

Université de Montréal

**Caractérisation de la voie d'activation des interférons de
type I**

par

Jean-Francois Clément

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)
en Sciences Pharmaceutiques
option Pharmacologie

Août, 2010

© Jean-Francois Clément, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Caractérisation de la voie d'activation des Interférons de type I

Présentée par :

Jean-Francois Clément

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Daniel Lévesque, président-rapporteur

Dr Marc Servant, directeur de recherche

Dr Sylvain Meloche, codirecteur

Dr Jacques Archambault, membre du jury

Dr Jacques Côté, examinateur externe

Dr Ali Ahmad, représentant du doyen de la FES

Résumé

Durant ces quatre dernières années, le champ de recherche concernant l'immunité innée a grandement été influencé par la découverte des IKK-related kinases, TBK1 et IKKi, deux kinases régulant l'activité des facteurs de transcription IRF-3/IRF-7 et NF- κ B. Les kinases TBK1 and IKKi furent notamment démontrées comme étant responsables de la phosphorylation en C-terminal de IRF-3. Toutefois, l'identité des sites phosphoaccepteurs ciblés par ces kinases restait un sujet de controverse. En combinant la spectrométrie de masse aux essais de phosphorylation *in vitro* de His-IRF-3 par la kinase recombinante TBK1, nous démontrons que les sérines 396 et 402 sont directement phosphorylées par cette kinase. Nos analyses biochimiques révèlent également que la mutation S396A, localisée dans le cluster II, abolit l'homodimérisation, l'association à CBP et l'accumulation nucléaire de IRF-3. De façon intéressante, la mutation de la sérine 339, impliquée dans la stabilité de IRF-3, provoque également une perte d'association à CBP et de la dimérisation du facteur de transcription sans toutefois affecter la transactivation des gènes antiviraux en autant que la sérine 396 soit disponible pour accepter un événement de phosphorylation. Nos expériences de complémentation de MEFs IRF-3 KO révèlent la présence d'un mécanisme compensatoire impliquant la sérine 339 et la sérine 396 dans l'induction des *IFN-stimulated genes* (ISGs), ISG56 and ISG54. Globalement, les données présentées dans cette étude nous ont permis de reconsidérer le modèle d'activation du facteur de transcription IRF-3 actuellement proposé et d'y ajouter certaines subtilités.

TRAF3 est également un médiateur central impliqué dans l'induction de la réponse interféron de type I. Cette fois, en couplant la spectrométrie de masse à la technique de purification protéique par affinité, nous avons identifié Sec16A et p115, deux protéines du système de transport vésiculaire ER-Golgi, comme étant des nouveaux partenaires protéiques de Flag-TRAF3. Nos expériences démontrent la localisation cellulaire de TRAF3 au niveau du système de transport vésiculaire. De plus, la diminution des niveaux d'expression de p115 ou Sec16A provoque une redistribution cellulaire de TRAF3 et

affecte la réponse interféron suivant une stimulation par de l'ARN double brin. Nos résultats démontrent également une colocalisation de TRAF3 et TRADD au niveau du *cis*-Golgi ainsi qu'une interaction avec la protéine du translocon Sec61 β médiée par l'intermédiaire de Sec5. De façon générale, nos données suggèrent que la localisation cellulaire de TRAF3 au niveau des compartiments de transport vésiculaire est requise afin d'obtenir une réponse antiviral optimale par la voie de signalisation cellulaire associée aux *RIG-I-like RNA helicases*, RIG-I et MDA5. Nos données appuient également le rôle potentiel précédemment suggéré de l'exocyste dans l'établissement d'une réponse antivirale.

Mots-clés : Interféron, défense antivirale, IRF-3, TRAF3, phosphorylation

Abstract

Over the past four years, the field of the innate immune response has been highly influenced by the discovery of the I κ B kinase (IKK)-related kinases, TBK1 and IKKi, which regulate the activity of IRF-3/IRF-7 and NF- κ B transcription factors. The IKK-related kinases, TBK1 and IKKi, were recently shown to be responsible for the C-terminal phosphorylation of IRF-3. However, the identity of the phosphoacceptor site(s) targeted by these two kinases remains unclear. By combining mass spectrometry analysis to *in vitro* kinase assays using full length His-IRF3 as a substrate, we have demonstrated that serine 402 and serine 396 were directly targeted by TBK1. Analysis of Ser/Thr to Ala mutants revealed that S396A mutation, located in cluster II, abolished IRF-3 homodimerization, CBP association and nuclear accumulation. Interestingly, mutation of serine 339, which is involved in IRF-3 stability, also abrogated CBP association and dimerization without affecting gene transactivation as long as serine 396 remained available for phosphorylation. Complementation of MEFs IRF-3 KO also reveals a compensatory mechanism of serine 339 and serine 396 in the ability of IRF-3 to induce IFN-stimulated genes (ISGs) ISG56 and ISG54 expression. These data lead us to reconsider the current model of IRF-3 activation.

TRAF3 is also a central mediator that is important for inducing type I interferon production in response to intracellular double-stranded RNA. By combining Flag-Affinity purification using Flag-TRAF3 as a bait to mass spectrometry, we have identified Sec16A and p115, two proteins of the ER-to-Golgi vesicular transport system, as novel TRAF3 interactors. We found that TRAF3 localizes to the ER-to-Golgi vesicular pathway and behaves like a cis-Golgi protein. Depletion of p115 or Sec16A disrupts the cis-Golgi cellular localization of TRAF3 and affects type I Interferon response following double-stranded RNA treatment. Furthermore, we demonstrate that TRAF3 colocalizes with TRADD at the cis-Golgi and also interacts with the translocon protein Sec61 β in a Sec5 dependent manner. Together, our data suggest that the cellular localization of TRAF3 to the ER-to-Golgi transport compartments is required for an optimal RIG-I-like Helicases

(RLH)-Cardif-dependent antiviral immune response. Our findings also highlight the potential role of the exocyst in the innate immune response.

Keywords : Interferon, antiviral state, IRF-3, TRAF3, phosphorylation

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières	vii
Remerciements.....	xxiii
Introduction.....	1
Chapitre 1. La réponse immunitaire innée.....	2
1.1 La réponse interféron de type I.....	3
1.1.1 Signalisation par les IFNs de type I et induction des gènes cibles : un survol.....	4
1.1.2 Enhanceosome du gène IFN β et IRFs.....	6
1.2 Reconnaissance des PAMPs : Les Pattern Recognition Receptors (PRRs).....	10
1.2.1 Les TLRs.....	10
1.2.1.1 Structure et fonction.....	10
1.2.1.2 Signalisation via les TLRs	12
1.2.1.3 TLRs et cytokines pro-inflammatoires – une voie dépendante de MyD88 ..	13
1.2.1.4 TLRs et IFN de type I – une voie dépendante de TRIF.....	13
1.2.1.5 Les TLRs extracellulaires	15
1.2.1.5.1 TLR1, TLR2, TLR6.....	15
1.2.1.5.2 TLR4.....	15
1.2.1.5.3 TLR5.....	16
1.2.1.5.4 TLR11	16
1.2.1.6 Les TLRs intracellulaires.....	17
1.2.1.6.1 TLR3	17
1.2.1.6.2 TLR7, TLR8 et TLR9	18
1.2.2 Les récepteurs cytosoliques	19
1.2.2.1 Les NLRs	19
1.2.2.1.2 Structure et phylogénie de la famille NLR.....	19
1.2.2.1.3 NOD signalosome.....	21

1.2.2.1.4 Inflammasomes	23
1.2.2.2 DAI	26
1.2.2.3 AIM2.....	28
1.2.2.4 RNA polymerase III.....	29
1.2.3 Les RLRs	30
1.2.3.1 RIG-I.....	30
1.2.3.2 MDA5	32
1.2.3.3 LGP2.....	33
1.2.3.4 Signalisation par les RLRs : importance de CARDIF et STING	34
1.2.3.5 Protéines adaptatrices impliquées dans la signalisation par les RLRs.....	37
1.2.3.5.1 Les régulateurs positifs	38
1.2.3.5.1.1 TANK	38
1.2.3.5.1.2 NAPI	39
1.2.3.5.1.3 SINTBAD	40
1.2.3.5.1.4 NEMO.....	40
1.2.3.5.1.5 HSP90	41
1.2.3.5.1.6 TRADD/ FADD/RIP1/Caspase8-10.....	41
1.2.3.5.1.7 TRAF3	42
1.2.3.5.1.8 TRAF2 et TRAF6	42
1.2.3.5.1.9 c-Src	43
1.2.3.5.1.10 TRIM25	43
1.2.3.5.1.11 NOX2 et ROS	44
1.2.3.5.1.12 DDX3.....	44
1.2.3.5.1.13 GRIP1	45
1.2.3.5.1.14 Cyclophiline B	45
1.2.3.5.2 Les régulateurs négatifs	46
1.2.3.5.2.1 NLRX1.....	46
1.2.3.5.2.2 PLK1	46
1.2.3.5.2.3 RNF125.....	47

1.2.3.5.2.4 SIKE.....	47
1.2.3.5.2.5 RFP	47
1.2.3.5.2.6 CYLD.....	48
1.2.3.5.2.7 A20.....	48
1.2.3.5.2.8 DUBA	49
1.2.3.5.2.9 TRIAD3A	50
1.2.3.5.2.10 RNF5.....	50
1.2.3.5.2.11 Atg5-Atg12	51
1.2.3.5.2.12 DAK.....	52
1.2.3.5.2.13 Pin1	52
1.2.3.5.2.14 Le complexe SCF.....	53
1.3 IRF-3 et TRAF3.....	53
1.3.1 Le facteur de transcription IRF-3.....	54
1.3.1.1 Fonctions de IRF-3 <i>in vivo</i>	54
1.3.1.2 Cycle de vie de IRF-3	55
1.3.1.3 Région N-terminale de IRF-3	58
1.3.1.3.1 Domaine de liaison à l'ADN	58
1.3.1.3.2 Phosphorylation	59
1.3.1.4 Région C-terminale de IRF-3	59
1.3.1.4.1. Cristallographie et modèle d'activation de IRF-3.....	59
1.3.1.4.2 Phosphorylation en C-terminal : activation et dégradation de IRF-3 ...	61
1.3.1.5 Gènes régulés par IRF-3	63
1.3.1.6 Autres modifications post-traductionnelles de IRF-3	67
1.3.2 La protéine adaptatrice TRAF3	68
1.3.2.1 Caractéristiques de TRAF3 et études structure-fonction.....	68
1.3.2.2 Association avec les récepteurs de surface et autres partenaires protéiques	69
1.3.2.3 Fonction 1 : TRAF3 dans la voie d'activation non classique de NF-kB	70
1.3.2.3.1 Voie classique et non classique d'activation : un sommaire	70
1.3.2.3.2. Rôle de TRAF3 dans la voie non classique d'activation	73

1.3.2.4 Fonction 2 : TRAF3 dans la réponse immunitaire innée	74
Chapitre 2. L'inflammation et le cancer	75
2.1 Mise en situation	75
2.2 Article 1- The IKK-related Kinases : from innate immunity to oncogenesis	76
Chapitre 3. Objectif de cette thèse et publications.....	111
3.1 Objectif général.....	111
3.1.1 Objectifs spécifiques.....	111
3.1.1.1 Identification des sites de phosphorylation impliqués dans l'activation du facteur de transcription IRF-3.	111
3.1.1.2 Identification de nouvelles protéines impliquées dans la voie d'activation de la réponse interféron.	112
3.2 Publications.....	112
Chapitre 4. Caractérisation des sites de phosphorylation du facteur de transcription IRF-3	114
4.1 Mise en situation	114
4.2 Article 2- Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 generates a hyperactive form of IRF- 3 through regulation of dimerization and CBP association.	115
Chapitre 5. Caractérisation des nouveaux médiateurs impliqués dans la signalisation cellulaire de la voie des interférons de type I	165
5.1 Mise en situation	165
5.2 Article 3- TRAF3 recruitment to Sec16A and p115 reveals a new role for the ER to Golgi Transport Compartments in Innate Immunity	166
Chapitre 6. Discussion et perspectives	208
6.1 IRF-3, une protéine hyperphosphorylée	208
6.1.1 L'importance des sites en C-terminal : la controverse persiste	208
6.1.2 Quel est le vrai rôle de la sérine 339 ?	219
6.1.3 GSK-3 β , une nouvelle kinase de IRF-3 ?	221
6.1.4 Le mystère de la phosphorylation en N-terminal.....	228
6.2 Bien mesurer l'activation de IRF-3, est-ce possible ?	233

6.3 TRAF3 localise à la mitochondrie ou au niveau des compartiments vésiculaires du ER-Golgi ?	234
6.4 La protéine TRK-fused Gene.....	241
Conclusion	247

Liste des tableaux

Tableau 1. Ligands des TLRs.....	14
----------------------------------	----

Liste des figures

Figure 1. Réponse interféron de type I	3
Figure 2. Transcription du gène IFN β suivant une infection virale.....	8
Figure 3. Structure et domaines de IRF-3, IRF-5 et IRF-7.....	9
Figure 4. Voie de signalisation cellulaire associée aux différents TLRs.....	11
Figure 5. Domaines des différents NLRs.....	20
Figure 6. NOD signalosome	22
Figure 7. Les différents types d'inflammasome.....	25
Figure 8. Voie de signalisation cellulaire associée à DAI	27
Figure 9. Structure primaire des différents RLRs.....	30
Figure 10. Reconnaissance des ARNs viraux.....	34
Figure 11. Voie de signalisation cellulaire associée aux RLRs.....	37
Figure 12. Représentation schématique temporelle de la découverte des protéines impliquées dans la régulation de la réponse IFN de type I depuis la caractérisation de IRF-3 en 1998	38
Figure 13. Cycle de vie de IRF-3.....	57
Figure 14. Sites de phosphorylation présents sur IRF-3.....	58
Figure 15. Gènes ciblés par IRF-3	66
Figure 16. Voie classique et non classique d'activation de NF- κ B.....	71
Figure 17. Alignement de séquence du domaine de transactivation localisé en C-terminal des différents IRFs.....	210
Figure 18. Structure 3D de IRF-3 basée sur le modèle d'autoinhibition.....	211
Figure 19. Aucun rôle pour la Ser175 et la Thr219 dans l'activation de IRF-3 et la production d'IFN β	214
Figure 20. Structure 3D montrant les différents sites de phosphorylation de IRF-3	216
Figure 21. Plusieurs sites autres que le C-terminal de IRF-3 sont phosphorylés suite à une infection virale	218
Figure 22. Une corrélation existe entre l'inactivation de AKT ou p90RSK et la dégradation de IRF-3 suivant une infection virale	222

Figure 23. GSK-3 β phosphoryle IRF-3 <i>in vitro</i>	223
Figure 24. GSK-3 β cible la Ser339 de IRF-3	225
Figure 25. L'infection au SeV inhibe AKT et active GSK-3 β	225
Figure 26. Interaction inductible par l'infection virale entre GSK-3 β et IRF-3.....	226
Figure 27. L'inhibition pharmacologique de GSK-3 β retarde la dégradation de IRF-3	226
Figure 28. Le N-terminal de IRF-3 est hautement phosphorylé <i>in vivo</i>	229
Figure 29. TBK1 phosphoryle <i>in vitro</i> d'autres sites en amont du C-terminal de IRF-3....	230
Figure 30. La mutation indépendante de la majorité des Ser/Thr conservées en N-terminal n'influence pas la dimérisation de IRF-3 ni la présence de la forme II	231
Figure 31. Illustration schématique de l'implication de p115 dans le transport vésiculaire	235
Figure 32. Modèle décrivant la fonction de Sec16A dans la cellule	236
Figure 33. Fusion de la membrane du Golgi avec celle du ER suivant l'activation de la voie des RLRs.....	239
Figure 34. TFG interagit et colocalise avec TRAF3.....	242
Figure 35. TFG localise au niveau des ERES.....	243
Figure 36. TFG interagit et colocalise avec Sec16A	244
Figure 37. La surexpression de TFG augmente l'induction du gène IFN β suivant une infection virale	245
Figure 38. Réseau des interactions protéiques partagées par TRAF3 et TFG	246

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADAR	RNA-specific adenosine deaminase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN-B	ADN de conformation B
ADNc	ADN complémentaire
ADN-Z	ADN de conformation Z
AIM2	Absent in melanoma 2
AMP	Adenosine monophosphate
AP/MS	Purification par affinité couplée à la spectrométrie de masse
ATF2	Activation Transcription Factor 2
ATP	Adenosine triphosphate
ARN	Acide ribonucléique
ASC	Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD
BAF	BRG-BRM-associated factor
BAFFR	B cell-activating factor receptor
BIR	Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat
Birc1e	BIR-containing 1e
BRG	BRM-related gene
BRM	Brahma
CARD	Caspase Recruitment Domain
CARDIF	CARD adapter inducing IFN β
CBP	CREB binding protein
cIAP	Cellular inhibitor of apoptosis
cDC	Cellule dendritique conventionnelle
CpG	Cytidine-phosphate-Guanosine
CREB	cAMP response element-binding

CYLD	Cylindromatosis
CypB	Cyclophiline B
DAI	DNA dependant Activator of IRF
DAK	Dihydroxyacetone kinase
DAMP	Damage associated molecular pattern molecules
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
dsDNA	ADN double brin
dsRNA	ARN double brin
DUB	Enzymes de deubiquitination
DUBA	Deubiquitinating enzyme A
EMCV	Encephalomyocarditis virus
ER	Réticulum Endoplasmique
ERES	ER exit site
ERGIC	ER to Golgi intermediates compartments
ES	Cellules souches embryonnaires
ERK1/2	Extracellular signal-Regulated Kinase
FAD	Flavin adenine dinucleotide
FADD	Fas-Associated Death Domain protein
GBP1	Guanylate binding protein
GCN5	General-control-of-amino-acid synthesis 5
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GR	Glucocorticoïde
GRX-1	Glutaredoxin-1
GS	Glycogène Synthase

GSK-3	Glycogen Synthase kinase 3
HAT	histones acétyl transférases
HCV	Hepatitis C Virus
HERC5	HECT domain and RLD 5
HMGA1	High mobility group protein A1
HSP	Heat shock proteins
HSV	Herpes Simplex Virus
IAD	Domaine d'association aux IRFs
IE-DAP	acide g-D-glutamyl-meso-diaminopimelic
IFN	Interferon
IkB	Inhibitor of NF-kB
IKK	IkB kinase
IKKi	IKK-related kinase inducible
IPAF	IL-1 β -converting enzyme Protease Activating Factor
IPS-1	IFN β Promotor Stimulator-1
IRAK	IL-1R Associated Kinase
IRF	Interferon Regulatory Factor
ISD	ADN immunostimulateur
ISG	Interferon Stimulated
ISGF-3	Interferon Stimulated Gene Factor-3
ISRE	Interferon stimulated response element
JEV	Japanese Encephalitis virus
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LBP	LPS-binding protein
LC3	Microtubule-associated protein 1 light chain 3

LC-MS/MS	Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry
LGP2	Laboratory of Genetic and Physiology 2
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine-Rich Repeats
LT	Toxine létale (<i>Bacillus anthracis</i>)
LT β R	Lymphotoxin beta receptor
MAL	MyD88-adaptor adaptor-like
MAP	Mitogen Activated Protein
MAPK	MAP Kinase
MAVS	Mitochondrial antiviral signaling
MCMV	Murine Cytomegalovirus
MD-2	Myeloid Differentiation protein-2
MDA5	Melanoma Differentiation Associated gene 5
MDP	Muramyl dipeptide
MEFs	Murine embryonic fibroblasts
MKK	MAP kinase kinase
MITA	Mediator of IRF-3 Activation
MMTV	Mouse mammary tumor virus
MOI	Multiplicité d'infection
mTOR	Mammalian target of Rapamycin
Mx	Myxovirus resistance GTPase
MyD88	Myeloid Differentiation primary response gene 88
NAIP	Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein
NALP	NACHT-LRR-PYD containing Protein
NAP1	NAK-associated protein 1
NBD	Nucleotide-binding domain
NDV	New Castle Disease Virus

NEMO	NF- κ B essential Modulator
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NGF	Nerve growth factor
NGFR	NGF receptor
NIK	NF- κ B inducing kinase
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
NOX	NADPH oxydase
NLR	NOD-like Receptors
NLS	Signal de localisation nucléaire
OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthase/RNase L
OTU	Ovarian tumor
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
pDC	Cellule dendritique plasmacytoïde
PGN	Peptidoglycane
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PKR	double-stranded RNA dependant kinase R
PLK1	Polo-like kinase 1
Poly(IC)	Polyinosinic-polycytidylic acid
PRDs	Positive Regulatory Domain
PRRs	Pattern-Recognition Receptors
PYD	Pyrin Domain
PYHIN	pyrin and HIN200 domain-containing protein
RAL	Ras-like
RANTES	Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted
RBCC	RING, B-box, coiled-coil

RBCK1	RBCC protein interacting with PKC1
RFP	Ret-finger protein
RHIM	RIP homotypic interaction motif
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene – I
RING	Really Interesting New Gene
RIP	Receptor Interacting Protein
RLR	RIG-I-like Receptor
ROS	Reactive oxygen species
RSV	Respiratory Syncytial Virus
SCF	Skp1-Cul1-F-box
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS
SeV	Sendai virus
SH3	Src Homology 3
SHIP1	Src homology 2-containing inositol phosphatase-1
SIKE	Suppressor of IKK ϵ
siRNA	Small interfering RNA
SINTBAD	Similar to NAP1 TBK1 adaptor
ssRNA	ARN simple brin
STING	Stimulator of IFN gene
SUMO	Small ubiquitin-related modifier
TAB	TAK1-binding proteins
TAK1	Transforming growth factor β -Activated Kinase 1
TANK	TNFR-Associated factor family member-associated NF-kB activator
TBK1	TANK Binding Kinase-1
TBD	TBK1/IKKi-binding domain
TFG	TRK-fused gene

TICAM	TIR domain containing adaptor molecule
TIM	TRAF-interaction motif
TIR	Toll/IL-1 receptor
TIRAP	TIR-associated protein
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	TNF Receptor
TRADD	TNFR-Associated Death Domain
TRAF	TNFR-Associated Factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAM	TRIF-Related Adaptor Molecule
TRIF	TIR-containing adapter inducing IFN β
TRIM	Tripartite motif protein
UBP	Ubiquitin-specific protease
VISA	Virus-induced signaling adapter
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
WNV	West Nile Virus

*À tous ceux qui sont présents dans ma
vie, car vous êtes ma source d'énergie.*

Remerciements

Personnellement, je tiens à préciser qu'il est difficile de faire la liste complète des personnes que je dois absolument remercier. Puisque toutes nos sphères de vie influencent grandement notre façon d'être, plusieurs rencontres ont eu un grand rôle à jouer dans mon cheminement personnel. Déjà à ce moment, vous pouvez, tout un chacun, vous reconnaître.

Premièrement, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Marc Servant, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Son dynamisme, sa motivation, sa philosophie scientifique et surtout sa façon de voir la vie, ont grandement influencé mon travail et ont largement contribué à devenir la personne que je suis. Merci aussi à mon co-directeur, Sylvain Meloche, d'avoir participé activement à ma formation. Son enthousiasme scientifique contagieux m'a profondément marqué (son talent au ping-pong aussi d'ailleurs...). Les co-directions ne sont pas toujours faciles, mais dans mon cas, on peut dire que j'ai été choyé. Je retire donc beaucoup de mes deux superviseurs.

Ma reconnaissance va également à mes collègues du Labo-Servant, pour m'avoir simplement enduré toutes ces années. Merci Simon, Annie, Tash, Prisc, Mimi et Monique pour notre vie commune enrichissante à la fois parsemée d'embûches, de plaisirs et de chicanes. Nos discussions scientifiques tout autant que personnelles ont été incroyables. Je veux simplement dire un merci spécial à Simon et Annie, avec qui l'aventure a débuté. Mes remerciements vont aussi à tous les membres du Labo-Meloche pour m'avoir toujours considéré comme un membre intégral du laboratoire. Même si nos sujets étaient différents, vous avez toujours pris le temps de m'écouter et de m'aider. Merci beaucoup Phil, Gen, Justine, Ben, P-L, Ed, Christelle, Marc, Laure, Benoit, Steph...

Finalement, un remerciement spécial à ma famille pour leur soutien extérieur. J'entame une douzième année d'université en ce septembre 2010 et vous êtes toujours aussi présent qu'à ma première, soit en 1999. C'est cela qui me rend heureux et vous le savez. Je ne demande rien de plus...

Introduction

Durant ces dernières années, la recherche sur la réponse immunitaire innée a grandement été influencée par la découverte de molécules importantes impliquées dans la régulation de la réponse interféron et de l'inflammation. Ces recherches ont notamment permis d'établir un lien direct entre certaines de ces molécules pro-inflammatoires et le processus d'oncogenèse. Les liens moléculaires entre l'inflammation chronique et le cancer ont donc finalement commencé à émerger depuis peu, et ce, même si Rudolph Virchow avait déjà proposé cette association au début du 20^e siècle. Afin de bien comprendre l'importance de ces nouveaux médiateurs de signalisation intracellulaire, j'ai séparé l'introduction de cette thèse en deux parties. Les différentes protéines impliquées dans la signalisation cellulaire de la réponse immunitaire innée seront d'abord discutées en fonction de leur implication dans l'établissement d'un état de défense contre les pathogènes (Chapitre 1). Elles seront ensuite abordées quant à leur contribution potentielle dans le processus d'oncogenèse (Chapitre 2).

Chapitre 1. La réponse immunitaire innée

Vivant dans un monde abondamment peuplé de divers microorganismes pathogènes, l'homme est constamment exposé à certaines menaces pouvant affectées ses mécanismes d'homéostasie corporelle. Ces différents microorganismes pathogènes possèdent une grande variété de mécanismes pouvant contrôler leur réplication et leur propagation. Ces derniers sont donc grandement susceptibles de perturber les fonctions normales de l'hôte. Au cours de l'évolution, les mammifères ont toutefois réussi à développer un système immunitaire complexe leur permettant de contrôler et éliminer ces pathogènes. L'homme utilise notamment deux types de mécanismes de défense : la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative. Ces deux mécanismes sont très différents tout en étant intimement reliés. Ils reposent tous les deux sur leur capacité de pouvoir distinguer les antigènes du soi (de l'hôte) et du non-soi (étrangers). Bien qu'importante, la réponse immunitaire adaptative ne sera toutefois pas discutée davantage dans cette thèse. Par contre, la réponse immunitaire innée, première ligne de protection contre les pathogènes envahissants, sera détaillée minutieusement afin de pouvoir démontrer sa complexité et son importance. Cette dernière implique l'induction d'une panoplie de gènes ayant comme fonction de limiter la propagation des pathogènes. Parmi ceux-ci, nous y retrouvons notamment les interférons de type I (Honda et al, 2006). Les interférons de type III sont également important dans cette première ligne de défense, mais ils ne seront pas davantage détaillés (Ank et al, 2009)

1.1 La réponse interféron de type I

Les interférons (IFNs) de type I ont été identifiés dans les années 1950 comme étant des cytokines antivirales sécrétées par les cellules infectées par un virus (Isaacs & Lindenmann, 1957; Nagano & Kojima, 1954). Chez les mammifères, les IFNs de type I englobent au moins dix membres de la famille IFN- α , l'IFN- β , l'IFN- ϵ , l'IFN- κ , l'IFN- ω et l'IFN- τ (Roberts et al, 1998). Toutefois, l'IFN- α et l'IFN- β sont les deux principaux médiateurs de la défense contre les pathogènes.

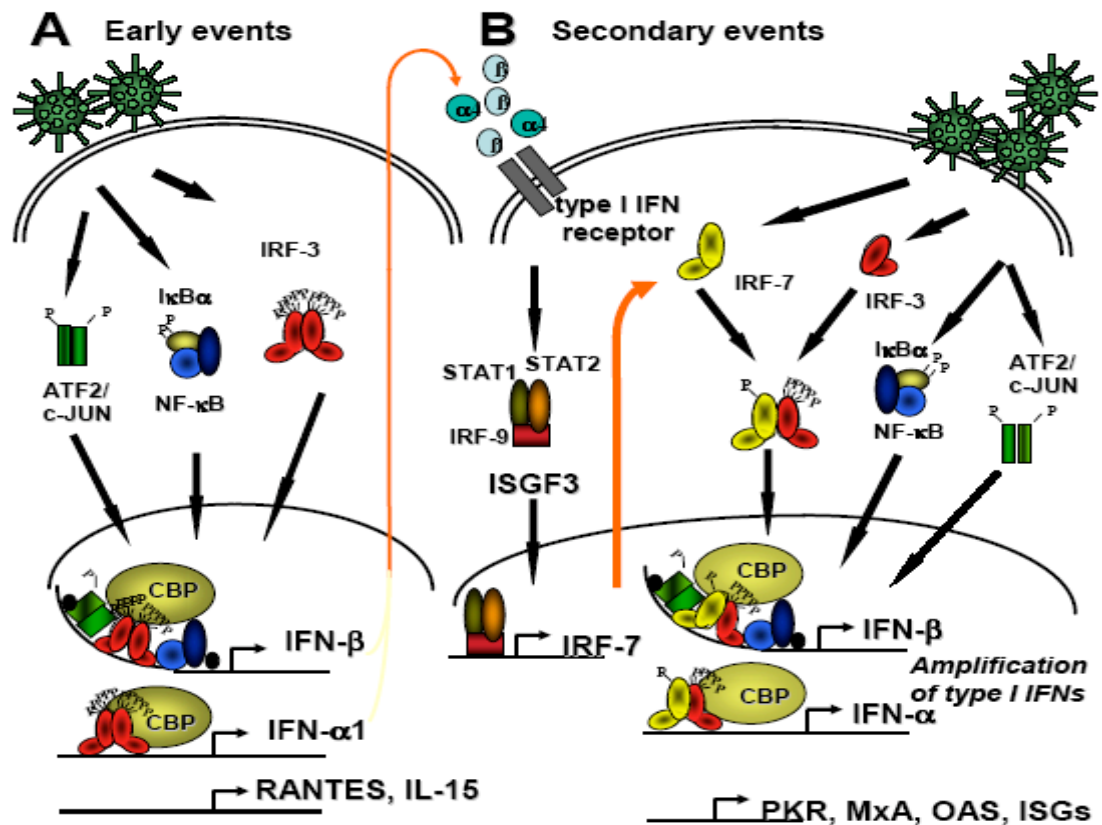


Figure 1. Réponse interféron de type I

En réponse à une infection virale, plusieurs voies de signalisation sont activées et mènent ultimement à l'activation de facteur de transcription régulant les gènes précoces responsables de la défense antivirale, dont les IFNs de type I. Une fois sécrétés, les IFNs interagissent avec leur récepteur à la surface des cellules avoisinantes afin d'induire la voie JAK/STAT menant à l'activation du complexe ISGF3 et la production de

IRF-7. Suivant une infection virale, IRF-3 et IRF-7 contribuent à l'expression et l'amplification de la réponse IFN tout en induisant des gènes tardifs de la réponse antivirale, dont les ISGs, ADAR, GBP, 2',5'-OAS, PKR et RANTES. Figure adaptée de (Grandvaux et al, 2002b).

1.1.1 Signalisation par les IFNs de type I et induction des gènes cibles : un survol

Chez les eucaryotes, la compréhension de la régulation transcriptionnelle des gènes représente un des défis les plus importants de la biologie moléculaire moderne. Le but principal partagé par les chercheurs oeuvrant dans ce domaine est de comprendre comment la cellule parvient à utiliser un nombre si limité de facteurs de transcription pour contrôler étroitement un profil d'expression génique global (Ptashne, 2005).

Au niveau de la régulation transcriptionnelle, l'expression du gène de l'IFN β est un des exemples les plus caractérisés chez les mammifères. La cellule utilise trois familles de facteurs de transcription pour amorcer la transcription du gène IFN β : *Nuclear Factor kappa B* (NF-kB), *Interferon Regulatory Factor* (IRF)-3/IRF-7 et *Activation Transcription Factor 2* (ATF2)/c-Jun. Ces trois protéines doivent être présentes avant l'infection et requièrent d'importantes modifications post-traductionnelles afin d'induire la réponse IFN (**voir Figure 1**). Ce sujet sera d'ailleurs approfondi tout au cours des différentes sections de cette thèse. De plus, une emphase particulière sera accordée au facteur de transcription IRF-3 (**voir section 1.3**). L'expression des IFNs de type I est régulée par des voies de signalisation activées par les *Pattern Recognition Receptors* (PRRs). Ces derniers reconnaissent certains *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) qui sont propres aux différents microorganismes (**voir section 1.2**).

De façon générale, NF- κ B est retenu dans le cytoplasme par son association avec *inhibitors of κ B* α (I κ B α), un membre de la famille des protéines inhibitrices de NF- κ B. Suivant une infection, I κ B α est phosphorylé par le complexe kinase I κ B (IKK) sur des résidus sérines spécifiques. Cette phosphorylation induit la dégradation de I κ B α par le protéasome et permet ainsi la translocation de NF- κ B au noyau (Gilmore, 2006). IRF-3 est exprimé constitutivement dans plusieurs types cellulaires et sa phosphorylation en C-terminal entraîne un changement conformationnel de la protéine permettant son homodimérisation ainsi que sa translocation nucléaire (Honda et al, 2005b). ATF2/c-Jun est déjà localisé dans le noyau, mais ce dernier est incapable d'induire la transcription sans que son domaine d'activation soit phosphorylé via la voie de signalisation des *Mitogen activated protein* (MAP) *Kinases* (MAPK) (Chinenov & Kerppola, 2001). En somme, l'infection virale provoque l'activation de différentes cascades de signalisation et induit ainsi plusieurs modifications post-traductionnelles permettant l'assemblage des facteurs de transcription NF- κ B, IRF-3 et ATF2/c-Jun dans un complexe nommé *enhanceosome*. Les événements détaillés ci-dessus représentent la phase précoce de la réponse IFN de type I (voir **Figure 1**).

Une fois synthétisées et sécrétées, les molécules d'IFN α et d'IFN β sont reconnues par les cellules avoisinantes via le récepteur des IFNs (IFNR1/2) (Uze et al, 2007). La liaison au récepteur entraîne ensuite l'activation de la tyrosine kinase Jak associée au récepteur et la phosphorylation de ses substrats, STAT1 et STAT2 (Stark et al, 1998). Les hétérodimères STAT1/2 interagissent ensuite avec IRF-9 afin de former un complexe nommé *Interferon Stimulated Gene Factor-3* (ISGF-3). Ce dernier pénètre dans le noyau afin de lier fortement des séquences « interféron-stimulated response elements » (ISREs) retrouvées dans plus d'une centaine de gènes antiviraux, tels que PKR (*double-stranded RNA dependant kinase R*), OAS1 (*2'-5'-oligoadenylate synthase*), ADAR (*RNA-specific adenosine deaminase*) et Mx (*Myxovirus resistance GTPase*) (Sadler & Williams, 2008; Samuel, 2001). Ces gènes confèrent un état antiviral global et robuste à la cellule. Ces

événements représentent la deuxième phase de la réponse IFN de type I, soit la phase tardive (voir **Figure 1**).

1.1.2 Enhanceosome du gène IFN β et IRFs

La partie *enhancer* du gène IFN β est constituée d'une région régulatrice de cinquante paires de bases (pb) située à -104 et -55 pb du site d'initiation de la transcription (Munshi et al, 1999). Cet *enhancer* contient quatre domaines de régulation positifs (PRDs), soit PRDII, PRDI-III et PRDIV qui sont liés respectivement par NF-kB (Fujita et al, 1989; Hiscott et al, 1989; Lenardo & Baltimore, 1989), les IRFs (Sato et al, 2000b; Wathelet et al, 1998) et l'hétérodimère ATF-2/c-Jun (Du & Maniatis, 1994) (**Figure 2A**). En coopération avec la *High mobility group protein A1* (HMGA1), ces activateurs lient coopérativement l'ADN et forme un complexe stable, nommé *enhanceosome*, qui active la transcription du gène IFN β en réponse à une infection virale (Du & Maniatis, 1994; Thanos & Maniatis, 1992; Thanos & Maniatis, 1995). L'*enhanceosome* permet notamment de recruter les histones acétyl transférases (HATs) GNC5 (*General-control-of-amino-acid synthesis 5*) et CBP (*cAMP response element-binding (CREB) binding protein*) afin de promouvoir l'acétylation des résidus lysine des histones H3 et H4 au niveau du nucléosome (**Figure 2B**). Par sa localisation, ce dernier couvre le site de départ de la transcription du gène IFN β et inhibe donc l'induction du gène au niveau basal (Agalioti et al, 2000). L'acétylation des histones facilite ensuite le recrutement d'un complexe de modification du nucléosome, nommé *Brahma-related gene (BRG)-Brahma (BRM)-associated factor (BAF)* (**Figure 2C**), qui permet de déplacer le nucléosome du site de départ de la transcription et le recrutement du complexe TFIID, un élément essentiel pour induire la transcription (Agalioti et al, 2000) (**Figure 2D**).

IRF-1, molécule prototype de la famille des IRFs, fut le premier activateur transcriptionnel identifié pouvant lier les séquences PRDI et PRDIII du gène IFN β (Miyamoto et al, 1988). Subséquemment, les autres IRFs furent identifiés et la famille comprend maintenant neuf membres (IRF-1 à IRF-9) (Taniguchi et al, 2001). Il a été démontré que ces IRFs jouaient un rôle important dans divers processus biologiques incluant l'immunité, l'inflammation et l'apoptose (Mamane et al, 1999; Nguyen et al, 1997). Tous les membres de cette famille sont caractérisés par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN en N-terminal, bien conservé et d'environ 120 acides aminés (aa), qui reconnaît spécifiquement une séquence consensus ISRE (5'-GAAANNGAAAG/CT/C-3'). Cette séquence est similaire à la séquence des PRDs retrouvés dans le promoteur IFN β (Tanaka et al, 1993). Les IRFs reconnaissent également une séquence nommée *IRF binding element* (IRF-E) qui s'apparente à la séquence ISRE (5'-AANNGAAANNGAAA-3').

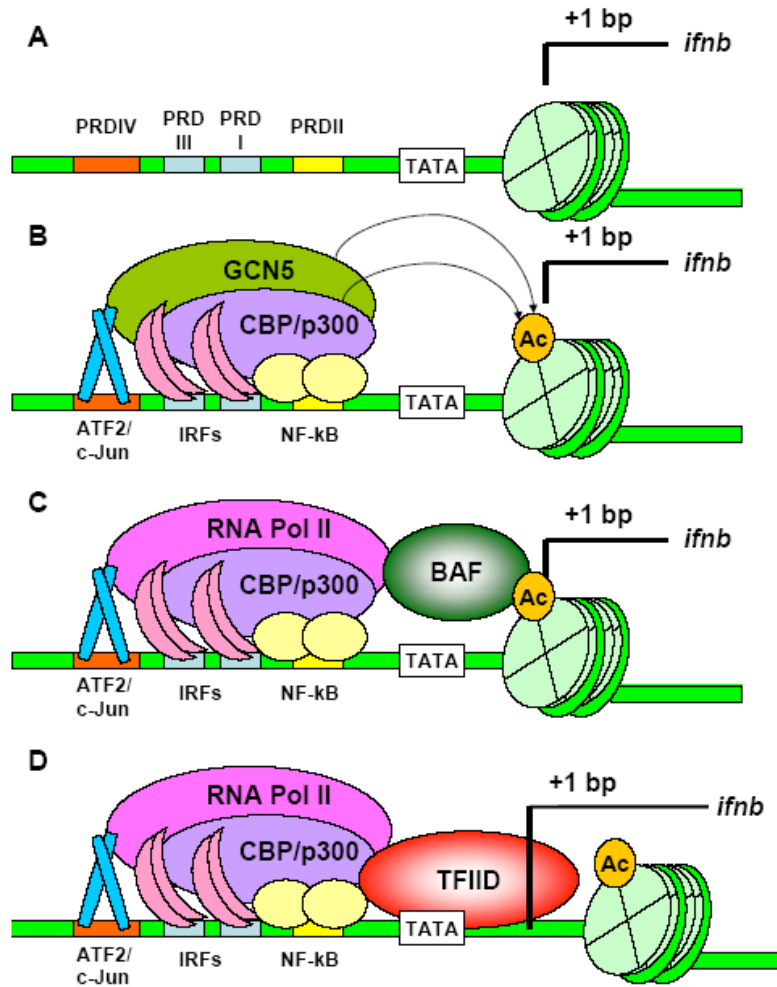


Figure 2. Transcription du gène IFN β suivant une infection virale

A) À l'état d'équilibre, le site de départ de la transcription (localisé à +1 pb) du gène IFN β est recouvert par le positionnement du nucléosome. B) Suivant une infection virale, les PRDs (I à IV) dirigent l'assemblage de ATF2/c-Jun, les IRFs, NF- κ B et HMG-1(Y) afin de former l'*enhanceosome*. L'*enhanceosome* recrute ensuite les HATs, telles que GCN5 et CBP/p300. Ces dernières acétylent (Ac) des résidus lysine sur les histones du nucléosome. C) La RNA Pol II est par la suite recrutée au niveau du promoteur, alors que les complexes de remodelage de la chromatine (BAF) sont recrutés par les histones acétylées. BAF provoque le déplacement du nucléosome du site d'origine de la transcription et permet ainsi à TFIID d'être recruté afin d'induire l'expression du gène. Figure adaptée de (Honda et al, 2006).

Parmi ces IRFs, au moins quatre membres possèdent un rôle au niveau de la régulation de la transcription du gène IFN β , soit IRF-1, IRF-3, IRF-5 et IRF-7 (Mamane et al, 1999; Nguyen et al, 1997; Tanaka et al, 1993; Taniguchi et al, 2001). Toutefois, seulement IRF-3, IRF-5 et IRF-7 peuvent fonctionner comme activateur direct des IFNs de type I lors d'une infection virale (Takaoka et al, 2005; Tamura et al, 2008). Ces trois membres possèdent la plus grande homologie structurale retrouvée chez les IRFs et ont tous un rôle important à jouer dans la voie de signalisation cellulaire associée aux *RIG-I-like Receptors* (RLRs) (**Voir Figure 3**). Ils résident généralement dans le cytoplasme sous forme latente et subissent tous des événements de phosphorylation essentiels à leur homo- ou hétérodimérisation et leur translocation nucléaire suivant une infection virale (Honda et al, 2006; Tamura et al, 2008)

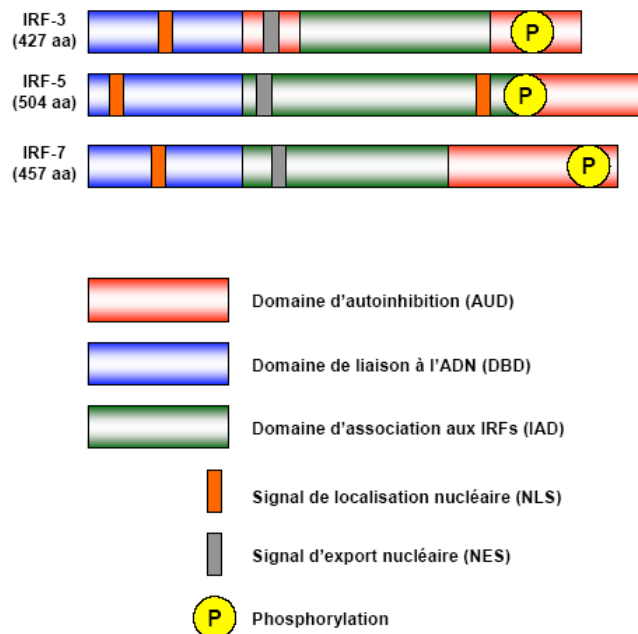


Figure 3. Structure et domaines de IRF-3, IRF-5 et IRF-7

Les domaines connus pour participer dans les interactions protéine-protéine sont indiqués par les boîtes de couleurs. La taille de chaque IRF est aussi indiquée. Figure adaptée de (Chen & Royer)

1.2 Reconnaissance des PAMPs : Les Pattern Recognition Receptors (PRRs)

L'identification récente de plusieurs senseurs moléculaires dans le système immunitaire inné a notamment permis d'établir la notion que différentes familles distinctes de PRRs étaient impliquées dans la détection des pathogènes. Ces PRRs sont divisés en trois classes, soit les *Toll-like receptors* (TLRs), les *RIG-I-like Receptors* (RLRs) et les récepteurs cytoplasmiques (Kawai & Akira, 2009). Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires qui détectent la présence de PAMPs à la surface cellulaire ou dans les compartiments endosomaux (Kawai & Akira, 2007; Robinson et al, 2006). Quant aux RLRs et récepteurs cytosoliques, ils sont impliqués dans la reconnaissance des PAMPs au niveau du cytoplasme (Franchi et al, 2009; Takaoka & Taniguchi, 2008; Takeuchi & Akira, 2008).

1.2.1 Les TLRs

1.2.1.1 Structure et fonction

La protéine Toll a originalement été identifiée chez la drosophile. La caractérisation de cette protéine avait alors démontré son implication dans la polarité dorsoventrale du développement embryonnaire de la drosophile (Lemaitre et al, 1996). Toutefois, des études plus approfondies ont cependant fini par démontrer son rôle essentiel dans la réponse immunitaire de la drosophile contre *Aspergillus fumigatus* (Lemaitre et al, 1996). Chez les mammifères, douze membres de la famille des TLRs ont jusqu'à présent été identifiés (Akira et al, 2006; Beutler, 2009; Janeway & Medzhitov, 2002) (**Voir Figure 4**).

Les TLRs sont des glycoprotéines membranaires de type I possédant une structure trimodulaire. Leur domaine extracellulaire en N-terminal est responsable de la reconnaissance spécifique des PAMPs (Kumar et al, 2009b). Il est composé d'environ 16-

différents adaptateurs impliqués dans l'activation de NF- κ B, ATF2/c-Jun et IRF-3/7. Les TLR7, TLR8 et TLR9 utilisent MyD88 comme adaptateur afin d'activer IRF-7 en plus de NF- κ B et ATF2/c-Jun. Figure adaptée de (Kumar et al, 2009b).

Les différents membres de la famille des TLRs sont exprimés chez une grande variété de cellules immunes et non immunes, telles que les lymphocytes B, les cellules NK, les cellules dendritiques, les macrophages, les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales. Toutefois, ils sont localisés dans des compartiments cellulaires distincts. Les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR11 sont exprimés à la surface cellulaire, alors que les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont localisés dans les vésicules intracellulaires (**voir Figure 4**).

1.2.1.2 Signalisation via les TLRs

La liaison des composants microbiens aux TLRs engendre l'activation d'une cascade de signalisation menant à l'induction de gènes connus pour interférer avec la propagation des pathogènes. Après la liaison du ligand, le TLR dimérise et subit un changement conformationnel permettant le recrutement des « TIR-domain-adaptor molecules » au domaine TIR des TLRs (Kumar et al, 2009b). Il existe quatre molécules adaptatrices : *Myeloid Differentiation primary response gene 88* (MyD88), *TIR-associated protein* (TIRAP)/*MyD88-adaptor adaptor-like* (MAL), *TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN β* (TRIF)/*TIR-domain containing molecule 1* (TICAM1) et *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) (Oshiumi et al, 2003; Yamamoto et al, 2003a; Yamamoto et al, 2002a; Yamamoto et al, 2003b; Yamamoto et al, 2002b). La réponse différentielle parmi les TLRs peut être en partie expliquée par l'usage sélectif de ces molécules adaptatrices. MyD88 et TRIF sont responsables de l'activation de voies de signalisation distinctes menant respectivement à la production de cytokines pro-inflammatoires et à la production d'IFN de type I (Seth et al, 2006).

1.2.1.3 TLRs et cytokines pro-inflammatoires – une voie dépendante de MyD88

MyD88 est une molécule essentielle pour la signalisation de tous les TLRs, à l'exception du TLR3. Suivant une stimulation appropriée, MyD88 s'associe avec la portion cytoplasmique du TLR afin de recruter *IL-1R-associated kinases* (IRAK)-4 et IRAK-1. Pour le TLR2 et le TLR4, TIRAP/MAL est également requis pour permettre le recrutement de MyD88 au niveau du récepteur (Fitzgerald et al, 2001; Horng et al, 2001). Après son association à MyD88, IRAK1 est phosphorylé par IRAK-4 afin de permettre son interaction avec *TNFR-associated Factor* (TRAF) 6, une E3 ubiquitine ligase (Li et al, 2002). TRAF6, en compagnie du complexe E2 d'ubiquitination UBC13/UEV1A, catalyse ensuite son autoubiquitination en K63 ainsi que l'ubiquitination de NEMO (Deng et al, 2000). Un complexe, composé de TAK1 et des *TAK1-binding proteins* (TAB), TAB1, TAB2 et TAB3, est par la suite recruté à TRAF6 afin de permettre la phosphorylation de IKK β et de *MAP kinase kinase 6* (MKK6) (Wang et al, 2001). IKK β et MKK6 sont respectivement responsables de l'activation de NF- κ B et des MAPKs impliquées dans l'induction des gènes de la réponse pro-inflammatoire.

1.2.1.4 TLRs et IFN de type I – une voie dépendante de TRIF

En plus de stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires, la signalisation par le TLR3 et le TLR4 permet d'induire une réponse IFN de type I. Ces deux récepteurs ont effectivement la capacité d'induire IFN β dans les cellules MyD88 $-/-$ grâce à une autre molécule nommée TRIF (Hoebe et al, 2003; Yamamoto et al, 2003a). En ce qui concerne le TLR4, TRAM est toutefois requis afin de pouvoir recruter TRIF et agit donc comme molécule de liaison (Yamamoto et al, 2003b). La protéine TRIF interagit ensuite avec *Receptor-interacting protein* (RIP)-1 afin d'activer NF- κ B (Meylan et al, 2004). D'un autre côté, TRIF active aussi *TRAF-family-member-associated NF- κ B activator* (TANK)-*binding kinase 1* (TBK1) et IKKi via TRAF3 (Hacker et al, 2006; Oganessian et al, 2006). TBK1 et

IKKi phosphorylent finalement IRF-3 et IRF-7 afin de stimuler la réponse IFN de type I et ainsi permettre la transactivation de certains gènes inductibles par les IFNs.

TLRs	Ligands/PAMPs	Microorganismes
TLR1/2	Triacyl lipopeptides	Bactéria et Mycobactéria
TLR2	Hemagglutinine Glycosylphosphatidyl- inositol mucin Phospholipomannan Lipoarabinomannan Peptidoglycan Porins	Measles virus Trypanosoma Candida albicans Mycobacteria Bacteria Gram + Nesseria
TLR4	LPS Mannan Glycoinositolphospholipids Protéine d'enveloppe	Bacteria Gram – Candida albicans Trypanosoma RSV et MMTV
TLR5	Flagelline	Bacteria
TLR6/2	Zyosan Acide lipoteichoïque Diacyl lipopeptides	S. Cerevisiae Streptococcus Mycoplasma
TLR11	Profilin-like molecule	Toxoplasma gondii
TLR3	dsRNA ssRNA	Reovirus/RSV/MCMV WNV
TLR7/8	ssRNA	VSV/Influenza
TLR9	dsDNA CpG-DNA motifs Hemozoin	HSV/MCMV Bacteria/virus Plasmodium

Tableau 1. Ligands des TLRs. Tableau adapté de (Akira et al, 2006).

1.2.1.5 Les TLRs extracellulaires

1.2.1.5.1 TLR1, TLR2, TLR6

Le TLR2 est capable de détecter des PAMPs provenant d'une grande variété de microorganismes dont les virus, les bactéries, les mycètes et les parasites (Akira et al, 2006). Ses ligands connus incluent le triacyl lipopeptide des bactéries et mycobactéries, le diacyl lipopeptide des mycoplasmes, le peptidoglycan et l'acide lipoteichoïque des bactéries Gram positif, la porine de *Nesseria*, le lipoarabinomannan des mycobactéries, le zymosan des mycètes, le glycosylphosphatidylinositol (GPI)-mucin du Trypanosome et l'hémagglutinine du *Measles virus*. Cette grande diversité est rendue possible grâce à son hétéromérisation avec soit le TLR1, le TLR6 ou d'autres molécules, telles que le CD36, le CD14 et la Dectin-1 (Akira et al, 2006).

1.2.1.5.2 TLR4

Le TLR4 est essentiel pour la réponse au lipopolysaccharide (LPS), le constituant majeur de la membrane externe des bactéries Gram négatif et le principal responsable des chocs septiques. Le TLR4 s'associe à *Myeloid Differentiation protein 2* (MD-2) au niveau de la surface cellulaire. Ce complexe est requis afin d'obtenir une induction robuste des cytokines pro-inflammatoires (Miyake, 2007). L'activation du TLR4 est aussi supportée par d'autres protéines, telles que la *LPS-binding protein* (LBP) et le CD14 (Lu et al, 2008). La LBP est à la fois une protéine soluble et une protéine de la membrane plasmique capable de lier le LPS. Le CD14 est une *GPI-link protein* contenant des LRRs. Elle se lie à LBP et délivre ensuite le complexe LPS-LBP au complexe TLR4-MD-2 afin d'activer la cascade de signalisation (Jin et al, 2007; Miyake, 2007). Les études avec le LPS démontrent que le lipide A est le composant actif se liant à MD-2. Un rôle de reconnaissance pour MD-2 plutôt que de signalisation lui a donc été attribué (Jin et al, 2007). Le TLR4 est aussi capable de détecter la présence des glycoinositolphospholipides du Trypanosome (Ropert et

al, 2002), la protéine de fusion du *Respiratory Syncytial virus* (RSV) (Kurt-Jones et al, 2000) et la protéine d'enveloppe du *Mouse mammary tumor virus* (MMTV) (Burzyn et al, 2004). De plus, le TLR4 est capable de reconnaître certaines protéines endogènes, telles que les *heat shock proteins* (HSPs), le fibrinogène, l'acide hyaluronique, la β -défensine et le domaine extracellulaire de la fibronectine (Takeda & Akira, 2005).

1.2.1.5.3 TLR5

Le TLR5 est responsable de la détection de la flagelline, un des composants majeurs de l'appareil de motilité des bactéries flagellées (Hayashi et al, 2001). Il est exprimé par les cellules épithéliales, les monocytes et les cellules dendritiques immatures. Le TLR5 est retrouvé majoritairement à la surface basolatérale de l'épithélium intestinal. La flagelline n'est donc reconnue par l'hôte qu'au moment où la bactérie envahit la barrière épithéliale. Une fois activée par la flagelline, les cellules épithéliales sécrètent des cytokines et chimiokines permettant le recrutement des neutrophiles (Tseng et al, 2006). Le TLR5 est aussi fortement exprimé dans les tissus pulmonaires, ce qui suggère un rôle important dans la protection contre les pathogènes des voies respiratoires supérieures (Hawn et al, 2003). En effet, une interférence moléculaire au niveau de sa signalisation intracellulaire augmente le risque de développer une pneumonie suivant une infection par le *Legionella pneumophila*.

1.2.1.5.4 TLR11

Le TLR11, retrouvé seulement chez la souris, est très similaire au TLR5. Il est hautement exprimé dans le rein et la vessie. Il semblerait jouer un rôle dans la détection des bactéries uropathogéniques. Toutefois, le ligand exact n'a pas encore été identifié (Zhang et al, 2004a). Le TLR11 reconnaît aussi des composants présents chez le *Toxoplasma gondii*

dont la *profilin-like molecule*, une protéine liant l'actine et qui semble nécessaire à la motilité ou l'évasion du parasite. La signalisation par le TLR11 engendre surtout la sécrétion d'IL-12 (Plattner et al, 2008; Yarovinsky et al, 2005).

1.2.1.6 Les TLRs intracellulaires

1.2.1.6.1 TLR3

Le TLR3 est grandement exprimé chez la cellule dendritique conventionnelle (cDC), mais non chez la cellule dendritique plasmacytoïde (pDC). Il est également exprimé chez une variété de cellules épithéliales incluant celles des voies pulmonaires, de l'utérus, de la cornée, de la muqueuse vaginale et intestinale où il agit en tant que puissante barrière aux infections (Kumar et al, 2009a). Le TLR3 reconnaît notamment l'ARN double brin (dsRNA) synthétisé par les virus à génome ARN double brin (ex. les réovirus) (Alexopoulou et al, 2001). Le dsRNA généré lors de la réplication des virus à génome ARN simple brin, tels que le *West Nile Virus* (WNV) (Wang et al, 2004a), le RSV (Groskreutz et al, 2006) et l'*Encephalomyocarditis virus* (EMCV), est aussi un substrat du TLR3 (Hardarson et al, 2007). De plus, ce dernier est capable de reconnaître le poly(IC), un analogue synthétique du dsRNA. La stimulation du TLR3 par le dsRNA active la voie de signalisation dépendante de TRIF (Oshiumi et al, 2003; Yamamoto et al, 2002b). Toutefois, il semblerait que le TLR3 active aussi la voie phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) (Sarkar et al, 2004). Après stimulation, la phosphorylation en tyrosine au niveau du récepteur permettrait le recrutement de la PI3K et l'activation subséquente de AKT. Cette cascade influencerait finalement l'activation du facteur de transcription IRF-3.

1.2.1.6.2 TLR7, TLR8 et TLR9

Le TLR7, le TLR8 et le TLR9 sont surtout fortement exprimés chez les pDCs. Ces cellules sont également connues sous le nom de *interferon-producing cells* en raison de leur haute capacité de production d'IFN α suivant une stimulation aux acides nucléiques viraux (Colonna et al, 2004). Le TLR7 reconnaît l'ARN simple brin (ssRNA) des virus qui réussissent à pénétrer dans la cellule par endocytose et qui rejoignent ensuite le phagolysosome, un endroit favorable à la décapsulation virale. Dégradé par les RNAses, le ssRNA de l'hôte n'arrive pas à atteindre ces vésicules endocytiques, ce qui explique en partie la spécificité du TLR7 pour l'ARN viral (Diebold et al, 2004; Heil et al, 2004; Hemmi et al, 2002; Lund et al, 2004). Le TLR7 peut aussi lier les homologues de l'ARN comme l'imiquimod, le resiquimod (R-848) et la loxoribine. De plus, l'ARN synthétique poly-uridine et certains *small interfering RNA* (siRNA) peuvent aussi activer le TLR7 (Diebold et al, 2004; Jurk et al, 2002). Le TLR8 est phylogénétiquement très relié au TLR7, mais son rôle spécifique demeure encore obscur. Le TLR9 est responsable de la détection des *unmethylated 2'-deoxyribo (cytidine-phosphate-guanosine) (CpG) DNA motifs* présents chez les bactéries et l'ADN viral (Hemmi et al, 2000). Il est notamment requis pour la production d'IFN α en réponse au *murine cytomegalovirus* (MCMV), *Herpes Simplex Virus* (HSV)-1 et HSV-2 (Krug et al, 2004; Lund et al, 2003). Au niveau de l'ADN de l'hôte, les motifs CpG sont généralement méthylés sur la base cytosine. Ils représentent donc de faibles stimulateurs du TLR9. De plus, il a récemment été démontré que le TLR9 pouvait reconnaître un pigment du parasite de la malaria, l'hémozoïne (Coban et al, 2005).

L'induction des IFN α par le TLR7 et TLR9 est particulière puisqu'elle est médiée par la voie dépendante de MyD88 chez les pDCs et qu'elle ne dépend pas des IKK-related kinases. Suivant une stimulation, MyD88 formerait plutôt un complexe avec IRF-7 et TRAF6 afin d'induire la production d'IFN α (Honda et al, 2004; Kawai et al, 2004). IRAK1 et IKK α seraient ensuite recrutées à MyD88 dans le but de phosphoryler IRF-7. Toutefois,

il semblerait que la sérine/thréonine kinase *mammalian target of rapamycin* (mTOR) soit également impliquée dans la signalisation cellulaire de cette voie d'activation. En effet, l'inhibition de mTOR ou de ses substrats, p70S6K1 et p70S6K2, empêcherait la liaison de MyD88 au TLR9, abolissant ainsi l'activation de IRF-7 (Cao et al, 2008).

1.2.2 Les récepteurs cytosoliques

1.2.2.1 Les NLRs

1.2.2.1.2 Structure et phylogénie de la famille NLR

Les études portant sur la caractérisation des TLRs et les analyses effectuées sur les souris déficientes pour certains TLRs ont révélé que ces derniers ne pouvaient pas être exclusivement responsables de la production des cytokines. Des analyses bioinformatiques sur le génome humain ont ensuite mené à l'identification des *nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like Receptors* (NLRs). Chez l'humain, la famille des NLRs comprend vingt-trois membres, alors que chez la souris, au moins trente membres ont été dénombrés (Ting et al, 2008). Ces derniers sont tous exprimés dans le cytoplasme. Structuralement, ils possèdent trois domaines distincts (**voir Figure 5**). En C-terminal, les NLRs possèdent un domaine LRR leur permettant la reconnaissance des PAMPs. Le domaine NOD, situé à un niveau central pour tous les NLRs, est responsable de l'oligomérisation. Le domaine effecteur est situé en N-terminal et varie en fonction du type de NLRs. Cette partie effectrice peut contenir un domaine PYD (*Pyrin Domain*) (ex. NALP1-14), un domaine CARD (*Caspase Recruitment Domain*) (ex. NOD1 et IPAF), deux domaines CARD (ex. NOD2) ou encore trois domaines BIR (*Baculovirus IAP Repeat*) (ex. NAIP) (Franchi et al, 2009; Martinon et al, 2009). De façon générale, les NLRs sont responsables de promouvoir l'assemblage d'une plateforme de signalisation moléculaire. Il en existe deux types : le NOD signalosome et l'inflammasome.

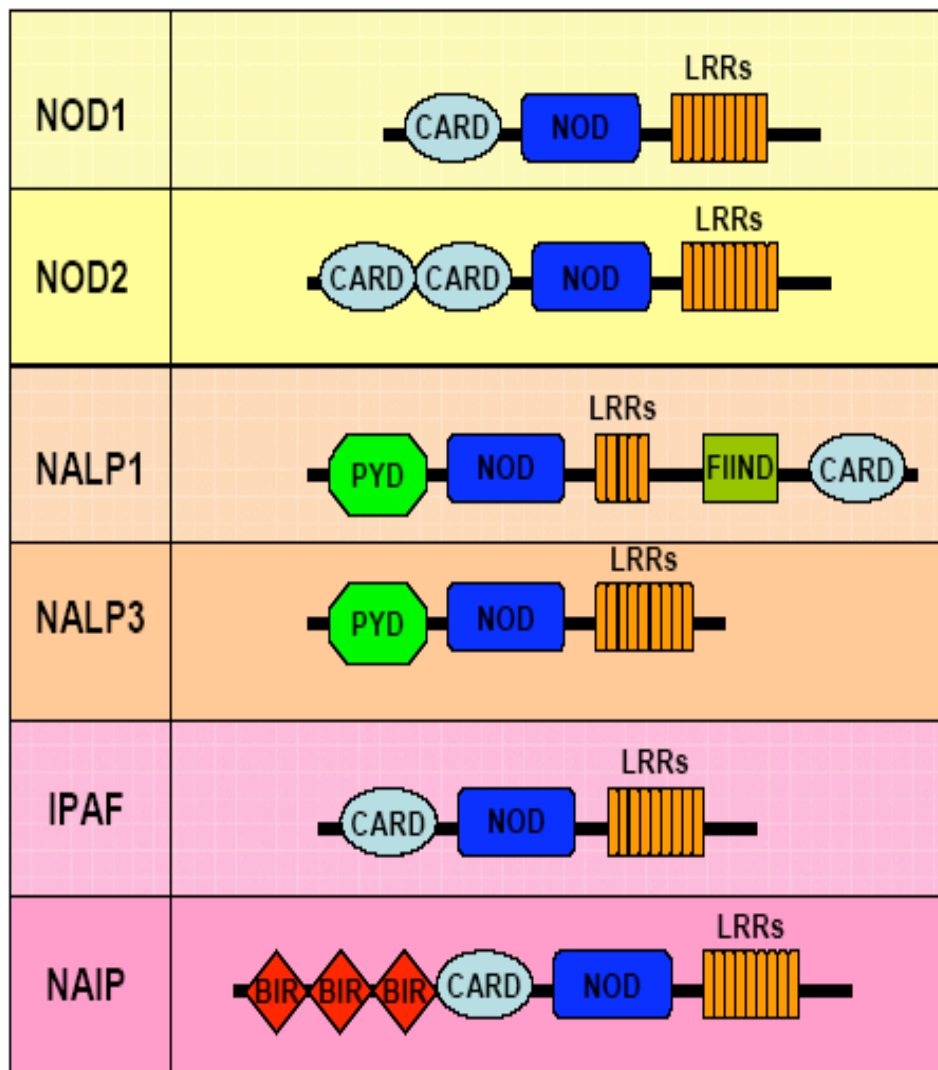


Figure 5. Domaines des différents NLRs

Figure 5. Domaines des différents NLRs. Les NLRs sont caractérisés par 3 domaines distincts : le LRR pour détecter les ligands, le domaine NACHT pour l'oligomérisation et le domaine effecteur pouvant être un domaine PYD, CARD ou BIR. Figure adaptée de (Martinon et al, 2009).

1.2.2.1.3 NOD signalosome

Le NOD signalosome est associé à NOD1 et NOD2 (**voir Figure 6**). NOD1 fut l'un des premiers NLRs caractérisés (Bertin et al, 1999; Inohara et al, 1999). Une fois activés, NOD1 et NOD2 recrutent la kinase RIP2 par l'intermédiaire d'une interaction de type CARD-CARD. L'oligomérisation de RIP2 au niveau du NOD signalosome permet l'activation subséquente de TAK1 via un mécanisme d'ubiquitination. Cette kinase active finalement le facteur de transcription NF- κ B et la voie MAPK afin de permettre l'induction de cytokines pro-inflammatoires et de gènes antimicrobiens (Hasegawa et al, 2008; Hitotsumatsu et al, 2008; Tattoli et al, 2007). Ces deux NLRs reconnaissent des composants distincts dérivés de la barrière de peptidoglycane (PGN) retrouvé dans la paroi bactérienne. En effet, NOD1 reconnaît spécifiquement l'acide g-D-glutamyl-meso-diaminopimelic (IE-DAP), un composant structural du PGN retrouvé chez les bactéries Gram négatif, mais aussi chez certaines bactéries Gram positif, telles que *Bacillus subtilis* et *Listeria monocytogenes* (Chamaillard et al, 2003; Girardin et al, 2003a). Pour sa part, NOD2 reconnaît le composant structural majeur de la barrière de PGN retrouvé chez les bactéries, soit le muramyl dipeptide (MDP) (Girardin et al, 2003a; Girardin et al, 2003b).

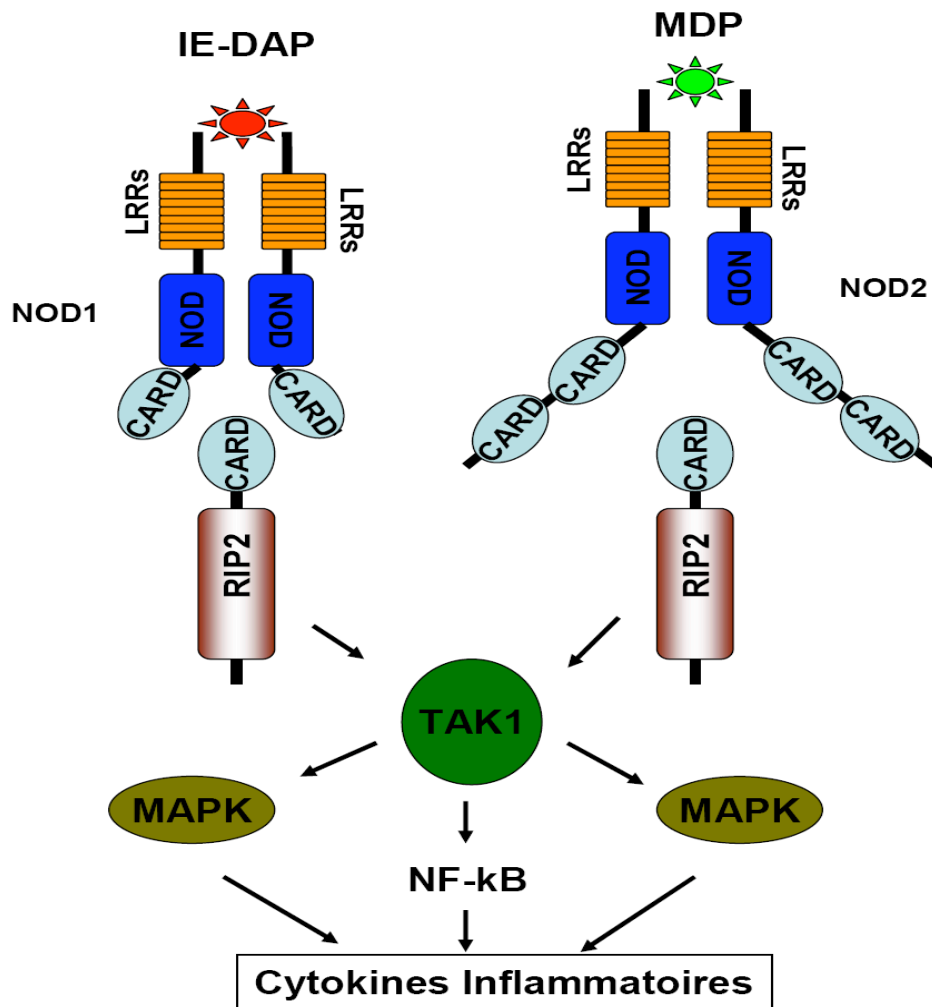


Figure 6. NOD signalosome

NOD1 et NOD2 détectent respectivement le IE-DAP et le MDP, deux composants des parois bactériennes, et recrutent RIP2. RIP2 active ensuite les MAPKs et NF-kB via TAK1. Figure adaptée de (Franchi et al, 2009).

Au niveau de l'immunité innée, NOD1 et NOD2 sont des récepteurs cruciaux pour les cellules épithéliales. Dans les cellules de la voie gastro-intestinale, ils contrôlent notamment les infections par le *Helicobacter pylori* et le *Listeria monocytogenes*

(Kobayashi et al, 2005; Viala et al, 2004). De plus, des mutations dans NOD2 ont aussi été cliniquement associées à la maladie de Crohn, une maladie inflammatoire chronique de la voie gastro-intestinale. Ces mutations identifiées étaient majoritairement localisées dans les LRRs de NOD2, suggérant ainsi une incapacité fonctionnelle de détection lors d'une infection bactérienne (Vignal et al, 2007). Plus récemment, des études ont aussi démontré un rôle de NOD2 dans l'activation de certains types d'inflammasome (Hsu et al, 2008; Pan et al, 2007).

1.2.2.1.4 Inflammasomes

Certains NLRs répondent à plusieurs PAMPs et *Damage associated molecular pattern molecules* (DAMPs) et leur activation mène à la sécrétion de cytokines faisant partie de la famille IL-1 (IL-1 β , IL-18 et IL-33). Le terme inflammasome a été utilisé pour la première fois en 2002 par le groupe de Jurg Tschopp afin de décrire un complexe de haut poids moléculaire responsable de l'activation des caspases inflammatoires et de la cytokine IL-1 β (Martinon et al, 2002). Il existe actuellement trois types d'inflammasome : le NALP1/Nlrp1 inflammasome, le NALP3/Nlrp3 inflammasome et le IPAF/Nlrc4 inflammasome (**voir Figure 7**).

Le NALP3 inflammasome est probablement le plus caractérisé des trois jusqu'à maintenant. Les NALPs agissent habituellement en tant que protéine d'échafaudage de l'inflammasome. Via une interaction PYD-PYD, les NALPs interagissent et recrutent la protéine adaptatrice *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain* (ASC) (Martinon et al, 2007). Une fois liée au complexe, la protéine ASC recrute ensuite la Caspase-1 via son domaine CARD situé en C-terminal. NALP3 possède un rôle crucial dans l'activation de la Caspase-1 lorsque la cellule est exposée à divers stimuli microbiens ou non microbiens. Le LPS et l'ATP extracellulaire activent

notamment la Caspase-1 de façon NALP3 dépendante (Mariathasan et al, 2006; Sutterwala et al, 2006). Le NALP3 inflammasome est aussi activé par la listériolysine O du *Listeria monocytogenes*, l'aérolysine de *Aeromonas hydrophila* et les hémolysines de *Staphylococcus aureus* (Gurcel et al, 2006). Récemment, des études ont démontré que l'ADN, l'ARN bactérien et les composants synthétiques R837 et R848 pouvaient également induire l'activation du NALP3 inflammasome de façon indépendante des TLRs ou de la voie des RLRs (Kanneganti et al, 2006a; Kanneganti et al, 2006b; Muruve et al, 2008) (voir **Figure 7**).

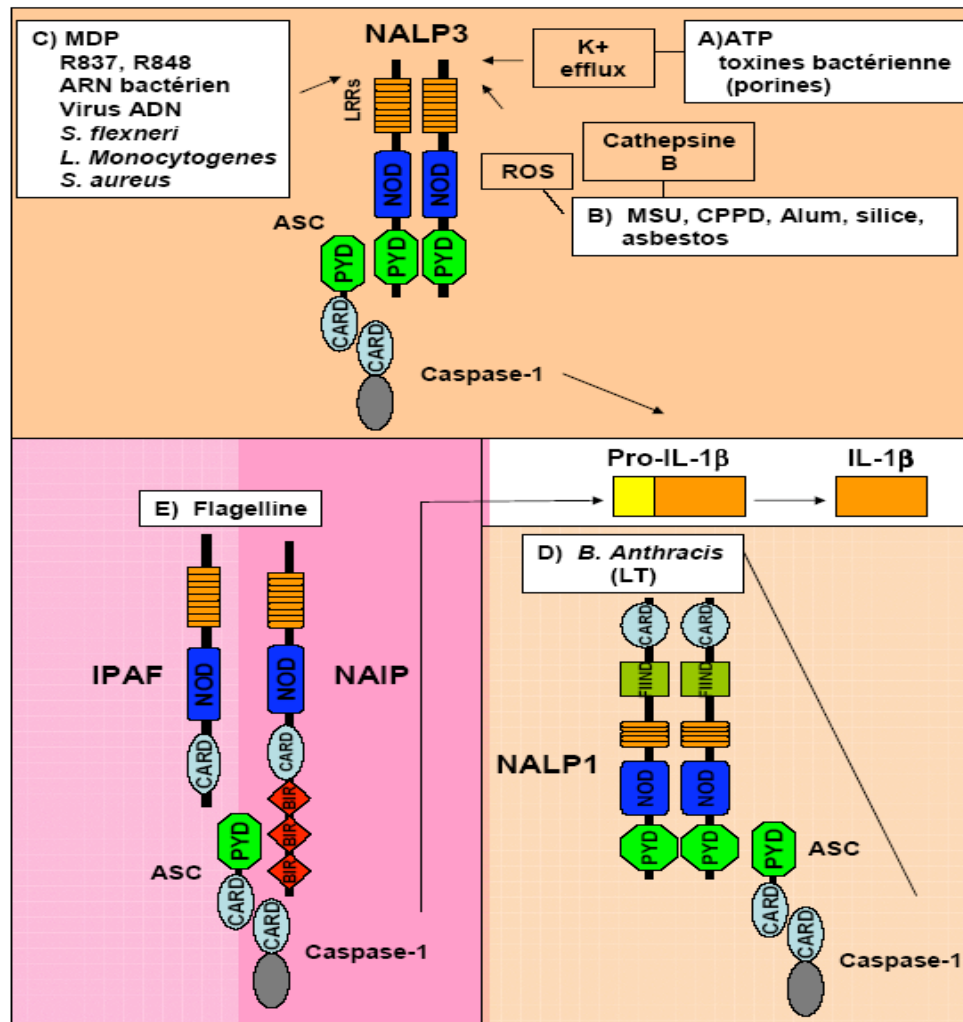


Figure 7. Les différents types d'inflammasome

Les 3 types d'inflammasome représentés peuvent recruter la Caspase-1 via la protéine adaptatrice ASC. La Caspase-1 est nécessaire afin de générer l'IL-1 β à partir de son précurseur Pro-IL-1 β . (A) Les pores formés dans la membrane cellulaire par la pannexine-1 activée lors de la liaison de l'ATP à son récepteur P2X7 ou par les toxines bactériennes de types porine engendrent un efflux de potassium (K⁺) qui active le NALP3 inflammasome. (B) La phagocytose des cristaux d'acide urique (MSU), de calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD), de sels d'aluminium (Alum), de silice et d'amiante provoque l'activation du NALP3 inflammasome par une rupture lysosomale et la libération de la Cathepsine B au niveau du cytosol. Les cristaux trop gros pour être phagocytés restent à la surface et active la production de ROS par la NADPH oxydase. Les ROS activent le NALP3 inflammasome. (C) Le muramyl dipeptide (MDP), le R837 et R848, l'ARN bactérien, certains virus ADN et plusieurs bactéries intracellulaires active le NALP3 inflammasome. (D) La flagelline active le IPAF inflammasome à l'aide de NAIP. (E) La toxine létale du *Bacillus anthracis* (LT) est détectée par le NALP1 inflammasome.

Le NALP1 inflammasome est le moins bien caractérisé des inflammasomes. Il semblerait composé de la Caspase-1, de la Caspase-5 et de la molécule ASC. NALP1 serait par contre le composant minimal pour induire l'activation de la Caspase-1 (Faustin et al, 2007). Le NALP1 inflammasome est notamment activé lors d'une exposition à la toxine létale (LT) du *Bacillus anthracis* (Boyden & Dietrich, 2006) (**voir Figure 7**).

Le IPAF inflammasome est aussi capable de réguler l'activation de la Caspase-1 et la maturation de l'IL-1 β . Ce dernier est activé par la flagelline délivrée dans le cytosol lors d'une infection bactérienne (Franchi et al, 2006; Miao et al, 2006). La *Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein 5* (NAIP5) participe aussi à la détection de la flagelline (Molofsky et al, 2006; Ren et al, 2006; Zamboni et al, 2006). IPAF et NAIP5 co-immunoprécipitent ensemble, ce qui laisse suggérer qu'ils agissent de concert afin de détecter la présence de la flagelline. La transduction du signal est relayée par le recrutement de ASC au niveau du complexe (Zamboni et al, 2006). IPAF pourrait aussi détecter d'autres PAMPs puisque certaines bactéries déficientes pour la flagelline sont également capables d'activer la Caspase-1 via IPAF (Gurcel et al, 2006; Sutterwala et al, 2006). L'activation du IPAF inflammasome mène généralement à la mort cellulaire (**voir Figure 7**).

1.2.2.2 DAI

La découverte du TLR9 et la caractérisation de son rôle dans la détection des ADNs étrangers sont venues grandement aider la compréhension de la voie d'activation des IFNs de type I. Toutefois, l'utilisation d'antagonistes du TLR9 ainsi que la génération de souris TLR9 *-/-* ont permis de mettre en évidence la présence d'un récepteur cytosolique inconnu dans la réponse IFN (Ishii et al, 2006; Okabe et al, 2005; Paladino et al, 2006; Stetson & Medzhitov, 2006; Yasuda et al, 2005). En 2006, deux groupes de recherche indépendants ont démontré de façon élégante que la réponse IFN de type I pouvait être induite à l'aide de

fragments d'ADN délivrés directement dans le cytosol (Ishii et al, 2006; Stetson & Medzhitov, 2006). En effet, la transfection d'ADN synthétique ou une infection par certaines bactéries (*Listeria monocytogenes* et *Legionella pneumophila*) pouvait activer une réponse IFN de type I dépendante de TBK1/IKKi, mais indépendante du TLR9. Ces deux études ont donc pavé la voie menant à la découverte de ce fameux récepteur ADN.

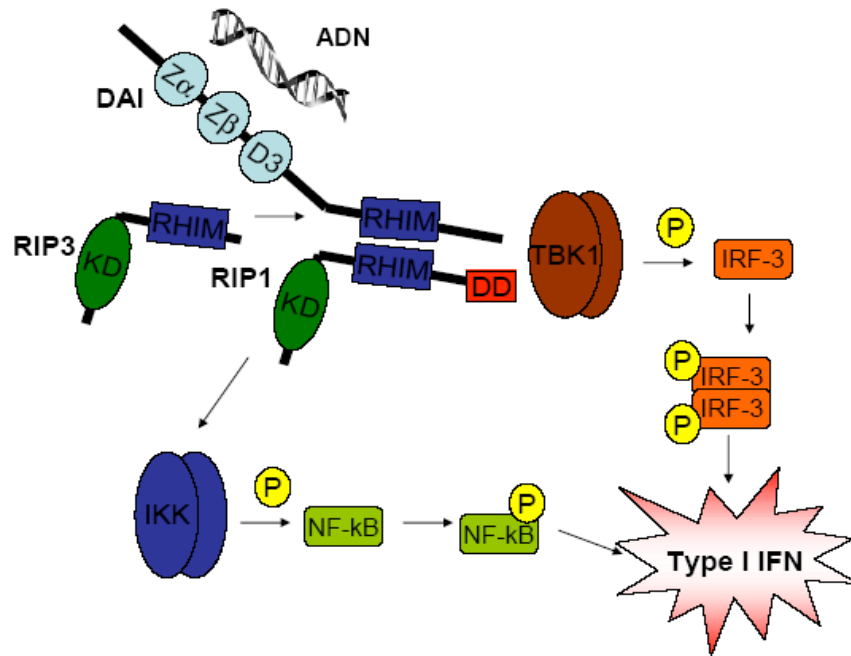


Figure 8. Voie de signalisation cellulaire associée à DAI

DAI lie l'ADN grâce à ses domaines Z α , Z β et D3. L'activation de NF- κ B est médiée par une interaction spécifique du domaine RHIM (*RIP homotypic interaction motif*) de DAI et avec ceux de RIP1 et RIP3. La partie C-terminale de DAI est responsable de l'activation de la voie IFN et nécessite la présence de TBK1 et IRF-3. Figure adaptée de (Vilaysane & Muruve, 2009).

