

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

**Caractérisation des mécanismes de régulation de
l'activité du facteur de transcription IRF-3**

par

Annie Bibeau-Poirier

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de PhD
en Sciences Pharmaceutiques
option Pharmacologie

Décembre 2008

© Annie Bibeau-Poirier, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Faculté de ~~pharmacie~~
Université de Montréal
Grade octroyé le:

2009-07-09

Cette thèse intitulée :

Caractérisation des mécanismes de régulation de l'activité du facteur de transcription IRF-3

présentée par :

Annie Bibeau-Poirier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Gerardo Ferbeyre, président-rapporteur

Marc Servant, directeur de recherche

Audrey Claing, membre du jury

Marc Pouliot, examinateur externe

Benoît Coulombe, représentant du doyen de la FES

Résumé

L'induction de l'immunité innée suite à une infection par un pathogène implique l'activation de facteurs de transcription latents nécessaires pour l'expression de gènes responsables de la clairance de l'agent infectieux. Un de ces facteurs de transcription, *Interferon Regulatory Factor 3* (IRF3), est un médiateur essentiel de la réponse immunitaire innée. Aussi, l'activation soutenue de ce dernier joue un rôle majeur dans certaines maladies inflammatoires aiguës et chroniques. IRF3 est constitutivement exprimé dans une grande variété de tissus où il est maintenu dans une conformation de latence dans le cytoplasme. Suite à une infection virale, IRF3 est phosphorylé dans son extrémité C-terminale par les sérine/thréonines kinases *TANK-binding protein 1* (TBK1) et IKKi, ce qui induit son changement conformationnel et son homodimérisation. Ensuite, IRF3 transloque au noyau grâce à une séquence de localisation nucléaire (NLS) atypique et s'associe à ses coactivateurs *CREB-binding protein* (CBP)/p300 (histones acétyltransférases), qui le séquestrent dans ce compartiment et lui permettent de lier l'ADN. Suite à son activation, l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique a suggéré qu'IRF3 est dégradé par le protéasome. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus sont peu caractérisés.

Ainsi, le principal objectif de cette thèse est de caractériser les voies de signalisation nécessaires à la régulation de l'activité transcriptionnelle d'IRF3. Tout d'abord, nous avons démontré pour la première fois qu'IRF3 est polyubiquitiné suite à sa phosphorylation en C-terminal par TBK1/IKKi. Ce processus, qui est réalisé partiellement par une E3 ligase de type complexe SCF, est important pour induire la dégradation d'IRF3 par le protéasome. Les résidus lysines (K) sont les récepteurs majeurs de l'ubiquitine, mais aussi de groupements acétyl et méthyl. De façon intéressante, la K77 d'IRF3 est conservée parmi tous les membres des IRFs et a été proposée pour faire partie d'un NLS atypique. Ainsi, nous avons ensuite caractérisé le rôle de la K77 dans l'activité d'IRF3. Le remplacement de K77 par un résidu arginine ou la mutation du NLS atypique en remplaçant les deux

résidus basiques Lys-Arg par les résidus neutres Asn-Gly, créant le mutant IRF3KR77/78NG, abolit complètement la capacité d'IRF3 à lier l'ADN. De plus, l'habileté d'IRF3K77R ou d'IRF3KR77/78NG à être phosphorylé, à s'homodimériser et inopinément, à s'associer avec ses coactivateurs CBP/p300 et à accumuler dans le noyau suite à une infection virale n'est pas affectée. En outre, nous avons montré que la K77 d'IRF3 est acétylée *in vivo* par CBP/p300 de façon dépendante de TBK1/IKKi. Ainsi, nos résultats remettent en question le rôle de la séquence NLS atypique dans l'accumulation nucléaire d'IRF3 et suggèrent que l'acétylation de la K77 d'IRF3 par CBP/p300 représente une des dernières modifications requise pour son activité transcriptionnelle.

Depuis plusieurs années, la phosphorylation est reconnue comme une des plus importantes modifications post-traductionnelles menant à l'activation de cascades de signalisation. Il y a maintenant des évidences claires que la polyubiquitination et l'acétylation travaillent parallèlement avec la phosphorylation afin d'orchestrer une réponse physiologique globale. La compréhension du rôle de ces modifications post-traductionnelles dans la régulation de l'activité d'IRF3 permettra de paver la voie vers de nouvelles avenues thérapeutiques.

Mots-clés : PRR, infection virale, interféron, IRF3, TBK1/IKKi, ubiquitination, complexe SCF, acétylation, CBP/p300, NLS;

Abstract

Activation of the innate arm of the immune system following pathogen infections rely on the activation of latent transcription factors involved in the induction of a subset of genes responsible for pathogen's clearance. One of these transcription factors, Interferon Regulatory Factor 3 (IRF3), is an essential mediator of the innate immune response. Sustained activation of this transcription factor is also proposed to play a major role in acute and chronic inflammatory diseases. IRF3 is constitutively expressed in a variety of tissues where it is maintained in a latent conformation in the cytoplasm. Upon viral infection, IRF-3 is phosphorylated within its C-terminus extremity by the IKK-related kinases TANK-binding protein (TBK1) and IKKi inducing a conformational change that allows its homodimerization. In this conformation, IRF3 translocates into the nucleus *via* an atypical nuclear localization sequence (NLS) where it associates with coactivators CREB-binding protein (CBP)/p300 (histone acetyltransferases), inducing its sequestration into this compartment and allowing DNA binding activity. Following its activation, use of pharmacological inhibitors has suggested that IRF-3 is targeted to the proteasome machinery. However, the molecular mechanisms involved in this process were unknown.

Thus, the principal objective of this thesis was to characterize the signaling pathways involved in regulating the transcriptional activity of IRF3. We show for the first time that IRF3 is polyubiquitinated following its phosphorylation in its C-terminal end by TBK1 and IKKi. This process, which is mediated in part by a SCF complex E3 ligase, is important for recognition of IRF3 by the proteasome machinery. Lysine residues (K) are the major receptor for covalent attachment of ubiquitin but also for acetyl and methyl motifs. Interestingly, K77 of IRF3 is conserved among all the IRF members and was proposed to be part of an atypical NLS. Thus, we next addressed the role of K77 in IRF3 activity. Replacing lysine 77 with an arginine residue or mutating the atypical NLS by replacing the two basic residues Lys-Arg to neutral residues Asn-Gly, creating IRF3 KR77/78NG completely abrogated the DNA binding activity of IRF3. In addition, the

capacity of IRF3 K77R or IRF3 KR77/78NG to become phosphorylated, to homodimerize and, unexpectedly, to associate with CBP/p300 co-activators and to accumulate into the nucleus upon virus infection was not affected. Furthermore, we show that K77 is subjected to *in vivo* acetylation by CBP/p300 in a TBK1/IKKi dependent manner. Thus, our data questioned the proposed role of the atypical NLS sequence in the nuclear accumulation of IRF-3 and suggest that acetylation of IRF-3 on K77 by CBP/p300 represent one of last modifications required for its transcriptional activity.

For several years, phosphorylation was viewed as one of the most important posttranslational modifications leading to the activation of signaling cascades. There is now clear evidence that polyubiquitination and acetylation work in parallel with phosphorylation to orchestrate the overall physiological response. Understanding how these posttranslational modifications affect the activity of IRF3 might pave the way towards new therapeutic avenues.

Keywords : PRR, viral infection, interferon, IRF3, TBK1/IKKi, ubiquitination, SCF complex, acetylation, CBP/p300, NLS;

Table des matières

1. Introduction	1
1.1 Immunité innée.....	1
1.2 Les PAMS et les PRRs.....	2
1.2.1 TLRs.....	7
1.2.1.1 Expression cellulaire et tissulaire et localisation cellulaire.....	7
1.2.1.2 Structure	9
1.2.1.2.1 Domaine extracellulaire	9
1.2.1.2.2 Domaine TIR.....	10
1.2.1.3 Ligands	10
1.2.1.4 Adaptateurs et voies de signalisation cellulaire.....	13
1.2.1.4.1 MyD88.....	14
1.2.1.4.2 Mal.....	17
1.2.1.4.3 TRIF	18
1.2.1.4.4 TRAM	19
1.2.1.4.5 SARM.....	20
1.2.2 RLHs	20
1.2.2.3 Distribution cellulaire.....	22
1.2.2.2 Structures.....	22
1.2.2.3 Ligands	24
1.2.2.4 Adaptateurs et voies de signalisation cellulaire.....	25
1.2.3 DAI.....	29
1.2.3.1 Distribution tissulaire et cellulaire et localisation cellulaire	30
1.2.3.2 Structure	30
1.2.3.3 Ligands	32
1.2.3.4 Voie de signalisation cellulaire	32
1.3 Interférons	34
1.3.1 Classification.....	35

