A). Apoptosis was also determined by detection of phosphatidyl serine exposure. In macrophages from controls and JNK1 KO mice, M-CSF rescue from the apoptosis induced by the absence of growth factors (Fig. 6B). However, in macrophages from JNK2 deficient mice M-CSF has no protective effect.

The results, so far, suggested that the JNK1 isoform is involved in the MKP-1 induced transcription by M-CSF and LPS. To corroborate these results we performed studies with JNK1 and JNK2 single knock-out mice. Using macrophages from JNK2 deficient mice, the LPS-dependent JNK1 activity was detected (Fig. 6C). While in macrophages of wild type mice no JNK2 activity was observed, in JNK1 KO macrophages we detected JNK2 activity (Fig. 6D). Neither JNK1 nor JNK2 activity was detected in JNK1 and JNK2 knock-out macrophages respectively (data not shown).

Next we wanted to know the effect of the *in vivo* inactivation of JNK1 and JNK2 on the MKP1 expression. Under both stimuli, LPS and M-CSF, the absence of JNK1 caused a decrease in MKP1 induced expression, similar to that produced by the inhibition of JNK with SP 600125 (Fig. 7A and 7B). However, no inhibition of MKP1 expression was observed in the absence of JNK2 (Fig. 7C and 7D). In these macrophages, SP 600125 inhibits the expression of the phosphatase showing that a JNK isoform other than JNK2 was involved in the transcription of MKP-1.

The JNK mediates its effects through induction and activation of the transcription factor c-jun (Derijard, Hibi et al. 1994; Davis 2000). In macrophages from wild type mice M-CSF or LPS induce the expression of c-jun. However, in macrophages from the JNK1 knock-out mice the expression of c-jun was blocked (Fig. 7G and 7F).

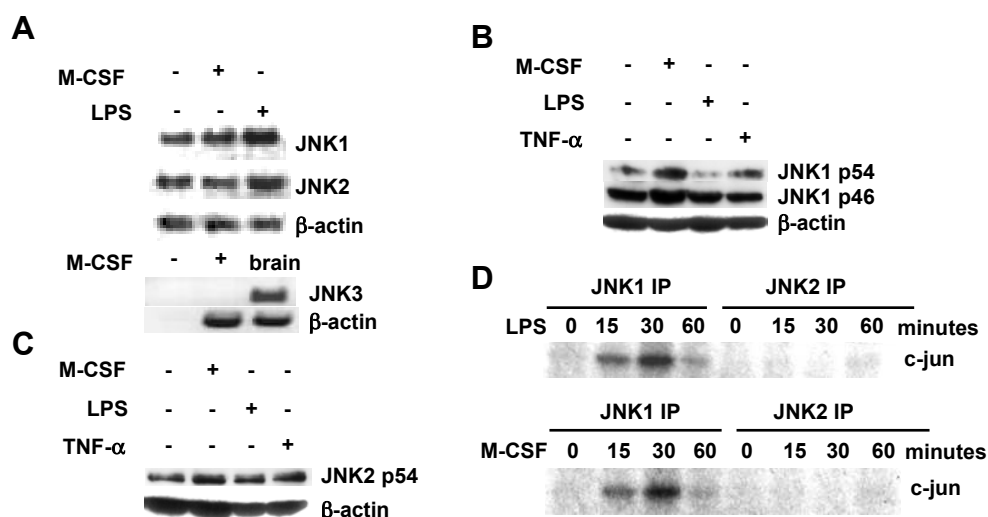


Figure 5. Macrophages express both JNK1 and JNK2 constitutively although JNK1 is the main active isoform induced by M-CSF and LPS. A) Macrophages express JNK1 and JNK2 constitutively. PCR of JNK1, JNK2 and β-actin from cell lysates of macrophages treated during 30 min with M-CSF (3200 U/ml). B) Macrophages express p54 and p46 JNK1 isoforms as determined by Western blot. C) Macrophages also express p54 JNK2 isoforms. D) JNK1 is the main isoform induced by M-CSF or LPS. JNK assay from JNK1 and JNK2 immunoprecipitated cell lysates of cells stimulated with LPS or M-CSF.