Au cours d'une étude effectuée sur des MEFs STAT1 $-/-$ traités à l'IFN β , Takaoka et collègues ont trouvé une protéine inductible qu'ils ont ensuite nommée *DNA dependant activator of IFN regulatory factors* (DAI) en raison de sa capacité de lier l'ADN et de mener à l'induction des IFN de type I (Takaoka et al, 2007) (**voir Figure 8**). DAI localise

dans le cytoplasme et possède une distribution diffuse. Toutefois, une distribution à l'aspect granulaire de DAI a été observée par immunofluorescence. Ce PRR contient deux domaines de liaison pour l'ADN de conformation Z (ADN-Z) dans sa partie N-terminale et un domaine de liaison pour l'ADN de conformation B (ADN-B) à un niveau central de la protéine. L'ADN-B est cependant un activateur plus puissant de DAI que l'ADN-Z (Takaoka et al, 2007). Le C-terminal de DAI est responsable de la transduction du signal (Wang et al, 2008). Suite à la liaison d'ADN cytosolique, DAI recrute TBK1 pour permettre l'activation de IRF-3. NF- κ B est aussi activé lorsque du poly(dA:dT) est transfecté dans le cytoplasme, mais sa cinétique d'activation est toutefois plus lente et semblerait indépendante de TBK1. De plus, aucune activation de NF- κ B n'est détectée lorsque de l'ADN synthétique de type immunostimulatoire (ISD) est introduit dans la cellule.

Bien que DAI soit le premier récepteur d'ADN cytosolique caractérisé, plusieurs évidences laissent fortement présager la présence d'un autre récepteur. En effet, dans les cellules où les niveaux d'expression de DAI sont diminués par la technique d'ARN interférence ou encore dans les MEFs DAI $-/-$, l'induction des IFNs de type I est grandement diminué, mais pas complètement abolie (Ishii et al, 2008; Takaoka et al, 2007; Wang et al, 2008). De plus, l'induction des IFNs de type I par les ISDs, originalement caractérisée avec des fibroblastes (MEFs) (Stetson & Medzhitov, 2006), n'est pas observée chez les cellules murines L929 qui sont connues pour répondre lors d'une stimulation avec de l'ADN-B (Takaoka et al, 2007).

1.2.2.3 AIM2

La majorité des études portant sur les récepteurs cytoplasmiques de l'ADN avait comme but ultime de découvrir les mécanismes moléculaires impliqués dans la production

des cytokines pro-inflammatoires et des IFNs de type I en réponse au dsDNA. Toutefois, certains groupes avaient observé que l'introduction de dsDNA dans le cytoplasme pouvait également activer l'inflammasome et ainsi induire la production d'IL-1 β . En utilisant des approches différentes, quatre groupes indépendants ont récemment identifié le lien manquant entre l'inflammasome et le dsDNA, soit la protéine *Absent in melanoma 2* (AIM2) (Burckstummer et al, 2009; Fernandes-Alnemri et al, 2009; Hornung et al, 2009; Roberts et al, 2009). AIM2 appartient à la famille des *Pyrin and HIN200 domain-containing protein* (PYHIN). Cette famille possède trois autres membres, soit IFIX, IFI16 et MNDA. Contrairement aux autres membres des PYHINs, AIM2 localise exclusivement au niveau du cytoplasme et interagit avec ASC (Hornung et al, 2009). AIM2 serait donc responsable de lier le dsDNA cytoplasmique afin de promouvoir l'assemblage d'un complexe incluant ASC et la Caspase-1. L'activation subséquente de la Caspase-1 permettrait le clivage des pro-cytokines IL-1 β et IL-18, ainsi que leur relâche extracellulaire. La formation du AIM2 inflammasome pourrait également jouer un rôle dans l'activation de NF-kB et l'induction de la pyroptose, une sorte de mort cellulaire programmée spécifique (Hornung & Latz).

1.2.2.4 RNA polymerase III

Il a récemment été suggéré que le poly(dA:dT), un dsDNA synthétique, pouvait être transcrit par la RNA polymerase III. En effet, le *5'-triphosphate-containing dsRNA* résultant de cette transcription serait par la suite reconnu par *Retinoic-inducible gene I* (RIG-I), suggérant ainsi un nouveau mécanisme de détection des ADNs cytoplasmiques (Ablasser et al, 2009; Chiu et al, 2009). Les virus ADN, tels que le HSV, l'adénovirus, et le virus Epstein-Barr ont aussi la capacité d'induire spécifiquement cette voie de signalisation. Toutefois, ces types d'ADN peuvent aussi déclencher la production d'IFN par des voies indépendantes de RIG-I. Le mécanisme d'action et l'implication de cette voie demeurent encore incertains.

1.2.3 Les RLRs

Les RLRs sont une famille de PRRs comprenant trois membres : RIG-I, *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) et *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2). Ces trois protéines sont des hélicases à ARN de type DExD/H-box inductibles par les IFNs et exprimées au niveau du cytoplasme.

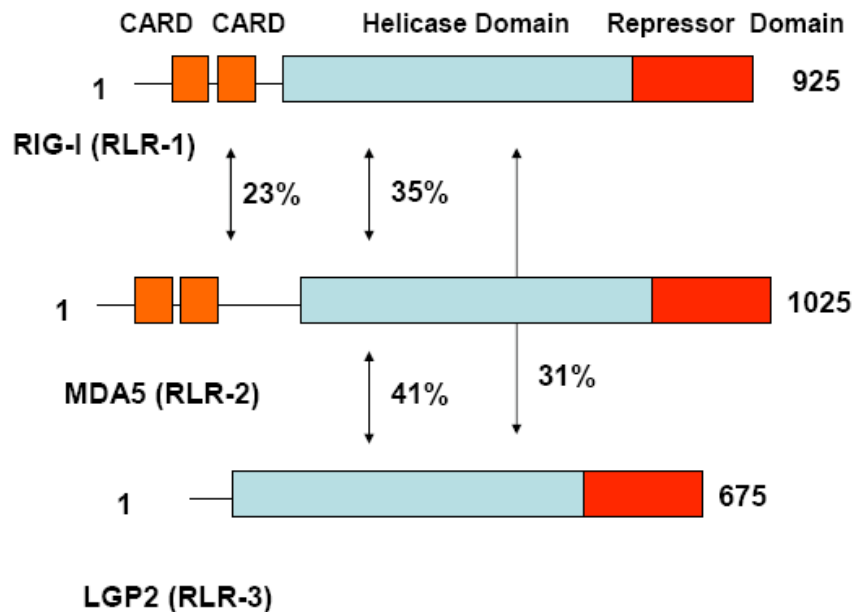


Figure 9. Structure primaire des différents RLRs

Tous les RLRs sont des hélicases ARN de type DExD/H (Bleu). RIG-I et MDA5 contiennent des domaines CARD en tandem dans leur région N-terminale (Orange). Bien que la partie C-terminale de RIG-I ou LGP2 possède un rôle de répression (Rouge), celle de MDA5 ne semble pas posséder de fonction inhibitrice particulière. L'homologie entre les domaines de chaque RLR est indiquée en pourcentage (%). Figure adaptée de (Yoneyama & Fujita, 2007).

1.2.3.1 RIG-I

RIG-I fut d'abord identifié comme une protéine induite dans les cellules traitées à l'acide rétinoïque (Yu et al, 1997). Son implication dans l'établissement d'une réponse antivirale fut rapportée pour la première fois en 2004, par le groupe du Dr Fujita

(Yoneyama et al, 2004). RIG-I possède deux domaines CARD localisés en N-terminal, un domaine ATPase central et un domaine DExD/H-box en C-terminal (**voir Figure 9**). Ce RLR est présent dans le cytoplasme et devient activé suivant une infection virale ou la transfection de dsRNA. La délétion des domaines CARD en N-terminal engendre la formation d'une protéine ayant une fonction dominante négative (aussi appelée RIG-IC), alors que la délétion de son C-terminal provoque la formation d'une protéine constitutivement active (Lin et al, 2006; Yoneyama et al, 2004). La mutation de son site de liaison de l'ATP (K270A) situé dans son domaine hélicase provoque également l'inactivation de RIG-I, suggérant ainsi que l'hydrolyse de l'ATP est nécessaire au changement conformationnel permettant l'exposition des domaines CARDS (Yoneyama et al, 2004). La portion C-terminale encode un domaine répresseur aussi présent chez LGP2. Ce domaine de répression permet de réguler l'auto-oligomérisation de RIG-I en l'absence d'infection (Saito et al, 2007).

RIG-I serait responsable de la détection des ARNs provenant des virus à génome ssRNA, tels que les *Paramyxoviridae* (ex. *Sendai virus* (SeV), *New Castle Disease virus* (NDV)), les *Flaviviridae* (ex. *Japanese encephalitis virus* (JEV), *Hepatitis C virus* (HCV)), les *Orthomyxoviridae* (ex. *Influenza virus*) et les *Rhabdoviridae* (*Vesicular Stomatitis virus* (VSV)) (**voir Figure 10**). Les *Picornaviridae* possèdent un mécanisme d'évasion leur permettant d'échapper à la détection par RIG-I (Kato et al, 2005). RIG-I reconnaît préférentiellement la partie 5'-triphosphate des ARNs viraux (Hornung et al, 2006; Pichlmair et al, 2006). Chez les *Picornaviridae*, cette partie de l'ARN est protégée par une protéine virale nommée Vpg et empêche ainsi l'activation de RIG-I (Pichlmair et al, 2006). Cette spécificité de détection des ARNs expliquerait aussi la discrimination stricte entre les ARNs viraux et ceux de l'hôte. En effet, les ARNs cellulaires perdent généralement leur groupe 5'-triphosphate lors du processus de maturation. Toutefois, il a été démontré que les petits ARNs cellulaires générés par le clivage enzymatique de la RNase L pouvaient activer la production d'IFN de type I (Malathi et al, 2007). Le dsRNA

d'une longueur inférieure à 1 kb est aussi un ligand de RIG-I, mais sa détection est évidemment indépendante du 5'-triphosphate (Takahasi et al, 2008). De plus, les petits fragments de dsRNA des *Reoviridae*, les petits fragments de poly(IC) et le dsRNA généré lors de la réplication de certains virus ADN peuvent également activer la voie de signalisation dépendante de RIG-I (Ablasser et al, 2009; Chiu et al, 2009; Kato et al, 2008; Schlee et al, 2009; Schmidt et al, 2009).

1.2.3.2 MDA5

Structuralement, les domaines CARD de MDA5 possèdent une homologie en acides aminés de 23% avec ceux de RIG-I, alors que son domaine hélicase possède 35% d'homologie (**voir Figure 9**). Le C-terminal de MDA5 ne contient pas de domaine de répression et ne démontre aucune fonction d'auto-inhibition (Saito et al, 2007; Yoneyama et al, 2004).

MDA5 est principalement responsable de la détection des ARNs des *Picornaviridae* (ex. EMCV, *Theiler's virus* et *Mengo virus*) (Gitlin et al, 2006; Kato et al, 2005) (**voir Figure 10**). Des études plus récentes ont toutefois démontré un rôle de MDA5 pour la détection des *Calciviridae* (ex. *murin norovirus-1*), des *Coronaviridae* (ex. virus de l'hépatite murine) et les longs segments de dsRNA des *Reoviridae* (Kato et al, 2008; McCartney et al, 2008; Roth-Cross et al, 2008). En revanche, la réponse antivirale au WNV et au *Dengue virus* est dépendante de MDA5 et RIG-I (Fredericksen et al, 2008; Loo et al, 2008). Contrairement à RIG-I, ce sont les fragments de poly(IC) d'une longueur supérieure à 1 kb qui sont reconnus par MDA5 (Kato et al, 2008). Les différents intermédiaires de dsRNA générés lors de la réplication virale sont donc sélectivement détectés par MDA5 ou RIG-I en fonction de leur longueur.

1.2.3.3 LGP2

LGP2 dispose d'un domaine DExD/H-box et d'un domaine répresseur situé en C-terminal, mais diffère de RIG-I et MDA5 par l'absence de domaine CARD en N-terminal. Son domaine hélicase possède respectivement 31% et 41% d'homologie en acide aminé avec celui de RIG-I et MDA5 (**voir Figure 9**). LGP2 fonctionne comme un régulateur négatif de la réponse immunitaire innée (Saito et al, 2007; Vitour & Meurs, 2007; Yoneyama et al, 2005). En effet, sa surexpression diminue significativement la production d'IFN β suivant une infection virale, alors que l'abolition de son expression cellulaire produit l'effet opposé (Rothenfusser et al, 2005). Plusieurs mécanismes d'action ont été suggérés pour expliquer son effet inhibiteur. Tout d'abord, comme son homologue RIG-IC, LGP2 pourrait séquestrer les ligands de type ARN et ainsi empêcher l'activation de RIG-I ou MDA5 (Rothenfusser et al, 2005; Yoneyama et al, 2004). Ensuite, il a été démontré que LGP2 co-immunoprécipitait avec CARDIF de façon compétitive pour un site de liaison commun avec IKKi. Le mécanisme pourrait donc être indépendant de la présence du ligand (Komuro & Horvath, 2006). Via une interaction impliquant son domaine répresseur, LGP2 pourrait également inhiber l'auto-oligomérisation de RIG-I. Selon ce modèle, la dimérisation RIG-I/RIG-I rendant la protéine active suivant une stimulation au 5'-*triphosphorylated ssRNA*, pourrait être remplacée par une hétérodimérisation de type LGP2/RIG-I (Saito et al, 2007).

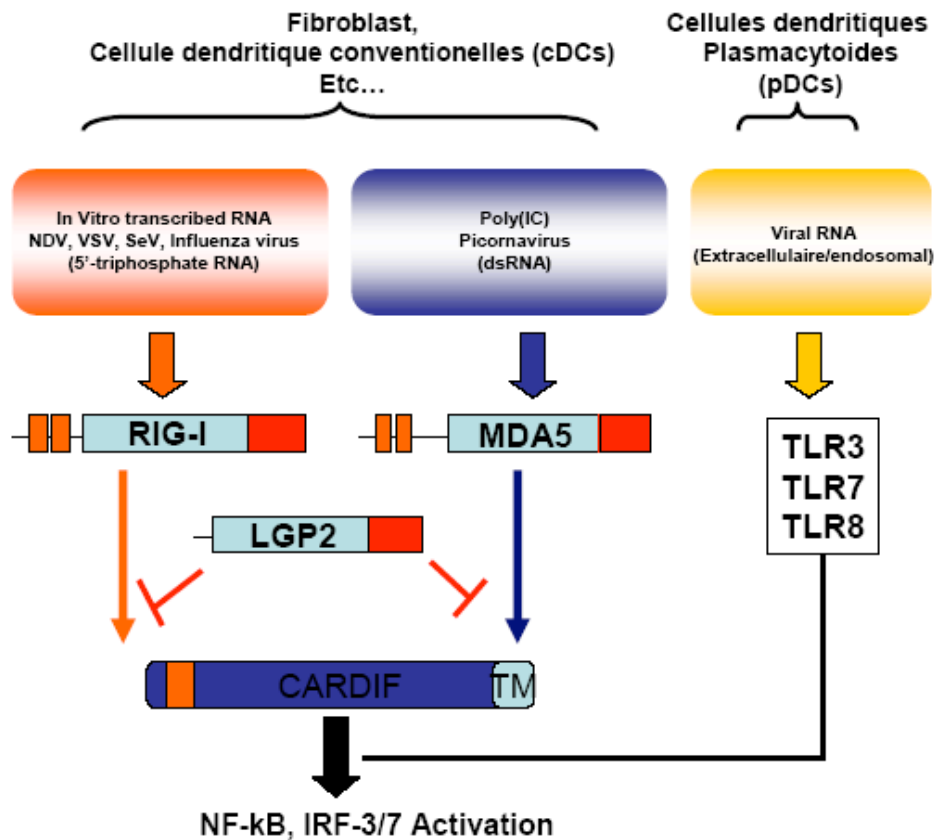


Figure 10. Reconnaissance des ARNs viraux

Dans la majorité des types cellulaires, RIG-I est essentiel pour la détection des ARNs viraux contenant un 5'-triphosphate (NDV, SeV, VSV et Influenza). MDA5 est le récepteur principal pour les ARNs des picornavirus et de la molécule synthétique poly(IC). Cependant, au niveau des pDCs, le système des TLRs est indispensable pour activer les IFNs de type I. Figure adaptée de (Yoneyama & Fujita, 2007).

1.2.3.4 Signalisation par les RLRs : importance de CARDIF et STING

En réponse à une stimulation par l'ARN viral, RIG-I et MDA5 s'associent avec la protéine adaptatrice *CARD adapter inducing IFN β* (CARDIF) aussi connue sous le nom de *IFN β promoter stimulator-1* (IPS-1), *Mitochondrial antiviral signaling* (MAVS) et *virus-induced signaling adapter* (VISA) (Kawai et al, 2005; Meylan et al, 2005; Seth et al, 2005; Xu et al, 2005). CARDIF contient un domaine CARD en N-terminal permettant une

interaction homotypique CARD-CARD avec le premier domaine CARD de RIG-I/MDA5 (Potter et al, 2008). CARDIF joue un rôle essentiel dans la signalisation par les RLRs. Cette protéine est présente dans la membrane externe mitochondriale. Cette découverte a totalement changé la perception de la réponse immunitaire innée, car un rôle dans la défense antivirale, autre que la mort cellulaire programmée, venait d'être attribué à la mitochondrie. La protéase NS3/4A du HCV réussit spécifiquement à abolir la production d'IFN grâce à un clivage de CARDIF qui engendre sa délocalisation de la mitochondrie. Il a donc été suggéré que cette localisation cellulaire mitochondriale était essentielle pour permettre l'assemblage d'un complexe de signalisation impliqué dans la réponse antivirale (Meylan et al, 2005; Seth et al, 2005). La caractérisation subséquente du complexe a ensuite permis de proposer un modèle où *TNFR-associated death domain* (TRADD) était recruté à CARDIF dans le but de promouvoir la signalisation vers NF- κ B et IRF-3 (Michallet et al, 2008). D'un côté, TRADD formerait un complexe avec *Fas-associated death domain-containing protein* (FADD), RIP1 et les Caspases 8/10 afin d'activer NF- κ B, alors que de l'autre côté, cette protéine augmenterait le recrutement de TANK à TRAF3 afin de stimuler spécifiquement IRF-3. NF- κ B et IRF-3 sont respectivement activés par le complexe IKK (IKK α /IKK β) et les IKK-related kinases (TBK1/IKKi) afin d'induire la production de cytokines pro-inflammatoires et des IFNs de type I (**voir Figure 11**).

La récente découverte de *stimulator of interferon genes* (STING) (Ishikawa & Barber, 2008), aussi connue sous le nom *mediator of IRF-3 activation* (MITA) et MPYS (Jin et al, 2008; Zhong et al, 2008), a également contribué à la grande réorganisation du modèle d'activation de la voie de signalisation des RLRs en y ajoutant un rôle pour le réticulum endoplasmique (ER). En effet, STING est une protéine possédant cinq domaines transmembranaires qui réside au niveau du ER. Sa surexpression stimule la production des IFNs de type I en activant la voie NF- κ B et la voie IRF-3 (Ishikawa & Barber, 2008). STING s'associerait préférentiellement à RIG-I plutôt que MDA5. De plus, il a été démontré que STING interagissait avec CARDIF. Il est également important de mentionner

qu'une controverse concernant sa localisation cellulaire persiste actuellement. Selon Zhong et ses collègues, la localisation de STING serait plutôt mitochondriale (Zhong et al, 2008).

En dépit des discordances sur la localisation cellulaire, les études effectuées sur STING ont apporté beaucoup d'informations additionnelles sur les mécanismes de signalisation potentiels de CARDIF. Le groupe du Dr Barber a notamment démontré que STING interagissait avec TRAP β et Sec61 β , un composant du translocon situé au niveau du ER (Ishikawa & Barber, 2008). Il est intéressant de noter que le translocon s'associe avec l'exocyste, dont l'un de ses membres, Sec5, a récemment été caractérisé comme étant un partenaire protéique de TBK1 (Chien et al, 2006) (**voir Chapitre 2**). Un modèle a donc été proposé où RIG-I pourrait lier les ARNs viraux traduits en proximité du translocon afin de permettre une signalisation cellulaire médiée par STING et TBK1 nouvellement recrutée à partir de l'exocyste (Ishikawa & Barber, 2008). Par contre, le groupe du Dr Shu propose un modèle plus simple où RIG-I s'associe à un complexe composé de STING et CARDIF. Ce complexe recruterait ensuite TBK1 afin de phosphoryler IRF-3 et permettre la synthèse des IFNs de type I (Zhong et al, 2008). Le rôle exact de STING demeure donc encore incertain.

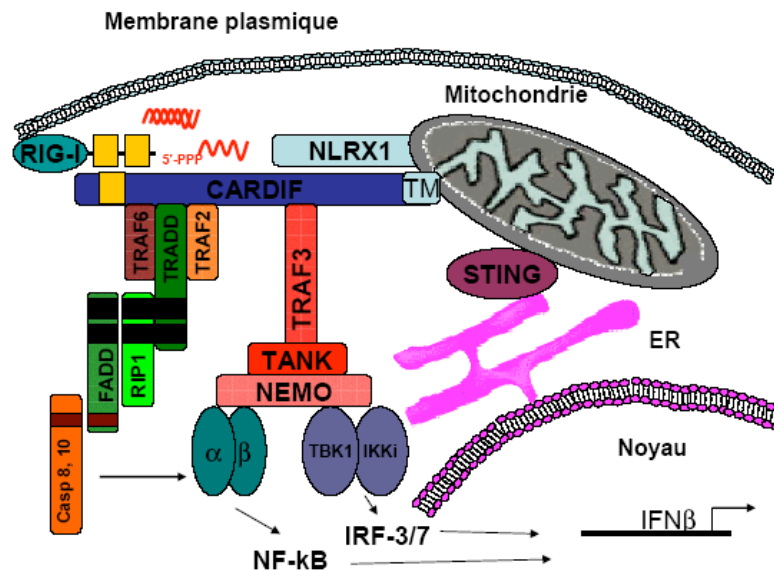


Figure 11. Voie de signalisation cellulaire associée aux RLRs

RIG-I est activé par sa liaison aux dsRNA de petite taille ou aux ssRNA contenant un 5'-triphosphate. Son activation provoque ensuite un changement de conformation qui permet une interaction CARD-CARD avec CARDIF et qui a comme conséquence de déplacer NLRX1. STING est aussi recruté à ce complexe. TRADD et TRAF3 sont recrutés à CARDIF et permettent respectivement l'assemblage de composants impliqués dans l'activation de NF- κ B et IRF-3 afin de promouvoir l'expression du gène IFN β . Figure adaptée de (Michallet et al, 2008).

1.2.3.5 Protéines adaptatrices impliquées dans la signalisation par les RLRs

La découverte de protéines impliquées dans la voie de signalisation des RLRs a été exponentielle depuis la découverte des IKK-related kinases en 2003 (voir **Figure 12**). Il devient donc difficile de les intégrer dans le modèle de signalisation cellulaire illustré ci-dessus (voir **Figure 11**). Toutefois, ces protéines possèdent toutes un rôle important à jouer dans la réponse IFN de type I. Voici donc une description plus détaillée de certains de ces médiateurs protéiques impliqués dans la régulation des RLRs. Le but de cette section est de démontrer la complexité de cette voie de signalisation cellulaire.

NF- κ B par le complexe IKK est toutefois controversé. En effet, aucun défaut d'activation de ce complexe n'a pu être observé dans les cellules TANK $-/-$ traitées au LPS ou au TNF α (Bonif et al, 2006; Gatot et al, 2007). Toutefois, il est possible que TANK soit impliqué dans le processus menant à phosphorylation des différents membres de la famille NF- κ B, p65 (Adli & Baldwin, 2006; Mattioli et al, 2006), c-Rel (Harris et al, 2006) ou p52 (Wietek et al, 2006) par les IKK-related kinases. Via son domaine N-terminal, TANK se lie de façon constitutive à TBK1 (Pomerantz & Baltimore, 1999a) et IKKi (Nomura et al, 2000). De plus, sa présence est essentielle à la phosphorylation de IRF-3 par les IKK-related kinases (Gatot et al, 2007; Guo & Cheng, 2007). TANK semble donc être une protéine d'échafaudage qui, par l'intermédiaire de ses multiples domaines, permet le recrutement des différents composants impliqués dans l'activation du complexe IKK et des IKK-related kinases.

1.2.3.5.1.2 NAP1

NAK-associated protein 1 (NAP1), une protéine d'échafaudage initialement identifiée comme partenaire protéique de TBK1 (aussi nommé NAK), partage certaines caractéristiques structurales avec TANK (Fujita et al, 2003). NAP1 et TANK ont une homologie en acides aminés de 18,2%. NAP1 avait originalement été impliqué dans l'assemblage du complexe nécessaire à la phosphorylation de p65 par TBK1. Toutefois, une participation du complexe NAP1-TBK1/IKKi-IRF-3 dans l'induction de l'expression des IFNs de type I par la voie des RLRs a également été démontrée (Sasai et al, 2005). NAP1 est donc un médiateur cellulaire important permettant l'assemblage d'un complexe de signalisation qui a pour fonction principale de phosphoryler les facteurs de transcription NF- κ B et IRF-3.

1.2.3.5.1.3 SINTBAD

Lors d'une analyse bioinformatique ayant pour but de trouver des homologies de séquences parmi les différents composants de la voie d'activation de IRF-3, une grande homologie entre NAP1 et la protéine KIAA0775 fut observée (Ryzhakov & Randow, 2007). Cette protéine, par la suite renommée *similar to NAP1 TBK1 adaptor* (SINTBAD), interagit de façon constitutive avec TBK1 et IKKi. Tout comme NAP1 et TANK, SINTBAD est essentiel à l'induction des gènes dépendants du facteur de transcription IRF-3. Ces trois protéines adaptatrices semblent d'ailleurs lier les IKK-related kinases grâce à leur *TBK1/IKKi-binding domain* (TBD) commun. Lors d'une infection virale, SINTBAD semble donc jouer un rôle dans l'assemblage d'un complexe de signalisation impliquant TBK1 et IKKi.

1.2.3.5.1.4 NEMO

Bien que NEMO semble être essentiellement dédié à la voie de signalisation de NF- κ B, Zhao et collaborateurs ont récemment démontré un rôle de cette protéine dans l'activation des IRFs (Zhao et al. 2007). NEMO agirait comme molécule de liaison permettant l'activation simultanée des deux voies de signalisation. Comme mentionné précédemment, la voie de signalisation IRF-3/IRF-7 dépend des IKK-related kinases, TBK1 et IKKi, pour assurer la phosphorylation de ces facteurs de transcription. Ces deux kinases appartiennent à un complexe qui inclut probablement TANK, NAP1 ou SINTBAD (Chau et al. 2008). Selon Zhao et ses collègues, NEMO agirait en amont de TBK1 et IKKi par sa capacité de recruter TANK. Son rôle exact dans la cascade demeure toutefois encore incertain.

1.2.3.5.1.5 HSP90

Les HSPs font parties d'une famille de protéines dont les fonctions majeures sont de promouvoir le bon repliement protéique et d'assurer l'assemblage des protéines (Agashe & Hartl, 2000; Bukau et al, 2000; Feldman & Frydman, 2000; Jakob et al, 1995). Le mécanisme cellulaire le plus caractérisé pour HSP90 est celui associé à la maturation du récepteur des glucocorticoïdes (GR). En absence de ligand, GR est séquestré par HSP90 au niveau du cytoplasme afin d'assurer son inactivité (Cadepond et al, 1991; Giguere et al, 1986). HSP90 fut identifié dans une étude utilisant la technique du double-hybride afin de pouvoir identifier de nouveaux interacteurs protéiques de IRF-3 (Yang et al, 2006). Son inhibition par la geldanamycine réduit l'activation de IRF-3. Les expériences ont notamment démontré que cet inhibiteur pharmacologique empêchait HSP90 de se complexer à TBK1. L'absence de cette interaction provoque la déstabilisation de TBK1 en accélérant sa dégradation par le protéasome. Il a donc été suggéré que HSP90 formait un complexe avec TBK1 et IRF-3 dans le but de pouvoir assurer une proximité physique entre ces deux protéines. Ceci faciliterait la transduction du signal lors d'une infection virale.

1.2.3.5.1.6 TRADD/ FADD/RIP1/Caspase8-10

TRADD a d'abord été caractérisé comme un composant du complexe de signalisation recruté au niveau du récepteur du TNF (TNFR1) (Hsu et al, 1995). TRADD s'associe à la région cytoplasmique du TNFR1 pour ensuite recruter RIP1 et FADD grâce à des interactions impliquant les *death domains* des trois protéines (Hsu et al, 1996a; Hsu et al, 1996b). Ces associations mènent ultimement à l'activation de NF-kB via RIP1 ou à la mort cellulaire programmée via la voie TRADD-FADD-Caspase 8/10. Récemment, il a été suggéré que TRADD était une protéine adaptatrice importante de la voie de signalisation des RLRs (Michallet et al, 2008). Comme mentionné précédemment (**voir section 1.2.3.4**), TRADD interagit avec CARDIF afin de permettre le recrutement des différents complexes activant NF-kB et IRF-3. Puisque le recrutement du complexe FADD/RIP1 à CARDIF

semblait augmenter l'interaction entre TRAF3 et TANK, les auteurs ont alors suggéré que TRADD orchestrait la signalisation de NF- κ B qui est dépendante de FADD et RIP1 d'un côté et celle de IRF-3 qui est dépendante de TANK et TRAF3 de l'autre côté. La Caspase 8 et la Caspase 10 sont clivées lors d'une stimulation au dsRNA et la surexpression des formes clivées est suffisante pour mener à l'activation de NF- κ B. De plus, les cellules Caspase 8 $-/-$ stimulées au poly(IC) démontrent une réduction importante de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et de l'activation de NF- κ B, illustrant ainsi l'importance des caspases dans la signalisation par les RLRs (Takahashi et al, 2006).

1.2.3.5.1.7 TRAF3

L'activation de RIG-I/MDA5 entraîne la dimérisation/oligomérisation de CARDIF par l'intermédiaire de ses domaines CARD. Cette dimérisation permet ensuite le recrutement de TRAF3 au niveau de CARDIF (Baril et al, 2009; Tang & Wang, 2009). Les deux protéines semblent interagir directement grâce au domaine TRAF de TRAF3 et le *TRAF-interaction motif* (TIM) présent chez CARDIF (Saha et al, 2006). Une fois TRAF3 recruté au niveau du complexe de signalisation, son domaine E3 ligase de type RING assemble préférentiellement des chaînes de polyubiquitines en K63 afin de former une plateforme nécessaire au recrutement des IKK-related kinases. Les caractéristiques moléculaires de TRAF3 seront davantage détaillées dans une section ultérieure de cette thèse (**voir section 1.3.2**).

1.2.3.5.1.8 TRAF2 et TRAF6

De façon similaire à TRAF3, TRAF2 et TRAF6 interagissent aussi avec CARDIF (Xu et al, 2005). Bien que l'interaction de TRAF6 fût observée, son rôle dans l'induction des IFNs de type I demeure encore incertain. Toutefois, une étude récente implique TRAF6 dans l'activation de NF- κ B, p38 et JNK suivant la transfection de poly(IC) (Yoshida et al,

2008). Cette étude propose que la présence de TRAF6 et de MEKK1 au niveau de CARDIF soit nécessaire pour assurer une induction optimale des IFNs de type I via NF- κ B et les MAPKs. Dans une autre étude, Mikkelsen et collaborateurs ont démontré que TRAF2 et TAK1 étaient des composants essentiels à l'activation de p38 au niveau de la voie de signalisation des RLRs (Mikkelsen et al, 2009). Cette activation permettrait notamment la production d'IL-12 et potentialiserait l'induction des IFNs de type I.

1.2.3.5.1.9 c-Src

La participation de c-Src dans la voie de signalisation de RIG-I a tout récemment été démontrée (Johnsen et al, 2009). Des études antérieures avaient déjà proposé son implication dans l'activation des facteurs de transcription IRF-3 et STAT1 au niveau de la voie de signalisation du TLR3 (Johnsen et al, 2006). Les données semblaient alors indiquées que c-Src était situé en aval de TRIF. Dans la voie de signalisation de RIG-I, la présence de c-Src augmente l'activation de IRF-3 et la production de protéines antivirales. Son effet est principalement médié par son association au domaine RING de TRAF3. Ceci expliquerait son rôle dans les deux voies de signalisation activées par le dsRNA (TLR3 et RLRs).

1.2.3.5.1.10 TRIM25

La transduction du signal par RIG-I est aussi régulée par l'ubiquitination. En effet, *tripartite motif 25* (TRIM25), une E3 ubiquitine ligase contenant un domaine de type *RING Finger*, interagit avec le domaine CARD de RIG-I situé en N-terminal (Gack et al, 2007). L'ubiquitination de RIG-I par TRIM25 permet la création d'une plateforme d'ancrage pour CARDIF. TRIM25 influence donc l'activation de cette voie de signalisation et la production des IFNs de type I en réponse aux infections virales.

1.2.3.5.1.11 NOX2 et ROS

Les *reactive oxygen species* (ROS) sont maintenant bien connus pour leur contribution dans les voies de signalisation intracellulaire (Droge, 2002). Les enzymes de type *NADPH oxydase* (NOX) sont la principale source de production des ROS cellulaires. NOX2 et sa production de ROS sont requis afin d'obtenir une activation optimale de IRF-3 ainsi que l'induction des gènes IFN β et IFIT1 (Soucy-Faulkner et al). De plus, NOX2 serait nécessaire pour l'expression de CARDIF. En effet, la séquestration des ROS, tout comme la régulation à la baisse des niveaux d'expression de NOX2, engendrent une diminution drastique de l'ARNm de CARDIF.

1.2.3.5.1.12 DDX3

DDX3 est un membre de la famille des *DEAD-box RNA helicase* qui a reçu beaucoup d'intérêt ces dernières années parce que plusieurs études ont démontré sa manipulation par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1, le HCV et les *poxviridae* (Ariumi et al, 2007; Mamiya & Worman, 1999; Owsianka & Patel, 1999; Schroder et al, 2008; Yedavalli et al, 2004; You et al, 1999). Dernièrement, l'implication de DDX3 dans l'induction de certains médiateurs antiviraux a été observée (Schroder et al, 2008; Soulat et al, 2008). Suivant une infection virale, DDX3 interagit avec IKKi pour contribuer à l'activation de IRF-3 ainsi qu'à l'induction des IFNs de type I. Selon le groupe du Dr Superti-Furga, DDX3 serait également un partenaire et un substrat de TBK1. Cette hélicase serait également capable de lier la région *enhancer* du promoteur IFN β afin d'agir comme cofacteur transcriptionnel. Le mécanisme moléculaire expliquant la contribution de DDX3 dans l'activation de IRF-3 demeure donc encore incertain.

1.2.3.5.1.13 GRIP1

Les glucocorticoïdes inhibent drastiquement la production des cytokines et chimiokines. Ils agissent sur le GR, un facteur de transcription de type ligand dépendant qui réprime notamment l'activité de AP1 et de NF- κ B en utilisant GRIP1 comme co-répresseur. En utilisant la technique du double-hybride et GRIP1 comme appât moléculaire, Reily et collaborateurs ont identifié IRF-3 comme partenaire protéique potentiel (Reily et al, 2006). Les études de co-immunoprécipitation ont ensuite démontré l'interaction entre les deux protéines ainsi qu'une compétition entre IRF-3 et GR pour la liaison de GRIP1. GRIP1 serait donc un nouveau cofacteur impliqué dans la transcription des gènes dépendant de IRF-3. Son mécanisme d'action demeure toutefois encore obscur. Il a été suggéré que GRIP1 pourrait faciliter le recrutement de CBP/p300 au niveau du promoteur ou qu'il pourrait contribuer à la stabilisation de IRF-3 sur l'ADN.

1.2.3.5.1.14 Cyclophiline B

Cyclophiline B (CypB) est un membre de la famille des cyclophilines. Ces protéines possèdent une activité peptidyl-prolyl isomérase *cis-trans* qui permet de faciliter le repliement protéique (Price et al, 1994). Les cyclophilines contribuent ainsi à la maturation et au transport de plusieurs protéines cellulaires (Kay, 1996). De plus, les cyclophilines sont impliquées dans certaines cascades de signalisation, notamment celles menant à la transactivation des gènes par c-myc et IRF-4 (Leverson et al, 1998; Lopez-Ilasaca et al, 1998). En utilisant la technique du double hybride, Obata et ses collègues ont identifié IRF-3 comme un nouveau partenaire protéique de CypB (Obata et al, 2005). La baisse des niveaux d'expression de CypB par la technique d'ARN interférence entraîne une diminution de l'activation de IRF-3 suivant une infection virale. En effet, des altérations ont été observées au niveau de sa phosphorylation, dimérisation, capacité de liaison à l'ADN et de son interaction avec CBP. CypB serait donc impliqué dans la modulation de l'expression du gène *ifn β* via son interaction avec IRF-3.

1.2.3.5.2 Les régulateurs négatifs

1.2.3.5.2.1 NLRX1

NLRX1 est une protéine de la famille des NLRs localisée dans la membrane externe de la mitochondrie. Cette dernière joue un rôle important dans la voie de signalisation des RLRs. NLRX1 inhibe la production des IFNs de type I en empêchant l'interaction de RIG-I/MDA5 avec CARDIF (Moore et al, 2008). NLRX1 s'associe à CARDIF grâce à une interaction impliquant son *nucleotide-binding domain* (NBD) et le domaine CARD de CARDIF. La suppression de son domaine LRR abolit son effet d'inhibition sur CARDIF, mais n'empêche toutefois pas l'interaction entre les deux protéines. Moores et collaborateurs proposent que le rôle de NLRX1 soit de compétitionner avec RIG-I pour une interaction avec CARDIF. Son niveau d'expression cellulaire ne varie pas lorsque la voie de signalisation des RLRs est activée ou lorsque les cellules sont traitées à l'IFN β . NLRX1 serait donc un inhibiteur à l'état d'équilibre de la réponse IFN plutôt qu'un régulateur à rétro-action négative de cette voie de signalisation.

1.2.3.5.2.2 PLK1

La *polo-like kinase* (PLK1) fut identifié comme un partenaire de CARDIF grâce à la technique du double-hybride (Vitour et al, 2009). L'interaction entre les deux protéines est médiée par le domaine Polo-box de PLK1 et le domaine C-terminal de CARDIF. PLK1 phosphoryle CARDIF sur la thréonine 234 du motif STP situé au niveau du domaine Proline-riche. Cette phosphorylation empêcherait CARDIF de pouvoir activer les voies de signalisation menant à l'activation de IRF-3 et NF-kB. Une autre étude vient de démontrer que PLK1 interagissait aussi avec TANK (Zhang et al). Ce recrutement de TANK à PLK1 serait par contre impliqué dans la régulation négative de NF-kB au niveau de la voie de signalisation du TNF.

1.2.3.5.2.3 RNF125

Bien qu'activé par la E3 ligase TRIM25, RIG-I est également inhibé par une autre ubiquitine E3 ligase, soit RNF125. Cette dernière induit son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Arimoto et al, 2007). Cette protéine appartient aussi à la famille de E3 ligase de type *RING Finger*. La région N-terminale de RNF125 s'associe à RIG-I via son domaine CARD et son domaine hélicase. RNF125 serait aussi responsable de l'ubiquitination de MDA5 et de CARDIF.

1.2.3.5.2.4 SIKE

La protéine *suppressor of IKKε* (SIKE) fut identifiée par la méthode de double-hybride en utilisant IKKε (autre nomenclature pour IKKi) comme apât moléculaire (Huang et al, 2005). Toutefois, SIKE s'associe également à TBK1. Sa surexpression inhibe efficacement la signalisation induite par IKKi, TBK1, TRIF, TLR3 et RIG-I. De plus, cette protéine semble jouer un rôle spécifique dans la voie d'activation de IRF-3 puisque l'activation de NF-κB n'est pas influencée par la surexpression de cette protéine. SIKE est présent dans le cytoplasme et forme un complexe de haut poids moléculaire en compagnie de TBK1 et d'une protéine non caractérisée à ce jour. Son rôle serait d'empêcher le recrutement des IKK-related kinases au niveau des autres composants protéiques impliqués dans la signalisation médiée par RIG-I et le TLR3. Suivant une infection virale ou une stimulation par le dsRNA, SIKE se dissocierait des IKK-related kinases afin de permettre aux deux kinases de pouvoir accomplir leur fonction cellulaire.

1.2.3.5.2.5 RFP

En utilisant la technique du double-hybride, Zha et collaborateurs ont réussi à identifier la *Ret Finger Protein* (RFP) comme un partenaire potentiel de IKKi (Zha et al, 2006). Des études plus approfondies ont démontré que RFP interagissait avec les deux

IKK-related kinases, mais aussi avec les composants du complexe IKK, IKK α et IKK β . RFP inhibe l'activation de NF-kB et/ou de IRF-3 médiée par le TNF, l'IL-1, le poly(IC) et une infection virale. En ciblant le complexe IKK ou les IKK-related kinases, RFP agirait donc en tant que régulateur négatif de l'inflammation et de la réponse antivirale.

1.2.3.5.2.6 CYLD

La protéine suppresseur de tumeur *Cylindromatosis* (CYLD) contient les boîtes cystéine et histidine retrouvées typiquement dans la famille des *ubiquitin-specific protease* (UBP) parmi les enzymes de déubiquitination (DUB) (Bignell et al, 2000). Deux groupes de recherche indépendants ont simultanément identifiés CYLD comme étant un nouveau régulateur négatif de la voie RIG-I (Friedman et al, 2008; Zhang et al, 2008b). Les données de ces études démontrent que CYLD cible RIG-I, TBK1 et IKKi pour la déubiquitination, engendrant ainsi l'inactivation de la signalisation cellulaire. CYLD s'associe au domaine CARD de RIG-I et supprime les chaînes de polyubiquitination en K63 conjuguées sur ce domaine par TRIM25. La perte de CYLD dans les cDCs cause notamment une accumulation d'ubiquitination chez RIG-I. RIG-I est donc constamment en cycle d'ubiquitination-déubiquitination où l'étape dominante à l'état d'équilibre est celle de la déubiquitination. De plus, cette accumulation cellulaire de RIG-I ubiquitiné chez les cDCs CYLD $-/-$ est fortement associée à une activité constitutive des IKK-related kinases. Les mécanismes cellulaires précis contrôlant les cycles d'ubiquitination par TRIM25 et de déubiquitination par CYLD demeurent toutefois inconnus.

1.2.3.5.2.7 A20

A20 est une protéine induite suite à l'activation de la voie NF-kB. Cette protéine est unique, car elle possède à la fois une activité déubiquitinase médiée par son domaine

ovarian tumor (OTU) situé en N-terminal et une activité E3 ligase associée à son domaine C-terminal. A20 était antérieurement connue pour son implication dans la régulation négative de NF- κ B au niveau de la voie de signalisation du TNF (Chen, 2005). Il semblerait que A20 soit également un régulateur négatif de l'activation de IRF-3 suite à la stimulation des voies de signalisation associées à RIG-I et au TLR3 (Lin et al, 2006; Saitoh et al, 2005; Wang et al, 2004b). Les études publiées présentent toutefois quelques discordances quant à la fonction de cette protéine. De son côté, le groupe du Dr Hiscott prétend que l'expression de A20, suivant une infection virale, a pour but d'interférer efficacement avec l'activation de NF- κ B et de IRF-3 dans la voie de signalisation des RLRs. Son rôle dans la voie de signalisation du TLR3 serait très mitigé (Lin et al, 2006). Deux autres groupes sont d'un avis contraire et prétendent que le rôle de A20 se situe principalement au niveau de la voie du TLR3. En effet, la modulation des niveaux d'expression de A20, soit par surexpression ou ARN interférence, influence l'activation de IRF-3 et NF- κ B suite à une stimulation par des ligands du TLR3 (Saitoh et al, 2005; Wang et al, 2004b). Une étude plus récente vient compliquer davantage notre compréhension de A20. En effet, des expériences utilisant des macrophages dérivés de souris A20 $-/-$ suggèrerait un rôle spécifique de cette enzyme dans l'activation de NF- κ B par le TLR3 et non dans celle de IRF-3 (Turer et al, 2008). Le rôle de A20 au niveau de la réponse immunitaire innée est donc très controversé.

1.2.3.5.2.8 DUBA

Deubiquitinating enzyme A (DUBA) est un autre membre de la famille des DUBs caractérisées par la présence d'un domaine OTU qui agit en tant que régulateur négatif de la voie de signalisation des RLRs. DUBA fut découvert lors d'un criblage à haut débit utilisant des siRNA dirigés contre les DUBs (Kayagaki et al, 2007). La baisse des niveaux d'expression de DUBA provoque une augmentation de la réponse IFN de type I, alors que sa surexpression engendre l'effet inverse. DUBA est spécifiquement responsable d'inhiber

l'interaction TRAF3-TBK1. DUBA se lie à TRAF3 et clive sélectivement les chaînes de polyubiquitine K63 présentes sur sa cible. Par conséquent, TRAF3 se dissocie du complexe de signalisation où TBK1 est aussi présent. DUBA est donc un nouveau régulateur négatif de la réponse immunitaire innée.

1.2.3.5.2.9 TRIAD3A

TRIAD3A est une E3 ubiquitine ligase de type RING qui interagit avec plusieurs composants de la voie de signalisation des TLRs, dont TRIF et TIRAP, afin de promouvoir leur dégradation par le protéasome (Chuang & Ulevitch, 2004). Suivant une infection virale, TRIAD3A s'associe également à TRAF3. Le rôle de cette interaction inductible est de cibler TRAF3 pour la polyubiquitination en K48 et de stimuler sa dégradation par le protéasome. La surexpression de TRIAD3A interfère notamment avec l'activation de IRF-3 et la production des IFNs de type I. De plus, TRIAD3A semble promouvoir la dissociation de CARDIF et TRAF3 en compétitionnant avec CARDIF pour le domaine TRAF de TRAF3 (Nakhaei et al, 2009).

1.2.3.5.2.10 RNF5

RNF5 est une E3 ligase qui a été associée au contrôle de la motilité cellulaire, au contrôle de la qualité protéique, au cancer et aux myopathies dégénératives (Bromberg et al, 2007; Didier et al, 2003; Younger et al, 2006). RNF5 contient un domaine transmembranaire en C-terminal et localise au niveau du ER. Dans une étude vouée à trouver de nouveaux modulateurs de la voie de signalisation des RLRs, Zhong et collaborateurs ont observé une interaction inductible entre STING et RNF5 en présence d'une infection virale (Zhong et al, 2009). La surexpression de RNF5 interfère avec l'activation de IRF-3 et l'expression d'IFN β . RNF5 est responsable de la polyubiquitination sur la lysine 150 de STING. Cette modification engendre sa dégradation par le protéasome.

L'étude effectuée par Zhong et ses collègues apporte aussi certaines précisions concernant la controverse qui entoure la localisation cellulaire de STING. Selon ce groupe, STING localiserait d'abord à la mitochondrie pour être ensuite relocalisé dans le ER lors d'une infection virale. La situation serait inversée pour RNF5. Cette dernière aurait une localisation initiale au niveau du ER pour être finalement redistribuée vers la mitochondrie pendant l'infection. Le processus d'ubiquitination de STING aurait toutefois lieu à la membrane mitochondriale. En somme, RNF5 est un nouveau régulateur négatif de la voie de signalisation associée aux RLRs.

1.2.3.5.2.11 Atg5-Atg12

L'autophagie est un processus cellulaire impliquant des voies non spécifiques de dégradation/recyclage essentielles pour le recyclage des macromolécules stables, le maintien d'un pool d'acides aminés cellulaire pendant un jeûne et la réponse à une variété de stimuli hormonaux (Shintani & Klionsky, 2004). Une étude a proposé que l'autophagie est impliquée dans la régulation négative de la voie de signalisation associée aux RLRs (Jounai et al, 2007). D'abord, la petite *ubiquitin-like protein* Atg12 se conjugue à son substrat Atg5 pour former le conjugué Atg5-Atg12, un régulateur clé du processus autophagique. Ce conjugué se lie ensuite directement aux domaines CARD de RIG-I, MDA5 et CARDIF. La présence de ce conjugué au niveau du complexe RIG-I/CARDIF aurait comme fonction d'engendrer son inactivation. En accord avec cette hypothèse, la suppression du mécanisme de conjugaison provoque une plus grande production d'IFN de type I en réponse au poly(IC). Le conjugué Atg5-Atg12, mais non les monomères individuels, agirait donc en tant que suppresseur de la signalisation par les RLRs. Il est intéressant de noter qu'une étude récente vient de démontrer la colocalisation de STING avec deux autres protéines impliquées dans l'autophagie, soit Atg9a et *microtubule-associated protein 1 light chain 3* (LC3), suivant la transfection de dsDNA (Saitoh et al,

2009). Ces deux protéines possèdent toutefois un rôle positif dans la régulation de cette voie de signalisation associée aux récepteurs cytoplasmiques de l'ADN.

1.2.3.5.2.12 DAK

Dihydroxyacetone kinase (DAK) fut identifiée dans une expérience de double-hybride utilisant MDA5 comme appât moléculaire (Diao et al, 2007). DAK possède une activité lyase *flavin adenine dinucleotide* (FAD)-*adenosine monophosphate* (AMP) couplée à une activité Pha kinase ATP dépendante (Bachler et al, 2005; Cabezas et al, 2005). Toutefois, son rôle physiologique demeure encore inconnu. DAK interagit avec le domaine CARD de MDA5, mais non pas avec celui de RIG-I. De plus, la surexpression de DAK diminue la signalisation déclenchée par MDA5 et non celle déclenchée par RIG-I ou CARDIF. La surexpression de DAK n'affecte pas la signalisation menant à l'activation de NF- κ B. Par conséquent, ceci suggère que cette kinase semble préférentiellement inhiber la voie d'activation de IRF-3. Son mécanisme d'action serait similaire à celui de SIKE puisque le complexe DAK-MDA5 se dissocie suivant une infection virale. DAK maintiendrait donc MDA5 dans un état inactif au niveau d'un complexe cytoplasmique stable. Jusqu'à ce jour, DAK est le seul régulateur négatif spécifique à MDA5 rapporté dans la littérature.

1.2.3.5.2.13 Pin1

Pin1 est une peptidyl-prolyl isomérase qui catalyse un changement conformationnel protéique dépendant de la phosphorylation. Via son domaine WW, Pin1 reconnaît spécifiquement des résidus sérines ou thréonines phosphorylés suivis par une proline (Lu et al, 1996; Wulf et al, 2005). Saitoh et collègues ont démontré que Pin1 régulait négativement le facteur de transcription IRF-3 (Saitoh et al, 2006). Après une stimulation au dsRNA, la phosphorylation induite sur le motif Serine339-Proline340 de IRF-3 permet

le recrutement de Pin1. Cette interaction engendre la polyubiquitination de IRF-3 et sa dégradation subséquente par le protéasome. L'absence de Pin1 provoque une diminution de la réplication virale secondaire à une augmentation de la production d'IFN β . Les mécanismes impliqués dans la dégradation de IRF-3 seront discutés plus amplement dans la section suivante de cette thèse.

1.2.3.5.2.14 Le complexe SCF

Ce complexe E3 ubiquitine ligase se caractérise par la présence de trois composants invariables au niveau du complexe protéique, soit Skp1, Cullin1 et Rbx/Roc1. L'autre composant important du complexe varie en fonction du substrat et se nomme la *F-box protein* (Cardozo T et al, 2004). Lors d'une de nos études, nous avons proposé un rôle de ce complexe dans la dégradation du facteur de transcription IRF-3 (Bibeau-Poirier et al, 2006). Pour plus de détails, voir la section 1.3.1.4 ci-dessous.

1.3 IRF-3 et TRAF3

Pour la dernière section du Chapitre 1, j'ai choisi de détailler davantage les protéines IRF-3 et TRAF3. Ces deux protéines font l'objet de mes deux articles de thèse présentés respectivement dans les chapitres 4 et 5. Cette présente section aura pour but de vous donner une meilleure idée de l'implication de ces deux protéines dans l'ensemble de la réponse immunitaire innée. Vous pourrez donc vous y rapporter afin de mieux comprendre certains concepts brièvement expliqués lors des introductions et discussions de chacun de mes articles scientifiques.

Hormis leur importance respective dans la voie de signalisation déclenchée par les RLRs et TLRs ou encore le chiffre trois dans leur nom, TRAF3 et IRF-3 n'ont aucun autre

point commun. Le choix d'étudier ces deux protéines parmi tant d'autres également présentes dans la voie de signalisation des RLRs n'a été que circonstanciel. L'identification des sites phosphorylés présents sur IRF-3 et la cinétique de phosphorylation représentaient à l'époque, et encore aujourd'hui, un casse-tête majeur pour ceux oeuvrant dans ce domaine de recherche. Par conséquent, cette section aura principalement comme but de vous démontrer l'ampleur des discordances retrouvées dans la littérature concernant la régulation de IRF-3. Quant à TRAF3, sa caractérisation en 2006 dans la voie de signalisation des TLRs a laissé la communauté scientifique perplexe. Avant cette découverte, TRAF3 n'avait été étudié que dans le contexte de la voie d'activation de NF- κ B non classique. Soudainement, de grandes questions ont été soulevées concernant ses fonctions dans la défense contre les pathogènes. La section sur TRAF3 fera surtout un retour sommaire sur l'ensemble de ses fonctions biologiques cellulaires.

1.3.1 Le facteur de transcription IRF-3

1.3.1.1 Fonctions de IRF-3 *in vivo*

La génération des souris IRF-3 $-/-$ par le groupe du Dr Taniguchi a grandement contribué à la découverte de plusieurs fonctions importantes *in vivo* de ce facteur de transcription. Comme mentionné précédemment, IRF-3 est un médiateur critique de la réponse IFN de type I suivant une infection virale (Sato et al, 2000b). IRF-3 est également impliqué dans la réponse au choc septique (Sakaguchi et al, 2003). En effet, la production des IFNs de type I est une conséquence essentielle de la réponse au LPS (Karaghiosoff et al, 2003). En utilisant une approche visant à déterminer le rôle de IRF-3 dans la réponse au LPS, Sakaguchi et ses collègues ont démontré que les souris IRF-3 $-/-$ étaient résistantes au choc septique induit par de fortes doses de LPS. La réponse IFN était grandement diminuée chez les souris IRF-3 $-/-$ et corrélait fortement avec leur taux de survie. Dans une autre étude, Dang et ses collaborateurs ont aussi démontré que l'inhibition de IRF-3 par

l'hydroxystilbene piceatannol pouvait protéger les souris du choc septique (Dang et al, 2004). Dernièrement, la contribution de IRF-3 dans le développement de la réponse immunitaire relié aux vaccins à ADN fut mise en évidence (Shirota et al, 2009). Contrairement aux souris IRF-3 WT, les souris IRF-3 -/- sont incapables de produire une réponse immunitaire à médiation cellulaire adéquate suivant l'administration d'un vaccin ADN avec adjuvant. Ces résultats sont hautement compatibles avec ceux obtenus chez les souris TBK1 -/- également immunisées à l'aide d'un vaccin ADN (Ishii et al, 2008). Il a donc été suggéré que la reconnaissance cytoplasmique des plasmides ADN pouvait mener à l'activation de IRF-3 et l'induction des IFNs de type I et que ce processus était essentiel afin de générer une réponse immunitaire à médiation cellulaire efficace.

L'activation de IRF-3 peut donc être perçue comme un couteau dont la lame possède deux côtés tranchants. D'une part, son activation est un processus essentiel à la survie cellulaire, mais d'un autre côté, son activation soutenue et exagérée peut engendrer des dommages cellulaires importants. Il devient alors justifié de bien définir les mécanismes moléculaires impliqués dans sa régulation.

1.3.1.2 Cycle de vie de IRF-3

IRF-3 est une phosphoprotéine de 427 aa constitutivement exprimée au niveau du cytoplasme (Au et al, 1995). Son extrémité N-terminale contient un domaine de liaison à l'ADN (DBD), alors que sa partie C-terminal possède un domaine d'association aux IRFs (IAD) et un domaine de transactivation. Lors d'une infection virale, l'activité transcriptionnelle de IRF-3 est contrôlée par des événements de phosphorylation ayant lieu principalement en C-terminal. Les kinases responsables de son activation sont les IKK-related kinases, TBK1 et IKKi (Fitzgerald et al, 2003; Sharma et al, 2003). Les différents sites de phosphorylation potentiellement ciblés par ces kinases sont les Ser385 et Ser386

(Cluster I), les Ser396 et Ser398 (Cluster II) ainsi que les Ser402, Thr404 et Ser405 (Cluster III) (**voir Figure 14**). Basé sur plusieurs données biochimiques, il a été suggéré que la phosphorylation de ces *clusters* (**Figure 13, Étape 2**) induisait un changement conformationnel (**Figure 13, Étape 3**) permettant l'homodimérisation de IRF-3 (**Figure 13, Étape 4**). La forme dimérique est importée dans le noyau où elle s'associe aux coactivateurs CBP et p300 (**Figure 13, Étape 5**). La forme monomérique inactive de IRF-3 peut également être importée dans le noyau via son NLS, mais elle est aussitôt expulsée en raison de son incapacité de lier CBP (Kumar et al, 2000b). Une fois associée à ses coactivateurs, IRF-3 induit la transcription des gènes IFN α/β et des différents ISGs (**Figure 13, Étape 6**). IRF-3 est finalement dégradé par un mécanisme cellulaire impliquant le protéasome (**Figure 13, Étape 7**).

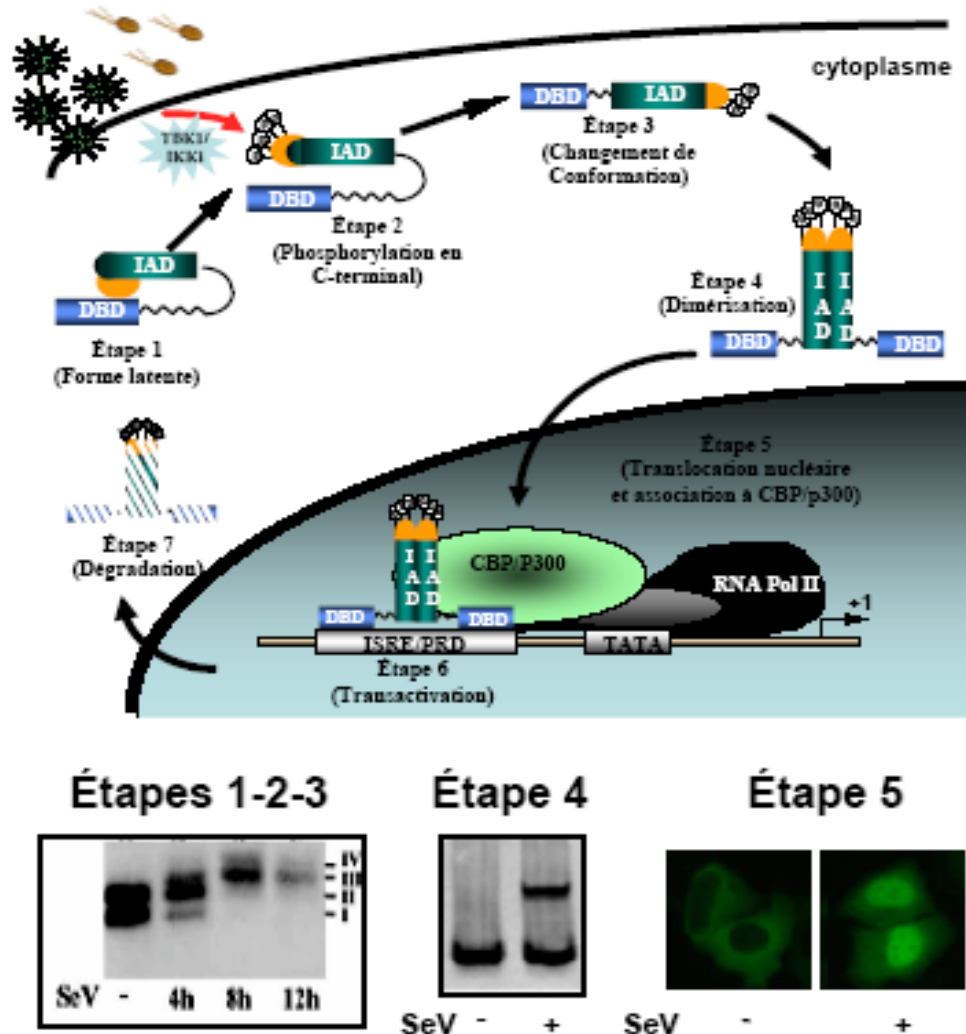


Figure 13. Cycle de vie de IRF-3

IRF-3 est inactif au niveau du cytoplasme (Étape 1). Lors d'une infection virale, l'activité transcriptionnelle de IRF-3 est contrôlée par des événements de phosphorylation en C-terminal médiés par les kinases TBK1/IKKi. Basé sur des données biochimiques, un modèle d'activation de IRF-3 fut proposé où la phosphorylation des différents *clusters* localisés en C-terminal (Étape 2) induit un changement conformationnel (Étape 3) permettant l'homodimérisation de IRF-3 (Étape 4). La forme dimérique est ensuite importée dans le noyau afin de s'associer à ses coactivateurs CBP/p300 (Étape 5). Une fois lié à CBP/p300, IRF-3 induit la transcription des gènes IFN α/β , de la chimiokine RANTES et des différents ISGs (Étape 6). IRF-3 est finalement dégradé par un mécanisme cellulaire impliquant le protéasome (Étape 7). Les étapes 1-2-3 peuvent être visualisées par gel SDS-PAGE. Les formes phosphorylées de IRF-3 (forme III et IV) ont une migration retardée sur gel. L'étape 4 peut être visualisée par un PAGE de type natif. L'infection virale provoque l'apparition d'une 2^e bande (dimère). L'étape 5 peut être visualisée par immunofluorescence.

1.3.1.3 Région N-terminale de IRF-3

1.3.1.3.1 Domaine de liaison à l'ADN

Le DBD des IRFs est bien conservé et forme une structure de type hélice-boucle-hélice avec un *cluster* riche en tryptophane dans le but de permettre la reconnaissance des PRDs retrouvés chez les différents ISGs (Escalante et al, 1998). Les études cristallographiques de la structure du DBD de IRF-3, complexé avec la partie *enhancer* du gène IFN β , ont permis de révéler qu'un total de quatre molécules de IRF-3 se liaient à des séquences consensus et non-consensus avec une flexibilité surprenante au niveau de l'espacement sur l'ADN et des interactions ADN-protéines (Escalante et al, 1998). Une autre étude remet toutefois en question ce modèle en prétendant qu'un des deux sites de liaison à l'ADN identifiés par cristallographie est inutile. Leurs résultats démontrent que la région *enhancer* du promoteur IFN β ne peut accueillir qu'une seule molécule dimérique de IRF-3 (Dragan et al, 2008).

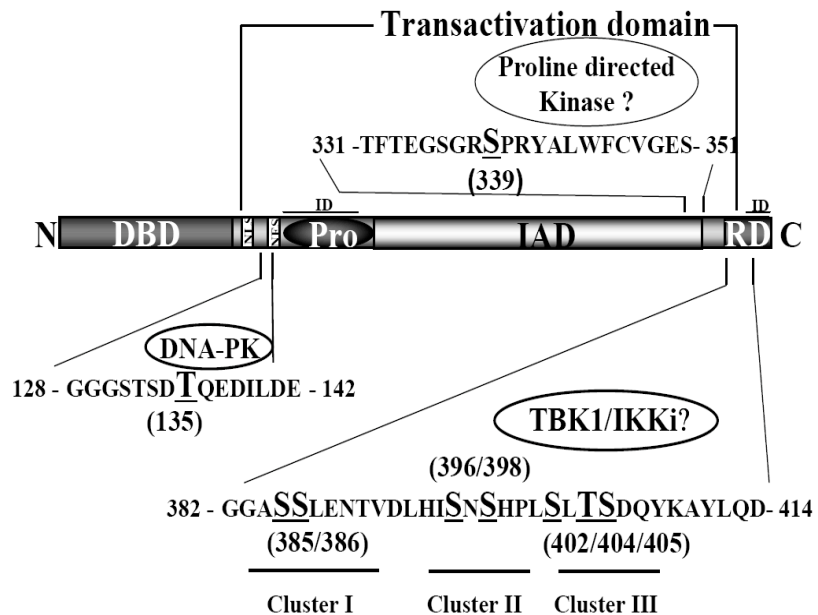


Figure 14. Sites de phosphorylation présents sur IRF-3

Les résidus potentiellement phosphorylés par TBK1/IKKi en C-terminal sont indiqués et séparés en 3 *clusters* (I-II-III). La sérine 339 est potentiellement phosphorylée par une *Proline-directed kinase* actuellement inconnue. La thréonine 135 est phosphorylée par la DNA-PK.

1.3.1.3.2 Phosphorylation

La région N-terminale est constitutivement phosphorylée sur un ou plusieurs résidus encore non caractérisés, ce qui se traduit par la présence d'un doublet lors des analyses de IRF-3 par immunobuvardage (Servant et al, 2001b) (**voir Figure 13, étape 1-2-3**). Cette forme II de IRF-3 semble modulée par certains inducteurs de stress cellulaire, facteurs de croissance et agents endommageant l'ADN. De plus, il semblerait que le ou les sites de phosphorylation soient situés dans les 200 premiers acides aminés de la protéine (Kim et al, 1999; Servant et al, 2001b). Les voies de signalisation associées aux MAPKs sont probablement impliquées dans cette phosphorylation constitutive. Toutefois, le rôle de cette phosphorylation en N-terminal demeure toujours inconnu.

Selon Karpova et collègues, la DNA-PK est responsable de la phosphorylation de la Thr135 de IRF-3 suivant une infection virale (Karpova et al, 2002) (**voir Figure 14**). La phosphorylation de IRF-3 sur ce site permettrait d'accroître sa stabilité en augmentant son temps de rétention nucléaire.

1.3.1.4 Région C-terminale de IRF-3

1.3.1.4.1. Cristallographie et modèle d'activation de IRF-3

La région C-terminale de IRF-3 comprend les domaines d'autoinhibition, de liaison à CBP/p300 et de phosphorylation (**voir Figure 14**). Deux études indépendantes ont proposé une structure très similaire de la région C-terminale de IRF-3 (Qin et al, 2003;

Takahasi et al, 2003). Basé sur ces structures, Takahasi et collègues ont proposé le modèle « dimérisation induit par la phosphorylation » où les sites phosphorylés présents sur IRF-3 ont comme fonction de stabiliser l'assemblage dimérique de la protéine (Takahasi et al, 2003). D'un autre côté, Qin et collaborateurs ont proposé le modèle « d'autoinhibition » où les hélices α en N-terminal et C-terminal, délimitant le domaine β sandwich core de l'IAD, interagissent ensemble pour former une structure condensée hydrophobe. Suivant la phosphorylation en C-terminal, l'introduction de charges négatives provoquerait alors l'ouverture de la structure afin de permettre la dimérisation (Qin et al, 2003). Cet état dimérique de IRF-3 peut être visualisé à l'aide d'une électrophorèse sur gel natif suivant une infection virale (**voir Figure 13, étape 4**). Étant un événement clé dans le processus d'activation de IRF-3, la présence du dimère est souvent utilisée comme critère d'évaluation de son activité transcriptionnelle.

La structure cristallographique du complexe IRF-3/CBP a ensuite révélé que l'association entre ces deux protéines était médiée au niveau d'une partie hydrophobe de IRF-3 normalement recouverte par le domaine d'autoinhibition en période de latence (Qin et al, 2005). La rétention nucléaire de IRF-3 est modulée par cette interaction (Kumar et al, 2000b). En effet, suivant sa dimérisation, IRF-3 est importé au niveau du noyau et son association avec CBP/p300 permet sa séquestration nucléaire via le NLS de ces deux coactivateurs. Cette accumulation nucléaire de IRF-3 favoriserait évidemment la transcription des gènes antiviraux. Cette étape dans le cycle de vie de IRF-3 est généralement visualisée par immunofluorescence et peut également servir à mesurer les niveaux d'activation de IRF-3 (**voir Figure 13, étape 5**).

1.3.1.4.2 Phosphorylation en C-terminal : activation et dégradation de IRF-3

La phosphorylation de IRF-3 en C-terminal est médiée par l'activation des IKK-related kinases suivant une infection virale. Plusieurs résidus Ser/Thr sont ciblés par ces kinases, ce qui suggère que différentes fonctions pourraient être associées à chacun de ces sites (**voir Figure 14**). La sérine 396, située dans le *cluster* II, fut l'un des premiers sites de phosphorylation identifiés grâce à la génération d'un anticorps phosphospécifique dirigé contre cette sérine (Servant et al, 2003). De plus, la génération du mutant phosphomimétique IRF3 S396D avait suggéré que cette sérine était le site minimal d'activation de IRF-3. Par la suite, Mori et collaborateurs ont montré la présence de phosphorylation sur la sérine 386 (Mori et al, 2004). Selon ce groupe, cet événement de phosphorylation serait le plus crucial à l'activation de IRF-3 puisqu'il précéderait celui de la sérine 396. Ce fut alors le début d'une longue polémique, car ces données publiées ne concordaient pas avec les analyses biochimiques effectuées par Lin et collègues démontrant l'importance des Ser396, Ser398, Ser402, Thr404 et Ser405 dans l'activation de IRF-3 (Lin et al, 1999b). Dans une analyse de phosphorylation *in vitro* utilisant un mutant tronqué de IRF-3 et les kinases TBK1 et IKKi purifiées, tenOever et collaborateurs ont identifié la sérine 402 comme étant la cible préférentielle de ces deux kinases (tenOever et al, 2004). Selon les analyses cristallographiques effectuées sur IRF-3, cette sérine se trouve par contre dans le *cluster* de phosphorylation le moins accessible parmi les trois potentiellement ciblés (Takahasi et al, 2003).

Encore aujourd'hui, il n'existe aucun consensus quant à la cinétique de phosphorylation de ces différents sites sur IRF-3. La phosphorylation des sites présents en C-terminal peut être visualisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE), car elle cause une migration retardée sur gel. La technique d'immunobuvardage permet ensuite de révéler la présence des formes III et IV de IRF-3, aussi nommées formes hyperphosphorylées (**voir Figure 13, Étape 1-2-3**). En accord avec le modèle d'activation

actuellement proposé, ces formes hyperphosphorylées représentent également un autre moyen afin de mesurer l'activation de ce facteur de transcription.

Suite à une infection virale, la sérine 339 de IRF-3 est aussi phosphorylée par une kinase inconnue (Saitoh et al, 2006). La modification post-traductionnelle de cette sérine survient toutefois après celle de la sérine 396 et permet la création d'un site de liaison pour Pin1. Cette interaction avec Pin1 favorise ensuite la polyubiquitination et la dégradation de IRF-3 par le protéasome. Pin1 régule la stabilité de IRF-3, mais ne catalyse cependant pas la réaction d'ubiquitination nécessaire à sa dégradation.

Des expériences utilisant un inhibiteur du protéasome, le MG132, avaient démontré la stabilisation des formes hyperphosphorylées de IRF-3 suivant une infection virale. Il avait alors été proposé que la phosphorylation en C-terminal par les IKK-related kinases était un événement essentiel à la dégradation de IRF-3 par le protéasome. Les mécanismes impliqués dans cette régulation négative de IRF-3 sont encore peu caractérisés. Notre groupe de recherche a récemment proposé que la phosphorylation en C-terminal soit responsable de créer un signal essentiel à la reconnaissance de IRF-3 par une voie ubiquitine ligase Cullin dépendante (Bibeau-Poirier et al, 2006). Nos résultats démontrent notamment le recrutement de IRF-3 par la Cullin1 lors d'une infection virale et la nécessité du processus de NEDDylation pour sa dégradation. Ces résultats, combinés au fait que la Cullin1 soit un composant invariable des complexes SCF (Skp1-Cul1-F-box), suggèrent fortement un rôle important de cette famille de E3 ligases dans le contrôle de la stabilité de IRF-3. Nos résultats suggéraient également la participation potentielle d'une autre E3 ligase dans le processus de dégradation. En effet, lors d'expériences utilisant une lignée cellulaire surexprimant un mutant dominant négatif de Cullin1 (Cullin1-N252), nous avons démontré une importante augmentation de la stabilité de IRF-3, mais non une stabilisation complète.

Selon le groupe du Dr Jefferies, TRIM21/Ro52 serait cette E3 ligase (Higgs et al, 2008). La famille des TRIMs représente une nouvelle sous-classe des *single protein RING finger E3 ubiquitin ligase*. Les TRIMs sont aussi connus sous le nom de protéines *RING*, *B-box*, *coiled-coil* (RBCC) en raison de la présence de ce motif localisé en N-terminal. Les expériences de surexpression de TRIM21, combinées à celles d'ARN interférence, suggèrent son implication dans le processus de polyubiquitination en K48 de IRF-3.

Le groupe du Dr Shu prétend de son côté que la dégradation de IRF-3 soit médiée principalement par *RBCC protein interacting with PKC1* (RBCK1) (Zhang et al, 2008a). Cette E3 ligase serait spécifiquement induite suivant une infection virale au SeV afin de catalyser la réaction de polyubiquitination en K48 de IRF-3.

1.3.1.5 Gènes régulés par IRF-3

L'identification des gènes ciblés par IRF-3 est essentielle à la compréhension de son rôle dans la réponse antivirale. Comme mentionné antérieurement, IRF-3 contribue notamment à l'induction du gène IFN β . En 2002, une étude effectuée sur des cellules Jurkat exprimant la forme constitutivement active de IRF3 (IRF-3 5D) avait permis d'identifier quatorze gènes modulés à la hausse par ce facteur de transcription (Grandvaux et al, 2002a). Parmi ceux-ci, sept gènes appartenaient à la famille des ISGs, soit ISG54, ISG56, ISG60, *hepatitis C-associated microtubular aggregate 44-kDa protein*, *guanylate binding protein* (GBP1), OAS1 et ISG15. Cette étude avait ensuite caractérisé le promoteur de ISG56 et démontré que IRF-3 était suffisant pour assurer la transactivation de ce gène. L'induction de ISG56 est devenue par la suite un autre moyen de mesurer l'activation de IRF-3 suivant une infection virale.

Les données concernant les gènes régulés par IRF-3 ne font pas exception à celles publiées sur son activation ou sa dégradation; elles connaissent aussi leur part de discordance au niveau de la littérature. Selon le groupe du Dr Howley, *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), est une cible de IRF-3 (Kirshner et al, 2005). Toutefois, une étude plus récente démontre que TRAIL est préférentiellement induit par IRF-7, alors que NOXA est très spécifique à IRF-3 (Goubau et al, 2009). Selon le groupe du Dr Tovey, NOXA est effectivement une cible de IRF-3, mais CREB et IRF-1 sont également impliqués dans la transactivation de ce gène (Lallemant et al, 2007). Quant au groupe du Dr Sen, il prétend que IRF-3 n'est simplement pas impliqué dans l'induction de NOXA. Ce gène serait induit suite à l'activation de STAT1 et de p53 suivant une infection au SeV (Elco et al, 2005).

Dans le but de fournir une meilleure compréhension des gènes régulés par IRF-3, une étude combinant l'utilisation de puces ADN aux MEFs IRF3 WT ou IRF3 *-/-* a récemment été effectuée (Andersen et al, 2008). Grâce à sa stratégie expérimentale, cette étude a non seulement permis de déterminer deux grands groupes de gènes, soit « IRF-3 dépendant » et « IRF-3 indépendant », mais aussi d'obtenir certaines sous catégories, telles que « IRF-3 suffisant », « IRF-3 coopératif » et « IRF-3 augmenté » (**voir Figure 15**). La catégorie « IRF-3 dépendant suffisant » regroupe les gènes dont l'activation de IRF-3 est suffisante à l'induction des gènes. À la lumière des résultats obtenus, il semblerait donc que le complexe IRF-3/CBP puisse lier directement les promoteurs de ISG54 et de CIG5 afin d'induire leur expression. Les gènes IFN β , IFN α 4, IFN α 5, CCL4 et CD116 seraient aussi dépendants de l'activation de IRF-3, mais leur expression respective exigerait une coopération entre certains facteurs de transcription. Pour cette catégorie « IRF-3 dépendant coopératif », IRF-3 est requis, mais n'est pas suffisant. La catégorie « IRF-3 indépendant/augmenté » inclut les gènes dont l'expression est augmentée lorsque IRF-3 est activé. Les chimiokines *regulated upon activation normal T cell expressed and secreted* (RANTES) et IP-10, ainsi que certains membres des ISGs (ISG15, ISG56, ISG60

et GBP2) seraient inclus dans cette catégorie. Ces gènes sont donc tous induits par d'autres facteurs de transcription activés lors d'une infection virale, mais l'activation de IRF-3 agirait de façon additive afin de permettre leur expression. Finalement, l'expression de IRF-1, STAT1, IRF-9, IL-15, IL-6 ou ICAM1 ne serait aucunement dépendante de IRF-3 lors d'une infection virale. En somme, cette étude s'oppose à celle de Grandvaux et collaborateurs en démontrant qu'il est préférable d'utiliser ISG54 au lieu de ISG56 pour mesurer correctement l'activité transcriptionnelle de IRF-3. De plus, elle démontre pour la première fois une participation de IRF-3 dans l'induction de IFN α 5. Ce type d'IFN a longtemps été considéré comme étant dépendant de IRF-7 (Marie et al, 1998).

1.3.1.6 Autres modifications post-traductionnelles de IRF-3

IRF-3 est une protéine hautement phosphorylée et ubiquitinée, mais sa régulation est aussi assurée par d'autres modifications post-traductionnelles. IRF-3 est ISGylé par la *HECT domain and RLD 5* (HERC5) (Shi et al). HERC5 catalyse la conjugaison de ISG15, une protéine *ubiquitin-like*, sur les lysines 193, 360 et 366 de IRF-3. Cette modification atténue l'interaction entre Pin1 et IRF-3, permettant ainsi une activation soutenue de IRF-3. L'infection virale provoque également la SUMOylation de IRF-3 (Kubota et al, 2008). La lysine 152 serait le seul site de liaison de la *small ubiquitin-related modifier* (SUMO). Cette modification, indépendante de la phosphorylation de IRF-3, régule négativement l'activation du facteur de transcription. En période de latence, IRF-3 est S-glutathionylé sur plusieurs cystéines (Prinarakis et al, 2008). Suivant une infection virale, la glutaredoxin-1 (GRX-1) catalyse la déglutathionylation afin de permettre une interaction efficace avec CBP au niveau du noyau. Une fois au noyau, IRF-3 serait aussi acétylé par p300 (Suhara et al, 2002). Toutefois, cette acétylation n'a été démontrée que par des expériences *in vitro* et aucune lysine n'a été jusqu'à présent identifiée. Cette acétylation augmenterait la capacité de liaison à l'ADN de IRF-3.

1.3.2 La protéine adaptatrice TRAF3

TRAF3 est un des membres les plus énigmatiques de la famille des TRAFs. Cette dernière comprend sept membres nommés TRAF1 à TRAF7. En dépit des similarités partagées avec les autres TRAFs au niveau de la structure et des associations protéine-protéine, la surexpression de TRAF3 n'induit pas l'activation des voies de signalisation NF- κ B et JNK habituellement inductibles. Le manque d'essai fonctionnel et la mystérieuse létalité des souris TRAF3 $-/-$ ont pendant longtemps retardé l'étude des fonctions associées à TRAF3. Toutefois, des études récentes ont permis de démontrer deux rôles distincts de cette molécule. TRAF3 est à la fois un régulateur négatif de la voie de signalisation NF- κ B et un régulateur positif de la réponse IFN de type I.

1.3.2.1 Caractéristiques de TRAF3 et études structure-fonction

TRAF3 est une protéine exprimée de façon ubiquitaire. Son expression a été observée dans une multitude de tissus murins dont le cerveau, le cœur, le foie, la rate et le thymus (Cheng et al, 1995). TRAF3 est aussi exprimé chez plusieurs lignées cellulaires humaines incluant les cellules progénitrices myéloïdes, les monocytes et les cellules B plasmiques (Krajewski et al, 1997). La protéine TRAF3 est composée de 568 aa et possède un poids moléculaire d'environ 64 kDa. Elle partage 96% d'homologie en acides aminés avec la protéine TRAF3 murine (Cheng et al, 1995). Comme les autres membres de la famille, TRAF3 contient un domaine TRAF localisé au niveau de son C-terminal. En N-terminal, TRAF3 possède un domaine *C3HC4 RING finger* typique suivi par cinq structures en « doigt de zinc » et un *zipper* isoleucine.

Contrairement à TRAF2, TRAF5 et TRAF6, la surexpression de TRAF3 n'active pas les voies de signalisation menant à l'activation de JNK et NF- κ B (Arch & Thompson,

1998; Kawamata et al, 1998; Kwon et al, 1999; Song et al, 1997). La présence des structures en « doigt de zinc » chez TRAF3 serait notamment responsable de cette différence (Dadgostar & Cheng, 1998). La localisation cellulaire de TRAF3 semble aussi être différente des autres membres. Lors d'expériences de fractionnement cellulaire, TRAF3 ne localise pas préférentiellement dans la fraction insoluble du culot cellulaire contrairement à TRAF2, TRAF5 et TRAF6 (Dadgostar & Cheng, 2000). Ceci pourrait également expliquer en partie la différence observée au niveau de l'activation des voies de signalisation cellulaire. En effet, la myristoylation de TRAF3, une modification qui cause la relocalisation de TRAF3 dans les fractions membranaires insolubles, transforme TRAF3 en activateur de JNK (Dadgostar & Cheng, 1998).