1.3.2	Présentation de l'enhanceosome de l'IFN β	37
1.3.3	Induction biphasique des IFN β et IFN α s	40
1.3.4	Récepteurs et signalisation cellulaires.....	42
1.3.5	Rôles et fonctions des IFN β / α s.....	45
1.3.6	ISGs	47
1.3.6.1	PKR	48
1.3.6.2	OAS	49
1.3.6.3	Mx	50
1.3.6.4	La famille p56	51
1.3.6.5	ISG20.....	52
1.4	Les IRFs	52
1.4.1	Structure d'IRF3.....	58
1.4.2	Mécanisme d'activation d'IRF3	60
1.4.3	Gènes induits par IRF3.....	62
1.4.4	Mécanisme de régulation de l'activité d'IRF3	63
1.4.4.1	Phosphorylation.....	64
1.4.4.2	S-glutathionylation	65
1.4.4.3	Acétylation	65
1.4.4.4	ISGylation	66
1.4.4.5	Sumoylation.....	67
1.4.4.6	Ubiquitination/dégradation.....	67
1.4.5	Inhibition de l'activité d'IRF3 par les virus	68
1.4.6	Implication pathologique d'IRF3	71
1.5	Ubiquitination.....	72
1.5.1	Roles of ubiquitination in pattern recognition receptor and interferon type I receptor signaling	76
1.5.1.1	Abstract	77
1.5.1.2	Introduction	78

1.5.1.3 E3 ubiquitin ligases	80
1.5.1.3.1 TRAFs	81
1.5.1.3.1.1 TRAF6	82
1.5.1.3.1.2 TRAF3	83
1.5.1.3.2 TRIAD3A	84
1.5.1.3.3 TRIM	85
1.5.1.3.3.1 TRIM25	85
1.5.1.3.3.2 TRIM21	86
1.5.1.3.3.3 TRIM30 α	86
1.5.1.3.4 Cullin-based E3 ligases	86
1.5.1.3.4.1 SCF complex	86
1.5.1.3.4.2 ECS	88
1.5.1.3.5 RNF125	89
1.5.1.3.6 SLIM/PDLIM2	90
1.5.1.4 Deubiquitin enzymes that regulate PRR and IFN signaling	91
1.5.1.4.1 CYLD	91
1.5.1.4.2 A20	91
1.5.1.4.3 DUBA	93
1.5.1.4.4 YopJ	93
1.5.1.5 Conclusion	93
1.5.1.6 Acknowledgements	94
1.5.1.7 References	94
1.5.1.8 Figure legends	106
1.5.1.9 Figures	107
1.5.1.10 Tables	109
2. Hypothèse et objectifs de travail	110
3. Involvement of the IKK-related kinases TBK1/IKKi and Cullin-based Ubiquitin Ligases in IRF-3 Degradation	113

3.1 Abstract	114
3.2 Introduction	115
3.3 Materials and Methods	117
3.3.1 Reagent, antibodies, and plasmids	117
3.3.2 Cell types, transfection and virus strains.....	117
3.3.3 Infection.....	118
3.3.4 Immunoprecipitation, Immunoblot analysis and Native-PAGE	118
3.3.5 In vivo ubiquitination assays.....	119
3.3.6 Biosynthetic Labeling Experiments	119
3.4 Results	120
3.4.1 Virus infection results in proteasome-dependent degradation of IRF-3	120
3.4.2 An ubiquitin-dependent process is involved in the degradation of IRF-3 following SeV infection	121
3.4.3 A Cullin-based ubiquitin ligase pathway is involved in host cell-mediated IRF-3 degradation following SeV infection	122
3.4.4 Degradation of IRF-3 is dependent of the TBK1/IKKi signaling pathway.....	123
3.5 Discussion	125
3.6 Acknowledgments	127
3.7 Footnotes	128
3.8 References	128
3.9 Figure Legends	137
3.10 Figures	141
4. Lysine residue 77, located in the DNA binding domain of Interferon Regulatory Factor-3 transcription factor, is not part of a predicted NLS but is rather acetylated by CBP/p300 and essential for DNA binding	151
4.1 ABSTRACT	152
4.2 INTRODUCTION.....	153
4.3 MATERIALS AND METHODS	154

4.3.1 Reagent, antibodies, and plasmids.	154
4.3.2 Cell culture, transfection and infections.	155
4.3.3 Immunoblot analysis, Immunoprecipitation, and Native-PAGE.	155
4.3.4 Immunofluorescence.	156
4.3.5 Biological assay.	157
4.3.6 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	157
4.3.7 Production of recombinant GST-IRF-3.	158
4.3.8 Reporter Gene Assays.	158
4.4 RESULTS.	158
4.4.1 Essential role of Lys77 in the transactivating activity of IRF-3.	158
4.4.2 The dimerization and the nuclear accumulation of IRF3 are not affected in the context of a mutated NLS.	160
4.4.3 Lysine 77 is a residue critical for DNA binding	160
4.4.4 IRF3 is acetylated in vivo in an IKK-related kinases-CBP/p300 dependent manner	161
4.5 DISCUSSION	161
4.6 ACKNOWLEDGMENTS	164
4.7 REFERENCES	164
4.8 FIGURE LEGENDS	167
4.9 FIGURES	170
5. Discussion et perspectives.	182
6. Conclusion.	202
7. Bibliographie	204

Liste des tableaux

Tableau I : Les adaptateurs, la localisation membranaire et les ligands des TLRs humains.	12
Tableau II : Distribution, conditions d'expression et inducteurs des IRFs et exemples de gènes induits par les IRFs.	56
Tableau III : Présentation de différents virus ayant la faculté d'antagoniser l'activité transcriptionnelle d'IRF3.	69

Liste des figures

Figure 1 : Reconnaissance des PAMPs viraux par les PRRs : TLRs, RLHs et DAI.....	6
Figure 2 : Localisation cellulaire, structure et ligands (PAMPs) des TLRs.	9
Figure 3 : Représentation schématique de la structure des adaptateurs contenant un domaine TIR.	14
Figure 4 : Voies de signalisation dépendantes de MyD88 et de TRIF induites par les TLRs.	15
Figure 5 : Représentation schématique de la structure des RLHs et de l'adaptateur IPS-1.	23
Figure 6 : Voies de signalisation induites par les récepteurs RLHs.....	27
Figure 7 : Représentation schématique de la structure de DAI (DLM-1/ZBP1).....	31
Figure 8 : Modèle d'activation de DAI et de ses voies de signalisation.	34
Figure 9 : Présentation de l'enhanceosome du promoteur de l'IFNβ.	39
Figure 10 : Modèle d'induction biphasique des IFNs de type I.	41
Figure 11 : Voie de signalisation induite par les IFNs de type I.....	44
Figure 12 : Induction et rôle des IFNs de type I suite à une infection virale.	46
Figure 13 : Activation de PKR et inhibition de la traduction.	49
Figure 14 : Activation de l'oligoadénylate synthétase (OAS) et dégradation des ARNs viraux et cellulaires.	50
Figure 15 : Schéma des structures et domaines conservés des IRFs.	54
Figure 16 : Représentation schématique du facteur de transcription IRF3.	59
Figure 17 : Mécanisme d'activation du facteur de transcription d'IRF3.	62
Figure 18 : Mécanisme de conjugaison de l'ubiquitine à une protéine substrat.	73
Figure 19 : IRF3 est activé et dégradé suite à une infection par le virus HCMV inactivé aux rayons ultra-violets.	184
Figure 20 : La surexpression de Fwd2 et Fbw4 diminue l'activité transcriptionnelle d'IRF-3 suite à son activation.....	187

Figure 21 : La surexpression de Fwd2 et Fbw4 diminue l'activité transcriptionnelle d'une version constitutivement active d'IRF3, IRF-3 5D.....	188
Figure 22 : La surexpression de Fwd2 ou Fbw4 favorise la dégradation d'IRF3 suite à sa phosphorylation.	189
Figure 23 : Stratégie utilisée afin de créer un mutant d'IRF3 ne pouvant plus être acétylé par CBP/p300 sans modifier le résidu K77 nécessaire à la liaison à l'ADN.	194
Figure 24 : Les mutations des acides aminés entourant la K77 (T75G/R78T) affectent l'activité transcriptionnelle d'IRF3.	195

Abréviations

5'PPP-ssRNA, ssRNA avec une extrémité 5'-triphosphate
 ADN-B, ADN de forme B
 ADN-Z, ADN de forme Z
 AP, *activator protein*
 APC, cellule présentatrice d'antigènes
 ARNm, ARN messenger
 ATF, *activating transcription factor*
 BAF, *BRG* ou *BRM-associated factor*
 BHV1, *Bovine Herpes Virus 1*
 BRG, *Brahma-related gene*
 BRM, *Brahma*
 CARD, *Caspase recruitment domain*
 Cardif, *CARD adaptor inducing IFN β*
 CBP, *CREB binding protein*
 CCL, *CC-chemokine ligand*
 CD, *cluster of differentiation*
 cDC, *conventional DC*
 cdk, *cyclin-dependent kinase*
 CDKN1A, *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*
 ConA, concanavaline A
 CRE, *cAMP-responsive element*
 CREB, *CRE-binding protein*
 CRP, *C-reactive protein*
 CSFV, *classical swine fever virus*
 CXCL, *CXC-chemokine ligand*
 DAI, *DNA-dependent activator of IRFs*
 DBD, domaine de liaison à l'ADN
 DC, *dendritic cell*
 DD, *death domain*
 DNA-PK, *DNA dependent protein kinase*
 DR, domaine de régulation
 DRAF1, *double-stranded RNA-activated factor 1*
 DRBD, *dsRNA-binding protein*
 dsRNA, ARN double brin
 FADD, *Fas association death domain*
 FMLP, *f-Met-Leu-Phe*
 GAS, *IFN γ -activated site*
 GATA3, *GATA-binding protein 3*
 GBP1, *guanylate-binding protein 1*