The proinflammatory cytokines such as TNF-α, IL-1β and IL-6 are AP-1 dependent genes (Baillly, Fay et al. 1996; Yao, Mackman et al. 1997). Consequently, the effect of the different JNK isoforms on the proinflammatory response of macrophages was determined using Real-Time PCR. The absence of JNK1 was critical for TNF-α, IL-6, IL-1β or NOS2 induction by LPS (Fig. 8A). Similar results were found when we used TNF-α as activator. The JNK2 involvement was also determined but no defects in cytokine production were observed (Fig. 8B). The inhibition of JNK or ERK in macrophages from the JNK2 KO mice blocked the LPS-dependent cytokine production. The synthesis of NOS2 protein induced by LPS or by IFN-γ stimulation was studied in macrophages of JNK2 knock-out mice. No differences in protein levels of this enzyme were observed (Fig. 8C). These data corroborate the critical role of JNK1 as mediator of LPS-induced macrophage activation.

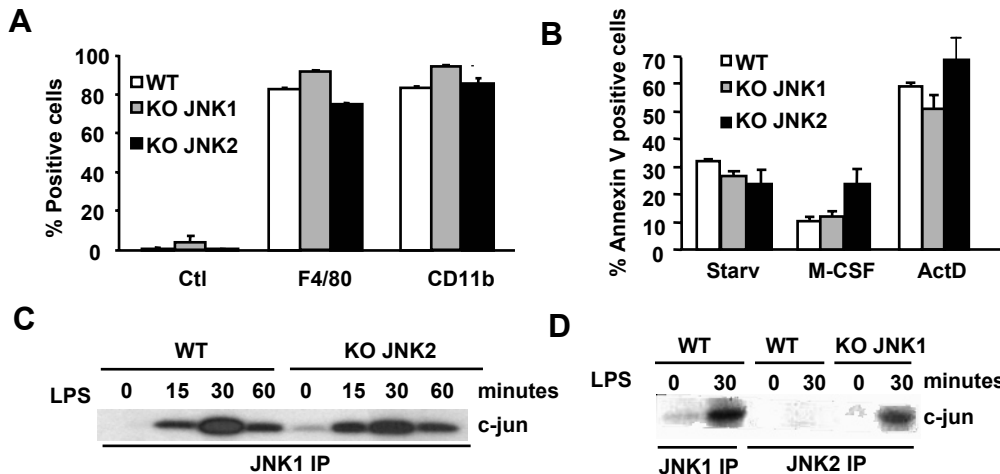


Figure 6. Characterization of macrophages from JNK1 and JNK2 single knock-out mice. A) Macrophage differentiation was not altered in JNK2 and JNK1 knock-out mice. FACS analysis of Ly-71 (F4/80) and CD11b surface expression of one week old BMDM. B) Similar apoptosis yields in BMDM of JNK1 and JNK2 deficient mice. Annexin V analysis of macrophages from JNK1 and JNK2 knock-out mice in presence or absence of M-CSF. Actinomycin D was used as positive control. C) LPS induces JNK1 activity in JNK2 knock-out macrophages. JNK1 assay from JNK2 deficient macrophages stimulated with LPS. D) Increased JNK2 activity induced by LPS in JNK1 deficient macrophages.

In summary, our results demonstrate that JNK1 is involved in two mechanisms critical for macrophage functions, the induction of the MKP1 phosphatase that is responsible for deactivating MAPKs and in the proinflammatory response induced by LPS.

Discussion

In macrophages the regulation of MKP1 which limits the extent and duration of ERK kinase signaling correlates with the determination of two opposite responses such as proliferation or activation (Valledor, Comalada et al. 2000). It seems logical to present a scenario where the same kinases that need to be dephosphorylated regulate the expression of the phosphatases. In fact, this was observed in fibroblasts where the expression of MKP1 is regulated by ERK or p38MAPK (Brondello, Brunet et al. 1997; Slack, Seternes et al. 2001). However, our results in macrophages allow us to conclude that neither ERK or p38 (Valledor, Xaus et al. 1999; Valledor, Xaus et al. 2000) are involved in MKP1 induction upon M-CSF or LPS stimulation.

In this report, we demonstrate that the MAP kinase JNK is required for the expression of MKP1 in macrophages. Therefore, both M-CSF and LPS signals, which lead to MAP kinase activation, also lead to the induction of a specific MAP kinase attenuator through the activation of one of the MAPKs, providing a direct negative feedback

mechanism inducing JNK to control the extent of ERK-1/2 and p38 activity. In fact, Cos-7 transfected cells with an active form of Jun also exhibit attenuated ERK activation showing a cross-talk between JNK and ERK pathways (Shen, Godlewski et al. 2003). This regulation of the MAP kinase-signaling cascade as well as between JNK and MKP1 phosphatase has also been observed in other cell types and seems to contribute to the inhibition of cell growth (Cano and Mahadevan 1995; Bokemeyer, Sorokin et al. 1996; Shen, Godlewski et al. 2003).