1.3.2.2 Association avec les récepteurs de surface et autres partenaires protéiques

TRAF3 fut originalement découverte comme étant une protéine associée au récepteur CD40. Les études initiales avaient démontré un rôle inhibiteur de TRAF3 dans la signalisation par ce récepteur (Hostager & Bishop, 1999). Son rôle précis demeure cependant très peu caractérisé dans cette voie de signalisation puisque TRAF2 semble pouvoir compenser la perte de TRAF3 dans les cellules TRAF3 ^{-/-}. TRAF3 fut ensuite impliqué dans la signalisation cellulaire induite par la protéine transformante LMP1 du virus Epstein-Barr qui mime une signalisation constitutivement activée par le CD40 (Floettmann & Rowe, 1997; Xie et al, 2004). LMP1 s'associe également à TRAF2 et TRAF3 afin de pouvoir activer NF- κ B et JNK. Contrairement au récepteur CD40, l'activation de LMP1 ne provoque toutefois pas la dégradation de TRAF3 (Brown et al, 2001; Sandberg et al, 1997). Des interactions entre TRAF3 et plusieurs autres membres de la famille des TNFRs ont aussi été démontrées. En effet, CD30, HVEM, Ox40, p75NGFR et RANK partagent tous avec CD40 le même motif TIM généralement décrit comme (P/S/AT)X(Q/E)E (Arch & Thompson, 1998; Gedrich et al, 1996; Marsters et al, 1997;

Park et al, 1999). TRAF2 et TRAF3 sont parfois capables de lier le même TIM suggérant une compétition au niveau de la signalisation par certains récepteurs.

TRAF3 s'associe aussi à plusieurs autres molécules dont Act1 (Qian et al, 2002), ASK1 (Nishitoh et al, 1998), c-Src (Johnsen et al, 2009; Wong et al, 1999), MIP-T3 (Ling & Goeddel, 2000), NIK (Song et al, 1997), p62 nucléoporine (Gamper et al, 2000), p40^{phox} (Ha & Lee, 2004), RIP1 (Hsu et al, 1996a), RIP4 (Meylan et al, 2002), TANK (Rothe et al, 1996), T3JAM (Dadgostar et al, 2003), TNAP (Hu et al, 2004) et TTRAP (Pype et al, 2000). Parmi ces partenaires protéiques, MIP-T3, p62 nucléoporine et T3JAM sont spécifiques à TRAF3, alors que les autres peuvent également se lier à TRAF2.

1.3.2.3 Fonction 1 : TRAF3 dans la voie d'activation non classique de NF-kB

1.3.2.3.1 Voie classique et non classique d'activation : un sommaire

De façon générale, la famille des facteurs de transcription NF-kB joue un rôle pivot dans la réponse immunitaire innée et adaptative grâce à leur implication dans l'expression de gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la survie, l'apoptose et l'inflammation (Baeuerle & Baltimore, 1996; Kopp & Ghosh, 1995). Cette famille est composée de cinq membres, soit NF-kB1 (p105, le précurseur de p50), RelA (p65), cRel, NF-kB2 (p100, le précurseur de p52) et RelB. En condition normale, les dimères Rel inactifs sont retenus dans le cytoplasme par les IκBs (Karin & Ben-Neriah, 2000). La phosphorylation des IκBs en présence de stimuli provoque leur dégradation et la translocation nucléaire des dimères de Rel.

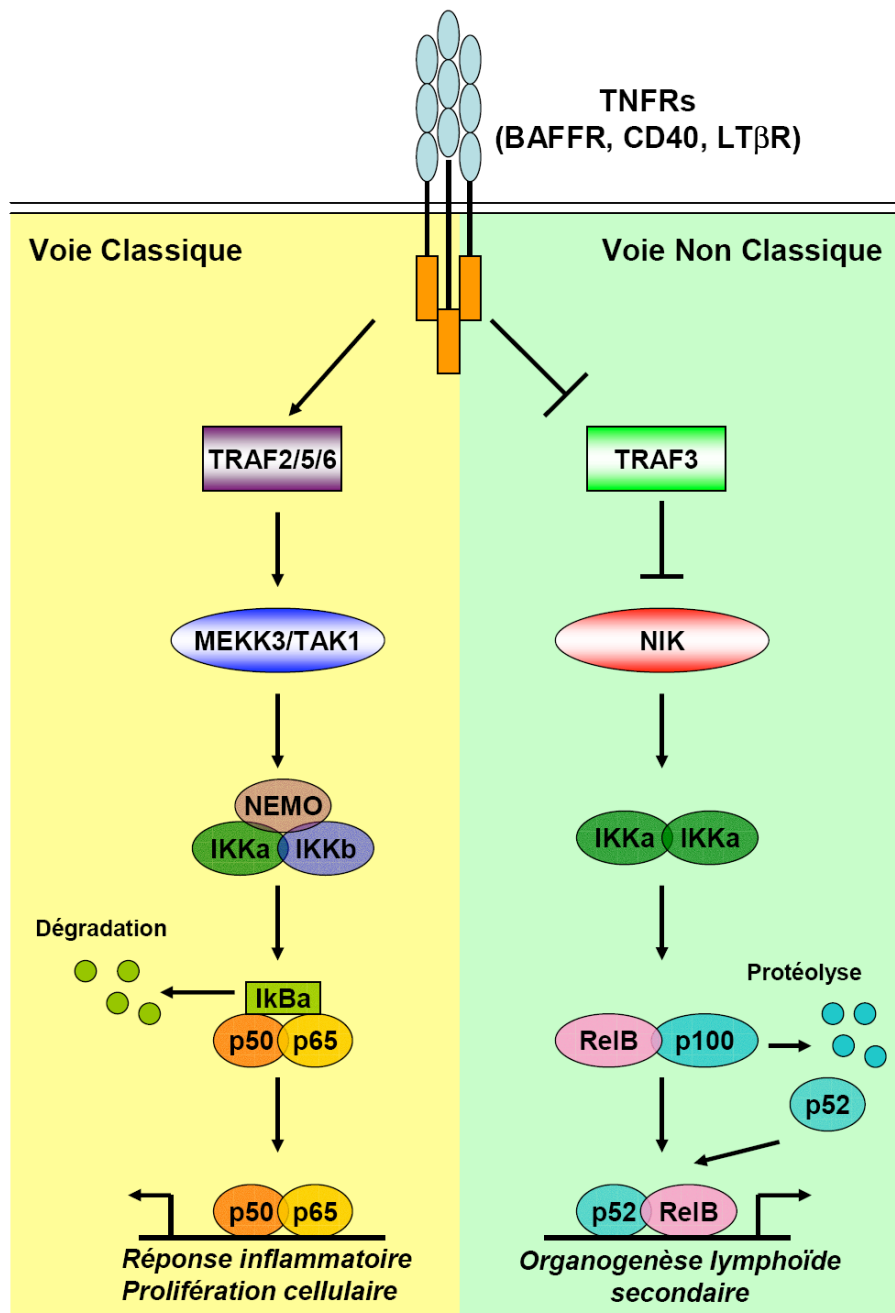


Figure 16. Voie classique et non classique d'activation de NF-κB

Schéma illustrant comment les différents TRAFs sont impliqués dans les deux voies d'activation de NF-κB par les membres de la famille des TNFRs (BAFFR, CD40, LTβR). Pour plus de détails voir les sections 1.3.2.3.1 et 1.3.2.3.2. Figure adaptée de (He et al, 2007).

La voie classique d'activation de NF- κ B requiert la présence du complexe IKK composé des deux sous-unités catalytiques (IKK α et IKK β) et de la sous-unité régulatrice NEMO (**voir Figure 16**). L'activation du complexe IKK provoque la dégradation de I κ B α et la relâche subséquente des dimères p50/p65 et p50/cRel (Hayden & Ghosh, 2004; Sizemore et al, 2002). L'activation de la voie non classique de NF- κ B implique la *NF- κ B inducing kinase* (NIK) et les homodimères IKK α /IKK α (Matsushima et al, 2001; Yin et al, 2001). En coopération, NIK et IKK α lient la portion C-terminale de p100 afin de promouvoir son clivage vers la forme active p52, un processus menant à la relâche des dimères RelB/p52 (Dejardin et al, 2002; Scheinman et al, 1993; Xiao et al, 2004).

Les deux voies d'activation de NF- κ B diffèrent aussi au niveau de leur cinétique et de leur dépendance pour la synthèse protéique *de novo*. En effet, l'activation de NF- κ B dans la voie classique est très rapide (secondes ou minutes) et la synthèse protéique n'est pas nécessaire. De plus, l'activation de NF- κ B mène à l'expression de nouveaux I κ Bs, ce qui résulte en une forte boucle de rétroaction négative. En conséquence, l'activation classique de NF- κ B est caractérisée par sa forme oscillatoire qui décroît en amplitude en fonction du temps (Hoffmann et al, 2002). L'activation de la voie non classique est plus longue (plusieurs heures), requiert la synthèse de nouvelles protéines et son intensité ne diminue pas dans le temps (Claudio et al, 2002). La suppression génique chez la souris de certains composants impliqués dans cette voie a notamment permis d'observer divers phénotypes liés à l'organogénèse lymphoïde dont une désorganisation sévère de la rate, un nombre réduit de lymphocytes B au niveau périphérique et de la moelle osseuse, ainsi qu'une réponse immunologique lymphocytaire déficiente (Caamano et al, 1998; Yilmaz et al, 2003). Les souris déficientes pour les récepteurs CD40, LT β R (*Lymphotoxin β receptor*) ou BAFFR (*B cell-activating factor receptor*), ayant tous la capacité de lier TRAF3 et d'activer la voie non classique, présentent également des phénotypes similaires (Claudio et

al, 2002; Coope et al, 2002; Dejardin et al, 2002; Kawabe et al, 1994; Rennert et al, 1998; Schiemann et al, 2001).

1.3.2.3.2. Rôle de TRAF3 dans la voie non classique d'activation

En 2004, il avait été démontré que TRAF3 interagissait fortement avec NIK (Liao et al, 2004). Sa surexpression entraînait la diminution des niveaux d'expression de NIK, alors que sa déplétion cellulaire par ARN interférence provoquait l'accumulation de formes ubiquitinées de NIK et une augmentation du clivage de p100 vers la forme p52. Il avait alors été suggéré que TRAF3 jouait un rôle important dans l'inhibition de l'activité de NIK (**voir Figure 16**). Selon le modèle proposé, l'interaction de TRAF3 avec NIK engendre sa dégradation par le protéasome afin d'empêcher NIK de continuellement promouvoir le clivage de p100 vers la forme p52. Lors d'une stimulation appropriée, TRAF3 est recruté au récepteur et ensuite dégradé afin de permettre l'accumulation de NIK et l'activation des homodimères IKK α (Hostager et al, 2003). Ceci expliquerait en partie la cinétique d'activation retardée de cette voie de signalisation ainsi que la nécessité de la synthèse protéique *de novo*. Deux études ont dernièrement ajouté quelques précisions à ce modèle en proposant des rôles distincts de TRAF2 et TRAF3 (Vallabhapurapu et al, 2008; Zarnegar et al, 2008). Dans les cellules non stimulées, TRAF3 recrute TRAF2 et les *cellular inhibitor of apoptosis* (cIAPs) au niveau de NIK afin de former un complexe responsable de sa dégradation. Suivant une stimulation, ce complexe est ensuite recruté au niveau du récepteur afin de permettre l'ubiquitination de TRAF3 et sa dégradation. La présence de TRAF2 dans ce complexe serait également nécessaire à l'ubiquitination de NEMO par Ubc13. Cet événement représenterait un pré-requis pour le recrutement de MEKK1 au niveau de ce même complexe. La présence de MEKK1 mènerait finalement à l'activation de JNK et p38 (Matsuzawa et al, 2008).

1.3.2.4 Fonction 2 : TRAF3 dans la réponse immunitaire innée

Comme mentionné précédemment, TRAF3 fut récemment impliqué dans les voies d'activation associées aux TLRs (Hacker et al, 2006; Oganessian et al, 2006) et aux RLRs (Saha et al, 2006). Dans la voie associée aux TLRs, une interaction avec TRIF permet d'induire la synthèse des IFNs de type I suite à l'activation du TLR3 et du TLR4. Une association avec IRAK-1 est nécessaire afin de permettre l'induction des IFNs de type I suivant une stimulation du TLR7 et du TLR9. Selon Hacker et collaborateurs, la production d'IL-10 est aussi influencée par TRAF3 (Hacker et al, 2006). Dans la voie de signalisation des RLRs, TRAF3 est requis pour la production des IFNs de type I. Cependant, l'absence de TRAF3 affecte davantage l'expression des IFN α . Son interaction avec CARDIF est médiée par le motif TIM de CARDIF, situé dans sa région proline-riche, et le domaine TRAF de TRAF3. Le rôle de TRAF3 dans la cascade de signalisation associée aux RLRs est discuté dans les sections 1.2.3.4 et 1.2.3.5 de ce chapitre.

Chapitre 2. L'inflammation et le cancer

2.1 Mise en situation

Le complexe IKK est situé au cœur de la réponse inflammatoire. En 2002, le groupe du Dr Michael Karin démontre également que ce complexe joue un rôle pivot dans le processus d'oncogenèse. Soudainement, un lien moléculaire solide venait d'être établi entre l'inflammation chronique et le cancer et ce, pour la première fois depuis le moment où l'hypothèse avait été énoncée par Virchow.

En plus de leur fonction essentielle dans la réponse immunitaire innée, voilà maintenant que des études commencent à souligner le rôle potentiel des IKK-related kinases dans la transformation oncogénique induite par Ras. En effet, TBK1 serait un effecteur de la voie *Ras-like* (Ral)-*guanine nucleotide exchange factor* (GEF) impliquée dans le processus de transformation par Ras, alors que IKKi serait une kinase agissant en coopération avec MEK pour promouvoir la transformation cellulaire. Ce chapitre de thèse discutera donc des rôles de TBK1 et IKKi dans le processus d'oncogenèse tout en mettant l'emphase sur leur mécanisme respectif de régulation cellulaire ainsi que leur spécificité de substrat.

2.2 Article 1- The IKK-related Kinases : from innate immunity to oncogenesis

REVIEW

Cell Research (2008) 18:889-899.

© 2008 IBCB, SIBS, CAS All rights reserved 1001-0602/08 \$ 30.00

www.nature.com/cr



The IKK-related kinases: from innate immunity to oncogenesis

Jean-François Clément^{1,2}, Sylvain Meloche^{3,4}, Marc J Servant^{1,2}

¹Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7; ²Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7; ³Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7; ⁴Departments of Pharmacology and Molecular Biology, University of Montreal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Over the past four years, the field of the innate immune response has been highly influenced by the discovery of the I κ B kinase (IKK)-related kinases, TANK Binding Kinase 1 (TBK1) and IKKi, which regulate the activity of interferon regulatory factor (IRF)-3/IRF-7 and NF- κ B transcription factors. More recently, additional essential components of the signaling pathways that activate these IKK homologues have been discovered. These include the RNA helicases RIGI and MDA5, and the downstream mitochondrial effector known as CARDIF/MAVS/VISA/IPS-1. In addition to their essential functions in controlling the innate immune response, recent studies have highlighted a role of these kinases in cell proliferation and oncogenesis. The canonical IKKs are well recognized to be a bridge linking chronic inflammation to cancer. New findings now suggest that the IKK-related kinases TBK1 and IKKi also participate in signaling pathways that impact on cell transformation and tumor progression. This review will therefore summarize and discuss the role of TBK1 and IKKi in cellular transformation and oncogenesis by focusing on their regulation and substrate specificity.

Keywords: cancer, IKKi, TBK1, cytokines, NF- κ B, interferon regulatory factor, inflammation

Cell Research (2008) 18:889-899. doi: 10.1038/cr.2008.273; published online 12 August 2008

The IKK-related Kinases: From Innate Immunity to Oncogenesis

Jean-François Clément^{1,2}, Sylvain Meloche^{3,4} and Marc J. Servant^{1,2*}

¹Faculty of Pharmacy, ²Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament, ³Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, ⁴Departments of Pharmacology and Molecular Biology, University of Montreal, Montreal, H3C 3J7, Canada

Abstract

Over the past four years, the field of the innate immune response has been highly influenced by the discovery of the I κ B kinase (IKK)-related kinases, TBK1 and IKKi, which regulate the activity of IRF-3/IRF-7 and NF- κ B transcription factors. More recently, additional essential components of the signaling pathways that activate these IKK homologues have been discovered. These include the RNA helicases RIGi and MDA5, and the downstream mitochondrial effector known as CARDIF/MAVS/VISA/IPS-1. In addition to their essential functions in controlling the innate immune response, recent studies have highlighted a role of these kinases in cell proliferation and oncogenesis. The canonical I κ B kinases are well recognized to be a bridge linking chronic inflammation to cancer. New findings now suggest that the IKK-related kinases TBK1 and IKKi also participate to signaling pathways that impact on cell transformation and tumor progression. This review will therefore summarize and discuss the role of TBK1 and IKKi in cellular transformation and oncogenesis by focusing on their regulation and substrate specificity.

Introduction

The molecular links between chronic inflammation and cancer have only recently begun to emerge, despite the fact that Rudolf Virchow proposed such an association more than 100 years ago (Balkwill & Mantovani, 2001; Coussens & Werb, 2002). Following exposure to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), the innate immune response and the inflammation reaction that follows rely on evolutionarily conserved receptors termed pattern-recognition receptors (PRRs). Some of these receptors are located at the plasma membrane and include molecules such as the Toll-like receptors (TLR 1, 2, 4, 5, 6) and scavenger receptors (CD36 and SR-A). Others occur in acidic endosomes (TLR 3, 7, 8, and 9), and still others can be found in the cytoplasm [PKR, the RIG-I-like helicases (RLHs) (RIGI and MDA5), the DNA-dependent activator of interferon regulatory factors (IRFs) (DAI), and the nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) receptors] (Lee & Kim, 2007; Tamura et al, 2008). Engagement of these receptors signals the activation of several transcription factors that are inactive in resting cells. One of the most important signaling cascades triggered by these receptors is the $IKK\alpha/\beta$ -NF- κ B pathway leading to the induction of several key molecules involved in the clearance of incoming pathogens. Notably, several of these key molecules, such as TNF- α , IL-6 or vascular endothelial growth factor (VEGF), are implicated in cell survival, cell proliferation and angiogenesis signaling pathways and, therefore, can influence cancer development (Ancrile et al, 2008; Karin, 2008; Lin & Karin, 2007). Elegant gene targeting studies using mice with tissue-specific ablation of the *IKK β* gene in epithelial cells, bone-marrow-derived macrophages, and hepatocytes demonstrated a complex role of the $IKK\beta$ -NF- κ B pathway in a variety of cancer models that are dependent or independent of chronic inflammation (Greten et al, 2004; Maeda et al, 2005). Moreover, study of *IKK α ^{AA}* knock-in mice, which express a catalytically inactive kinase mutant, revealed an important role for $IKK\alpha$ in metastatogenesis (Luo et al, 2007). These important findings have recently been extensively reviewed (Coussens & Werb, 2002; Karin, 2008; Karin & Greten, 2005; Karin et al, 2006) and will not be discussed further here. This review focuses on recent data

suggesting that additional players that control the innate immune system may be involved in cancer development.

The IKK-related kinases, partners in NF- κ B signaling

The importance of the IKK complex in the regulation of NF- κ B has fueled intensive research efforts by several groups leading to the discovery of the IKK-related kinases (for good reviews, see (Hacker & Karin, 2006) and (Peters & Maniatis, 2001)). Using degenerate primers containing sequences common to IKK α and IKK β , a portion of NF- κ B-activating kinase (NAK) was amplified by PCR (Tojima et al, 2000). This NAK, also called TANK Binding Kinase 1 (TBK1), was shown to act as an IKK-activating kinase responsible for NF- κ B activation in response to growth factors that stimulate PKC ϵ . TBK1 was originally identified in a yeast two-hybrid screening using TANK as the bait (Pomerantz & Baltimore, 1999a). At almost exactly the same time, another IKK-related kinase was also characterized and named IKK ϵ /IKKi. Peters and colleagues found IKK ϵ in a database search for proteins similar to IKK α and IKK β , whereas Akira's group isolated IKKi in a subtractive hybridization screen of a cDNA library from LPS-stimulated mouse macrophages (Peters et al, 2000b; Shimada et al, 1999a). In contrast to IKK α , IKK β , and TBK1, which are constitutively expressed in virtually all cell types, IKKi is predominantly expressed in specific tissues such as the pancreas, thymus, spleen, and peripheral blood leukocytes (Shimada et al, 1999a). It is also expressed at very low level in specific cell lines (Bibeau-Poirier et al, 2006; Gravel & Servant, 2005; Honda et al, 2005a). Importantly, IKKi mRNA can be induced in response to exposure to LPS, viral infection, or a number of NF- κ B-inducing cytokines (Bibeau-Poirier et al, 2006; Kravchenko et al, 2003; Shimada et al, 1999a; Wang et al, 2005). TBK1 and IKKi display 61% sequence identity, and overexpression of both kinases induces NF- κ B activation (Peters et al, 2000b; Pomerantz & Baltimore, 1999a; Shimada et al, 1999a). However, in contrast to IKK β , the enzymes TBK1 and IKKi phosphorylate only one (Serine 36) of the two phosphoacceptor sites

present in I κ B α (Peters et al, 2000b; Shimada et al, 1999a; Tojima et al, 2000). Why only one phosphorylation event occurs in the I κ B α phosphodegron motif –DSGXXS– is unclear. Overexpression of IKKi is known to effectively drive I κ B α degradation (Boehm et al, 2007; Eddy et al, 2005), indicating that phosphorylation of Serine 36 may facilitate the phosphorylation of the protein on Serine 32, thus leading to its degradation.

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) deficient for IKKi or TBK1 show normal I κ B α degradation and NF- κ B DNA-binding activity in response to classical NF- κ B inducers including TNF α , IL-1 β and lipopolysaccharide (LPS) (Bonnard et al, 2000; Kravchenko et al, 2003). However, the induction of well characterized NF- κ B target genes such as *IL6*, *MCPI*, *COX2* and *ICAM1* was abrogated in MEFs lacking either IKKi or TBK1. Phosphorylation of the p65/RelA subunit of NF- κ B was proposed to explain the observed defects in the transactivation of specific NF- κ B target genes (Bonnard et al, 2000). It is worth noting that phosphorylation of p65/RelA at Serine 536 by IKK β and IKK α was shown to be an essential modification required in the second phase of NF- κ B activation. This plays a key role in determining both the strength and duration of the NF- κ B-mediated transcriptional response (Chen et al, 2005; Lawrence et al, 2005). Interestingly, both IKKi and TBK1 also target p65/RelA at Serine 536, a process clearly involved in the induction of NF- κ B-regulated genes (Buss et al, 2004; Fujita et al, 2003). In stimulated T cells, IKKi was shown to enhance the activity of p65 following its phosphorylation at Serine 468 (Mattioli et al, 2006). Animal models also revealed functional similarities between IKK β and the IKK-related kinases. Notably, TBK1 deficient mice were phenotypically similar to NEMO/IKK γ , IKK β - and p65-deficient mice, where embryonic lethality was observed at E14.5 due to liver degeneration and apoptosis (Bonnard et al, 2000). Clearly, the IKK-related kinases are major molecular players in the modulation of inflammatory responses through their action on effectors of the NF- κ B pathway.

The IKK-related kinases, key players in the induction of type I Interferon

The field of the innate immune system was changed by the remarkable discovery that TBK1 and IKKi function as virus-activated kinases necessary for the establishment of an antiviral state (Fitzgerald et al, 2003; Sharma et al, 2003). Both kinases phosphorylate the transcription factors interferon regulatory factor 3 (IRF-3) and IRF-7 at key C-terminal residues (Caillaud et al, 2005; Clement et al, 2008; Mori et al, 2004; Panne et al, 2007a; tenOever et al, 2004). Both IRF-3 and IRF-7 are important players in the induction of type I interferon (IFN) following viral infection (Honda et al, 2005a; Sato et al, 2000b; Tamura et al, 2008). Whereas IRF-7 can be induced at the transcriptional level, IRF-3 is found latent in the cytoplasm. Upon phosphorylation of the C-terminal region by TBK1 or IKKi, IRF-3 and IRF-7 heterodimerize and translocate into the nucleus where they induce several proinflammatory and antiviral genes such as Type I IFN (see (Tamura et al, 2008) for a good review). Another IRF family member, IRF-5, is also involved in IFN type I induction (Yanai et al, 2007) and can also be phosphorylated by TBK1 or IKKi (Cheng et al, 2006; Lin et al, 2005; Schoenemeyer et al, 2005). However, how IRF-5 participates in the transcriptional regulation of type I IFNs genes is not yet completely understood.

Since the discovery of TBK1 and IKKi, detailed characterization of the signaling pathways involved in the activation of NF- κ B and IRF-3 in response to pathogen infection has led to the identification of several positive scaffolding effectors regulating the phosphotransferase activities of TBK1 and IKKi. These effectors include FADD (Balachandran et al, 2004), TRADD (Michallet et al, 2008), TRAF3 (Hacker et al, 2006; Oganessian et al, 2006), TANK (Gatot et al, 2007; Guo & Cheng, 2007; Nomura et al, 2000; Rothe et al, 1996), NAP1 (Fujita et al, 2003; Sasai et al, 2005), HSP90 (Yang et al, 2006), and SINTBAD (Ryzhakov & Randow, 2007). In addition, intracellular RNA sensors such as RIG-1 (Yoneyama et al, 2004) and MDA-5 (Andrejeva et al, 2004), which signal through the mitochondrial antiviral signaling adaptor MAVS (also known as Cardif, VISA,

and IPS-1) (Kawai et al, 2005; Meylan et al, 2005; Seth et al, 2005; Xu et al, 2005), have been found to activate the IKK-related kinases in response to infection by RNA viruses. Cytosolic DNA sensors were also recently described. DAI, also known as DLM-1/ZBP1, is a DNA sensor that assembles with TBK1 and IRF-3 upon dsDNA treatment (Takaoka et al, 2007) whereas NALP3 and ASC recognize cytosolic microbial and host DNA to induce an innate immune response independent of IRFs (Muruve et al, 2008). At the level of transcriptional regulation, GRIP1 was recently identified as a new cofactor of the IRF-3 dimers (Reily et al, 2006). Negative regulators including the SHP-2 phosphatase (An et al, 2006), SIKE (Huang et al, 2005), A20 (Lin et al, 2006), LGP-2 (Rothenfusser et al, 2005), NLXR1 (Moore et al, 2008) and CYLD (Zhang et al, 2008c) were also added to the complex puzzle. Some of these important findings have been extensively reviewed elsewhere (Hacker & Karin, 2006; Honda & Taniguchi, 2006; Kassel & Herrlich, 2007; Seth et al, 2006; Tamura et al, 2008) and will not be discussed further here. More recently, the IKK-related kinases have been implicated in oncogenesis (Boehm et al, 2007; Chien et al, 2006; Eddy et al, 2005). The following discussion will describe the potential oncogenic roles of the IKK-related kinases and their different substrates (Table 1).

	Targeted region	Phosphorylation site	Suggested Function	References
IKK-related common substrate				
<i>RelA/p65</i> <i>IκBα</i> <i>TANK</i>	TAD Phosphodegron aa 192-247	Ser 536 Ser 36 ?	Transactivation ? Proper assembly of a signaling complex upon LPS stimulation?	[29,82] [15,17,18] [46]
<i>c-Rel</i>	TAD	?	NF-κB activation Induces nuclear translocation	[48] [81]
<i>IRF-3</i>	C-Terminal	Ser 396, Ser 402 Thr 404, Ser 405	Stability/Transactivation/ Rearrangement of the autoinhibitory structure	[33,35,36]
<i>IRF-7</i>	C-Terminal	Ser 386 Ser 477/479	Activation	[34] [36]
<i>IRF-5</i> <i>xLAP</i>	C-Terminal ?	Ser 477/480 ?	Activation Protein Turnover	[108] [86]
TBK1 specific substrate				
<i>Sec5</i>	Ral Binding Domain	unknown	Regulation of the RalB/Sec5/TBK1 complex assembly ?	[70]
<i>IKKβ</i>	Activation loop	Ser 177/181	Kinase Activation	[15]
IKKi specific substrate				
<i>STAT1</i> <i>RelA/p65</i>	C-Terminal TAD	Ser 708 Ser 468	ISGF3 stability Regulation of gene expression	[98] [30]
<i>p100/p52</i>	N/A	Not phosphorylated	Transactivation via p65	[85]
DmIKKε substrate				
<i>DIAP1</i>	?	?	Protein Turnover	[86]

Table I

Table I. IKK-related kinases substrates

The IKK-related kinases in oncogenesis

In addition to the proposed roles of the IKK-related kinases in controlling NF- κ B and the IRF transcription factors, recent findings point towards a role for TBK1 and IKKi in Ras-induced oncogenic transformation (Fig. 1). TBK1 was identified as a RalB effector in the Ral-guanine nucleotide exchange factor (GEF) pathway that is required for Ras-induced transformation. On the other hand, a functional screen identified IKKi as a kinase that acts downstream of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-AKT pathway and cooperate with activated MEK to promote cellular transformation.

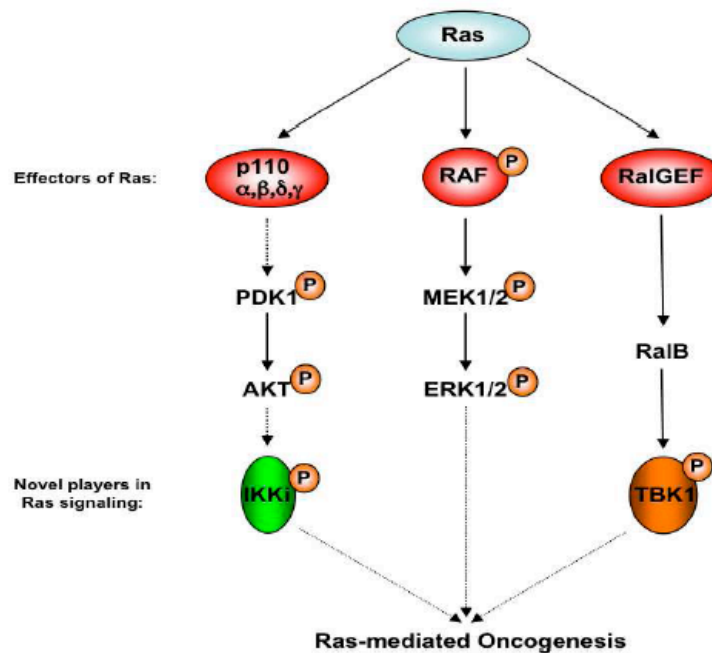


Figure 1: Pivotal contribution of the IKK-related kinases to oncogenic Ras-induced tumorigenicity. Recent findings demonstrated a role of TBK1 and IKKi in Ras-induced oncogenic transformation. In the uncontrolled proliferation of transformed cells, IKKi has a role downstream of the PI3-kinase-AKT pathway whereas TBK1 is most likely a RalB effector in the RalGEF pathway.

TBK1 and RalB signaling

The Ras-like (Ral) GTPases RalA and RalB are two close relatives of the founding members of the Ras GTPase superfamily. The Ral proteins are involved in a variety of regulatory systems known to participate in oncogenic signaling cascades. Indeed, modulation of Ral GTPase activity influences the activation of Src, JNK, and p38 kinases; induction of phospholipase D activity; and the activation of NF- κ B, Stat3 and transcription factors of the Forkhead family (Camonis & White, 2005). Moreover, Ral GEF-induced Ral activation was recently found to be necessary and sufficient for Ras transformation of a variety of human cell types (Hamad et al, 2002; Lim et al, 2006; Rangarajan et al, 2004). Ral GTPases also control secretory events through the exocyst. The exocyst is a multisubunit complex whose core elements include Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70, and Exo84. It is involved in the intricate secretory vesicle sorting and delivery events required to establish and support functionally and architecturally discrete plasma membrane domains (Camonis & White, 2005). Sec5 and Exo84 are both direct effectors of Ral.

While studying the contribution of Ral GTPase effector proteins to Ral function in normal and tumorigenic epithelial cells, Chien and colleagues observed that RNAi-mediated depletion of Sec5 induces apoptosis of a variety of tumor cell lines (Chien et al, 2006). To understand the molecular basis of this effect, they immunoprecipitated the exocyst complex from epithelial cells and identified TBK1 as a co-precipitating protein. They further showed that RalB activation promotes TBK1/Sec5 assembly and that TBK1 can phosphorylate Sec5 in vitro (see Fig. 2A and Table I). Silencing of TBK1 expression by RNAi was found to mimic depletion of RalB or Sec5 and induce tumor cell apoptosis. On the other hand, non-tumorigenic epithelial cells do not depend on TBK1 for survival (Chien et al, 2006). The selective dependence of transformed cells on TBK1 was also reflected in

the enzyme's phosphotransferase activity, which was higher in transformed cells than in non-tumorigenic epithelial cells. Furthermore, studies using TBK1^{-/-} fibroblasts revealed that TBK1 expression was required for cells to tolerate transforming levels of oncogenic K-Ras^{G12V}. This study also established that RalB and Sec5 were required for activation of the host defense pathway. Whereas Ras activity was suppressed in non-transformed epithelial cells in response to TLR3 signaling stimulated by poly(I:C) treatment, Ral GTPases were activated and this activation correlated with the phosphorylation of IRF-3. Moreover, siRNA-mediated depletion of Sec5 severely impaired not only the nuclear accumulation of IRF-3, but also the induction of *ISG56* and *IFNβ* following Sendai virus (SeV) infection or poly(I:C) treatment. In summary, the RalB/TBK1 pathway is required for the survival of Ras-transformed cells and to activate the innate immune response in non-tumorigenic cells (Fig. 3).

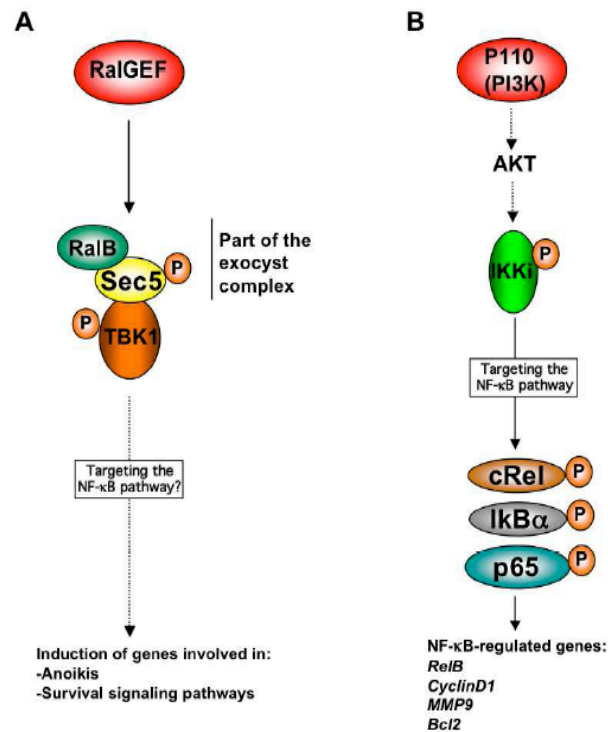


Figure 2. A, TBK1 is part of the exocyst complex and is engaged by Sec5 from within that complex. The contribution of Sec5 to TBK1 activation occurs independently of exocyst integrity and is thought to result from RalB-induced TBK1 activation, in which RalB/Sec5 complex formation reveals a cryptic TBK1 interaction domain that recruits TBK1 into a kinase activation complex. The molecular mechanisms responsible for TBK1-dependent tumor cell survival remains to be characterized but could involve, in part, the NF-κB pathway. B, IKKi is an essential effector in AKT-transformed cells. The NF-κB pathway is implicated in the oncogenic effect of IKKi. How the PI3-kinase pathway activates IKKi is presently unknown.

Another recent study provides evidence for a role of TBK1 in the tumorigenesis process. Using a genome-wide phenotypic screen based on the overexpression of 250,000 cDNAs in HEK 293 cells combined with the transfer of culture supernatants onto HUVEC cells, Korherr and colleagues identified TBK1 and TRIF as new effectors of vascularization (Korherr et al, 2006). Overexpression of TRIF and TBK1 in HEK293 cells resulted in the

secretion of a complex mixture containing endothelial growth factors such as IL-8 and RANTES, as well as the anti-proliferative cytokine IFN β . The secreted mixture showed significant proangiogenic properties on endothelial cells. In addition to HEK 293 cells, the authors analyzed the proliferative response of endothelial cells to supernatants isolated from MCF-7, PC-3, and KB-3-1 cancer cells transiently transfected with the gene for TBK1. They confirmed that the autocrine effect of TBK1 is observed in various cancer cell lines. Interestingly, these cancer cell lines already show increased activity of TBK1 (see above). Their study also showed some unexpected findings: TBK1 was up-regulated under hypoxic conditions, as well as in solid breast and colon tumors. This is the first report demonstrating modulation of TBK1 at the protein level.

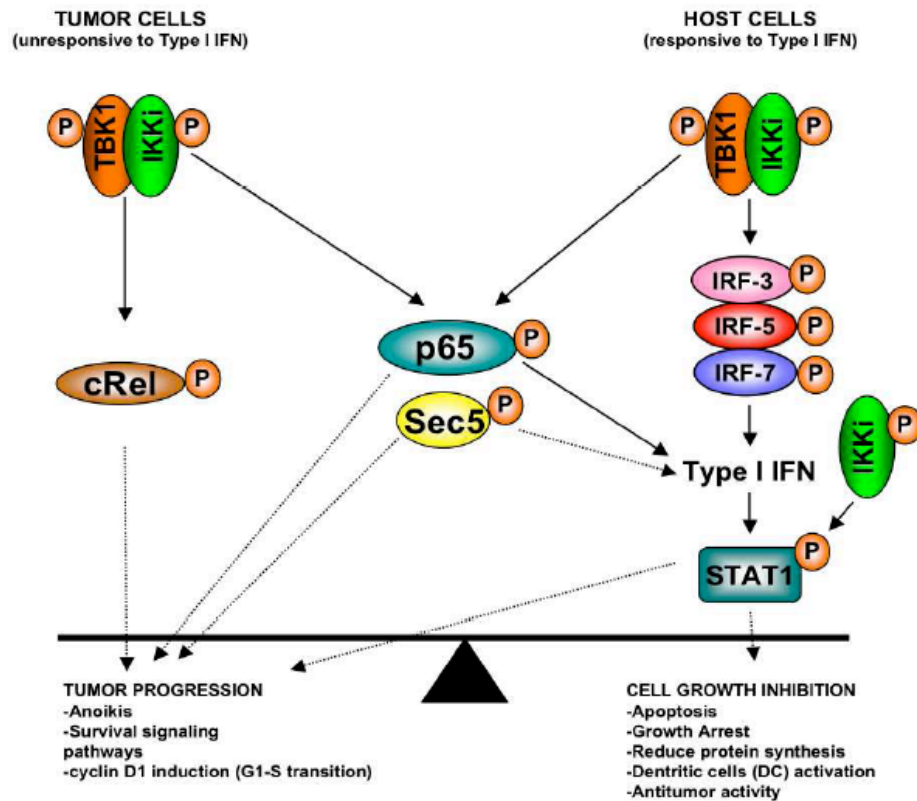


Figure 3. Transformed cells rely on the IKK-related kinases for cell proliferation and viability. Both the expression and the activity of IKK α and TBK1 can be increased in oncogenic tissues or cancer-derived cell lines. The IKK-related kinases depend on effectors of the NF- κ B pathway, such as c-Rel, p65/RelA and I κ B α in order to antagonize apoptotic signals that are normally activated when cells loose contact with the extracellular matrix or following genotoxic stimuli. Cyclin D1 induction diminishes the need of growth signal and allow G1-S transition. The role of phosphorylated Sec5 in TBK1-induced cancer cell survival remains to be elucidated. On the other hand, following exposition to PAMPs, targeted cells will use the IKK-related kinases to induce a set of anti-viral genes like type I IFN. IFNs are strong inducers of cell cycle arrest. However, several cancers exhibit specific mutations of gene products in the IFN pathway and are therefore resistant to the growth inhibitory effect of type I IFN.

Breast cancer and the NF- κ B pathway. Is IKKi the missing link?

Inflammatory breast cancer (IBC) is the most aggressive form of locally advanced breast cancer with a high metastatic potential. At the molecular level, microarray and qPCR analysis have revealed an 'NF- κ B signature' in IBC (Lerebours et al, 2008; Van Laere et al, 2006). Interestingly, the first evidences implicating IKKi in tumor development were in breast cancer. IKKi was found to be constitutively expressed in two-thirds of the human breast cancer tissues analyzed, as well as in several human breast cancer cell lines (Eddy et al, 2005). Casein kinase 2 (CK2) was proposed to be involved in the increased expression level of IKKi. Most importantly, the NF- κ B pathway is thought to contribute to the uncontrolled cellular proliferation of IKKi-expressing cells, since overexpression of an inactive mutant of IKKi reduces the expression of the cyclin D1 gene targeted by NF- κ B (Fig. 2B). It also reduces the ability of breast cancer cells to grow in soft agar and to form invasive colonies in Matrigel.

Mutation of the Ras proteins or hyperactivation of downstream effector pathways, principally the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and PI3K pathways, occurs in several epithelial cancers including breast cancers ((Downward, 2003) and Fig. 1). An elegant functional genomic approach was used to identify protein kinases that have the potential to replace activated Akt and cooperate with a constitutively active MAPK pathway to drive tumorigenesis of immortalized human embryonic kidney epithelial cells (Boehm et al, 2007). In this study, IKKi was identified among four kinases with transforming potential (Fig. 2B). Interestingly, the authors found copy-number amplification of the 1q32 region, which includes the *IKBKE* locus, in 16.3% of breast cancer cell lines and in several primary human breast cancer specimens. No somatic mutation was found in the *IKBKE* gene, and no association was observed between the *IKBKE* copy-number gain and the estrogen receptor or Her2/neu status. *IKBKE* amplification correlated with overexpression of IKKi in several breast cancer cell lines such

as MCF-7 and ZR-75-1. Silencing experiments with shRNAs confirmed that IKKi is required for the proliferation and survival of ZR-75-1 cells. Interestingly, knocking down the expression levels of both IKKi and TBK1 was required to diminish the viability of MCF-7 cells. This observation also supports a role for TBK1 in oncogenesis as discussed above.

At the molecular level, the overexpression of IKKi observed in breast cancer cell lines resulted in increased expression of two NF- κ B-regulated genes, *MMP9* and *BCL2*, both of which were down-regulated when *IKBKE* expression was suppressed. Moreover, immunohistochemical studies in patient-derived breast cancer tissue samples revealed nuclear staining for c-Rel, a recently described substrate of IKKi (Table I). This protein had previously been reported to accumulate in the nuclei of breast cancer cells (Sovak et al, 1997) and to contribute to tumorigenesis of the mammary gland in an MMTV-LTR-c-Rel transgenic mouse model (Romieu-Mourez et al, 2003). IKKi modulates c-Rel activity through direct phosphorylation of the transactivation domain (Harris et al, 2006). However, even though nuclear accumulation of c-Rel was observed in HEK 293T cells, IKKi-induced phosphorylation was insufficient to significantly induce its transactivation potential. Thus, additional signaling cascades are likely to be required for full activation of c-Rel.

In addition to c-Rel and RelB (Eddy et al, 2005), RelA/p65 was observed to accumulate in the nuclei of primary human breast tumor specimens (Sovak et al, 1997). Furthermore, in many cancer cell lines, expression levels of IKKi correlate with p65 phosphorylation at Serine 536 (Adli & Baldwin, 2006). However, Serine 536 is targeted by many other kinases, including IKK α/β , TBK1, and RSK1 (Bohuslav et al, 2004; Buss et al, 2004; Sakurai et al, 1999). Finally, IKKi also interacts with NF- κ B2/p100 and p52 following TNF α stimulation (Wietek et al, 2006). Gel filtration experiments suggest that IKKi and p52 are components of a 600-kDa complex. This interaction promotes

transcription of p52-dependent genes in a ternary complex with p65/RelA. Although the kinase activity of IKKi is essential to achieve this process, p52 does not seem to be a direct target, again suggesting that p65/RelA may be the preferred substrate of the kinase.

Are other substrates of IKK-related kinases involved in tumorigenesis?

It is intriguing that while the activity of IKK-related kinases is linked to cancer cell survival (see above), these kinases act on transcription factors with tumor suppressor properties, namely IRF-3, -5, and -7 (Table I and Fig. 3). Activated by TBK1 or IKKi following viral or bacterial infections, these transcription factors ultimately lead to pathogen clearance. This occurs through the induction of type I IFN and of several IFN-stimulated genes (ISGs) involved in host defense cellular processes. These processes include protein translational shutdown, cell cycle withdrawal, apoptosis, and hematopoietic cell regulation such as dendritic cell (DC) activation. Notably, type I IFN signaling induce p53 accumulation (Takaoka et al, 2003). Thus, at first glance, one can argue that the IKK-related kinases may also counteract tumor development through their effect on type I IFN synthesis. However, several cancers exhibit specific mutations in components of the IFN signaling pathway (Stojdl et al, 2000) and are therefore resistant to the growth-inhibitory effect of type I IFN. Since these cytokines are known to act by paracrine and autocrine mechanisms, transformed cells that rely on the IKK-related kinases for survival and proliferation are likely to be unresponsive to type I IFN, thus shifting the equilibrium toward tumor progression (Fig. 3). On the other hand, IRF-3 is known to possess tumor suppressor activities that are unrelated to the protein's effect on type I IFN synthesis, but are directly linked to its effect on apoptosis. Studies have revealed that IRF-3 can transactivate a large number of genes, such as *ISG56*, *TRAIL*, and *NOXA*, which are known to abrogate protein synthesis or to induce apoptosis in a p53-independent manner (Grandvaux et al, 2002a; Guo et al, 2000; Kirshner et al, 2005; Lallemand et al, 2007; Weaver et al, 2001b). However, IRF-3 also activates transcription of the gene encoding

promyelocytic leukemia protein (PML), leading to p53-dependent growth inhibition of cancer cells (Kim et al, 2006; Kim et al, 2007).

The role of IRF-7 in oncogenesis is still unclear. According to Zhang and colleagues, IRF-7 itself has oncogenic potential, as evidenced by its ability to induce tumor formation in nude mice and to cause anchorage-independent growth in NIH 3T3 cells (Zhang et al, 2004b). These authors suggested that IRF-7 may cooperate with the viral oncoprotein LMP-1 in EBV-immortalized B cells or CNS lymphoma cells in order to achieve cellular transformation. Conversely, a recent study pointed out the antitumor effector functions of IRF-7. Adenoviral transduction of an active form of IRF-7 into macrophages was found to up-regulate genes such as *TRAIL*, *IL15*, *IL12p35*, *ISG56*, and *CD80* and also down-regulate transcription of proangiogenic/metastatic genes such as *VEGF* and *MMP2*. Thus, IRF-7 increases the antitumor properties of primary macrophages while reducing their protumorigenic effects (Romieu-Mourez et al, 2006).

IRF-5 is also a candidate tumor suppressor gene that mediates cell cycle arrest and apoptosis (reviewed in (Tamura et al, 2008)). In primary hematological malignancies such as acute lymphoblastic leukemia, chronic lymphocytic leukemia and acute myeloid leukemia, IRF-5 expression is frequently down-regulated or absent (Barnes et al, 2003). Overexpression of IRF-5 reduces colony formation of A549 lung cancer cells and HCT116 colorectal cancer cells (Mori et al, 2002), and it inhibits growth of BJAB tumor cells *in vivo* (Barnes et al, 2003).

STAT1, a novel substrate of IKKi

As key players in the interferon pathway, proteins known as signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins contribute to the induction of numerous genes known to establish a formidable barrier against viral infection. Recently, Tenover and colleagues established a molecular link between IKKi and the formation of the interferon-stimulated gene factor 3 complex (ISGF3), composed of the STAT1-STAT2 heterodimer and IRF-9 (Tenover et al, 2007). They showed that IKKi phosphorylates STAT1 following treatment with IFN β . *In vitro* kinase assays combined with mass spectrometry identified Serine 708 as the phosphorylated residue. This post-translational modification allows formation of a more stable STAT1-STAT2 heterodimer, which is likely to be essential for binding the ISRE sequence located in a subset of genes involved in antiviral immunity. Thus, IKKi may be involved in defining ISGF3 binding specificity.

The STAT proteins have also been extensively studied for their role in oncogenesis. For instance, constitutive activation of STAT1, STAT3, and STAT5 has been observed in different human primary tumors and cell lines derived from breast cancer, multiple myeloma, head and neck cancer, leukemia, lymphoma, and lung cancer (Bowman et al, 2000; Watson, 2001). However, unlike the clear involvement of STAT3 and STAT5 in oncogenesis, the role of STAT1 remains obscure and controversial. While STAT3 and STAT5 are clearly recognized as oncogenic transcription factors, the STAT1 pathway has been predominantly associated with the inhibition of cell proliferation and tumor suppression (Desrivieres et al, 2006; Watson, 2001). On one hand, STAT1 can promote tumor cell death through transcriptional regulation of genes encoding proteins such as death receptors and ligands, caspases, iNOS, Bcl-xL, and p21^{Cip1}. (For good reviews see (Bowman et al, 2000; Bromberg & Darnell, 2000; Kim & Lee, 2007)). On the other hand, according to the recent findings of Yarilina and colleagues, STAT1 in myeloid cells could enhance tumor progression by accelerating inflammation during the early stages of

inflammation-associated tumorigenesis (Yarilina et al, 2008). Indeed, $\text{TNF}\alpha$, a well-known protumorigenic cytokine (Lin & Karin, 2007), can stimulate macrophages to produce low levels of $\text{IFN}\beta$, which can in turn activate JAK-STAT signaling. Once activated, JAK-STAT signaling acts in synergy with other TNF-induced signals to maintain the expression of inflammatory cytokines. It also leads to increased expression of IKKi, IRF-7, and STAT1. Thus, STAT1 activation could play opposing roles in cancer development (Fig. 3). As mentioned above, IKKi expression is also increased in breast tumors and it may therefore play a role in the constitutive activation of STAT1 seen in breast tumor-derived cell lines (Bowman et al, 2000; Watson, 2001).

The roles of the IKK-related kinase in oncolytic-based viral therapy

Tumor cells show deficient Type I IFN signaling that can be exploited for oncolytic-based viral therapy (Stojdl et al, 2000). For instance, VSV has been shown to exhibit powerful anti-tumor effects against metastatic breast adenocarcinoma (Balachandran & Barber, 2000; Balachandran et al, 2001; Ebert et al, 2005). The Ras-dependent MAPK pathway seems to be responsible for this down-regulation of IFN-induced antiviral response (Battcock et al, 2006). In this context, one can argue that increased levels of IKKi in breast cancer cells may promote the virus infection-mediated apoptosis. Indeed, VSV-mediated apoptosis was shown to be dependent of IRF-5, which, in turn, is likely to be phosphorylated and activated by the IKK-related kinases following VSV infection (Barnes et al, 2002; Cheng et al, 2006; Lin et al, 2005; Schoenemeyer et al, 2005; Yanai et al, 2007). It has also been reported that reovirus, another oncolytic virus, takes advantage of the Ras-dependent RalGEF pathway for its replication (Norman et al, 2004). Knowing that reovirus activation of IRF-3 enhances cellular apoptosis (Holm et al, 2007), it is tempting to speculate that the RalB-induced TBK1 activity in transformed cells may prove useful for developing anti-cancer therapies.

Conclusion

There is now compelling evidence that the transcription factor NF- κ B plays a key role in cancer development and progression. Thus, the recent suggestion that the IKK-related kinases TBK1 and IKKi also regulate the proliferation and survival of cancer cells was not totally unexpected. However, these new findings will increase our understanding of the complex relationship between innate immune effectors and the signaling events that drive tumor formation. Some of the future questions that should be high on the priority list of investigators analyzing the role of these kinases in tumor development are the following. How the kinase activity of TBK1 is increased in cancer-derived cell lines in the absence of any apparent increased in expression level? Is this related to distinct scaffold proteins that facilitate assembly of TBK1 and IKKi subcomplexes (Chau et al, 2008) or could it be more related to the a decrease in the expression of the tumor suppressor CYLD (Zhang et al, 2008c)? What is the molecular basis of IKKi overexpression in breast tumors in the absence of amplification of the *IKBKE* locus, and is this related to increase NF- κ B signaling? Are IRF-3 and IRF-7 activated in transformed cells that rely on TBK1 or IKKi for their proliferation and survival? If yes, then what is the role of the proapoptotic functions of these transcription factors that are unrelated to the protein's effect on type I IFN synthesis? At the molecular level, how does PI3K signaling leads to IKKi activation? Is TBK1 also subjected to this precise regulation? Is there other substrates for these kinases that could explain their effect on cellular proliferation? TBK1 and IKKi are new effectors implicated in tumor progression and may therefore represent new opportunities for drug development. Notably, the availability of compounds like SU6668, which targets TBK1 and other kinases, may help dissect the role of IKK-related kinases in cancer (Godl et al, 2005).

Acknowledgements

We apologize to all colleagues whose papers could not be cited owing to space limitations. This work was supported by funding from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to M.S. (MOP-84571). M.S. is the recipient of a Rx&D/CIHR Health Research Foundation Career Awards in Health Sciences. S.M. is the recipient of a Canada Research Chair in Cellular Signaling. J.F.C is recipient of a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

References

1. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357 (9255):539-545.
2. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420 (6917):860-867.
3. Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T. The IRF Family Transcription Factors in Immunity and Oncogenesis. *Annu Rev Immunol* 2008; 26:535-584.
4. Lee MS, Kim YJ. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annual review of biochemistry* 2007; 76:447-480.
5. Karin M. The IkappaB kinase - a bridge between inflammation and cancer. *Cell Res* 2008; 18 (3):334-342.
6. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 2007; 117 (5):1175-1183.
7. Ancrile BB, O'Hayer KM, Counter CM. Oncogenic ras-induced expression of cytokines: a new target of anti-cancer therapeutics. *Mol Interv* 2008; 8 (1):22-27.
8. Maeda S, Kamata H, Luo JL, Leffert H, Karin M. IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* 2005; 121 (7):977-990.
9. Greten FR, Eckmann L, Greten TF *et al.* IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004; 118 (3):285-296.
10. Luo JL, Tan W, Ricono JM *et al.* Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. *Nature* 2007; 446 (7136):690-694.
11. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature reviews* 2005; 5 (10):749-759.
12. Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 2006; 124 (4):823-835.
13. Hacker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* 2006; 2006 (357):re13.

14. Peters RT, Maniatis T. A new family of IKK-related kinases may function as I kappa B kinase kinases. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1471 (2):M57-62.
15. Tojima Y, Fujimoto A, Delhase M *et al.* NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature* 2000; 404 (6779):778-782.
16. Pomerantz JL, Baltimore D. NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *The EMBO journal* 1999; 18 (23):6694-6704.
17. Peters RT, Liao SM, Maniatis T. IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible IkappaB kinase complex. *Mol Cell* 2000; 5 (3):513-522.
18. Shimada T, Kawai T, Takeda K *et al.* IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases. *Int Immunol* 1999; 11 (8):1357-1362.
19. Gravel SP, Servant MJ. Roles of an IkappaB kinase-related pathway in human cytomegalovirus-infected vascular smooth muscle cells: a molecular link in pathogen-induced proatherosclerotic conditions. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280 (9):7477-7486.
20. Bibeau-Poirier A, Gravel SP, Clement JF *et al.* Involvement of the IkappaB kinase (IKK)-related kinases tank-binding kinase 1/IKKi and cullin-based ubiquitin ligases in IFN regulatory factor-3 degradation. *J Immunol* 2006; 177 (8):5059-5067.
21. Honda K, Yanai H, Negishi H *et al.* IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 2005; 434 (7034):772-777.
22. Kravchenko VV, Mathison JC, Schwamborn K, Mercurio F, Ulevitch RJ. IKKi/IKKepsilon plays a key role in integrating signals induced by pro-inflammatory stimuli. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278 (29):26612-26619.
23. Wang N, Ahmed S, Haqqi TM. Genomic structure and functional characterization of the promoter region of human IkappaB kinase-related kinase IKKi/IKKvarepsilon gene. *Gene* 2005; 353 (1):118-133.
24. Boehm JS, Zhao JJ, Yao J *et al.* Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene. *Cell* 2007; 129 (6):1065-1079.

25. Eddy SF, Guo S, Demicco EG *et al.* Inducible IkappaB kinase/IkappaB kinase epsilon expression is induced by CK2 and promotes aberrant nuclear factor-kappaB activation in breast cancer cells. *Cancer research* 2005; 65 (24):11375-11383.
26. Bonnard M, Mirtsos C, Suzuki S *et al.* Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF-kappaB-dependent gene transcription. *The EMBO journal* 2000; 19 (18):4976-4985.
27. Chen LF, Williams SA, Mu Y *et al.* NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Mol Cell Biol* 2005; 25 (18):7966-7975.
28. Lawrence T, Bebien M, Liu GY, Nizet V, Karin M. IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* 2005; 434 (7037):1138-1143.
29. Fujita F, Taniguchi Y, Kato T *et al.* Identification of NAP1, a regulatory subunit of IkappaB kinase-related kinases that potentiates NF-kappaB signaling. *Mol Cell Biol* 2003; 23 (21):7780-7793.
30. Buss H, Dorrie A, Schmitz ML *et al.* Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- κ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I κ B kinase (IKK)- α , IKK β , IKK ϵ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279 (53):55633-55643.
31. Mattioli I, Geng H, Sebald A *et al.* Inducible phosphorylation of NF-kappa B p65 at serine 468 by T cell costimulation is mediated by IKK epsilon. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281 (10):6175-6183.
32. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL *et al.* IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2003; 4 (5):491-496.
33. Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N *et al.* Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 2003; 300 (5622):1148-1151.

34. Clement JF, Bibeau-Poirier A, Gravel SP *et al.* Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 generates a hyperactive form of IRF-3 through regulation of dimerization and CBP association. *Journal of virology* 2008; 82 (8):3984-3996.
35. Mori M, Yoneyama M, Ito T *et al.* Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279 (11):9698-9702.
36. Panne D, McWhirter SM, Maniatis T, Harrison SC. Interferon regulatory factor 3 is regulated by a dual phosphorylation-dependent switch. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282 (31):22816-22822.
37. tenOever BR, Sharma S, Zou W *et al.* Activation of TBK1 and IKKvarepsilon kinases by vesicular stomatitis virus infection and the role of viral ribonucleoprotein in the development of interferon antiviral immunity. *Journal of virology* 2004; 78 (19):10636-10649.
38. Caillaud A, Hovanessian AG, Levy DE, Marie IJ. Regulatory serine residues mediate phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent activation of interferon regulatory factor 7. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280 (18):17671-17677.
39. Sato M, Suemori H, Hata N *et al.* Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 2000; 13 (4):539-548.
40. Yanai H, Chen HM, Inuzuka T *et al.* Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104 (9):3402-3407.
41. Cheng TF, Brzostek S, Ando O *et al.* Differential activation of IFN regulatory factor (IRF)-3 and IRF-5 transcription factors during viral infection. *J Immunol* 2006; 176 (12):7462-7470.
42. Lin R, Yang L, Arguello M, Penafuerte C, Hiscott J. A CRM1-dependent nuclear export pathway is involved in the regulation of IRF-5 subcellular localization. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280 (4):3088-3095.

43. Schoenemeyer A, Barnes BJ, Mancl ME *et al.* The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280 (17):17005-17012.
44. Balachandran S, Thomas E, Barber GN. A FADD-dependent innate immune mechanism in mammalian cells. *Nature* 2004; 432 (7015):401-405.
45. Michallet MC, Meylan E, Ermolaeva MA *et al.* TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway. *Immunity* 2008; 28 (5):651-661.
46. Hacker H, Redecke V, Blagoev B *et al.* Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 2006; 439 (7073):204-207.
47. Oganessian G, Saha SK, Guo B *et al.* Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 2006; 439 (7073):208-211.
48. Gatot JS, Gioia R, Chau TL *et al.* Lipopolysaccharide-mediated interferon regulatory factor activation involves TBK1-IKKepsilon-dependent Lys(63)-linked polyubiquitination and phosphorylation of TANK/I-TRAF. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282 (43):31131-31146.
49. Guo B, Cheng G. Modulation of the interferon antiviral response by the TBK1/IKKi adaptor protein TANK. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282 (16):11817-11826.
50. Nomura F, Kawai T, Nakanishi K, Akira S. NF-kappaB activation through IKK-i-dependent I-TRAF/TANK phosphorylation. *Genes Cells* 2000; 5 (3):191-202.
51. Rothe M, Xiong J, Shu HB *et al.* I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93 (16):8241-8246.
52. Sasai M, Oshiumi H, Matsumoto M *et al.* Cutting Edge: NF-kappaB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation. *J Immunol* 2005; 174 (1):27-30.

53. Yang K, Shi H, Qi R *et al.* Hsp90 regulates activation of interferon regulatory factor 3 and TBK-1 stabilization in Sendai virus-infected cells. *Mol Biol Cell* 2006; 17 (3):1461-1471.
54. Ryzhakov G, Randow F. SINTBAD, a novel component of innate antiviral immunity, shares a TBK1-binding domain with NAP1 and TANK. *The EMBO journal* 2007; 26 (13):3180-3190.
55. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004; 5 (7):730-737.
56. Andrejeva J, Childs KS, Young DF *et al.* The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101 (49):17264-17269.
57. Kawai T, Takahashi K, Sato S *et al.* IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 2005; 6 (10):981-988.
58. Meylan E, Curran J, Hofmann K *et al.* Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005; 437 (7062):1167-1172.
59. Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 2005; 122 (5):669-682.
60. Xu LG, Wang YY, Han KJ *et al.* VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* 2005; 19 (6):727-740.
61. Takaoka A, Wang Z, Choi MK *et al.* DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 2007; 448 (7152):501-505.
62. Muruve DA, Petrilli V, Zaiss AK *et al.* The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* 2008; 452 (7183):103-107.

63. Reily MM, Pantoja C, Hu X, Chinenov Y, Rogatsky I. The GRIP1:IRF3 interaction as a target for glucocorticoid receptor-mediated immunosuppression. *The EMBO journal* 2006; 25 (1):108-117.
64. An H, Zhao W, Hou J *et al.* SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type I interferon and proinflammatory cytokine production. *Immunity* 2006; 25 (6):919-928.
65. Huang J, Liu T, Xu LG *et al.* SIKE is an IKK epsilon/TBK1-associated suppressor of TLR3- and virus-triggered IRF-3 activation pathways. *The EMBO journal* 2005; 24 (23):4018-4028.
66. Lin R, Yang L, Nakhaei P *et al.* Negative regulation of the retinoic acid-inducible gene I-induced antiviral state by the ubiquitin-editing protein A20. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281 (4):2095-2103.
67. Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G *et al.* The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* 2005; 175 (8):5260-5268.
68. Moore CB, Bergstralh DT, Duncan JA *et al.* NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature* 2008; 451 (7178):573-577.
69. Zhang M, Wu X, Lee AJ *et al.* Regulation of IKK-related kinases and antiviral responses by tumor suppressor CYLD. *The Journal of biological chemistry* 2008.
70. Kassel O, Herrlich P. Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 275 (1-2):13-29.
71. Seth RB, Sun L, Chen ZJ. Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res* 2006; 16 (2):141-147.
72. Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature reviews* 2006; 6 (9):644-658.
73. Chien Y, Kim S, Bumeister R *et al.* RalB GTPase-mediated activation of the IkkappaB family kinase TBK1 couples innate immune signaling to tumor cell survival. *Cell* 2006; 127 (1):157-170.

74. Camonis JH, White MA. Ral GTPases: corrupting the exocyst in cancer cells. *Trends Cell Biol* 2005; 15 (6):327-332.
75. Hamad NM, Elconin JH, Karnoub AE *et al.* Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells. *Genes Dev* 2002; 16 (16):2045-2057.
76. Lim KH, O'Hayer K, Adam SJ *et al.* Divergent roles for RalA and RalB in malignant growth of human pancreatic carcinoma cells. *Curr Biol* 2006; 16 (24):2385-2394.
77. Rangarajan A, Hong SJ, Gifford A, Weinberg RA. Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell* 2004; 6 (2):171-183.
78. Korherr C, Gille H, Schafer R *et al.* Identification of proangiogenic genes and pathways by high-throughput functional genomics: TBK1 and the IRF3 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103 (11):4240-4245.
79. Van Laere SJ, Van der Auwera I, Van den Eynden GG *et al.* Nuclear factor-kappaB signature of inflammatory breast cancer by cDNA microarray validated by quantitative real-time reverse transcription-PCR, immunohistochemistry, and nuclear factor-kappaB DNA-binding. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (11 Pt 1):3249-3256.
80. Lerebours F, Vacher S, Andrieu C *et al.* NF-kappa B genes have a major role in inflammatory breast cancer. *BMC Cancer* 2008; 8:41.
81. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3 (1):11-22.
82. Sovak MA, Bellas RE, Kim DW *et al.* Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 1997; 100 (12):2952-2960.
83. Romieu-Mourez R, Kim DW, Shin SM *et al.* Mouse mammary tumor virus c-rel transgenic mice develop mammary tumors. *Mol Cell Biol* 2003; 23 (16):5738-5754.
84. Harris J, Oliere S, Sharma S *et al.* Nuclear accumulation of cRel following C-terminal phosphorylation by TBK1/IKK epsilon. *J Immunol* 2006; 177 (4):2527-2535.

85. Adli M, Baldwin AS. IKK-i/IKKepsilon controls constitutive, cancer cell-associated NF-kappaB activity via regulation of Ser-536 p65/RelA phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281 (37):26976-26984.
86. Bohuslav J, Chen LF, Kwon H, Mu Y, Greene WC. p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279 (25):26115-26125.
87. Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T, Toriumi W. IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *The Journal of biological chemistry* 1999; 274 (43):30353-30356.
88. Wietek C, Cleaver CS, Ludbrook V *et al.* IkappaB kinase epsilon interacts with p52 and promotes transactivation via p65. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281 (46):34973-34981.
89. Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H *et al.* Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* 2003; 424 (6948):516-523.
90. Stojdl DF, Lichty B, Knowles S *et al.* Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med* 2000; 6 (7):821-825.
91. Grandvaux N, Servant MJ, tenOever B *et al.* Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *Journal of virology* 2002; 76 (11):5532-5539.
92. Kirshner JR, Karpova AY, Kops M, Howley PM. Identification of TRAIL as an interferon regulatory factor 3 transcriptional target. *Journal of virology* 2005; 79 (14):9320-9324.
93. Weaver BK, Ando O, Kumar KP, Reich NC. Apoptosis is promoted by the dsRNA-activated factor (DRAF1) during viral infection independent of the action of interferon or p53. *Faseb J* 2001; 15 (2):501-515.

94. Lallemand C, Blanchard B, Palmieri M *et al.* Single-stranded RNA viruses inactivate the transcriptional activity of p53 but induce NOXA-dependent apoptosis via post-translational modifications of IRF-1, IRF-3 and CREB. *Oncogene* 2007; 26 (3):328-338.
95. Guo J, Hui DJ, Merrick WC, Sen GC. A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3. *The EMBO journal* 2000; 19 (24):6891-6899.
96. Kim TK, Lee JS, Jung JE *et al.* Interferon regulatory factor 3 activates p53-dependent cell growth inhibition. *Cancer Lett* 2006; 242 (2):215-221.
97. Kim TK, Lee JS, Oh SY *et al.* Direct transcriptional activation of promyelocytic leukemia protein by IFN regulatory factor 3 induces the p53-dependent growth inhibition of cancer cells. *Cancer research* 2007; 67 (23):11133-11140.
98. Zhang L, Zhang J, Lambert Q *et al.* Interferon regulatory factor 7 is associated with Epstein-Barr virus-transformed central nervous system lymphoma and has oncogenic properties. *Journal of virology* 2004; 78 (23):12987-12995.
99. Romieu-Mourez R, Solis M, Nardin A *et al.* Distinct roles for IFN regulatory factor (IRF)-3 and IRF-7 in the activation of antitumor properties of human macrophages. *Cancer research* 2006; 66 (21):10576-10585.
100. Barnes BJ, Kellum MJ, Pinder KE, Frisancho JA, Pitha PM. Interferon regulatory factor 5, a novel mediator of cell cycle arrest and cell death. *Cancer research* 2003; 63 (19):6424-6431.
101. Mori T, Anazawa Y, Iizumi M *et al.* Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. *Oncogene* 2002; 21 (18):2914-2918.
102. Tenover BR, Ng SL, Chua MA *et al.* Multiple functions of the IKK-related kinase IKKepsilon in interferon-mediated antiviral immunity. *Science* 2007; 315 (5816):1274-1278.
103. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; 19 (21):2474-2488.
104. Watson CJ. Stat transcription factors in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; 6 (1):115-127.

105. Desrivieres S, Kunz C, Barash I *et al.* The biological functions of the versatile transcription factors STAT3 and STAT5 and new strategies for their targeted inhibition. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2006; 11 (1):75-87.
106. Bromberg J, Darnell JE, Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000; 19 (21):2468-2473.
107. Kim HS, Lee MS. STAT1 as a key modulator of cell death. *Cell Signal* 2007; 19 (3):454-465.
108. Yarilina A, Park-Min KH, Antoniv T, Hu X, Ivashkiv LB. TNF activates an IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1-dependent type I interferon-response genes. *Nat Immunol* 2008; 9 (4):378-387.
109. Balachandran S, Barber GN. Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors. *IUBMB Life* 2000; 50 (2):135-138.
110. Balachandran S, Porosnicu M, Barber GN. Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Ras, or myc function and involves the induction of apoptosis. *Journal of virology* 2001; 75 (7):3474-3479.
111. Ebert O, Harbaran S, Shinozaki K, Woo SL. Systemic therapy of experimental breast cancer metastases by mutant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Cancer gene therapy* 2005; 12 (4):350-358.
112. Battcock SM, Collier TW, Zu D, Hirasawa K. Negative regulation of the alpha interferon-induced antiviral response by the Ras/Raf/MEK pathway. *Journal of virology* 2006; 80 (9):4422-4430.
113. Barnes BJ, Kellum MJ, Field AE, Pitha PM. Multiple regulatory domains of IRF-5 control activation, cellular localization, and induction of chemokines that mediate recruitment of T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 2002; 22 (16):5721-5740.
114. Norman KL, Hirasawa K, Yang AD, Shields MA, Lee PW. Reovirus oncolysis: the Ras/RalGEF/p38 pathway dictates host cell permissiveness to reovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101 (30):11099-11104.

115. Holm GH, Zurney J, Tumilasci V *et al.* Retinoic acid-inducible gene-I and interferon-beta promoter stimulator-1 augment proapoptotic responses following mammalian reovirus infection via interferon regulatory factor-3. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282 (30):21953-21961.
116. Chau TL, Gioia R, Gatot JS *et al.* Are the IKKs and IKK-related kinases TBK1 and IKK-varepsilon similarly activated? *Trends Biochem Sci* 2008.
117. Godl K, Gruss OJ, Eickhoff J *et al.* Proteomic characterization of the angiogenesis inhibitor SU6668 reveals multiple impacts on cellular kinase signaling. *Cancer research* 2005; 65 (15):6919-6926.

Chapitre 3. Objectif de cette thèse et publications

3.1 Objectif général

Lorsque que j'ai commencé dans le laboratoire du Dr Marc Servant, la caractérisation des différentes voies de signalisation impliquées dans la réponse IFN de type I était en pleine effervescence. Les données dans la littérature abondaient de toute part, mais elles étaient souvent très contradictoires. À mon avis, le modèle proposé pour expliquer le mécanisme d'activation de IRF-3 était le plus affecté par ces discordances. Dans le but de clarifier ce modèle, nous avons entrepris d'approfondir les mécanismes de régulation moléculaires impliqués dans l'activation de ce facteur de transcription. De plus, le monde des IFNs venait d'être complètement bouleversé par la découverte de médiateurs cellulaires importants localisés au niveau de la mitochondrie. La membrane mitochondriale était maintenant devenue une nouvelle plateforme permettant l'assemblage de certains complexes de signalisation impliquée dans la réponse antivirale. Afin de mieux comprendre les mécanismes régulant l'assemblage de ces complexes, nous avons également tenté de trouver de nouveaux régulateurs protéiques pouvant influencer la production des IFNs de type I.

3.1.1 Objectifs spécifiques

3.1.1.1 Identification des sites de phosphorylation impliqués dans l'activation du facteur de transcriton IRF-3.

TBK1 et IKKi venaient tout juste d'être identifiées comme étant les kinases responsables des modifications post-traductionnelles observées en C-terminal de IRF-3. Les sites phosphoaccepteurs ciblés par ces kinases demeuraient toutefois encore incertains. Nous avons alors entrepris d'identifier ces sites afin de vérifier leur impact respectif dans la

régulation de la réponse interféron. De plus, nous avons essayé de caractériser la cinétique de phosphorylation de ces sites localisés en C-terminal.

3.1.1.2 Identification de nouvelles protéines impliquées dans la voie d'activation de la réponse interféron.

La voie de signalisation menant à l'activation des IKK-related kinases (TBK1/IKKi) est très complexe et peu de choses à l'époque étaient connues quant aux protéines cytoplasmiques impliquées dans l'orchestration de cette cascade. En combinant la spectrométrie de masse à nos techniques conventionnelles de biologie moléculaire, nous avons tenté d'identifier de nouveaux partenaires protéiques de TRAF3, une protéine dont l'association à CARDIF au niveau de la mitochondrie venait tout juste d'être démontrée. Nous espérons ainsi mieux comprendre les mécanismes de régulation impliqués dans cette voie de signalisation cellulaire.

3.2 Publications

Les objectifs de cette thèse ont permis les publications suivantes :

- 1) **Jean-Francois Clement**, Lisa D'Ambrosio, Gregory Emery, Anne-Claude Gingras, Sylvain Meloche and Marc J Servant. *TRAF3 recruitment to Sec16A and p115 reveals a new a role for the ER to Golgi Transport Compartments in Innate Immunity*. Submitted. Augusts 2010.
- 2) Marc J Servant, **Jean-Francois Clement** and Sylvain Meloche. *The IKK-related Kinases, unexpected culprits in oncogenesis*. Atlas of genetics and cytogenetics in Oncology and Haematology, march 2009. Deep Insight.

- 3) **Jean-Francois Clement**, Sylvain Meloche and Marc J Servant. *The IKK-related Kinases : From Innate Immunity to Oncogenesis*. Cell Research. 2008 Sept; 18:889–899
- 4) **Jean-Francois Clément**, Bibeau-Poirier A, Gravel SP, Grandvaux N, Bonneil E, Thibault P, Meloche S, Servant MJ. *Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 generates a hyperactive form of IRF-3 through regulation of dimerization and CBP association*. Journal of Virology. 2008 Apr;82(8):3984-96
- 5) Annie Bibeau-Poirier, Simon-Pierre Gravel, **Jean-François Clement**, Sébastien Rolland, Geneviève Rodier, Philippe Coulombe, Sylvain Meloche, Nathalie Grandvaux and Marc. J. Servant. *Involvement of the IkappaB kinase (IKK)-related kinases tank-binding kinase 1/IKKi and cullin-based ubiquitin ligases in IFN regulatory factor-3 degradation*. Journal of Immunology. 2006 Oct 15;177(8):5059-67
- 6) Annie Douillette, Annie Bibeau-Poirier, Simon-Pierre Gravel, **Jean-Francois Clement**, Valerie Chenard, Pierre Moreau and Marc J Servant. *The proinflammatory actions of angiotensin II are dependent on p65 phosphorylation by the Ikappa B kinase complex*. Journal of Biological Chemistry. 2006 May 12;281(19):13275-84

Chapitre 4. Caractérisation des sites de phosphorylation du facteur de transcription IRF-3

4.1 Mise en situation

En 2003, les IKK-related kinases, TBK1 et IKKi, furent identifiées comme les kinases responsables de la phosphorylation en C-terminal de IRF-3. Toutefois, l'identité des sites phosphoaccepteurs ciblés par ces deux kinases demeurait obscure. Les études publiées à ce sujet étaient extrêmement contradictoires. Par exemple, des essais kinases *in vitro* utilisant des substrats tronqués de IRF-3 démontraient la phosphorylation de la sérine 402 par TBK1, alors que les études cristallographiques démontraient que ce site était le moins accessible de tous ceux disponibles en C-terminal. La façon de mesurer l'activation de IRF-3 se compliquait aussi par la présence de données discordantes dans la littérature. Le modèle accepté pour expliquer le mécanisme d'activation de IRF-3 établissait que son association à CBP, son hyperphosphorylation, son homodimérisation et sa translocation nucléaire reflétaient parfaitement son activité biologique. Toutefois, le groupe du Dre Mossman avait observé à plusieurs occasions un manque de corrélation entre l'induction des gènes dépendant de IRF-3 et son état d'hyperphosphorylation. D'autres groupes ont par la suite démontré des incohérences au niveau de son activation avec la présence d'une association à CBP ou son homodimérisation. En couplant la spectrométrie de masse à des analyses structure-fonction de IRF-3, nous avons donc décidé de réévaluer les sites phosphoaccepteurs ciblés par TBK1 et tenté de fournir des explications aux discordances observées avec le modèle d'activation de IRF-3 actuellement proposé.

4.2 Article 2- Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 generates a hyperactive form of IRF-3 through regulation of dimerization and CBP association.

JOURNAL OF VIROLOGY, Apr. 2008, p. 3984–3996
 0022-538X/08/\$08.00+0 doi:10.1128/JVI.02526-07
 Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 82, No. 8

Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 Generates a Hyperactive Form of IRF-3 through Regulation of Dimerization and CBP Association[▽]

Jean-François Clément,¹ Annie Bibeau-Poirier,¹ Simon-Pierre Gravel,¹ Nathalie Grandvaux,⁴
 Éric Bonneil,² Pierre Thibault,² Sylvain Meloche,^{2,3} and Marc J. Servant^{1*}

Faculty of Pharmacy,¹ Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie,² Departments of Pharmacology and Molecular Biology,³ and Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and Department of Biochemistry,⁴ University of Montreal, Montreal H3C 3J7, Canada

Received 26 November 2007/Accepted 30 January 2008

The I κ B kinase-related kinases, TBK1 and IKKi, were recently shown to be responsible for the C-terminal phosphorylation of IRF-3. However, the identity of the phosphoacceptor site(s) targeted by these two kinases remains unclear. Using a biological assay based on the IRF-3-mediated production of antiviral cytokines, we demonstrate here that all Ser/Thr clusters of IRF-3 are required for its optimal transactivation capacity. In vitro kinase assays using full-length His-IRF-3 as a substrate combined with mass spectrometry analysis revealed that serine 402 and serine 396 are directly targeted by TBK1. Analysis of Ser/Thr-to-Ala mutants revealed that the S396A mutation, located in cluster II, abolished IRF-3 homodimerization, CBP association, and nuclear accumulation. However, production of antiviral cytokines was still present in IRF-3 S396A-expressing cells. Interestingly, mutation of serine 339, which is involved in IRF-3 stability, also abrogated CBP association and dimerization without affecting gene transactivation as long as serine 396 remained available for phosphorylation. Complementation of IRF-3-knockout mouse embryonic fibroblasts also revealed a compensatory mechanism of serine 339 and serine 396 in the ability of IRF-3 to induce expression of the interferon-stimulated genes ISG56 and ISG54. These data lead us to reconsider the current model of IRF-3 activation. We propose that conventional biochemical assays used to measure IRF-3 activation are not sensitive enough to detect the small fraction of IRF-3 needed to elicit a biological response. Importantly, our study establishes a molecular link between the role of serine 339 in IRF-3 homodimerization, CBP association, and its destabilization.

Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 Generates a Hyperactive Form of IRF-3 Through Regulation of Dimerization and CBP Association

Jean-François Clément¹, Annie Bibeau-Poirier¹, Simon-Pierre Gravel¹, Nathalie Grandvaux⁴, Éric Bonneil²,
Pierre Thibault², Sylvain Meloche^{2,3} and Marc J Servant^{1,*}.

¹Faculty of Pharmacy, ²Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, ³Departments of Pharmacology and Molecular Biology, ⁴Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and Department of Biochemistry, University of Montreal, Montreal, H3C 3J7, Canada

Running title: Role of Ser 339 in IRF-3 transcriptional activity

abstract : 247 words

Word Count : 6865

ABSTRACT

The IKK-related kinases, TBK1 and IKKi, were recently shown to be responsible for the C-terminal phosphorylation of IRF-3. However, the identity of the phosphoacceptor site(s) targeted by these two kinases remains unclear. Using a biological assay based on the production of IRF-3-mediated anti-viral cytokines production, we demonstrate here that all Ser/Thr clusters of IRF-3 are required for its optimal transactivation capacity. *In vitro* kinase assays using full length His-IRF3 as a substrate combined with mass spectrometry analysis revealed that serine 402 and serine 396 are directly targeted by TBK1. Analysis of Ser/Thr to Ala mutants revealed that S396A mutation, located in cluster II, abolished IRF-3 homodimerization, CBP association and nuclear accumulation. However, production of anti-viral cytokines was still present in IRF-3 S396A expressing cells. Interestingly, mutation of serine 339, which is involved in IRF-3 stability, also abrogated CBP association and dimerization without affecting gene transactivation as long as serine 396 remained available for phosphorylation. Complementation of MEFs IRF-3 KO also reveals a compensatory mechanism of serine 339 and serine 396 in the ability of IRF-3 to induce IFN-stimulated genes (ISGs) ISG56 and ISG54 expression. These data lead us to reconsider the current model of IRF-3 activation. We propose that conventional biochemical assays used to measure IRF-3 activation are not sensitive enough to detect the small fraction of IRF-3 needed to elicit a biological response. Importantly, our study establishes a molecular link between the role of serine 339 in IRF-3 homodimerization, CBP association, and its destabilization.