GCN5, *general control nonderepressible 5*
 GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
 GNATs, *Gcn5-related N-acetyltransferases*
 gp91^{PHOX}, *glycoprotein 91 (phagocyte oxidase)*
 GRX-1, *glutaredoxin 1*
 GTPase, *guanosine triphosphatase*
 HAT, *histone acétyltransférase*
 HAV, *Hepatitis A Virus*
 HCMV, *human cytomegalovirus*
 HCMV-B, *protéine B du HCMV*
 HCMV-H, *protéine H du HCMV*
 HCV, *Hepatitis C Virus*
 HDAC, *histone déacétyltransférase*
 HHV, *Human Herpesvirus*
 HIV, *human immunodeficiency virus*
 HRSV, *Human Respiratory Syncytial Virus*
 HSP, *heat-shock protein*
 HSV, *herpes simplex virus*
 HTLV-1 Tax, *human T cell lymphotropic virus Type 1 transactivator Tax*
 IAD, *IRF associated domain*
 ICSAT, *Interferon Consensus Sequence binding protein for Activated T cells*
 ICSBP, *IFN consensus sequence binding protein*
 ID, *domaine intermédiaire*
 IFIH1, *interferon induced with helicase C domain 1*
 IFIT1, *interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1*
 IFN, *interféron*
 IGK, *immunoglobulin κ light chain*
 I κ B, *inhibitory κ B*
 IKK, *I κ B kinase*
 IKKi, *IKK inductible*
 IL, *interleukine*
 IL-1R, *IL-1 receptor*
 IP-10, *IFN γ inducible protein 10*
 IPS-1, *IFN β promoter stimulator*
 ISD, *IFN-stimulatory DNA*
 ISG, *IFN-stimulated gene*
 ISGF, *ISG factor*
 ISRE, *IFN stimulated response element*
 IRAK, *IL-1 receptor associated kinase*
 IRF, *IFN regulatory factor*
 JAK, *janus kinase*
 JNK, *JUN N-terminal kinase*

K, lysine
 K77, lysine en position 77
 KSHV, *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*
 LGP2, *laboratory of genetics and physiology-2*
 LMP2, *low-molecular-mass protein 2*
 LPS, lipopolysaccharide
 LRR, *leucin-rich repeat*
 LTA, acide lipotochéique
 Mal, *MyD88 adapter-like protein*
 MALP2, *macrophage-activating lipopeptide 2*
 MAPK, *mitogen-activated protein kinase*
 MAVS, *mitochondrial antiviral signaling*
 MCM, *murine cytomegalovirus*
 MDA5, *melanoma differentiation-associated gene 5*
 MEF, *mouse embryonic fibroblast*
 MH2, *Mad-homology 2*
 MITA, *mediator of IRF3 activation*
 MMR, *macrophage mannose receptor*
 MyD88, *myeloid differentiation- 88*
 NAK, *NF- κ B-activating kinase*
 NDV, *Newcastle disease virus*
 NEDD8, *neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 8*
 NEMO, *NF- κ B essential modulator*
 NES, séquence d'exportation nucléaire
 NF- κ B, *nuclear factor (NF)- κ B*
 NFKBIK, *I κ B- ζ*
 NIK, *NF- κ B-inducing kinase*
 NK, *natural killer*
 NLRX1, *NOD-like receptor XI*
 NLR, *Nod-like receptor*
 NLS, séquence de localisation nucléaire
 NLS_c, séquence de localisation nucléaire classique
 NOD, *nucleotide-binding oligomerization domain*
 NOS2, *nitric-oxide synthase 2*
 NS, *nonstructural protein*
 NSP, *nonstructural protein*
 NTS, signal de translocation nucléaire
 OAS, *olygoadénylate-synthétase*
 p300, *E1A-associated protein of 300 kDa*
 P, proline
 PAMP, *pathogen-associated molecular pattern*
 pDC, *plasmacytoid DC*

PIP, *prolactin induced protein*
PIP-2D, domaine de liaison à PtdIns(4,5)P₂
PKR, *dsRNA-dependant kinase*
PLpro domain, *Papain-like protease domain*
PMA, *phorbol myristate acetate*
poly(dA-dT)·poly(dA-dT), acide poly(deoxyadenylique-thymidylique)
poly(dG-dC)·poly(dG-dC), acide poly(2'-deoxyguanyle-2'-deoxycytidylique)
Poly I :C, acide polyinosique-polycytidylique
PRD, *positif regulatory domain*
PRR, *patterns recognition receptor*
PtdIns(4,5)P₂, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
R, arginine
RANTES, *regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*
RBCK1, *RBCC protein interacting with PKC1*
RD, *repressor domain*
RE, réticulum endoplasmique
RHIM, *RIP homotypic interaction motif*
RNaseL, endonucléase latente
RIG-I, *retinoic acid-inducible gene*
RIP, *receptor-interacting protein*
RLH, *RIG-I-like RNA helicase*
RLR, *RHIM-like repeat*
RSV, *respiratory syncytial virus*
RSV-F, protéine F du RSV
RRP, région riche en proline
S, sérine
SARM, *sterile α- and armadillo-motif-containing protein*
SARS-CoV, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*
SD, *signaling domain*
SeV, *Sendai Virus*
SH, *Src homology region*
SHFM3, *split hand/foot malformation 3*
STING, *stimulator of interferon genes*
ssRNA, ARN simple brin
STAT, *signal transducer and activator of transcription*
T, thréonine
T6BD, domaine de liaison à TRAF-6
TAK1, *TGF-activated kinase 1*
TAB, *TAK1-binding protein*
TANK, *TRAF-family member-associated NF-κB activator*
TAP1, *transporter associated with antigen processing 1*
TBK, *TANK-binding kinase*

TGF, *Transforming growth factor*
TICAM, *TIR-domain-containing molecule*
TIR, *Toll/IL-1R domain*
TIRAP, *TIR-associated protein*
TLR, *Toll-like receptor*
TNF, *tumor necrosis factor*
TPR, *motif tétratricopeptide*
TRADD, *TNFR-associated death domain*
TRAF6, *TNF-receptor-associated factor 6*
TRAIL, *TNF-related apoptosis inducing ligand*
TRAM, *TRIF-related adaptor molecule*
TRAP, *translocon-associated protein*
TRIF, *TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β*
TSA, *trichostatine A*
Ub, *ubiquitine*
Uev, *ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant*
VISA, *virus-induced signaling adaptor*
VSV, *vesicular stomatitis virus*
VSV-G, *protéine G du VSV*
VV, *Vaccinia Virus*
WNV, *West Nile Virus*;
XAF, *XIAP-associated factor*
XIAP, *X-linked inhibitor of apoptosis*
ZBP1, *Z-DNA binding protein 1*
ZYM, *zymosan*

À tous les membres de ma famille, maman, papa, Jackie, Caroline, Nicole et Roger, qui ont cru en moi et m'ont toujours supporté dans les moments faciles et difficiles depuis mes débuts. À ma mère et ma grand-mère Verville qui m'ont guidé, poussé à aller au bout des choses et à dépasser mes limites.

À mon mari Vincent, que j'adore et qui a toujours été présent pour me soutenir, m'aider, me réconforter et m'encourager.

Remerciements

Une thèse de doctorat est un long travail qui se fait grâce à l'aide de plusieurs personnes. Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de thèse, Dr Marc Servant. Son énergie et son enthousiasme à communiquer sa passion pour la recherche, son feu sacré, a été une grande motivation dans les moments plus faciles comme difficiles. Son transfert exceptionnel de connaissances et ses multiples conseils m'ont guidée pour faire de moi la scientifique et chercheuse que je suis aujourd'hui. Aussi, j'aimerais remercier tous mes collègues de travail, une équipe formidable, qui ont rendu ces multiples années de labeur fantastiques : Simon-Pierre Gravel, Jean-François Clément, Priscilla Doyon, Myriame St-Amant-Verret, Annie Douillette, Louis-Dominic Tremblay et Valérie Chénard. Finalement, j'aimerais remercier les Dr Pierre Moreau, Dr Sylvain Meloche, Dr Geneviève Rodier, Dr Philippe Coulomb, Dr Nathalie Grandvaux, Dr John Hiscott et Dr Rongtuan Lin pour leur expertise et leur aide.

1. Introduction

1.1 Immunité innée

Quotidiennement, le corps humain est exposé à plusieurs micro-organismes potentiellement dangereux. Pour contrer ces multiples infections, il se défend grâce à deux types d'immunités : innée et adaptative. Toujours présente, l'immunité innée est la première ligne de défense contre une grande diversité de pathogènes. Elle est phylogénétiquement très ancienne et intervient très rapidement, soit quelques minutes après le début de l'infection. Ainsi, l'agent infectieux est éliminé grâce des mécanismes de phagocytose (macrophages/monocytes, neutrophiles et cellules dendritiques) et d'inflammation aiguë. Cependant, l'immunité innée n'a pas toujours la capacité d'éliminer l'infection à elle seule. Dans ce cas, elle la contient jusqu'à la mobilisation et la contribution de l'immunité adaptative, qui se manifeste généralement entre trois à cinq jours après de début de l'infection. L'immunité adaptative génère une réponse adaptée et spécifique suite à la reconnaissance d'un antigène du pathogène. Elle est déclenchée et orientée par l'expression de certains gènes induits lors de l'activation de l'immunité innée, c'est-à-dire des cytokines (comme par exemple : interleukine (IL)-1, IL-6 et *tumor necrosis factor* (TNF)- α) et des molécules co-stimulatrices ¹.