The study of the JNK isoforms involved in MKP1 induction in macrophages showed that although both JNK1 and JNK2 isoforms were expressed in macrophages, the main JNK activity induced by both M-CSF and LPS comes from the JNK1 isoform, as previously described (Dreskin, Thomas et al. 2001). Data reported give evidence of major JNK1 implication in MKP1 transcriptional induction by both M-CSF and LPS probably through c-jun transcriptional regulation. Similarly, gain-of function JNK1 studies in fibroblast showed MKP1 increased induction (Han, Kim et al. 2002). The study of other phosphatases regulated by the different JNK isoforms and the role of AP-1 on the regulation of MKP1 transcription in the presence of M-CSF and LPS is currently being carried on.

Although JNK has been considered primarily as a stress-responsive protein kinase, a role in differentiation, proliferation and cell death has also been suggested (Angel and Karin 1991; Antonyak, Moscatello et al. 1998; Potapova, Gorospe et al. 2000; Sabapathy, Kallunki et al. 2001; Shaulian and Karin 2001). When JNK isoforms are eliminated, as described in T and B lymphocytes (Yang, Conze et al. 1998; Sabapathy, Hu et al. 1999; Constant, Dong et al. 2000; Dong, Yang et al. 2000), no defects in macrophage development were observed. However, different alterations in their functional activities have been observed. In the presence of M-CSF a small increase of cell death in JNK2 deficient macrophages was observed. It has been reported that growth factors stimulate the JNK activity and that, under some circumstances, JNK can also play a protective role supporting cell survival through Akt interaction (Logan, Falasca et al. 1997; Lopez-Illasaca, Li et al. 1997; Aikin, Maysinger et al. 2004; Sunayama, Tsuruta et al. 2005). In our model, we have observed no defects in proliferation in JNK single knock-outs (data not shown). However, in JNK1/JNK2 double knock-out, which die embryonically and display complete absence of JNK activity, fibroblasts proliferate more slowly (Sabapathy, Jochum et al. 1999; Tournier, Hess et al. 2000). Therefore, this suggests that signal transduction induced by M-CSF preferentially activates JNK1 but in its absence may activate JNK2 for proliferation and apoptosis not to be compromised.