INTRODUCTION

IRF-3 is essential for the normal host response to pathogens ((Sato et al, 2000a) and reviewed in (Hiscott et al, 2003)) and its activity is regulated by phosphorylation mechanisms. Biochemical studies have clearly demonstrated that IRF-3 is a phosphoprotein that is hyperphosphorylated in response to virus infection or exposure to pathogen-activated molecular patterns (PAMPs) (Collins et al, 2004; Gravel & Servant, 2005; Hiscott et al, 2003; Lin et al, 1998; Servant et al, 2003; Servant et al, 2001a). Therefore, understanding how the transcriptional activity of IRF-3 is controlled by protein kinases has been a subject of major interest. Exposure of cells to dsRNA, lipopolysaccharide (LPS) or infectious particles is known to activate several host kinases such as the I κ B kinase (IKK) complex and the stress-activated protein kinases p38 and JNK. However, none of these kinases target IRF-3 (Servant et al, 2001a). Two IKK homologs, namely IKKe (Peters et al, 2000a) (also called IKKi (Shimada et al, 1999b)), and Tank-binding kinase (TBK)1 (Pomerantz & Baltimore, 1999b) were recently shown to be activated following virus infection and to control the transcriptional activity of IRF-3 through phosphorylation of its C-terminal Regulatory Domain (RD) (Fitzgerald et al, 2003; Sharma et al, 2003). This domain comprises three clusters of phosphoacceptor sites: Ser 385/Ser 386 (cluster I), Ser 396/Ser 398 (cluster II) and Ser 402/Thr 404/Ser 405 (Cluster III) for a total of 7 potential sites $^{-382}\text{GGASSLENTVDLHISN}\underline{\text{SHPLSLTSDQY}}^{408}$ -. Presently, TBK1 and IKKi are the only characterized kinases responsible for the C-terminal phosphorylation of IRF-3 and different conclusions were reached about the phosphoacceptor site(s) targeted by these kinases. *In vitro* kinase assays using either recombinant kinases or immunoprecipitated kinases from overexpressing cells and truncated recombinant IRF-3 as a substrate (GST-IRF-3 amino acid 381-427) suggested that cluster III is targeted by TBK1/IKKi, most likely at Ser 402 (McWhirter et al, 2004; Sharma et al, 2003; tenOever et al, 2004). On the other hand, crystallographic studies revealed that Ser 402 is unlikely to be an important target site because it is located in a β -strand region (Takahasi et al, 2003). Phosphoacceptor sites in cluster I are the most accessible amino acids and Ser 386 could be the initial target for TBK1/IKKi (Mori et al, 2004; Takahasi et al, 2003). Thus, the precise sites targeted by

these kinases remain to be characterized. Despite these uncertainties, structure-function studies have clearly established a major role of the C-terminal RD region of IRF-3 in its activation (Lin et al, 1998; Lin et al, 1999c; Servant et al, 2002; Yoneyama et al, 1998). Notably, mutation of the cluster I Ser 385/386 to Ala (creating IRF-3 J2A) abolishes IRF-3 activation (Yoneyama et al, 1998). Intriguingly, mutation of Ser 385/386 to Asp (creating IRF-3 J2D), also abrogates IRF-3 activation (Lin et al, 1999c). These data led to the suggestion that the Ser385/386 cluster may serve as a recognition domain for the IKK-related kinases or alternatively that phosphomimetic substitutions do not produce a functional protein (Lin et al, 1998; tenOever et al, 2004). Substitution of the 5 other phosphoacceptor sites in clusters II and III to Ala (creating IRF-3 5A) reduces IRF-3 activation following virus infection (Lin et al, 1999c; Suhara et al, 2000). Reciprocally, the IRF-3 5D (mutation of the 5 Ser/Thr residues to Asp) behaves as a strong constitutive active form of IRF-3 that associates with CBP, stimulates gene transcription (Lin et al, 1998; Lin et al, 1999c), and induces apoptosis in the absence of virus infection (Heylbroeck et al, 2000; Weaver et al, 2001a). Of the five phosphoacceptor sites present in clusters II and III, we further demonstrated that mutation of Ser 396 to Asp (generating IRF-3 S396D) was the minimal modification required in cluster II in order to obtain a form of IRF-3 that constitutively associates with CBP and induces gene transcription, thus a form that mimic IRF-3 5D (Servant et al, 2003). Importantly, immunoblotting analysis with phosphospecific antibodies showed that Ser 396 and Ser 386 are targeted *in vivo* following virus infection (Mori et al, 2004; Servant et al, 2003).

Based on these observations and crystallographic studies (Qin et al, 2003; Takahasi et al, 2003), two models for IRF-3 activation by phosphorylation have been proposed. One model states that phosphorylation at Ser 385 or Ser 386 of IRF-3 induces its dimerization (Takahasi et al, 2003). The other model favors intramolecular interactions where IRF-3 exists in a latent closed conformation in the cytoplasm, the C-terminal RD interacting with the Proline-Rich Region near the N-terminal DNA Binding Domain (DBD) (Lin et al,

1999c; Qin et al, 2003). C-terminal phosphorylation by TBK1/IKKi is thought to abrogate these intramolecular interactions allowing IRF-3 to homodimerize or heterodimerize with IRF-7 (Honda & Taniguchi, 2006). Subsequently, the dimerized forms of IRF-3 associate with the histone acetyltransferase nuclear proteins CBP and p300, causing IRF-3, which normally shuttles in and out of the nucleus, to become predominantly nuclear (Kumar et al, 2000a) and induce transcription of genes encoding chemokines and type I interferon (IFN). Then, IRF-3 is targeted for degradation following its polyubiquitination by at least two intracellular signaling pathways: 1) phosphorylation at Ser 339 which induces the recruitment of the prolyl isomerase Pin1 followed by polyubiquitination (Saitoh et al, 2006) and 2) phosphorylation of clusters II and III resulting in IRF-3 recognition by a Cullin-based E3 ligase (Bibeau-Poirier et al, 2006).

However, more recent findings suggest that the current model of IRF-3 regulation needs further refinement. For example, Collins and coworkers observed IRF-3-dependent *ISG56* induction without IRF-3 hyperphosphorylation or nuclear translocation. It was proposed that hyperphosphorylation is more related to an anti-immune defense strategy of inducing IRF-3 degradation rather than being a necessary step for the biological activation of IRF-3 (Collins et al, 2004). Other studies also reported a lack of correlation between nuclear accumulation of IRF-3 and its hyperphosphorylation, homodimerization and CBP association state (Dauber et al, 2006; Spiegel et al, 2005).

Using mass spectrometry analysis coupled to comprehensive structure-activity analysis, we re-evaluated the phosphoacceptor sites targeted by TBK1 and the model of IRF-3 activation. Our study reveals that Ser 396 and Ser 402 are directly targeted by TBK1 and that the current assays used to monitor the activation of IRF-3 (hyperphosphorylation on SDS-PAGE, dimerization, co-activator association and nuclear accumulation) are not directly linked to its transcriptional status, but instead reflect hyperactive and unstable

forms of IRF-3. Interestingly, mutation of Ser 339, which is involved in IRF-3 stability, also abrogates CBP association and dimerization without affecting gene transactivation as long as Ser 396 is available for phosphorylation. Therefore, our study establishes a molecular link between the role of Ser 339 in IRF-3 homodimerization, CBP association, and its degradation by the proteasome.

MATERIALS AND METHODS

Reagent, antibodies, and plasmids. Commercial antibodies were obtained from the following suppliers: anti-IRF-3 antibody and anti-pSer386 (IBL, Japan); anti-Flag epitope (M2) and anti- β -actin (clone AC-74) were from Sigma (Oakville, Ontario, Canada). The anti-CBP (A22) and the neutralizing anti-IFN β were purchased from Santa Cruz (Santa Cruz, CA) and Fitzgerald (Concord, MA) respectively. The anti-mISG56 and mISG54 were a kind gift of Dr. Ganes Sen (Lerner Research Institute, Cleveland, OH). A rabbit anti-serum raised against proteins of Sendai virus (SeV) as well as the pFlag-IRF3wt and the pFlag-IRF3 point mutants plasmids were generously provided by Dr. John Hiscott (McGill University, Montreal, Qc). All pFlag-IRF-3 plasmids containing the S339A were generated by site-directed mutagenesis (QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, La Jolla, CA). Plasmids encoding for Δ N IRF-3, Flag-IKKi, Flag-TBK1 and the dominant negative version Flag-IKKi K38A or Flag-TBK1 K38A were kind gifts of Dr. Rongtuan Lin (McGill University, Montreal, Qc). The IFN β reporter plasmid, pGL3-IFN- β -LUC was described previously (Lin et al, 1999a; Lin et al, 1998; Lin et al, 1999c; Lin et al, 2000). Cycloheximide (CHX) and Leptomycin B (LMB) were purchased from Calbiochem and used at final concentrations of 100 μ g/ml and 100 ng/ml, respectively.

Cell culture, transfection and infections. HeLa, 293T, Vero and MEFs IRF-3 KO cells (kindly provided by Tom Maniatis, Harvard University, MA) were maintained in Dubelco

modified Eagle Medium supplemented with 10% fetal bovine serum. MEFs IRF3 +/+ and -/- were immortalized using the 3T3 protocol (Todaro & Green, 1963). DNA transfections were performed with lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) according to the manufacturer's protocol. Sendai virus (SeV) was obtained from Specific Pathogen-Free Avian Supply (North Franklin, CT). VSV (Indiana strain, a kind gift of Dr. John Hiscott) was propagated in Vero cells and quantified by standard plaque assay.

Immunoblot analysis, Immunoprecipitation, and Native-PAGE. Preparation of whole cell extracts (WCE), immunoprecipitation, Native-PAGE and immunoblot analysis were performed as described previously (Bibeau-Poirier et al, 2006; Gravel & Servant, 2005; Servant et al, 2001a). Briefly, WCE were prepared in Triton X-100 lysis buffer (50 mM Tris pH7.4, 150 mM NaCl, 30 mM NaF, 5 mM EDTA, 10% Glycerol, 1 mM Na₃VO₄, 40 mM B-Glycerophosphate, 0.1 mM PMSF, 5 µg/ml of Leupeptin, Pepstatin, and Aprotinin, 1% Triton X-100). For co-immunoprecipitation studies, WCE (400-500 µg) were incubated with 1.5 µg of anti-CBP antibody A-22 cross-linked to 30 µl of protein A-Sepharose beads for 4h at 4°C (Amersham, GE Health Care, UK). The beads were washed 5 times in lysis buffer and then resuspended in denaturing SDS loading buffer. IRF-3 proteins associated with CBP were analyzed by immunoblotting as previously described (Servant et al, 2001a). For Native-PAGE analysis, a 7.5% acrylamide gels (without SDS) were prerun with 25 mM Tris and 192 mM glycine, pH 8.4, with and without 1% deoxycholate in the cathode and anode chamber, respectively, for 30 min, at 40 mA. WCE (10-15 µg) diluted in native sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 15% glycerol, and bromophenol blue) were applied to the gel and subjected to electrophoresis for 60 min at 25 mA. Immunoblotting was performed using a anti-Flag monoclonal antibody.

Production of recombinant His-wtIRF-3. IRF-3 cDNA was subcloned in pET-15b vector (Novagen, Madison, WI), transformed in *E. coli* BL21(DE3)pLysS bacteria. Expression was induced with 1 mM IPTG at 37°C for 3 hours at OD600 nm. His-tagged IRF-3 protein was then purified by nickel–N-acrylotris (hydroxymethyl) aminomethane (Ni-NTA) affinity chromatography using the His Bind Purification Kit (Novagen) according to the manufacturer’s protocol.

Immunofluorescence. HeLa cells were transfected with the different IRF-3 constructs for 24h and then infected with SeV. 8h post-infection, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min followed by permeabilization with 0.2% Triton X-100 for 10 min. Cells were washed with PBS, pH 7.2 and blocked with 5% dry milk in PBS. Anti-Flag antibody (M2, Sigma) was used at 1:1000 in PBS 1% BSA. Secondary fluorophore-conjugated antiserum (Alexa Fluor 488) was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR) and used at 1:250 in PBS 1% BSA. In the case of treatment of Leptomycin B, the inhibitor was only added 3h post-infection. The presence of the nucleus was revealed by a conventional 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining.

In vitro Kinase Assay. 1.5 µg of bacterially produced His-wtIRF-3 was resuspended in a kinase buffer containing 0.5 µg of recombinant His-TBK1 (Upstate, Lake Placid, NY) or GST-IKKi (Cell Signaling), 20 mM Hepes, pH 7.4, 20 mM MgCl₂, 2 mM dithiothreitol and 20 µM ATP. The reactions were incubated at 30 °C for 30 min and then stored at -80C for subsequent MS analysis. *In vitro* kinase assays were also accomplished in the presence of [γ^{32} P]-ATP to verify the phosphotransferase activities of both recombinant TBK1 and IKKi.

Mass Spectrometry analysis. Phosphorylated His-wtIRF-3 was digested with aspartic acid endoprotease (AspN) at 37 °C for 4 h followed by trypsin at 37 °C for 4 h. Digests were reconstituted in 30 μ l of 0.2% formic acid in water/ACN (95/5) and analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC/MS) on a NanoAcquity UPLC system interfaced to a Q-TOF Premier (Waters, Millford, MA). The LC system consists of an in-house 300 μ m \times 5 mm C₁₈ precolumn and a 150 μ m \times 10 cm in-house C₁₈ analytical column both packed with Jupiter 3 μ m, 300 Å stationary phase (Phenomenex, Torrance, CA). Peptide elution was performed at 600 nL/min. External calibration of the instrument was made using a Glu-Fib B (Sigma) solution of 83 fmol/ μ l. Data-dependent acquisition of MS-MS Spectra was obtained for up to 3 precursor ions per survey spectrum using argon as a target gas, with collision energies ranging from 20-45 eV (laboratory frame of reference). Fragment ions formed in the RF-only quadrupole were recorded by a time-of-flight mass analyzer.

Biological assay. HeLa cells were first transfected with 0.5 μ g of the different pFlag-IRF3 constructs in 6-well plates. 24h post-transfection, cells were washed twice and infected with 200 HAU/ml of SeV in serum free media in order to stimulate interferon production. Two hours post-infection, cells were extensively washed and covered by 2 ml of fresh complete media. 20h later, supernatants were cleared by centrifugation at 3000 rpm and cells were harvested in order to be analyzed by Western Blot. The supernatants of HeLa cells overexpressing the different C-terminal IRF-3 mutants (2 ml) were then split and 500 μ l were used for pretreatment (16h) of a monolayer of confluent Vero cells seeded in a 12-well plate before further challenge with VSV at different multiplicity of infection. The effects were evaluated through VSV-induced cell lysis using a standard plaque assay procedure, where VSV infections were performed in serum free media for 1h followed by replacement with DMEM containing 1% methylcellulose. After 3 days, monolayers were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with crystal violet. The infection step with SeV was omitted for the phosphomimetic IRF-3 mutants.

Reporter Gene Assays. Subconfluent cells in 35-mm-diameter tissue culture dishes were transfected with 100 ng of pRLTK reporter (Renilla luciferase for internal control) and 250 ng of pGL3-IFN- β -LUC with use of Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as detailed by the manufacturer. Cells were harvested 24h post-transfection, lysed in passive lysis buffer (Promega, Madison, WI), and assayed for dual-luciferase activity with use of 10 μ l of lysate according to the manufacturer's instructions. All firefly luciferase values were normalized to renilla luciferase to control for transfection efficiency.

RESULTS

Role of IRF-3 phosphoacceptor sites in the establishment of an antiviral state. IRF-3 contains 7 potential phosphoacceptor sites located in the C-terminal RD (Fig. 1A). However, the precise site(s) involved in IRF-3 phosphorylation following a viral infection remain(s) to be identified. Moreover, the contribution of each phosphoacceptor site in the mechanism of IRF-3 activation is unclear. (Lin et al, 1998; McWhirter et al, 2004; Mori et al, 2004; Qin et al, 2003; Servant et al, 2003; Takahasi et al, 2003; tenOever et al, 2004; Yoneyama et al, 1998). We thus re-evaluated the physiological relevance of the different Ser/Thr clusters by studying the effect of mutations on anti-viral cytokines production. For this purpose, we took advantage of a biological assay where supernatants of HeLa cells overexpressing the different C-terminal IRF-3 mutants were collected and used to treat Vero cells before infection with VSV. The effects were evaluated through VSV-induced cell lysis using a standard plaque assay procedure. In our system, transfection of wtIRF-3 allowed enough IFN β production in the supernatant of HeLa cells to protect Vero cells against a VSV challenge. Notably, VSV titers revealed that this protection was only effective following an infection of wtIRF-3-transfected HeLa cells with SeV (Fig. 1B, compare lane 4 to lanes 1-2-3). Consequently, involvement of endogenous IRF-3 is ruled out since SeV infection of mock-transfected HeLa cells did not result in any sign of protection (Fig. 1B lanes 1 and 2). Importantly, the use of an anti-IFN β antibody in the collected supernatant completely prevented the anti-viral effect of overexpressed wtIRF-3 (Fig. 1D). It has been shown that the substitution of residues 396 to 405 with the phosphomimetic Asp generates a strong, constitutive transactivator named IRF-3 5D (Lin et al, 1999c). As expected, transfection of this mutant conferred resistance to a further VSV challenge without any need for viral infection (Fig. 1B, compare lane 5 to lanes 4 and 6).

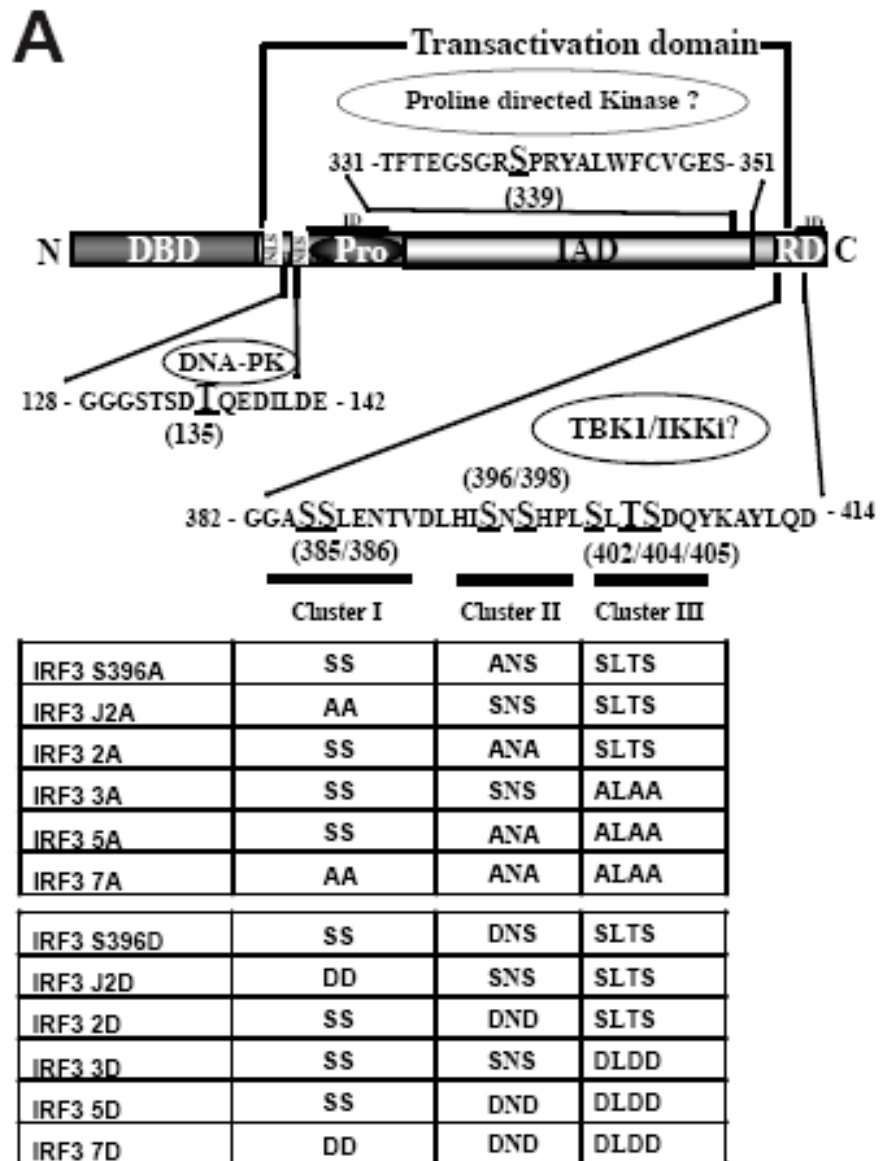


Figure 1. Analyzing IRF-3 antiviral activity by a biological assay. A) Schematic representation of the potential phosphoacceptor sites of IRF-3. C-terminal mutations in the different IRF-3 constructs used in this study are shown

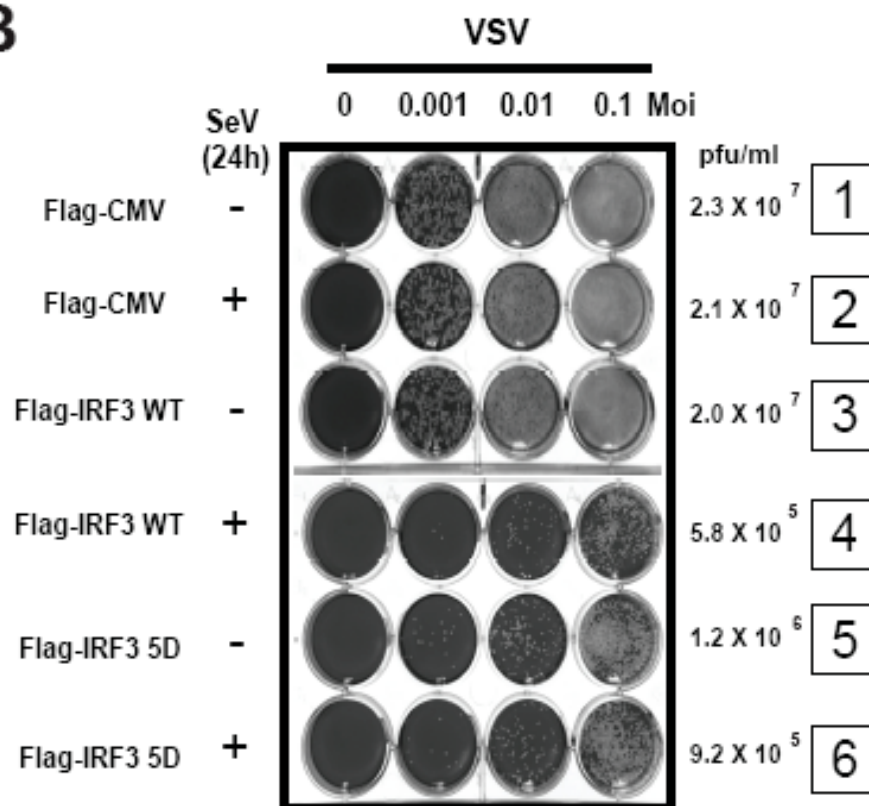
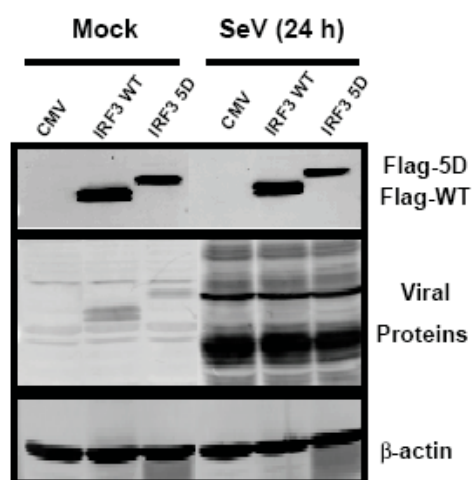
B**C**

Figure 1. Analyzing IRF-3 antiviral activity by a biological assay. B) HeLa cells in a 6-well plates were transfected with 0.5 μg of the indicated plasmid. 24 hours post-transfection, cells were left untreated or infected with SeV (200 HAU/ml; 200 HAU total) for 2 hours. Then, cells were extensively washed and covered with 2 ml of fresh media. 20 hours post-infection, supernatants containing anti-viral cytokines were collected, cleared of cellular contaminants and transferred on Vero cells plated in a 12-well plate. After 16 hours of incubation, Vero cells were washed with PBS and challenged with different multiplicity of infection (moi) of VSV (0; 0.001; 0.01 and 0.1) in serum free DMEM. After one hour, infection media was removed and replaced with DMEM containing 1% methylcellulose and FBS. The effects were evaluated through VSV-induced cell lysis using a standard plaque assay procedure. VSV titers (pfu/ml) are also shown and reflect the ability of each IRF-3 construct to confer viral resistance. C) Immunoblot analysis of Flag-IRF3 expression levels and viral proteins in HeLa cells 20 hours post-infection.

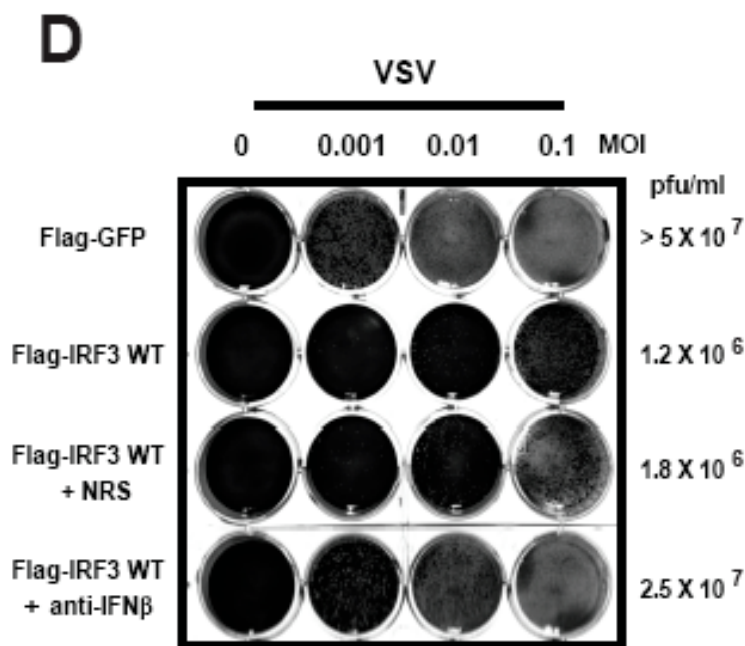


Figure 1. Analyzing IRF-3 antiviral activity by a biological assay. D) wtIRF-3 was tested in the biological assay with the exception that prior the incubation on Vero cells for 16h, clarified supernatant from HeLa cells infected with SeV were incubated with no antibodies, normal rabbit serum or neutralizing anti-IFN β antibodies for 1h at 4°C.

When different C-terminal mutants of IRF-3 were compared in this biological assay, we were able to document an important role for the 3 different clusters in the transactivating potential of the transcription factor. Indeed, while HeLa cells overexpressing wtIRF-3 conferred resistance to VSV infection up to a MOI of 0.1, cells overexpressing the IRF-3 J2A mutants were not able to raise a strong protection against VSV infection (Fig. 1E, compare lane 2 to lane 7). In fact, we observed a 2 log reduction of protection compare to the WT protein, a result similar to HeLa cells overexpressing a non-relevant protein (green fluorescent protein, GFP) or the dominant negative version of IRF-3 that lacks the DNA binding domain (Δ N-IRF3) (Fig. 1E, compare lane 2 to lanes 7, 1 and 9). This incapacity of IRF-3 J2A mutant to confer resistance to VSV demonstrates that these two serines are essential for IRF-3 activation. We also observed an intermediate protection (1 log reduction) with the IRF-3 2A, 3A and 5A mutants, suggesting that the Ser/Thr clusters II and III are necessary phosphorylation sites for the achievement of a full activation of IRF-3 (Fig. 1E, compare lane 2 to lanes 4-5-6). As expected, introduction of the S385/386A mutation into IRF-3 5A (herein name IRF-3 7A) completely abolished the intermediate protection of IRF-3 5A, restoring the phenotype observed with the IRF-3 J2A mutant (Fig. 1E, compare lane 6 to lanes 7-8). We previously proposed that Ser 396 was the minimal phosphoacceptor site required for IRF-3 activation (Servant et al, 2003). We therefore tested if this residue was involved in the anti-viral state observed in our bioassay. Surprisingly, overexpression of IRF-3 S396A conferred the same protection as the wild-type protein (Fig. 1E, lanes 2 and 3). On the other hand, the use of different phosphomimetic mutants of IRF-3 in this biological assay clearly demonstrated that IRF-3 S396D had the strongest anti-viral activity of all phosphomimetic mutants tested (Fig. 1F, lane 8). Using reporter gene assays, IRF-3 5D was previously classified as a strong constitutive gene transactivator (Lin et al, 1999c). Indeed, IRF-3 5D had anti-viral activities in our biological assay comparable to that of IRF-3 3D and IRF-3 S398D mutants, but less than IRF-3 S396D and IRF-3 2D (Fig. 1F, compare lanes 5-6-9 to lanes 3 and 8). Finally, our results also demonstrated that the integrity of Ser 385 and Ser 386 is primordial

for IRF-3 activity, as IRF-3 J2D did not behave like a phosphomimetic mutant of IRF-3 and replacement of Ser 385/386 to Asp in the IRF-3 5D backbone (generating IRF-3 7D), totally abrogated the anti-viral activity of IRF-3 5D (Fig. 1F, lane 4 and 7). Altogether, our data reconcile published data (Lin et al, 1999c; Servant et al, 2003; Yang et al, 2002) by showing that all clusters are essential for full IRF-3 transactivation activity, but at different levels of importance, raising the idea of well-ordered cluster phosphorylation kinetic. Importantly, the results obtained using our bioassay further highlight the importance of the integrity of Ser 385/386 for IRF-3 activity, while questioning the role of Ser 396 in the activation of IRF-3.

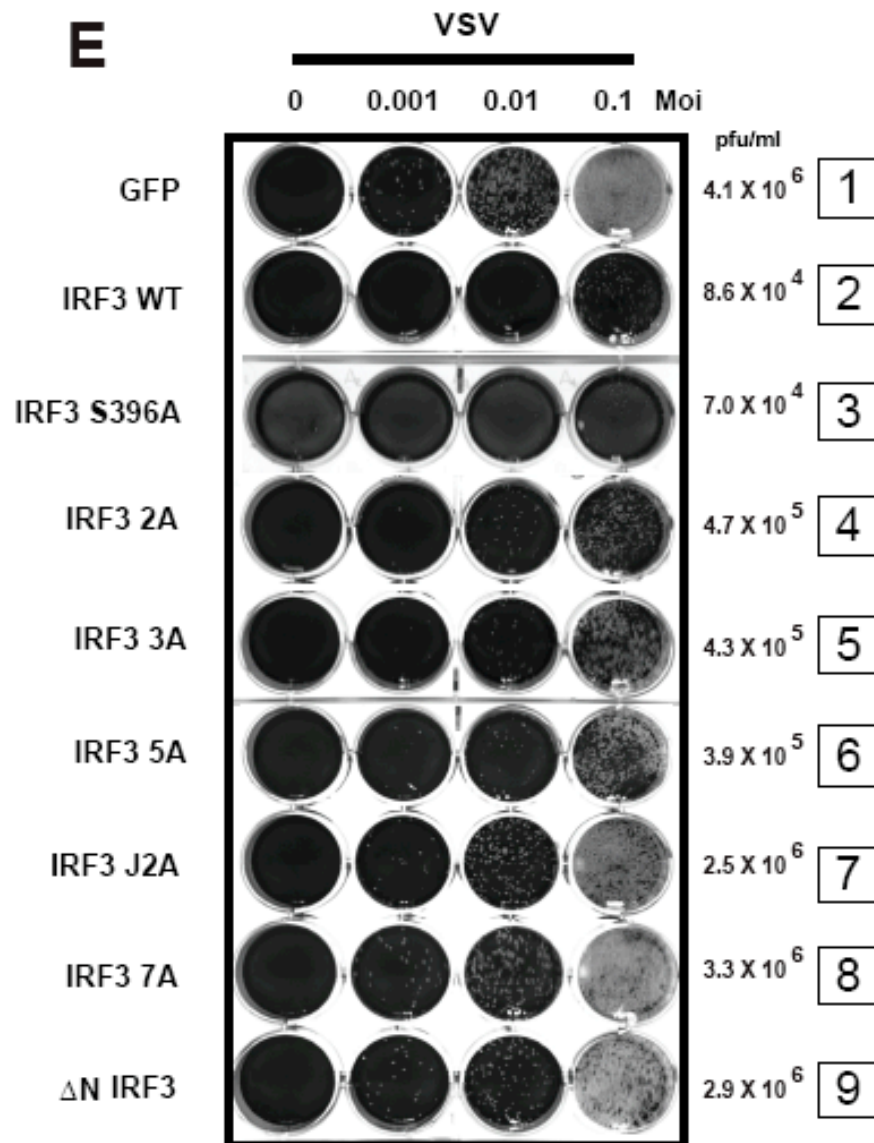


Figure 1. Analyzing IRF-3 antiviral activity by a biological assay. E) Different C-terminal mutants of IRF-3 were tested in the biological assay for their capacity to generate antiviral interferons. The transactivating ability of the different IRF-3 mutants is compared to the one offered by the transfection of a non-relevant protein (GFP). The deltaN-IRF3 construct is used as an internal control and represents the behavior of a dominant negative IRF3 in this assay. The expression of the different transgenes was verified by immunoblot analysis as described in Fig. 1C (data not shown)..

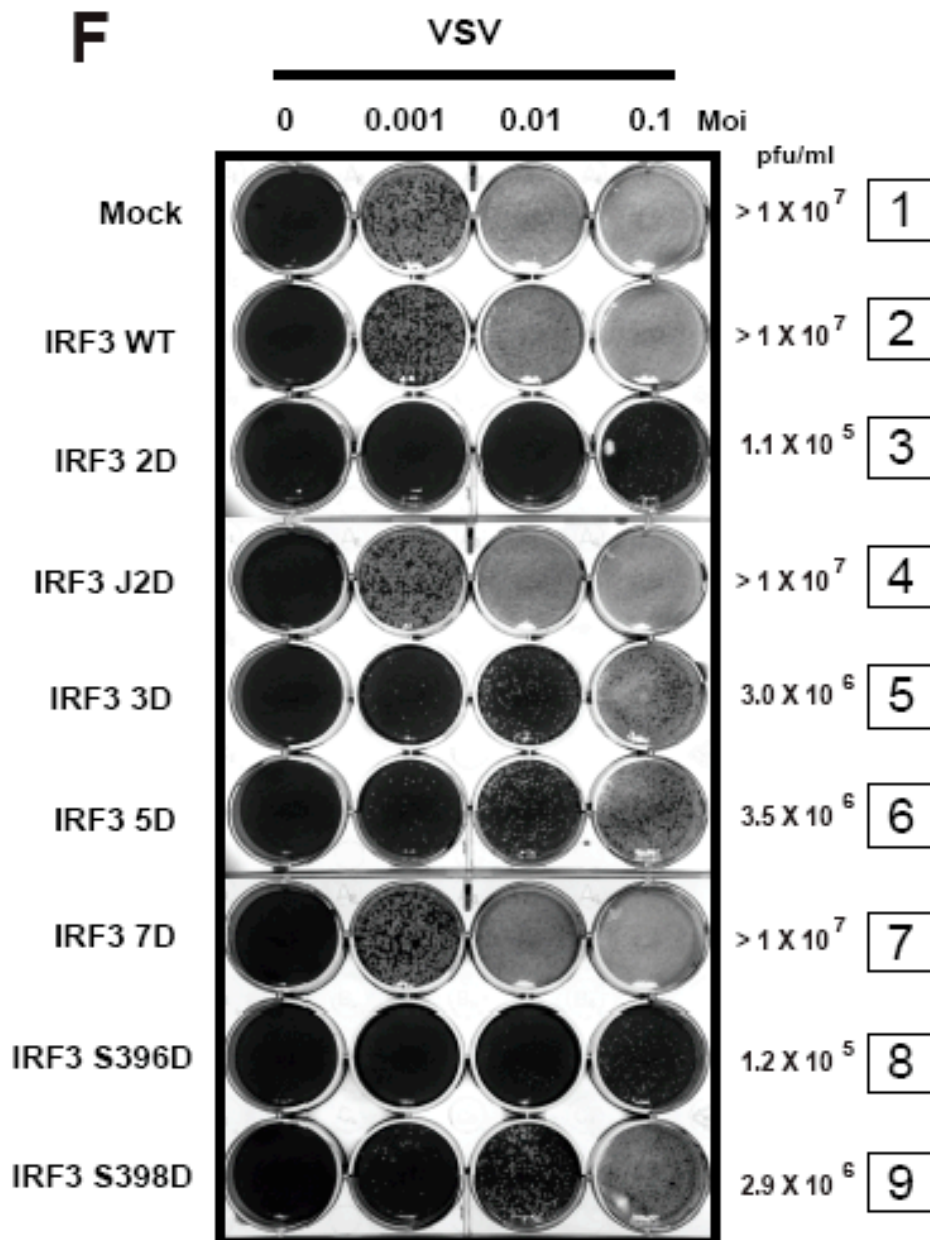


Figure 1. Analyzing IRF-3 antiviral activity by a biological assay. F) Different C-terminal phosphomimetic mutants of IRF-3 were tested in the biological assay for their capacity to generate antiviral interferon as described in B in the absence of SeV infection. The transactivating ability of the phosphomimetic mutants is compared to the one offered by the mock or IRF3 WT transfected HeLa cells. The expression of the different transgenes was verified by immunoblot analysis as described in Fig. 1C (data not shown). Data are representative of 3 independent experiments.

MS analysis of phosphorylated IRF-3 by TBK1. The different abilities of the diverse IRF-3 mutants to yield an antiviral state prompted us to readdress the role of the IKK-related kinases in the phosphorylation and activation of IRF-3. TBK1 and IKKi were recently shown to be responsible for the C-terminal phosphorylation of IRF-3 after a viral infection (Fitzgerald et al, 2003; Sharma et al, 2003), but the exact phosphoacceptor sites on IRF-3 still remain to be identified. Therefore, we performed *in vitro* kinase assays using bacterially produced full-length His-tagged wtIRF-3 in the presence of recombinant TBK1. Phosphorylated wtIRF-3 was then analyzed by MS/MS in order to identify the targeted phosphoacceptor sites. Figure 2A shows the MS/MS spectra of precursors m/z 800.8²⁺ and m/z 840.8²⁺. Both precursors correspond to IRF-3 peptide DLHISNSHPLSLTS bearing respectively one and two phosphates group at residue 402 and residues 396 and 402. For both spectra, the site of phosphorylation was assigned to the Ser 402 residue, as fragment ion m/z 389.3 harbored the characteristic loss of H₃PO₄ moiety through a β -elimination giving rise to a dehydro-alanine residue shifted by 69 Da from its adjacent y-type fragment ion at m/z 320.2. For m/z 840.8²⁺, a supplementary phosphorylation site at Ser 396 was observed, an assignment supported by the characteristic dehydro-alanine residue for b-type fragment ion at m/z 479.3. To substantiate these results, the phosphorylation of recombinant His-IRF-3 was also analyzed using a phosphospecific antibody against Ser 396 (Servant et al, 2003). A significant phospho-serine 396 signal was detected when IRF-3 was incubated with TBK1 (Fig. 2B). Phosphorylation of Ser 402 was also observed when IKKi was used in the kinase assay (data not shown). Combined with the results obtained from the bioassay (Fig. 1), our data support the idea that clusters II and III are the first sites targeted by the IKK-related kinases, which, once phosphorylated, are likely to prime the targeting of Ser 385 and Ser 386 located in cluster I. These results suggest that sequential phosphorylation of the three clusters is necessary to elicit complete unfolding and full activation of IRF-3.

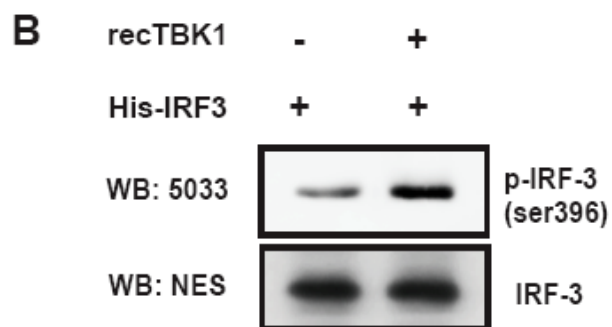
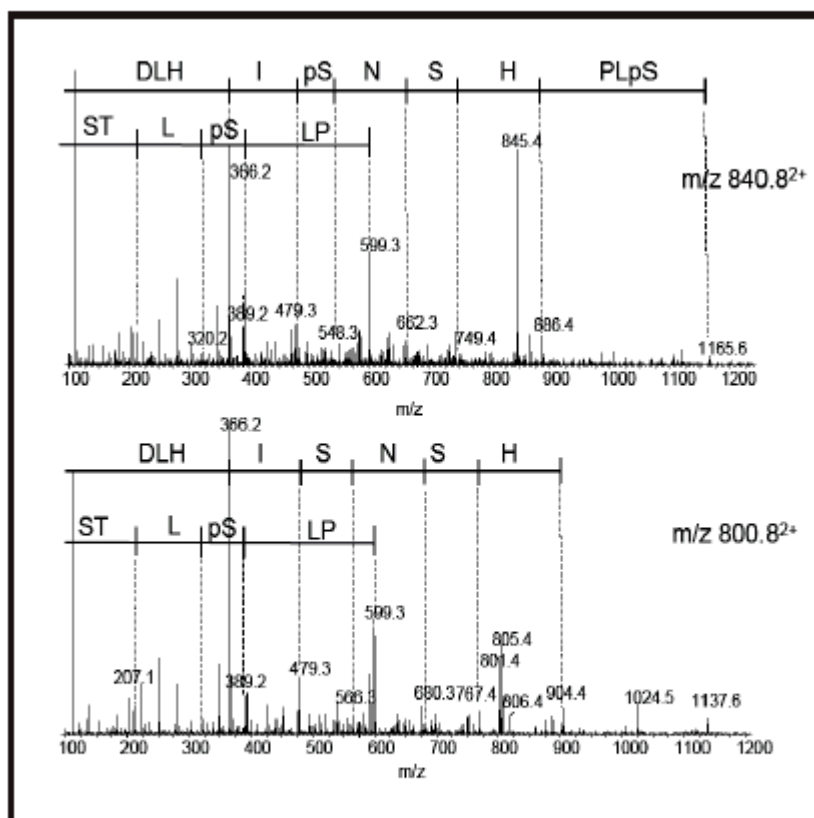
A

Figure 2. TBK1 directly phosphorylates cluster II and III of IRF-3 *in vitro*. A) *In vitro* kinase assay using cold ATP, recombinant TBK1, and His-IRF3 full length as substrate, was analyzed by LC-MS-MS for characterization of potential phosphoacceptor sites on IRF-3. MS/MS spectra of precursors at m/z 800.8²⁺ and 840.8²⁺ confirming the protein identification and the sites of phosphorylation. B) Western blot analysis of the *in vitro* kinase assay using an affinity-purified pS396 antibody.

The use of IRF-3 S396A reveals a lack of correlation between IRF-3 transcriptional activity and other conventional assays. Our bioassay demonstrated that the IRF-3 S396A mutant was transcriptionally active (Fig. 1). However, our previous work showed that this mutation abolishes virus-induced IRF-3-CBP association (Servant et al, 2003), suggesting that this assay of IRF-3 activation may not reflect transcriptional potential. Thus, we have decided to test the activation of all IRF-3 mutants using conventional biochemical assays: *i.e.*, hyperphosphorylation (retarded mobility in SDS-PAGE), dimerization, association to CBP, and nuclear accumulation). We first verified the capacity of the different IRF-3 mutants to associate with the CBP coactivator, as this step is essential for the DNA binding activity and the nuclear accumulation of IRF-3 (Kumar et al, 2000a; Suhara et al, 2002). Mutations in cluster I (J2A) and II (S396A and 2A) completely abolished CBP association in SeV-infected HeLa cells, whereas mutation of cluster III (IRF3 3A) had no effect (Fig. 3A), as previously observed (Lin et al, 1998; Servant et al, 2003). The same observation was made in HeLa cells overexpressing TBK1 (data not shown). We next verified the dimerization state of the different IRF-3 mutants using a Native-PAGE assay (Iwamura et al, 2001). As for CBP association, our data demonstrate that the dimerization of IRF-3 was restricted to wtIRF-3 and IRF-3 3A mutants. Notably, mutants lacking Ser 385/Ser 386 (J2A) or Ser 396 (2A, 5A, 7A and S396A) phosphorylation did not show any sign of inducible dimerization following virus infection (Fig. 3B). Similar results were observed in cells overexpressing TBK1 or IKKi (data not shown). Importantly, titration experiments demonstrated that overexpression of IRF-3 S396A to 6 times the level of wtIRF-3 did not rescue the observed phenotype (data not shown). Interestingly, using the phosphomimetic mutants, we observed that IRF-3 2D and S396D, the two most powerful phosphomimetic

transactivators (Fig. 1E), are not in a complete state of dimerization compared to IRF-3 5D (Fig. 3C).

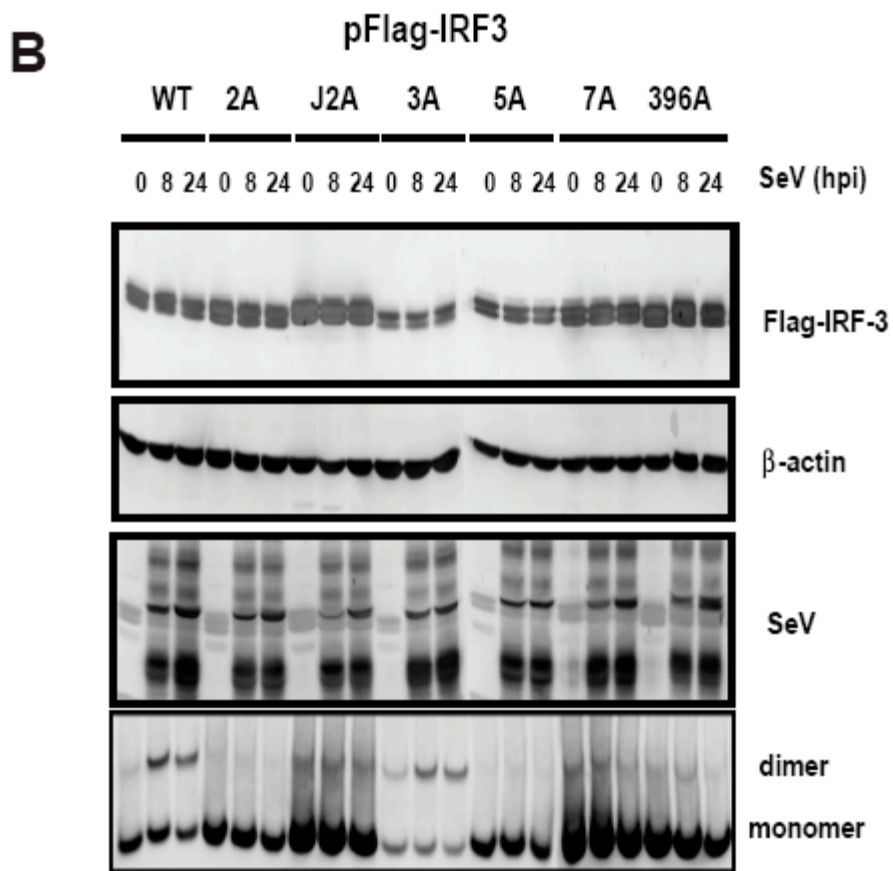
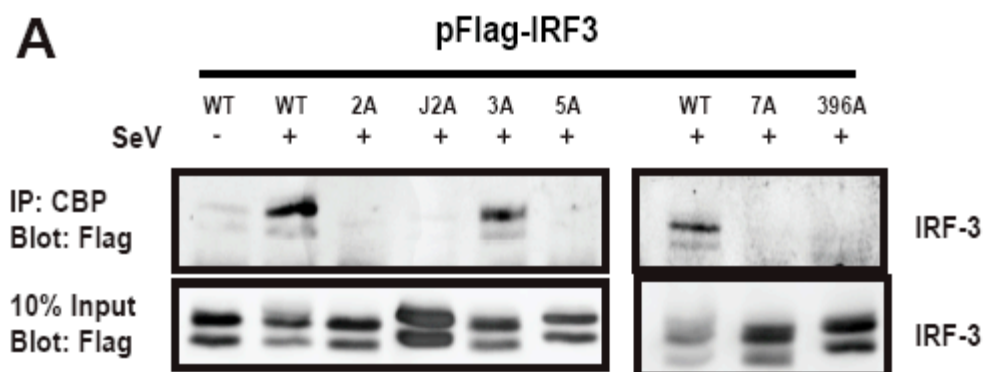


Figure 3. Conventional assays of activation do not correlate with IRF-3 S396A activity. A) Co-immunoprecipitation experiments of Flag-IRF3 with CBP following SeV infection in HeLa cells (8h, 200 HAU/ml, 200 HAU total). B) SDS-PAGE and Native-PAGE electrophoresis analysis of the different Flag-IRF3 constructs following SeV infection (8h, 200 HAU/ml, 200 HAU total). Blots were probed with anti-Flag antibody to correlate the cellular expression of IRF-3 mutants (SDS-PAGE) with their dimerization state (Native).

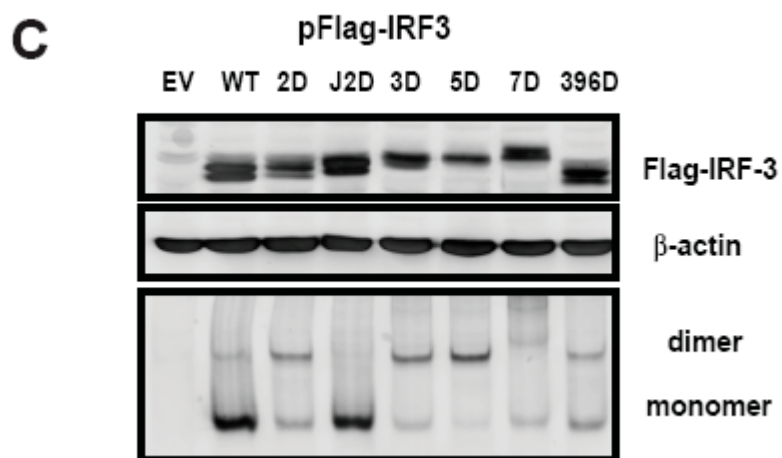


Figure 3. Conventional assays of activation do not correlate with IRF-3 S396A activity. C) HeLa cells were transfected with the different IRF-3 phosphomimetic mutants for 40h. SDS-PAGE and Native-PAGE were then performed as described in B).

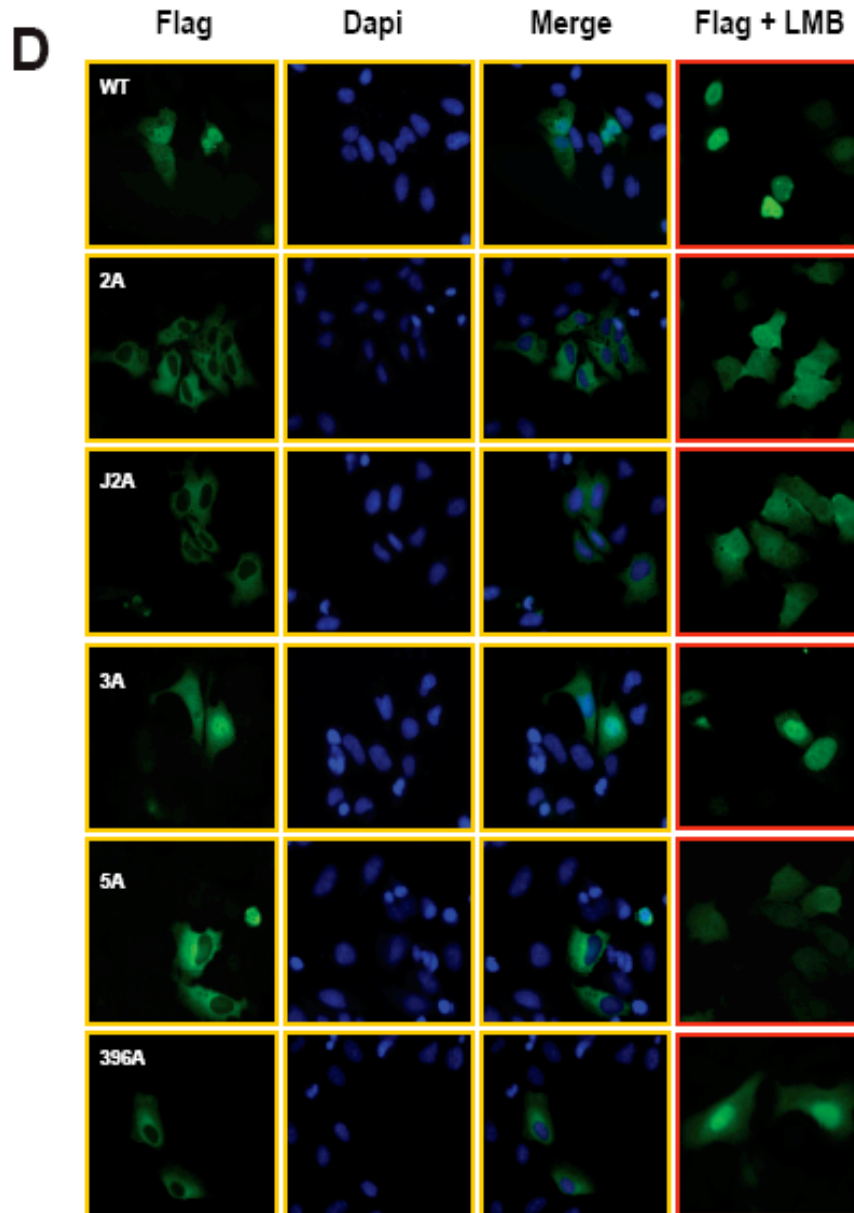


Figure 3. Conventional assays of activation do not correlate with IRF-3 S396A activity. D) Cellular localization of the different Flag-IRF3 mutants following SeV infection. Immunofluorescence analyses were performed using an anti-Flag antibody. Cellular localization of the different Flag-IRF3 mutants following SeV infection (8h, 200HAU/ml, 200 HAU total) in presence of Leptomycin B (100 ng/ml) is also shown.

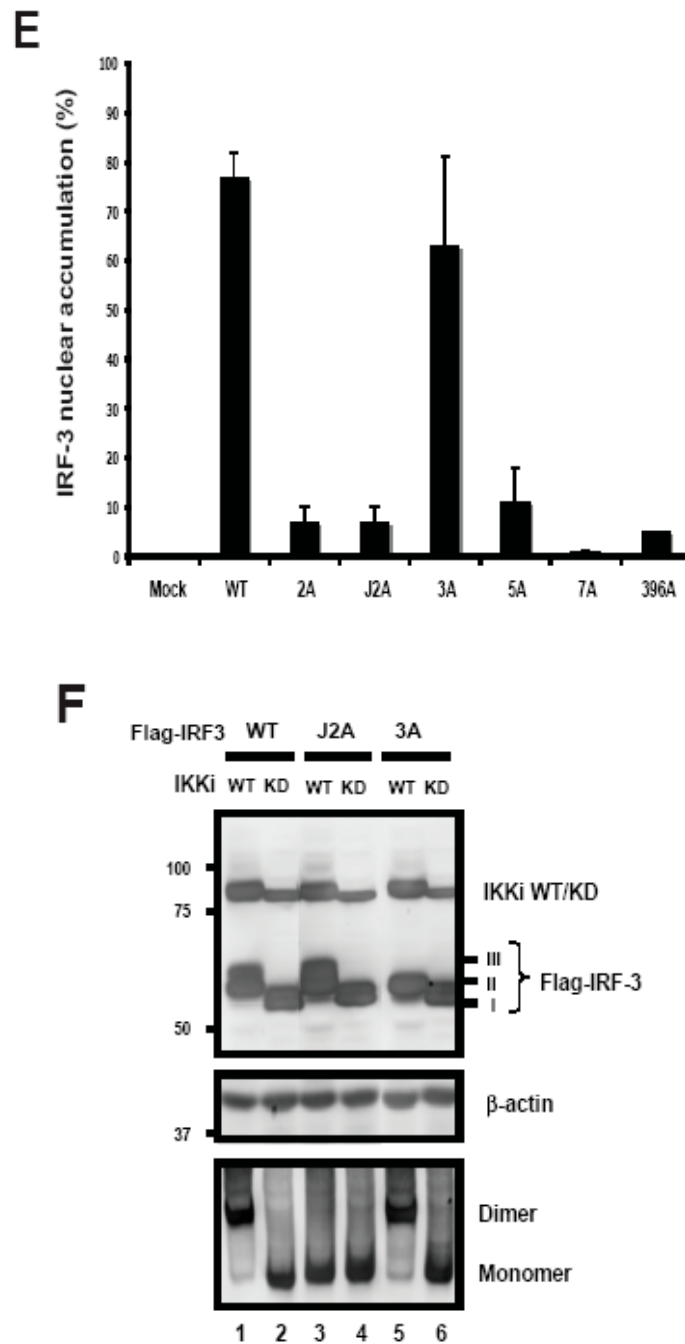


Figure 3. Conventional assays of activation do not correlate with IRF-3 S396A activity. E) Quantification of the nuclear accumulation observed in D). Results are expressed as mean \pm standard error (SE) of the nuclear accumulation percentage of IRF-3. Data represents 3 independent experiments where 100 cells were randomly counted by epifluorescence microscopy. Only cells having more than 50% of the total IRF-3 localized in the nucleus were considered for the nuclear accumulation phenotype. F) Hyperphosphorylation profile of Flag-wtIRF3, J2A and 3A. Flag-IRF3 constructs were co-transfected with Flag-IKKi (KD or WT) in HEK 293T cells. 40h post-transfection, cells were lysed and hyperphosphorylated forms of IRF-3 (I, II and

III) were resolved by SDS-gel electrophoresis on 7.5% acrylamide gel. The membrane was probed with anti-Flag antibody. Native-PAGE was also performed to correlate the dimerization state of the different IRF-3 mutants with their hyperphosphorylation profile.

Nuclear accumulation is another assay frequently used to monitor the activation of IRF-3. Consistent with CBP association and the dimerization state observed by Native-PAGE assay, wtIRF-3 and the IRF-3 3A mutant were the only proteins able to accumulate in the nuclear compartment following virus infection (Fig. 3D and 3E). Accordingly, mutation of Ser 396 to Ala abrogated this accumulation, correlating with its failure to associate with CBP coactivator. Using another model, IRF-3 was reported to accumulate rapidly and transiently in the nucleus (Spiegel et al, 2005) but immunofluorescence analysis of cells infected for 4 hours demonstrated no nuclear accumulation of IRF-3 S396A (data not shown). Importantly, addition of leptomycin B, a selective inhibitor of the CRM-1 dependent export pathway, rescued nuclear accumulation of the mutants containing mutation of Ser 396 to Ala and also the J2A mutant (Fig. 3D). This confirms that the nuclear import pathway and IRF-3 C-terminal phosphorylation are two independent mechanisms and that nuclear accumulation of IRF-3 observed in epifluorescence is dependent upon CBP binding, as previously proposed (Kumar et al, 2000a). Thus, the IRF-3 3A mutant behaves essentially like wtIRF-3 in CBP association, dimerization, and nuclear accumulation assays. However, IRF-3 3A is comparable to IRF-3 2A and 5A (mutants that failed to associate with CBP, dimerize or accumulate into the nucleus) in its ability to build a moderate antiviral state (Fig. 1D). Another commonly used assay to follow IRF-3 activation is the appearance of hyperphosphorylated forms in SDS-PAGE after viral infection. Easily observable on endogenous IRF-3, these hyperphosphorylated forms of IRF-3 are harder to detect with the ectopic protein (Lin et al, 1998). However, when IKKi is co-expressed with IRF-3 in 293T cells, hyperphosphorylation becomes apparent. As shown in Figure 3F, a hyperphosphorylated form of IRF-3, denoted as form III, was totally lost in the IRF-3 3A mutant under conditions where dimerization is still

observed. The IRF-3 J2A mutant, which represents a transcriptionally inactive IRF-3 protein, is however hyperphosphorylated without any sign of dimerization. Altogether, these data demonstrate that the three Ser/Thr clusters are all important for full activation of IRF-3 but the conventional biochemical assays mentioned above are not sensitive enough to monitor minimal IRF-3 activation and are likely to reveal principally the only forms of IRF-3 that are hyperactive.

Phosphorylation of Ser 339 regulates IRF-3 dimerization, coactivator association and degradation. The hyperactive mutant IRF-3 5D strongly associates with the CBP coactivator (Lin et al, 1999c) and is mostly expressed as a dimeric form (see Fig. 3C). Moreover, we recently demonstrated that this phosphomimetic mutant is highly unstable in transfected cells (Bibeau-Poirier et al, 2006). Interestingly, the Prolyl Isomerase Pin1 was recently shown to bind and promote IRF-3 degradation following virus infection or poly I:C stimulation (Saitoh et al, 2006). This interaction is dependent upon phosphorylation of Ser 339 by a putative “proline-directed” kinase. Since our data demonstrate that the CBP-associated and the dimerized form of IRF-3 likely represents an unstable hyperactive version of the transcription factor (see Fig. 3), we hypothesized that Ser 339 phosphorylation may be involved in the capacity of IRF-3 to homodimerize and associate with CBP. First, we verified whether Ser 339 was involved in the instability of overexpressed IRF-3 5D using cycloheximide-chase experiments. As predicted (Bibeau-Poirier et al, 2006), IRF-3 5D was unstable compared to wtIRF-3 (Fig. 4A). Importantly, this instability was significantly rescued by substitution of Ser 339 to Ala in IRF-3 5D (IRF-3 5D S339A) (Fig. 4B). The role of Ser 339 in IRF-3 stability was also evaluated upon virus infection. The monomeric form of IRF-3 S339A was highly stable over the entire studied kinetic (Fig. 4C, right panel). Importantly, the stabilization of IRF-3 S339A correlated with its incapacity to homodimerize or associate with CBP following viral infection, a profile also shared by the S396A mutant (Fig. 4C and D). Introduction of this specific mutation in IRF-3 3A, the only mutant that is still able to homodimerize upon

infection (see Fig. 3), also abolished its capacity to dimerize (Fig. 4E). Similar observations were made when S339A mutation was introduced in the phosphomimetic mutants 2D, 3D, 5D, and S396D (Fig. 4F). Thus, the residue Ser 339 is also involved in the capacity of IRF-3 to homodimerize and associate with the CBP coactivator following its activation. Moreover, Ser 339 serves as a molecular link between the hyperactive dimeric and CBP-associated forms of IRF-3 and its degradation.

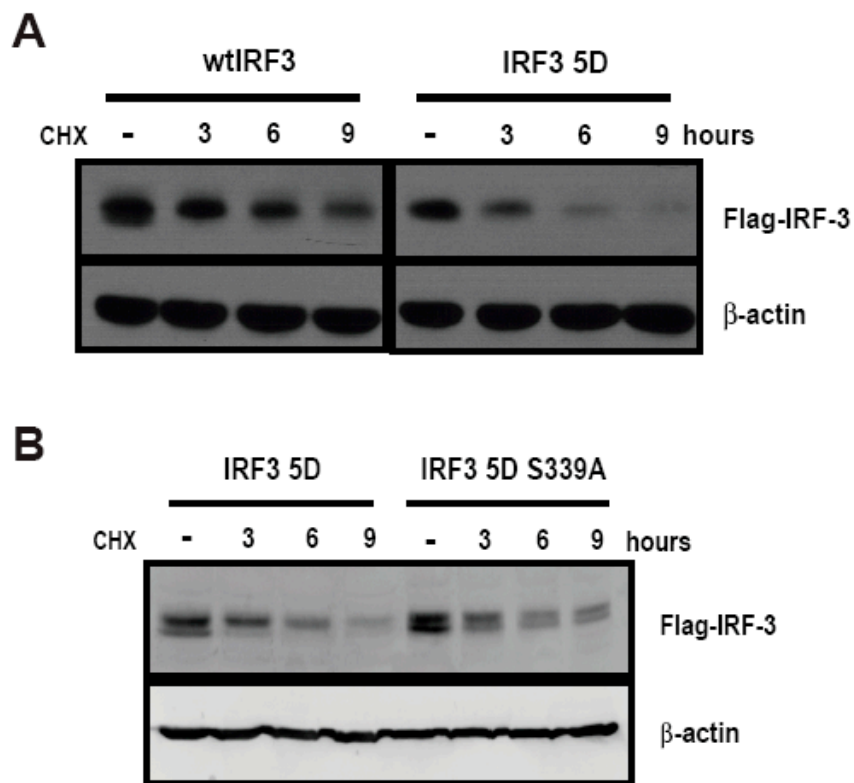


Figure 4. Mutation of IRF-3 at Ser 339 affects its dimerization and CBP association state. A-B) HeLa cells were transfected with Flag-wtIRF3, 5D or 5D S339A for 24h and then treated with CHX for the indicated time. IRF-3 expression was analyzed by immunoblot analysis using anti-Flag antibody.

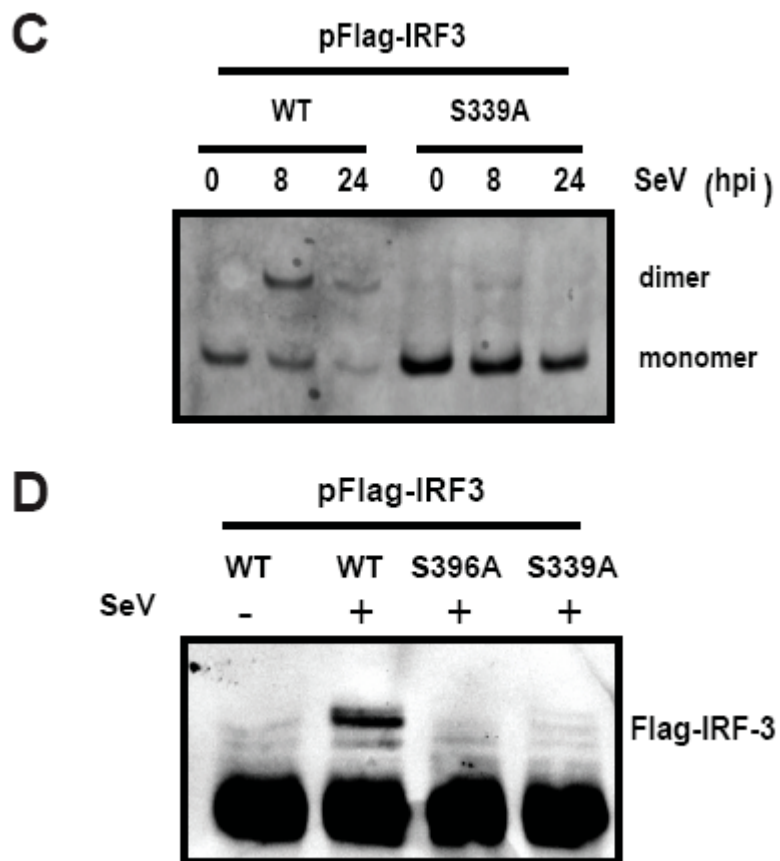


Figure 4. Mutation of IRF-3 at Ser 339 affects its dimerization and CBP association state.. C) Flag-wtIRF3 and S339A were transfected in HeLa cells and then infected with SeV (8h or 24h, 200 HAU/ml, 200 HAU total) 24 hours post-transfection. Dimerization state was analyzed by Native- PAGE. D) Flag-wtIRF3, S339A and S396A were transfected in HeLa cells for 24h and then left untreated or infected with SeV (8h). Co-immunoprecipitation with CBP was then monitored. E-F) The S339A mutation was introduced in the different IRF-3 C-terminal alanine mutants

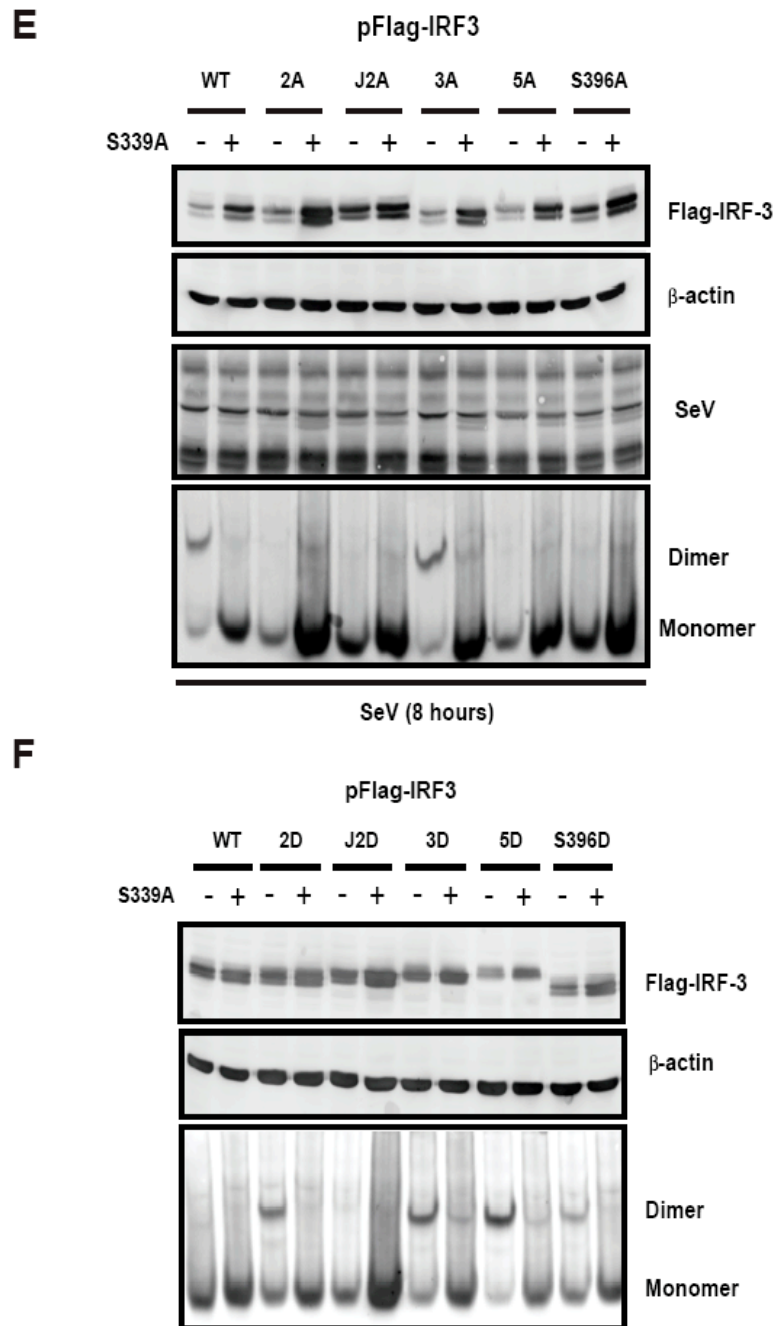


Figure 4. Mutation of IRF-3 at Ser 339 affects its dimerization and CBP association state. E-F) The S339A mutation was introduced in the different IRF-3 C-terminal alanine mutants (E) or aspartic mutants (F). Cells were transfected and then infected with SeV for 8h (E) or left untreated (F). Cellular expression and

dimerization state of the IRF-3 mutants were then analyzed by SDS-PAGE and Native PAGE respectively followed by Western blot analysis

Role of Ser 339 in the transactivation activity of IRF-3. Since Ser 339 contributes to the ability of IRF-3 to homodimerize and associate with CBP, it could potentially regulate its transcriptional activity. However, our data suggest that these assays are not directly linked to the transcriptional status of IRF-3 (Fig. 3). Notably, the ability of IRF-3 S339A to establish an antiviral state in our biological assay was as efficient as wtIRF-3 and IRF-3 S396A (Fig. 5A, compare lanes 2, 3 and 5). On the other hand, we observed that a combination of S339A mutation with S396A results in a transcriptionally inactive IRF-3 molecule behaving like the IRF-3 J2A mutant (Fig. 5A, compare lanes 4 and 6). The same result was obtained for every IRF-3 mutant where Ser 396 was mutated to Ala. Notably, IRF-3 2A and 5A are no longer able to confer an intermediate resistance to VSV infection while IRF-3 3A is not affected by the presence of the mutation. (Fig. 5B, lanes 3-4, 7-8 and 5-6). In MEFs, ISG56 induction is totally dependent on the presence of IRF-3 (Fig. 5C). Therefore, we performed complementation experiments in MEFs IRF-3 $-/-$ in order to evaluate the ability of the different IRF-3 mutants to promote murine ISG56 expression. In the absence of viral infection, overexpression of wtIRF-3 was previously shown to activate the antiviral state in 2FTGH cells and rat embryonic fibroblasts (Juang et al, 1998). Indeed, we observed the induction of ISG56 and also ISG54 in MEFs IRF-3 $-/-$ complemented with wtIRF-3 in the absence of viral infection (Fig. 5D, lane 3). In line with the results from the biological assay, mISG56 induction is compromised only when Ser396 and Ser339 are both mutated to Ala (Fig 5D, compare lane 4 to lane 10). As verified by the loss of the dimers and the phospho386 signal (data not shown), introduction of the S339A mutation in IRF-3 3A totally abolished its dimerization state, but did not blunt the induction of mISG56 as well as mISG54 (Fig. 5E, lanes 6-7) whereas mutation of Ser 339 to Ala in mutants 2A and 5A dramatically reduced the induction of mISG56 and mISG54 following virus infection (Fig. 5E, compare lanes 5 and 9 to lanes 3 and 7). When introduced in IRF-3 5D, S339A did not modify the induction of mISG56 and mISG54. However, it totally prevented its

phosphorylation on Ser 386 and therefore its dimerization (Fig. 5 F-G). This observation was further substantiated using a reporter gene assay where IRF-3 5D S339A was as potent as IRF-3 5D in transactivating the IFN β promoter under conditions where almost no dimerization or CBP association were detected (Fig. 5H and I). Thus coactivator association and dimerization assays do not precisely reflect the transcriptional potential of IRF-3.

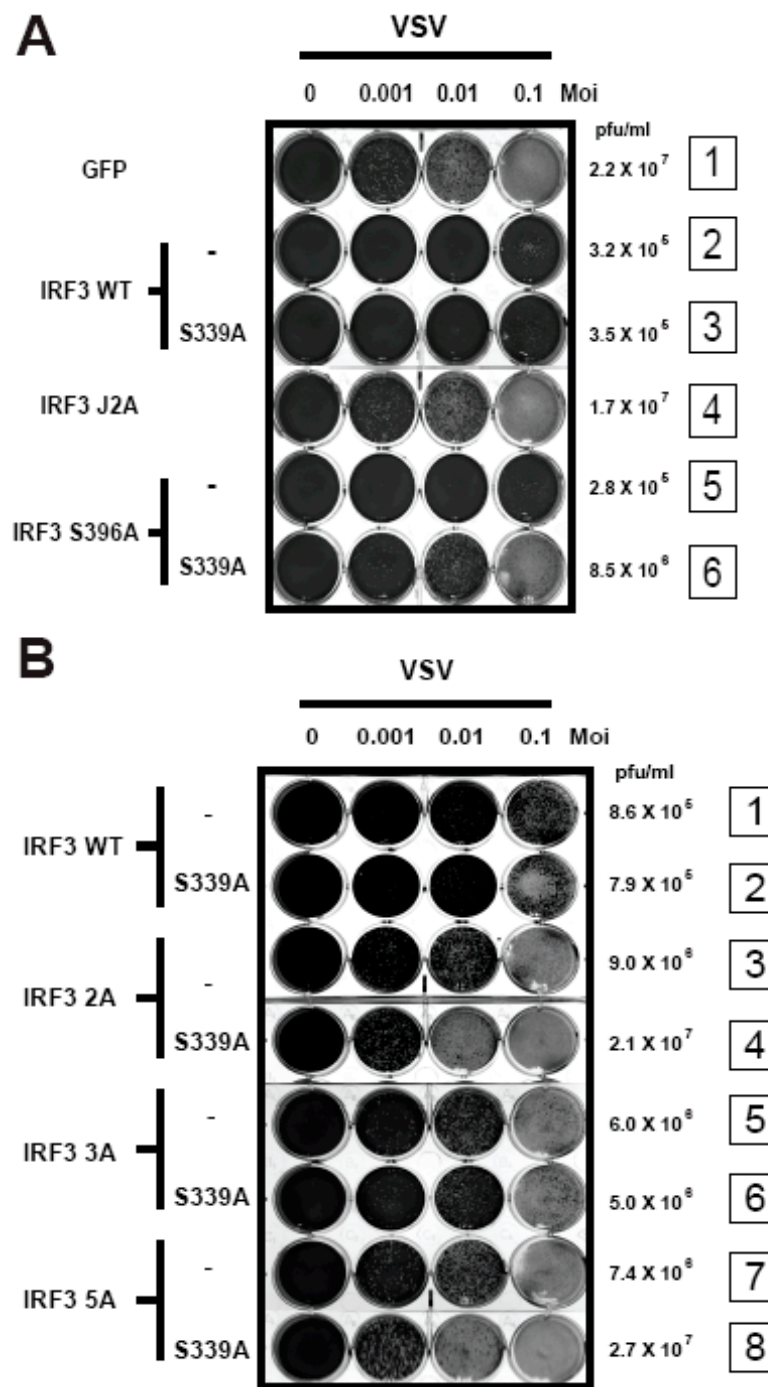
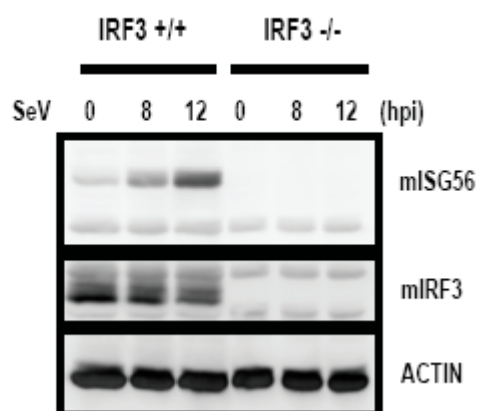
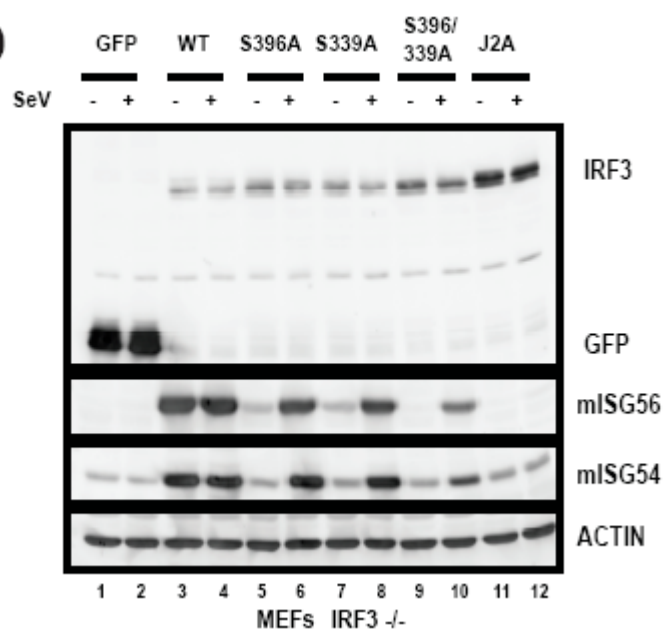


Figure 5. Mutual compensation of Ser 339 and Ser 396 in the transactivation process of IRF-3. A-B) The different C-terminal IRF-3 mutants harboring S339A mutation were tested in the biological assay for their capacity to produce antiviral interferons as described in Fig. 1E. The transactivating ability of the different IRF-3 mutants is compared to the one offered by the transfection of a non-relevant protein (GFP). VSV titers (pfu/ml) are also shown.

C**D**

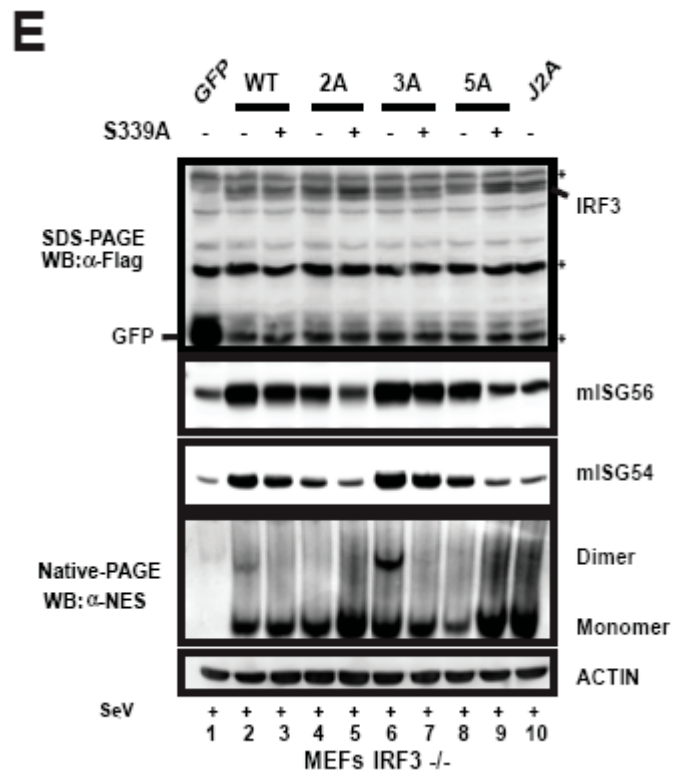


Figure 5. Mutual compensation of Ser 339 and Ser 396 in the transactivation process of IRF-3. C) mISG56 induction profile in MEFs IRF-3^{-/-} following viral infection. D-E) Complementation experiment in MEFs IRF3^{-/-} with the different C-terminal mutant of IRF-3 in order to determine their ability to induce mISG56 and mISG54. Indicated IRF-3 constructs were transfected in MEFs IRF3^{-/-} cells. 24h post-transfection, cells were infected with SeV as indicated. Cellular expression of indicated proteins was analyzed by SDS-PAGE as well as Native-PAGE followed by Western blot analysis. Asterisks denote nonspecific signal.