Ainsi, l'immunité innée joue un rôle primordial dans la réponse de l'hôte contre un agent infectieux et c'est pourquoi nous nous y sommes spécifiquement intéressés dans la cadre de nos travaux de recherche. Par conséquent, le prochain chapitre discutera des différents récepteurs impliqués dans la détection des corps étrangers et de leur implication dans la réponse engendrée par les cellules suite à une infection par des pathogènes.

1.2 Les PAMS et les PRRs

L'immunité innée est dite non-spécifique car elle est activée par la reconnaissance de séquences communes à différents micro-organismes ¹. Par conséquent, la détection de la présence d'agents infectieux s'effectue grâce à des mécanismes généraux de reconnaissance moléculaire. Lors d'une infection de l'hôte par des pathogènes, des motifs moléculaires conservés associés à ceux-ci, les *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), sont responsables de l'activation des premières cellules de la réponse innée ^{2,3}. Des exemples de ces cellules sont les cellules épithéliales, macrophages, cellules dendritiques et cellules *natural killer* (NK). Ces PAMPs sont caractérisés par trois propriétés : -1- ils sont exprimés par les pathogènes et non par les cellules hôtes; -2- ils sont essentiels à la survie des pathogènes en question, ce qui limite la possibilité de mutations pouvant inhiber leurs reconnaissances par les récepteurs des cellules hôtes et rend leurs structures invariables; -3- leurs structures sont partagées par de grands groupes de micro-organismes, limitant ainsi le nombre de récepteurs impliqués dans leurs reconnaissances. Le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négative, des motifs d'ADN CpG non méthylés associés aux génomes de bactéries et de virus et l'ARN double brin, un intermédiaire de la réplication du matériel génétique de virus, sont des exemples de PAMPs bien connus ^{3,4}.

Les *pattern recognition receptor* (PRR) sont les récepteurs reconnaissant les PAMPs, une machinerie de l'immunité innée hautement conservée au cours de l'évolution, soit de la plante en passant par la drosophile ^{1, 5, 6}. Aussi, leurs expressions sont constitutives et ne sont pas clonales, c'est-à-dire que plusieurs types de cellules peuvent exprimer un PRR d'une même spécificité et qu'une seule cellule peut exprimer plusieurs PRRs de spécificités différentes ⁶. De plus, différents PRRs reconnaissent des PAMPs qui leur sont propres, ce qui active des voies de signalisation cellulaires spécifiques et aboutie à des réponses immunitaires distinctes.

Les PRRs peuvent être localisés au niveau des membranes cellulaires, dans le cytosol ou ils peuvent être sécrétés dans les fluides extracellulaires ^{1, 5}. Ils ont pour

fonction : -1- d'induire la phagocytose (en stimulant l'ingestion du pathogène reconnu, comme par exemple le *macrophage mannose receptor* (MMR)); -2- le chimiotactisme (en guidant les neutrophiles au site d'infection, comme par exemple le *f-Met-Leu-Phe* (FMLP) *receptor*); -3- l'activation cellulaire (en induisant l'expression de cytokines et de chimiokines importantes pour l'initiation d'une réponse adaptative adéquate, comme par exemple les *Toll-like receptor* (TLR)s)^{1, 5}. Par conséquent, une fois activés, ils induisent immédiatement des cascades d'activation extracellulaires (comme par exemple l'opsonisation de l'agent infectieux et l'activation du système du complément) et des signaux intracellulaires responsables de l'activation complète de la réponse immunitaire. Ainsi, les PRRs peuvent être séparés en deux familles : ceux de sécrétion (fluide extracellulaire) et ceux de signalisation (membranaire et cytosolique). Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés exclusivement à l'activation des PRRs de signalisation, qui ont pour rôle de signaler la présence d'un pathogène (essentiellement des virus dans notre cas), d'activer une réponse inflammatoire et d'induire l'expression de molécules nécessaires à l'induction de l'immunité adaptative et à la décimation de l'agent^{1, 5}.

Les deux familles de PRRs de signalisation les plus caractérisées pour induire une réponse contre une infection virale sont les *Toll-like receptors* (TLRs) (récepteurs membranaires) et les *retinoic acid-inducible gene* (RIG-I)-*like RNA helicases* (RLHs) (récepteurs cytoplasmique)⁷. De plus, un nouveau PRR cytoplasmique de signalisation impliqué dans une réponse antivirale a récemment été identifié : *DNA-dependent activator of IRFs* (DAI)⁸. Suite à la reconnaissance de leurs ligands, ces trois types de récepteurs recrutent des adaptateurs qui leurs permettent d'activer des cascades de signalisation intracellulaires. Ces dernières sont importantes pour la production des interférons (IFN) de type I et des cytokines pro-inflammatoires, qui sont essentielles pour générer une réponse innée antivirale adéquate. Aussi, les *Nod-like receptor* (NLR)s forment une grande famille de PRRs cytoplasmiques de signalisation essentiellement connus pour induire une réponse indépendante des IFNs contre les infections bactériennes⁹. Il a été démontré que NALP3,

un membre de cette famille, induit une réponse indépendante de la production des IFN de type I suite à une infection par certains types de virus (*Sendai Virus* (SeV), Influenza A et un adénovirus)^{10,11}.

Au cours des travaux de recherche de cette thèse, nous nous sommes intéressés strictement aux PRRs de signalisations responsables à l'induction des IFNs de type I. Ainsi, la suite de cette introduction discutera seulement des TLRs, RLHs et DAI. De plus, étant donnée l'importance de leurs activités biologiques antivirales, l'utilisation du terme IFN de type I au cours de cette thèse fera référence aux IFN β et IFN α s (IFN β/α s), qui sont les représentants majeurs de cette sous-famille de cytokines.

Tous les virus sont constitués d'ADN ou d'ARN et d'une capsid, une enveloppe de protéines qui renferme les acides nucléiques. De plus, plusieurs virus sont enfermés dans une enveloppe de phospholipides composée de glycoprotéines virales⁷. Les structures de chacune de ces composantes virales constituent un PAMPs pouvant être reconnus par les TLRs, RHLs et DAI et ainsi, initier une réponse antivirale^{7,8}. Aussi, des intermédiaires de réplication des virus générés durant leurs cycles de réplication constituent des PAMPs, en particulier l'ARN double brin (dsRNA)⁷.

Premièrement, les TLRs localisés à la membrane plasmique des cellules (TLR2 et 4) peuvent reconnaître et interagir avec les glycoprotéines virales des virions qui se retrouvent dans le milieu extracellulaire (voir Figure 1)¹². Deuxièmement, les TLRs localisés aux membranes endosomiales (TLR3, 7/8 et 9) peuvent reconnaître certaines structures d'acides nucléiques virales localisées à l'intérieur de ce compartiment (voir Figure 1)^{2, 3, 13-17}. D'une part, certains virus sont endocytés par les cellules, comme par exemple le virus Influenza. Suite à la maturation des endosomes, les enveloppes virales et les capsides protéiques sont digérées par les enzymes lysosomiales. Ceci entraîne une libération du matériel génétique viral à l'intérieur de ce compartiment, ce qui permet leur reconnaissance par les TLRs présents chez cette membrane^{18,19}. D'autre part, il a été récemment proposé que l'autophagie, un processus de dégradation de composés cytoplasmiques par le transport

vésiculaire aux lysosomes, est responsable de la délivrance et de la présentation de composantes virales (acides nucléiques) aux TLRs endosomiaux^{18,20}. En effet, l'entrée de certains virus par le processus d'endocytose (comme par exemple le *vesicular stomatitis virus* (VSV) et le SeV) dans les *plasmacytoid dendritic cells* (pDC) induit une libération du matériel génétique dans le cytoplasme des cellules hôtes. Ainsi, l'autophagie permet le transfert des intermédiaires de réplication viraux du cytosol aux compartiments lysosomiaux contenant TLR7^{18, 21}. Troisièmement, lorsqu'un virus entre dans une cellule par un mécanisme de fusion de membranes, les acides nucléiques du virus sont libérés dans le cytoplasme. La famille des RHLs peut reconnaître et lier les structures d'ARN simple brin (ssRNA) avec une extrémité 5'-triphosphate (5'PPP-ssRNA) et de dsRNA alors que DAI reconnaît différentes structures d'ADN (voir Figure 1)²²⁻²⁶. Finalement, une fois que les virus ont été détectés par ces différents mécanismes, une réponse cellulaire antivirale est engendrée.