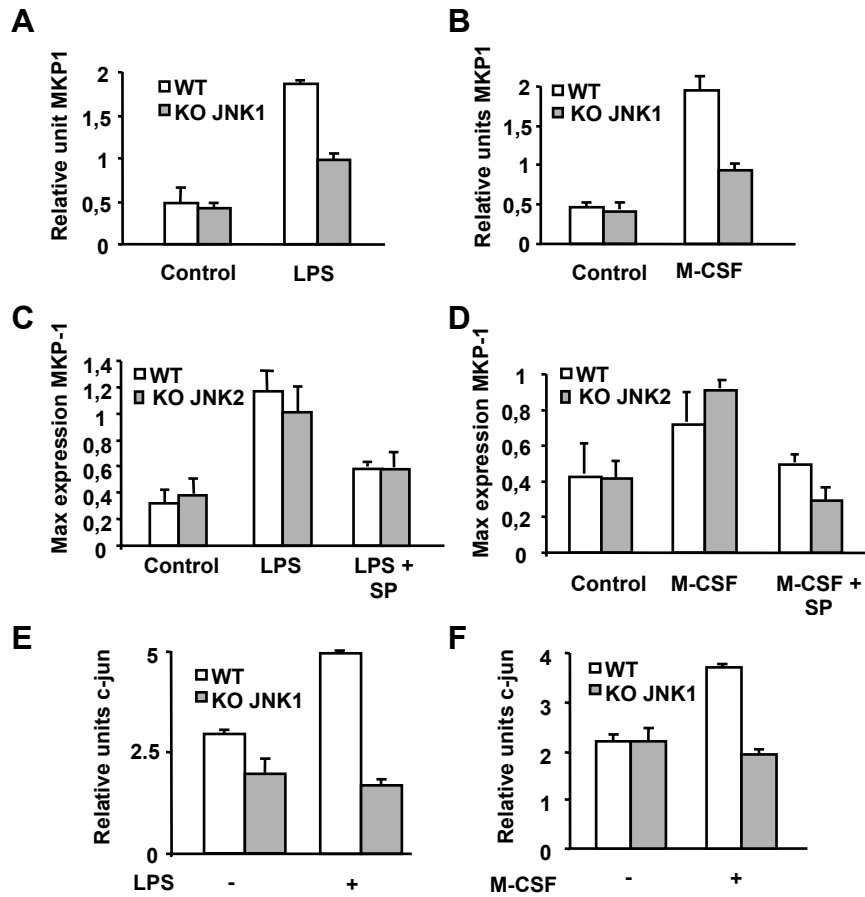


Figure 7. JNK1 is required for MKP1 induction by LPS or M-CSF. A and B) JNK1 is implicated in MKP1 induction by both LPS and M-CSF. Real Time-PCR relative values of MKP1 of LPS or M-CSF stimulated macrophages from JNK1 deficient macrophages in the presence and absence of the JNK inhibitor SP600125 or the inhibitor of conventional and novel PKC isoforms, GF. C and D) JNK2 is not involved in MKP1 induction by LPS. Maximal expression of MKP1 Western blot from wild type and JNK2 knock-out deficient macrophages stimulated with LPS at indicated times pre-treated or not with GF or SP inhibitors. E and F) JNK1 deficient mice are not able to induce c-jun by LPS or by M-CSF. Real Time-PCR relative values of c-jun from LPS and M-CSF stimulated JNK1 knock-out macrophages at indicated times.

We observed that proinflammatory cytokine and NOS2 induction by LPS was dependent on JNK1 isoform but not on JNK2. This effect could not be attributed to MKP1 disappearance, since in macrophages from mice KO for this phosphatase, cytokine expression is not compromised. In addition, JNK1 has also been implicated in IL-6 and IL-1 β induction by TNF- α , in view of predominant p46 role in TNF- α signaling as previously described (Chan, Winston et al. 1997; Liu, Minemoto et al. 2004).

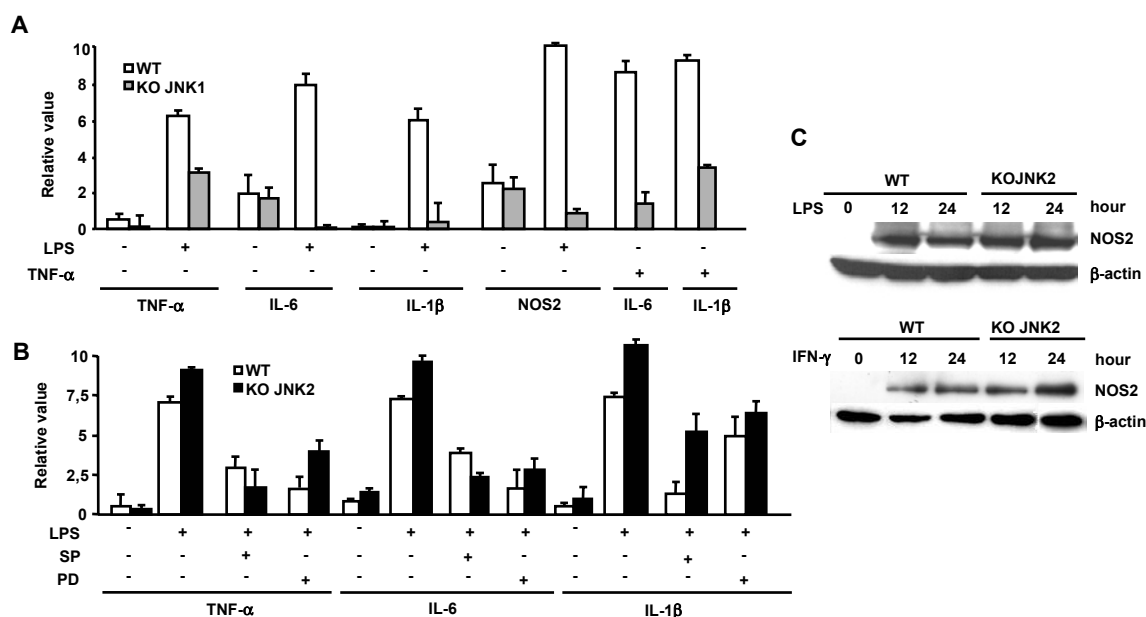


Figure 8. JNK1 isoform is implicated in proinflammatory cytokine induction by LPS in macrophages. A) JNK1 is required for LPS and TNF- α induced pro-inflammatory cytokine and NOS2 production. Macrophages from JNK1 deficient mice were stimulated with LPS or TNF- α for 6 hours and then the levels of mRNA measured by Real-Time PCR in relation to those of β -actin. Each point was performed in triplicate. B) JNK2 isoform is not involved in cytokine production by LPS. The experiment was performed as in A using macrophages from JNK2 mice. In some cases SP 600125 at 20 μ M concentration and PD 98059 at 50 μ M were used. Each point was performed in triplicate. C) JNK2 is not implicated in NOS2 induction by LPS or by IFN- γ . Western blot of NOS2 from macrophages of wild type and JNK2 knock-out phenotype stimulated with LPS and IFN- γ (1200 U/ml) at indicated times. Results are representative of three to five independent experiments.