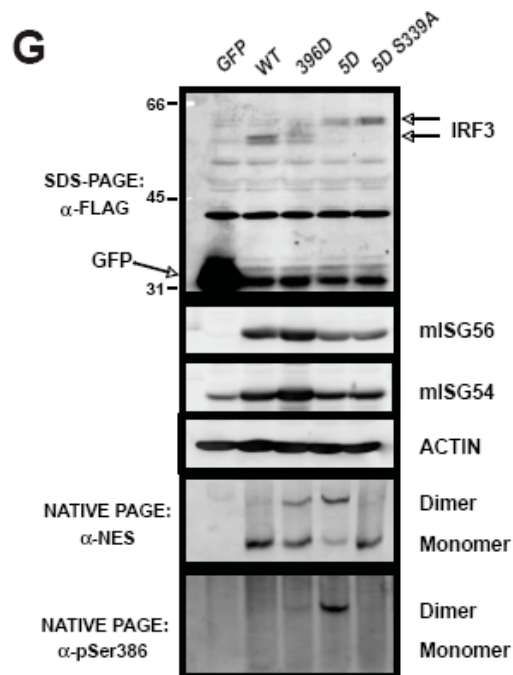
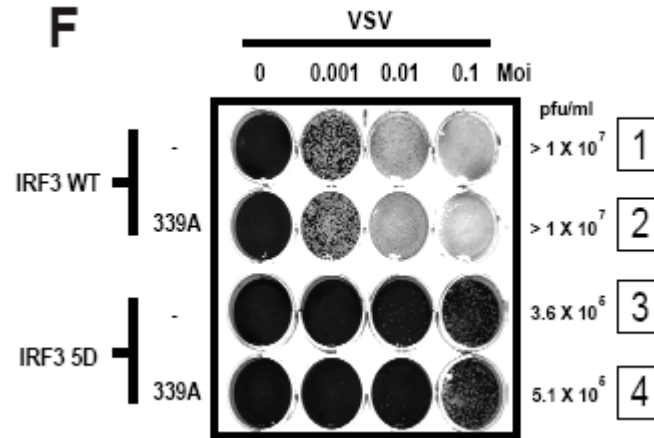


Figure 5. Mutual compensation of Ser 339 and Ser 396 in the transactivation process of IRF-3. F) IRF-3 5D and 5D S339A were tested in the biological assay as described in Fig. 1F. The transactivating ability of the phosphomimetic mutants is compared to the one offered by HeLa cells transfected with wtIRF3. G) Complementation experiment in MEFs IRF3 ^{-/-} with the different IRF-3 phosphomimetic mutants. Uninfected cells were treated as in Figs. 5D.

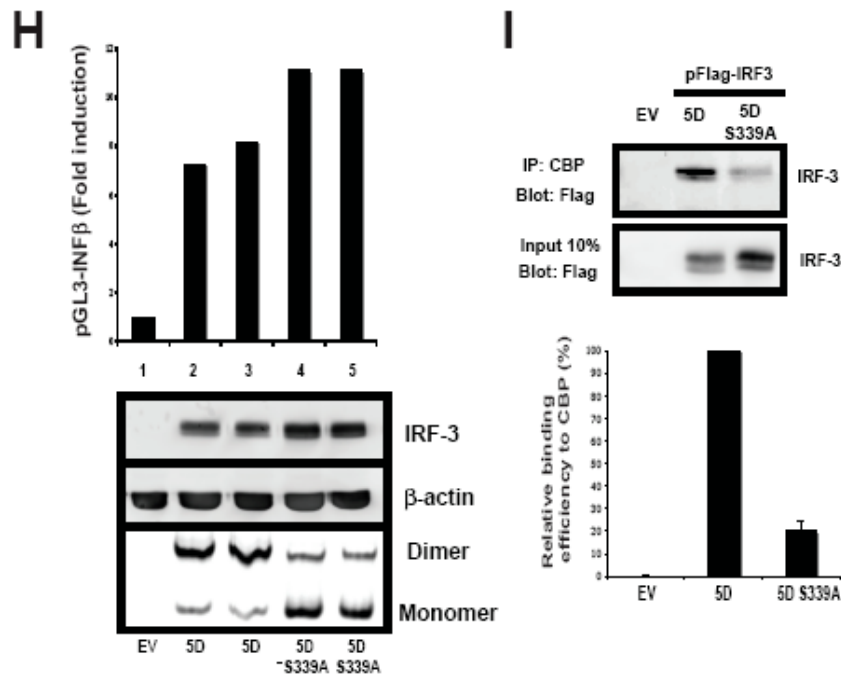


Figure 5. Mutual compensation of Ser 339 and Ser 396 in the transactivation process of IRF-3. H) HeLa cells were transiently co-transfected with luciferase reporter constructs containing the IFNB promoter and IRF-3 5D or 5DS339A as indicated below the bar graphs. At 36 h post-transfection, the luciferase activity was measured as described in Materials and Methods. The relative luciferase activity was measured as fold activation over the transfection of pFlag-CMV2 alone (EV). Each value represents the mean \pm S.E. of triplicate determinations. The data are representative of at least four different experiments with similar results. Cellular extracts were also analyzed by SDS-PAGE and Native-PAGE in order to correlate the dimerization state of the mutants and their transactivating abilities. I) pFlag-CMV2 (EV), Flag-IRF3 5D and 5D S339A were transfected in HeLa cells. 40h post-transfection, cells were lysed and IRF-3 co-immunoprecipitation with CBP was monitored as described in Fig. 3. Quantification of co-immunoprecipitated IRF-3 was done with a gel documentation device (Typhoon scanner, GE Healthcare). Percent standard errors (SE) are given based on the average of three independent experiments.

DISCUSSION

Phosphorylation mechanisms are often the rate-limiting step involved in controlling enzymatic activities, protein-protein interactions, as well as other post-translational

modifications such as acetylation and ubiquitination. Thus, several transcription factors are kept inactive in resting cells and rapidly become activated following their phosphorylation on specific subsets of phosphoacceptor sites. In resting cells, IRF-3 is already expressed as a phosphoprotein with phosphorylation largely occurring in the N-terminal region ((Servant et al, 2001a) and JF Clement and MJ Servant, Unpublished results)). Upon virus infection, at least 9 phosphoacceptor sites (8 located in its C terminus) have been suggested to participate in the regulation of its transcriptional activity (Karpova et al, 2002; Lin et al, 1998; Mori et al, 2004; Saitoh et al, 2006; Servant et al, 2003; Yoneyama et al, 1998), a complex situation that could partly explain the difficulties and discrepancies encountered in the literature about the role of the different phosphoacceptor sites of IRF-3. Our mass spectrometry analysis of TBK1-phosphorylated full-length IRF-3 clearly documents the phosphorylation of at least 2 of these sites: residues 396 and 402, located in clusters II and III, respectively. For IKKi, only Ser 402 phosphorylation was observed (data not shown). This is the first study directly implicating the phosphorylation of Ser 396 by TBK1. Using an *in vitro* phosphorylation assay, TenOever et al. concluded that Ser 402 was phosphorylated in IRF-3 (tenOever et al, 2002). We suspect that they did not identify Ser 396 as a targeted residue because of the use of a C-terminal fragment of IRF-3 as a substrate (381-427), which does not represent the native protein. On the other hand, a recent study demonstrated that residue 404 or 405 is directly targeted by recombinant TBK1 (Panne et al, 2007b). However, residual phosphorylation was detected in the latter C-terminal construct of IRF-3 when these two residues were mutated to alanine. Phosphorylation of these residues by TBK1 is intriguing since the crystal structure of latent IRF-3 has revealed that they are buried in a hydrophobic environment, a position not favorable for a nucleophilic attack of the gamma phosphate of the ATP. Thus, one model that could reconcile these discrepancies is an orderly phosphorylation mechanism where IRF-3 is first phosphorylated on residues 396 and 402 by TBK1 followed by phosphorylation of Ser 404 or Ser 405, which would then prime the phosphorylation of Ser 385/Ser 386 (see Fig. 6B and (Panne et al, 2007b)). This model can also be appreciated *in vivo* following overexpression of IKKi and IRF-3 J2A where the generation of

hyperphosphorylated forms of IRF-3 J2A was observed without any sign of dimerization (Fig. 3F, lanes 3 and 4). On the other hand, cluster III is likely responsible for the generation of the hyperphosphorylated forms of IRF-3 (Fig. 3F, lanes 5.6). Thus, clusters II and III can obviously be phosphorylated first, a covalent modification that would favor the phosphorylation of cluster I at Ser 386, which is essential for IRF-3 dimerization and activation.

Several biochemical assays have been used in order to monitor IRF-3 activation. Higher migrating forms of IRF-3 on SDS-gels, which correlate with its C-terminal phosphorylation (Lin et al, 1998; Servant et al, 2003; Servant et al, 2001a), association to coactivators CBP and p300, as well as EMSA analysis were among the first proposed assays because they correlated with nuclear accumulation of IRF-3 and gene transactivation. The ability of IRF-3 to homodimerize following its phosphorylation was then introduced as another read out of activation, followed by the use of phosphospecific antibodies to monitor IRF-3 phosphorylation by immunoblot analysis (Iwamura et al, 2001; Mori et al, 2004; Servant et al, 2003). However, recent reports in the literature have challenged the validity of these biochemical assays. Notably, in response to UV-treated SeV or low m.o.i., Collins and coworkers failed to observe hyperphosphorylation, nuclear localization, or subsequent degradation of IRF-3, yet readily observed induction of the IRF-3 responsive gene *ISG56* (Collins et al, 2004). Another study also reported early nuclear accumulation of IRF-3 without any sign of hyperphosphorylation, homodimerization, or CBP association (Spiegel et al, 2005). The discrepancy of the different assays to measure IRF-3 activation was also observed in cells infected with NS1 mutants of the Influenza B virus where nuclear accumulation of IRF-3 occurred in the absence of measurable CBP association (Dauber et al, 2006).

Using a comprehensive combination of different IRF-3 mutants, our study clearly demonstrates that the conventional assays are not sensitive enough to detect the small fraction of IRF-3 needed to elicit a biological response (see Fig. 6A). Notably, the IRF-3 S396A and S339A mutants are active in our bioassay (Figs. 1 and 5), despite the fact that they are greatly impaired in their capacity to dimerize, associate with CBP, and accumulate into the nucleus following virus infection (Fig. 3 to 5 and data not shown). Intriguingly, a lack of sensitivity of the methods used to follow IRF-3 activation was previously shown by Mori et al. where overexpression of IRF-3 S396D in 293T cells did not result in either dimerization nor phosphorylation of Ser 386 (Mori et al, 2004) despite its strong transcriptional activity (this study and (Servant et al, 2003)). Using complementation assays in MEFs IRF-3 ^{-/-} cells, we further demonstrate that overexpression of S396D resulted in strong induction of both ISG56 and ISG54 under conditions where the phospho386 signal is almost absent (Fig. 5G). We therefore propose that the hyperphosphorylation, homodimerization, CBP association and nuclear accumulation observed following virus infection are only measurable when IRF-3 is hyperactivated, a condition that leads to its degradation (Bibeau-Poirier et al, 2006).

We and others have demonstrated that the hyperphosphorylated/dimerized forms of IRF-3 are unstable in infected cells (Bibeau-Poirier et al, 2006; Collins et al, 2004; Gravel & Servant, 2005; Karpova et al, 2002; Lin et al, 1998; Saitoh et al, 2006; Servant et al, 2003; Servant et al, 2001a). These hyperphosphorylated/dimerized forms of IRF-3, detected by a decreased mobility in SDS-PAGE and in Native-PAGE assays, respectively, are artificially reproduced following overexpression of IRF-3 5D (Bibeau-Poirier et al, 2006; Lin et al, 1998; Servant et al, 2003). Ser 339 is involved in IRF-3 degradation following virus infection (Saitoh et al, 2006) and the observed instability of IRF-3 5D is abrogated when Ser 339 is replaced by Ala (IRF-3 5D S339A), a condition that also affects the ability of IRF-3 5D to homodimerize and associate with CBP (Fig. 4 and 5). These observations suggest that IRF-3 5D is constitutively phosphorylated on Ser 339. The effect of mutating

Ser 339 to Ala also abrogates virus-mediated IRF-3 homodimerization, CBP association and degradation (Fig. 4). Thus, through phosphorylation of Ser 339, the dimerized and CBP-associated form of IRF-3 is more likely to represent a highly transcriptionally active but also unstable version of IRF-3. Therefore, our study establishes a molecular link between the role of Ser 339 in IRF-3 homodimerization, CBP association, and its destabilization. Interestingly, this working model was also suggested for the transcriptional regulator Steroid Receptor Coactivator (SRC)-3 where phosphorylation allows interaction with Pin1, which in turn enhances SRC-3-CBP/p300 interaction, promoting the turnover of the activated SRC-3 oncoprotein (Yi et al, 2005). We are currently investigating the role of Pin1 in the ability of IRF-3 to interact with CBP.

Since the homodimerization and CBP association assays do not reflect the transcriptional status of IRF-3, we were not surprised to find that IRF-3 S339A or IRF-3 S396A, two mutants completely devoided of these activities, had similar antiviral properties as wtIRF-3 (Fig. 1 and 5). However, when introduced in IRF-3 mutants in which Ser 396 is mutated to Ala (IRF-3 S396A, IRF-3 2A and IRF-3 5A), S339A completely suppresses the protection provided by these mutants (Fig. 5). These results suggest that Ser 339 and Ser 396 share redundant roles at the level of IRF-3 transcriptional activity. Together, they are essential for the transcriptional activity of IRF-3, as substitution of these residues with non-phosphorylatable sites completely suppressed virus-induced production of IFN β in our bioassay or greatly reduced the ability of IRF-3 to induce mISG56 expression. This conclusion is also supported by the fact that mutation of Ser 339 to Ala in mutant IRF-3 3A (IRF-3 3A S339A), did not dramatically affect the transactivation potential of the molecule (Fig. 5B, compare lanes 5 and 6; Fig. 5E, compare lanes 6 and 7). The availability of Ser 396 in this mutant likely explains why the transcriptional activity of IRF-3 is not affected.

A model for the activation of IRF-3 is presented in Fig. 6. Following virus infection, activation of the IKK-related kinases TBK1/IKKi results in IRF-3 phosphorylation of sites accessible on cluster II (Ser 396) and III (Ser 402) that will subsequently lead to the phosphorylation of Ser385/386 for a significant activation and anti-viral gene transactivation. Since phosphorylation of Ser 396 precedes the phosphorylation of Ser 339 (Saitoh et al, 2006), we propose that phosphorylation of Ser 396 on cluster II further enhances the anti-viral response by presumably exposing Ser 339 and favoring its subsequent phosphorylation by an unknown proline-directed kinase, a modification that results in the generation of a hyperactive version of IRF-3 that is easily measurable through CBP association and homodimerization assays. Once generated, this hyperactive form of IRF-3 is recognized by Pin1, a process leading to its polyubiquitination and subsequent degradation by the proteasome (Bibeau-Poirier et al, 2006; Saitoh et al, 2006). Our results thus favor the two-step activation model of IRF-3 as previously suggested (Sarkar et al, 2004; Spiegel et al, 2005) and we propose that phosphorylation of Ser 339 is another important covalent modification involved in that process. As demonstrated by our mass spectrometry data, TBK1 preferably targets clusters II and III. We did not detect phosphorylation of cluster I by recombinant TBK1, thus favoring the idea that Ser 385/Ser 386 are likely to be the target of an atypical phosphoinositide 3-kinase-regulated kinase (PI3K) pathway (Noyce et al, 2006; Sarkar et al, 2004). On the other hand, it is also possible that Ser 385/Ser 386 become targets of TBK1 following the phosphorylation of cluster II and III (Panne et al, 2007b). Despite these uncertainties and taking into consideration the important role of Ser385/386 in the activation of IRF-3, phosphorylation of Ser 396 by TBK1 and phosphorylation of Ser 339 by a putative “proline-directed kinase” would be two essential covalent modifications for the dimerization and the formation of a hyperactive form of IRF-3.

A

	IRF-3					
	WT	S396A	2A	3A	5A	J2A
CBP association	+	-	-	+	-	-
Dimerization	+	-	-	+	-	-
Nuclear accumulation	+	-	-	+	-	-
Hyperphosphorylation	+	ND	ND	-	ND	+
IFN β production	+	+	+/-	+/-	+/-	-
mISGs induction	+	+	+	+	+	-
Biological activity affected by S339A mutation	No	Yes	Yes	No	Yes	N/A

B

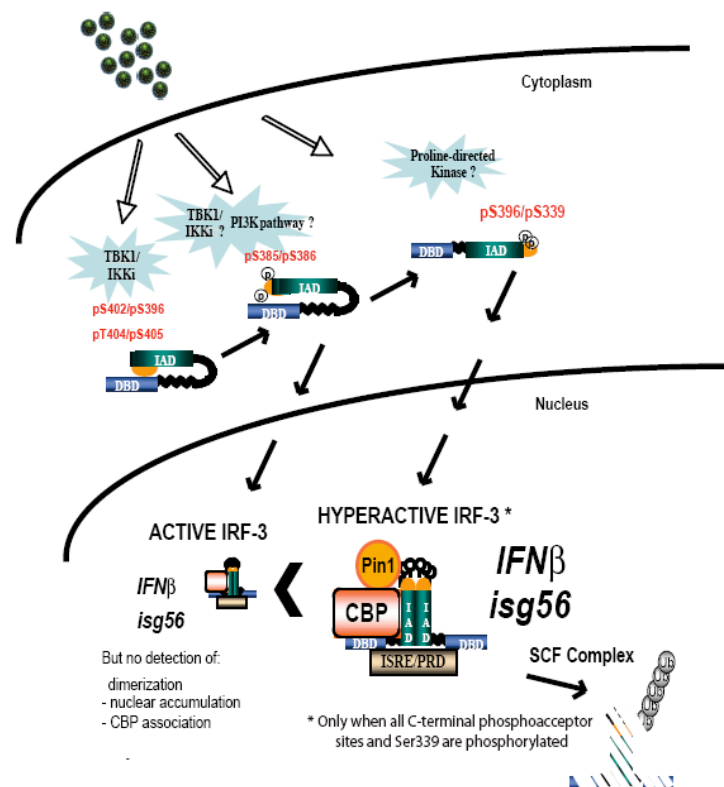


Figure 6. Analysis of the Ser/Thr to Ala mutants of IRF-3 revealed the implication of Ser 339 in the two-step activation process of IRF-3. A) Summary of the effect of the alanine mutants of IRF-3 and their properties in biochemical assays and in the biological activity. ND, Non-determined; N/A, Non-Applicable. B) Proposed model. Following a viral infection, the IKK-related kinases TBK1/IKKi are activated and phosphorylate Ser

402 (cluster III) and/or Ser 396 (cluster II). This phosphorylation event allows further phosphorylation of cluster III at less accessible sites (residues 404 and 405). Modification of clusters II and III then allows cluster I to become available for phosphorylation either by TBK1/IKKi (Panne et al, 2007b) or by an atypical PI3K pathway (Noyce et al, 2006; Sarkar et al, 2004). This incremental mechanism, by which phosphorylation might progressively pry off the inhibitory helix in the regulatory domain (shown in yellow), allows IRF-3 to become competent for the induction of interferon beta (IFN β). However, a putative Proline-directed kinase activated by the viral infection also phosphorylates IRF-3 on Ser 339. When both Ser 339 and Ser 396 are phosphorylated, IRF-3 becomes hyperactivated. Thus, homodimerization, CBP association, and nuclear accumulation are favored and become easily measurable by conventional biochemical assays. Bound to Pin1, this hyperactive form of IRF-3 will then be degraded by a Cullin-based E3 ligase.

Since we clearly observe anti-viral gene expression in the almost total absence of CBP association with IRF-3 S339A or IRF-3 S396A mutants (see Fig. 1E, Fig. 4D and Fig. 5), one could argue that IRF-3-CBP association is not absolutely required for the induction of the IFN β gene as recently proposed (Mokrani et al, 2006). While our study did not address the role of coactivators in the anti-viral properties of IRF-3, our results suggest that current biochemical assays do not always accurately reflect the transcriptional activity of IRF-3. The induction of IRF-3 response genes such as *ISG56* and type I IFN still represent the most reliable assays.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank John Hiscott, Rongtuan Lin, Ganes Sen, Tom Maniatis and Benjamin TenOever for reagents used in this study. We are also grateful to members of Sylvain Meloche laboratory's for helpful discussions. This work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to M.S. (MOP-53282), SM (MOP-14168) and a CIHR Research Resource Grant (PRG 80293) to P.T. M.S. is a recipient from a Rx&D/CIHR Health Research Foundation Career Awards in Health Sciences. S.M. P.T. and N.G. are recipients of Canada Research Chairs. J.F.C and S.P.G are both recipients of a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

REFERENCES

1. Bibeau-Poirier, A., S. P. Gravel, J. F. Clement, S. Rolland, G. Rodier, P. Coulombe, J. Hiscott, N. Grandvaux, S. Meloche, and M. J. Servant. 2006. Involvement of the IkappaB kinase (IKK)-related kinases tank-binding kinase 1/IKKi and cullin-based ubiquitin ligases in IFN regulatory factor-3 degradation. *J Immunol* 177:5059-67.
2. Collins, S. E., R. S. Noyce, and K. L. Mossman. 2004. Innate cellular response to virus particle entry requires IRF3 but not virus replication. *J Virol* 78:1706-17.
3. Dauber, B., J. Schneider, and T. Wolff. 2006. Double-stranded RNA binding of influenza B virus nonstructural NS1 protein inhibits protein kinase R but is not essential to antagonize production of alpha/beta interferon. *J Virol* 80:11667-77.
4. Fitzgerald, K. A., S. M. McWhirter, K. L. Faia, D. C. Rowe, E. Latz, D. T. Golenbock, A. J. Coyle, S. M. Liao, and T. Maniatis. 2003. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 4:491-6.
5. Gravel, S. P., and M. J. Servant. 2005. Roles of an IkappaB kinase-related pathway in human cytomegalovirus-infected vascular smooth muscle cells: a molecular link in pathogen-induced proatherosclerotic conditions. *J Biol Chem* 280:7477-86.
6. Heylbroeck, C., S. Balachandran, M. J. Servant, C. DeLuca, G. N. Barber, R. Lin, and J. Hiscott. 2000. The IRF-3 transcription factor mediates Sendai virus-induced apoptosis. *J Virol* 74:3781-92.
7. Hiscott, J., N. Grandvaux, S. Sharma, B. R. Tenover, M. J. Servant, and R. Lin. 2003. Convergence of the NF-kappaB and interferon signaling pathways in the regulation of antiviral defense and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 1010:237-48.
8. Honda, K., and T. Taniguchi. 2006. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 6:644-58.
9. Iwamura, T., M. Yoneyama, K. Yamaguchi, W. Suhara, W. Mori, K. Shiota, Y. Okabe, H. Namiki, and T. Fujita. 2001. Induction of IRF-3/-7 kinase and NF-kappaB in response to double-stranded RNA and virus infection: common and unique pathways. *Genes Cells* 6:375-88.

10. Juang, Y. T., W. Lowther, M. Kellum, W. C. Au, R. Lin, J. Hiscott, and P. M. Pitha. 1998. Primary activation of interferon A and interferon B gene transcription by interferon regulatory factor-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:9837-9842.
11. Karpova, A. Y., M. Trost, J. M. Murray, L. C. Cantley, and P. M. Howley. 2002. Interferon regulatory factor-3 is an in vivo target of DNA-PK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2818-23.
12. Kumar, K. P., K. M. McBride, B. K. Weaver, C. Dingwall, and N. C. Reich. 2000. Regulated nuclear-cytoplasmic localization of interferon regulatory factor 3, a subunit of double-stranded RNA-activated factor 1. *Mol Cell Biol* 20:4159-68.
13. Lin, R., C. Heylbroeck, P. Genin, P. M. Pitha, and J. Hiscott. 1999. Essential role of interferon regulatory factor 3 in direct activation of RANTES chemokine transcription. *Mol Cell Biol* 19:959-66.
14. Lin, R., C. Heylbroeck, P. M. Pitha, and J. Hiscott. 1998. Virus dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential and proteasome mediated degradation. *Molecular and Cellular Biology* 18:2986-2996.
15. Lin, R., Y. Mamane, and J. Hiscott. 2000. Multiple regulatory domains control IRF-7 activity in response to virus infection. *J Biol Chem* 275:34320-7.
16. Lin, R., Y. Mamane, and J. Hiscott. 1999. Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains. *Mol Cell Biol* 19:2465-74.
17. McWhirter, S. M., K. A. Fitzgerald, J. Rosains, D. C. Rowe, D. T. Golenbock, and T. Maniatis. 2004. IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:233-8.
18. Mokrani, H., O. Sharaf el Dein, Z. Mansuroglu, and E. Bonefoy. 2006. Binding of YY1 to proximal region of the murine beta interferon promoter is essential to allow CBP recruitment and K8H4/K14H3 acetylation on the promoter region after virus infection. *Molecular and Cellular Biology* 26:8551-8561.

19. Mori, M., M. Yoneyama, T. Ito, K. Takahashi, F. Inagaki, and T. Fujita. 2004. Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J Biol Chem* 279:9698-702.
20. Noyce, R. S., S. E. Collins, and K. L. Mossman. 2006. Identification of a novel pathway essential for the immediate-early, interferon-independent antiviral response to enveloped virions. *J Virol* 80:226-35.
21. Panne, D., S. M. McWhirter, T. Maniatis, and S. C. Harrison. 2007. Interferon response factor 3 is regulated by a dual phosphorylation dependent switch. *J Biol Chem*.
22. Peters, R., S. M. Liao, and T. Maniatis. 2000. IKKe is part of a novel PMA-inducible I κ B kinase complex. *Molecular Cell* 5:513-522.
23. Pomerantz, J. L., and D. Baltimore. 1999. NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *Embo J* 18:6694-704.
24. Qin, B. Y., C. Liu, S. S. Lam, H. Srinath, R. Delston, J. J. Correia, R. Derynck, and K. Lin. 2003. Crystal structure of IRF-3 reveals mechanism of autoinhibition and virus-induced phosphoactivation. *Nat Struct Biol* 10:913-21.
25. Saitoh, T., A. Tun-Kyi, A. Ryo, M. Yamamoto, G. Finn, T. Fujita, S. Akira, N. Yamamoto, K. P. Lu, and S. Yamaoka. 2006. Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat Immunol* 7:598-605.
26. Sarkar, S. N., K. L. Peters, C. P. Elco, S. Sakamoto, S. Pal, and G. C. Sen. 2004. Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling. *Nat Struct Mol Biol* 11:1060-7.
27. Sato, M., H. Suemori, N. Hata, M. Asagiri, K. Ogasawara, K. Nakao, T. Nakaya, M. Katsuki, S. Noguchi, N. Tanaka, and T. Taniguchi. 2000. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 13:539-48.
28. Servant, M. J., N. Grandvaux, B. R. tenOever, D. Duguay, R. Lin, and J. Hiscott. 2003. Identification of the minimal phosphoacceptor site required for in vivo activation of

interferon regulatory factor 3 in response to virus and double-stranded RNA. *J Biol Chem* 278:9441-7.

29. Servant, M. J., B. ten Oever, C. LePage, L. Conti, S. Gessani, I. Julkunen, R. Lin, and J. Hiscott. 2001. Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Biol Chem* 276:355-63.
30. Servant, M. J., B. Tenoever, and R. Lin. 2002. Overlapping and distinct mechanisms regulating IRF-3 and IRF-7 function. *J Interferon Cytokine Res* 22:49-58.
31. Sharma, S., B. R. tenOever, N. Grandvaux, G. P. Zhou, R. Lin, and J. Hiscott. 2003. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 300:1148-51.
32. Shimada, T., T. Kawai, K. Takeda, M. Matsumoto, J. Inoue, Y. Tatsumi, A. Kanamaru, and S. Akira. 1999. IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to I κ B kinases. *Int Immunol* 11:1357-62.
33. Spiegel, M., A. Pichlmair, L. Martinez-Sobrido, J. Cros, A. Garcia-Sastre, O. Haller, and F. Weber. 2005. Inhibition of Beta interferon induction by severe acute respiratory syndrome coronavirus suggests a two-step model for activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* 79:2079-86.
34. Suhara, W., M. Yoneyama, T. Iwamura, S. Yoshimura, K. Tamura, H. Namiki, S. Aimoto, and T. Fujita. 2000. Analyses of virus-induced homomeric and heteromeric protein associations between IRF-3 and coactivator CBP/p300. *J Biochem (Tokyo)* 128:301-7.
35. Suhara, W., M. Yoneyama, I. Kitabayashi, and T. Fujita. 2002. Direct involvement of CREB-binding protein/p300 in sequence-specific DNA binding of virus-activated interferon regulatory factor-3 holocomplex. *J Biol Chem* 277:22304-13.
36. Takahasi, K., N. N. Suzuki, M. Horiuchi, M. Mori, W. Suhara, Y. Okabe, Y. Fukuhara, H. Terasawa, S. Akira, T. Fujita, and F. Inagaki. 2003. X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications. *Nat Struct Biol* 10:922-7.
37. tenOever, B. R., M. J. Servant, N. Grandvaux, R. Lin, and J. Hiscott. 2002. Recognition of the measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. *J Virol* 76:3659-69.

38. tenOever, B. R., S. Sharma, W. Zou, Q. Sun, N. Grandvaux, I. Julkunen, H. Hemmi, M. Yamamoto, S. Akira, W. C. Yeh, R. Lin, and J. Hiscott. 2004. Activation of TBK1 and IKK ϵ kinases by vesicular stomatitis virus infection and the role of viral ribonucleoprotein in the development of interferon antiviral immunity. *J Virol* 78:10636-49.
39. Todaro, G. J., and H. Green. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 17:299-313.
40. Weaver, B. K., O. Ando, K. P. Kumar, and N. C. Reich. 2001. Apoptosis is promoted by the dsRNA-activated factor (DRAF1) during viral infection independent of the action of interferon or p53. *Faseb J* 15:501-15.
41. Yang, H., C. H. Lin, G. Ma, M. Orr, M. O. Baffi, and M. G. Wathelet. 2002. Transcriptional activity of interferon regulatory factor (IRF)-3 depends on multiple protein-protein interactions. *Eur J Biochem* 269:6142-51.
42. Yi, P., R. C. Wu, J. Sandquist, J. Wong, S. Y. Tsai, M. J. Tsai, A. R. Means, and B. W. O'Malley. 2005. Peptidyl-prolyl isomerase 1 (Pin1) serves as a coactivator of steroid receptor by regulating the activity of phosphorylated steroid receptor coactivator 3 (SRC-3/AIB1). *Mol Cell Biol* 25:9687-99.
43. Yoneyama, M., W. Suhara, Y. Fukuhara, M. Fukada, E. Nishida, and T. Fujita. 1998. Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO Journal* 17:1087-1095.

Chapitre 5. Caractérisation des nouveaux médiateurs impliqués dans la signalisation cellulaire de la voie des interférons de type I

5.1 Mise en situation

TRAF3 a originalement été caractérisé comme étant une protéine associée au TNFR impliquée dans la voie d'activation non classique de NF- κ B. TRAF3 régule négativement cette voie de signalisation en permettant le recrutement du complexe E3 ligase TRAF2-cIAP1-cIAP2 au niveau de NIK afin d'induire sa dégradation. Dans la signalisation de la voie des RLRs, TRAF3 joue cependant un rôle positif dans la régulation. En effet, ses interactions avec CARDIF et TRADD sont essentielles à l'activation de IRF-3 par les IKK-related kinases. Un modèle explicatif fut suggéré où TRADD orchestrerait la signalisation de NF- κ B à l'aide de FADD et RIP1, alors que TRAF3 serait responsable du recrutement de TANK pour la signalisation vers IRF-3. Afin d'approfondir la compréhension des différents rôles de TRAF3 ainsi que son mécanisme d'action dans la voie des RLRs, nous avons tenté de découvrir de nouveaux interacteurs de cette protéine. Pour y parvenir, nous avons combiné les techniques de purification par affinité à la spectrométrie de masse. Les résultats de ces expériences ont notamment permis de démontrer que Sec16A et p115, deux protéines du transport vésiculaire ER-Golgi, interagissaient fortement avec TRAF3. Suite à l'engouement scientifique suscité par la récente découverte d'une protéine du ER impliquée dans la voie de signalisation des IFNs nommée STING, nous avons entrepris de caractériser l'impact fonctionnel de ces deux protéines sur TRAF3. Nous espérons ainsi enrichir le modèle explicatif actuellement proposé.

5.2 Article 3- TRAF3 recruitment to Sec16A and p115 reveals a new role for the ER to Golgi Transport Compartments in Innate Immunity

TRAF3 Recruitment to Sec16A and p115 Reveals a New Role for the ER-to-Golgi Transport Compartments in Innate Immunity

Jean-François Clément¹, Lisa M D'Ambrosio⁵, Myriam St-Amant-Verret¹, Wendy van Zuijlen¹, Tasheen Wissanji¹, Priscilla Doyon¹, Gregory Emery^{2,4}, Anne-Claude Gingras⁵, Sylvain Meloche^{2,3} and Marc J Servant^{1,*}

¹Faculty of Pharmacy, ²Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, ³Departments of Pharmacology and Molecular Biology, ⁴Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, Montreal, H3C 3J7, Canada, ⁵Samuel Lunenfeld Research Institute at Mount Sinai Hospital, Toronto, ON

Running title: TRAF3 localization at the ER-to-Golgi Interface

Key Words: Golgi/Innate immunity/p115/Sec16A/TRAF3

Subject Category: Immunology/Signal Transduction

ABSTRACT

TRAF3 is a central mediator that is important for inducing type I interferon production in response to intracellular double-stranded RNA. Here, we report the identification of Sec16A and p115, two proteins of the ER-to-Golgi vesicular transport system, as novel TRAF3 interactors. We demonstrate that TRAF3 localizes to the ER-to-Golgi vesicular pathway and behaves like a cis-Golgi protein. Depletion of p115 or Sec16A disrupts the cis-Golgi cellular localization of TRAF3 and affects type I Interferon response following double-stranded RNA treatment. Reciprocally, overexpression of Sec16A or p115 increases the activation of type I IFN β , ISG56 and NF- κ B-dependent promoters following viral infection. Furthermore, we demonstrate that TRAF3 colocalizes with TRADD at the cis-Golgi and also interacts with the translocon protein Sec61 β in a Sec5 dependent manner. Together, our data suggest that the cellular localization of TRAF3 to the ER-to-Golgi transport compartments is required for an optimal RIG-I-Like Helicases (RLH)-Cardif-dependent antiviral immune response. Our findings also highlight the potential role of the exocyst in the innate immune response.

Abstract : 164 words

Character count: 48041

INTRODUCTION

Following exposure to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), the innate immune response and the subsequent inflammation reaction rely on evolutionarily conserved receptors termed pattern-recognition receptors (PRRs) (Lee & Kim, 2007). These signaling receptors can be expressed at the cellular membrane (Toll-like receptors (TLRs) 1, 2, 4, 5, and 6), in acidic endosomes (TLRs 3, 7, 8, and 9), or in the cytoplasmic compartment (the double-stranded RNA (dsRNA)-activated kinase (PKR), the RIG-I-like helicases (RLHs) retinoic-acid-inducible gene I (RIG-I) and melanoma differentiation antigen 5 (MDA5), the HIN-200 family member Absent In Melanoma 2 (AIM2), the DNA-dependent activator of interferon regulatory factors (IRFs) (DAI), and the nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) receptors). RIG-I and MDA5 have been characterized as important cytoplasmic sensors for viral RNA (Andrejeva et al, 2004; Gitlin et al, 2006; Kato et al, 2005; Yoneyama et al, 2004). Once activated by dsRNA molecules, RIG-I and MDA5 are recruited to the mitochondrial adaptor protein Cardif (also called IPS-1, MAVS and VISA) in order to trigger signaling cascades leading to IRF-3 and NF- κ B activation, two essential players involved in the establishment of a cellular antiviral state (Kawai et al, 2005; Meylan et al, 2005; Seth et al, 2005; Xu et al, 2005).

Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor-associated factors (TRAFs) are part of a family of adaptor proteins that bridge the intracellular domains of multiple receptors, such as TNFR, IL1R, and TLRs, to downstream effectors involved in the inflammatory and innate immune signaling pathways. The TRAF family is composed of seven members, TRAF1 through TRAF7. They all share a C-terminal TRAF domain, which is composed of a coiled-coil domain followed by a conserved receptor-interacting domain. This domain mediates self-association and interaction with receptors or signaling proteins. Their N-terminal regions are composed of one or more zinc-finger motifs and, with the exception of TRAF1, a RING-finger domain that mediates E3 ubiquitin ligase activity and signaling

(Bradley & Pober, 2001). All mammalian TRAFs localize to the cytoplasm except TRAF4, which is found in the nucleus. Importantly, recent gene deletion studies have identified TRAF3 as a critical mediator involved in the induction of the type I interferons (IFNs) by the RLHs pathway (Hacker et al, 2006; Oganessian et al, 2006).

TRAF3 has originally been shown to associate with TNF receptors (e.g. BAFFR, CD40, $LT\beta R$, RANK, CD30, and Fn14) that are activators of the noncanonical NF- κB pathway (Claudio et al, 2002; Coope et al, 2002; Dejardin et al, 2002; Hauer et al, 2005). TRAF3 acts as a negative regulator in this pathway by promoting the recruitment of the TRAF2-cIAP1-cIAP2 E3 ligase complex to NF- κB -inducing kinase (NIK) in order to control its rapid turnover in resting cells (Vallabhapurapu et al, 2008; Zarnegar et al, 2008). However, in the RLHs pathway, the adaptor protein TRAF3 acts as a positive regulator. Its interaction with Cardif and TRADD is important to trigger IRF-3 phosphorylation through the adaptor molecule TANK and the IKK-related kinases TBK1/IKKi (Michallet et al, 2008; Saha et al, 2006). The TRADD mediated recruitment of FADD and RIP1 to Cardif also enhances the interaction between TANK and TRAF3. A model was then proposed where TRADD organizes FADD- and RIP1-mediated NF- κB signaling on one hand and TRAF3- and TANK-mediated IRF-3 signaling on the other (Michallet et al, 2008; Pietras & Cheng, 2008). However, this possible mechanism of action requires further investigations.

Here, we have used a proteomics-based strategy to identify novel TRAF3 interacting proteins that are implicated in the induction of type I IFN. Using this approach, we have identified two novel TRAF3 interactors, Sec16A and p115 (also called USO1), which have characterized roles in the Endoplasmic Reticulum (ER)-to-Golgi vesicular transport system. Sec16A is a peripheral membrane protein that is tightly associated with ER exit sites (ERES) where it recycles on and off the membrane. This process is important

for membrane trafficking between the ER and the Golgi apparatus (Iinuma et al, 2007; Watson et al, 2006). p115 is a vesicle tethering protein that is essential for both exocytic transport and for the maintenance of the stacked structure of mammalian Golgi membranes (Puthenveedu & Linstedt, 2004). It also tethers COPI vesicles to Golgi membranes (Sonnichsen et al, 1998). Since novel essential mediators of the type I IFN response were recently found to be associated with the ER or the exocyst pathway, such as STING/MITA/ERIS, Sec61 β and Sec5 (Chien et al, 2006; Ishikawa & Barber, 2008; Sun et al, 2009; Zhong et al, 2008), we postulated that Sec16A and p115 may exert a similar function through the ER-to-Golgi transport compartments. Co-immunoprecipitation experiments and confocal microscopy confirmed the association and co-localization of TRAF3 with p115 and Sec16A. Importantly, overexpression of p115 or Sec16A increased the type I IFN response, whereas their depletion by siRNA treatment impaired the induction of antiviral genes. Other players involved in type I IFN such as TRADD and Sec61 β , a subunit of the translocon channel, also partially colocalized with TRAF3 at the cis-Golgi and the ER-to-Golgi intermediate compartment (ERGIC), respectively. TRAF3 also interacts with Sec5 and Sec61 β , further reinforcing the model where the translocon interacts with the exocyst. Our study identifies p115 and Sec16A as new scaffold proteins involved in the establishment of the antiviral state.

RESULTS

Identification of Sec16A and p115 as new TRAF3 interactors

In order to find novel players involved in the type I IFN pathway, we have used a functional proteomics approach based on Flag affinity purification and mass spectrometry analysis. 293T cells stably expressing Flag-TRAF3 were harvested, subjected to IP with an anti-Flag antibody under native conditions and Flag-TRAF3 complexes were analyzed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Surprisingly, Sec16A (also called KIAA0310) and p115 (also called USO1), two proteins involved in the ER-to-Golgi vesicular trafficking, were found to associate with TRAF3 with a high confidence when compared to our internal control TBK1, a well-known TRAF3 interactor (Hacker et al, 2006; Oganessian et al, 2006) (Figure 1A). To confirm these interactions, we performed conventional co-immunoprecipitation experiments by overexpressing the candidate tagged-proteins with a Flag-TRAF3 construct in 293T cells. The interactions between Flag-TRAF3 and Myc-p115 or EGFP-Sec16A were clearly detected (Figure 1B-C). To further substantiate the interaction network between TRAF3, Sec16A and p115, we have also established a 293T cell line stably expressing Flag-p115 and analyzed its physiological interactors by Flag affinity purification and LC-MS/MS. Endogenous Sec16A was found associated to Flag-p115, as well as GM130 (also known as GOLGA2), an established physical partner of p115 (Nakamura et al, 1997) (Figure 1D). EGFP-Sec16A interaction with Myc-p115 was also confirmed by co-immunoprecipitation experiment (Figure 1E). However, endogenous TRAF3 was not recovered in our Flag-p115 analysis even when no filters were applied to the raw data. This result may be explained by the fact that p115 has many interactors (data not shown) and/or is part of alternative complexes independent from TRAF3. However, overexpressed Myc-TRAF3 was recovered from Flag-p115 complexes when this latter was immunoprecipitated from 293T cells co-expressing both constructs (Figure 1F). The TRAF3 interaction network identified

by functional proteomics suggests the presence of TRAF3 in close proximity to the Golgi network.

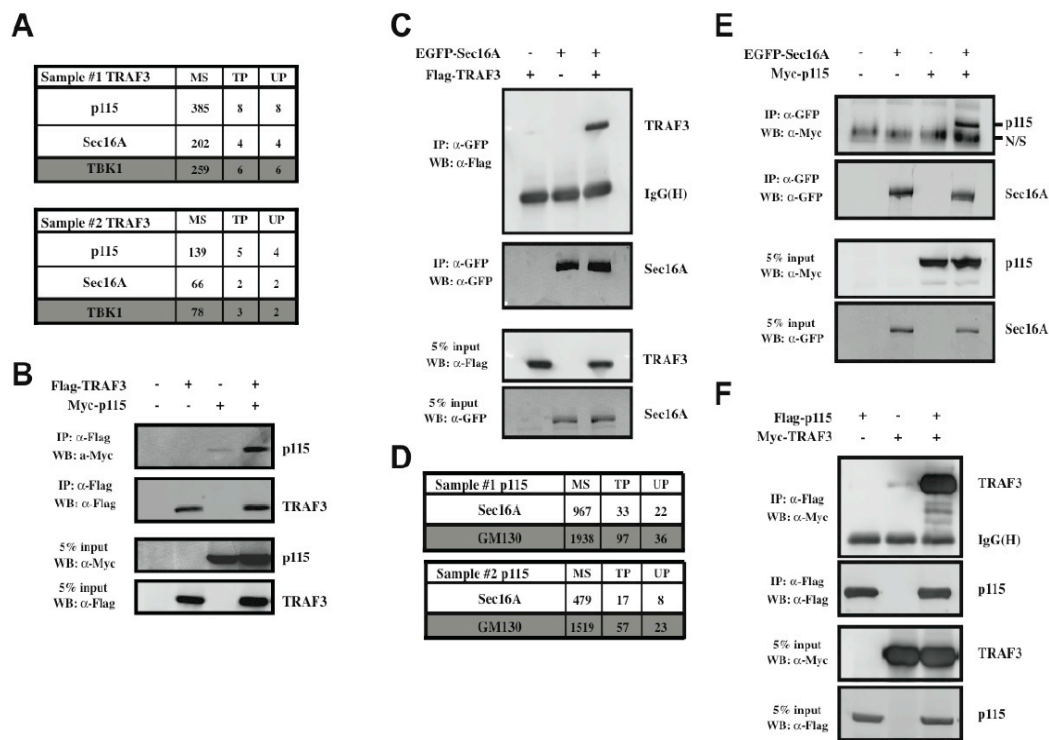


Figure 1. Identification of p115 and Sec16A as new TRAF3 interacting proteins. (A) 293T cells were stably transfected with pcDNA3-Flag-TRAF3 or pcDNA3-Flag alone. After G418 selection, the cells were lysed and subjected to AP/MS as described under methods. p115 and Sec16A were not detected in immunoprecipitate for control cells. MS; average mascot score per analysis, TP; average total number of peptides (spectral counts) identified per analysis, UP; average number of unique peptides observed per analysis. (B) Co-immunoprecipitation experiments showing the association of Myc-p115 to Flag-TRAF3 when coexpressed in 293T cells. (C) Co-immunoprecipitation experiments showing the association of Flag-TRAF3 to EGFP-Sec16A when coexpressed in 293T cells. (D) 293T cells stably transfected with pcDNA3-Flag-p115 or pcDNA3-Flag vector and analyzed as described in (A). (E) Co-immunoprecipitation experiments showing the association of Myc-p115 to EGFP-Sec16A and (F) Myc-TRAF3 to Flag-p115 when coexpressed in 293T cells.

TRAF3 localizes to the ER-Golgi transport compartments and behaves like a cis-Golgi matrix protein

To further validate the interaction between TRAF3 and these new interactors, we next analyzed their subcellular localization by confocal microscopy. We observed a perfect co-localization of Myc-p115 with Flag-TRAF3 (Figure 2A, lane 1). As previously mentioned, the vesicle-tethering protein p115 is known to colocalize and interact specifically with the NH2 terminus of the cis-Golgi protein GM130 ((Seemann et al, 2000b) and see Figure 2A, lane 2). Flag-TRAF3 also localizes to the Golgi apparatus where it exhibits a high degree of overlap with the cis-Golgi marker GM130 (Figure 2A, lane 3). It is worth noting that the best co-localization with the Golgi apparatus was observed in cells expressing low levels of Flag-TRAF3 cells or in TRAF3 ^{-/-} MEFs cells reconstituted with human TRAF3 (see Supplemental Figure 1). p115 was previously reported to be present in the ERGIC through an interaction involving activated Rab1 (Marra et al, 2001; Moyer et al, 2001). This cellular localization of Flag-p115 can be visualized with the conventional ERGIC marker, ERGIC53 (Figure 2A lane 4). Notably, Flag-TRAF3 was also present in the ERGIC (Figure 2A, lane 5). No significant colocalization was detected between TRAF3 and the ER marker calnexin (Figure 2A, lane 6), the lysosomal compartments (Figure 2A, lane 7) and the mitochondria (Figure 2A, lane 8).

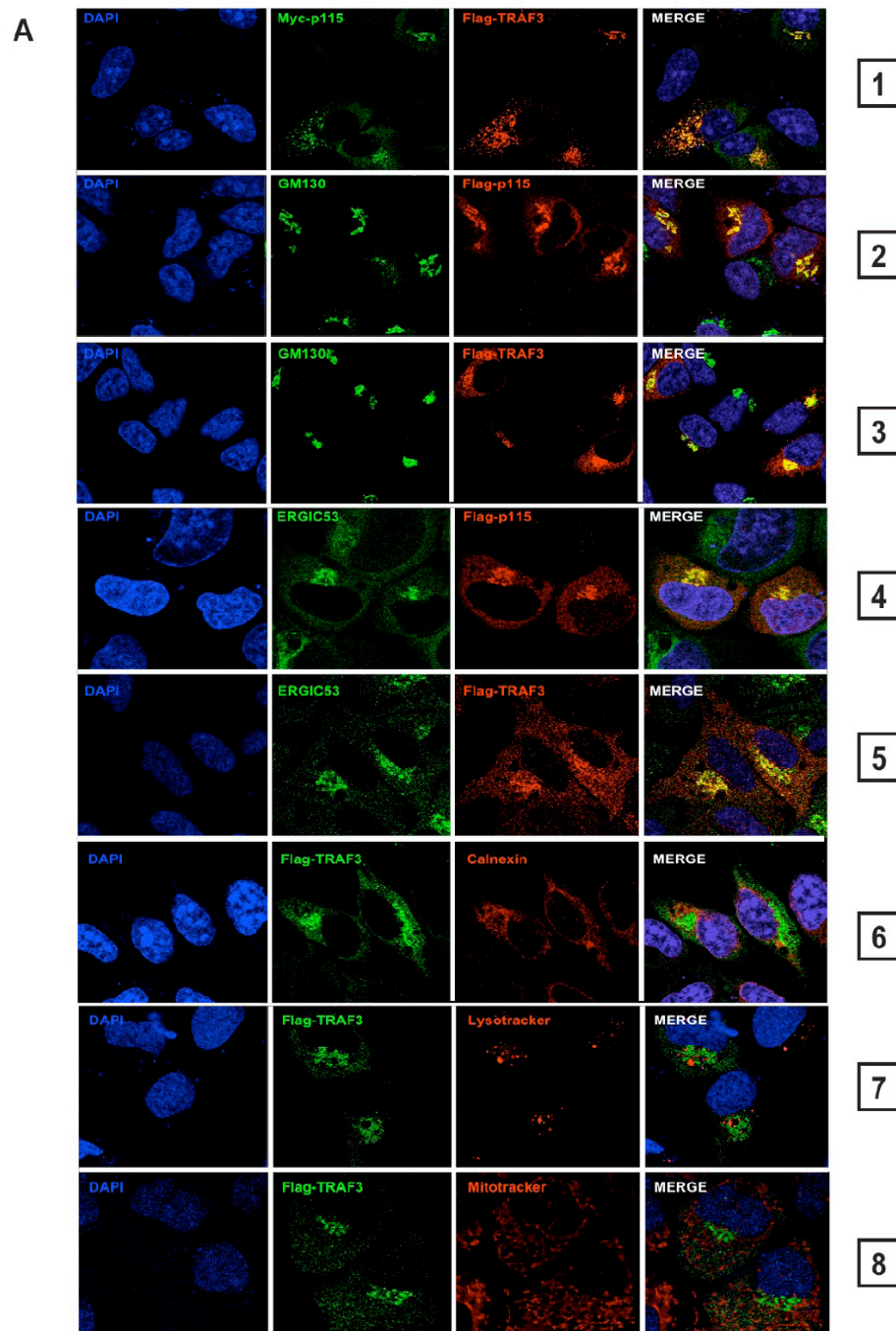


Figure 2

Figure 2. TRAF3 localizes to the ER-to-Golgi transport compartments and behaves like a cis-Golgi protein. (A) Confocal microscopy performed in HeLa cells on Flag-TRAF3 and Myc-p115 (lane 1), Flag-p115 and GM130 (lane 2), Flag-TRAF3 and GM130 (lane 3), Flag-p115 and ERGIC53 (lane 4), Flag-TRAF3 and

ERGIC53 (lane 5), Flag-TRAF3 and Calnexin (lane 6), Flag-TRAF3 and lysotracker (lane 7) or mitotracker (lane 8).

In HeLa cells, Sec16A was demonstrated to define ERES (Iinuma et al, 2007; Watson et al, 2006). Like other proteins of the ERES, such as COPII components, Sec16A was shown to display a punctated pattern with some concentration at the juxtannuclear region that is not distributed across the entire ER membrane. This pattern was reproduced in this study (Figure 2B, lane 1). Since Rab1 recruitment of p115 to ERES (Allan et al, 2000) represents an essential step for the subsequent docking of ER-derived vesicles to the ERGIC (Cao et al, 1998), we next examined the colocalization of EGFP-Sec16A and Flag-p115. The two proteins clearly colocalized at the perinuclear region (Figure 2B, lane 2). Flag-TRAF3 and EGFP-Sec16A also mainly colocalized at the perinuclear region in HeLa cells (Figure 2B, lane 3). Moreover, a colocalization of Flag-TRAF3 with endogenous Sec16A at ERES distributed in the cytoplasm could be observed. However, some Flag-TRAF3 punctae also appeared in close proximity to those containing Sec16A (Figure 2B, lane 4, compare both arrows).

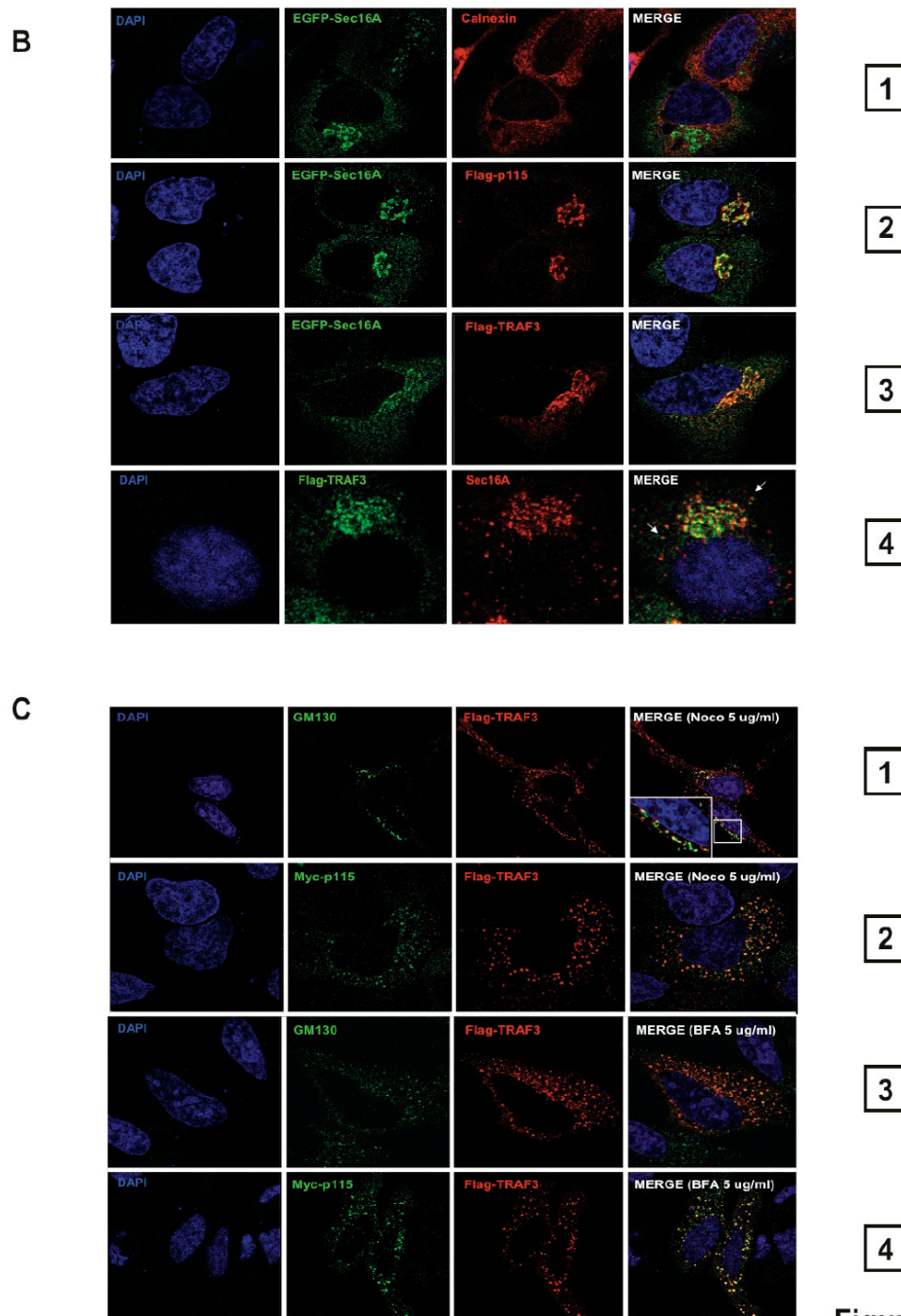


Figure 2

Figure 2. TRAF3 localizes to the ER-to-Golgi transport compartments and behaves like a cis-Golgi protein. (B) Confocal microscopy performed in HeLa cells on EGFP-Sec16A and calnexin (lane 1), EGFP-Sec16A and Flag-p115 (lane 2), EGFP-Sec16A and Flag-TRAF3 (lane 3) and Flag-TRAF3 and endogenous Sec16A

(lane 4). (C) HeLa cells were transfected with Flag-TRAF3 (lane 1 and 3) or Flag-TRAF3 and Myc-p115 (lane 2 and 4) and treated with either 5 $\mu\text{g/ml}$ of nocodazole for 2 hours at 37°C (lane 1-2) or 5 $\mu\text{g/ml}$ of BFA for 1 hour at 37°C (lane 3-4) before analysis by confocal microscopy

To further confirm the localization of TRAF3 to the Golgi apparatus, we next treated the cells with nocodazole. Microtubule depolymerization is known to result in the reorganization of the Golgi complex into characteristic mini-stacks, which appear as punctate structures throughout the cell (Thyberg & Moskalewski, 1985). We still detected the colocalization of Flag-TRAF3 with GM130 (Figure 2C, lane 1) and Myc-p115 (Figure 2C, lane 2) in cells treated with nocodazole. Treatment with brefeldin A (BFA), leads to relocalization of the components of the cis-Golgi matrix to punctate cytoplasmic structures (also called remnants) that appear close to ERES (Lippincott-Schwartz et al, 1990; Seemann et al, 2000a). GM130 and p115 are cis-Golgi proteins known to be relocalized in these remnants (Seemann et al, 2000a). Flag-TRAF3 was also relocated to cytoplasmic remnants upon BFA treatment, where it co-localized with GM130 (Figure 2C, lane 3) and Myc-p115 (Figure 2C, lane 4). Overall, results from our biochemical experiments and confocal microscopy suggest that TRAF3 localization is restricted to the cis-side of the Golgi apparatus (Nelson et al, 1998; Waters et al, 1992).

TRAF3 interaction with Sec16A or p115 is selective over TRAF2 and TRAF6, requires its full protein integrity and is reduced following viral infection

Members of the TRAF family often share common interacting partners. For example, TRADD and RIP1 bind strongly to TRAF1, TRAF2 and TRAF3 (Hsu et al, 1996a; Michallet et al, 2008), whereas Cardif interacts with TRAF2, TRAF3 and TRAF6 (Saha et al, 2006; Xu et al, 2005). To verify the binding selectivity of the new TRAF3 interactors, we next performed co-immunoprecipitation experiments in 293T cells overexpressing Flag-tagged TRAF2, TRAF3 or TRAF6, TRAF molecules involved in type I IFN and inflammatory responses, along with Myc-p115 or EGFP-Sec16A. Only Flag-

TRAF3 was found to interact with Myc-p115 (Figure 3A). A similar result was obtained with EGFP-Sec16A, except that a weak interaction was observed with TRAF2 when compared to TRAF3 (Figure 3B). Confocal microscopy analysis of Flag-TRAF2 (Figure 3E, lane 1), TRAF3 (Figure 3E, lane 2) and TRAF6 (Figure 3E, lane 3) also confirmed that only TRAF3 exhibits a cellular Golgi-like distribution and colocalizes with Sec16A (Figure 3F) or Myc-p115 (Supplemental Figure 2). TRAF3 is also known to interact with several substrates through a particular motif (PxQxS/T) called the TRAF interaction motif (TIM) (Brodeur et al, 1997). The mutation of two amino acids located in the TIM-binding pocket of TRAF3, Y440 and Q442, abrogates these interactions (Saha et al, 2006). Surprisingly, a strong interaction was detected between Flag-TRAF3 Y440/Q442A and Myc-p115 (Figure 3C) or EGFP-Sec16A (Figure 3D). Confocal microscopy on Flag-TRAF3 Y440/Q442A and Myc-p115 also revealed their colocalization at the Golgi apparatus (Figure 3F, lane 1). By GST pull-down experiments, TRAF3 was previously demonstrated to be recruited to Cardif through a direct and specific interaction with the TIM located in its proline-rich region (Saha et al, 2006). As seen by confocal microscopy, Myc-TRAF3 and Flag-Cardif perfectly colocalize, suggesting that TRAF3 relocates from the Golgi to the mitochondria when Cardif is overexpressed (Figure 3G, lane 2). Cells co-expressing Flag-TRAF3 Y440/Q442A and Myc-Cardif also show a TRAF3 recruitment to the mitochondria, whereas cells expressing the Flag-TRAF3 Y440/Q442A construct alone exhibit a Golgi-like distribution pattern (Figure 3G, lane 3). These findings question the implication of a TIM for the interaction between Cardif and TRAF3.

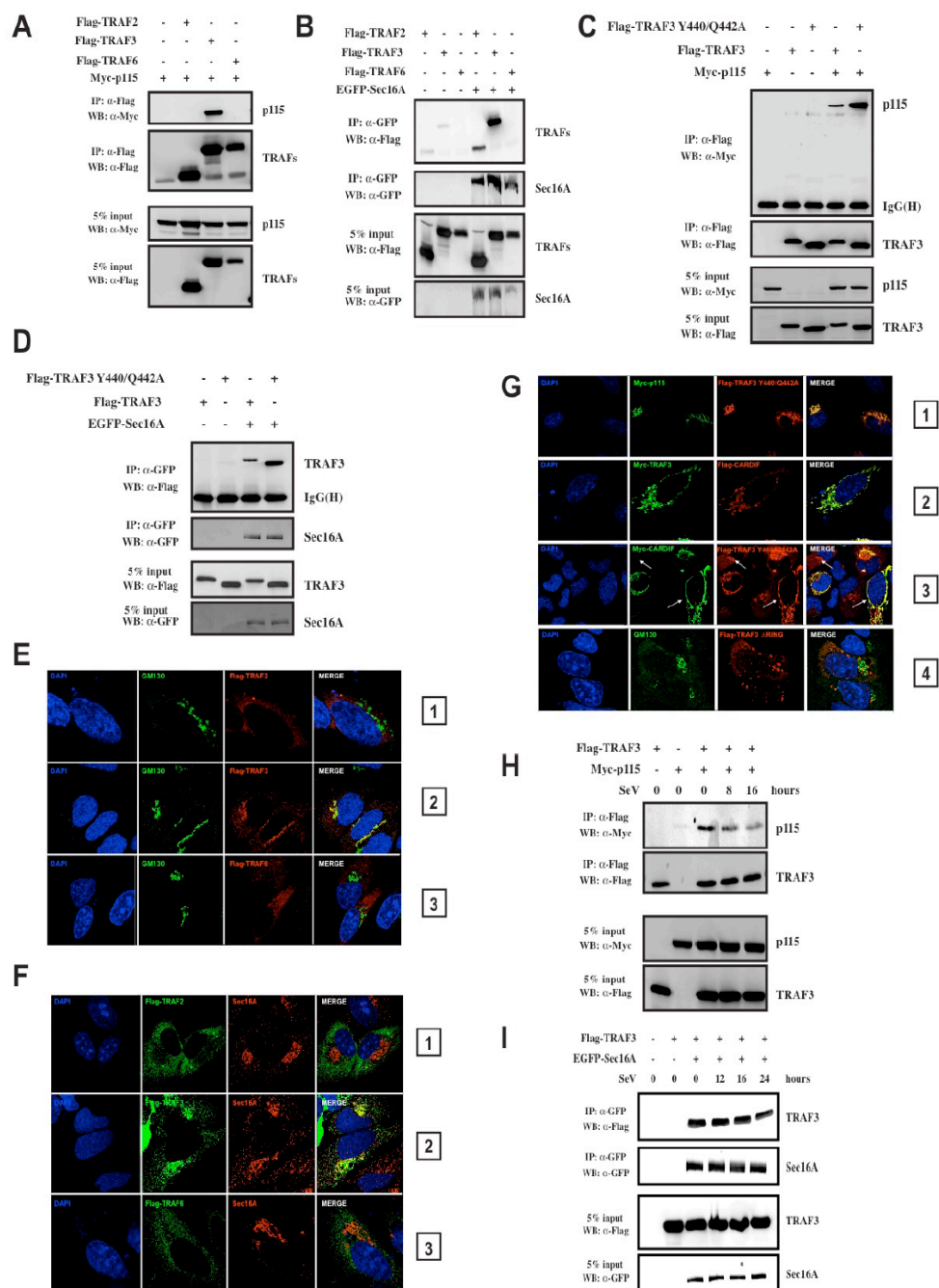


Figure 3

Figure 3. Localization of Flag-TRAF3 to the Golgi apparatus or its association to Myc-p115 and EGFP-Sec16A is specific and does not involve a TIM. (A-B) Co-immunoprecipitation experiments showing the association of Flag-TRAF3, but not TRAF2 or TRAF6 to Myc-p115 or EGFP-Sec16A (C-D) Co-

immunoprecipitation experiments showing the association of Flag-TRAF3 WT and Y440/Q442A to Myc-p115 or EGFP-Sec16A when coexpressed in 293T cells. (E) Confocal microscopy analysis on HeLa cells transfected with Flag-tagged TRAF2 (lane 1), TRAF3 (lane 2) or TRAF6 (lane 3). The Golgi apparatus was labeled with an anti-GM130 antibody. (F) Colocalization of TRAF2 (lane 1), TRAF3 (lane 2) or TRAF6 (lane 3) with Sec16A as described in (E). (G) Confocal microscopy analysis of HeLa cells co-expressing Myc-p115 and Flag-TRAF3 Y440/Q442A (lane 1), Myc-TRAF3 and Flag-Cardif (lane 2), Myc-Cardif and Flag-TRAF3 Y440/Q442A (lane 3) or expressing only Flag-TRAF3 deltaRING (lane 4). (H-I) Co-immunoprecipitation experiments showing a diminution in the association of Flag-TRAF3 with Myc-p115 or EGFP-Sec16A following SeV infection.

It was also proposed that an intact TRAF3 molecule is required for its antiviral activity. Indeed, TRAF3 lacking its RING domain behaves like a dead signaling molecule (Saha et al, 2006). We therefore looked at the subcellular localization of the Δ RING TRAF3 mutant. Unexpectedly, the colocalization with the cis-Golgi apparatus was completely abrogated (Figure 3G, lane 4). Moreover, the interaction between TRAF3 and p115 or Sec16A also decreased following viral infection (Figure 3H-I). These results suggest that TRAF3 localization to the cis-Golgi may be an important step prior to its recruitment to Cardif in order to execute its antiviral function.

TRAF3 partially colocalizes at the Golgi with TRADD and the translocon and interacts with Sec5

TRAF3 localization to the ER-to-Golgi transport compartment, prompted us to verify if others interacting partners of TRAF3 also localize to these vesicular compartments. According to a recent study, TRADD is an essential component of the RLH pathway and was shown to exhibit a strong interaction with Cardif and TRAF3 (Michallet et al, 2008). In U937 human leukemic monocyte lymphoma cell line, TRADD was previously shown to be loosely associated with the Golgi, but not with the trans-Golgi network (TGN) in which TNF-R1 is localized (Jones et al, 1999; Morgan et al, 2002). In HeLa cells, endogenous TRADD localizes mainly at the Golgi apparatus and is partially colocalized with Flag-TRAF3 (Figure 4A, lane 1) and Myc-p115 (Figure 4B, lane 2). We

tried to co-immunoprecipitate Myc-p115 with Flag-TRADD, but no significant interaction was observed under our experimental conditions (data not shown). Recently, STING/MITA/ERIS was found to co-immunoprecipitate with components of the TRAP complex (TRAP β) and the ER-resident translocon protein Sec61 β (Ishikawa & Barber, 2008). The translocon is known to be distributed in the ER, but also in the ERGIC ((Greenfield & High, 1999; Inuma et al, 2009) and see Figure 4A, lane 4). Since TRAF3 was shown to localize at the ERGIC (see Figure 2A), we then examined the colocalization of TRAF3 and Sec61 β by confocal microscopy. As shown in Figure 4A (see lane 3), TRAF3 and Sec61 β partially colocalized in subcellular compartments that include in part the ERGIC. Interestingly, the translocon was demonstrated to associate with the exocyst complex (Lipschutz et al, 2003; Toikkanen et al, 2003), which in turn was shown to interact with TBK1, a well-known TRAF3 interacting protein (Chien et al, 2006). To test whether TRAF3 is also physically associated with the exocyst, we next performed co-immunoprecipitation experiments. We found that Myc-Sec5 specifically interacts with Flag-TRAF3 (Figure 4B). However, no significant interaction with Sec5 could be detected with Flag-p115 nor Flag-TRADD (Figure 4C). We next performed different co-immunoprecipitation experiments to further characterize the potential interaction complex composed of TRAF3, the exocyst (sec5) and Sec61 β . No interaction between Flag-TRAF3 and endogenous Sec61 β could be significantly detected (Figure 4D, lane 2). However, when Myc-Sec5 was co-expressed with Flag-TRAF3, Sec61 β was specifically detected in TRAF3 immunoprecipitates (Figure 4D, see lane 4). This result suggests that the exocyst complex is responsible for the recruitment of Sec61 β to TRAF3. As previously mentioned, Sec61 β is mainly located at the ER, but also at the ERGIC where TRAF3 is also found. Together, these results suggest that the cellular distribution of TRAF3 to the ER-to-Golgi transport compartment could favor, on one hand, its interaction with TRADD in order to interact with Cardif following a viral infection, and on the other hand, the recruitment of TBK1 to the exocyst complex.

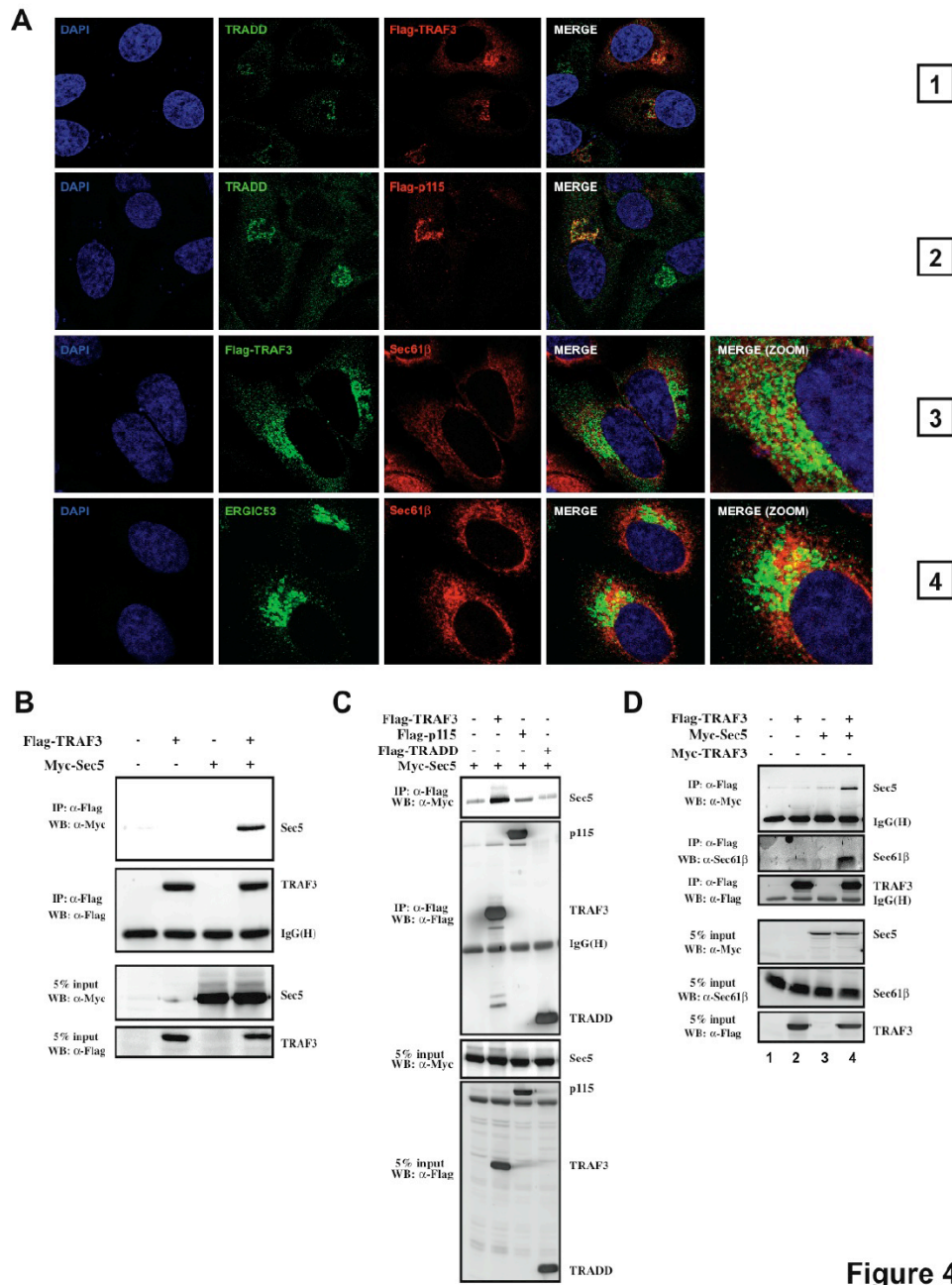


Figure 4

Figure 4. The ER-to-Golgi transport compartments host other important players involved in innate immunity. (A) Confocal microscopy analysis of HeLa cells showing the partial co-localization of Flag-TRAF3 and TRADD (lane 1), Flag-p115 and TRADD (lane 2), Flag-TRAF3 and Sec61 β (lane 3) or ERGIC53 and Sec61 β (lane 4). (B-C) Co-immunoprecipitation experiments showing the association of Myc-Sec5 to Flag-

TRAF3, but not to Flag-p115 or Flag-TRADD. (D) Co-immunoprecipitation experiments showing the recruitment of Sec61 β to TRAF3 through Myc-Sec5.

Sec16A and p115 influence the type I IFN antiviral response at the transcriptional level

To investigate whether Sec16A or p115 may play a role in innate immunity, we next overexpressed both proteins in Hec1B cells and measure type I IFN response using reporter gene assays. Without any stimulation, overexpression of both proteins did not significantly activate the IFN β promoter. However, the response following viral infection was highly increased in cells overexpressing Sec16A or p115 (Figure 5A). Overexpression of Sec16A and p115 also increases the activation of an ISG56 promoter (IRF3-dependent promoter) (Figure 5B) and a NF- κ B dependent promoter (Figure 5C) following Sendai virus (SeV) infection. Moreover, we observed a synergistic effect on the IFN β promoter when Sec16A or p115 were co-expressed with TRIF (Figure 5D), Cardif (Figure 5E) and TBK1 (Figure 5F). Similar results were also obtained using the ISG56 promoter or the NF- κ B dependent promoter (Figure 5G to 5L). These results suggest that, like TRAF3 (Oganesyan et al, 2006), Sec16A and p115 might serve as adaptor molecules in the type I IFN pathway.

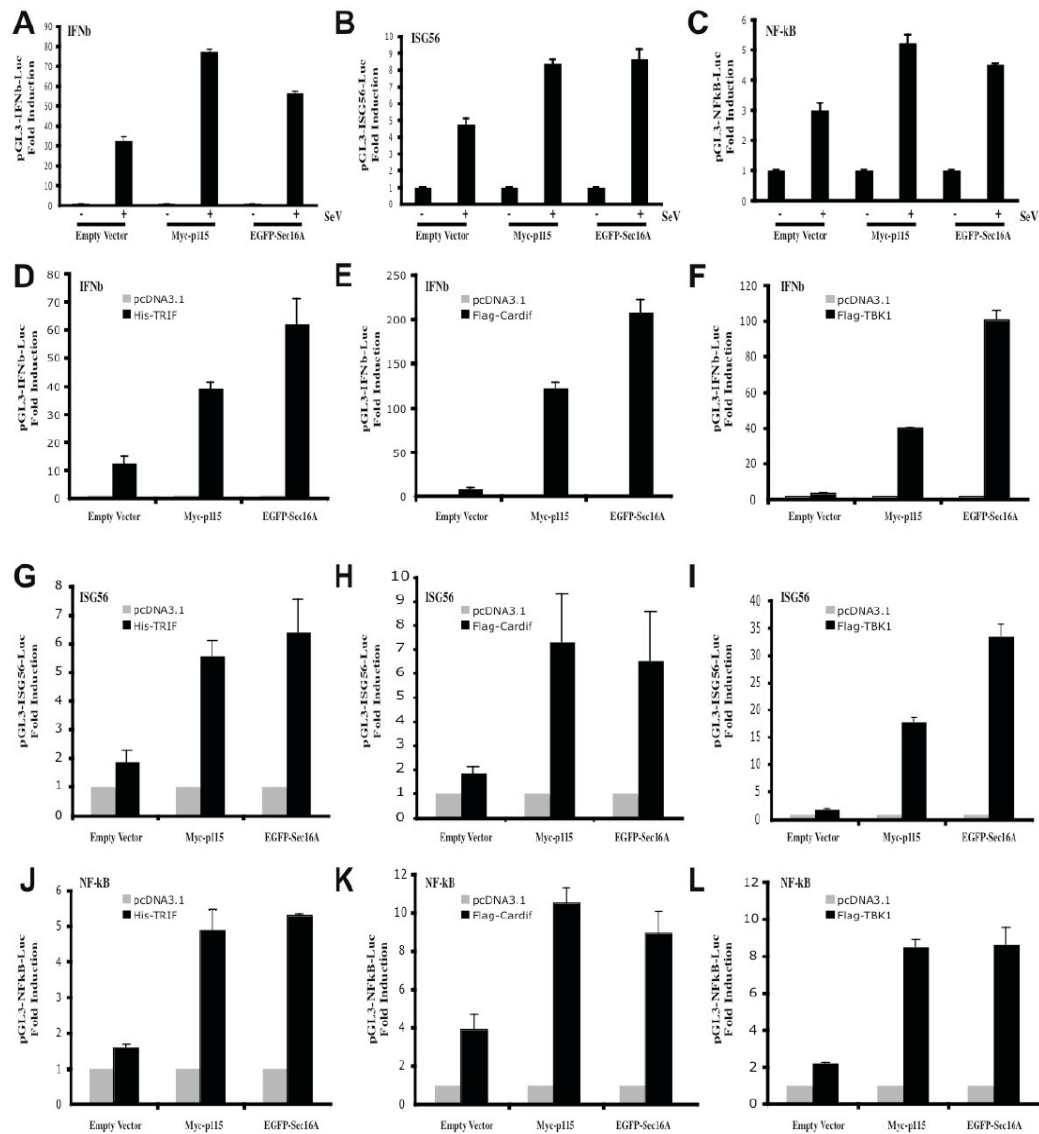


Figure 5. Overexpression of Sec16A and p115 increases TBK1-mediated promoter activation. (A-C) Hec1B cells were co-transfected with the indicated luciferase reporter genes together with 125 ng of empty vector, Myc-p115 or EGFP-Sec16A. Data are expressed as a fold induction following SeV infection (16 h) over the corresponding non infected condition. (D-F) HEK293 QBI cells or Hec1B cells were co-transfected with pGL3-IFN β -luciferase reporter gene together with 125 ng of empty vector, Myc-p115 or Sec16A and 15 ng of His-TRIF (D), 15 ng of Flag-Cardif (E) or 100 ng of Flag-TBK1 (F). (G-I) HEK293 QBI cells were co-transfected with pGL3-ISG56-luciferase reporter gene, 125 ng of empty vector, Myc-p115 or Sec16A and 15 ng of His-TRIF (G), 15 ng of Flag-Cardif (H) or 100 ng of Flag-TBK1 (I). (J-L) HEK293 QBI cells were co-transfected with pGL3-NF- κ B-luciferase reporter gene together with 125 ng of empty vector, Myc-p115 or Sec16A and 60 ng of His-TRIF (J), 60 ng of Flag-Cardif (K) or 200 ng of Flag-TBK1 (L). Data represent the fold activation over the corresponding vector control. Each value represents the mean \pm standard error of the

mean (S.E.M.) of triplicate determinations. The data are representative of at least four different experiments with similar results.

To further ascertain the implication of Sec16A and p115 in type I IFN response, we performed loss-of-function experiment using siRNA to evaluate the expression of genes induced by poly(IC) transfection. This approach was used based on the rationale that depletion of Sec16A or p115 is known to affect the integrity of the ER-to-Golgi vesicular transport pathway (Iinuma et al, 2007; Puthenveedu et al, 2006; Puthenveedu & Linstedt, 2004; Sohda et al, 2005; Watson et al, 2006). As a consequence, the observation of a decreased amount of IFN β by ELISA could simply reflect of a vesicular transport problem and not the interference with an upstream signaling pathway. Disturbing the Golgi integrity is also known to activate the ER stress pathway resulting translation inhibition (Molina et al, 2007). To circumvent these problems, poly(IC) transfection was used in order to avoid the potential problem of different amounts of viral dsRNA generated in the cytoplasm of infected cells. The levels of p115 and Sec16A levels were significantly decreased after siRNA treatment and resulted in lack of localization of TRAF3 to the ER-to-Golgi vesicular pathway (Figures 6A and 7). More importantly, siRNA cellular depletion of p115 or Sec16A significantly reduces *Ifnb*, *ifit1* (ISG56), *gip2* (ISG15), *mxr* and *oas1* mRNA induction following poly(IC) transfection confirming that TRAF3 localization to the ER-to-Golgi vesicular pathway is necessary for type I IFN response (Figure 6B-F).