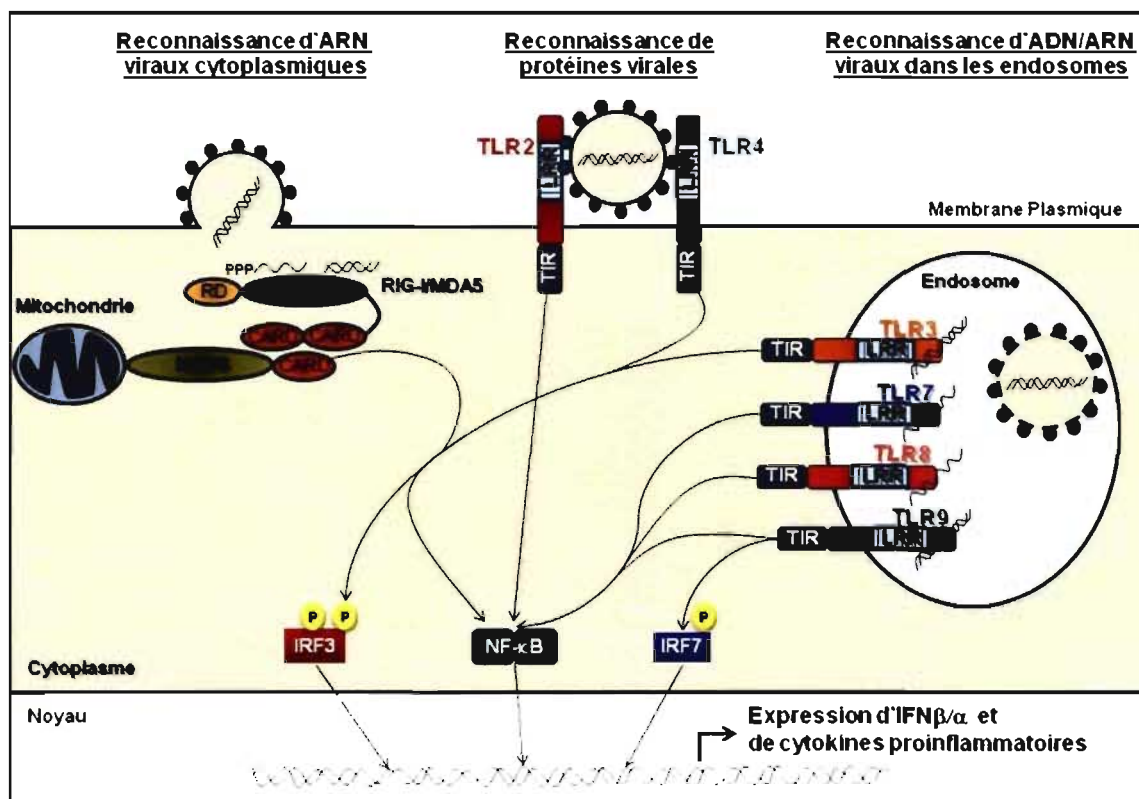


Figure 1 : Reconnaissance des PAMPs viraux par les PRRs : TLRs, RLHs et DAI.

Puisque dans le cadre de mes travaux de recherche, nous nous sommes exclusivement intéressés à l'activation des PRRs de signalisation activés lors d'une infection virale, les prochaines sous-sections de ce chapitre seront consacrées aux récepteurs des familles des TLRs (section 1.2.1), RLHs (section 1.2.2) et DAI (section 1.2.3). Ainsi, plusieurs paramètres seront élaborés pour chacun d'entre eux : leur distribution cellulaire, leur structure, leurs ligands et leurs adaptateurs et les voies de signalisation cellulaire qu'ils engendrent une fois activés.

1.2.1 TLRs

Les récepteurs TLRs ont été hautement conservés au cours de l'évolution, du *Caenorhabditis elegans* aux mammifères^{27,28}. C'est à la fin du 20^{ème} siècle qu'un groupe de recherche a identifié un nouveau rôle de Toll, initialement connu comme un gène responsable du développement dorso-ventral de la drosophile, dans la détection et l'induction d'une défense de l'hôte contre une invasion fongique²⁹. Ce fût le point de départ de la mise en évidence d'une nouvelle famille de PRRs chez les vertébrés. En effet, peu de temps après, le Dr Janeway et son équipe ont identifié une molécule humaine homologue à Toll responsable de la reconnaissance du LPS³⁰. Ils ont baptisé cette dernière *Toll-like receptor* (TLR), qui est définie aujourd'hui comme TLR4. Depuis ce temps, chez l'homme, nous avons identifié plus de dix récepteurs ayant une séquence très homologue à celle de la protéine Toll³¹. Par conséquent, cette famille de récepteurs a été nommée *Toll-like receptor* (TLR), tous ayant une spécificité de reconnaissance qui leur est propre.

1.2.1.1 Expression cellulaire et tissulaire et localisation cellulaire

Le niveau d'expression des membres de la famille des TLRs est différent. En effet, l'analyse d'expériences antigéniques à l'aide d'anticorps monoclonaux a montré que la présence de TLRs à la surface membranaire des cellules immunitaire semble très faible³². Il s'agit de quelques milliers de molécules par cellule à la surface des monocytes et de quelques centaines ou moins dans les cellules dendritiques immatures (*dendritic cells* (DC)).

La plupart des tissus expriment au moins un type de TLR et certains types cellulaires expriment la totalité, comme par exemple les leucocytes du sang périphérique. Les TLRs sont exprimés par plusieurs cellules du système immunitaire (macrophage, DCs, les cellules B et certaines cellules T (NK)) et plusieurs cellules non-immunitaires (fibroblastes, cellules épithéliales, adipocytes, cellules endothéliales vasculaires)³³. En

effet, les tissus les plus exposés aux agents microbiens, tels que les poumons, l'intestin grêle et le colon, expriment une grande variété de TLRs. Par contre, l'expression des TLRs par les cellules mononucléées du sang est variable : TLR1 et TLR6 sont exprimés dans tous les types cellulaires; TLR2, TLR4 et TLR8 sont principalement exprimés dans les monocytes CD14+; TLR9 et TLR10 sont très fortement exprimés dans les cellules B CD19+; TLR3 est exprimé dans les DCs. De plus, la maturation du monocyte vers la DC influence les types et niveaux d'expression des TLRs dans le cadre d'une même famille de cellules. Par conséquent, les monocytes expriment préférentiellement les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR8. Les DCs immatures expriment sélectivement le TLR3 et les DCs plasmocytoïdes expriment très fortement TLR7 et TLR9. Finalement, l'expression des TLRs n'est pas statique et est modulée rapidement par une variété de stimuli, tels qu'en réponse à un pathogène, plusieurs cytokines et des stress environnant ^{3,33}.

Les TLRs peuvent être exprimés de façon intra- ou extracellulaire. Ainsi, les TLRs 1, 2, 4, 5 et 6 sont exprimés à la membrane plasmique des cellules et les TLRs 3, 7, 8 et 9 sont retrouvés exclusivement aux membranes de compartiments intracellulaires tels que les endosomes et les phagosomes (voir Figure 2) ². Cependant, TLR3 est exprimé à la membrane plasmique chez les fibroblastes. Par conséquent, les ligands des ces récepteurs intracellulaires doivent être internalisés dans les endosomes afin de permettre une activation et une signalisation des récepteurs. Aussi, l'acidification des vésicules est nécessaire pour permettre la signalisation du TLR3 ³⁴. Finalement, certaines évidences suggèrent une internalisation du TLR4 dans les endosomes pour moduler l'expression des IFNs de type I ³⁵.

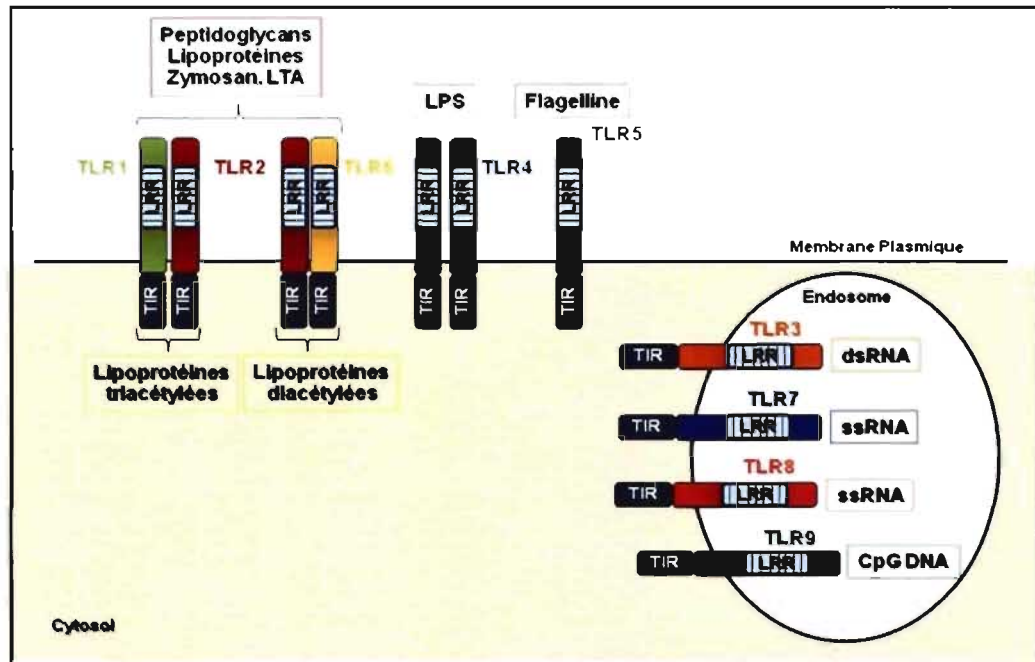


Figure 2 : Localisation cellulaire, structure et ligands (PAMPs) des TLRs.