In conclusion, our results demonstrate experimental evidence that JNK1 and JNK2 isoforms are redundant kinases in response to M-CSF but display a differential role in macrophage activation. Our results revealed that JNK1 isoform is involved in the induction of MKP1 expression in macrophages under both M-CSF and LPS stimulation. Significantly, JNK1, but not JNK2, played a predominant role in LPS and TNF- α induction of proinflammatory mediators, offering new insights into target abnormal inflammatory response by activated macrophages. Little is known about the role of JNK in human cancer, but it has been observed that activated JNK may promote a transformed phenotype (Raitano, Halpern et al. 1995; Rodrigues, Park et al. 1997) and constitutively active JNK activity has been described in human tumor lines and inflammatory diseases (Bost, McKay et al. 1997; Teng, Perry et al. 1997). In addition, MKP1 has been found overexpressed in many malignant human tumors (Bang, Kwon et al. 1998; Liao, Guo et al. 2003), suggesting a correlation between JNK and MKP1 expression. Therefore, we speculate that JNK could be a novel therapeutic target to regulate MKP1 expression in

tumors or in inadapted inflammatory responses seen in some lung diseases such as asthma or acute respiratory distress syndrome.

Gene	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'
β-actin	ACTATTGGCAACGAGCGGTTC	AAGGAAGGCTGGAAAAGAGCC
NOS2	GCCACCAACAATGGCAACA	CGTACCGGATGAGCTGTGAATT
c-jun	TGAAAGCGCAAAACTCCGAG	GCACCCACTGTTAACGTGGTTC
TNF-α	CCTTGTTGCCTCCTCTTTTGC	TCAGTGATGTAGCGACAGCCTG
IL-1β	CCTGTGTTTTCTCCTTGCCT	GCCTAATGTCCCCTTGAATCAA
IL-6	CAGAAGGAGTGGCTAAGGACCA	ACGCACTAGTTTTGCCGAGTAG
JNK1	GATTTTGGACTGGCGAGGACT	TAGCCCATGCCGAGAATGA
JNK2	TGATTGATCCAGACAAGCGG	AAATTTGAGGTGGTGGCGC
JNK3	AAACTACGTGGAGAATCGGCC	TGGCTTGGCTGGCTTTAAGT
MKP1	GGACAACCACAAGGCAGACATC	GGCCTGGCAATGAACAAACA

Table 1. Specific primer pairs for PCR and Real-Time PCR.

La proteïna kinasa c-Jun N-Terminal 1 (JNK1) és necessària per l'expressió de MKP1 (DUSP1) en els macròfags i per l'activació depenent de LPS

Resum

Els macròfags proliferen en presència del seu factor de creixement, l'M-CSF. Aquest procés és depenent d'una activació ràpida i curta de les quinases ERK. La presència del LPS activa els macròfags induint l'aturada de la proliferació i una activació de ERK més tardana i llarga afavorint la síntesis de citocines pro-inflamatòries. En macròfags la proliferació i l'activació estan modulades per l'extensió i duració de la fosforilació d'ERK, que està modulada per l'acció de les fosfatases de MAPKs. Els nostres estudis determinen que de totes les proteïnes quinases MAPKs, ERK, JNK i p38 activades per M-CSF i LPS, només l'activitat JNK és necessària per a la transcripció de la fosfatasa MKP1 (DUSP1). La disminució de MKP1 a través de la inhibició de JNK provoca un allargament lleuger de l'activació d'ERK i p38. Els macròfags expressen constitutivament 2 gens JNK, *jnk1* i *jnk2*, però només JNK1 està implicat en l'inducció d'MKP-1 tant per M-CSF com per LPS. Això es va poder comprovar utilitzant ratolins deficients en cadascuna de les isoformes. JNK1 també és necessari per a la síntesi de citocines proinflamatores (TNF- α , IL-1 β i IL-6) i en la producció d'òxid nítric induïda per l'activació amb LPS i TNF- α . La producció de la resposta inflamatòria també està regulada per l'expressió de MKP1 com es pot concloure dels estudis amb ratolins deficients per aquests gens. Aquests resultats indiquen que els estímuls que impliquen l'activació de les MAPK també indueixen atenuadors que controlen de forma negativa l'activació de les altres MAPKs.