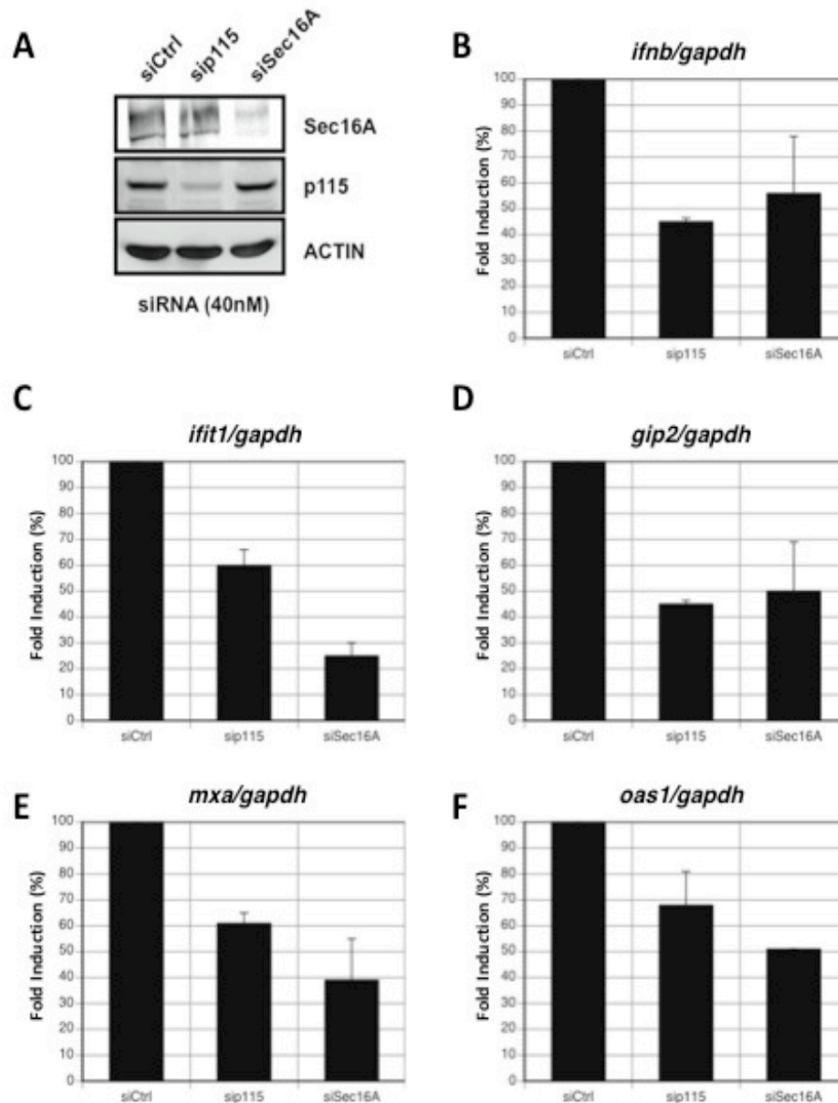


Figure 6. siRNA mediated depletion of p115 and Sec16A affect type I IFN response to poly(IC) transfection. (A) Expression of p115 and Sec16A was monitored by immunoblotting. Actin is shown as a loading control. (B-F) HeLa cells treated with the indicated siRNAs were transfected with 2 μ g/ml of poly(IC) for 6 hours. Induction of *ifnb* (B), *ifit1* (*isg56*) (C), *gip2* (*isg15*) (D), *mxg* (E) or *oas1* mRNA (F) was then measured by quantitative RT-PCR. Data are expressed as fold induction percentage of the poly(IC) treated condition over its mock transfected counterpart and compared to the siCtrl treated cells. Error bars correspond to S.E.M. of three independent experiments.

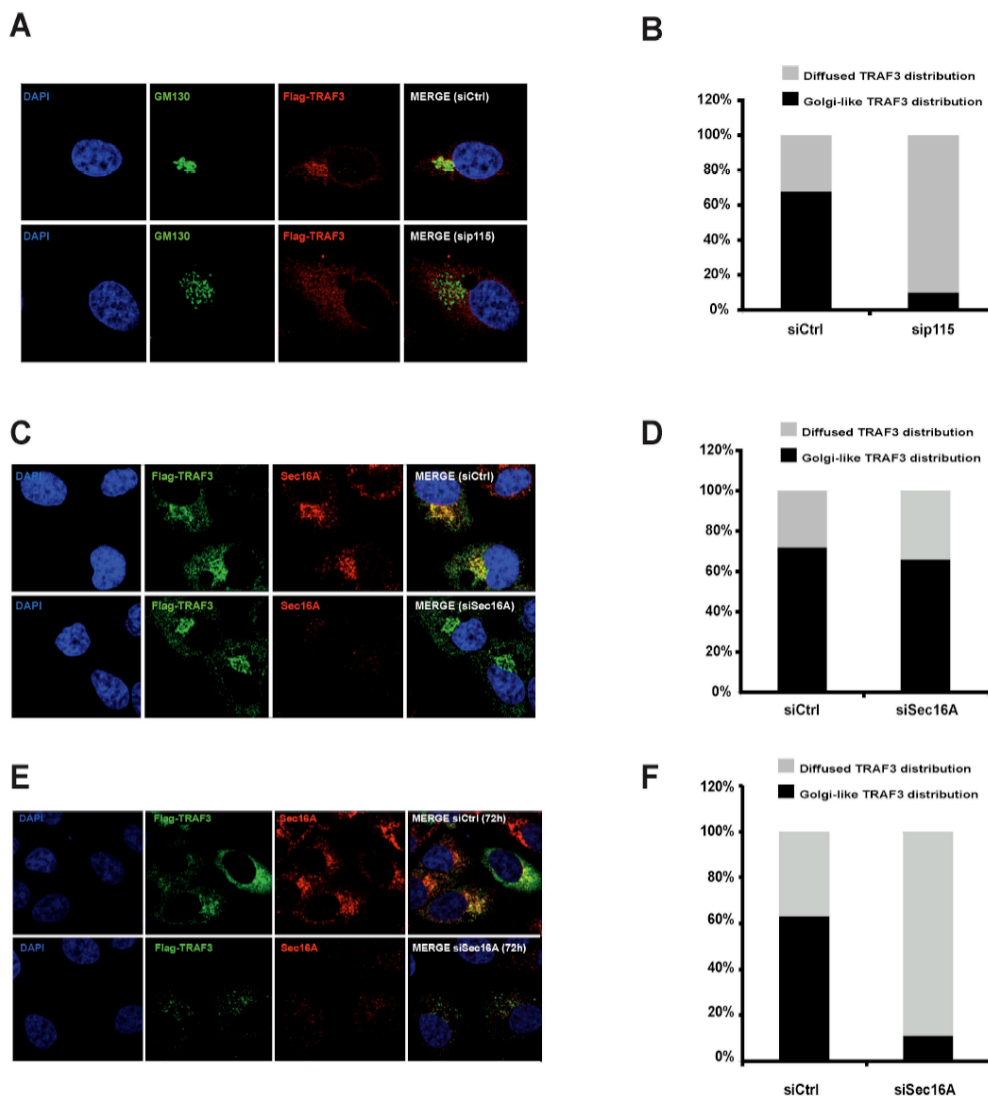


Figure 7. Cellular depletion of p115 or Sec16A disrupts TRAF3 cellular localization to the ER-to-Golgi transport compartments. HeLa cells were microporated with Flag-TRAF3 and subsequently treated with the indicated siRNA. TRAF3 localization was monitored by immunofluorescence 48 hours (A and C) or 72 hours (E) after siRNA transfection using an anti-Flag antibody. GM130 was used as a cis-Golgi protein marker. (B, D and F) Quantification of Flag-TRAF3 cellular localization (cytoplasmic diffused versus Golgi-like distributed) observed in panels A and E. Data are representative of two independent experiments and expressed in percentage (%) of cells. 75 to 100 Flag-TRAF3 positive cells were counted.

DISCUSSION

The discovery of STING/MITA/ERIS has recently opened new perspectives in the field of innate immunity. Notably, the notion that elements of the ER can be involved in the cytosolic antiviral recognition pathway has completely changed our view of how molecules assemble to form a functional signaling complex (Ishikawa & Barber, 2008). Herein, we found that TRAF3 localizes to the ER-Golgi compartments through its specific interaction with p115 and Sec16A. Both proteins were shown to play a primary role in the anterograde trafficking at the ER-Golgi interface by influencing the assembly and transport of COPII vesicles. Sec16A assembles on the ER membrane and forms an organized scaffold defining an ERES whereby COPII assembly occurs (Inuma et al, 2007; Watson et al, 2006). Interestingly, Bouwmeester and colleagues observed a NIK-dependent interaction between Sec16A and NF- κ B2/p100 in an exhaustive study mapping the human TNF- α /NF- κ B signal transduction network (Bouwmeester et al, 2004). However, no further functional characterization was undertaken in this study. As for p115, the coiled-coil myosin-shaped molecule was demonstrated to be an important tethering adaptor controlling ER-to-Golgi traffic at various sites (Appenzeller-Herzog & Hauri, 2006; Barr & Short, 2003). First, p115 acts during COPII vesicle formation by recruiting a selected set of SNARE proteins required for subsequent vesicle fusion (Allan et al, 2000). Its presence is also required to determine the focused positioning of the ERES within the cytoplasm (Kondylis & Rabouille, 2003). In second instance, p115 mediates vesicle tethering at the ERGIC (Alvarez et al, 1999). Finally, it orchestrates the tethering at the cis-Golgi, in conjunction with two other Rab1-binding tethering factors, giantin and GM130 (Beard et al, 2005; Sonnichsen et al, 1998). Of note, p115 was recently implicated in innate immunity by mediating the unconventional secretion of MIF (migration inhibitory factor) (Merk et al, 2009).

Interestingly, we found that TRAF3 behaves like the cis-Golgi matrix protein p115 and GM130. Upon BFA treatment, TRAF3 redistributes to small punctate cytoplasmic structures discrete from the ER along with both Golgi matrix proteins 115 and GM130 (Nakamura et al, 1995; Waters et al, 1992). The cellular distribution of TRAF3 was also affected by nocodazole treatment in a similar fashion to GM130 and p115. Both the structure and positioning of the Golgi apparatus are highly dependent on the microtubule cytoskeleton (Thyberg & Moskalewski, 1999). A link between TRAF3 and the microtubule network has been already established in a previous study through its interaction with MIP-T3 (Microtubule-Interacting Protein that associates with TRAF3) (Ling & Goeddel, 2000). TRAF3 was dissociated from this complex upon CD40L stimulation and, consequently, it was suggested that microtubule association of TRAF3 could be responsible for directing TRAF3 to defined membrane microdomains in the cell. As such, TRAF3 association to p115 at the ER-to-Golgi vesicular pathway may also play a similar and important role to orchestrate TRAF3 recruitment to Cardif following viral infection.

The following evidences suggest a role of Sec16A and p115 in the TRAF3 mediated-RLH type I IFN response: (1) Sec16A and p115 interacts strongly with TRAF3, but not with TRAF2 nor TRAF6, (2) inactivation of TRAF3 by deletion of its RING finger domain displaces TRAF3 from the ER-Golgi transport compartments, (3) TRAF3 dissociates from the Sec16A-p115 complex upon virus infection, (4) overexpression of both proteins enhances SeV-, TBK1- and Cardif-stimulated IFN β , ISG56 and NF- κ B promoter induction; (5) TRADD also partially colocalizes with TRAF3 and p115 at the Golgi apparatus and (6) siRNA depletion of p115 or Sec16A affects both cellular distribution of TRAF3 and type I IFN response following poly(IC) transfection. Interestingly, enforced expression of Sec16A or p115 also increases TRIF-mediated IFN β promoter activation (Figure 5) indicating a role of the ER-to-Golgi compartment system in TLR3 signaling. Thus, we propose that these two trafficking proteins, Sec16A and p115, complex with TRAF3 at the ER-to-Golgi transport compartments in order to ensure its

proper recruitment to the mitochondria during a viral infection. In support of this idea, the ER-Golgi transport compartments seem to host several proteins involved in type I IFN (see Figure 4), such as TRADD (Michallet et al, 2008), the translocon (Ishikawa & Barber, 2008) and potentially the exocyst (Chien et al, 2006) through its interaction with Sec61 β (Lipschutz et al, 2003; Toikkanen et al, 2003). All these data suggest a model where the different organelles (ER, Golgi and mitochondria) are in close proximity in order to facilitate the assembly of a functional Cardif signaling complex (see Figure 8). Our proposed model is also conciliating the role of Sec5, a member of the exocyst, in the type I IFN response. On one hand, the exocyst has been shown to associate with both Sec61 β , a member of the translocon (Lipschutz et al, 2003; Toikkanen et al, 2003), and TBK1 (Chien et al, 2006). On the other hand, STING has been demonstrated to interact with the translocon (Ishikawa & Barber, 2008). Since, we have demonstrated that TRAF3 partially colocalizes and interacts with Sec61 β , probably at the ERGIC, and also associates to Sec5, the possibility that TRAF3 mediates the recruitment of TBK1 to the exocyst is likely conceivable. We speculate that the membranous network composed of the ER, Golgi and mitochondria provides a convenient platform on which antiviral cell-signaling complexes are arranged and optimally activated. If important, this model is likely to be conserved among different species. Notably, Cardif is part of a well-conserved mechanism among species since this system has also been reported to be functional in fish (Biacchesi et al, 2007). Fish TRAF3 has not been cloned so far, but interestingly, zebrafish TRIF was shown to be a Golgi-localized protein (Fan et al, 2008).

The notion of cellular proximity to favor exchanges between organelles has been an intense field of interest for many years. Recently, mitofusin 2 present on the ER was shown to tether the ER to mitochondria in order to promote efficient Ca²⁺ uptake into the mitochondria. Interestingly, mitofusin 2 was also shown to inhibit the RLH pathway signaling by interacting with the C-terminal of Cardif (Yasukawa et al, 2009). Also, the ER-resident E3 ubiquitin ligase RNF5 was shown to target STING/MITA/ERIS for

ubiquitination and degradation (Zhong et al, 2009). Furthermore, the Golgi localization of the glycolipid GD3 is important for its transport to the mitochondria after TNF α stimulation (Garcia-Ruiz et al, 2002; Tomassini et al, 2004). Membrane scrambling between Golgi and mitochondria following Fas stimulation is another example pointing to the connection between different cellular organelles (Ouasti et al, 2007).

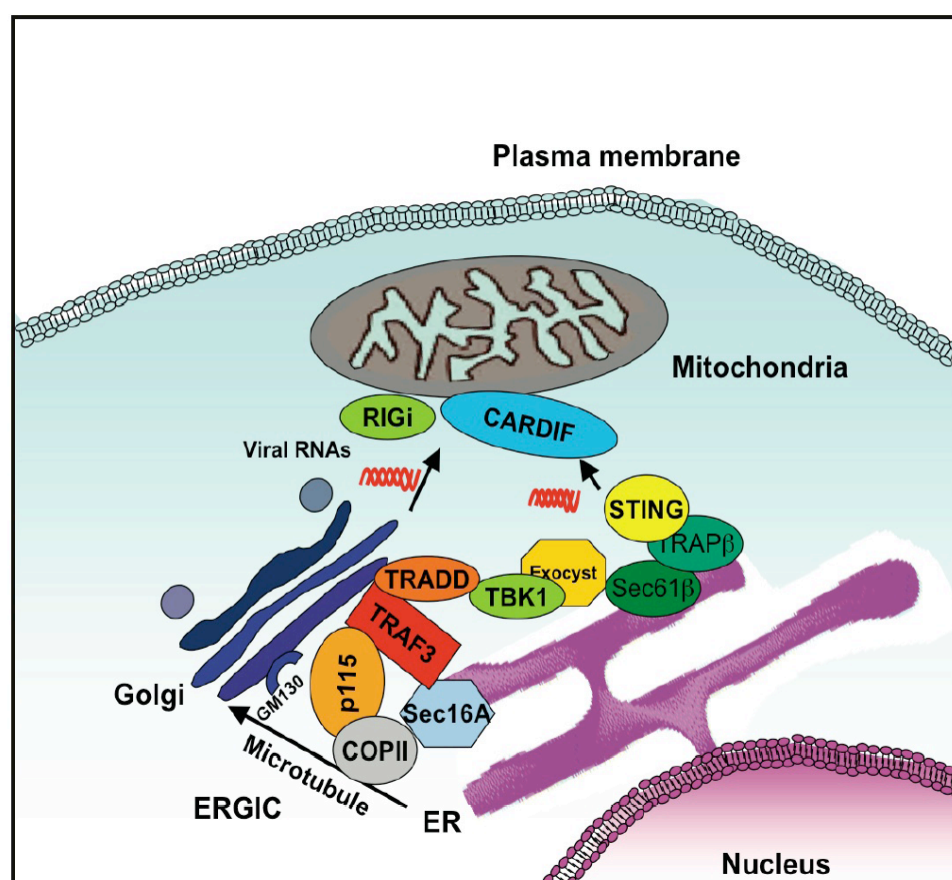


Figure 8

Figure 8. Proposed model. TRAF3 localizes to the ER-Golgi transport compartments through a p115 and Sec16A dependent mechanism. Its cellular localization favors its interaction with TRADD that is also located at the cis-Golgi, STING/MITA/ERIS that localizes on the membrane of the endoplasmic reticulum, the translocon components and the exocyst. During viral infections, viral double-stranded RNA or single-stranded RNA bearing 5'-triphosphate is recognized by the RNA helicase RIG-I in the cytosol. RIG-I then activates

Cardif, which is localized on the mitochondrial outer membrane. Through a dynamic process, TRAF3 and TRADD are then recruited to Cardif in order to trigger a TBK1-dependent antiviral response.

It is noteworthy that, as a common feature, plus strand RNA viruses have the ability to induce cytoplasmic membrane rearrangements that facilitate their replication. Consequently, the formation of these RNA replication complexes results in dramatic reorganization of the secretory pathway of host cells (Roosendaal et al, 2006). For example, poliovirus-infected cells accumulate membranous vesicles derived from COPII vesicles (Rust et al, 2001) whereas Kunjin virus induces “convoluted membranes” that contain markers from the ERGIC (Mackenzie & Westaway, 2001). The precise role for this internal membrane rearrangement in the virus propagation and virus-host interaction needs further investigations. Nevertheless, localization of TRAF3 and TRADD to these vesicular transport compartments could represent a cellular strategy to increase the rate of RNA detection and the formation of an effective signaling complex at the mitochondrial membrane. The observation that TRADD translocates from the cytoplasm to the mitochondria during Influenza A virus infection supports this model (Ohman et al, 2009).

Additionally, recent observations have highlighted the fact that viruses have evolved a variety of mechanisms involving the Golgi apparatus to particularly block TRAF3 recruitment into a functional signaling complex. Notably, the SARS Coronavirus triple-spanning membrane glycoprotein M, a Golgi localized protein, was recently found to impede the formation of a TRAF3-TANK-TBK1/IKKi complex by sequestering TRAF3 to the Golgi (Siu et al, 2009). The NY-1 strain Hantavirus glycoprotein (Gn) was also shown to disrupt TRAF3-TBK1 interaction by interacting with TRAF3 through its cytoplasmic tail (Alff et al, 2008).

In conclusion, our findings reveal a novel role of Sec16A and p115 in type I IFN response and in the subcellular localization of TRAF3 to the ER-Golgi Transport compartments. More in-depth studies to define the precise role of Sec16A and p115 in TRAF3-mediated type I IFN signaling are underway.

MATERIALS AND METHODS

Reagent, antibodies, and plasmids. Commercial antibody anti-GM130 was purchased from BD Transduction (San Jose, CA). The monoclonal anti-Flag epitope (M2), the polyclonal anti-Flag and the anti- β -actin (clone AC-74) were obtained from Sigma (Oakville, Ontario, Canada). The TRAF3 (G-6) and c-Myc (9E10) monoclonal antibodies were purchased from Santa Cruz (Santa Cruz, CA) as well as the polyclonal p115 (H-300). The anti-GFP (monoclonal 1218) antibody and the polyclonal goat anti-GFP antibody were respectively obtained from ABCAM (Cambridge, MA) and US Biological (Swampscott, MA). The anti-ERGIC53 and anti-calnexin were provided by Dr Michel Bouvier (IRIC, Montreal, Qc). The polyclonal anti-Sec61 β was obtained from Millipore (Billerica, MA). Plasmids encoding for EGFP-Sec16A and Myc-Sec5 were kind gifts of Dr. David Stephens (University of Bristol, UK) and Dr Charles Yeaman (University of Wisconsin, WI). TRAF3 and p115 cDNAs were amplified from the MGC bank collection and respectively subcloned in pcDNA3.1 and pTag2B (Flag) or pTag3B (Myc) vectors (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). TRADD and TRAF6 cDNAs were purchased from Origene (Rockville, MD) and subcloned in the pTag2B/3B vectors. The pFlag-CMV2-TBK1 and pcDNA3.1 Flag-Cardif construct were gift from Drs. John Hiscott and Rongtuan Lin respectively (McGill University). pcDNA3-His-TRIF construct was from Dr. Daniel Lamarre (Université de Montréal). The pRK5-TRAF2-Flag was obtained from Dr Nathalie Grandvaux (University of Montreal, Montreal). The IFN β reporter plasmid, pGL3-IFN- β -LUC was described previously (Lin R 1999) as well as the ISG56-luciferase reporter (Grandvaux et al, 2002a) and the NF- κ B p2(2)TK reporter plasmid (Servant et al, 2001b). Poly(I:C) was purchased from GE HealthCare (Waukesha, WI) and transfected with Lipo2000 (Invitrogen) at final concentration of 2 μ g/ml. BFA and nocodazole were obtained from Calbiochem and used at final concentration of 5 μ g/ml.

Cell culture, transfection and infections. HeLa, Hec1B, HEK 293T and HEK 293QBI cell lines were maintained in Dulbecco modified Eagle Medium supplemented with 10% fetal bovine serum. All DNA transfections in human cell lines were performed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Transient transfection of immortalized MEFs was performed by microporation with the Microporator Apparatus (Montreal Biotech) according to the manufacturers' instructions. MEFs TRAF3 KO were also reconstituted with human TRAF3 using pMSCV-TRAF3 and G418 selection. Sendai virus (SeV) was obtained from Specific Pathogen-Free Avian Supply (North Franklin, CT).

Immunoblot analysis and Immunoprecipitation. Preparation of whole cell extracts immunoprecipitation, Native-PAGE and immunoblot analysis were performed as described previously (Clement et al, 2008). For co-immunoprecipitation studies, cell extracts (750 µg) were incubated with 1 µg of anti-Flag or GFP antibody cross-linked to 30 µl of protein G-Sepharose beads for 4h at 4°C (GE Health Care). The beads were washed 5 times in lysis buffer and then resuspended in denaturing SDS loading buffer.

Confocal Microscopy. HeLa cells were transfected with the different constructs for 24 hours. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min followed by permeabilization with 0.2% Triton X-100 for 10 min. Cells were washed with PBS (pH 7.2) and blocked with 5% dry milk in PBS. Anti-Flag antibody (M2, Sigma) was used at 1:1000 in PBS 1% BSA, anti-GM130; 1:100, anti-ERGIC53; 1:100, anti-Flag polyclonal antibody; 1:400, anti-GFP (ABCAM); 1:100, anti-Myc 9E10; 1:100. Secondary fluorophore-conjugated antisera (Alexa Fluor 488 and 564) was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR) and used at 1:250 in PBS 1% BSA. The labeling of the nucleus was revealed by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. The confocal micrographs represent a

single optical section through the plane of the cell. Images were obtained using LSM510 software (Carl Zeiss, Inc.) and were displayed using Photoshop CS 3.0 (Adobe).

Flag affinity purification and mass spectrometric analysis. Flag-affinity purification was performed essentially as described previously (Chen GI and Gingras AC, 2007) with the following modifications. Detergent concentration in the lysis buffer was 0.5% NP-40; the lysis buffer was added at 4 ml/g wet cell pellet, and cells were subjected to passive lysis (30 minutes) followed by one freeze-thaw cycle and centrifugation. Immunoprecipitation was performed on the cleared lysate by adding 25 μ l packed FLAG M2 beads (Sigma) and incubating for two hours. Beads were washed three times in lysis buffer, and three times in 50mM ammonium bicarbonate. Samples were eluted with ammonium hydroxide, lyophilized in a speed-vac, resuspended in 50 mM ammonium bicarbonate (pH 8 - 8.3), and incubated at 37°C with trypsin overnight. The ammonium bicarbonate was evaporated, and the samples were resuspended in HPLC buffer A2 (2% acetonitrile, 0.1% formic acid), then directly loaded onto capillary columns packed in-house with Magic 5 μ m, 100A, C18AQ. MS/MS data was acquired in data-dependent mode (over a 2 hr acetonitrile 2 - 40% gradient) on a ThermoFinnigan LTQ or a ThermoFinnigan LTQ-Orbitrap, equipped with a Proxeon NanoSource and an Agilent 1100 capillary pump. Acquired RAW files were converted to mgf format, which were searched with the Mascot search engine (Matrix Sciences, London, UK) against the human RefSeq data base (release 24) with a precursor ion mass tolerance of 3.0 and a fragment ion mass tolerance of 0.8. Methionine oxidation was allowed as a variable modification, and trypsin specificity (with two missed cleavages allowed) was selected. The resulting list of RAW interactions was compared against a database of Flag AP-MS generated using the same protocol in the Gingras laboratory (n = 400). In particular, proteins detected in analyses of the tag alone, or detected in > 15% of the purifications were omitted. Only proteins detected in both of the biological replicates were considered for further analysis.

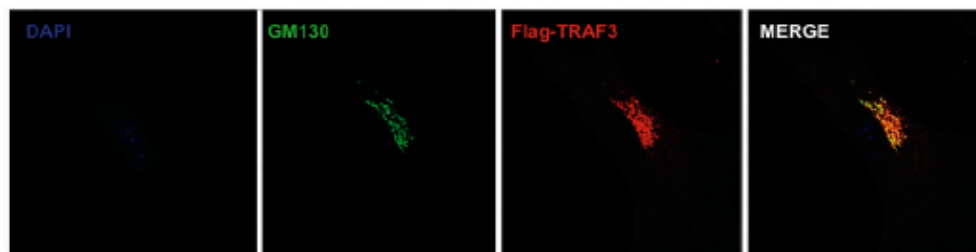
RNA Interference. HeLa cells were transfected with 40 nM siRNA using Lipo2000 (Invitrogen). The smart pool siRNA p115, Sec16A and the non-targeting pool siRNA were purchased from Dharmacon (Lafayette, CO).

RNA isolation and qPCR Analysis. After stimulation, total RNA was extracted from HeLa cells using Trizol reagent (Invitrogen). 2 µg of RNA was reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with random primers (Applied Biosystems) as described by the manufacturer. SYBR green PCR reactions were performed using 2 µl of cDNA samples (25-50 ng), 5 µl of the Fast SYBR qPCR Master Mix (Applied Biosystems) and 10 pmol of each primer in a total volume of 10 µl. The IFN α qRT-Primer set for real-time quantification of the IFN response (IFN β , ISG15, ISG56, MxA and OAS1) was purchased from InvivoGen (San Diego, CA). The ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) was used to measure the amplification level. All reactions were run in triplicate and the average Cts were used for quantification. GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was used as endogenous control.

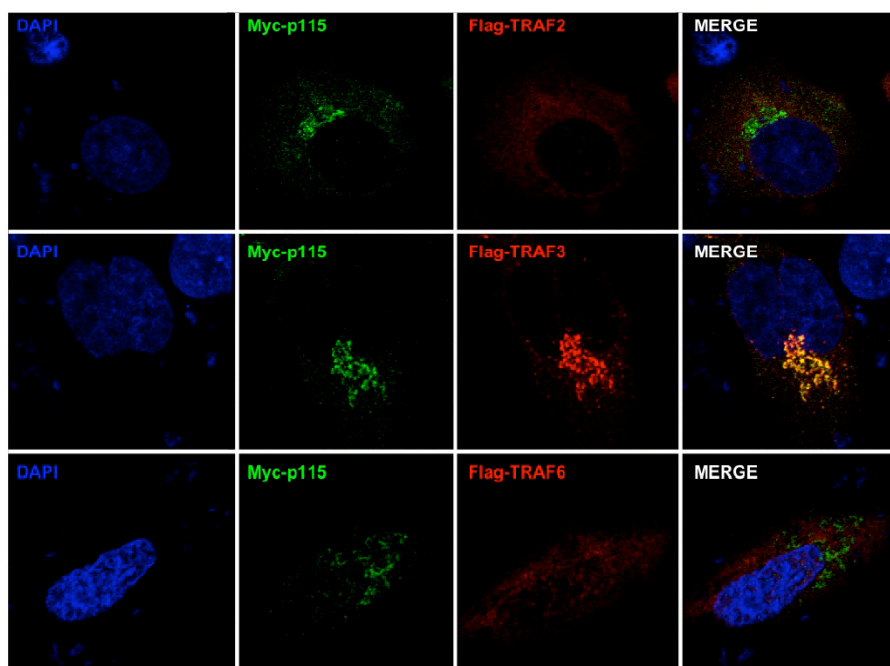
Reporter Gene Assays. Subconfluent Hec1B or HEK 293 QBI cells in 24 well-plates were transfected with 25 ng of pRLTK reporter (renilla luciferase for internal control) and 125 ng of pGL3-IFN- β -LUC, pGL3-ISG56-LUC or pGL3-NF κ B-LUC using the conventional CaPO₄ transfection protocol. Cells were harvested 24 hours post-transfection, lysed in passive lysis buffer (Promega, Madison, WI), and assayed for dual-luciferase activity using 10 µl of lysate according to the manufacturer's instructions. All firefly luciferase values were normalized to renilla luciferase to control for transfection efficiency.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Carl Ware, Dr John Hiscott, Peyman Nakahei, Dr Luis A Rokeach and Alexandre Leroux for sharing reagents. We thank the members of Sylvain Meloche laboratory for helpful discussions. We also thank the Genomics core facility of IRIC for the qPCR analysis and Marilyn Goudreault for help in generating the Flag-TRAF3 cell line. This work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to M.J.S. (MOP-84571) and A.C.G (MOP-84314). M.J.S. is the recipient of a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). JFC is supported by the Robert Dugal (RxD-CIHR) fellowship. S.M. and A.-C.G hold Canada Research Chairs in Cellular Signaling and Functional Proteomics respectively. A.-C.G. holds the Lea Reichmann Chair in Cancer Proteomics. Individual contributions of each author: J.F.C. performed the experiments, interpreted the data and participated in writing the paper. A.C.G. and L.M.D. contributed to the generation of stable cell lines, Flag affinity purification, mass spectrometry analysis and edited the manuscript. WVZ, PD, MS and TW performed the experiments. G.E. provided technical expertise in confocal microscopy data analysis and edited the manuscript. S.M. provided valuable advice and expertise and edited the manuscript. M.J.S. planned the experiments, interpreted the data and wrote the paper.



Supplemental Figure 1. TRAF3^{-/-} MEFs were electroporated with a construct encoding for human Flag-TRAF3. 48 hours post-electroporation, cells were analyzed by confocal microscopy as indicated. The Golgi apparatus was labeled with an anti-GM130 antibody.



Supplemental Figure 2. Colocalization of TRAF2 (lane 1), TRAF3 (lane 2) or TRAF6 (lane 3) with Myc-p115 as described in Figure 3F.

REFERENCES

- Alff PJ, Sen N, Gorbunova E, Gavrilovskaya IN, Mackow ER (2008) The NY-1 hantavirus Gn cytoplasmic tail coprecipitates TRAF3 and inhibits cellular interferon responses by disrupting TBK1-TRAF3 complex formation. *J Virol* **82**(18): 9115-9122
- Allan BB, Moyer BD, Balch WE (2000) Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science* **289**(5478): 444-448
- Alvarez C, Fujita H, Hubbard A, Sztul E (1999) ER to Golgi transport: Requirement for p115 at a pre-Golgi VTC stage. *J Cell Biol* **147**(6): 1205-1222
- Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, Goodbourn S, Randall RE (2004) The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(49): 17264-17269
- Appenzeller-Herzog C, Hauri HP (2006) The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J Cell Sci* **119**(Pt 11): 2173-2183
- Barr FA, Short B (2003) Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* **15**(4): 405-413
- Beard M, Satoh A, Shorter J, Warren G (2005) A cryptic Rab1-binding site in the p115 tethering protein. *J Biol Chem* **280**(27): 25840-25848
- Biacchesi S, Le Berre M, Le Guillou S, Benmansour A, Bremont M, Quillet E, Boudinot P (2007) Fish genotype significantly influences susceptibility of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to waterborne infection with infectious salmon anaemia virus. *J Fish Dis* **30**(10): 631-636
- Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Croughton K, Cruciat C, Eberhard D, Gagneur J, Ghidelli S, Hopf C, Huhse B, Mangano R, Michon AM, Schirle M, Schlegl J, Schwab M, Stein MA, Bauer A, Casari G, Drewes G, Gavin AC, Jackson DB, Joberty G, Neubauer G, Rick J, Kuster B, Superti-Furga G (2004) A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* **6**(2): 97-105
- Bradley JR, Pober JS (2001) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* **20**(44): 6482-6491

- Brodeur SR, Cheng G, Baltimore D, Thorley-Lawson DA (1997) Localization of the major NF-kappaB-activating site and the sole TRAF3 binding site of LMP-1 defines two distinct signaling motifs. *J Biol Chem* **272**(32): 19777-19784
- Cao X, Ballew N, Barlowe C (1998) Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *EMBO J* **17**(8): 2156-2165
- Chien Y, Kim S, Bumeister R, Loo YM, Kwon SW, Johnson CL, Balakireva MG, Romeo Y, Kopelovich L, Gale M, Jr., Yeaman C, Camonis JH, Zhao Y, White MA (2006) RalB GTPase-mediated activation of the IkappaB family kinase TBK1 couples innate immune signaling to tumor cell survival. *Cell* **127**(1): 157-170
- Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U (2002) BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol* **3**(10): 958-965
- Clement JF, Bibeau-Poirier A, Gravel SP, Grandvaux N, Bonneil E, Thibault P, Meloche S, Servant MJ (2008) Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 generates a hyperactive form of IRF-3 through regulation of dimerization and CBP association. *J Virol* **82**(8): 3984-3996
- Coope HJ, Atkinson PG, Huhse B, Belich M, Janzen J, Holman MJ, Klaus GG, Johnston LH, Ley SC (2002) CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J* **21**(20): 5375-5385
- Dejardin E, Droin NM, Delhase M, Haas E, Cao Y, Makris C, Li ZW, Karin M, Ware CF, Green DR (2002) The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* **17**(4): 525-535
- Fan S, Chen S, Liu Y, Lin Y, Liu H, Guo L, Lin B, Huang S, Xu A (2008) Zebrafish TRIF, a Golgi-localized protein, participates in IFN induction and NF-kappaB activation. *J Immunol* **180**(8): 5373-5383
- Garcia-Ruiz C, Colell A, Morales A, Calvo M, Enrich C, Fernandez-Checa JC (2002) Trafficking of ganglioside GD3 to mitochondria by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* **277**(39): 36443-36448
- Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, Diamond MS, Colonna M (2006) Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(22): 8459-8464
- Grandvaux N, Servant MJ, tenOever B, Sen GC, Balachandran S, Barber GN, Lin R, Hiscott J (2002) Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J Virol* **76**(11): 5532-5539

Greenfield JJ, High S (1999) The Sec61 complex is located in both the ER and the ER-Golgi intermediate compartment. *J Cell Sci* **112** (Pt 10): 1477-1486

Hacker H, Redecke V, Blagoev B, Kratchmarova I, Hsu LC, Wang GG, Kamps MP, Raz E, Wagner H, Hacker G, Mann M, Karin M (2006) Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* **439**(7073): 204-207

Hauer J, Puschner S, Ramakrishnan P, Simon U, Bongers M, Federle C, Engelmann H (2005) TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(8): 2874-2879

Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV (1996) TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* **4**(4): 387-396

Iinuma T, Aoki T, Arasaki K, Hirose H, Yamamoto A, Samata R, Hauri HP, Arimitsu N, Tagaya M, Tani K (2009) Role of syntaxin 18 in the organization of endoplasmic reticulum subdomains. *J Cell Sci* **122**(Pt 10): 1680-1690

Iinuma T, Shiga A, Nakamoto K, O'Brien MB, Aridor M, Arimitsu N, Tagaya M, Tani K (2007) Mammalian Sec16/p250 plays a role in membrane traffic from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **282**(24): 17632-17639

Ishikawa H, Barber GN (2008) STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**(7213): 674-678

Jones SJ, Ledgerwood EC, Prins JB, Galbraith J, Johnson DR, Pober JS, Bradley JR (1999) TNF recruits TRADD to the plasma membrane but not the trans-Golgi network, the principal subcellular location of TNF-R1. *J Immunol* **162**(2): 1042-1048

Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O, Akira S (2005) Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* **23**(1): 19-28

Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S (2005) IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* **6**(10): 981-988

Kondylis V, Rabouille C (2003) A novel role for dp115 in the organization of tER sites in *Drosophila*. *J Cell Biol* **162**(2): 185-198

Lee MS, Kim YJ (2007) Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem* **76**: 447-480

- Ling L, Goeddel DV (2000) MIP-T3, a novel protein linking tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 to the microtubule network. *J Biol Chem* **275**(31): 23852-23860
- Lippincott-Schwartz J, Donaldson JG, Schweizer A, Berger EG, Hauri HP, Yuan LC, Klausner RD (1990) Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* **60**(5): 821-836
- Lipschutz JH, Lingappa VR, Mostov KE (2003) The exocyst affects protein synthesis by acting on the translocation machinery of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **278**(23): 20954-20960
- Mackenzie JM, Westaway EG (2001) Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J Virol* **75**(22): 10787-10799
- Marra P, Maffucci T, Daniele T, Tullio GD, Ikehara Y, Chan EK, Luini A, Beznoussenko G, Mironov A, De Matteis MA (2001) The GM130 and GRASP65 Golgi proteins cycle through and define a subdomain of the intermediate compartment. *Nat Cell Biol* **3**(12): 1101-1113
- Merk M, Baugh J, Zierow S, Leng L, Pal U, Lee SJ, Ebert AD, Mizue Y, Trent JO, Mitchell R, Nickel W, Kavathas PB, Bernhagen J, Bucala R (2009) The Golgi-associated protein p115 mediates the secretion of macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol* **182**(11): 6896-6906
- Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J (2005) Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**(7062): 1167-1172
- Michallet MC, Meylan E, Ermolaeva MA, Vazquez J, Rebsamen M, Curran J, Poeck H, Bscheider M, Hartmann G, Konig M, Kalinke U, Pasparakis M, Tschopp J (2008) TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway. *Immunity* **28**(5): 651-661
- Molina S, Sanz MA, Madan V, Ventoso I, Castello A, Carrasco L (2007) Differential inhibition of cellular and Sindbis virus translation by brefeldin A. *Virology* **363**(2): 430-436
- Morgan M, Thorburn J, Pandolfi PP, Thorburn A (2002) Nuclear and cytoplasmic shuttling of TRADD induces apoptosis via different mechanisms. *J Cell Biol* **157**(6): 975-984
- Moyer BD, Allan BB, Balch WE (2001) Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis-Golgi tethering. *Traffic* **2**(4): 268-276

- Nakamura N, Lowe M, Levine TP, Rabouille C, Warren G (1997) The vesicle docking protein p115 binds GM130, a cis-Golgi matrix protein, in a mitotically regulated manner. *Cell* **89**(3): 445-455
- Nakamura N, Rabouille C, Watson R, Nilsson T, Hui N, Slusarewicz P, Kreis TE, Warren G (1995) Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol* **131**(6 Pt 2): 1715-1726
- Nelson DS, Alvarez C, Gao YS, Garcia-Mata R, Fialkowski E, Sztul E (1998) The membrane transport factor TAP/p115 cycles between the Golgi and earlier secretory compartments and contains distinct domains required for its localization and function. *J Cell Biol* **143**(2): 319-331
- Oganesyan G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, Perry A, Cheng G (2006) Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* **439**(7073): 208-211
- Ohman T, Rintahaka J, Kalkkinen N, Matikainen S, Nyman TA (2009) Actin and RIG-I/MAVS signaling components translocate to mitochondria upon influenza A virus infection of human primary macrophages. *J Immunol* **182**(9): 5682-5692
- Ouasti S, Matarrese P, Paddon R, Khosravi-Far R, Sorice M, Tinari A, Malorni W, Degli Esposti M (2007) Death receptor ligation triggers membrane scrambling between Golgi and mitochondria. *Cell Death Differ* **14**(3): 453-461
- Pietras EM, Cheng G (2008) A New TRADDition in intracellular antiviral signaling. *Sci Signal* **1**(30): pe36
- Puthenveedu MA, Bachert C, Puri S, Lanni F, Linstedt AD (2006) GM130 and GRASP65-dependent lateral cisternal fusion allows uniform Golgi-enzyme distribution. *Nat Cell Biol* **8**(3): 238-248
- Puthenveedu MA, Linstedt AD (2004) Gene replacement reveals that p115/SNARE interactions are essential for Golgi biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(5): 1253-1256
- Roosendaal J, Westaway EG, Khromykh A, Mackenzie JM (2006) Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. *J Virol* **80**(9): 4623-4632
- Rust RC, Landmann L, Gosert R, Tang BL, Hong W, Hauri HP, Egger D, Bienz K (2001) Cellular COPII proteins are involved in production of the vesicles that form the poliovirus replication complex. *J Virol* **75**(20): 9808-9818

- Saha SK, Pietras EM, He JQ, Kang JR, Liu SY, Oganessian G, Shahangian A, Zarnegar B, Shiba TL, Wang Y, Cheng G (2006) Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J* **25**(14): 3257-3263
- Seemann J, Jokitalo E, Pypaert M, Warren G (2000a) Matrix proteins can generate the higher order architecture of the Golgi apparatus. *Nature* **407**(6807): 1022-1026
- Seemann J, Jokitalo EJ, Warren G (2000b) The role of the tethering proteins p115 and GM130 in transport through the Golgi apparatus in vivo. *Mol Biol Cell* **11**(2): 635-645
- Servant MJ, ten Oever B, LePage C, Conti L, Gessani S, Julkunen I, Lin R, Hiscott J (2001) Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Biol Chem* **276**(1): 355-363
- Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ (2005) Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**(5): 669-682
- Siu KL, Kok KH, Ng MH, Poon VK, Yuen KY, Zheng BJ, Jin DY (2009) Severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein inhibits type I interferon production by impeding the formation of TRAF3-TANK-TBK1/IKK{epsilon} complex. *J Biol Chem*
- Sohda M, Misumi Y, Yoshimura S, Nakamura N, Fusano T, Sakisaka S, Ogata S, Fujimoto J, Kiyokawa N, Ikehara Y (2005) Depletion of vesicle-tethering factor p115 causes mini-stacked Golgi fragments with delayed protein transport. *Biochem Biophys Res Commun* **338**(2): 1268-1274
- Sonnichsen B, Lowe M, Levine T, Jamsa E, Dirac-Svejstrup B, Warren G (1998) A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J Cell Biol* **140**(5): 1013-1021
- Sun W, Li Y, Chen L, Chen H, You F, Zhou X, Zhou Y, Zhai Z, Chen D, Jiang Z (2009) ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(21): 8653-8658
- Thyberg J, Moskalewski S (1985) Microtubules and the organization of the Golgi complex. *Exp Cell Res* **159**(1): 1-16
- Thyberg J, Moskalewski S (1999) Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. *Exp Cell Res* **246**(2): 263-279
- Toikkanen JH, Miller KJ, Soderlund H, Jantti J, Keranen S (2003) The beta subunit of the Sec61p endoplasmic reticulum translocon interacts with the exocyst complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**(23): 20946-20953

Tomassini B, Malisan F, Franchi L, Nicolo C, Calvo GB, Saito T, Testi R (2004) Calnexin suppresses GD3 synthase-induced apoptosis. *FASEB J* **18**(13): 1553-1555

Vallabhapurapu S, Matsuzawa A, Zhang W, Tseng PH, Keats JJ, Wang H, Vignali DA, Bergsagel PL, Karin M (2008) Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol* **9**(12): 1364-1370

Waters MG, Clary DO, Rothman JE (1992) A novel 115-kD peripheral membrane protein is required for intercisternal transport in the Golgi stack. *J Cell Biol* **118**(5): 1015-1026

Watson P, Townley AK, Koka P, Palmer KJ, Stephens DJ (2006) Sec16 defines endoplasmic reticulum exit sites and is required for secretory cargo export in mammalian cells. *Traffic* **7**(12): 1678-1687

Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB (2005) VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* **19**(6): 727-740

Yasukawa K, Oshiumi H, Takeda M, Ishihara N, Yanagi Y, Seya T, Kawabata S, Koshiba T (2009) Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. *Sci Signal* **2**(84): ra47

Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**(7): 730-737

Zarnegar BJ, Wang Y, Mahoney DJ, Dempsey PW, Cheung HH, He J, Shiba T, Yang X, Yeh WC, Mak TW, Korneluk RG, Cheng G (2008) Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol* **9**(12): 1371-1378

Zhong B, Yang Y, Li S, Wang YY, Li Y, Diao F, Lei C, He X, Zhang L, Tien P, Shu HB (2008) The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* **29**(4): 538-550

Zhong B, Zhang L, Lei C, Li Y, Mao AP, Yang Y, Wang YY, Zhang XL, Shu HB (2009) The ubiquitin ligase RNF5 regulates antiviral responses by mediating degradation of the adaptor protein MITA. *Immunity* **30**(3): 397-407

Chapitre 6. Discussion et perspectives

6.1 IRF-3, une protéine hyperphosphorylée

6.1.1 L'importance des sites en C-terminal : la controverse persiste

La phosphorylation réversible des protéines est une modification post-traductionnelle critique dans la signalisation cellulaire. Élucider et caractériser les sites de phosphorylation sur une protéine devient donc essentiel pour comprendre la régulation de certains processus cellulaires clés. Toutefois, cette caractérisation représente un défi technique de taille. Les limitations liées à la méthode d'analyse par dégradation d'Edman des phosphoprotéines radiomarquées au P^{32} ont notamment accéléré le développement de la spectrométrie de masse pour permettre le séquençage des phosphopeptides.

Bien que nous ayons utilisé cette technique pour étudier la phosphorylation de IRF-3, la controverse concernant les sites ciblés par TBK1/IKKi reste toujours présente. Peu de temps avant la sortie de notre étude, Panne et collaborateurs ont purifié la forme constitutivement active de IRF-3 (IRF-3 5D) exprimée dans des cellules d'insecte en utilisant une colonne d'exclusion basée sur la taille afin d'obtenir uniquement la forme dimérique (Panne et al, 2007a). Leurs résultats de spectrométrie de masse ont démontré une phosphorylation complète du dimère au niveau de son *cluster* I, suggérant ainsi une phosphorylation constitutive des Ser385/386 *in vivo* par une kinase présente dans les cellules d'insecte. Ce résultat de phosphorylation en deux étapes est en accord avec notre modèle, où nous suggérons que la phosphorylation des *clusters* II et III favorise la phosphorylation du *cluster* I nécessaire à la dimérisation de IRF-3 (voire l'article présenté au Chapitre 4, Figure 6; modèle d'activation de IRF-3 en deux étapes). Toutefois, en

analysant IRF-3 phosphorylé *in vitro* par la kinase TBK1, ce groupe conclu que le résidu ciblé par la kinase est la Thr404 ou la Ser405. De façon intéressante, ils observent également la présence d'un site de phosphorylation résiduel lorsque ces deux résidus sont mutés en alanine (IRF-3 T404A S405A). Ils sont cependant incapables de préciser s'il s'agit de la Ser396, Ser398 ou Ser402. Les résidus Thr404 et Ser405 sont situés entre le feuillet β 13 et l'hélice α 5 faisant partie du *core* hydrophobe de la structure autoinhibitrice (Qin et al, 2003) (**voir Figure 17**). La Thr404 forme un N-cap pour l'hélice α 5 grâce à un pont hydrogène la reliant au groupement amide de la Gln407. La Ser405 entre en contact avec la Lys409, l'Asp406 et la Tyr408. Panne et ses collègues proposent donc que la phosphorylation en Thr404 ou Ser405 provoque un réarrangement de la structure inhibitrice afin de démasquer les surfaces hydrophobes des hélices α 3 et α 4 nécessaires à l'interaction avec CBP. Nous avons toutefois démontré que le mutant IRF-3/3A (S402A, T404A et S405A) s'associait toujours *in vivo* avec CBP (Clement et al, 2008). La phosphorylation de ces sites ne serait donc pas un pré-requis pour cette association. Par conséquent, nous proposons que leur site de phosphorylation résiduel non identifié soit la Ser396. Cette sérine est localisée dans la boucle L6 (**voir Figure 17-18**) et forme un pont hydrogène avec la chaîne principale amide du Glu201 et potentiellement avec la chaîne latérale du Glu200 (**voir Figure 18B**). Selon Takahasi et collègues, la phosphorylation en Ser396 peut aussi déstabiliser la structure autoinhibitrice de IRF-3 (Takahasi et al, 2003). Question de solidifier nos propos, il aurait été intéressant de démontrer la présence de phosphorylation en Ser396 sur notre mutant IRF-3/3A, soit par la technique de spectrométrie de masse ou à l'aide d'un anticorps pSer396. Par contre, nos données démontrent clairement que la mutation de cette sérine provoque une perte d'association à CBP *in vivo* (Clement et al, 2008; Servant et al, 2003).

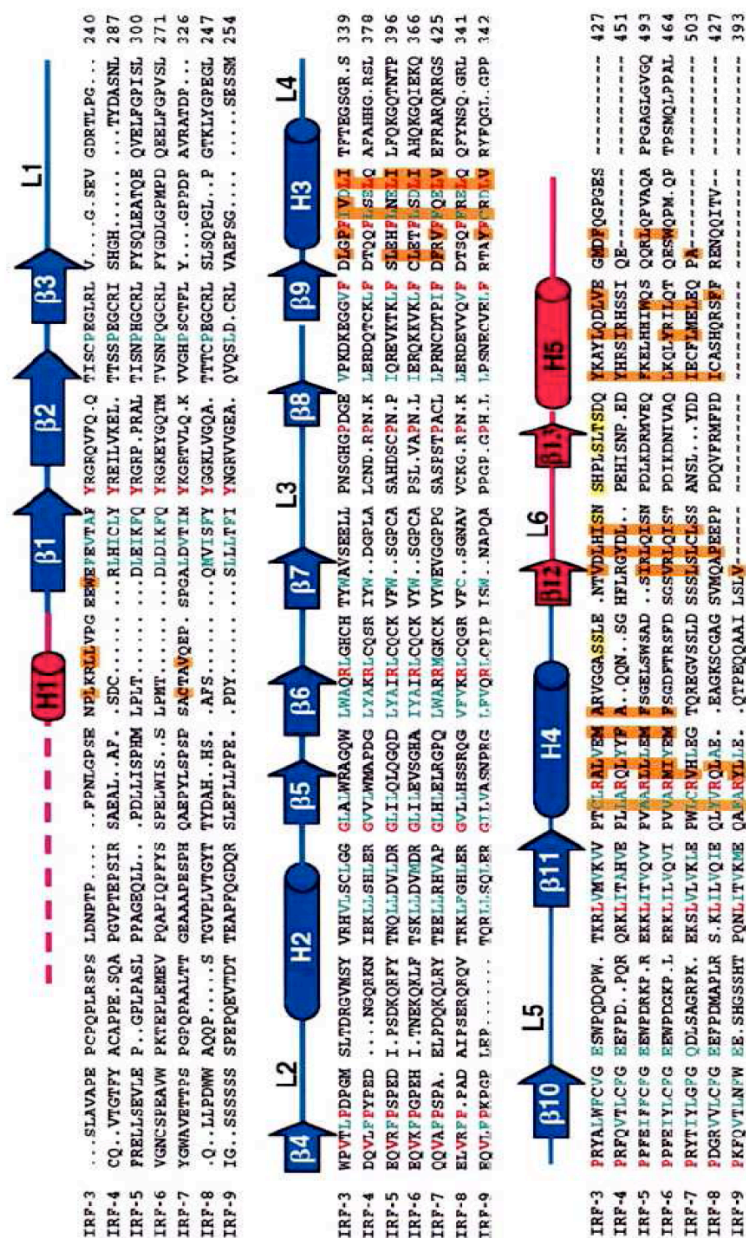


Figure 17. Alignement de séquence du domaine de transactivation localisé en C-terminal des différents IRFs

Les structures secondaires de IRF-3, estimées par cristallographie, sont représentées au dessus de l'alignement. La ligne pointillée au niveau du N-terminal représente le segment étant présent dans le fragment de IRF-3 lors des études cristallographiques, mais dont la structure était désordonnée. Le IAD est en cyan. La

structure autoinhibitrice est en mauve. Les acides aminés identiques sont en rouge alors que ceux conservés sont en vert. Les résidus hydrophobiques dans les hélices H3 et H4 et la structure autoinhibitrice de IRF-3 impliquée dans les interactions inhibitrices sont en brun. Les sites potentiels de phosphorylation sont en jaune. Figure tirée de (Qin et al, 2003).

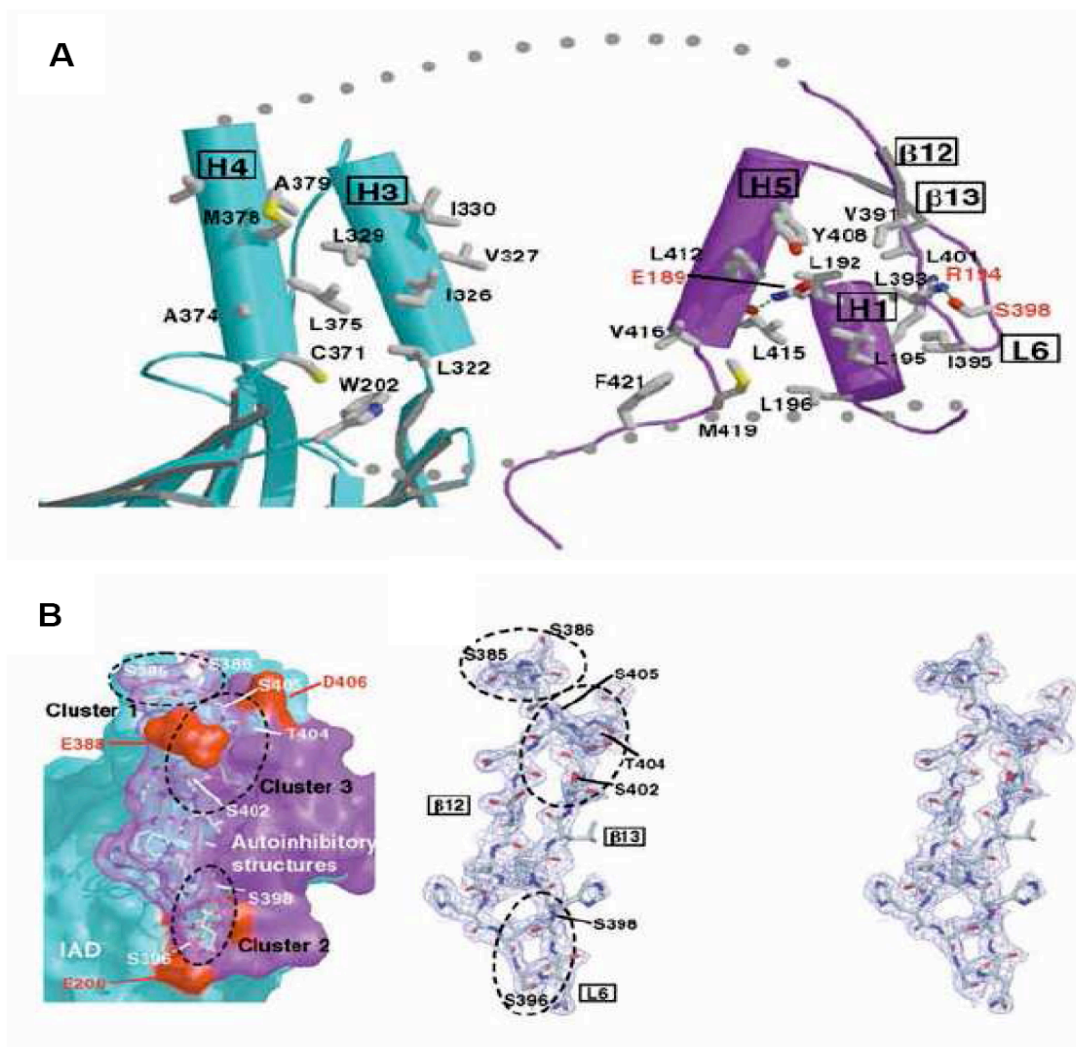


Figure 18. Structure 3D de IRF-3 basée sur le modèle d'autoinhibition

A) L'autoinhibition est médiée par des contacts hydrophobiques entre les hélices H3 et H4 du IAD et les structures autoinhibitrices. Les surfaces d'interaction sur le IAD (cyan) et la structure autoinhibitrice (mauve) sont montrées côte à côte par séparation des deux surfaces pour que les chaînes latérales hydrophobiques (gris) sur chaque surface puissent être vues. B). Représentation de surface des sites de phosphorylation sur

IRF-3. Le IAD est en cyan. Les structures autoinhibitrices en N-terminal et C-terminal sont en mauve. Les 3 *clusters* de phosphorylation sont encerclés. Figure tirée de (Qin et al, 2003).

À l'aide de techniques détaillées de thermodynamique, Chen et collaborateurs démontrent également des rôles importants de la Ser396 et de la Ser386 pour l'association de IRF-3 à CBP (Chen et al, 2008). Parmi tous les mutants phosphomimétiques de IRF-3 (S385D, S386D, S396D, S398D, S402D, T404D, S405D), IRF-3 S396D est celui qui présente la plus forte interaction avec CBP. De plus, cette interaction est augmentée en présence d'une phosphorylation en Ser386 (IRF3 S386/396D). En accord avec notre modèle, ce groupe propose que l'ajout d'une charge négative au niveau de la Ser396 provoque un phénomène de répulsion avec les charges négatives des résidus Glu200 et Glu201, permettant ainsi la libération des sites de liaison à CBP. De façon intéressante, leurs résultats démontrent pour la première fois un rôle antagoniste de la Ser385 par rapport à celui de la Ser386. Contrairement à la Ser386, la phosphorylation en Ser385, lorsque jumelée à celle de la Ser396, réduirait l'association à CBP (IRF3 S385D/S396D). Les effets de la Ser385 et de la Ser386 sont toutefois plus difficiles à rationaliser, car ces résidus sont localisés au début de la région autoinhibitrice (**voir Figure 18 B**). Ils pourraient donc théoriquement faire partie d'un *hinge* nécessaire au dépliement de la région autoinhibitrice (Chen et al, 2008).

Dans une autre étude récemment publiée, Fujii et collègues ont utilisé une analyse protéomique basée sur le LC-MS/MS afin de démontrer les sites phosphorylés par la kinase IKKi (Fujii et al). Trois principales formes phosphorylées de IRF-3 ont été identifiées. En accord avec nos résultats, ils démontrent la présence de peptides monophosphorylés en Ser402 et de peptides diphosphorylés en Ser396/Ser402. TBK1 et IKKi possèderaient donc une spécificité *in vitro* très similaire pour le C-terminal de IRF-3. Toutefois, leurs analyses permettent également l'identification de peptides diphosphorylés en Ser386/Ser402. Leurs résultats suggèrent fortement que la phosphorylation en Ser402 puisse être responsable

d'augmenter l'accessibilité des autres sites pour une phosphorylation subséquente. Toutefois, comme il semble exister deux sortes de peptides disphosphorylés de IRF-3, Ser402/Ser396 et Ser402/Ser386, il devient alors difficile de préciser si la phosphorylation de la Ser396 précède réellement celle de la Ser386 comme nous le proposons. Néanmoins, leurs résultats corrèlent avec ceux de nos analyses du mutant IRF-3 5A (*clusters* II et III complètement mutés en alanine) qui suggèrent aussi la phosphorylation du *cluster* I par les IKK-related kinases. Il devient également tentant de spéculer que TBK1 ou IKKi soit la kinase inconnue phosphorylant IRF-3 5D sur la Ser385/Ser386 dans les expériences de Panne et collaborateurs (Panne et al, 2007a).

Les études mentionnées ci-dessus présentent toutefois le désavantage d'avoir identifié leurs sites de phosphorylation par des techniques de phosphorylation *in vitro* (Clement et al, 2008; Fujii et al; Panne et al, 2007a) ou de pseudophosphorylation artificielle (Chen et al, 2008; Panne et al, 2007a). Nous avons donc tenté d'identifier les sites de phosphorylation induits *in vivo* par une infection virale. Malgré l'acharnement, nous n'avons pas été capables de détecter les sites présents en C-terminal. Une phosphorylation constitutive semblait cependant présente sur la Ser175 et la Thr219 (Clément et al, résultats non présentés). Ces sites concordaient avec les observations de Whatelet et collaborateurs concernant la phosphorylation partielle de IRF-3 dans les cellules non infectées (Wathelet et al, 1998) et les études de Servant et collègues sur la phosphorylation en N-terminal de IRF-3. Nous avons investigué l'impact de ces sites de phosphorylation sur l'activation de IRF-3, mais aucune différence notable n'a pu être observée chez le mutant IRF-3 S175A ou IRF-3 T219A en comparaison avec le IRF-3 WT (**voir Figure 19**). De plus, la mystérieuse forme II de IRF-3 est toujours visible malgré la présence de ces mutations (**voir Figure 19**) et sa dimérisation suivant une infection virale n'est pas altérée (Clément JF, résultats non présentés).

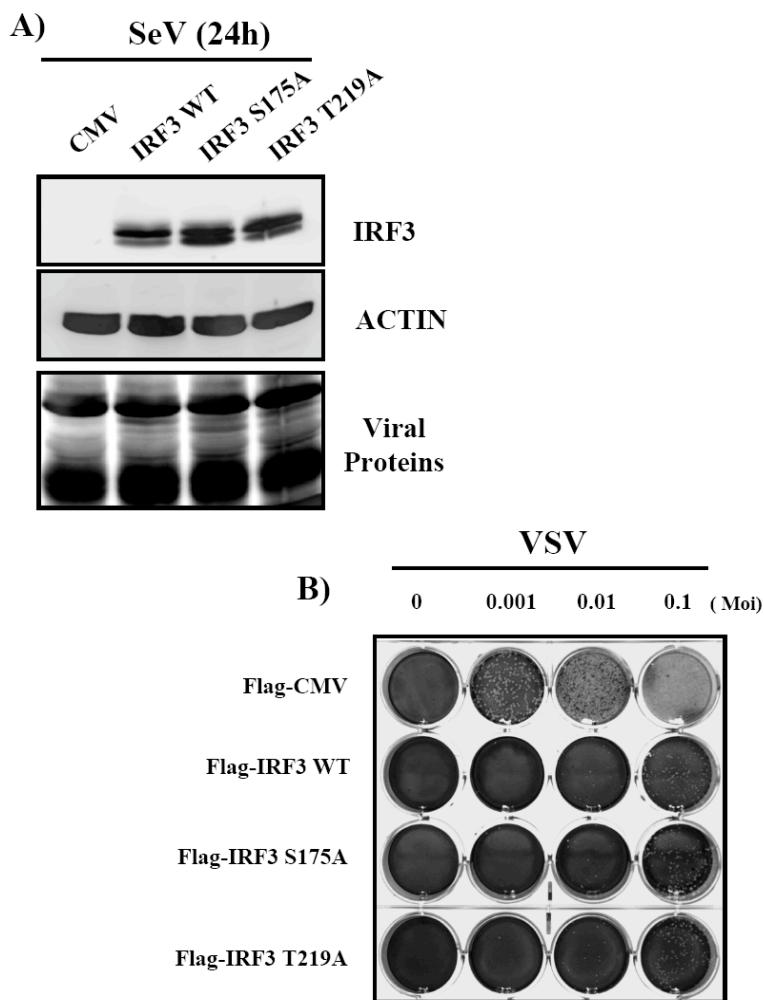


Figure 19. Aucun rôle pour la Ser175 et la Thr219 dans l'activation de IRF-3 et la production d'IFN β

A) Analyse par immunobuvardage des niveaux d'expression de Flag-IRF3 et des protéines virales dans les HeLa 20h post-infection. B) Des cellules HeLa dans des plaques 6 puits ont été transfectées avec 0,5 μ g du plasmide indiqué. 24h post-transfection, les cellules ont été infectées ou non avec du SeV (200 HAU/ml) pour une durée de 2h. Les cellules ont été ensuite rincées intensivement et couvertes de milieu frais. 20 h post-infection les surnageants contenant les cytokines antivirales ont été récoltées et transférées sur des cellules Vero en culture dans des plaques 12 puits. Après 16h d'incubation, les cellules Vero ont été lavées et infectées avec différent MOI de VSV dans du milieu sans sérum. 1h post-infection, le milieu a été remplacé par du DMEM 1% méthylcellulose et FBS. Les effets sont évalués par un essai standard de titration en plaque grâce aux plages de lyse induites par le VSV.

Le groupe du Dr Anthonsen a également eu l'idée d'analyser les résidus phosphorylés *in vivo* sur IRF-3 suivant une infection au SeV (Bergstroem et al). À l'instar de nos résultats, ils proposent aussi une phosphorylation constitutive en Ser175 en plus d'une autre située en Ser173. En présence d'une infection virale, des phosphorylations sur la Ser396, la Ser386 et la Thr390 sont observées (**voir Figure 20**). Toutefois, la phosphorylation en Thr390 est toujours concomitante à celle de la Ser396 ou de la Ser386. Ils ont ensuite tenté de vérifier si TBK1 phosphorylait ces sites *in vitro*, mais aucun site n'a pu être détecté en raison d'une ionisation trop importante du peptide C-terminal. Toutefois, à l'aide des anticorps phosphospécifiques dirigés contre la Ser386 et Ser396, ils démontrent que TBK1 ciblent ces deux sites *in vitro*. Ceci confirme notamment nos résultats publiés sur la Ser396 (**voir Chapitre 4**). En ce qui concerne la Thr390, leurs données suggèrent une implication de cette phosphorylation dans le processus de liaison à CBP et dans la transactivation du gène IFN β . Selon leur modèle, cette phosphorylation en Thr390 permettrait la phosphorylation subséquente de la Ser396. De plus, comme leurs analyses de MS/MS ont révélé la présence de phosphorylation en Ser385/386 dans les conditions non infectées, ils proposent que la séquence de phosphorylation soit la suivante : Ser385/386, Thr390 et finalement Ser396. Ce modèle proposé contraste cependant avec certains de leurs résultats publiés dans le même article. Premièrement, le mutant IRF-3 T390A s'associe toujours avec CBP, ce qui laisse présager que la phosphorylation en Ser396 est toujours présente pour assumer cette fonction. Deuxièmement, ils démontrent à l'aide de l'anticorps phosphospécifique pSer396 que cette phosphorylation a toujours lieu sur IRF-3 T390A. Finalement, en combinant la mutation T390D à la mutation S396D, ils génèrent un IRF-3 T390/S396D qui s'associe plus faiblement à CBP que la forme phosphomimétique IRF-3 S396D. Sans minimiser l'importance de certaines de leurs observations, leur modèle nécessiterait une certaine révision. De plus, parmi tous les groupes qui étudient l'activation de IRF-3, Bergstroem et collaborateurs sont les seuls à avoir détecté de la phosphorylation en Ser386 sur la forme monomérique de IRF-3.

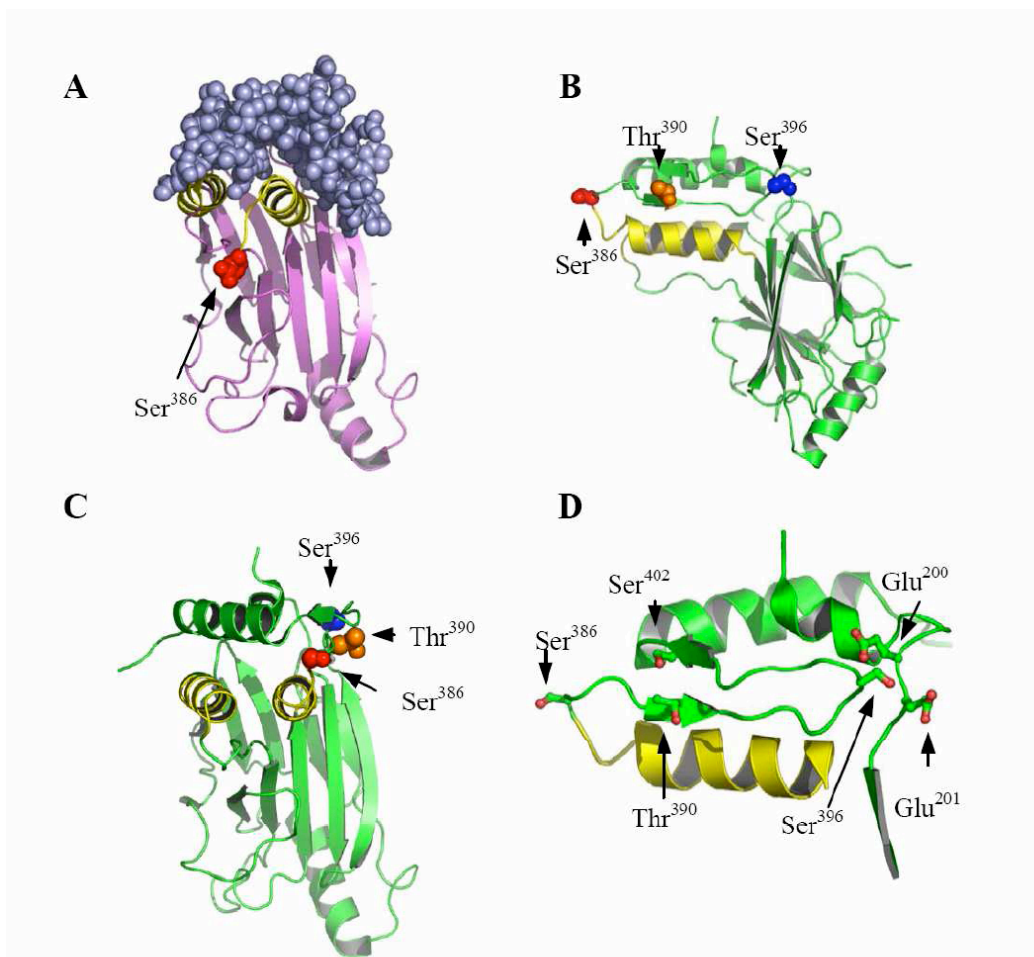


Figure 20. Structure 3D montrant les différents sites de phosphorylation de IRF-3

A) IRF-3 sans son domaine de régulation en C-terminal co-cristallisé avec le domaine de liaison à IRF-3 de CBP. Les deux unités IRF-3/CBP trouvés dans la structure cristallographique sont montrées. IRF-3 est schématisé par la représentation en ruban (rose), alors que CBP remplit l'espace (mauve). Les deux hélices α de IRF-3 interagissant avec CBP sont identifiées en jaune. B-C) Le *backbone* de IRF-3 est schématisé par une représentation en ruban (vert). Les sites de phosphorylations sont identifiés (rouge : Ser386, orange : Thr390, bleu : Ser396). D) Magnification de la figure en A et B illustrant les résidus à proximité des Ser386, Thr390 et Ser396. Figure tirée de (Bergstroem et al).

En somme, bien que les modèles d'activation de IRF-3 diffèrent entre les groupes de recherche, l'importance de la Ser396 est toujours soulignée. Sa phosphorylation par les IKK-related kinases et son rôle dans l'association à CBP semblent maintenant bien

acceptés. L'ensemble des données de la littérature suggère que la phosphorylation de la Ser396 précède celle de la Ser385/Ser386, mais quelques groupes s'y opposent encore. La technique de spectrométrie de masse a permis de faire avancer rapidement le domaine de la phosphorylation de IRF-3. Toutefois, nous devons être prudents avec l'interprétation de nos résultats en raison des limites techniques de détection associées à cette méthode. Beaucoup de variations ont notamment été observées parmi les différents groupes de recherches. Il est cependant vrai que le C-terminal hautement phosphorylé de IRF-3 soit une cause de problème au niveau de l'ionisation des peptides. Afin de détecter le peptide contenant les *clusters* II et III, nous avons dû optimiser notre stratégie expérimentale plusieurs fois.

Les expériences à effectuer prochainement devront avoir comme but de clarifier cette hiérarchisation de la phosphorylation en C-terminal de IRF-3 et de déterminer la fonction réellement associée à chacun de ces *clusters*. Est-ce que les sept sites de phosphorylation sont vraiment nécessaires pour donner une conformation active à IRF-3? Est-ce que chaque *cluster* en C-terminal ne se serait pas plutôt impliqué dans le recrutement de coactivateurs spécifiques pour permettre la transactivation des gènes? Seules des études de protéomique utilisant IRF-3 comme appât moléculaire suivant une infection virale pourront mieux nous aider à comprendre. Les prochaines expériences devront également cibler l'identification de nouveaux sites de phosphorylation. À cet égard, nous avons obtenu des évidences que plusieurs autres sites de phosphorylation sont induits sur IRF-3 suivant une infection virale. En effectuant un marquage métabolique *in vivo* au P³² et une analyse par cartographie peptidique de IRF-3 5A, nous avons observé l'apparition de plusieurs nouveaux peptides phosphorylés suivant une infection au SeV (**voir Figure 21**). L'identification éventuelle de ces sites pourra évidemment nous aider à mieux comprendre les mécanismes de régulation de IRF-3.

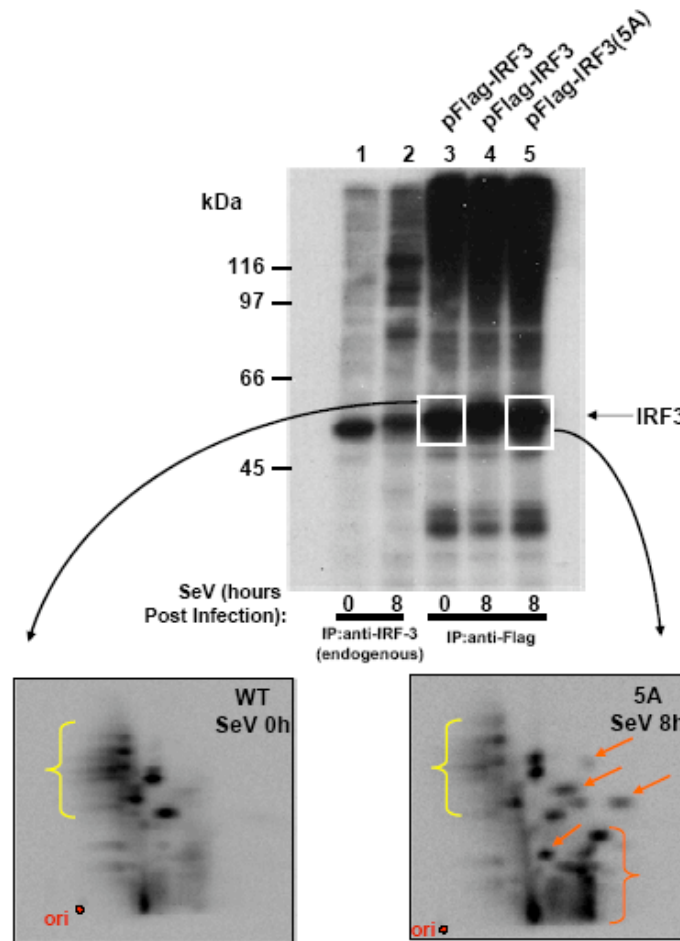


Figure 21. Plusieurs sites autres que le C-terminal de IRF-3 sont phosphorylés suite à une infection virale

Phosphorylation *in vivo* de IRF-3. Des cellules HeLa ont été transfectées avec les plasmides indiqués (ligne 3 à 5). 36h post-transfection, un marquage métabolique *in vivo* au P^{32} a été effectué. Après immunoprécipitation avec l'anticorps indiqué, un SDS-PAGE et un transfert sur membrane de PVDF, IRF-3 a ensuite été digéré à la trypsine pour effectuer des analyses de cartographie peptidique. Les accolades en jaune démontrent le profil de peptides restant inchangés, alors que les flèches et l'accolade en orange démontrent les peptides phosphorylés induits par l'infection virale même en absence des *clusters* II et III.

6.1.2 Quel est le vrai rôle de la sérine 339 ?

La Ser339 est un autre site de phosphorylation important pour le cycle de vie de IRF-3. Cette phosphorylation joue notamment un rôle primordial dans sa stabilité en créant un motif de liaison pour Pin1 (Saitoh et al, 2006). Ce motif présent chez IRF-3 est conservé chez l'humain, la souris, le singe, le rat et même IRF-7. En général, la dégradation des facteurs de transcription est le principal mécanisme utilisé par la cellule pour réduire ou terminer la transcription. En 2006, nous avons également proposé un rôle du système ubiquitine protéasome dans le contrôle de la stabilité de IRF-3 suivant une infection virale (Bibeau-Poirier et al, 2006). Cette dégradation, tout comme celle caractérisée par Saitoh et collègues, était dépendante de sa phosphorylation en C-terminal. Ceci signifie qu'en plus d'activer IRF-3, la phosphorylation du C-terminal enclenche un processus menant ultimement à sa dégradation cellulaire. Dans notre étude, nous avons démontré que la dégradation de IRF-3 dans les cellules infectées était régulée par un complexe ligase de la famille des SCF. Le mécanisme précis demeure toutefois incertain, mais il pourrait fortement dépendre de cette phosphorylation en Ser339 et de la présence de Pin1. À titre d'exemple, Pin1 agit en conjonction avec le complexe $SCF^{hCdc4\alpha}$ pour médier la polyubiquitination de la Cyclin E (van Drogen et al, 2006). En effet, le complexe Pin1-Cyclin E/Cdk2 se lie au complexe $SCF^{hCdc4\alpha}$ dans le but de pouvoir isomériser en *trans* le lien entre la Pro381 et la Pro382. Ceci provoquerait un changement de conformation du C-terminal de la Cyclin E permettant ensuite sa polyubiquitination par un autre complexe SCF, soit le complexe $SCF^{hCdc4\gamma}$.

Dans l'étude présentée au Chapitre 4, nous avons démontré un rôle de la Ser339 dans la dimérisation de IRF-3 et son association à CBP. Selon Saitoh et collègues, cette phosphorylation serait dépendante de la phosphorylation en Ser396. Nous avons également établi un lien moléculaire entre la Ser396 et la Ser339 en ce qui concerne la transactivation des gènes. En effet, la mutation de la Ser339 n'affecte pas l'activité transcriptionnelle de IRF-3 en autant que la Ser396 soit disponible pour être phosphorylée et vice versa. Ceci

suggère donc un mécanisme de compensation mutuelle de la Ser339 et de la Ser396. Mais quel est le mécanisme d'action pouvant être impliqué ? Un scénario où ces deux sites sont impliqués dans le recrutement d'une protéine importante pour l'activité transcriptionnelle de IRF-3, mais dont la mutation d'un seul de ces sites n'affecte pas l'interaction entre les deux protéines est envisageable. Considérant que la phosphorylation en C-terminal et que la phosphorylation de la Ser339 sont essentielles à la dégradation de IRF-3 (Bibeau-Poirier et al, 2006; Saitoh et al, 2006), ces deux sites pourraient également être impliqués dans le recrutement de la machinerie de dégradation du protéasome. Plusieurs évidences suggèrent d'ailleurs que le protéasome possède un rôle dans l'activation de la transcription. Chez la levure, la protéine Sug1, un composant de la sous unité 19S du protéasome, est un coactivateur nécessaire à l'expression des gènes du galactose (Swaffield et al, 1992). Certains composants du protéasome sont aussi détectés au niveau de la chromatine sur des sites transcriptionnellement actifs (Gonzalez et al, 2002; Reid et al, 2003). Le recyclage protéique du récepteur des oestrogènes par le protéasome est important pour l'induction des gènes en réponse à l'oestrogène (Lonard et al, 2000; Reid et al, 2003). Des expériences de génétique ont également permis d'observer un rôle du protéasome dans l'élongation de la transcription (Ferdous et al, 2001). En effet, son activité ATPase pourrait être utilisée comme chaperone moléculaire pour le remodelage de certaines protéines ou de certaines interactions protéiques afin de permettre la libération de la RNA Pol II du complexe de pré-initiation. Concernant IRF-3, nous avons des évidences qui suggèrent la présence d'ubiquitination en K63 (Annie Bibeau-Poirier, résultats non présentés). En considérant que plusieurs complexes E3 ligases différents peuvent être responsables de la dégradation de IRF-3 (**voir section 1.3.1.4.2**), il est possible que la phosphorylation de chacun de ces sites (Ser339 et Ser396) soit responsable de recruter un complexe particulier. Pour tester cette hypothèse, il faudrait vérifier si IRF-3 S396A est moins polyubiquitiné que le IRF-3 WT. Ces expériences ont été effectuées par ma collègue Annie dans le laboratoire, mais les résultats n'ont pas été concluants. Nous avons également essayé de déterminer la stabilité de IRF-3 S396A et de la comparer à celle de IRF-3 WT et IRF-3 S339A, mais aucune conclusion n'a pu être tirée de ces expériences.

L'utilisation d'un anticorps phosphospécifique dirigé contre la Ser339 phosphorylé aurait été un outil intéressant pour nos expériences, mais nous n'avons jamais été capables de faire fonctionner celui que nous avons généré. Cet anticorps, en combinaison avec nos différents mutants de IRF-3, aurait pu nous aider à déterminer les sites de phosphorylation en C-terminal essentiels pour engendrer la phosphorylation en Ser339.