1.2.1.2 Structure

La structure générale des TLRs s'apparente à l'organisation du récepteur d'IL-1^{4 2}. Ce sont des glycoprotéines de type 1 ancrées à la membrane plasmique des cellules par un domaine transmembranaire. Ils possèdent tous un domaine extracellulaire contenant un nombre variable de motifs riche en leucines, *leucine-rich repeat* (LRR) et un domaine de signalisation intracellulaire homologue au récepteur d'IL-1 (IL-1R) nommé *Toll/IL-1R domain* (TIR) (voir Figure 2).

1.2.1.2.1 Domaine extracellulaire

Les domaines extracellulaires des TLRs sont composés de 19 à 25 motifs LRRs disposés en tandem importants pour la liaison du ligand (PAMPs)⁴. Ces répétitions sont

très conservées et chacune est composée d'une séquence de 24 à 29 acides aminés riche en leucines (L), soit XLXXLXLXX ou X ϕ XX ϕ X₄FXXLX, où X est un acide aminé quelconque et ϕ est un acide aminé hydrophobique. Aussi, chaque LRR est formé d'un feuillet β et d'une hélice α qui sont reliés par une boucle⁴. L'ensemble de ces motifs LRRs semblerait octroyer une conformation de fer à cheval aux domaines extracellulaires des TLRs, où le ligand se lierait sur la surface concave de cette structure³⁶.

1.2.1.2.2 *Domaine TIR*

Les TLRs et IL-1R possèdent une région très conservée, composée d'environ 160 acides aminés dans leur portion cytoplasmique nommée le domaine TIR. Ce dernier permet des interactions homophiles ou hétérophiles entre les récepteurs TLRs ou avec les adaptateurs des TLRs contenant aussi un domaine TIR. La séquence d'homologie du domaine TIR comprend trois boîtes conservées, nommées boîte 1, 2 et 3, cruciales pour la signalisation cellulaire des récepteurs^{2, 4, 37}. Les régions à l'extérieur de ces boîtes sont aussi conservées. La boîte 1 est une signature du domaine TIR. La boîte 2 forme une importante boucle dans la structure du domaine, qui est probablement responsable du recrutement des effecteurs situés en aval des récepteurs activés. Cette boîte pourrait également permettre le recrutement d'un autre TLR, puisque les TLRs dimérisent durant la signalisation cellulaire. Le rôle de la boîte 3 n'est pas encore caractérisé mais elle semblerait être importante dans la signalisation du récepteur².

1.2.1.3 **Ligands**

Tel qu'expliqué précédemment dans la section 1.2.1.2.1, les motifs LRRs des domaines extracellulaires des TLRs sont responsables de la reconnaissance de leurs ligands respectifs, les PAMPs. Les TLRs s'hétérodimérisent (TLR1-TLR2, TLR2-TLR6, TLR8/TRL7 et TLR8/TLR9), s'homodimérisent (TLR4 et TLR9) et/ou se retrouvent sous

forme de monomère^{2, 3, 38-40}. Avant la liaison des ligands, le pré-assemblage des dimères est de très basse affinité. Une fois que les récepteurs ont lié leur agoniste, les dimères se forment et influencent ainsi la spécificité et la réponse des TLRs pour leurs différents ligands^{40, 41}.

Certains TLRs ont la capacité de reconnaître les déterminants membranaires des pathogènes. Par exemple, l'hétérodimère TLR2/6 reconnaît les lipoprotéines; TLR4, en coopération avec MD-2 et CD14, lie le LPS des bactéries Gram- (une endotoxine); TLR5 reconnaît la flagelline, qui est une protéine importante pour la propulsion des bactéries Gram- et Gram+^{12, 31, 42}. Cependant, cette reconnaissance ne se limite pas aux bactéries mais aussi aux virus et d'autres agents microbiens. D'autres TLRs ont la responsabilité de reconnaître des acides nucléiques de pathogènes (virus et bactéries) tels que TLR7/8, 9 et 3. En effet, les TLR7 et 8 lient des structures d'ARNs simple brin (ssRNA) riches en G/U retrouvés abondamment dans les ARNs viraux^{14, 15, 17}. Le TLR9 est activé par des séquences d'ADN riches en motifs CpG non-méthylées spécifiques aux bactéries et virus à ADN (voir Figure 2)¹⁶. Finalement, le TLR3 reconnaît des ARNs double brin (dsRNA), un intermédiaire de la réplication de virus à ARN¹³. De son côté, le TLR10 reste pour l'instant un récepteur orphelin. La liste de ligands des différents TLRs est décrite de façon plus élaborée dans le Tableau I.

Ainsi, même si les TLRs ont été initialement identifiés pour induire une réponse immunitaire innée contre les bactéries, ceux-ci sont également très importants pour générer la réponse de l'hôte contre les virus. Tels que mentionné plus tôt, les TLR3, 7/8 et 9 représentent la sous-famille de récepteurs reconnaissant les acides nucléiques de virus et induisent une réponse aux IFN de type I, particulièrement importante dans la réponse antivirale et qui sera discutée plus loin dans l'introduction de cette thèse (section 1.3).

Tableau I : Les adaptateurs, la localisation membranaire et les ligands des TLRs humains.

TLRs	Adaptateurs	Localisation Membranaire	Ligands
TLR 1	MyD88/Mal	Plasmique	Lipopeptide triacétylé;
TLR2	MyD88/Mal	Plasmique	Lipopeptide di/triacétylé, peptidoglycan, ZYM, porines, LTA, MALP2, HCMV-B, HCMV-H, virion du HSV, virion du Vaccinia virus;
TLR3	TRIF	Endosome	dsRNA synthétique (Poly I :C), dsRNA viral (ARN viral, Reovirus, MCMV, Rhinovirus, Influenza A, West Nile virus);
TLR4	MyD88/Mal/ TRIF/TRAM	Plasmique	LPS, taxol, HSP60, HSP70, fibronectine, VSV-G, RSV-F;
TLR5	MyD88	Plasmique	Flagelline;
TLR6	MyD88/Mal	Plasmique	Lipopeptide diacétylé, ZYM, LTA;
TLR7	MyD88	Endosome	ssRNA synthétique (imiquimode)/virale (influenza A, VSV);
TLR8	MyD88	Endosome	ssRNA synthétique (imiquimode)/virale (HIV);
TLR9	MyD88	Endosome	ADN CpG, ADN déméthylé (HSV-1/2, MCMV);
TLR10	Inconnue	Plasmique	Inconnue;

(Informations provenant des articles de revue suivants : ^{4,7})

Abréviations : dsRNA, ARN double brin; HCMV, *human cytomegalovirus*; HCMV-B, protéine B du HCMV; HCMV-H, protéine H du HCMV; HIV, *human immunodeficiency virus*; HSP, *heat-shock protein*; HSV, *herpes simplex virus*; LPS, lipopolysaccharide; LTA, acide lipotochéique; MALP2, *macrophage-activating lipopeptide 2*; MCMV, *murine cytomegalovirus*; PolyI :C, acide polyinosique-polycytidylique; RSV, *respiratory syncytial virus*; RSV-F, protéine F du RSV; ssRNA, ARN simple brin; VSV, *vesicular stomatitis virus*; VSV-G, protéine G du VSV; ZYM, zymosan;

1.2.1.4 Adaptateurs et voies de signalisation cellulaire

Suite à l'activation des TLRs par la liaison de leurs ligands respectifs, ces récepteurs induisent des voies de signalisation cellulaire. Ce phénomène est contrôlé par le recrutement d'adaptateurs spécifiques couplés à des protéines kinases responsables de l'activation de facteurs de transcription tels que le *nuclear factor-κB* (NF-κB) et les membres de la famille des *IFN regulatory factors* (IRF)s⁴⁰.

Tel que mentionné précédemment (section 1.2.1.3), la reconnaissance des PAMPs par les TLRs induit leur dimérisation. Ceci entraîne un changement conformationnel de leurs domaines TIR respectifs localisés dans la portion intracellulaire des récepteurs, créant une plateforme adéquate pour former des complexes protéiques de signalisation. En effet, les domaines TIRs des TLRs recrutent des adaptateurs, qui possèdent aussi ce type de domaine, en formant des interactions homotypiques TIR-TIR. Ainsi, ces adaptateurs vont à leur tour recruter d'autres molécules afin de permettre une signalisation cellulaire^{37, 40}.