Resultats

Tot i que l'activitat d'ERK és necessària durant la proliferació com en l'activació dels macròfags, la seva cinètica d'activació té una correlació amb una resposta diferent (Valledor, Comalada et al. 2000). La inducció de la fosfatasa MKP-1 també es correlaciona amb la cinètica de defosforilació d'ERK induïda amb M-CSF o LPS (Valledor, Xaus et al. 1999; Valledor, Xaus et al. 2000). Mitjançant l'ús d'inhibidors específics de MEK/ERK, p38 i de totes les isoformes de JNK a dosis no tòxiques, com el PD 098059, SB 203580 i SP 600125, respectivament, hem estudiat el paper de les diferents MAPKs en la inducció de MKP-1 per M-CSF o LPS ((Alessi, Cuenda et al. 1995; Cuenda, Rouse et al. 1995; Bennett, Sasaki et al. 2001) i Fig. 1).

Mitjançant assajos de Northern blot (Fig. 2A i 2B), veiem que la inducció de MKP-1 provocada per M-CSF i per LPS no depèn de p38 ni d'ERK-1/2, però sí de l'activació de JNK (Fig. 2C, 2D, 2E i 2F). No s'observen canvis en la degradació de MKP-1 (Fig. 2G i 2H). Al determinar l'activació d'ERK-1/2 en presència de l'inhibidor de JNK (Fig. 3A i 3B), no observem defectes en la seva activació però sí un lleuger allargament, suggerint que la inhibició de JNK podria tenir un efecte sobre les altres MAPKs. Un efecte similar s'observa en l'activació de p38 per M-CSF (Fig. 3C) i per LPS (Fig. 3D). L'efecte invers, l'acció de les altres MAPKs, sobre JNK no sembla tenir lloc (Fig. 3E i 3F). Aquests resultats suggereixen que l'activitat de JNK no és necessària per a l'activació de les altres MAPKs, però tindria un paper en la inducció de la fosfatasa MKP-1 que regula la desactivació de les altres MAPKs.

Per altra banda, la implicació de JNK en l'activació dels macròfags per LPS sembla ser crítica. L'estudi de l'expressió de citocines proinflamatòries com TNF- α , IL-1 β and IL-6 en presència d'LPS per Northern blot i PCR a temps real, demostra que JNK és crucial per la seva expressió (Fig. 4A). JNK també és necessària per la inducció de NOS2 per LPS. Per a definir si la funció de JNK en resposta al LPS és directa o indirecte a través de la regulació d'MKP-1, es va mesurar la producció de citocines en macròfags deficientes per a aquesta fosfatasa (Dorfman, Carrasco et al. 1996). En aquests macròfags, tot i tenir l'activitat JNK intacta en comparació amb els ratolins controls (Fig. 4C), s'observa un augment de l'expressió de citocines inflammatòries, demostrant que l'efecte de JNK durant l'activació dels macròfags per LPS és directe.

Fins ara es coneixen 10 isoformes de JNK diferents, expressades per 3 gens, *jnk1*, *jnk2* i *jnk3* (Kyriakis, Banerjee et al. 1994; Gupta, Barrett et al. 1996; Barr and Bogoyevitch 2001). JNK1 i JNK2 s'expressen de forma ubíqua, mentre que JNK3 només ho fa en cervell, testicles i cor (Gupta, Barrett et al. 1996; Davis 2000). L'estudi de la seva expressió en macròfags derivats de medul·la òssia indica que p46 JNK1 i p54 JNK2 s'expressen de forma constitutiva i que també es poden detectar isoformes de p54 JNK1 (Fig. 5A, B i C). L'activitat de les diferents isoformes de JNK en presència d'M-CSF i LPS, utilitzant c-jun com a substrat de la immunoprecipitació específica de JNK1 o de JNK2, demostra que ambdós estímuls indueixen majoritàriament l'activitat JNK1 amb una cinètica similar. La isoforma JNK2 sembla tenir només una activitat residual (Fig. 5D). L'estudi de la implicació de JNK1 i JNK2 en la biologia del macròfag es va dur a terme utilitzant ratolins deficientes per cadascuna de les isoformes. Aquests ratolins presenten un procés de diferenciació de la medul·la òssia a macròfags normal, avaluada pels nivells d'expressió en superfície de Ly-71 (F4/80) i de CD11b, components del receptor d'adhesió Mac-1 utilitzat com a indicador de diferenciació terminal dels macròfags (Fig. 6A). Aquests macròfags tampoc presenten alteracions en la seva

supervivència en comparació amb els controls. Aquest procés va ser mesurat per la presència de fosfatidil serina amb Annexina com a marcador de processos apoptòtics (Fig. 6B).