6.1.3 GSK-3 β , une nouvelle kinase de IRF-3 ?

La kinase phosphorylant la Ser339 demeure actuellement inconnue. Par contre, une *Proline-directed kinase* peut être suspectée en raison du motif S/T-P présent. Un exemple notoire où Pin1 et une *Proline-directed kinase* sont impliqués simultanément dans la régulation d'un facteur de transcription est celui de c-Myc. Ce facteur de transcription est soumis à un contrôle strict qui est dépendant de différents événements de phosphorylation ayant lieu sur deux sites spécifiques. La phosphorylation de la Ser62 augmente la stabilité de c-Myc, alors que la phosphorylation de la Thr58 stimule son ubiquitination et sa dégradation (Sears et al, 2000; Welcker et al, 2004; Yada et al, 2004). Dans ce modèle, *Glycogen Synthase kinase-3 β* (GSK-3 β) est responsable de la phosphorylation en Thr58, un événement nécessaire au recrutement de Pin1 qui permet ensuite d'initier le processus de déstabilisation de c-Myc (Yeh et al, 2004).

Dans le laboratoire, nous avons obtenu des évidences pharmacologiques indiquant qu'aucune *Proline-directed kinase* classique ne semblait être impliquée dans la dégradation de IRF-3. L'utilisation de PD98059/U0126, SB203580, SP600125, Rapamycine et d'Olomoucine/Roscovitine nous avaient permis d'éliminer respectivement ERK, p38, JNK, mTOR et les CDKs de ce processus (JF Clément et Marc Servant, résultats non présentés). Par contre, nous avons observé une corrélation entre l'inactivation de AKT ou p90RSK et la dégradation de IRF-3 (**voir résultats de SP Gravel et MJ Servant en Figure 22**). En

prenant en considération que ces deux kinases sont impliquées dans la régulation négative de GSK-3, nous avons donc émis l'hypothèse que cette dernière pouvait être responsable de la phosphorylation de la Ser339 de IRF-3.

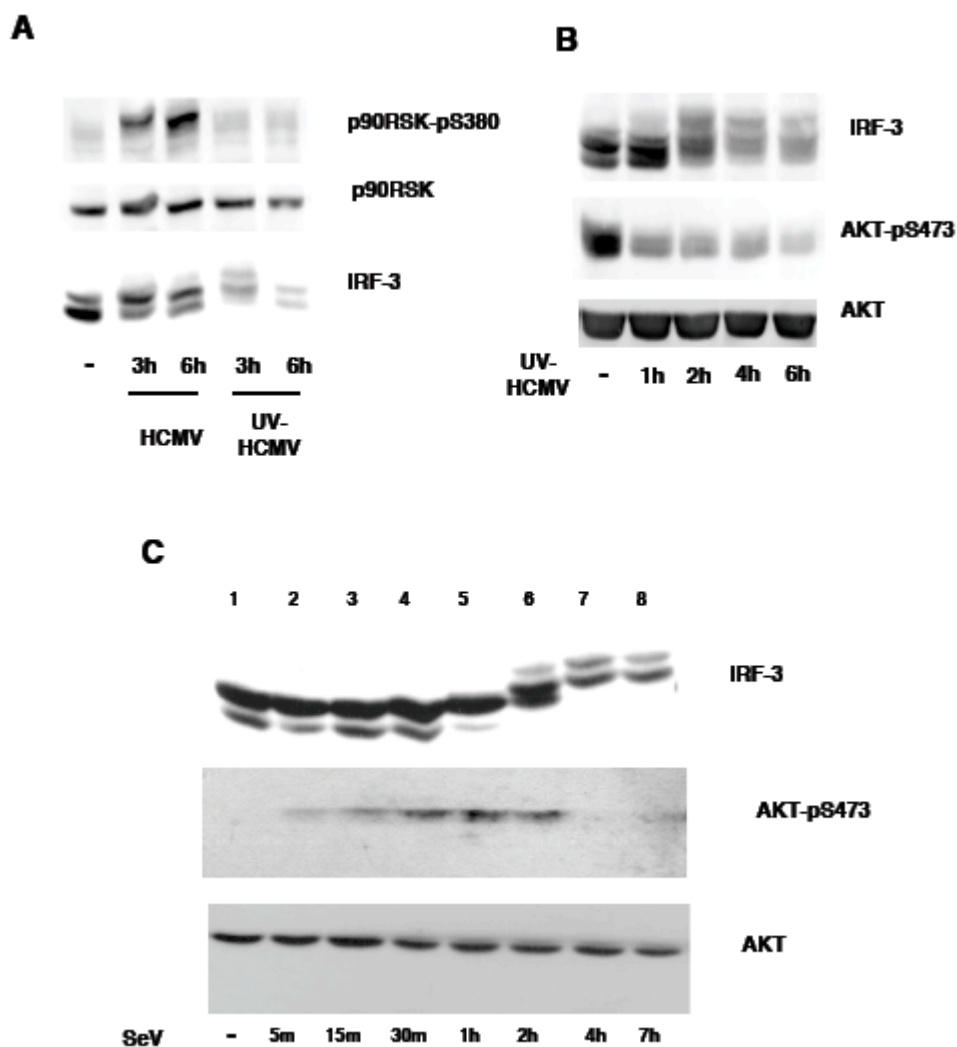


Figure 22. Une corrélation existe entre l'inactivation de AKT ou p90RSK et la dégradation de IRF-3 suivant une infection virale

A) Les cellules fibroblastiques MRC-5 ont été infectées ou non avec le virus HCMV ou du HCMV inactivé par les UVs pour les temps indiqués. Les extraits cellulaires ont ensuite été préparés afin de vérifier l'activation de p90RSK par immunobuvardage en utilisant un anticorps phosphospécifique dirigé contre la Ser380. La présence de IRF-3 a aussi été révélée. B) Les MRC-5 ont été traitées avec du UV-HCMV pour les

temps indiqués. Les extraits cellulaires ont été analysés de la même façon qu'en A) afin de révéler la présence de la forme active de AKT en utilisant un anticorps phosphospécifique dirigé contre la Ser473. C) Les cellules HFFs ont été infectées avec du SeV pour les temps indiqués et les extraits cellulaires ont été analysés comme mentionné ci-dessus.

Il existe deux isoformes de GSK-3, soit GSK-3 α et GSK-3 β . Ces dernières possèdent plusieurs fonctions redondantes. GSK-3 β est une sérine/thréonine kinase originalement caractérisée pour son rôle dans l'inhibition de la synthèse du glycogène. Contrairement à la plupart des kinases, GSK-3 β est constitutivement active grâce à sa phosphorylation en Tyr216 et devient inactivée suite à la phosphorylation de sa Ser9 située en N-terminal. Plusieurs kinases, incluant AKT, p90RSK, PKA et PKC, ont été identifiées comme des régulateurs négatifs de GSK-3 β grâce à leur capacité commune de phosphoryler cette Ser9 (Forde & Dale, 2007).

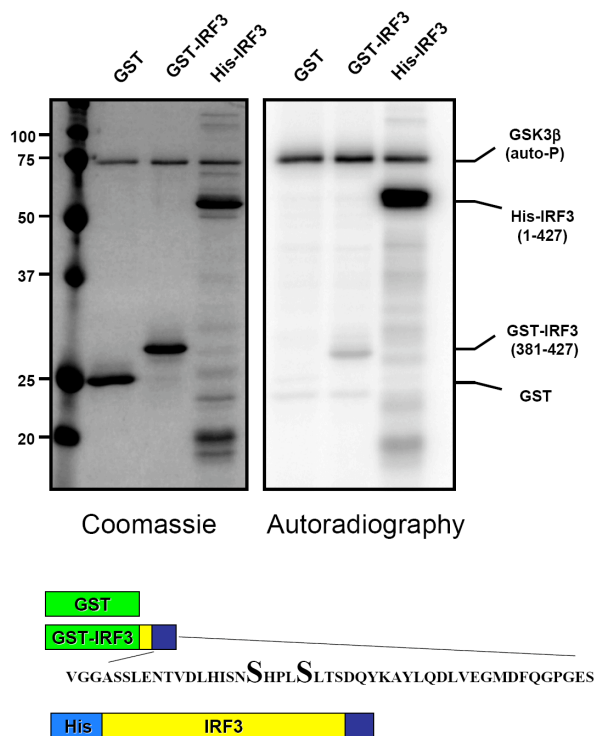


Figure 23. GSK-3 β phosphoryle IRF-3 *in vitro*

Les protéines recombinantes GST, GST-IRF3 (aa 381 à 427) et His-IRF3 (aa 1 à 427) ont été soumises à un essai de phosphorylation *in vitro* par la kinase recombinante GSK-3 β pendant 30 minutes. Un gel SDS-PAGE a ensuite été effectué et la présence des substrats phosphorylés a été dévoilée par autoradiographie. La présence des différents substrats a également été dévoilée par coloration au Bleu de Coomassie. Les différents substrats sont schématisés.

Nos expériences préliminaires avec une kinase GSK-3 β recombinante ont permis de déterminer que cette dernière phosphorylait IRF-3 *in vitro* sur un site situé en amont des différents *clusters* de phosphorylation localisés en C-terminal (**voir Figure 23**). En mutant la Ser339 en alanine, nous avons ensuite observé une baisse de la phosphorylation, suggérant ainsi que ce site pouvait être une cible de GSK-3 β *in vitro* (**voir Figure 24**). L'inhibition de AKT et l'activation de GSK-3 β ont également été confirmées suivant une infection virale (**voir Figure 25**). De plus, nous avons observé une association inductible par l'infection virale entre GSK-3 β et IRF-3 (**voir Figure 26**). Cette association apparaît surtout dans les temps plus tardifs de l'infection, ce qui suggère davantage un rôle au niveau de la dégradation de IRF-3 que dans son activation. En utilisant un inhibiteur pharmacologique de GSK-3, le BIO, nous avons aussi pu apprécier un retard au niveau de la cinétique de dégradation de IRF-3 (**voir Figure 27**). Tous ces résultats préliminaires suggèrent donc que GSK-3 β pourrait interagir avec IRF-3 dans la phase tardive de l'infection afin de promouvoir sa dégradation par la phosphorylation de la sérine 339.

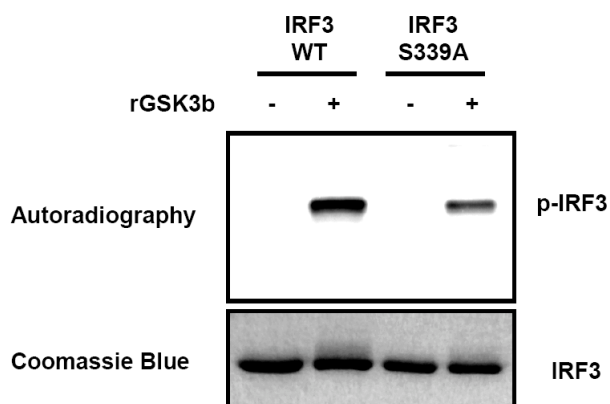


Figure 24. GSK-3 β cible la Ser339 de IRF-3

Les protéines recombinantes His-IRF3 WT et His-IRF3 S339A ont été soumises à un essai de phosphorylation *in vitro* par la kinase recombinante GSK-3 β . Un gel SDS-PAGE a ensuite été effectué et la présence de phosphorylation sur les substrats a été dévoilée par autoradiographie. Les différents substrats ont également été dévoilés par coloration au Bleu de Coomassie.

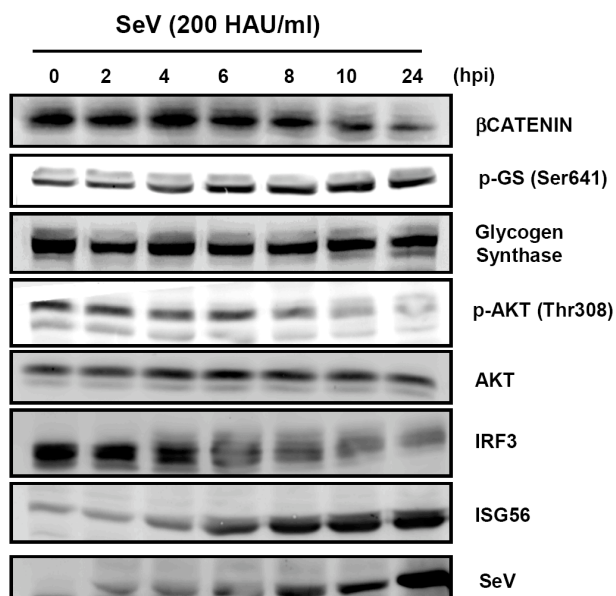


Figure 25. L'infection au SeV inhibe AKT et active GSK-3 β

Des cellules Hec1B ont été infectées ou non avec du SeV pour les temps indiqués. Les extraits cellulaires ont ensuite été préparés afin de vérifier la phosphorylation de la Glycogène Synthase (Ser641) et de AKT (Thr308). La dégradation de IRF-3, de β -Catenin et l'induction de ISG56 ont également été démontrées pendant l'infection virale.

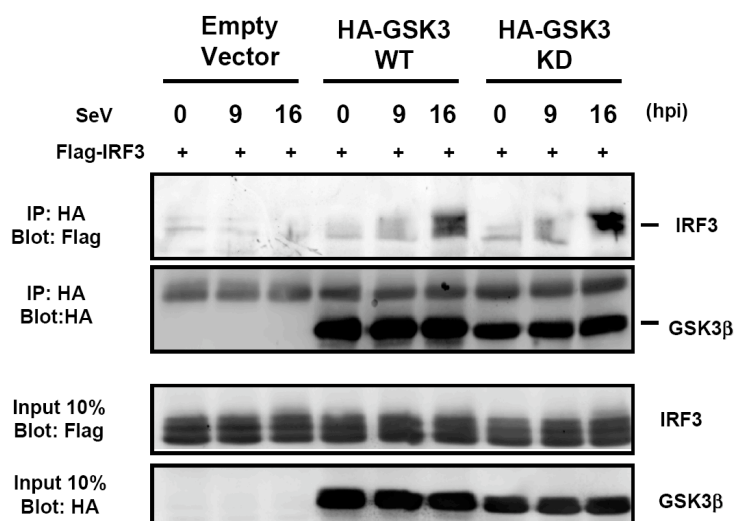


Figure 26. Interaction inductible par l'infection virale entre GSK-3 β et IRF-3

Des cellules 293T ont été transfectées avec les plasmides indiqués. 24h post-transfection, les cellules ont été infectées ou non avec du SeV pour les temps indiqués. Les lysats cellulaires ont été préparés afin de procéder à une co-immunoprécipitation en utilisant un anti-HA suivi d'une analyse par SDS-PAGE. La présence de IRF-3 ou de GSK-3 β a finalement été révélée par immunobuvardage à l'aide d'un anti-Flag ou d'un anti-HA respectivement.

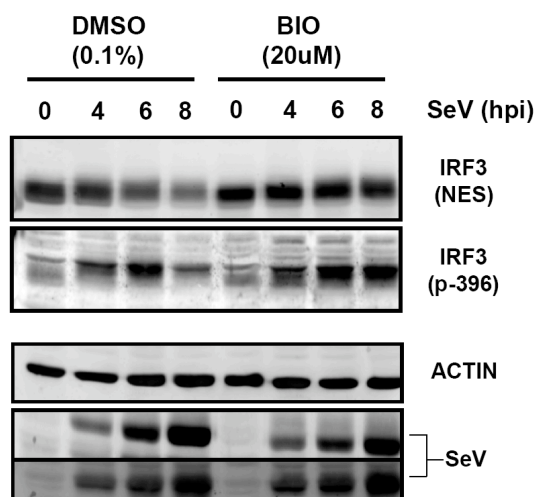


Figure 27. L'inhibition pharmacologique de GSK-3 β retarde la dégradation de IRF-3

Des cellules Hec1B ont été traitées ou non avec du BIO, un inhibiteur de la kinase GSK3-3 β , pour 30 minutes et ont ensuite été infectées ou non avec du SeV pour les temps indiqués. Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés par SDS-PAGE. La présence de IRF-3 a été révélée par immunobuvardage en utilisant un anti-IRF3 (NES) et l'anticorps phosphospécifique pSer396. La présence des protéines virales est aussi dévoilée.

Il reste évidemment plusieurs expériences à effectuer avant de pouvoir affirmer que GSK-3 β joue vraiment un rôle dans la dégradation de IRF-3. Nos expériences à l'aide de siRNAs dirigés contre GSK-3 α /GSK-3 β n'ont pas été concluantes. Ce phénomène a d'ailleurs été également rapporté par un autre groupe de recherche qui étudie la fonction de GSK-3 β au niveau de la régulation de p53 (Baltzis et al, 2007). De plus, l'utilisation des MEFs GSK-3 β ^{-/-} ne nous a pas permis de voir de différences significatives au niveau de la dégradation de IRF-3. Une fonction redondante de GSK-3 α , comme il fut observé dans le cas de la β -Catenin, pourrait expliquer nos résultats (Doble et al, 2007). Des expériences avec les cellules souches embryonnaires (ES) GSK-3 α ^{-/-} GSK-3 β ^{-/-} (ES double KO) sont donc présentement en cours afin de déterminer la cinétique de dégradation de IRF-3 dans ces cellules. Comme nous avons proposé un rôle de la Ser339 dans la dimérisation de IRF-3, il serait aussi intéressant de vérifier cet aspect dans les cellules ES double KO. De plus, un bon anticorps phosphospécifique dirigé contre la Ser339 s'avérerait encore une fois utile afin de démontrer une perte de phosphorylation dans ces cellules ES double KO.

Il est encore tôt dans cette étude pour envisager un mécanisme d'action précis impliquant la kinase GSK-3 β dans la phosphorylation de la Ser339. Par contre, un modèle proposé impliquant les kinases de eIF2 α , PERK et PKR, dans l'activation de GSK-3 β s'avère très inspirant (Baltzis et al, 2007). Selon Baltzis et ses collègues, une infection virale activerait PKR/PERK afin d'induire l'activation de GSK-3 β . Cette kinase transloquerait ensuite au noyau afin de phosphoryler p53 sur les sérines 315 et 376, deux événements essentiels pour l'ubiquitination de p53 par Mdm2 (Pluquet et al, 2005). Basé

sur ce modèle, il devient alors possible d'imaginer un scénario où la relocalisation nucléaire de GSK-3 β servirait aussi à la phosphorylation de IRF-3 sur la Ser339. En accord avec cette hypothèse, une étude vient tout juste de démontrer que PKR jouait un rôle important dans l'activation complète de IRF-3 par une voie dépendante de CARDIF (Zhang & Samuel, 2008). Notre modèle proposant la phosphorylation de IRF-3 par GSK-3 β soulève aussi des questions additionnelles. En effet, GSK-3 β démontre généralement une préférence pour les substrats pré-phosphorylés en reconnaissant la séquence S/T-X-X-X-X-pS/pT (Forde & Dale, 2007). GSK-3 β phosphorylerait aussi un certain nombre de substrats sans la présence de pré-phosphorylation, mais la phosphorylation stoichiométrique des substrats non pré-phosphorylés n'a jamais été démontrée, à l'exception de la protéine Tau (Cole et al, 2006). À l'instar de la protéine Tau, il est aussi concevable que IRF-3 et GSK-3 β interagissent grâce à une autre région que le domaine catalytique et que cette interaction permette la phosphorylation de la Ser339.

6.1.4 Le mystère de la phosphorylation en N-terminal

Durant mon doctorat, nous avons mis l'accent sur l'identification des sites de phosphorylation situés en C-terminal de IRF-3. Cependant, mes données de marquage métabolique au P³² indiquaient aussi une forte phosphorylation de IRF-3 en N-terminal (**voir Figure 28**). Cette phosphorylation en N-terminal est très peu étudiée en raison du fait qu'elle ne semble pas jouer de rôle dans l'activation de IRF-3 suivant une infection virale (Servant et al, 2001b).

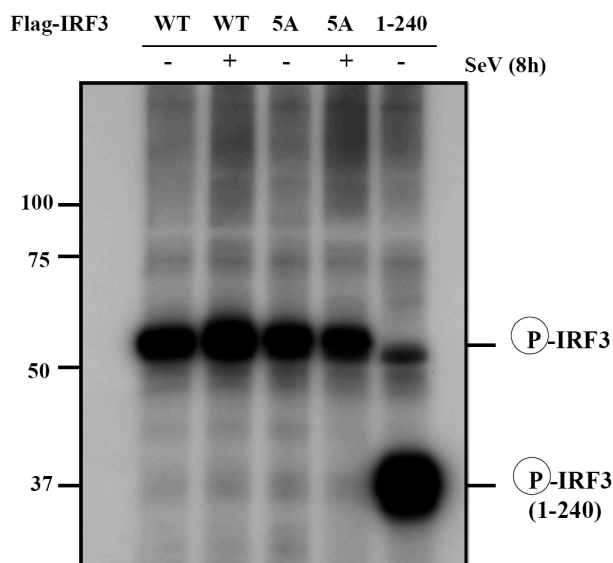


Figure 28. Le N-terminal de IRF-3 est hautement phosphorylé *in vivo*

Phosphorylation *in vivo* de IRF-3. Des cellules HeLa ont été transfectées avec les plasmides indiqués. 36h post-transfection, un marquage métabolique au P^{32} a été effectué. Après une immunoprécipitation avec un anti-Flag, une analyse par SDS-PAGE et un transfert sur membrane de PVDF, la présence de phosphorylation fut révélée par autoradiographie.

Lors de certaines analyses par cartographie peptidique de IRF-3 phosphorylé *in vitro* par TBK1, nous avons observé des événements de phosphorylation sur des sites ailleurs qu'en C-terminal de la protéine (voir Figure 29). De plus, nos analyses de spectrométrie de masse avaient indiqué que la Ser159 était une cible de TBK1 (JF Clément et Marc Servant, résultats non présentés). Nous avons donc investigué le rôle de cette sérine dans l'activation de IRF-3 en créant les mutants IRF-3 S159A et IRF-3 S159D. Après avoir effectué différentes expériences, nous en sommes venus à la conclusion que ce site n'était pas impliqué dans la génération de la forme II de IRF-3, dans sa dimérisation ou dans le processus de transactivation du promoteur IFN β (JF Clément et Marc Servant, résultats non présentés). Afin de pouvoir caractériser un nouveau site de phosphorylation en N-terminal,

nous avons également muté la plupart des sérines et thréonines conservées à travers les différentes espèces de IRF-3 étant situées dans les 135 premiers acides aminés de la protéine (Ser82, Ser112, Ser118, Ser123, Ser131, Ser133, Thr3, Thr122, Thr126). La mutation indépendante de ces sites en alanine ne provoque toutefois pas la perte de la forme II de IRF-3 et n'influence aucunement la formation du dimère de IRF-3 (voir **Figure 30**).

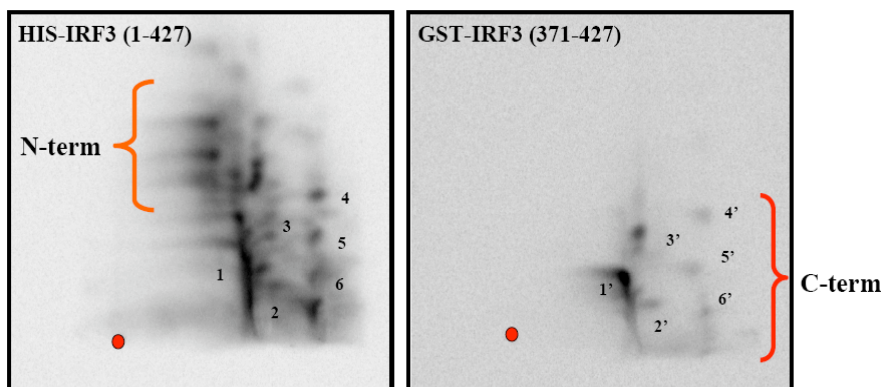


Figure 29. TBK1 phosphoryle *in vitro* d'autres sites en amont du C-terminal de IRF-3

Les protéines recombinantes His-IRF3 (aa 1 à 427) et GST-IRF3 (aa 371 à 427) ont été soumises à un essai de phosphorylation *in vitro* en utilisant la kinase TBK1. Les réactions ont été analysées par SDS-PAGE suivi d'un transfert sur membrane de PVDF. GST-IRF3 et His-IRF3 ont ensuite été digérés à la trypsine pour effectuer des analyses de cartographie peptidique. L'accolade en rouge démontre le profil des peptides phosphorylés en C-terminal sur GST-IRF3 qui se retrouvent aussi chez His-IRF3. Les phosphopeptides ont été numérotés afin de mieux les reconnaître sur chaque carte peptidique. L'accolade en orange démontre le profil des peptides phosphorylés par TBK1 qui ne sont pas situés dans le C-terminal (indiqué ici comme du N-terminal pour faciliter la terminologie).

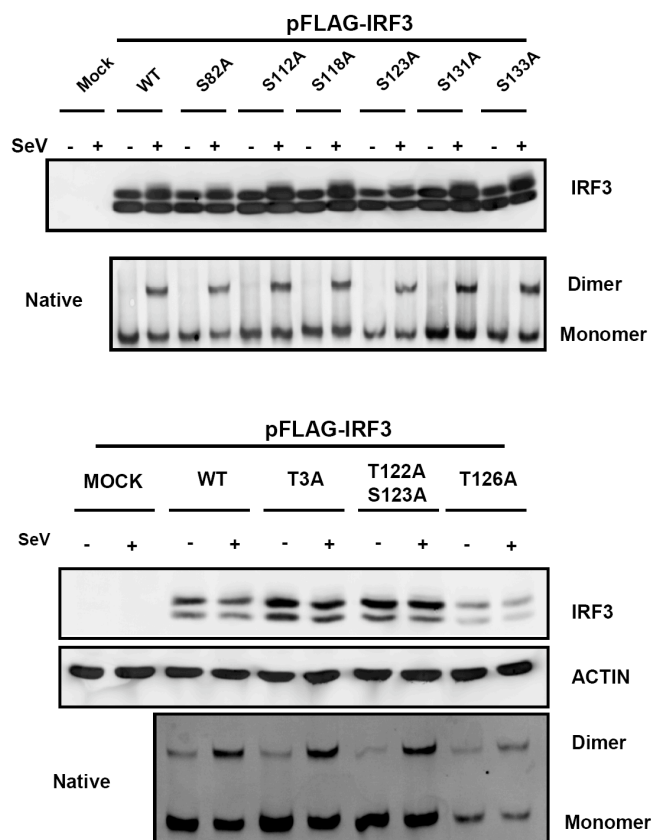


Figure 30. La mutation indépendante de la majorité des Ser/Thr conservées en N-terminal n'influence pas la dimérisation de IRF-3 ni la présence de la forme II

Des cellules HeLa ont été transfectées avec les différentes constructions indiquées. 24h post-transfection, les cellules ont été infectées ou non avec du SeV pour 12h. Les lysats cellulaires ont été préparés pour ensuite être analysés par SDS-PAGE ou gel natif. La présence de IRF-3 a été révélée par immunobuvardage en utilisant un anti-Flag.

Bergstroem et collaborateurs ont récemment identifié la Ser173 et la Ser175 comme étant de nouveaux sites de IRF-3 constitutivement phosphorylés *in vivo* (Bergstroem et al). Ils détectent également la présence de ces sites de phosphorylations lors de leur analyse de

phosphorylation *in vitro* par TBK1. Ils proposent donc que TBK1 soit impliqué dans la phosphorylation constitutive de IRF-3 sur ces sites. Comme mentionné précédemment, la Ser175 ne semble pas jouer de rôle dans l'activation de IRF-3 (**voir Figure 19**). Quant à la Ser173, Zhang et collègues proposent qu'elle soit la cible de JNK (Zhang et al, 2009). La mutation de la Ser173 en alanine provoquerait la perte de la forme II de IRF-3. Curieusement, cette phosphorylation par JNK serait également requise pour induire la dimérisation de IRF-3 suivant la transfection de poly(IC). De plus, la mutation de la Ser175 causerait la perte de la forme II de IRF-3. Nos résultats démontrent cependant le contraire (**voir Figure 19**). D'autres expériences seront donc nécessaires afin de pouvoir conclure sur un rôle de ces deux sites dans le cycle de vie de IRF-3.

Il y a quelques années, Kim et collaborateurs avaient rapporté que les agents endommageant l'ADN pouvaient promouvoir l'activation de IRF-3 (Kim et al, 1999). Toutefois, le rôle de la phosphorylation en N-terminal n'avait pas été investigué. Ils avaient par contre démontré l'importance du *cluster I* pour la transactivation des gènes en réponse à la doxorubicine ou aux UVs. Comme les dommages à l'ADN activent très fortement JNK, il devient alors possible de penser que le N-terminal de IRF-3 soit phosphorylé par JNK en réponse à ces deux agents. De plus, il serait fort intéressant de vérifier si les kinases TBK1/IKKi sont activées suivant des dommages à l'ADN. La caractérisation des sites de phosphorylation en N-terminal de IRF-3 pourrait grandement contribuer à la compréhension de la régulation de ce facteur de transcription.

6.2 Bien mesurer l'activation de IRF-3, est-ce possible ?

Afin de caractériser correctement le rôle de ce facteur de transcription dans la réponse immunitaire innée, il est à la fois important de comprendre les limitations des méthodes actuelles et d'identifier les critères diagnostiques de l'activation de IRF-3. Nos expériences effectuées sur la Ser339 et la Ser396 nous ont permis d'expliquer moléculairement pourquoi la dimérisation, la localisation nucléaire, l'association à CBP et la présence de formes hyperphosphorylées ne concordaient pas toujours avec l'activité biologique de IRF-3. Grâce à nos résultats, il est maintenant possible d'affirmer que l'hyperphosphorylation sur gel SDS-PAGE est médiée par le *cluster* III et qu'aucun lien n'existe entre la dimérisation de IRF-3 et son état d'hyperphosphorylation. La dimérisation, l'association à CBP et l'accumulation nucléaire dépendent de la Ser396 dans le *cluster* II et/ou de la Ser339. La phosphorylation du *cluster* I est essentielle à la transactivation des gènes tout en étant impliquée dans les processus de dimérisation et d'association à CBP.

Une étude récente effectuée par le groupe du Dr Mossman apporte des données complémentaires à notre vision de l'activation de IRF-3 (Noyce et al, 2009). Selon son groupe, les modifications post-traductionnelles de IRF-3 pourraient être diverses tout dépendamment de la source de virus, de sa capacité de réplication et de sa multiplicité d'infection (MOI). Plus important encore, leurs résultats démontrent que l'absence ou la présence des différentes formes de phosphorylation de IRF-3 ne reflète aucunement l'activité biologique du facteur de transcription dans sa capacité d'induire les ISGs. Certains de leurs résultats suggèrent même que les modifications post-traductionnelles médiées par les IKK-related kinases auraient lieu dans le noyau et non dans le cytoplasme comme le stipule le modèle d'activation conventionnel. Des expériences plus approfondies seront toutefois nécessaires pour réconcilier ces observations.

Plusieurs autres études avaient également observé des discordances entre les techniques de détection de l'activation de IRF-3 et son activité biologique réelle. Par contre, personne n'avait tenté jusqu'à présent de les expliquer. Notre première étude (**voir Chapitre 4**) et celle de Noyce et collaborateurs partagent le même objectif, celui de conscientiser les autres groupes de recherche quant à l'inefficacité des techniques actuellement disponibles pour mesurer l'activité biologique de IRF-3. Nous devons maintenant mieux approfondir chacune des étapes du cycle de vie de IRF-3 afin de mieux comprendre leur signification respective.

6.3 TRAF3 localise à la mitochondrie ou au niveau des compartiments vésiculaires du ER-Golgi ?

Le modèle expliquant la régulation de la voie de signalisation par les RLRs est devenu plus complexe suite à la caractérisation récente de STING. Tout en apportant de nouvelles informations quant aux mécanismes potentiels de signalisation, les études sur STING ont mis en évidence la participation de différents compartiments cellulaires dans ce processus. Il devient alors difficile de concilier le rôle de chacun des nouveaux composants de cette voie de signalisation tout en respectant leur localisation cellulaire respective. Comme mentionnée précédemment, STING interagit avec le complexe TRAP (via TRAP β) et le translocon (via SEC61 β) (Ishikawa & Barber, 2008). Le translocon interagit également avec l'exocyste, dont l'un de ses composants (Sec5) est capable de recruter TBK1 pour mener à l'activation de IRF-3 (Chien et al, 2006). En voulant accommoder toutes ces observations, il a donc été proposé que RIG-I était responsable de détecter les ARNs viraux étant en processus de traduction au niveau du translocon afin d'activer une signalisation médiée par STING et TBK1 nouvellement recruté de l'exocyste.

Lors de notre deuxième étude, nous avons découvert que TRAF3 localisait au niveau des compartiments vésiculaires du ER-Golgi grâce à une interaction impliquant les protéines Sec16A et p115 (**voir Chapitre 5**). Nous avons donc tenté de concilier le transport vésiculaire avec l'assemblage des complexes de signalisation induit par une infection virale. Nous avons proposé que les protéines de transport Sec16A et p115 soient responsables de la localisation cellulaire de TRAF3 afin d'assurer son recrutement au niveau de la mitochondrie. Ce modèle implique toutefois une notion de proximité cellulaire entre les différentes organelles (ER, Golgi et Mitochondrie) afin de permettre l'assemblage d'un complexe de signalisation fonctionnelle associé à CARDIF.

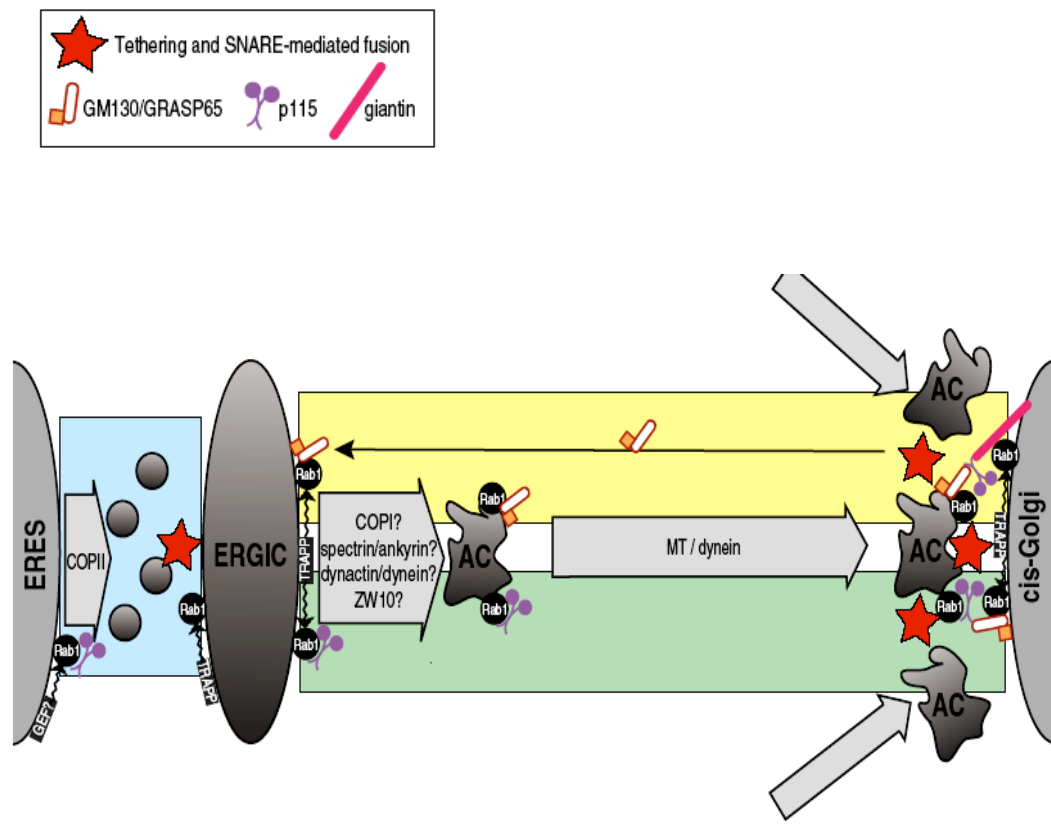


Figure 31. Illustration schématique de l'implication de p115 dans le transport vésiculaire

Le court transport des vésicules en provenance du ERES vers le ERGIC est dépendant du système COPII, mais indépendant du réseau de microtubule. Au contraire, le long transport vésiculaire du ERGIC vers le cis-Golgi implique les microtubules et les dynéines. La fission des compartiments antérogrades (AC) riche en

cargo provenant du ERGIC pourrait impliquer le système COPI, le squelette spectrin/ankyrin, ZW10, les dynéines et la dynactine. Le ciblage des membranes vésiculaires au niveau de son compartiment accepteur est orchestré par la machinerie d'amarrage. Premièrement, Rab1 est activé et recruté au niveau des membranes par des *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs). Recruté par Rab1 activé au niveau des *ER exit site* (ERES), p115 est ensuite responsable de l'amarrage des vésicules dérivées du ER au niveau du ERGIC. Pour le transport vésiculaire du ERGIC vers le *cis*-Golgi, p115 est impliqué dans deux scénarios. Dans le premier (boîte verte), p115 se lie au ERGIC grâce à Rab1 activé et l'amarrage au *cis*-Golgi implique un attachement médié par le complexe p115-Rab1-GM130-GRASP65. Dans le second (voir boîte jaune), le complexe GM130-GRASP65 est recyclé du *cis*-Golgi vers le ERGIC et l'amarrage au *cis*-Golgi implique une interaction p115-GM130 coordonnée par Rab1 au niveau de la protéine transmembranaire Giantin. La fusion membranaire des vésicules de transport est ensuite catalysée par p115 dans un processus médié par les SNAREs. Figure tirée de (Appenzeller-Herzog & Hauri, 2006).

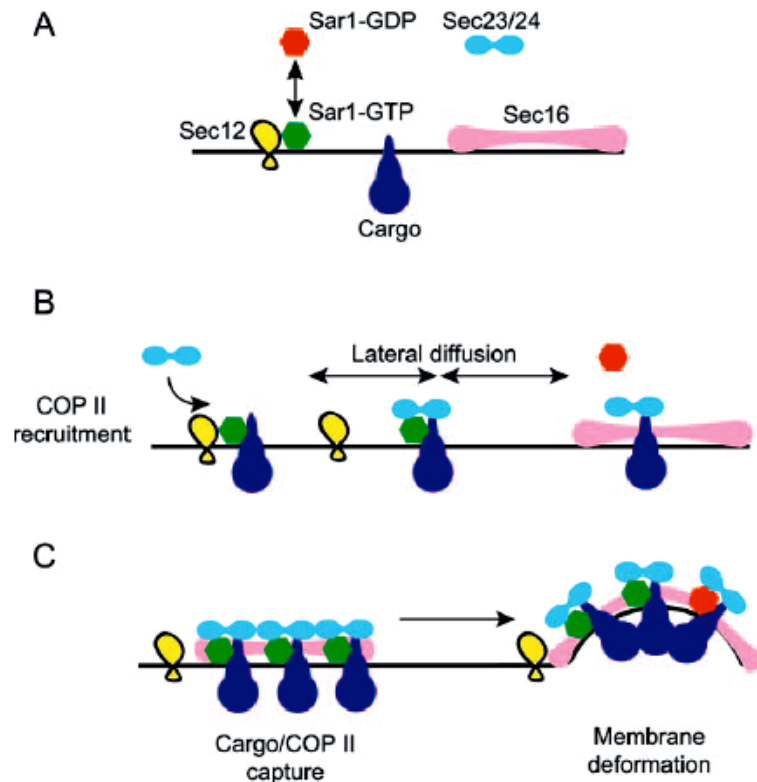


Figure 32. Modèle décrivant la fonction de Sec16A dans la cellule

A) La petite GTPase Sar1-GDP (en rouge) serait d'abord recrutée à la membrane du ER par Sec12, une GEF (en jaune). Les protéines de type cargo (en bleu) diffuseraient ensuite à travers la membrane du ER à proximité du lieu d'assemblage de Sec16A (en magenta). B) Sar1-GTP pourrait ensuite lier certaines molécules cargo et recruter Sec23/24 (en cyan). Il y aurait ensuite formation d'un complexe Sar1-GTP-cargo-Sec23/24 capable de diffuser dans le plan de la membrane du ER. L'hydrolyse de GTP permettrait la dissociation de Sar1, alors que le cargo et Sec23/24 resteraient associés. C) L'assemblage de Sec16A provoquerait ensuite la capture et la stabilisation du complexe cargo-Sec23/24. Cette stabilisation du

complexe de pré-bourgeoisement serait un pré-requis pour que la déformation membranaire ait lieu. Figure tirée de (Watson et al, 2006).

La protéine p115 joue un rôle important dans le transport vésiculaire (**voir Figure 31**). D'abord recruté par Rab1 activé au niveau des *ER exit site* (ERES), p115 est responsable de l'amarrage des vésicules dérivées du ER au niveau du *ER to Golgi intermediates compartments* (ERGIC) (Cao et al, 1998). Pour le transport vésiculaire du ERGIC vers le *cis*-Golgi, p115 est impliqué dans deux scénarios. Dans le premier (**Figure 31, boîte verte**), p115 se lie au ERGIC grâce à Rab1 activé et l'amarrage au *cis*-Golgi implique un attachement médié par le complexe p115-Rab1-GM130-GRASP65 (Moyer et al, 2001). Dans le second (**Figure 31, boîte jaune**), le complexe GM130-GRASP65 est recyclé du *cis*-Golgi vers le ERGIC (Marra et al, 2001) et l'amarrage au *cis*-Golgi implique une interaction p115-GM130 coordonnée par Rab1 au niveau de la protéine transmembranaire Giantin (Beard et al, 2005; Sonnichsen et al, 1998). La fusion membranaire des vésicules de transport est ensuite catalysée par p115 dans un processus médié par les SNAREs (Sapperstein et al, 1996; Shorter et al, 2002). Le rôle de Sec16A se situe davantage au niveau de la formation des ERES (**voir Figure 32**). La petite GTPase Sar1-GDP est d'abord recrutée à la membrane du ER par Sec12, une GEF. Les protéines de type cargo diffusent ensuite à travers la membrane du ER à proximité du lieu d'assemblage de Sec16A. La formation d'un complexe Sar1-GTP-cargo-Sec23/24 a lieu et diffuse dans le plan de la membrane du ER. L'hydrolyse du GTP permet la dissociation subséquente de Sar1 afin de permettre à Sec16A de capturer et de stabiliser le complexe cargo-Sec23/24. Cette stabilisation du complexe de pré-bourgeoisement est un pré-requis pour que la déformation membranaire ait lieu. Comme Sec16A et p115 sont des protéines dont la localisation est dynamique, il devient alors difficile de préciser où sont situés exactement les complexes Sec16A-p115-TRAF3 nécessaires à la voie des RLRs. Par contre, l'association de TRAF3 à ces deux protéines pourrait probablement permettre sa distribution à certains endroits cellulaires stratégiques dans le but d'assurer son recrutement à CARDIF lors d'une infection virale.

Dans une récente étude, Saitoh et collaborateurs proposent un modèle qui se base sur une vision similaire à la nôtre concernant l'assemblage cellulaire des complexes de signalisation (Saitoh et al, 2009). En effet, ils stipulent que STING, suivant une stimulation au dsDNA, se déplace du ER vers le Golgi afin d'atteindre des structures vésiculaires permettant le recrutement de TBK1. Dans ces structures vésiculaires, STING colocalise avec des protéines reliées à l'autophagie, dont Atg9a et LC3. Atg9a localise normalement au niveau du Golgi et des endosomes tardifs. Toutefois, sa localisation au niveau de ces deux organelles est dynamique et varie habituellement en fonction des conditions de privation cellulaire. Sachant que TRAF3 est un adaptateur important de TBK1, il devient alors tentant de spéculer que STING pourrait s'associer à TRAF3 lors de son passage au niveau du Golgi afin de permettre ultimement le recrutement de TBK1 dans les structures vésiculaires observées.

Cependant, ce scénario ne peut pas être exactement identique pour la voie de signalisation associée aux RLRs, car la localisation de STING au niveau du ER n'est pas influencée par une stimulation au dsRNA (Saitoh et al, 2009). La formation de ces structures vésiculaires semble donc très spécifique à la voie de signalisation induite par les récepteurs cytoplasmiques de l'ADN. Toutefois, il est possible d'imaginer un scénario où les membranes du Golgi et de la mitochondrie entrent en contact pour faciliter certaines interactions protéiques suivant une infection virale. Castanier et collaborateurs proposent d'ailleurs que l'activation de la voie des RLR provoque une élongation du réseau mitochondriale afin de favoriser la liaison de CARDIF et STING (Castanier et al). L'étude met surtout l'emphase sur un remodelage des membranes de la mitochondrie et du ER, mais nous possédons des évidences que la structure du Golgi est aussi modulée par l'activation de CARDIF (**voir Figure 33**). Ce *membrane scrambling* entre le Golgi et le ER fut également observé dans le cas d'une stimulation du récepteur Fas (Ouasti et al, 2007).

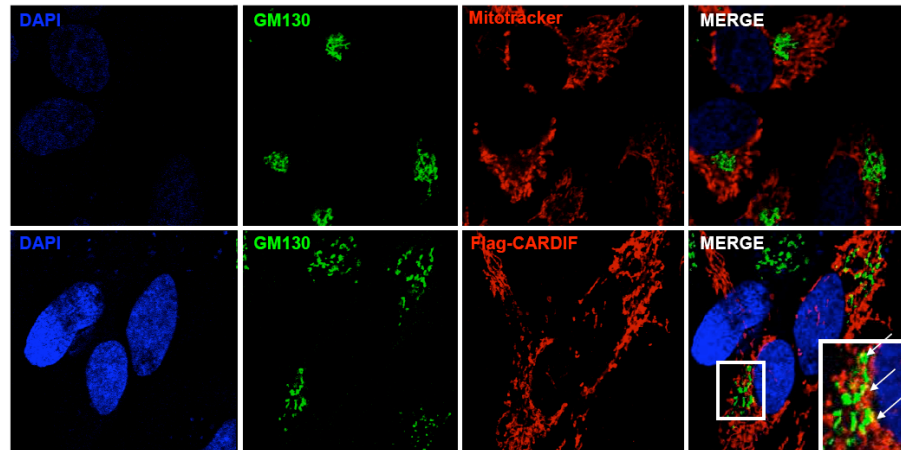


Figure 33. Fusion de la membrane du Golgi avec celle du ER suivant l'activation de la voie des RLRs

Des cellules HeLa ont été transfectées ou non avec Flag-Cardif. 24h post-transfection, les cellules ont été analysées par immunofluorescence. La présence du Golgi est indiquée à l'aide du marqueur GM130 (vert), alors que la présence des mitochondries est révélée par coloration au Mitotracker (rouge). Un anti-Flag a été utilisé pour révéler la présence de CARDIF au niveau de la mitochondrie dans les conditions où la construction a été transfectée.

L'implication des compartiments vésiculaires du ER-Golgi dans la réponse antivirale serait une percée majeure dans la quête visant à comprendre les mécanismes menant à la synthèse des IFNs de type I. Avant la soumission de notre manuscrit, aucune autre étude ne faisait mention d'une participation potentielle de ces vésicules dans la réponse IFN. Toutefois, pendant la période de révision de notre manuscrit, certaines études ont rapporté la localisation de STING au niveau du Golgi (Saitoh et al, 2009), la colocalisation de TRAF3 et SHIP1 dans des vésicules périnucléaires (Gabhann et al) et un rôle négatif de l'Optineurin, une protéine du *trans*-Golgi, dans l'induction de IFN β suivant une infection au SeV (Mankouri et al). Nous sommes cependant conscients que certaines expériences devront être effectuées afin de solidifier notre modèle de travail. Les

interactions endogènes entre TRAF3-Sec16A et TRAF3-p115 ainsi que la localisation cellulaire endogène de TRAF3 devront être démontrées afin de confirmer nos données de surexpression. Ensuite, il serait intéressant de montrer l'influence d'une baisse d'expression des niveaux de Sec16A et p115 par ARN interférence sur le recrutement de TRAF3 à CARDIF.

L'autophagie serait également une avenue de recherche intéressante à considérer pour continuer la caractérisation de la voie RLRs. Selon une étude chez la levure, l'homologue de Sec16A jouerait un rôle dans la formation des autophagosomes (Ishihara et al, 2001). L'origine des membranes formant les autophagosomes demeure encore obscure au niveau de ce processus cellulaire. Toutefois, il semblerait que la mitochondrie, le ER et le Golgi soient potentiellement impliqués (Hamasaki & Yoshimori). Les données récentes indiquent que certaines protéines ayant un rôle dans l'autophagie ont aussi un impact sur la signalisation associée à la voie des RLRs. Par exemple, la mitofusine 2, impliquée dans l'autophagie par son rôle de connexion entre la mitochondrie et le ER (Hailey et al), inhiberait la voie de signalisation antivirale mitochondriale (Yasukawa et al, 2009). Le complexe hétérodimérique Atg12-Atg5 régulerait négativement la voie des RLRs par sa liaison à RIG-I, MDA5 et CARDIF (Jounai et al, 2007). Selon Saitoh et collègues, Atg9a régulerait la cinétique d'assemblage de STING et TBK1 (Saitoh et al, 2009). En absence d'autophagie, l'activité de la voie des RLRs serait également augmentée en raison de l'accumulation cellulaire de mitochondries non fonctionnelles. L'augmentation des niveaux d'expression de CARDIF et la génération des ROS associée à ces mitochondries non éliminées contribueraient à la signalisation par les RLRs (Tal et al, 2009). En raison de tous ces liens moléculaires entre la voie de signalisation par les RLRs et l'autophagie, il serait intéressant de vérifier si Sec16A est impliqué dans le processus autophagique comme son homologue chez la levure.

6.4 La protéine TRK-fused Gene

Lors de nos expériences de purification par affinité couplée à la spectrométrie de masse (AP/MS), nous avons découvert un autre partenaire protéique intéressant de TRAF3 nommé *TRK-fused gene* (TFG) (**voir Figure 34A**). Au niveau moléculaire, cette protéine est très peu caractérisée. TFG a originalement été identifié comme une protéine fusionnée au *Nerve growth factor* (NGF) *receptor* (NGFR) qui génère l'oncogène papillaire de la thyroïde TRK-T3 (Pierotti et al, 1995). L'ADN complémentaire (ADNc) encode une protéine de 400 aa contenant un domaine N-terminal de type *coiled-coil* (Greco et al, 1998; Greco et al, 1995) ainsi qu'un domaine *Src Homology 3* (SH3) (Ohan et al, 2000). TFG représente un partenaire particulièrement intéressant de TRAF3 puisque des interactions avec c-Src (Amanchy et al, 2008), SHP-1 (Roccatto et al, 2005), TANK et NEMO (Miranda et al, 2006) ont antérieurement été démontrées. Ces protéines possèdent toutes un rôle important à jouer dans la régulation de la voie des RLRs (Cao et al, 2008; Gatot et al, 2007; Guo & Cheng, 2007; Johnsen et al, 2009; Zhao et al, 2007).

En caractérisant ce nouveau partenaire potentiel, nous avons observé une co-immunoprecipitation réciproque de TFG et TRAF3 en surexpression (**voir Figure 34B-C**). Curieusement, TRAF3 et TFG colocalisent également dans des compartiments périnucléaires (**voir Figure 34E**). En caractérisant cette localisation périnucléaire, nous avons conclu que TFG endogène résidait majoritairement au niveau des ERES (**voir Figure 35**). De plus, TFG interagit et colocalise avec Sec16A au niveau de ces structures (**voir Figure 36**). La surexpression de TFG augmente aussi l'induction du gène IFN β de façon dose dépendante suivant une infection virale (**voir Figure 37**). Toutes ces données suggèrent donc que TFG pourrait être impliqué dans la formation du complexe de signalisation médié par CARDIF. De plus, ce réseau d'interaction protéique entre les composants de la voie RLRs et ceux du transport vésiculaire ER-Golgi renforce grandement l'idée que TRAF3 pourrait localiser au niveau des ces compartiments de

transport vésiculaires afin d'être optimalement recruté à CARDIF. Bien que le rôle précis de TFG dans l'assemblage de ce complexe de signalisation demeure à caractériser, il est toutefois tentant de spéculer que, par sa grande capacité à oligomériser via son domaine *coiled-coil*, TFG puisse servir de protéine d'échafaudage. Sa caractérisation antérieure a surtout démontré un rôle dans l'activation de NF- κ B (Miranda et al, 2006), mais nous ne pouvons pas exclure pour l'instant son rôle dans l'activation de IRF-3. D'autres expériences sont évidemment en cours pour éclaircir son rôle dans la défense antivirale.

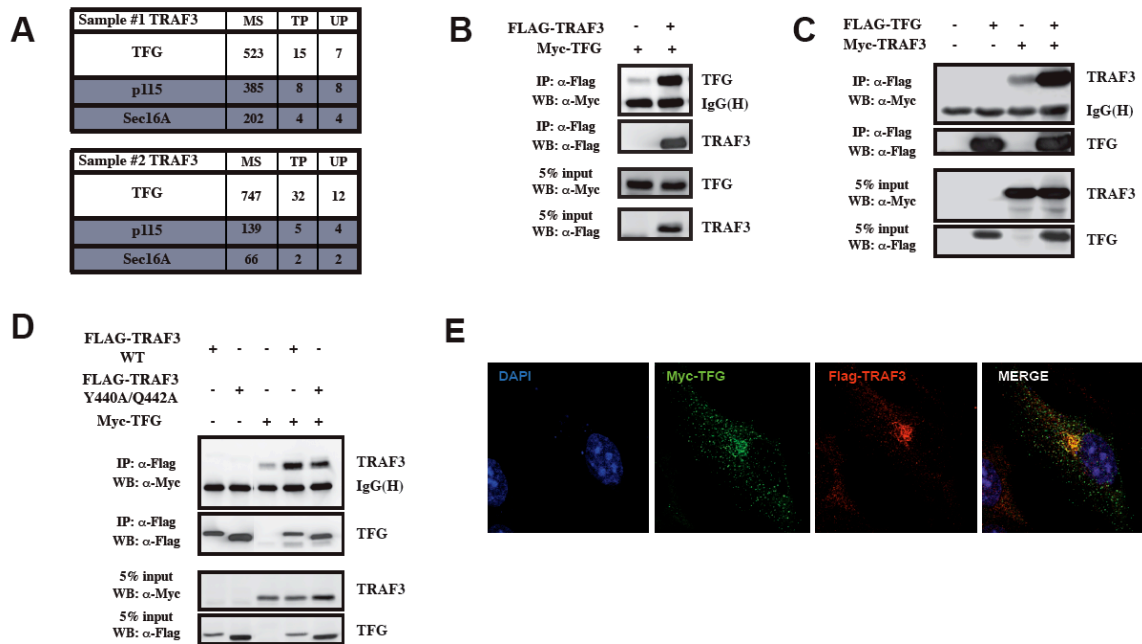


Figure 34. TFG interagit et colocalise avec TRAF3

A) Des cellules 293T ont été transfectées stablement avec pcDNA3-Flag-TRAF3 ou pcDNA3-Flag seul. Après une sélection au G418, les cellules ont été lysées. Les lysats ont ensuite été soumis à un protocole de AP/MS tel que décrit dans le matériel et méthode (Chapitre 5). TFG n'a pas été détecté dans les conditions de contrôle. MS; *average mascot score per analysis*, TP; *average total number of peptides (spectral counts) identified per analysis*, UP; *average number of unique peptides observed per analysis*. B-C) Expérience de co-immunoprécipitation démontrant l'association réciproque de TRAF3 et TFG en surexpression dans les 293T. D) Expérience de co-immunoprécipitation démontrant l'association de TRAF3 à TFG même lorsque le *TIM-binding pocket* de TRAF3 est muté (TRAF3 Y440A/Q442A). E) Microscopie confocale démontrant la colocalisation de Myc-TFG et Flag-TRAF3 dans une région périnucléaire.

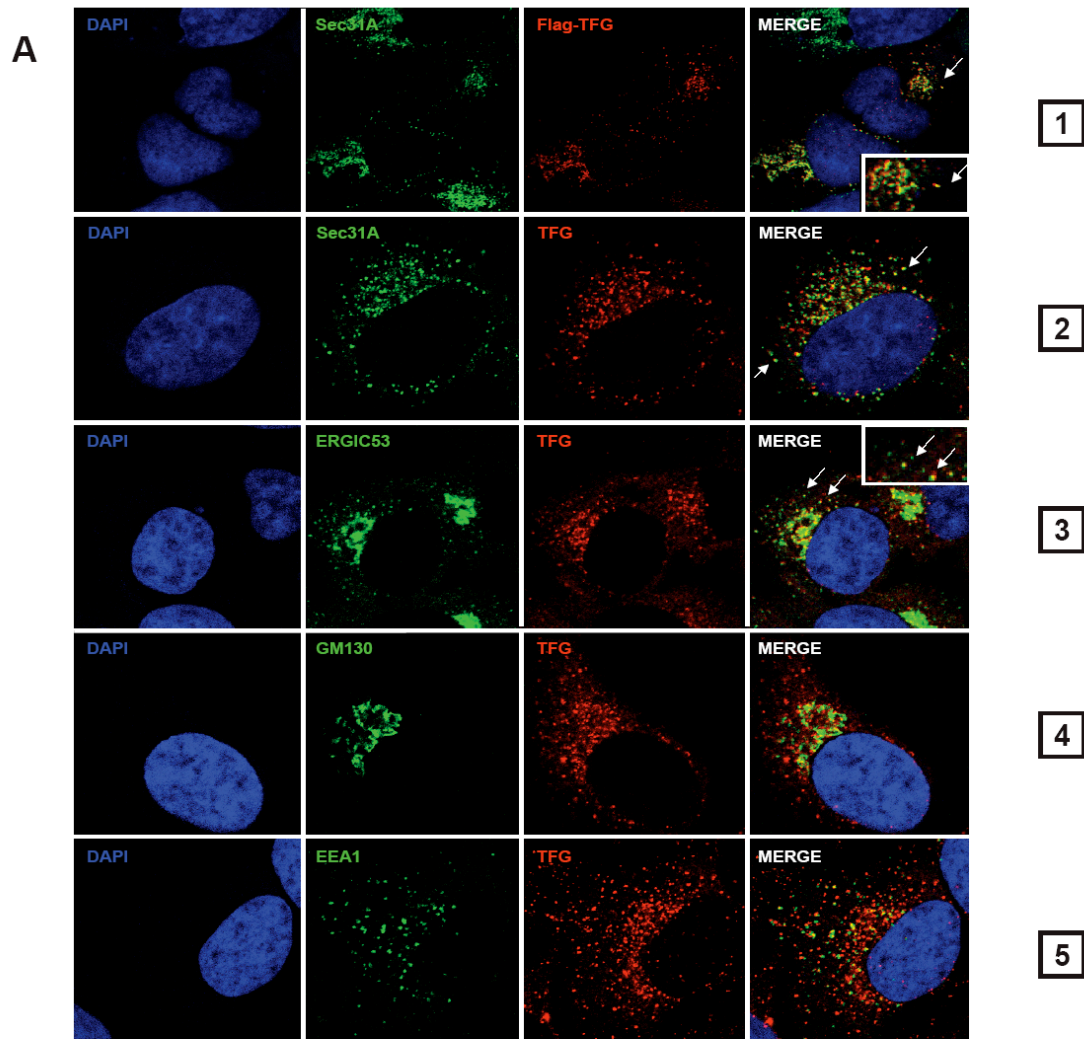
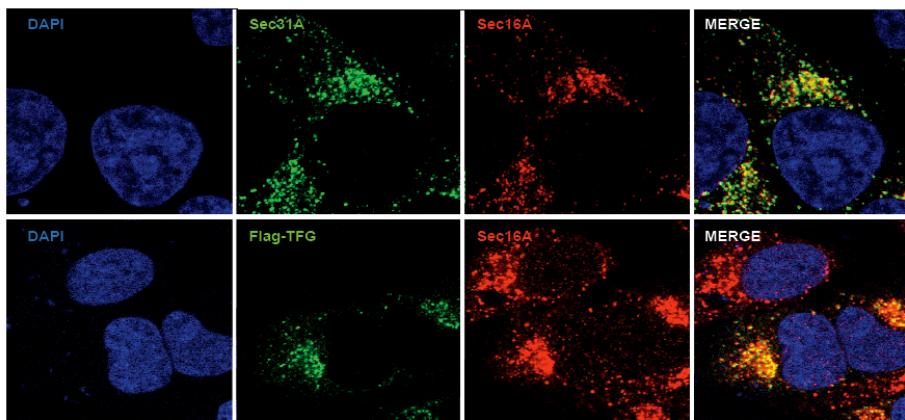


Figure 35. TFG localise au niveau des ERES

Microscopie confocale effectuée dans des cellules HeLa sur Flag-TFG et un marqueur des ERES, Sec31A (ligne 1); TFG endogène et Sec31A (ligne 2), TFG endogène et un marqueur du ERGIC, ERGIC53 (ligne 3); TFG endogène et un marqueur du Golgi, GM130 (ligne 4); TFG endogène et un marqueur des endosomes tardifs, EEA1 (ligne 5).

A



B

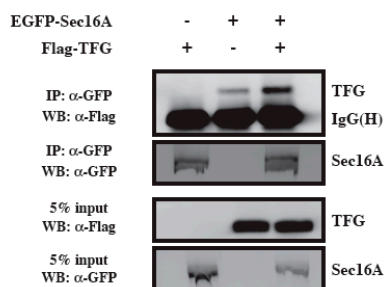


Figure 36. TFG interagit et colocalise avec Sec16A

A) Microscopie confocale effectuée dans des cellules HeLa sur Sec16A et Sec31A (ligne 1), ainsi que Flag-TFG et Sec16A (ligne 2). B) Co-immunoprécipitation de Flag-TFG avec EGFP-Sec16A dans des cellules 293T.

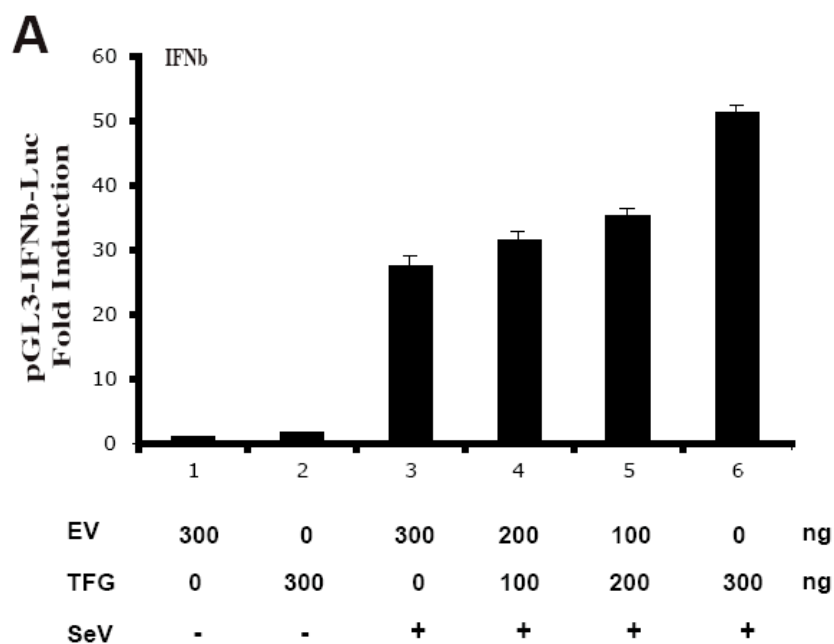


Figure 37. La surexpression de TFG augmente l'induction du gène IFN β suivant une infection virale

Des cellules Hec1B ont été transfectées avec les plasmides indiqués en combinaison avec pGL3-IFN β -luc et pRL-TK. 24h post-transfection les cellules ont été infectées avec du SeV pour 16h. L'activité luciférase a ensuite été mesurée et les données sont exprimées en *fold induction* et comparées à la condition où seulement un vecteur vide (EV) fut transfecté. Chaque valeur représente la moyenne d'une expérience en triplicata +/- la déviation standard.

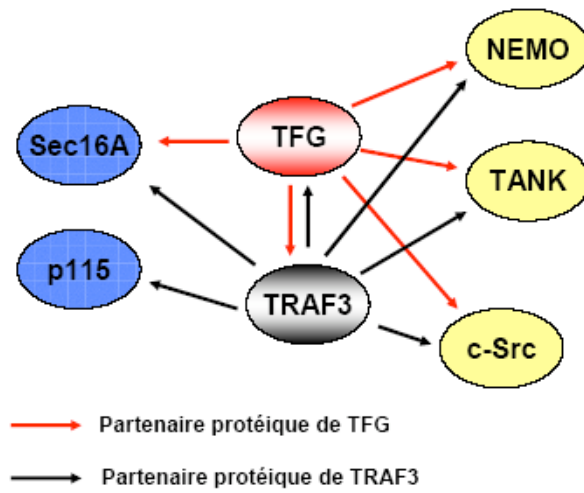


Figure 38. Réseau des interactions protéiques partagées par TRAF3 et TFG

Illustration schématisée des interactions caractérisées pour TRAF3 et TFG. Les interactions de TRAF3 sont illustrées par les flèches noires, alors que celles de TFG le sont par les flèches rouges.

Conclusion

La caractérisation des voies de signalisation impliquées dans l'activation de IRF-3 est essentielle afin de comprendre comment ce facteur de transcription permet d'établir un état de défense antiviral. Son activité transcriptionnelle est hautement régulée par sa phosphorylation et son ubiquitination. En caractérisant de façon plus approfondie les différents *clusters* de phosphorylation situés en C-terminal, nous avons réussi à démontrer que TBK1 pouvait cibler directement la Ser402 et la Ser396. Nous avons également caractérisé davantage le rôle de Ser396 en observant une implication dans les processus de dimérisation, d'association à CBP et d'accumulation nucléaire de IRF-3. De plus, nous avons réussi à démontrer un mécanisme de compensation mutuelle au niveau de la Ser396 et de la Ser339, site préalablement caractérisé pour son implication dans la dégradation de IRF-3. Sachant que la phosphorylation en C-terminal de IRF-3 est indispensable à sa dégradation et que ces deux mécanismes semblent impliqués dans sa régulation transcriptionnelle, nous croyons donc avoir établi un lien moléculaire entre les deux phénomènes. IRF-3 est impliqué dans les processus d'inflammation, de choc septique et de mort cellulaire induite par l'infection virale. Son activité biologique se doit donc d'être contrôlée de façon très stricte par la cellule. L'utilisation d'inhibiteur spécifique de TBK1/IKKi pourrait donc s'avérer une avenue intéressante afin de contrôler ce facteur de transcription. L'identification et la caractérisation de la kinase impliquée dans la phosphorylation de la Ser339 permettront aussi d'offrir une nouvelle option thérapeutique en lien avec cette voie de signalisation.

Nous avons également mis en évidence un rôle des protéines de transport vésiculaires Sec16A et p115 dans la réponse IFN grâce à leur implication dans la localisation cellulaire de TRAF3. La caractérisation de la voie de signalisation par les RLRs est en pleine effervescence et plusieurs morceaux du casse-tête sont encore manquants et/ou incorrectement placés. En caractérisant le rôle des compartiments du transport vésiculaire ER-Golgi dans la réponse IFN, nous avons contribué à démontrer que la formation des complexes de signalisation est un processus régulé par la dynamique du transport

membranaire. Nous espérons que nos résultats aideront à stimuler de nouvelles avenues d'investigation qui auront pour but d'aider la compréhension des mécanismes de régulation impliqués dans l'établissement de la réponse antivirale.

ANNEXE 1

Dans l'étude visant à identifier de nouveaux partenaires protéiques de TRAF3, voici la liste des autres protéines identifiées (à l'exception de TFG dont les données sont présentées dans la Figure 34).

Hit Gene Name	Hit Gene ID	Hit Protein ID	Hit Score	Peptide Number	Unique Peptide Number	Coverage	Frequency
USO1	8615	4505541	3082	615	44	57.4	2.33
GOLGA2	2801	19923757	1519	57	23	36.6	5.43
PCNT	5116	81295809	1238	42	20	9.1	27.13
GOLGB1	2804	148596984	823	22	16	7.2	17.05
PCM1	5108	134142826	498	19	9	6.1	17.05
PRKAR2A	5576	4758958	545	17	9	32.7	5.43
SEC16A	9919	124378039	479	17	8	7.1	10.08
CDK5RAP2	55755	58535451	296	10	7	6.4	3.88
PRKAR2B	5577	47132585	271	9	3	22.7	2.33
PDE4DIP	9659	50658071	291	8	5	6	13.18
PRKACA	5566	4506055	277	8	5	24.5	16.28
ACSL4	2182	4758332	223	7	4	10.4	5.43
FUS	2521	4826734	173	5	3	10.1	28.68
SNRPB	6628	4507125	115	5	2	10.4	24.81
ACTR1A	10121	5031569	94	2	2	10.1	20.16

- 1) proteins in the Gingras background list (generated by analysing several repeats of the flag alone) were removed.
- 2) proteins present in > 35% of all pull-downs in the Gingras database (n>400) were removed.
- 3) proteins identified on the basis of a single unique peptide were removed
- 4) proteins with a coverage < 5% were removed
- 5) proteins with a Mascot score < 80 were removed

Bibliographie

Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V (2009) RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* **10**(10): 1065-1072

Adli M, Baldwin AS (2006) IKK-i/IKKepsilon controls constitutive, cancer cell-associated NF-kappaB activity via regulation of Ser-536 p65/RelA phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **281**(37): 26976-26984

Agalioti T, Lomvardas S, Parekh B, Yie J, Maniatis T, Thanos D (2000) Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell* **103**(4): 667-678

Agashe VR, Hartl FU (2000) Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin Cell Dev Biol* **11**(1): 15-25

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**(4): 783-801

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**(6857): 732-738

Alff PJ, Sen N, Gorbunova E, Gavrillovskaya IN, Mackow ER (2008) The NY-1 hantavirus Gn cytoplasmic tail coprecipitates TRAF3 and inhibits cellular interferon responses by disrupting TBK1-TRAF3 complex formation. *J Virol* **82**(18): 9115-9122

Allan BB, Moyer BD, Balch WE (2000) Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science* **289**(5478): 444-448

Alvarez C, Fujita H, Hubbard A, Sztul E (1999) ER to Golgi transport: Requirement for p115 at a pre-Golgi VTC stage. *J Cell Biol* **147**(6): 1205-1222

Amanchy R, Zhong J, Molina H, Chaerkady R, Iwahori A, Kalume DE, Gronborg M, Joore J, Cope L, Pandey A (2008) Identification of c-Src tyrosine kinase substrates using mass spectrometry and peptide microarrays. *J Proteome Res* **7**(9): 3900-3910

An H, Zhao W, Hou J, Zhang Y, Xie Y, Zheng Y, Xu H, Qian C, Zhou J, Yu Y, Liu S, Feng G, Cao X (2006) SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type I interferon and proinflammatory cytokine production. *Immunity* **25**(6): 919-928

- Ancrile BB, O'Hayer KM, Counter CM (2008) Oncogenic ras-induced expression of cytokines: a new target of anti-cancer therapeutics. *Mol Interv* **8**(1): 22-27
- Andersen J, VanScoy S, Cheng TF, Gomez D, Reich NC (2008) IRF-3-dependent and augmented target genes during viral infection. *Genes Immun* **9**(2): 168-175
- Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, Goodbourn S, Randall RE (2004) The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(49): 17264-17269
- Appenzeller-Herzog C, Hauri HP (2006) The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J Cell Sci* **119**(Pt 11): 2173-2183
- Arch RH, Thompson CB (1998) 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB. *Mol Cell Biol* **18**(1): 558-565
- Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, Konishi H, Fujita T, Shimotohno K (2007) Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(18): 7500-7505
- Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N (2007) DDX3 DEAD-box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **81**(24): 13922-13926
- Au WC, Moore PA, Lowther W, Juang YT, Pitha PM (1995) Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(25): 11657-11661
- Bachler C, Flukiger-Bruhwiller K, Schneider P, Bahler P, Erni B (2005) From ATP as substrate to ADP as coenzyme: functional evolution of the nucleotide binding subunit of dihydroxyacetone kinases. *J Biol Chem* **280**(18): 18321-18325
- Baeuerle PA, Baltimore D (1996) NF-kappa B: ten years after. *Cell* **87**(1): 13-20
- Balachandran S, Barber GN (2000) Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors. *IUBMB Life* **50**(2): 135-138
- Balachandran S, Porosnicu M, Barber GN (2001) Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Ras, or myc function and involves the induction of apoptosis. *Journal of virology* **75**(7): 3474-3479

- Balachandran S, Thomas E, Barber GN (2004) A FADD-dependent innate immune mechanism in mammalian cells. *Nature* **432**(7015): 401-405
- Balkwill F, Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357**(9255): 539-545
- Baltzis D, Pluquet O, Papadakis AI, Kazemi S, Qu LK, Koromilas AE (2007) The eIF2alpha kinases PERK and PKR activate glycogen synthase kinase 3 to promote the proteasomal degradation of p53. *J Biol Chem* **282**(43): 31675-31687
- Baril M, Racine ME, Penin F, Lamarre D (2009) MAVS dimer is a crucial signaling component of innate immunity and the target of hepatitis C virus NS3/4A protease. *J Virol* **83**(3): 1299-1311
- Barnes BJ, Kellum MJ, Field AE, Pitha PM (2002) Multiple regulatory domains of IRF-5 control activation, cellular localization, and induction of chemokines that mediate recruitment of T lymphocytes. *Mol Cell Biol* **22**(16): 5721-5740
- Barnes BJ, Kellum MJ, Pinder KE, Frisancho JA, Pitha PM (2003) Interferon regulatory factor 5, a novel mediator of cell cycle arrest and cell death. *Cancer research* **63**(19): 6424-6431
- Barr FA, Short B (2003) Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* **15**(4): 405-413
- Battcock SM, Collier TW, Zu D, Hirasawa K (2006) Negative regulation of the alpha interferon-induced antiviral response by the Ras/Raf/MEK pathway. *Journal of virology* **80**(9): 4422-4430
- Beard M, Satoh A, Shorter J, Warren G (2005) A cryptic Rab1-binding site in the p115 tethering protein. *J Biol Chem* **280**(27): 25840-25848
- Bergstroem B, Johnsen IB, Nguyen TT, Hagen L, Slupphaug G, Thommesen L, Anthonsen MW Identification of a novel in vivo virus-targeted phosphorylation site in IRF3. *J Biol Chem*
- Bertin J, Nir WJ, Fischer CM, Tayber OV, Errada PR, Grant JR, Keilty JJ, Gosselin ML, Robison KE, Wong GH, Glucksmann MA, DiStefano PS (1999) Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J Biol Chem* **274**(19): 12955-12958
- Beutler BA (2009) TLRs and innate immunity. *Blood* **113**(7): 1399-1407

- Biacchesi S, Le Berre M, Le Guillou S, Benmansour A, Bremont M, Quillet E, Boudinot P (2007) Fish genotype significantly influences susceptibility of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to waterborne infection with infectious salmon anaemia virus. *J Fish Dis* **30**(10): 631-636
- Bibeau-Poirier A, Gravel SP, Clement JF, Rolland S, Rodier G, Coulombe P, Hiscott J, Grandvaux N, Meloche S, Servant MJ (2006) Involvement of the IkappaB kinase (IKK)-related kinases tank-binding kinase 1/IKKi and cullin-based ubiquitin ligases in IFN regulatory factor-3 degradation. *J Immunol* **177**(8): 5059-5067
- Bignell GR, Warren W, Seal S, Takahashi M, Rapley E, Barfoot R, Green H, Brown C, Biggs PJ, Lakhani SR, Jones C, Hansen J, Blair E, Hofmann B, Siebert R, Turner G, Evans DG, Schrandt-Stumpel C, Beemer FA, van Den Ouweland A, Halley D, Delpech B, Cleveland MG, Leigh I, Leisti J, Rasmussen S (2000) Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat Genet* **25**(2): 160-165
- Boehm JS, Zhao JJ, Yao J, Kim SY, Firestein R, Dunn IF, Sjostrom SK, Garraway LA, Weremowicz S, Richardson AL, Greulich H, Stewart CJ, Mulvey LA, Shen RR, Ambrogio L, Hirozane-Kishikawa T, Hill DE, Vidal M, Meyerson M, Grenier JK, Hinkle G, Root DE, Roberts TM, Lander ES, Polyak K, Hahn WC (2007) Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene. *Cell* **129**(6): 1065-1079
- Bohuslav J, Chen LF, Kwon H, Mu Y, Greene WC (2004) p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *The Journal of biological chemistry* **279**(25): 26115-26125
- Bonif M, Meuwis MA, Close P, Benoit V, Heyninck K, Chapelle JP, Bours V, Merville MP, Piette J, Beyaert R, Chariot A (2006) TNFalpha- and IKKbeta-mediated TANK/I-TRAF phosphorylation: implications for interaction with NEMO/IKKgamma and NF-kappaB activation. *Biochem J* **394**(Pt 3): 593-603
- Bonnard M, Mirtsos C, Suzuki S, Graham K, Huang J, Ng M, Itie A, Wakeham A, Shahinian A, Henzel WJ, Elia AJ, Shillinglaw W, Mak TW, Cao Z, Yeh WC (2000) Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF-kappaB-dependent gene transcription. *The EMBO journal* **19**(18): 4976-4985
- Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Croughton K, Cruciat C, Eberhard D, Gagneur J, Ghidelli S, Hopf C, Huhse B, Mangano R, Michon AM, Schirle M, Schlegl J, Schwab M, Stein MA, Bauer A, Casari G, Drewes G, Gavin AC, Jackson DB, Joberty G, Neubauer G, Rick J, Kuster B, Superti-Furga G (2004) A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* **6**(2): 97-105

- Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19**(21): 2474-2488
- Boyden ED, Dietrich WF (2006) Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet* **38**(2): 240-244
- Bradley JR, Pober JS (2001) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* **20**(44): 6482-6491
- Brodeur SR, Cheng G, Baltimore D, Thorley-Lawson DA (1997) Localization of the major NF-kappaB-activating site and the sole TRAF3 binding site of LMP-1 defines two distinct signaling motifs. *J Biol Chem* **272**(32): 19777-19784
- Bromberg J, Darnell JE, Jr. (2000) The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* **19**(21): 2468-2473
- Bromberg KD, Kluger HM, Delaunay A, Abbas S, DiVito KA, Krajewski S, Ronai Z (2007) Increased expression of the E3 ubiquitin ligase RNF5 is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res* **67**(17): 8172-8179
- Brown KD, Hostager BS, Bishop GA (2001) Differential signaling and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) degradation mediated by CD40 and the Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 (LMP1). *J Exp Med* **193**(8): 943-954
- Bukau B, Deuerling E, Pfund C, Craig EA (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* **101**(2): 119-122
- Burckstummer T, Baumann C, Bluml S, Dixit E, Durnberger G, Jahn H, Panyavsky M, Bilban M, Colinge J, Bennett KL, Superti-Furga G (2009) An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol* **10**(3): 266-272
- Burzyn D, Rassa JC, Kim D, Nepomnaschy I, Ross SR, Piazzon I (2004) Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by a retrovirus. *J Virol* **78**(2): 576-584
- Buss H, Dorrie A, Schmitz ML, Hoffmann E, Resch K, Kracht M (2004) Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- κ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I κ B kinase (IKK)- α , IKK β , IKK ϵ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription. *The Journal of biological chemistry* **279**(53): 55633-55643

- Caamano JH, Rizzo CA, Durham SK, Barton DS, Raventos-Suarez C, Snapper CM, Bravo R (1998) Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. *J Exp Med* **187**(2): 185-196
- Cabezas A, Costas MJ, Pinto RM, Couto A, Cameselle JC (2005) Identification of human and rat FAD-AMP lyase (cyclic FMN forming) as ATP-dependent dihydroxyacetone kinases. *Biochem Biophys Res Commun* **338**(4): 1682-1689
- Cadepond F, Schweizer-Groyer G, Segard-Maurel I, Jibard N, Hollenberg SM, Giguere V, Evans RM, Baulieu EE (1991) Heat shock protein 90 as a critical factor in maintaining glucocorticosteroid receptor in a nonfunctional state. *J Biol Chem* **266**(9): 5834-5841
- Caillaud A, Hovanessian AG, Levy DE, Marie IJ (2005) Regulatory serine residues mediate phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent activation of interferon regulatory factor 7. *The Journal of biological chemistry* **280**(18): 17671-17677
- Camonis JH, White MA (2005) Ral GTPases: corrupting the exocyst in cancer cells. *Trends Cell Biol* **15**(6): 327-332
- Cao W, Manicassamy S, Tang H, Kasturi SP, Pirani A, Murthy N, Pulendran B (2008) Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway. *Nat Immunol* **9**(10): 1157-1164
- Cao X, Ballew N, Barlowe C (1998) Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *EMBO J* **17**(8): 2156-2165
- Castanier C, Garcin D, Vazquez A, Arnoult D Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway. *EMBO Rep* **11**(2): 133-138
- Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, Ogura Y, Kawasaki A, Fukase K, Kusumoto S, Valvano MA, Foster SJ, Mak TW, Nunez G, Inohara N (2003) An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* **4**(7): 702-707
- Chariot A, Leonardi A, Muller J, Bonif M, Brown K, Siebenlist U (2002) Association of the adaptor TANK with the I kappa B kinase (IKK) regulator NEMO connects IKK complexes with IKK epsilon and TBK1 kinases. *J Biol Chem* **277**(40): 37029-37036
- Chau TL, Gioia R, Gatot JS, Patrascu F, Carpentier I, Chapelle JP, O'Neill L, Beyaert R, Piette J, Chariot A (2008) Are the IKKs and IKK-related kinases TBK1 and IKK-varepsilon similarly activated? *Trends Biochem Sci*