Les différents TLRs induisent une signalisation grâce à 5 protéines adaptatrices : *myeloid-differentiation-88* (MyD88), *MyD88 adaptor-like* (Mal), *TIR-containing adaptor protein inducing IFNβ* (TRIF), *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) et *sterile α- and armadillo motif-containing protein* (SARM) (voir Figure 3). Cet ensemble de protéines se nomme la famille des adaptateurs aux domaines TIR^{37, 40}. Comme les TLRs, ces adaptateurs ont été conservés chez plusieurs espèces. Aussi, la spécificité de chacun des TLRs pour leur(s) adaptateur(s) est indiquée dans le Tableau I. Finalement, les signalisations cellulaires résultantes de l'activation des TLRs peuvent être divisées en deux groupes : MyD88-dépendante et TRIF-dépendante (voir Figure 4). Celles-ci seront développées dans les sous-sections suivantes.

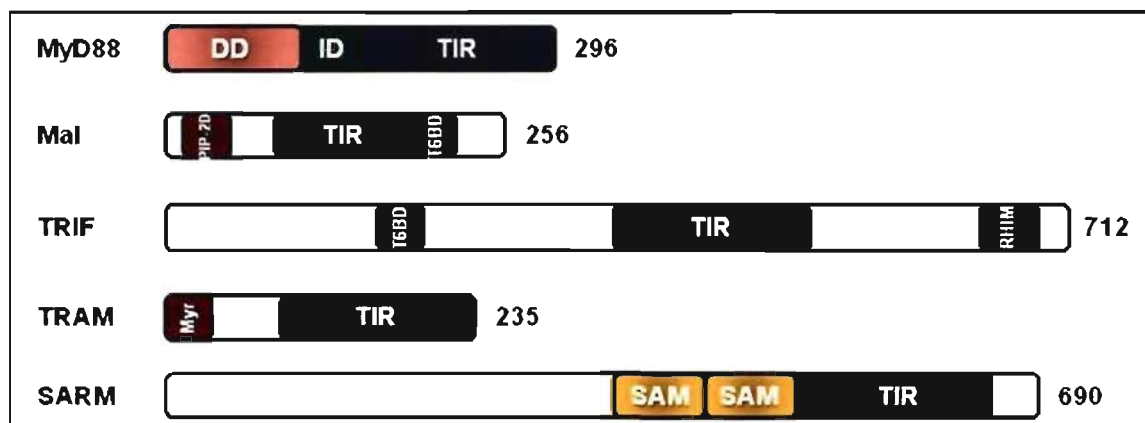


Figure 3 : Représentation schématique de la structure des adaptateurs contenant un domaine TIR.

1.2.1.4.1 MyD88

MyD88 est composé de 296 acides aminés et de trois domaines : un *death domain* (DD) en N-terminal, un domaine intermédiaire (ID) au centre et un domaine TIR en C-terminal (voir Figure 3)^{37, 40}. Il est le premier adaptateur avec un domaine TIR à avoir été identifié et joue un rôle clé pour tous les TLRs, à l'exception de TLR3 et certaines conditions d'activation du TLR4. Son rôle principal est d'activer le facteur de transcription NF- κ B⁴³.

MyD88 s'associe directement (TLR5, TLR7, TLR8 et TLR9) ou indirectement (TLR2 et TLR4) aux domaines TIRs des TLRs *via* son propre domaine TIR⁴⁰. À l'aide de son domaine DD, il interagit avec les protéines kinases *IL-1-associated kinase* (IRAK)-4 et IRAK-1^{37, 40, 44}. Une fois activé, IRAK-4 est phosphorylé et active à son tour IRAK-1, permettant son association avec la protéine *tumor necrosis factor* (TNF) *receptor-associated factor* (TRAF)-6^{37, 40, 45, 46}. Ceci induit l'oligomérisation et l'activation de ce dernier. TRAF6 a une activité E3 ligase qui nécessite les protéines suivantes : *ubiquitin-conjugating enzyme* (Ubc)13 et *ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant* (Uev)-1a⁴⁷. Il

catalyse la synthèse de chaînes d'ubiquitines sur des protéines cibles tels qu'IRAK-1, la protéine *transforming growth factor (TGF)-associated kinase (TAK)-1-binding protein* (TAB)-2 et lui-même⁴⁷⁻⁴⁹. Ainsi, une fois que TRAF6 est activé, il s'autoubiquitine, recrute TAB-2 et l'ubiquitine pour activer TAK-1 (voir Figure 4)⁵⁰. Aussi, TRAF6 induit une polymérisation des molécules d'ubiquitines sur la lysine en position 63 de l'ubiquitine initiale. Cet aspect sera discuté à la section 1.5 de cette thèse.

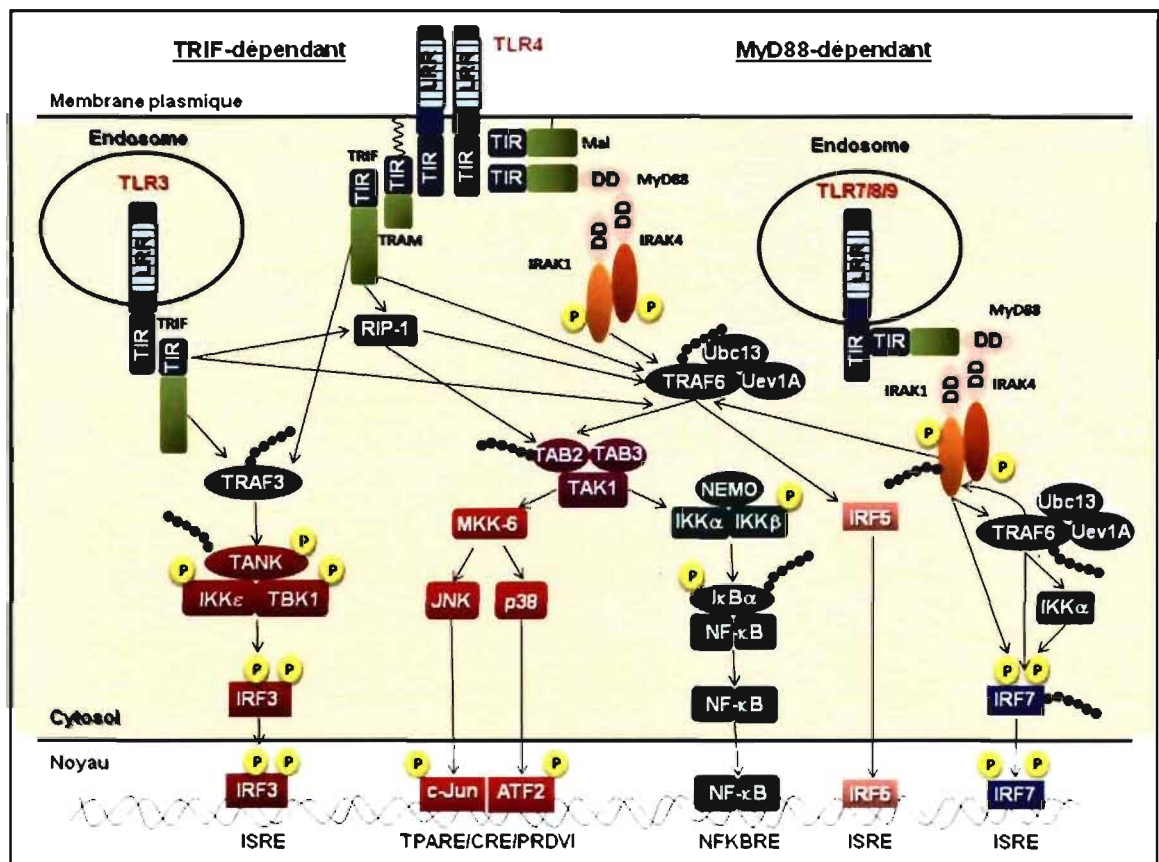


Figure 4 : Voies de signalisation dépendantes de MyD88 et de TRIF induites par les TLRs.

D'une part, une fois que TAK-1 est activé, celui-ci active à son tour le complexe *inhibitor of NF- κ B kinase* (IKK) composé de l'ensemble de protéines IKK α -IKK β -IKK γ (aussi connu sous le nom *NF- κ B essential modulator* (NEMO))⁴⁹. Ce complexe est responsable de la phosphorylation de l'inhibiteur du facteur de transcription NF- κ B nommé *inhibitory κ B* (I κ B). I κ B est constitutivement lié à NF- κ B pour l'inhiber. Suite à sa phosphorylation par le complexe IKK, il est ubiquitiné et dégradé par le protéasome, libérant ainsi NF- κ B. Celui-ci transloque au noyau pour lier des éléments de réponses, active transcriptionnellement des promoteurs et par conséquent, induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires⁵¹. D'autre part, TAK-1 active aussi les protéines kinases *mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase* (MKK)-7 et -3/6 responsables de l'activation respective des protéines kinases *JUN N-terminal kinase* (JNK) et p38, menant à l'activation du facteur de transcription *activator protein* (AP)-1, un hétérodimère composé de *activating transcription factor* (ATF)-2 et de c-Jun (voir Figure 4)^{40, 49, 52}.