L'estudi de l'activitat JNK en ratolins deficients de JNK1 o bé de JNK2, indica que en ratolins deficients per JNK2, l'activitat JNK1 encara és induïble per M-CSF i per LPS (Fig. 6C). Per altra banda, en els ratolins deficients de JNK1, l'activitat residual de JNK2 dels ratolins controls es veu lleugerament augmentada (Fig. 6D). Els ratolins no presenten activitat JNK2 ni JNK1, respectivament. L'expressió de la fosfatasa MKP-1 en els macròfags deficients, estimulats amb LPS i M-CSF, indica que l'isoforma implicada en la seva inducció és JNK1 (Fig. 7A i 7B), però no JNK2 (Fig. 7C i 7D). Com a control es va fer servir GF109203, inhibidor de PKC ϵ , prèviament implicada en l'expressió d'MKP-1 (Valledor, Xaus et al. 1999; Valledor, Xaus et al. 2000). També es va observar una disminució de la inducció de c-jun, com a mitjancer transcripcional de l'activitat JNK (Derijard, Hibi et al. 1994; Davis 2000), en els macròfags deficients de l'isoforma JNK1 (Fig. 7E and 7F).

L'expressió d'altres gens dependents d'AP-1 com les citocines proinflamatòries (Bailly, Fay et al. 1996; Yao, Mackman et al. 1997), també és dependent de JNK1. L'estudi per PCR a temps real en els macròfags deficients demostra que l'isoforma JNK1, però no la JNK2 és necessària per l'expressió de TNF- α , IL-6, IL-1 β i NOS2 (Fig. 8A i 8B, Taula I). Tampoc s'observen defectes en la inducció per NOS2 per IFN- γ (Fig. 8C). Tots aquests resultats semblen indicar que és la isoforma JNK1 i no la JNK2, la que intervé en la resposta per LPS en macròfags.

Per tant, els nostres resultats indiquen que JNK1 està implicada en dues funcions crítiques per la funció dels macròfags, la inducció de les fosfatases responsables de desactivar a les MAPKs i en la resposta proinflamatòria induïda per l'LPS.

Discussió

En macròfags la regulació d'MKP-1, responsable de limitar la duració de l'activitat MAPK, es correlaciona amb respostes oposades com la proliferació i l'activació (Valledor, Comalada et al. 2000). Els nostres resultats suggereixen mecanismes on les mateixes quinases que han de ser defosforilades regulen l'expressió de les fosfatases que ho duren a terme. Aquest efecte ja s'ha observat en fibroblasts, on l'expressió d'MKP-1 està regulada per ERK o per p38 (Brondello, Brunet et al. 1997; Slack, Seternes et al. 2001). Els nostres resultats indiquen però, que en macròfags, l'expressió de MKP-1 induïda per

M-CSF o LPS és independent de l'activitat d'ERK o de p38 (Valledor, Xaus et al. 1999; Valledor, Xaus et al. 2000).

En aquest treball demostrem que l'activitat JNK és necessària per l'expressió d'MKP-1 en macròfags. Aquests resultats indiquen que tant l'M-CSF com el LPS activen les MAPKs però també la inducció d'atenuadors de la seva activitat a través d'una de les MAPKs. Així doncs, l'activació de JNK regularia indirectament l'extensió de l'activitat ERK-1/2 i p38. De fet, en cèl·lules Cos-7 transfectades amb una forma activa de Jun també presenten una activació d'ERK més atenuada (Shen, Godlewski et al. 2003). Tant la regulació entre MAP kinases com la d'MKP-1 per JNK també s'ha observat en altres tipus cel·lulars (Cano and Mahadevan 1995; Bokemeyer, Sorokin et al. 1996; Shen, Godlewski et al. 2003).

Hem estudiat la implicació de les diferents isoformes de JNK en l'expressió d'MKP-1 i hem vist que tot i que les dues isoformes JNK1 i JNK2 s'expressen ubiquament, la principal activitat JNK es deriva de l'isoforma JNK1. Utilitzant ratolins deficientes per les diferents isoformes demostrem que precisament JNK1, però no JNK2, és la isoforma implicada en la inducció de MKP-1, possiblement a través de la regulació transcripcional de c-jun. L'estudi del paper de les diferents isoformes i d'AP-1 i altres llocs d'unió al promotor d'MKP-1 en presència d'M-CSF i LPS s'està duent a terme actualment. Els nostres estudis, però, no exclouen que la possibilitat que no veure alteracions en la diferenciació, proliferació o apoptosi en ratolins deficientes de cadascuna de les isoformes, es degui a mecanismes compensatoris entre les dues isoformes JNK.