- Chen LF, Williams SA, Mu Y, Nakano H, Duerr JM, Buckbinder L, Greene WC (2005) NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Mol Cell Biol* **25**(18): 7966-7975
- Chen W, Royer WE, Jr. Structural insights into interferon regulatory factor activation. *Cell Signal* **22**(6): 883-887
- Chen W, Srinath H, Lam SS, Schiffer CA, Royer WE, Jr., Lin K (2008) Contribution of Ser386 and Ser396 to activation of interferon regulatory factor 3. *J Mol Biol* **379**(2): 251-260
- Chen ZJ (2005) Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* **7**(8): 758-765
- Cheng G, Baltimore D (1996) TANK, a co-inducer with TRAF2 of TNF- and CD 40L-mediated NF-kappaB activation. *Genes Dev* **10**(8): 963-973
- Cheng G, Cleary AM, Ye ZS, Hong DI, Lederman S, Baltimore D (1995) Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling. *Science* **267**(5203): 1494-1498
- Cheng TF, Brzostek S, Ando O, Van Scoy S, Kumar KP, Reich NC (2006) Differential activation of IFN regulatory factor (IRF)-3 and IRF-5 transcription factors during viral infection. *J Immunol* **176**(12): 7462-7470
- Chien Y, Kim S, Bumeister R, Loo YM, Kwon SW, Johnson CL, Balakireva MG, Romeo Y, Kopelovich L, Gale M, Jr., Yeaman C, Camonis JH, Zhao Y, White MA (2006) RalB GTPase-mediated activation of the IkappaB family kinase TBK1 couples innate immune signaling to tumor cell survival. *Cell* **127**(1): 157-170
- Chinenov Y, Kerppola TK (2001) Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* **20**(19): 2438-2452
- Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ (2009) RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* **138**(3): 576-591
- Chuang TH, Ulevitch RJ (2004) Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nat Immunol* **5**(5): 495-502
- Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U (2002) BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol* **3**(10): 958-965
- Clement JF, Bibeau-Poirier A, Gravel SP, Grandvaux N, Bonneil E, Thibault P, Meloche S, Servant MJ (2008) Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 generates a hyperactive form of

IRF-3 through regulation of dimerization and CBP association. *Journal of virology* **82**(8): 3984-3996

Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, Yamamoto M, Takeuchi O, Itagaki S, Kumar N, Horii T, Akira S (2005) Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* **201**(1): 19-25

Cole AR, Causeret F, Yadirgi G, Hastie CJ, McLauchlan H, McManus EJ, Hernandez F, Eickholt BJ, Nikolic M, Sutherland C (2006) Distinct priming kinases contribute to differential regulation of collapsin response mediator proteins by glycogen synthase kinase-3 in vivo. *J Biol Chem* **281**(24): 16591-16598

Collins SE, Noyce RS, Mossman KL (2004) Innate cellular response to virus particle entry requires IRF3 but not virus replication. *J Virol* **78**(4): 1706-1717

Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ (2004) Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* **5**(12): 1219-1226

Coope HJ, Atkinson PG, Huhse B, Belich M, Janzen J, Holman MJ, Klaus GG, Johnston LH, Ley SC (2002) CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J* **21**(20): 5375-5385

Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* **420**(6917): 860-867

Dadgostar H, Cheng G (1998) An intact zinc ring finger is required for tumor necrosis factor receptor-associated factor-mediated nuclear factor-kappaB activation but is dispensable for c-Jun N-terminal kinase signaling. *J Biol Chem* **273**(38): 24775-24780

Dadgostar H, Cheng G (2000) Membrane localization of TRAF 3 enables JNK activation. *J Biol Chem* **275**(4): 2539-2544

Dadgostar H, Doyle SE, Shahangian A, Garcia DE, Cheng G (2003) T3JAM, a novel protein that specifically interacts with TRAF3 and promotes the activation of JNK(1). *FEBS Lett* **553**(3): 403-407

Dang O, Navarro L, David M (2004) Inhibition of lipopolysaccharide-induced interferon regulatory factor 3 activation and protection from septic shock by hydroxystilbenes. *Shock* **21**(5): 470-475

Dauber B, Schneider J, Wolff T (2006) Double-stranded RNA binding of influenza B virus nonstructural NS1 protein inhibits protein kinase R but is not essential to antagonize production of alpha/beta interferon. *J Virol* **80**(23): 11667-11677

Dejardin E, Droin NM, Delhase M, Haas E, Cao Y, Makris C, Li ZW, Karin M, Ware CF, Green DR (2002) The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* **17**(4): 525-535

Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ (2000) Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**(2): 351-361

Desrivieres S, Kunz C, Barash I, Vafaizadeh V, Borghouts C, Groner B (2006) The biological functions of the versatile transcription factors STAT3 and STAT5 and new strategies for their targeted inhibition. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **11**(1): 75-87

Diao F, Li S, Tian Y, Zhang M, Xu LG, Zhang Y, Wang RP, Chen D, Zhai Z, Zhong B, Tien P, Shu HB (2007) Negative regulation of MDA5- but not RIG-I-mediated innate antiviral signaling by the dihydroxyacetone kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(28): 11706-11711

Didier C, Broday L, Bhoumik A, Israeli S, Takahashi S, Nakayama K, Thomas SM, Turner CE, Henderson S, Sabe H, Ronai Z (2003) RNF5, a RING finger protein that regulates cell motility by targeting paxillin ubiquitination and altered localization. *Mol Cell Biol* **23**(15): 5331-5345

Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**(5663): 1529-1531

Doble BW, Patel S, Wood GA, Kockeritz LK, Woodgett JR (2007) Functional redundancy of GSK-3alpha and GSK-3beta in Wnt/beta-catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines. *Dev Cell* **12**(6): 957-971

Downward J (2003) Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**(1): 11-22

Dragan AI, Carrillo R, Gerasimova TI, Privalov PL (2008) Assembling the human IFN-beta enhanceosome in solution. *J Mol Biol* **384**(2): 335-348

Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**(1): 47-95

Du W, Maniatis T (1994) The high mobility group protein HMG I(Y) can stimulate or inhibit DNA binding of distinct transcription factor ATF-2 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(24): 11318-11322

- Ebert O, Harbaran S, Shinozaki K, Woo SL (2005) Systemic therapy of experimental breast cancer metastases by mutant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Cancer gene therapy* **12**(4): 350-358
- Eddy SF, Guo S, Demicco EG, Romieu-Mourez R, Landesman-Bollag E, Seldin DC, Sonenshein GE (2005) Inducible IkappaB kinase/IkappaB kinase epsilon expression is induced by CK2 and promotes aberrant nuclear factor-kappaB activation in breast cancer cells. *Cancer research* **65**(24): 11375-11383
- Elco CP, Guenther JM, Williams BR, Sen GC (2005) Analysis of genes induced by Sendai virus infection of mutant cell lines reveals essential roles of interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and interferon but not toll-like receptor 3. *J Virol* **79**(7): 3920-3929
- Escalante CR, Yie J, Thanos D, Aggarwal AK (1998) Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation. *Nature* **391**(6662): 103-106
- Fan S, Chen S, Liu Y, Lin Y, Liu H, Guo L, Lin B, Huang S, Xu A (2008) Zebrafish TRIF, a Golgi-localized protein, participates in IFN induction and NF-kappaB activation. *J Immunol* **180**(8): 5373-5383
- Faustin B, Lartigue L, Bruet JM, Luciano F, Sergienko E, Bailly-Maitre B, Volkmann N, Hanein D, Rouiller I, Reed JC (2007) Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell* **25**(5): 713-724
- Feldman DE, Frydman J (2000) Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones. *Curr Opin Struct Biol* **10**(1): 26-33
- Ferdous A, Gonzalez F, Sun L, Kodadek T, Johnston SA (2001) The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* **7**(5): 981-991
- Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES (2009) AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* **458**(7237): 509-513
- Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T (2003) IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* **4**(5): 491-496
- Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA (2001) Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* **413**(6851): 78-83

- Floettmann JE, Rowe M (1997) Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) C-terminus activation region 2 (CTAR2) maps to the far C-terminus and requires oligomerisation for NF-kappaB activation. *Oncogene* **15**(15): 1851-1858
- Forde JE, Dale TC (2007) Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. *Cell Mol Life Sci* **64**(15): 1930-1944
- Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, Jagirdar R, Inohara N, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant EP, Nunez G (2006) Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol* **7**(6): 576-582
- Franchi L, Warner N, Viani K, Nunez G (2009) Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* **227**(1): 106-128
- Fredericksen BL, Keller BC, Fornek J, Katze MG, Gale M, Jr. (2008) Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1. *J Virol* **82**(2): 609-616
- Friedman CS, O'Donnell MA, Legarda-Addison D, Ng A, Cardenas WB, Yount JS, Moran TM, Basler CF, Komuro A, Horvath CM, Xavier R, Ting AT (2008) The tumour suppressor CYLD is a negative regulator of RIG-I-mediated antiviral response. *EMBO Rep* **9**(9): 930-936
- Fujii K, Nakamura S, Takahashi K, Inagaki F Systematic characterization by mass spectrometric analysis of phosphorylation sites in IRF-3 regulatory domain activated by IKK-i. *J Proteomics* **73**(6): 1196-1203
- Fujita F, Taniguchi Y, Kato T, Narita Y, Furuya A, Ogawa T, Sakurai H, Joh T, Itoh M, Delhase M, Karin M, Nakanishi M (2003) Identification of NAP1, a regulatory subunit of IkappaB kinase-related kinases that potentiates NF-kappaB signaling. *Mol Cell Biol* **23**(21): 7780-7793
- Fujita T, Kimura Y, Miyamoto M, Barsoumian EL, Taniguchi T (1989) Induction of endogenous IFN-alpha and IFN-beta genes by a regulatory transcription factor, IRF-1. *Nature* **337**(6204): 270-272
- Gabhann JN, Higgs R, Brennan K, Thomas W, Damen JE, Ben Larbi N, Krystal G, Jefferies CA Absence of SHIP-1 results in constitutive phosphorylation of tank-binding kinase 1 and enhanced TLR3-dependent IFN-beta production. *J Immunol* **184**(5): 2314-2320

- Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU (2007) TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* **446**(7138): 916-920
- Gamper C, van Eyndhoven WG, Schweiger E, Mossbacher M, Koo B, Lederman S (2000) TRAF-3 interacts with p62 nucleoporin, a component of the nuclear pore central plug that binds classical NLS-containing import complexes. *Mol Immunol* **37**(1-2): 73-84
- Garcia-Ruiz C, Colell A, Morales A, Calvo M, Enrich C, Fernandez-Checa JC (2002) Trafficking of ganglioside GD3 to mitochondria by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* **277**(39): 36443-36448
- Gatot JS, Gioia R, Chau TL, Patrascu F, Warnier M, Close P, Chapelle JP, Muraille E, Brown K, Siebenlist U, Piette J, Dejardin E, Chariot A (2007) Lipopolysaccharide-mediated interferon regulatory factor activation involves TBK1-IKKepsilon-dependent Lys(63)-linked polyubiquitination and phosphorylation of TANK/I-TRAF. *J Biol Chem* **282**(43): 31131-31146
- Gedrich RW, Gilfillan MC, Duckett CS, Van Dongen JL, Thompson CB (1996) CD30 contains two binding sites with different specificities for members of the tumor necrosis factor receptor-associated factor family of signal transducing proteins. *J Biol Chem* **271**(22): 12852-12858
- Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM (1986) Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* **46**(5): 645-652
- Gilmore TD (2006) Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**(51): 6680-6684
- Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zahringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ, Philpott DJ (2003a) Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* **300**(5625): 1584-1587
- Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ (2003b) Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* **278**(11): 8869-8872
- Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, Diamond MS, Colonna M (2006) Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(22): 8459-8464
- Godl K, Gruss OJ, Eickhoff J, Wissing J, Blencke S, Weber M, Degen H, Brehmer D, Orfi L, Horvath Z, Keri G, Muller S, Cotten M, Ullrich A, Daub H (2005) Proteomic

characterization of the angiogenesis inhibitor SU6668 reveals multiple impacts on cellular kinase signaling. *Cancer research* **65**(15): 6919-6926

Gonzalez F, Delahodde A, Kodadek T, Johnston SA (2002) Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter. *Science* **296**(5567): 548-550

Goubau D, Romieu-Mourez R, Solis M, Hernandez E, Mesplede T, Lin R, Leaman D, Hiscott J (2009) Transcriptional re-programming of primary macrophages reveals distinct apoptotic and anti-tumoral functions of IRF-3 and IRF-7. *Eur J Immunol* **39**(2): 527-540

Grandvaux N, Servant MJ, tenOever B, Sen GC, Balachandran S, Barber GN, Lin R, Hiscott J (2002a) Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J Virol* **76**(11): 5532-5539

Grandvaux N, tenOever BR, Servant MJ, Hiscott J (2002b) The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. *Curr Opin Infect Dis* **15**(3): 259-267

Gravel SP, Servant MJ (2005) Roles of an IkappaB kinase-related pathway in human cytomegalovirus-infected vascular smooth muscle cells: a molecular link in pathogen-induced proatherosclerotic conditions. *J Biol Chem* **280**(9): 7477-7486

Greco A, Fusetti L, Miranda C, Villa R, Zanotti S, Pagliardini S, Pierotti MA (1998) Role of the TFG N-terminus and coiled-coil domain in the transforming activity of the thyroid TRK-T3 oncogene. *Oncogene* **16**(6): 809-816

Greco A, Mariani C, Miranda C, Lupas A, Pagliardini S, Pomati M, Pierotti MA (1995) The DNA rearrangement that generates the TRK-T3 oncogene involves a novel gene on chromosome 3 whose product has a potential coiled-coil domain. *Mol Cell Biol* **15**(11): 6118-6127

Greenfield JJ, High S (1999) The Sec61 complex is located in both the ER and the ER-Golgi intermediate compartment. *J Cell Sci* **112** (Pt 10): 1477-1486

Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M (2004) IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* **118**(3): 285-296

Groskreutz DJ, Monick MM, Powers LS, Yarovinsky TO, Look DC, Hunninghake GW (2006) Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells. *J Immunol* **176**(3): 1733-1740

- Guo B, Cheng G (2007) Modulation of the interferon antiviral response by the TBK1/IKKi adaptor protein TANK. *J Biol Chem* **282**(16): 11817-11826
- Guo J, Hui DJ, Merrick WC, Sen GC (2000) A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3. *The EMBO journal* **19**(24): 6891-6899
- Gurcel L, Abrami L, Girardin S, Tschopp J, van der Goot FG (2006) Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell* **126**(6): 1135-1145
- Ha YJ, Lee JR (2004) Role of TNF receptor-associated factor 3 in the CD40 signaling by production of reactive oxygen species through association with p40phox, a cytosolic subunit of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *J Immunol* **172**(1): 231-239
- Hacker H, Karin M (2006) Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* **2006**(357): re13
- Hacker H, Redecke V, Blagoev B, Kratchmarova I, Hsu LC, Wang GG, Kamps MP, Raz E, Wagner H, Hacker G, Mann M, Karin M (2006) Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* **439**(7073): 204-207
- Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, Lippincott-Schwartz J Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* **141**(4): 656-667
- Hamad NM, Elconin JH, Karnoub AE, Bai W, Rich JN, Abraham RT, Der CJ, Counter CM (2002) Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells. *Genes Dev* **16**(16): 2045-2057
- Hamasaki M, Yoshimori T Where do they come from? Insights into autophagosome formation. *FEBS Lett* **584**(7): 1296-1301
- Hardarson HS, Baker JS, Yang Z, Purevjav E, Huang CH, Alexopoulou L, Li N, Flavell RA, Bowles NE, Vallejo JG (2007) Toll-like receptor 3 is an essential component of the innate stress response in virus-induced cardiac injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**(1): H251-258
- Harris J, Olieri S, Sharma S, Sun Q, Lin R, Hiscott J, Grandvaux N (2006) Nuclear accumulation of cRel following C-terminal phosphorylation by TBK1/IKK epsilon. *J Immunol* **177**(4): 2527-2535

- Hasegawa M, Fujimoto Y, Lucas PC, Nakano H, Fukase K, Nunez G, Inohara N (2008) A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *EMBO J* **27**(2): 373-383
- Hauer J, Puschner S, Ramakrishnan P, Simon U, Bongers M, Federle C, Engelmann H (2005) TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(8): 2874-2879
- Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, Skerrett SJ, Beutler B, Schroeder L, Nachman A, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A (2003) A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med* **198**(10): 1563-1572
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**(6832): 1099-1103
- Hayden MS, Ghosh S (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* **18**(18): 2195-2224
- He JQ, Oganessian G, Saha SK, Zarnegar B, Cheng G (2007) TRAF3 and its biological function. *Adv Exp Med Biol* **597**: 48-59
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**(5663): 1526-1529
- Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S (2002) Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* **3**(2): 196-200
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**(6813): 740-745
- Heylbroeck C, Balachandran S, Servant MJ, DeLuca C, Barber GN, Lin R, Hiscott J (2000) The IRF-3 transcription factor mediates Sendai virus-induced apoptosis. *J Virol* **74**(8): 3781-3792.
- Higgs R, Ni Gabhann J, Ben Larbi N, Breen EP, Fitzgerald KA, Jefferies CA (2008) The E3 ubiquitin ligase Ro52 negatively regulates IFN-beta production post-pathogen recognition by polyubiquitin-mediated degradation of IRF3. *J Immunol* **181**(3): 1780-1786

Hiscott J, Alper D, Cohen L, Leblanc JF, Sportza L, Wong A, Xanthoudakis S (1989) Induction of human interferon gene expression is associated with a nuclear factor that interacts with the NF-kappa B site of the human immunodeficiency virus enhancer. *J Virol* **63**(6): 2557-2566

Hiscott J, Grandvaux N, Sharma S, Tenoever BR, Servant MJ, Lin R (2003) Convergence of the NF-kappaB and interferon signaling pathways in the regulation of antiviral defense and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* **1010**: 237-248

Hitotsumatsu O, Ahmad RC, Tavares R, Wang M, Philpott D, Turer EE, Lee BL, Shiffin N, Advincula R, Malynn BA, Werts C, Ma A (2008) The ubiquitin-editing enzyme A20 restricts nucleotide-binding oligomerization domain containing 2-triggered signals. *Immunity* **28**(3): 381-390

Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J, Beutler B (2003) Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* **424**(6950): 743-748

Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D (2002) The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* **298**(5596): 1241-1245

Holm GH, Zurney J, Tumilasci V, Leveille S, Danthi P, Hiscott J, Sherry B, Dermody TS (2007) Retinoic acid-inducible gene-I and interferon-beta promoter stimulator-1 augment proapoptotic responses following mammalian reovirus infection via interferon regulatory factor-3. *The Journal of biological chemistry* **282**(30): 21953-21961

Honda K, Takaoka A, Taniguchi T (2006) Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* **25**(3): 349-360

Honda K, Taniguchi T (2006) IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature reviews* **6**(9): 644-658

Honda K, Yanai H, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, Ohba Y, Takaoka A, Yeh WC, Taniguchi T (2004) Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(43): 15416-15421

Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N, Taniguchi T (2005a) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**(7034): 772-777

Honda K, Yanai H, Takaoka A, Taniguchi T (2005b) Regulation of the type I IFN induction: a current view. *Int Immunol* **17**(11): 1367-1378

Hornig T, Barton GM, Medzhitov R (2001) TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* **2**(9): 835-841

Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, Latz E, Fitzgerald KA (2009) AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* **458**(7237): 514-518

Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G (2006) 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**(5801): 994-997

Hornung V, Latz E Intracellular DNA recognition. *Nat Rev Immunol* **10**(2): 123-130

Hostager BS, Bishop GA (1999) Cutting edge: contrasting roles of TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) and TRAF3 in CD40-activated B lymphocyte differentiation. *J Immunol* **162**(11): 6307-6311

Hostager BS, Haxhinasto SA, Rowland SL, Bishop GA (2003) Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2)-deficient B lymphocytes reveal novel roles for TRAF2 in CD40 signaling. *J Biol Chem* **278**(46): 45382-45390

Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV (1996a) TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* **4**(4): 387-396

Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV (1996b) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* **84**(2): 299-308

Hsu H, Xiong J, Goeddel DV (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **81**(4): 495-504

Hsu LC, Ali SR, McGillivray S, Tseng PH, Mariathasan S, Humke EW, Eckmann L, Powell JJ, Nizet V, Dixit VM, Karin M (2008) A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1beta secretion in response to Bacillus anthracis infection and muramyl dipeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(22): 7803-7808

Hu WH, Mo XM, Walters WM, Brambilla R, Bethea JR (2004) TNAP, a novel repressor of NF-kappaB-inducing kinase, suppresses NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **279**(34): 35975-35983

Huang J, Liu T, Xu LG, Chen D, Zhai Z, Shu HB (2005) SIKE is an IKK epsilon/TBK1-associated suppressor of TLR3- and virus-triggered IRF-3 activation pathways. *The EMBO journal* **24**(23): 4018-4028

Iinuma T, Aoki T, Arasaki K, Hirose H, Yamamoto A, Samata R, Hauri HP, Arimitsu N, Tagaya M, Tani K (2009) Role of syntaxin 18 in the organization of endoplasmic reticulum subdomains. *J Cell Sci* **122**(Pt 10): 1680-1690

Iinuma T, Shiga A, Nakamoto K, O'Brien MB, Aridor M, Arimitsu N, Tagaya M, Tani K (2007) Mammalian Sec16/p250 plays a role in membrane traffic from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **282**(24): 17632-17639

Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Nunez G (1999) Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* **274**(21): 14560-14567

Isaacs A, Lindenmann J (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**(927): 258-267

Ishihara N, Hamasaki M, Yokota S, Suzuki K, Kamada Y, Kihara A, Yoshimori T, Noda T, Ohsumi Y (2001) Autophagosome requires specific early Sec proteins for its formation and NSF/SNARE for vacuolar fusion. *Mol Biol Cell* **12**(11): 3690-3702

Ishii KJ, Coban C, Kato H, Takahashi K, Torii Y, Takeshita F, Ludwig H, Sutter G, Suzuki K, Hemmi H, Sato S, Yamamoto M, Uematsu S, Kawai T, Takeuchi O, Akira S (2006) A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* **7**(1): 40-48

Ishii KJ, Kawagoe T, Koyama S, Matsui K, Kumar H, Kawai T, Uematsu S, Takeuchi O, Takeshita F, Coban C, Akira S (2008) TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature* **451**(7179): 725-729

Ishikawa H, Barber GN (2008) STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**(7213): 674-678

Iwamura T, Yoneyama M, Yamaguchi K, Suhara W, Mori W, Shiota K, Okabe Y, Namiki H, Fujita T (2001) Induction of IRF-3/-7 kinase and NF-kappaB in response to double-stranded RNA and virus infection: common and unique pathways. *Genes Cells* **6**(4): 375-388.

Jakob U, Lilie H, Meyer I, Buchner J (1995) Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock in vivo. *J Biol Chem* **270**(13): 7288-7294

Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**: 197-216

- Jin L, Waterman PM, Jonscher KR, Short CM, Reisdorph NA, Cambier JC (2008) MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals. *Mol Cell Biol* **28**(16): 5014-5026
- Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, Lee H, Lee JO (2007) Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* **130**(6): 1071-1082
- Johnsen IB, Nguyen TT, Bergstroem B, Fitzgerald KA, Anthonen MW (2009) The tyrosine kinase c-Src enhances RIG-I (retinoic acid-inducible gene I)-elicited antiviral signaling. *J Biol Chem* **284**(28): 19122-19131
- Johnsen IB, Nguyen TT, Ringdal M, Tryggestad AM, Bakke O, Lien E, Espevik T, Anthonen MW (2006) Toll-like receptor 3 associates with c-Src tyrosine kinase on endosomes to initiate antiviral signaling. *EMBO J* **25**(14): 3335-3346
- Jones SJ, Ledgerwood EC, Prins JB, Galbraith J, Johnson DR, Pober JS, Bradley JR (1999) TNF recruits TRADD to the plasma membrane but not the trans-Golgi network, the principal subcellular location of TNF-R1. *J Immunol* **162**(2): 1042-1048
- Jounai N, Takeshita F, Kobiyama K, Sawano A, Miyawaki A, Xin KQ, Ishii KJ, Kawai T, Akira S, Suzuki K, Okuda K (2007) The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(35): 14050-14055
- Juang YT, Lowther W, Kellum M, Au WC, Lin R, Hiscott J, Pitha PM (1998) Primary activation of interferon A and interferon B gene transcription by interferon regulatory factor-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**: 9837-9842
- Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, Lipford G, Bauer S (2002) Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* **3**(6): 499
- Kanneganti TD, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Whitfield J, Franchi L, Taraporewala ZF, Miller D, Patton JT, Inohara N, Nunez G (2006a) Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem* **281**(48): 36560-36568
- Kanneganti TD, Ozoren N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L, Whitfield J, Barchet W, Colonna M, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant EP, Akira S, Nunez G (2006b) Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* **440**(7081): 233-236

- Karaghiosoff M, Steinborn R, Kovarik P, Kriegshauser G, Baccarini M, Donabauer B, Reichart U, Kolbe T, Bogdan C, Leanderson T, Levy D, Decker T, Muller M (2003) Central role for type I interferons and Tyk2 in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. *Nat Immunol* **4**(5): 471-477
- Karin M (2008) The IkappaB kinase - a bridge between inflammation and cancer. *Cell Res* **18**(3): 334-342
- Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* **18**: 621-663
- Karin M, Greten FR (2005) NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature reviews* **5**(10): 749-759
- Karin M, Lawrence T, Nizet V (2006) Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* **124**(4): 823-835
- Karpova AY, Trost M, Murray JM, Cantley LC, Howley PM (2002) Interferon regulatory factor-3 is an in vivo target of DNA-PK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5): 2818-2823
- Kassel O, Herrlich P (2007) Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects. *Mol Cell Endocrinol* **275**(1-2): 13-29
- Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O, Akira S (2005) Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* **23**(1): 19-28
- Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, Hiiragi A, Dermody TS, Fujita T, Akira S (2008) Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* **205**(7): 1601-1610
- Kawabe T, Naka T, Yoshida K, Tanaka T, Fujiwara H, Suematsu S, Yoshida N, Kishimoto T, Kikutani H (1994) The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* **1**(3): 167-178
- Kawai T, Akira S (2007) TLR signaling. *Semin Immunol* **19**(1): 24-32
- Kawai T, Akira S (2009) The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* **21**(4): 317-337
- Kawai T, Sato S, Ishii KJ, Coban C, Hemmi H, Yamamoto M, Terai K, Matsuda M, Inoue J, Uematsu S, Takeuchi O, Akira S (2004) Interferon-alpha induction through Toll-like

receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* **5**(10): 1061-1068

Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S (2005) IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* **6**(10): 981-988

Kawamata S, Hori T, Imura A, Takaori-Kondo A, Uchiyama T (1998) Activation of OX40 signal transduction pathways leads to tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2- and TRAF5-mediated NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **273**(10): 5808-5814

Kay JE (1996) Structure-function relationships in the FK506-binding protein (FKBP) family of peptidylprolyl cis-trans isomerases. *Biochem J* **314** (Pt 2): 361-385

Kayagaki N, Phung Q, Chan S, Chaudhari R, Quan C, O'Rourke KM, Eby M, Pietras E, Cheng G, Bazan JF, Zhang Z, Arnott D, Dixit VM (2007) DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production. *Science* **318**(5856): 1628-1632

Kaye KM, Devergne O, Harada JN, Izumi KM, Yalamanchili R, Kieff E, Mosialos G (1996) Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF-kappa B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20): 11085-11090

Kim HS, Lee MS (2007) STAT1 as a key modulator of cell death. *Cell Signal* **19**(3): 454-465

Kim T, Kim TY, Song YH, Min IM, Yim J, Kim TK (1999) Activation of interferon regulatory factor 3 in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem* **274**(43): 30686-30689

Kim TK, Lee JS, Jung JE, Oh SY, Kwak S, Jin X, Lee SY, Lee JB, Chung YG, Choi YK, You S, Kim H (2006) Interferon regulatory factor 3 activates p53-dependent cell growth inhibition. *Cancer Lett* **242**(2): 215-221

Kim TK, Lee JS, Oh SY, Jin X, Choi YJ, Lee TH, Lee E, Choi YK, You S, Chung YG, Lee JB, DePinho RA, Chin L, Kim H (2007) Direct transcriptional activation of promyelocytic leukemia protein by IFN regulatory factor 3 induces the p53-dependent growth inhibition of cancer cells. *Cancer research* **67**(23): 11133-11140

Kirshner JR, Karpova AY, Kops M, Howley PM (2005) Identification of TRAIL as an interferon regulatory factor 3 transcriptional target. *J Virol* **79**(14): 9320-9324

- Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, Flavell RA (2005) Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* **307**(5710): 731-734
- Komuro A, Horvath CM (2006) RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2. *J Virol* **80**(24): 12332-12342
- Kondylis V, Rabouille C (2003) A novel role for dp115 in the organization of tER sites in Drosophila. *J Cell Biol* **162**(2): 185-198
- Kopp EB, Ghosh S (1995) NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol* **58**: 1-27
- Korherr C, Gille H, Schafer R, Koenig-Hoffmann K, Dixelius J, Eglund KA, Pastan I, Brinkmann U (2006) Identification of proangiogenic genes and pathways by high-throughput functional genomics: TBK1 and the IRF3 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(11): 4240-4245
- Krajewski S, Zapata JM, Krajewska M, VanArsdale T, Shabaik A, Gascoyne RD, Reed JC (1997) Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of TRAF-3 expression, a member of the TNF receptor-associated factor family. *J Immunol* **159**(12): 5841-5852
- Kravchenko VV, Mathison JC, Schwamborn K, Mercurio F, Ulevitch RJ (2003) IKKi/IKKepsilon plays a key role in integrating signals induced by pro-inflammatory stimuli. *The Journal of biological chemistry* **278**(29): 26612-26619
- Krug A, French AR, Barchet W, Fischer JA, Dzionek A, Pingel JT, Orihuela MM, Akira S, Yokoyama WM, Colonna M (2004) TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* **21**(1): 107-119
- Kubota T, Matsuoka M, Chang TH, Tailor P, Sasaki T, Tashiro M, Kato A, Ozato K (2008) Virus infection triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, leading to the negative regulation of type I interferon gene expression. *J Biol Chem* **283**(37): 25660-25670
- Kumar H, Kawai T, Akira S (2009a) Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J* **420**(1): 1-16
- Kumar H, Kawai T, Akira S (2009b) Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* **388**(4): 621-625
- Kumar KP, McBride KM, Weaver BK, Dingwall C, Reich NC (2000a) Regulated nuclear-cytoplasmic localization of interferon regulatory factor 3, a subunit of double-stranded RNA-activated factor 1. *Mol Cell Biol* **20**(11): 4159-4168.

Kumar KP, McBride KM, Weaver BK, Dingwall C, Reich NC (2000b) Regulated nuclear-cytoplasmic localization of interferon regulatory factor 3, a subunit of double-stranded RNA-activated factor 1. *Mol Cell Biol* **20**(11): 4159-4168

Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW (2000) Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* **1**(5): 398-401

Kwon B, Yu KY, Ni J, Yu GL, Jang IK, Kim YJ, Xing L, Liu D, Wang SX, Kwon BS (1999) Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand. *J Biol Chem* **274**(10): 6056-6061

Lallemant C, Blanchard B, Palmieri M, Lebon P, May E, Tovey MG (2007) Single-stranded RNA viruses inactivate the transcriptional activity of p53 but induce NOXA-dependent apoptosis via post-translational modifications of IRF-1, IRF-3 and CREB. *Oncogene* **26**(3): 328-338

Lawrence T, Bebien M, Liu GY, Nizet V, Karin M (2005) IKK α limits macrophage NF- κ B activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* **434**(7037): 1138-1143

Lee MS, Kim YJ (2007) Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem* **76**: 447-480

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**(6): 973-983

Lenardo MJ, Baltimore D (1989) NF- κ B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* **58**(2): 227-229

Lerebours F, Vacher S, Andrieu C, Espie M, Marty M, Lidereau R, Bieche I (2008) NF- κ B genes have a major role in inflammatory breast cancer. *BMC Cancer* **8**: 41

Levenson JD, Koskinen PJ, Orrico FC, Rainio EM, Jalkanen KJ, Dash AB, Eisenman RN, Ness SA (1998) Pim-1 kinase and p100 cooperate to enhance c-Myb activity. *Mol Cell* **2**(4): 417-425

Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H (2002) IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(8): 5567-5572

- Liao G, Zhang M, Harhaj EW, Sun SC (2004) Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J Biol Chem* **279**(25): 26243-26250
- Lim KH, O'Hayer K, Adam SJ, Kendall SD, Campbell PM, Der CJ, Counter CM (2006) Divergent roles for RalA and RalB in malignant growth of human pancreatic carcinoma cells. *Curr Biol* **16**(24): 2385-2394
- Lin R, Heylbroeck C, Genin P, Pitha PM, Hiscott J (1999a) Essential role of interferon regulatory factor 3 in direct activation of RANTES chemokine transcription. *Mol Cell Biol* **19**(2): 959-966.
- Lin R, Heylbroeck C, Pitha PM, Hiscott J (1998) Virus dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential and proteasome mediated degradation. *Molecular and Cellular Biology* **18**: 2986-2996
- Lin R, Mamane Y, Hiscott J (1999b) Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains. *Mol Cell Biol* **19**(4): 2465-2474
- Lin R, Mamane Y, Hiscott J (1999c) Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains. *Mol Cell Biol* **19**(4): 2465-2474.
- Lin R, Mamane Y, Hiscott J (2000) Multiple regulatory domains control IRF-7 activity in response to virus infection. *J Biol Chem* **275**(44): 34320-34327.
- Lin R, Yang L, Arguello M, Penafuerte C, Hiscott J (2005) A CRM1-dependent nuclear export pathway is involved in the regulation of IRF-5 subcellular localization. *The Journal of biological chemistry* **280**(4): 3088-3095
- Lin R, Yang L, Nakhaei P, Sun Q, Sharif-Askari E, Julkunen I, Hiscott J (2006) Negative regulation of the retinoic acid-inducible gene I-induced antiviral state by the ubiquitin-editing protein A20. *J Biol Chem* **281**(4): 2095-2103
- Lin WW, Karin M (2007) A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* **117**(5): 1175-1183
- Ling L, Goeddel DV (2000) MIP-T3, a novel protein linking tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 to the microtubule network. *J Biol Chem* **275**(31): 23852-23860

- Lippincott-Schwartz J, Donaldson JG, Schweizer A, Berger EG, Hauri HP, Yuan LC, Klausner RD (1990) Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* **60**(5): 821-836
- Lipschutz JH, Lingappa VR, Mostov KE (2003) The exocyst affects protein synthesis by acting on the translocation machinery of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **278**(23): 20954-20960
- Lonard DM, Nawaz Z, Smith CL, O'Malley BW (2000) The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol Cell* **5**(6): 939-948
- Loo YM, Fornek J, Crochet N, Bajwa G, Perwitasari O, Martinez-Sobrido L, Akira S, Gill MA, Garcia-Sastre A, Katze MG, Gale M, Jr. (2008) Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol* **82**(1): 335-345
- Lopez-Illasaca M, Schiene C, Kullertz G, Tradler T, Fischer G, Wetzker R (1998) Effects of FK506-binding protein 12 and FK506 on autophosphorylation of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **273**(16): 9430-9434
- Lu KP, Hanes SD, Hunter T (1996) A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* **380**(6574): 544-547
- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**(2): 145-151
- Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A (2003) Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **198**(3): 513-520
- Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA (2004) Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(15): 5598-5603
- Luo JL, Tan W, Ricono JM, Korchynskiy O, Zhang M, Gonias SL, Cheresch DA, Karin M (2007) Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. *Nature* **446**(7136): 690-694
- Mackenzie JM, Westaway EG (2001) Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J Virol* **75**(22): 10787-10799

- Maeda S, Kamata H, Luo JL, Leffert H, Karin M (2005) IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* **121**(7): 977-990
- Malathi K, Dong B, Gale M, Jr., Silverman RH (2007) Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* **448**(7155): 816-819
- Mamane Y, Heylbroeck C, Genin P, Algarte M, Servant MJ, LePage C, DeLuca C, Kwon H, Lin R, Hiscott J (1999) Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* **237**(1): 1-14
- Mamiya N, Worman HJ (1999) Hepatitis C virus core protein binds to a DEAD box RNA helicase. *J Biol Chem* **274**(22): 15751-15756
- Mankouri J, Fragkoudis R, Richards KH, Wetherill LF, Harris M, Kohl A, Elliott RM, Macdonald A Optineurin negatively regulates the induction of IFNbeta in response to RNA virus infection. *PLoS Pathog* **6**(2): e1000778
- Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**(7081): 228-232
- Marie I, Durbin JE, Levy DE (1998) Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J* **17**(22): 6660-6669
- Marra P, Maffucci T, Daniele T, Tullio GD, Ikehara Y, Chan EK, Luini A, Beznoussenko G, Mironov A, De Matteis MA (2001) The GM130 and GRASP65 Golgi proteins cycle through and define a subdomain of the intermediate compartment. *Nat Cell Biol* **3**(12): 1101-1113
- Marsters SA, Ayres TM, Skubatch M, Gray CL, Rothe M, Ashkenazi A (1997) Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* **272**(22): 14029-14032
- Martinon F, Burns K, Tschopp J (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* **10**(2): 417-426
- Martinon F, Gaide O, Petrilli V, Mayor A, Tschopp J (2007) NALP inflammasomes: a central role in innate immunity. *Semin Immunopathol* **29**(3): 213-229

- Martinon F, Mayor A, Tschopp J (2009) The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* **27**: 229-265
- Matsushima A, Kaisho T, Rennert PD, Nakano H, Kurosawa K, Uchida D, Takeda K, Akira S, Matsumoto M (2001) Essential role of nuclear factor (NF)-kappaB-inducing kinase and inhibitor of kappaB (IkappaB) kinase alpha in NF-kappaB activation through lymphotoxin beta receptor, but not through tumor necrosis factor receptor I. *J Exp Med* **193**(5): 631-636
- Matsuzawa A, Tseng PH, Vallabhapurapu S, Luo JL, Zhang W, Wang H, Vignali DA, Gallagher E, Karin M (2008) Essential cytoplasmic translocation of a cytokine receptor-assembled signaling complex. *Science* **321**(5889): 663-668
- Mattioli I, Geng H, Sebald A, Hodel M, Bucher C, Kracht M, Schmitz ML (2006) Inducible phosphorylation of NF-kappa B p65 at serine 468 by T cell costimulation is mediated by IKK epsilon. *J Biol Chem* **281**(10): 6175-6183
- McCartney SA, Thackray LB, Gitlin L, Gilfillan S, Virgin HW, Colonna M (2008) MDA-5 recognition of a murine norovirus. *PLoS Pathog* **4**(7): e1000108
- McWhirter SM, Fitzgerald KA, Rosains J, Rowe DC, Golenbock DT, Maniatis T (2004) IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(1): 233-238
- Merk M, Baugh J, Zierow S, Leng L, Pal U, Lee SJ, Ebert AD, Mizue Y, Trent JO, Mitchell R, Nickel W, Kavathas PB, Bernhagen J, Bucala R (2009) The Golgi-associated protein p115 mediates the secretion of macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol* **182**(11): 6896-6906
- Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, Tschopp J (2004) RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* **5**(5): 503-507
- Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J (2005) Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**(7062): 1167-1172
- Meylan E, Martinon F, Thome M, Gschwendt M, Tschopp J (2002) RIP4 (DIK/PKK), a novel member of the RIP kinase family, activates NF-kappa B and is processed during apoptosis. *EMBO Rep* **3**(12): 1201-1208
- Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI, Aderem A (2006) Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol* **7**(6): 569-575

- Michallet MC, Meylan E, Ermolaeva MA, Vazquez J, Rebsamen M, Curran J, Poeck H, Bscheider M, Hartmann G, Konig M, Kalinke U, Pasparakis M, Tschopp J (2008) TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway. *Immunity* **28**(5): 651-661
- Mikkelsen SS, Jensen SB, Chiliveru S, Melchjorsen J, Julkunen I, Gaestel M, Arthur JS, Flavell RA, Ghosh S, Paludan SR (2009) RIG-I-mediated activation of p38 MAPK is essential for viral induction of interferon and activation of dendritic cells: dependence on TRAF2 and TAK1. *J Biol Chem* **284**(16): 10774-10782
- Miranda C, Roccatto E, Raho G, Pagliardini S, Pierotti MA, Greco A (2006) The TFG protein, involved in oncogenic rearrangements, interacts with TANK and NEMO, two proteins involved in the NF-kappaB pathway. *J Cell Physiol* **208**(1): 154-160
- Miyake K (2007) Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin Immunol* **19**(1): 3-10
- Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y, Maruyama M, Harada H, Sudo Y, Miyata T, Taniguchi T (1988) Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell* **54**(6): 903-913
- Mokrani H, Sharaf el Dein O, Mansuroglu Z, Bonefoy E (2006) Binding of YY1 to proximal region of the murine beta interferon promoter is essential to allow CBP recruitment and K8H4/K14H3 acetylation on the promoter region after virus infection. *Molecular and Cellular Biology* **26**: 8551-8561
- Molina S, Sanz MA, Madan V, Ventoso I, Castello A, Carrasco L (2007) Differential inhibition of cellular and Sindbis virus translation by brefeldin A. *Virology* **363**(2): 430-436
- Molofsky AB, Byrne BG, Whitfield NN, Madigan CA, Fuse ET, Tateda K, Swanson MS (2006) Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts Legionella pneumophila infection. *J Exp Med* **203**(4): 1093-1104
- Moore CB, Bergstralh DT, Duncan JA, Lei Y, Morrison TE, Zimmermann AG, Accavitti-Loper MA, Madden VJ, Sun L, Ye Z, Lich JD, Heise MT, Chen Z, Ting JP (2008) NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature* **451**(7178): 573-577
- Morgan M, Thorburn J, Pandolfi PP, Thorburn A (2002) Nuclear and cytoplasmic shuttling of TRADD induces apoptosis via different mechanisms. *J Cell Biol* **157**(6): 975-984
- Mori M, Yoneyama M, Ito T, Takahashi K, Inagaki F, Fujita T (2004) Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J Biol Chem* **279**(11): 9698-9702

- Mori T, Anazawa Y, Iizumi M, Fukuda S, Nakamura Y, Arakawa H (2002) Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. *Oncogene* **21**(18): 2914-2918
- Moyer BD, Allan BB, Balch WE (2001) Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis--Golgi tethering. *Traffic* **2**(4): 268-276
- Munshi N, Yie Y, Merika M, Senger K, Lomvardas S, Agaloti T, Thanos D (1999) The IFN-beta enhancer: a paradigm for understanding activation and repression of inducible gene expression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **64**: 149-159
- Muruve DA, Petrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ, Parks RJ, Tschopp J (2008) The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* **452**(7183): 103-107
- Nagano Y, Kojima Y (1954) [Immunizing property of vaccinia virus inactivated by ultraviolet rays.]. *C R Seances Soc Biol Fil* **148**(19-20): 1700-1702
- Nakamura N, Lowe M, Levine TP, Rabouille C, Warren G (1997) The vesicle docking protein p115 binds GM130, a cis-Golgi matrix protein, in a mitotically regulated manner. *Cell* **89**(3): 445-455
- Nakamura N, Rabouille C, Watson R, Nilsson T, Hui N, Slusarewicz P, Kreis TE, Warren G (1995) Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol* **131**(6 Pt 2): 1715-1726
- Nakhaei P, Mesplede T, Solis M, Sun Q, Zhao T, Yang L, Chuang TH, Ware CF, Lin R, Hiscott J (2009) The E3 ubiquitin ligase Triad3A negatively regulates the RIG-I/MAVS signaling pathway by targeting TRAF3 for degradation. *PLoS Pathog* **5**(11): e1000650
- Nelson DS, Alvarez C, Gao YS, Garcia-Mata R, Fialkowski E, Sztul E (1998) The membrane transport factor TAP/p115 cycles between the Golgi and earlier secretory compartments and contains distinct domains required for its localization and function. *J Cell Biol* **143**(2): 319-331
- Nguyen H, Hiscott J, Pitha PM (1997) The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth Factor Rev* **8**(4): 293-312
- Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y, Takeda K, Nakano H, Rothe M, Miyazono K, Ichijo H (1998) ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell* **2**(3): 389-395
- Nomura F, Kawai T, Nakanishi K, Akira S (2000) NF-kappaB activation through IKK-i-dependent I-TRAF/TANK phosphorylation. *Genes Cells* **5**(3): 191-202

- Norman KL, Hirasawa K, Yang AD, Shields MA, Lee PW (2004) Reovirus oncolysis: the Ras/RalGEF/p38 pathway dictates host cell permissiveness to reovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(30): 11099-11104
- Noyce RS, Collins SE, Mossman KL (2006) Identification of a novel pathway essential for the immediate-early, interferon-independent antiviral response to enveloped virions. *J Virol* **80**(1): 226-235
- Noyce RS, Collins SE, Mossman KL (2009) Differential modification of interferon regulatory factor 3 following virus particle entry. *J Virol* **83**(9): 4013-4022
- O'Neill LA, Bowie AG (2007) The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **7**(5): 353-364
- Obata Y, Yamamoto K, Miyazaki M, Shimotohno K, Kohno S, Matsuyama T (2005) Role of cyclophilin B in activation of interferon regulatory factor-3. *J Biol Chem* **280**(18): 18355-18360
- Oganesyan G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, Perry A, Cheng G (2006) Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* **439**(7073): 208-211
- Ohan N, Sabourin D, Booth RA, Liu XJ (2000) *Xenopus laevis* TRK-fused gene (TFG) is an SH3 domain binding protein highly expressed in the cement gland. *Mol Reprod Dev* **56**(3): 336-344
- Ohman T, Rintahaka J, Kalkkinen N, Matikainen S, Nyman TA (2009) Actin and RIG-I/MAVS signaling components translocate to mitochondria upon influenza A virus infection of human primary macrophages. *J Immunol* **182**(9): 5682-5692
- Okabe Y, Kawane K, Akira S, Taniguchi T, Nagata S (2005) Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation. *J Exp Med* **202**(10): 1333-1339
- Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T (2003) TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* **4**(2): 161-167
- Ouasti S, Matarrese P, Paddon R, Khosravi-Far R, Sorice M, Tinari A, Malorni W, Degli Esposti M (2007) Death receptor ligation triggers membrane scrambling between Golgi and mitochondria. *Cell Death Differ* **14**(3): 453-461

- Owsianka AM, Patel AH (1999) Hepatitis C virus core protein interacts with a human DEAD box protein DDX3. *Virology* **257**(2): 330-340
- Paladino P, Cummings DT, Noyce RS, Mossman KL (2006) The IFN-independent response to virus particle entry provides a first line of antiviral defense that is independent of TLRs and retinoic acid-inducible gene I. *J Immunol* **177**(11): 8008-8016
- Pan Q, Mathison J, Fearn C, Kravchenko VV, Da Silva Correia J, Hoffman HM, Kobayashi KS, Bertin J, Grant EP, Coyle AJ, Sutterwala FS, Ogura Y, Flavell RA, Ulevitch RJ (2007) MDP-induced interleukin-1beta processing requires Nod2 and CIAS1/NALP3. *J Leukoc Biol* **82**(1): 177-183
- Panne D, McWhirter SM, Maniatis T, Harrison SC (2007a) Interferon regulatory factor 3 is regulated by a dual phosphorylation-dependent switch. *J Biol Chem* **282**(31): 22816-22822
- Panne D, McWhirter SM, Maniatis T, Harrison SC (2007b) Interferon response factor 3 is regulated by a dual phosphorylation dependent switch. *J Biol Chem*
- Park YC, Burkitt V, Villa AR, Tong L, Wu H (1999) Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2. *Nature* **398**(6727): 533-538
- Peters R, Liao SM, Maniatis T (2000a) IKKe is part of a novel PMA-inducible Ikb kinase complex. *Molecular Cell* **5**: 513-522
- Peters RT, Liao SM, Maniatis T (2000b) IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible IkkappaB kinase complex. *Mol Cell* **5**(3): 513-522
- Peters RT, Maniatis T (2001) A new family of IKK-related kinases may function as I kappa B kinase kinases. *Biochim Biophys Acta* **1471**(2): M57-62
- Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, Reis e Sousa C (2006) RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**(5801): 997-1001
- Pierotti MA, Bongarzone I, Borrello MG, Mariani C, Miranda C, Sozzi G, Greco A (1995) Rearrangements of TRK proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas. *J Endocrinol Invest* **18**(2): 130-133
- Pietras EM, Cheng G (2008) A New TRADDition in intracellular antiviral signaling. *Sci Signal* **1**(30): pe36
- Plattner F, Yarovinsky F, Romero S, Didry D, Carlier MF, Sher A, Soldati-Favre D (2008) Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host Microbe* **3**(2): 77-87

Pluquet O, Qu LK, Baltzis D, Koromilas AE (2005) Endoplasmic reticulum stress accelerates p53 degradation by the cooperative actions of Hdm2 and glycogen synthase kinase 3beta. *Mol Cell Biol* **25**(21): 9392-9405

Pomerantz JL, Baltimore D (1999a) NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *The EMBO journal* **18**(23): 6694-6704

Pomerantz JL, Baltimore D (1999b) NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *Embo J* **18**(23): 6694-6704.

Potter JA, Randall RE, Taylor GL (2008) Crystal structure of human IPS-1/MAVS/VISA/Cardif caspase activation recruitment domain. *BMC Struct Biol* **8**: 11

Price ER, Jin M, Lim D, Pati S, Walsh CT, McKeon FD (1994) Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(9): 3931-3935

Prinarakis E, Chantzoura E, Thanos D, Spyrou G (2008) S-glutathionylation of IRF3 regulates IRF3-CBP interaction and activation of the IFN beta pathway. *EMBO J* **27**(6): 865-875

Ptashne M (2005) Regulation of transcription: from lambda to eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **30**(6): 275-279

Puthenveedu MA, Bachert C, Puri S, Lanni F, Linstedt AD (2006) GM130 and GRASP65-dependent lateral cisternal fusion allows uniform Golgi-enzyme distribution. *Nat Cell Biol* **8**(3): 238-248

Puthenveedu MA, Linstedt AD (2004) Gene replacement reveals that p115/SNARE interactions are essential for Golgi biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(5): 1253-1256

Pype S, Declercq W, Ibrahimi A, Michiels C, Van Rietschoten JG, Dewulf N, de Boer M, Vandenameele P, Huylebroeck D, Remacle JE (2000) TTRAP, a novel protein that associates with CD40, tumor necrosis factor (TNF) receptor-75 and TNF receptor-associated factors (TRAFs), and that inhibits nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* **275**(24): 18586-18593

Qian Y, Zhao Z, Jiang Z, Li X (2002) Role of NF kappa B activator Act1 in CD40-mediated signaling in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(14): 9386-9391

- Qin BY, Liu C, Lam SS, Srinath H, Delston R, Correia JJ, Derynck R, Lin K (2003) Crystal structure of IRF-3 reveals mechanism of autoinhibition and virus-induced phosphoactivation. *Nat Struct Biol* **10**(11): 913-921
- Qin BY, Liu C, Srinath H, Lam SS, Correia JJ, Derynck R, Lin K (2005) Crystal structure of IRF-3 in complex with CBP. *Structure* **13**(9): 1269-1277
- Rangarajan A, Hong SJ, Gifford A, Weinberg RA (2004) Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell* **6**(2): 171-183
- Reid G, Hubner MR, Metivier R, Brand H, Denger S, Manu D, Beaudouin J, Ellenberg J, Gannon F (2003) Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* **11**(3): 695-707
- Reily MM, Pantoja C, Hu X, Chinenov Y, Rogatsky I (2006) The GRIP1:IRF3 interaction as a target for glucocorticoid receptor-mediated immunosuppression. *The EMBO journal* **25**(1): 108-117
- Ren T, Zamboni DS, Roy CR, Dietrich WF, Vance RE (2006) Flagellin-deficient Legionella mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS Pathog* **2**(3): e18
- Rennert PD, James D, Mackay F, Browning JL, Hochman PS (1998) Lymph node genesis is induced by signaling through the lymphotoxin beta receptor. *Immunity* **9**(1): 71-79
- Roberts RM, Liu L, Guo Q, Leaman D, Bixby J (1998) The evolution of the type I interferons. *J Interferon Cytokine Res* **18**(10): 805-816
- Roberts TL, Idris A, Dunn JA, Kelly GM, Burnton CM, Hodgson S, Hardy LL, Garceau V, Sweet MJ, Ross IL, Hume DA, Stacey KJ (2009) HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science* **323**(5917): 1057-1060
- Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Reis e Sousa C (2006) Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol* **7**(12): 1258-1265
- Roccatto E, Miranda C, Raho G, Pagliardini S, Pierotti MA, Greco A (2005) Analysis of SHP-1-mediated down-regulation of the TRK-T3 oncoprotein identifies Trk-fused gene (TFG) as a novel SHP-1-interacting protein. *J Biol Chem* **280**(5): 3382-3389
- Romieu-Mourez R, Kim DW, Shin SM, Demicco EG, Landesman-Bollag E, Seldin DC, Cardiff RD, Sonenshein GE (2003) Mouse mammary tumor virus c-rel transgenic mice develop mammary tumors. *Mol Cell Biol* **23**(16): 5738-5754

- Romieu-Mourez R, Solis M, Nardin A, Goubau D, Baron-Bodo V, Lin R, Massie B, Salcedo M, Hiscott J (2006) Distinct roles for IFN regulatory factor (IRF)-3 and IRF-7 in the activation of antitumor properties of human macrophages. *Cancer research* **66**(21): 10576-10585
- Roosendaal J, Westaway EG, Khromykh A, Mackenzie JM (2006) Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. *J Virol* **80**(9): 4623-4632
- Roport C, Ferreira LR, Campos MA, Procopio DO, Travassos LR, Ferguson MA, Reis LF, Teixeira MM, Almeida IC, Gazzinelli RT (2002) Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Microbes Infect* **4**(9): 1015-1025
- Roth-Cross JK, Bender SJ, Weiss SR (2008) Murine coronavirus mouse hepatitis virus is recognized by MDA5 and induces type I interferon in brain macrophages/microglia. *J Virol* **82**(20): 9829-9838
- Rothe M, Xiong J, Shu HB, Williamson K, Goddard A, Goeddel DV (1996) I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(16): 8241-8246
- Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, Yamamoto M, Akira S, Fitzgerald KA (2005) The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* **175**(8): 5260-5268
- Rust RC, Landmann L, Gosert R, Tang BL, Hong W, Hauri HP, Egger D, Bienz K (2001) Cellular COPII proteins are involved in production of the vesicles that form the poliovirus replication complex. *J Virol* **75**(20): 9808-9818
- Ryzhakov G, Randow F (2007) SINTBAD, a novel component of innate antiviral immunity, shares a TBK1-binding domain with NAP1 and TANK. *EMBO J* **26**(13): 3180-3190
- Sadler AJ, Williams BR (2008) Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* **8**(7): 559-568
- Saha SK, Pietras EM, He JQ, Kang JR, Liu SY, Oganessian G, Shahangian A, Zarnegar B, Shiba TL, Wang Y, Cheng G (2006) Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J* **25**(14): 3257-3263

- Saito T, Hirai R, Loo YM, Owen D, Johnson CL, Sinha SC, Akira S, Fujita T, Gale M, Jr. (2007) Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(2): 582-587
- Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, Matsunaga K, Kageyama S, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Kawai T, Ishii K, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S (2009) Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Saitoh T, Tun-Kyi A, Ryo A, Yamamoto M, Finn G, Fujita T, Akira S, Yamamoto N, Lu KP, Yamaoka S (2006) Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat Immunol* **7**(6): 598-605
- Saitoh T, Yamamoto M, Miyagishi M, Taira K, Nakanishi M, Fujita T, Akira S, Yamamoto N, Yamaoka S (2005) A20 is a negative regulator of IFN regulatory factor 3 signaling. *J Immunol* **174**(3): 1507-1512
- Sakaguchi S, Negishi H, Asagiri M, Nakajima C, Mizutani T, Takaoka A, Honda K, Taniguchi T (2003) Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon-beta gene expression and endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun* **306**(4): 860-866
- Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T, Toriumi W (1999) IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *The Journal of biological chemistry* **274**(43): 30353-30356
- Samuel CE (2001) Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**(4): 778-809, table of contents
- Sandberg M, Hammerschmidt W, Sugden B (1997) Characterization of LMP-1's association with TRAF1, TRAF2, and TRAF3. *J Virol* **71**(6): 4649-4656
- Sapperstein SK, Lupashin VV, Schmitt HD, Waters MG (1996) Assembly of the ER to Golgi SNARE complex requires Uso1p. *J Cell Biol* **132**(5): 755-767
- Sarkar SN, Peters KL, Elco CP, Sakamoto S, Pal S, Sen GC (2004) Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling. *Nat Struct Mol Biol* **11**(11): 1060-1067
- Sasai M, Oshiumi H, Matsumoto M, Inoue N, Fujita F, Nakanishi M, Seya T (2005) Cutting Edge: NF-kappaB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation. *J Immunol* **174**(1): 27-30

Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N, Taniguchi T (2000a) Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- α /beta gene induction. *Immunity* **13**(4): 539-548.

Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N, Taniguchi T (2000b) Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- α /beta gene induction. *Immunity* **13**(4): 539-548

Scheinman RI, Beg AA, Baldwin AS, Jr. (1993) NF- κ B p100 (Lyt-10) is a component of H2TF1 and can function as an I κ B-like molecule. *Mol Cell Biol* **13**(10): 6089-6101

Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, Cachero TG, Shulga-Morskaya S, Dobles M, Frew E, Scott ML (2001) An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* **293**(5537): 2111-2114

Schlee M, Roth A, Hornung V, Hagmann CA, Wimmenauer V, Barchet W, Coch C, Janke M, Mihailovic A, Wardle G, Juranek S, Kato H, Kawai T, Poeck H, Fitzgerald KA, Takeuchi O, Akira S, Tuschl T, Latz E, Ludwig J, Hartmann G (2009) Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* **31**(1): 25-34

Schmidt A, Schwerd T, Hamm W, Hellmuth JC, Cui S, Wenzel M, Hoffmann FS, Michallet MC, Besch R, Hopfner KP, Endres S, Rothenfusser S (2009) 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(29): 12067-12072

Schoenemeyer A, Barnes BJ, Mancl ME, Latz E, Goutagny N, Pitha PM, Fitzgerald KA, Golenbock DT (2005) The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling. *The Journal of biological chemistry* **280**(17): 17005-17012

Schroder M, Baran M, Bowie AG (2008) Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKepsilon-mediated IRF activation. *EMBO J* **27**(15): 2147-2157

Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR (2000) Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* **14**(19): 2501-2514

Seemann J, Jokitalo E, Pypaert M, Warren G (2000a) Matrix proteins can generate the higher order architecture of the Golgi apparatus. *Nature* **407**(6807): 1022-1026

Seemann J, Jokitalo EJ, Warren G (2000b) The role of the tethering proteins p115 and GM130 in transport through the Golgi apparatus in vivo. *Mol Biol Cell* **11**(2): 635-645

Servant MJ, Grandvaux N, tenOever BR, Duguay D, Lin R, Hiscott J (2003) Identification of the minimal phosphoacceptor site required for in vivo activation of interferon regulatory factor 3 in response to virus and double-stranded RNA. *J Biol Chem* **278**(11): 9441-9447

Servant MJ, ten Oever B, LePage C, Conti L, Gessani S, Julkunen I, Lin R, Hiscott J (2001a) Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Biol Chem* **276**(1): 355-363.

Servant MJ, ten Oever B, LePage C, Conti L, Gessani S, Julkunen I, Lin R, Hiscott J (2001b) Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Biol Chem* **276**(1): 355-363

Servant MJ, Tenoever B, Lin R (2002) Overlapping and distinct mechanisms regulating IRF-3 and IRF-7 function. *J Interferon Cytokine Res* **22**(1): 49-58

Seth RB, Sun L, Chen ZJ (2006) Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res* **16**(2): 141-147

Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ (2005) Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**(5): 669-682

Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, Hiscott J (2003) Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* **300**(5622): 1148-1151

Shi HX, Yang K, Liu X, Liu XY, Wei B, Shan YF, Zhu LH, Wang C Positive regulation of interferon regulatory factor 3 activation by Herc5 via ISG15 modification. *Mol Cell Biol* **30**(10): 2424-2436

Shimada T, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Inoue J, Tatsumi Y, Kanamaru A, Akira S (1999a) IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases. *Int Immunol* **11**(8): 1357-1362

Shimada T, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Inoue J, Tatsumi Y, Kanamaru A, Akira S (1999b) IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases. *Int Immunol* **11**(8): 1357-1362.

Shintani T, Klionsky DJ (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**(5698): 990-995

- Shirota H, Petrenko L, Hattori T, Klinman DM (2009) Contribution of IRF-3 mediated IFN β production to DNA vaccine dependent cellular immune responses. *Vaccine* **27**(15): 2144-2149
- Shorter J, Beard MB, Seemann J, Dirac-Svejstrup AB, Warren G (2002) Sequential tethering of Golgins and catalysis of SNAREpin assembly by the vesicle-tethering protein p115. *J Cell Biol* **157**(1): 45-62
- Siu KL, Kok KH, Ng MH, Poon VK, Yuen KY, Zheng BJ, Jin DY (2009) Severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein inhibits type I interferon production by impeding the formation of TRAF3-TANK-TBK1/IKK ϵ complex. *J Biol Chem*
- Sizemore N, Lerner N, Dombrowski N, Sakurai H, Stark GR (2002) Distinct roles of the I κ B kinase alpha and beta subunits in liberating nuclear factor kappa B (NF- κ B) from I κ B and in phosphorylating the p65 subunit of NF- κ B. *J Biol Chem* **277**(6): 3863-3869
- Sohda M, Misumi Y, Yoshimura S, Nakamura N, Fusano T, Sakisaka S, Ogata S, Fujimoto J, Kiyokawa N, Ikehara Y (2005) Depletion of vesicle-tethering factor p115 causes mini-stacked Golgi fragments with delayed protein transport. *Biochem Biophys Res Commun* **338**(2): 1268-1274
- Song HY, Regnier CH, Kirschning CJ, Goeddel DV, Rothe M (1997) Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor- κ B and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(18): 9792-9796
- Sonnichsen B, Lowe M, Levine T, Jamsa E, Dirac-Svejstrup B, Warren G (1998) A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J Cell Biol* **140**(5): 1013-1021
- Soucy-Faulkner A, Mukawera E, Fink K, Martel A, Jouan L, Nzenge Y, Lamarre D, Vande Velde C, Grandvaux N Requirement of NOX2 and reactive oxygen species for efficient RIG-I-mediated antiviral response through regulation of MAVS expression. *PLoS Pathog* **6**(6): e1000930
- Soulat D, Burckstummer T, Westermayer S, Goncalves A, Bauch A, Stefanovic A, Hantschel O, Bennett KL, Decker T, Superti-Furga G (2008) The DEAD-box helicase DDX3X is a critical component of the TANK-binding kinase 1-dependent innate immune response. *EMBO J* **27**(15): 2135-2146
- Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, Zanieski GJ, Rogers AE, Traish AM, Sonenshein GE (1997) Aberrant nuclear factor- κ B/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* **100**(12): 2952-2960

- Spiegel M, Pichlmair A, Martinez-Sobrido L, Cros J, Garcia-Sastre A, Haller O, Weber F (2005) Inhibition of Beta interferon induction by severe acute respiratory syndrome coronavirus suggests a two-step model for activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* **79**(4): 2079-2086
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**: 227-264
- Stetson DB, Medzhitov R (2006) Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* **24**(1): 93-103
- Stojdl DF, Lichty B, Knowles S, Marius R, Atkins H, Sonenberg N, Bell JC (2000) Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med* **6**(7): 821-825
- Suhara W, Yoneyama M, Iwamura T, Yoshimura S, Tamura K, Namiki H, Aimoto S, Fujita T (2000) Analyses of virus-induced homomeric and heteromeric protein associations between IRF-3 and coactivator CBP/p300. *J Biochem (Tokyo)* **128**(2): 301-307.
- Suhara W, Yoneyama M, Kitabayashi I, Fujita T (2002) Direct involvement of CREB-binding protein/p300 in sequence-specific DNA binding of virus-activated interferon regulatory factor-3 holocomplex. *J Biol Chem* **277**(25): 22304-22313
- Sun W, Li Y, Chen L, Chen H, You F, Zhou X, Zhou Y, Zhai Z, Chen D, Jiang Z (2009) ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(21): 8653-8658
- Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M, Lara-Tejero M, Lichtenberger GS, Grant EP, Bertin J, Coyle AJ, Galan JE, Askenase PW, Flavell RA (2006) Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* **24**(3): 317-327
- Swaffield JC, Bromberg JF, Johnston SA (1992) Alterations in a yeast protein resembling HIV Tat-binding protein relieve requirement for an acidic activation domain in GAL4. *Nature* **360**(6406): 768
- Takahashi K, Kawai T, Kumar H, Sato S, Yonehara S, Akira S (2006) Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. *J Immunol* **176**(8): 4520-4524
- Takahashi K, Suzuki NN, Horiuchi M, Mori M, Suhara W, Okabe Y, Fukuhara Y, Terasawa H, Akira S, Fujita T, Inagaki F (2003) X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications. *Nat Struct Biol* **10**(11): 922-927

- Takahashi K, Yoneyama M, Nishihori T, Hirai R, Kumeta H, Narita R, Gale M, Jr., Inagaki F, Fujita T (2008) Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol Cell* **29**(4): 428-440
- Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, Sasaki S, Imai K, Shibue T, Honda K, Taniguchi T (2003) Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* **424**(6948): 516-523
- Takaoka A, Taniguchi T (2008) Cytosolic DNA recognition for triggering innate immune responses. *Adv Drug Deliv Rev* **60**(7): 847-857
- Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T (2007) DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* **448**(7152): 501-505
- Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, Kano S, Honda K, Ohba Y, Mak TW, Taniguchi T (2005) Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* **434**(7030): 243-249
- Takeda K, Akira S (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**(1): 1-14
- Takeuchi O, Akira S (2008) MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol* **20**(1): 17-22
- Tal MC, Sasai M, Lee HK, Yordy B, Shadel GS, Iwasaki A (2009) Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(8): 2770-2775
- Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T (2008) The IRF Family Transcription Factors in Immunity and Oncogenesis. *Annu Rev Immunol* **26**: 535-584
- Tanaka N, Kawakami T, Taniguchi T (1993) Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system. *Mol Cell Biol* **13**(8): 4531-4538
- Tang ED, Wang CY (2009) MAVS self-association mediates antiviral innate immune signaling. *J Virol* **83**(8): 3420-3428
- Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N (2001) IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* **19**: 623-655
- Tattoli I, Travassos LH, Carneiro LA, Magalhaes JG, Girardin SE (2007) The Nodosome: Nod1 and Nod2 control bacterial infections and inflammation. *Semin Immunopathol* **29**(3): 289-301

- Tenover BR, Ng SL, Chua MA, McWhirter SM, Garcia-Sastre A, Maniatis T (2007) Multiple functions of the IKK-related kinase IKKepsilon in interferon-mediated antiviral immunity. *Science* **315**(5816): 1274-1278
- Tenover BR, Servant MJ, Grandvaux N, Lin R, Hiscott J (2002) Recognition of the measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. *J Virol* **76**(8): 3659-3669
- Tenover BR, Sharma S, Zou W, Sun Q, Grandvaux N, Julkunen I, Hemmi H, Yamamoto M, Akira S, Yeh WC, Lin R, Hiscott J (2004) Activation of TBK1 and IKKepsilon kinases by vesicular stomatitis virus infection and the role of viral ribonucleoprotein in the development of interferon antiviral immunity. *J Virol* **78**(19): 10636-10649
- Thanos D, Maniatis T (1992) The high mobility group protein HMG I(Y) is required for NF-kappa B-dependent virus induction of the human IFN-beta gene. *Cell* **71**(5): 777-789
- Thanos D, Maniatis T (1995) NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* **80**(4): 529-532
- Thyberg J, Moskalewski S (1985) Microtubules and the organization of the Golgi complex. *Exp Cell Res* **159**(1): 1-16
- Thyberg J, Moskalewski S (1999) Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. *Exp Cell Res* **246**(2): 263-279
- Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis BK, Flavell RA, Girardin SE, Godzik A, Harton JA, Hoffman HM, Hugot JP, Inohara N, Mackenzie A, Maltais LJ, Nunez G, Ogura Y, Otten LA, Philpott D, Reed JC, Reith W, Schreiber S, Steimle V, Ward PA (2008) The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity* **28**(3): 285-287
- Todaro GJ, Green H (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* **17**: 299-313
- Toikkanen JH, Miller KJ, Soderlund H, Jantti J, Keranen S (2003) The beta subunit of the Sec61p endoplasmic reticulum translocon interacts with the exocyst complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**(23): 20946-20953
- Tojima Y, Fujimoto A, Delhase M, Chen Y, Hatakeyama S, Nakayama K, Kaneko Y, Nimura Y, Motoyama N, Ikeda K, Karin M, Nakanishi M (2000) NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature* **404**(6779): 778-782
- Tomassini B, Malisan F, Franchi L, Nicolo C, Calvo GB, Saito T, Testi R (2004) Calnexin suppresses GD3 synthase-induced apoptosis. *FASEB J* **18**(13): 1553-1555

- Tseng J, Do J, Widdicombe JH, Machen TE (2006) Innate immune responses of human tracheal epithelium to *Pseudomonas aeruginosa* flagellin, TNF-alpha, and IL-1beta. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**(3): C678-690
- Turer EE, Tavares RM, Mortier E, Hitotsumatsu O, Advincula R, Lee B, Shifrin N, Malynn BA, Ma A (2008) Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20. *J Exp Med* **205**(2): 451-464
- Uze G, Schreiber G, Piehler J, Pellegrini S (2007) The receptor of the type I interferon family. *Curr Top Microbiol Immunol* **316**: 71-95
- Vallabhapurapu S, Matsuzawa A, Zhang W, Tseng PH, Keats JJ, Wang H, Vignali DA, Bergsagel PL, Karin M (2008) Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol* **9**(12): 1364-1370
- van Drogen F, Sangfelt O, Malyukova A, Matskova L, Yeh E, Means AR, Reed SI (2006) Ubiquitylation of cyclin E requires the sequential function of SCF complexes containing distinct hCdc4 isoforms. *Mol Cell* **23**(1): 37-48
- Van Laere SJ, Van der Auwera I, Van den Eynden GG, Elst HJ, Weyler J, Harris AL, van Dam P, Van Marck EA, Vermeulen PB, Dirix LY (2006) Nuclear factor-kappaB signature of inflammatory breast cancer by cDNA microarray validated by quantitative real-time reverse transcription-PCR, immunohistochemistry, and nuclear factor-kappaB DNA-binding. *Clin Cancer Res* **12**(11 Pt 1): 3249-3256
- Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Memet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, Ferrero RL (2004) Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* **5**(11): 1166-1174
- Vignal C, Singer E, Peyrin-Biroulet L, Desreumaux P, Chamaillard M (2007) How NOD2 mutations predispose to Crohn's disease? *Microbes Infect* **9**(5): 658-663
- Vilaysane A, Muruve DA (2009) The innate immune response to DNA. *Semin Immunol* **21**(4): 208-214
- Vitour D, Dabo S, Ahmadi Pour M, Vilasco M, Vidalain PO, Jacob Y, Mezel-Lemoine M, Paz S, Arguello M, Lin R, Tangy F, Hiscott J, Meurs EF (2009) Polo-like kinase 1 (PLK1) regulates interferon (IFN) induction by MAVS. *J Biol Chem* **284**(33): 21797-21809
- Vitour D, Meurs EF (2007) Regulation of interferon production by RIG-I and LGP2: a lesson in self-control. *Sci STKE* **2007**(384): pe20

- Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**(6844): 346-351
- Wang N, Ahmed S, Haqqi TM (2005) Genomic structure and functional characterization of the promoter region of human IkappaB kinase-related kinase IKKi/IKKvarepsilon gene. *Gene* **353**(1): 118-133
- Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA (2004a) Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* **10**(12): 1366-1373
- Wang YY, Li L, Han KJ, Zhai Z, Shu HB (2004b) A20 is a potent inhibitor of TLR3- and Sendai virus-induced activation of NF-kappaB and ISRE and IFN-beta promoter. *FEBS Lett* **576**(1-2): 86-90
- Wang Z, Choi MK, Ban T, Yanai H, Negishi H, Lu Y, Tamura T, Takaoka A, Nishikura K, Taniguchi T (2008) Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(14): 5477-5482
- Waters MG, Clary DO, Rothman JE (1992) A novel 115-kD peripheral membrane protein is required for intercisternal transport in the Golgi stack. *J Cell Biol* **118**(5): 1015-1026
- Wathelet MG, Lin CH, Parekh BS, Ronco LV, Howley PM, Maniatis T (1998) Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol Cell* **1**(4): 507-518
- Watson CJ (2001) Stat transcription factors in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **6**(1): 115-127
- Watson P, Townley AK, Koka P, Palmer KJ, Stephens DJ (2006) Sec16 defines endoplasmic reticulum exit sites and is required for secretory cargo export in mammalian cells. *Traffic* **7**(12): 1678-1687
- Weaver BK, Ando O, Kumar KP, Reich NC (2001a) Apoptosis is promoted by the dsRNA-activated factor (DRAF1) during viral infection independent of the action of interferon or p53. *Faseb J* **15**(2): 501-515.
- Weaver BK, Ando O, Kumar KP, Reich NC (2001b) Apoptosis is promoted by the dsRNA-activated factor (DRAF1) during viral infection independent of the action of interferon or p53. *Faseb J* **15**(2): 501-515
- Welcker M, Orian A, Jin J, Grim JE, Harper JW, Eisenman RN, Clurman BE (2004) The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(24): 9085-9090

Wietek C, Cleaver CS, Ludbrook V, Wilde J, White J, Bell DJ, Lee M, Dickson M, Ray KP, O'Neill LA (2006) IkappaB kinase epsilon interacts with p52 and promotes transactivation via p65. *J Biol Chem* **281**(46): 34973-34981

Wong BR, Besser D, Kim N, Arron JR, Vologodskaya M, Hanafusa H, Choi Y (1999) TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell* **4**(6): 1041-1049

Wulf G, Finn G, Suizu F, Lu KP (2005) Phosphorylation-specific prolyl isomerization: is there an underlying theme? *Nat Cell Biol* **7**(5): 435-441

Xiao G, Fong A, Sun SC (2004) Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* **279**(29): 30099-30105

Xie P, Hostager BS, Bishop GA (2004) Requirement for TRAF3 in signaling by LMP1 but not CD40 in B lymphocytes. *J Exp Med* **199**(5): 661-671

Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB (2005) VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* **19**(6): 727-740

Yada M, Hatakeyama S, Kamura T, Nishiyama M, Tsunematsu R, Imaki H, Ishida N, Okumura F, Nakayama K, Nakayama KI (2004) Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J* **23**(10): 2116-2125

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S (2003a) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**(5633): 640-643

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S (2002a) Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* **420**(6913): 324-329

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S (2003b) TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* **4**(11): 1144-1150

Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S (2002b) Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* **169**(12): 6668-6672

- Yanai H, Chen HM, Inuzuka T, Kondo S, Mak TW, Takaoka A, Honda K, Taniguchi T (2007) Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(9): 3402-3407
- Yang H, Lin CH, Ma G, Orr M, Baffi MO, Wathélet MG (2002) Transcriptional activity of interferon regulatory factor (IRF)-3 depends on multiple protein-protein interactions. *Eur J Biochem* **269**(24): 6142-6151
- Yang K, Shi H, Qi R, Sun S, Tang Y, Zhang B, Wang C (2006) Hsp90 regulates activation of interferon regulatory factor 3 and TBK-1 stabilization in Sendai virus-infected cells. *Mol Biol Cell* **17**(3): 1461-1471
- Yarilina A, Park-Min KH, Antoniv T, Hu X, Ivashkiv LB (2008) TNF activates an IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1-dependent type I interferon-response genes. *Nat Immunol* **9**(4): 378-387
- Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A (2005) TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* **308**(5728): 1626-1629
- Yasuda K, Yu P, Kirschning CJ, Schlatter B, Schmitz F, Heit A, Bauer S, Hochrein H, Wagner H (2005) Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J Immunol* **174**(10): 6129-6136
- Yasukawa K, Oshiumi H, Takeda M, Ishihara N, Yanagi Y, Seya T, Kawabata S, Koshiba T (2009) Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. *Sci Signal* **2**(84): ra47
- Yedavalli VS, Neuveut C, Chi YH, Kleiman L, Jeang KT (2004) Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell* **119**(3): 381-392
- Yeh E, Cunningham M, Arnold H, Chasse D, Monteith T, Ivaldi G, Hahn WC, Stukenberg PT, Shenolikar S, Uchida T, Counter CM, Nevins JR, Means AR, Sears R (2004) A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat Cell Biol* **6**(4): 308-318
- Yi P, Wu RC, Sandquist J, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, Means AR, O'Malley BW (2005) Peptidyl-prolyl isomerase 1 (Pin1) serves as a coactivator of steroid receptor by regulating the activity of phosphorylated steroid receptor coactivator 3 (SRC-3/AIB1). *Mol Cell Biol* **25**(21): 9687-9699
- Yilmaz ZB, Weih DS, Sivakumar V, Weih F (2003) RelB is required for Peyer's patch development: differential regulation of p52-RelB by lymphotoxin and TNF. *EMBO J* **22**(1): 121-130

Yin L, Wu L, Wesche H, Arthur CD, White JM, Goeddel DV, Schreiber RD (2001) Defective lymphotoxin-beta receptor-induced NF-kappaB transcriptional activity in NIK-deficient mice. *Science* **291**(5511): 2162-2165

Yoneyama M, Fujita T (2007) RIG-I family RNA helicases: cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* **18**(5-6): 545-551

Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M, Jr., Akira S, Yonehara S, Kato A, Fujita T (2005) Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* **175**(5): 2851-2858

Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**(7): 730-737

Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Fukada M, Nishida E, Fujita T (1998) Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO Journal* **17**: 1087-1095

Yoshida R, Takaesu G, Yoshida H, Okamoto F, Yoshioka T, Choi Y, Akira S, Kawai T, Yoshimura A, Kobayashi T (2008) TRAF6 and MEKK1 play a pivotal role in the RIG-I-like helicase antiviral pathway. *J Biol Chem* **283**(52): 36211-36220

You LR, Chen CM, Yeh TS, Tsai TY, Mai RT, Lin CH, Lee YH (1999) Hepatitis C virus core protein interacts with cellular putative RNA helicase. *J Virol* **73**(4): 2841-2853

Younger JM, Chen L, Ren HY, Rosser MF, Turnbull EL, Fan CY, Patterson C, Cyr DM (2006) Sequential quality-control checkpoints triage misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Cell* **126**(3): 571-582

Yu M, Tong JH, Mao M, Kan LX, Liu MM, Sun YW, Fu G, Jing YK, Yu L, Lepaslier D, Lanotte M, Wang ZY, Chen Z, Waxman S, Wang YX, Tan JZ, Chen SJ (1997) Cloning of a gene (RIG-G) associated with retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells and representing a new member of a family of interferon-stimulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14): 7406-7411

Zamboni DS, Kobayashi KS, Kohlsdorf T, Ogura Y, Long EM, Vance RE, Kuida K, Mariathasan S, Dixit VM, Flavell RA, Dietrich WF, Roy CR (2006) The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nat Immunol* **7**(3): 318-325

- Zarnegar BJ, Wang Y, Mahoney DJ, Dempsey PW, Cheung HH, He J, Shiba T, Yang X, Yeh WC, Mak TW, Korneluk RG, Cheng G (2008) Noncanonical NF- κ B activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol* **9**(12): 1371-1378
- Zha J, Han KJ, Xu LG, He W, Zhou Q, Chen D, Zhai Z, Shu HB (2006) The Ret finger protein inhibits signaling mediated by the noncanonical and canonical IkappaB kinase family members. *J Immunol* **176**(2): 1072-1080
- Zhang B, Li M, Chen L, Yang K, Shan Y, Zhu L, Sun S, Li L, Wang C (2009) The TAK1-JNK cascade is required for IRF3 function in the innate immune response. *Cell Res* **19**(4): 412-428
- Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S (2004a) A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* **303**(5663): 1522-1526
- Zhang L, Zhang J, Lambert Q, Der CJ, Del Valle L, Miklossy J, Khalili K, Zhou Y, Pagano JS (2004b) Interferon regulatory factor 7 is associated with Epstein-Barr virus-transformed central nervous system lymphoma and has oncogenic properties. *Journal of virology* **78**(23): 12987-12995
- Zhang M, Tian Y, Wang RP, Gao D, Zhang Y, Diao FC, Chen DY, Zhai ZH, Shu HB (2008a) Negative feedback regulation of cellular antiviral signaling by RBCK1-mediated degradation of IRF3. *Cell Res* **18**(11): 1096-1104
- Zhang M, Wu X, Lee AJ, Jin W, Chang M, Wright A, Imaizumi T, Sun SC (2008b) Regulation of IkappaB kinase-related kinases and antiviral responses by tumor suppressor CYLD. *J Biol Chem* **283**(27): 18621-18626
- Zhang M, Wu X, Lee AJ, Jin W, Chang M, Wright A, Imaizumi T, Sun SC (2008c) Regulation of IKK-related kinases and antiviral responses by tumor suppressor CYLD. *The Journal of biological chemistry*
- Zhang P, Samuel CE (2008) Induction of protein kinase PKR-dependent activation of interferon regulatory factor 3 by vaccinia virus occurs through adapter IPS-1 signaling. *J Biol Chem* **283**(50): 34580-34587
- Zhang W, Wang J, Zhang Y, Yuan Y, Guan W, Jin C, Chen H, Wang X, Yang X, He F The Scaffold Protein TANK/I-TRAF Inhibits NF- κ B Activation by Recruiting Polo-like Kinase 1. *Mol Biol Cell*

Zhao T, Yang L, Sun Q, Arguello M, Ballard DW, Hiscott J, Lin R (2007) The NEMO adaptor bridges the nuclear factor-kappaB and interferon regulatory factor signaling pathways. *Nat Immunol* **8**(6): 592-600

Zhong B, Yang Y, Li S, Wang YY, Li Y, Diao F, Lei C, He X, Zhang L, Tien P, Shu HB (2008) The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* **29**(4): 538-550

Zhong B, Zhang L, Lei C, Li Y, Mao AP, Yang Y, Wang YY, Zhang XL, Shu HB (2009) The ubiquitin ligase RNF5 regulates antiviral responses by mediating degradation of the adaptor protein MITA. *Immunity* **30**(3): 397-407