L'activitat JNK1 també és necessària per l'expressió de citocines proinflamatòries i NO per LPS. Els nostres estudis doncs, indiquen que les diferents isoformes de JNK regulen funcions diferents, amb un paper crucial de JNK1 però no de JNK2 en l'activació dels macròfags induïda per bacteries Gram negatives. De fet, els macròfags deficientes en JNK2 presenten un lleuger augment de la resposta inflamatòria, en concordança amb un paper descrit de l'isoforma JNK2 d'interferir amb l'activació de JNK1 (Liu, Minemoto et al. 2004).

Concloent, els nostres resultats indiquen que JNK1 i JNK2 no són redundants i tenen diferents funcions en la biologia del macròfag en resposta al M-CSF i al LPS. També indiquen que l'isoforma JNK1 està implicada en la inducció d'MKP-1 per ambdós estímuls i és responsable de participar en la resposta inflamatòria enfront l'LPS. Tenint en compte que s'ha vist que l'activitat JNK és constitutiva en certes línies de tumors i en malalties inflamatòries (Bost, McKay et al. 1997; Teng, Perry et al. 1997), i que MKP-1 també s'ha trobat sobreexpressat en tumors malignes (Bang, Kwon et al. 1998;

Liao, Guo et al. 2003), suggerim una correlació entre JNK i MKP-1 i una possible diana terapèutica en tumors o en respostes inflamatòries exacerbades.

**Sanglifehrin A, an inhibitor of cyclophilin
A, arrests M-CSF-dependent macrophage
proliferation by blocking ERK-1/2
activation and up-regulating p27^{kip1}**

Sanglifehrin A, an inhibitor of cyclophilin A, arrests M-CSF-dependent macrophage proliferation by blocking ERK-1/2 activation and up-regulating p27^{kip1}

Ester Sánchez-Tilló, Marta Wojciechowska, Monica Comalada, Consol Farrera,
Jorge Lloberas and Antonio Celada‡

Macrophage Biology Group, Institute of Biomedical Research, Barcelona Science Park, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Key words: monocytes/macrophages, protein kinases/phosphatases, proliferation, signal transduction.

‡Corresponding author: Antonio Celada, Institute of Biomedical Research, Barcelona Science Park, C/ Josep Samitier 1-5, E-08028 Barcelona, Spain. Phone 34 93 403 71 65; Fax 34 93 403 47 47; E-mail: acelada@ub.edu

Abbreviations: SfA, sanglifehrin A; MKP-1, mitogen-activated protein kinase phosphatase-1; Noco, Nocodazole; cdk, cyclin dependent kinase; cic, cyclin; CDKI, cdk inhibitor.

This work was supported by a grant from the *Ministerio de Ciencia y Tecnología* BFU2004-05725/BMC to A.C.

THIS ARTICLE IS SUBJECTED TO PRIVACY POLICY OF NOVARTIS PHARMA (BASEL, SWITZERLAND) AND CANNOT BE PUBLISHED

**Sanglifehrin A, an inhibitor of
cyclophilin A, blocks IFN- γ induction of
MHC class II expression through inhibition
of CIITA induction**

Sanglifehrin A, an inhibitor of cyclophilin A, blocks IFN- γ induction of MHC class II expression through inhibition of CIITA induction

Running Title: SfA interferes IFN- γ induced MHC class II expression in macrophages.

Ester Sànchez-Tilló, Maria Serra-Sarasa, Consol Farrera, Marta Wojciechowska*, Jorge Lloberas and Antonio Celada†

Group of Macrophage Biology, Biomedical Research Institute of Barcelona, Barcelona Science Park, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

This work was supported by a grant from the *Ministerio de Ciencia y Tecnología* BFU2004-05725/BMC to A.C.

Key words: monocytes/macrophages, MHC, antigen presentation/processing and cell activation.

†Corresponding author: Institute of Biomedical Research of Barcelona, Barcelona Science Park, C/ Josep Samitier 1-5, E-08028 Barcelona, Spain. Phone 34 93 403 71 65; Fax 34 93 403 47 47; E-mail: acelada@ub.edu

Current address: Immunology Division, Department of Pre-Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw Agriculture University, Warsaw, Poland.

THIS ARTICLE IS SUBJECTED TO PRIVACY POLICY OF NOVARTIS PHARMA (BASEL, SWITZERLAND) AND CANNOT BE PUBLISHED