Aussi, selon le récepteur activé, MyD88 peut induire l'activation des facteurs de transcription IRF1, IRF5 et IRF7^{40, 53-57}. Ces derniers sont importants pour stimuler la synthèse des IFNs de type I et/ou des cytokines pro-inflammatoires. En effet, dans les cellules pDCs, MyD88 induit l'activation d'IRF7 lorsque les TLRs 7, 8 et 9 ont été activés par la liaison de leurs ligands⁵⁵⁻⁵⁷. Ainsi, IRF7 est recruté au complexe MyD88-IRAK4-IRAK1-TRAF6⁵⁸. Tel qu'expliqué précédemment, la forme active d'IRAK-4 induit la phosphorylation et l'activation d'IRAK-1, qui phosphoryle et active à son tour IRF7. Aussi, TRAF6 s'autoubiquitine et ubiquitine IRAK-1 et IRF7, ce qui régule positivement l'activation d'IRF7^{48, 57}. De plus, la protéine kinase IKK α est activée en aval de Myd88 et TRAF6 et induit également la phosphorylation d'IRF7⁵⁹. Tous ces événements sont essentiels à l'activation d'IRF7, qui est l'inducteur principal des IFN α s pour les cellules pDCs. Dans le cas d'IRF5, celui-ci induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires par les TLRs⁵³. Il est activé et transloque au noyau grâce à son interaction avec MyD88 et TRAF-6 (voir Figure 4). Dans les DC myéloïde (mDC), suite à l'activation des TLRs,

IRF1 s'associe à MyD88 pour transloquer au noyau⁵⁴. Ce dernier induit différents profils de gènes selon le TLR activé.

1.2.1.4.2 Mal

Mal, aussi appelé *TIR-associated protein* (TIRAP), est composé de 256 acides aminés et de plusieurs domaines : un domaine de liaison aux phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) (PIP-2D) en N-terminale, suivi d'un domaine TIR et d'un domaine de liaison à TRAF6 (T6BD) (voir Figure 3)⁴⁰. Il est le second adaptateur avec un domaine TIR à avoir été identifié et joue un rôle important dans la signalisation cellulaire induite par les TLR2 et TLR4⁶⁰. Il sert de pont pour permettre la liaison de MyD88 à ces récepteurs⁶¹. Pour ce faire, suite à la dimérisation des TLRs induite par la liaison de leurs ligands (TLR2-TLR4 ou TLR4-TLR4), Mal est recruté à la membrane plasmique dans les microdomaines de ces récepteurs par son domaine PIP-2D⁶². Son domaine TIR s'associe à celui des TLRs activés. Ainsi, puisque MyD88 ne peut pas lier directement TLR2 et TLR4, il s'associe à Mal, ce qui lui permet d'induire la signalisation cellulaire décrite dans la section précédente (section 1.2.1.4.1) (voir Figure 4).

Aussi, Mal semble avoir d'autres rôles dans la signalisation cellulaire. Tout d'abord, Mal possède un domaine T6BD, ce qui pourrait permettre le recrutement de TRAF6 aux récepteurs activés⁶³. De plus, Mal est phosphorylé sur un résidu tyrosine par la protéine kinase *Bruton's tyrosine kinase* (BTK), une étape importante pour la signalisation des TLR2 et TLR4⁶⁴⁻⁶⁶. Finalement, il a été récemment montré que Mal interagit avec caspase-1 pour se faire cliver et permettre l'activation de NF-κB⁶⁷.

1.2.1.4.3 TRIF

TRIF, aussi appelé *TIR-domain-containing molecule* (TICAM)-1, est le plus gros membre de la famille d'adaptateurs avec un domaine TIR. Il est composé de 712 acides aminés et de plusieurs domaines : un domaine T6BD, un domaine TIR et un domaine *receptor-interacting protein (RIP) homotypic interaction motif* (RHIM) (voir Figure 3) ^{37, 40}. TRIF est responsable de la synthèse des IFNs de types I par les TLR3 et TLR4 car il induit l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et IRF-3/7 de façon indépendante de MyD88 ^{40, 68-71}. D'une part, il est le seul adaptateur nécessaire pour permettre la signalisation du TLR3, un récepteur impliqué dans la détection des structures dsRNA virales. D'autre part, TRIF induit la signalisation de TLR4 par son couplage au récepteur *via* l'adaptateur TRAM, que nous allons discuter dans la prochaine sous-section (section 1.2.1.4.4).

Les voies de signalisation MyD88-dépendante et TRIF-dépendante activées par le TLR4 sont respectivement induites de façon précoce et tardive ^{37, 40}. Tout d'abord, ce récepteur est localisé à la membrane plasmique et une fois qu'il est activé, TLR4 utilise la voie de signalisation MyD88-dépendante pour induire l'activation du facteur de transcription NF- κ B et la synthèse de cytokines pro-inflammatoire. Par la suite, TLR4 est internalisé dans les endosomes et induit une signalisation cellulaire dépendante de l'adaptateur TRIF, ce qui stimule l'activation des facteurs de transcription IRF3/7 et NF- κ B, un évènement important pour l'expression des IFNs de type I ³⁵.

L'activation des TLR3 et TLR4 par la liaison de leurs PAMPs permet le recrutement de TRIF au domaine intracellulaire de ces récepteurs. TRIF s'associe à ces TLRs par une interaction homotypique de leurs domaines TIR respectifs et recrute à son tour des molécules par engendrer une cascade de signalisation cellulaire ^{37, 40}. Tout d'abord, il interagit avec TRAF-6 *via* son domaine T6BP pour induire l'activation de NF- κ B tel que décrite précédemment dans la sous-section de MyD88 (section 1.2.1.4.1) ⁷². Aussi, TRIF lie la protéine *receptor interacting protein* (RIP)-1 grâce à son domaine RHIM

⁷³. Tout comme TRAF-6, RIP-1 permet l'activation du complexe IKK, impliqué dans l'activation de NF- κ B ⁷⁴. Finalement, TRIF active TRAF-3, qui est responsable de l'activation du facteur de transcription IRF3 nécessaire pour l'induction des IFNs de type I ^{75, 76}. Pour ce faire, TRAF-3 s'associe à *TRAF-associated NF- κ B activator* (TANK), une protéine d'échafaudage qui lie également les deux protéines kinases homologues à celles du complexe IKK impliquées dans l'activation de NF- κ B : IKK inductible (IKKi), aussi connue sous le nom IKK ϵ , et *TANK-binding protein* (TBK1), aussi connue sous le nom T2K et *NF- κ B-activating kinase* (NAK) ^{77, 78}. Ainsi, ces sérine/thréonine kinases phosphorylent les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 dans leurs domaines localisés en C-terminal, ce qui leurs permettent de s'homodimériser et/ou hétérodimériser, de transloquer au noyau et de lier des éléments de réponse *IFN-stimulated response element* (ISRE) retrouvés entre autres dans les promoteurs des IFNs de type I (voir Figure 4) ⁷⁹.

1.2.1.4.4 TRAM

TRAM est le plus petit adaptateur. Il est composé de 235 acides aminés et de deux domaines : un site de myristoylation en N-terminal et un domaine TIR en C-terminal (voir Figure 3) ⁴⁰. Il est impliqué dans l'activation de la voie de signalisation dépendante de TRIF par TLR4. Tout comme Mal, TRAM sert de pont pour permettre la liaison de TRIF à TLR4 ⁸⁰. Par son site de myristoylation, TRAM est recruté à la membrane plasmique dans l'environnement du TLR4 qui est activé et permet l'association des domaines TIR de TRAM et TLR4 ⁸¹. Ainsi, TRIF est recruté au TLR4 en liant TRAM et par conséquent, induit l'internalisation de TLR4, le recrutement de TRAF3 et les voies de signalisation décrites dans la section précédente (1.2.1.4.3) (voir Figure 4) ⁸².

1.2.1.4.5 SARM

SARM est un adaptateur composé de 690 acides aminés et de plusieurs domaines : deux domaines *sterile α -motif* (SAM) en tandem et un domaine TIR (voir Figure 3) ^{37, 40, 83}. Il est le cinquième membre de la famille d'adaptateur au domaine TIR à avoir été identifié. Contrairement aux autres membres de cette famille, il n'active pas les facteurs de transcription NF- κ B et IRF3 et inhibe les voies de signalisation dépendantes de TRIF des TLRs ⁸⁴. Pour ce faire, SARM s'associe à TRIF. Le mécanisme d'inhibition n'a pas été caractérisé mais deux possibilités ont été suggérées : -1- SARM séquestre TRIF et prévient son association à ses effecteurs; -2- SARM interagit avec TRIF *via* son domaine TIR pour recruter des protéines inhibitrices ^{37, 40, 84}. Tous les domaines de SARM sont importants pour le rendre fonctionnel. Aussi, le niveau d'expression de SARM est fortement stabilisé suite à un traitement au LPS ⁸⁴.

1.2.2 RLHs

Bien que les TLRs forment un système efficace contre les intrusions microbiennes en induisant une réponse très rapide, ces récepteurs de détection ont une limite majeure, soit leur localisation cellulaire. Ceux-ci se situent aux membranes plasmiques ou aux membranes de compartiments intracellulaires et, par conséquent, ils ne peuvent pas détecter les PAMPs viraux localisés dans le cytosol. D'une part, l'entrée de virus par un processus de fusion de membranes permet la libération de leur génome dans le cytoplasme des cellules. D'autre part, les structures dsRNAs sont des intermédiaires de la réplication virale synthétisés dans le cytosol des cellules hôtes. Dans ces deux situations, les acides nucléiques viraux ne sont pas accessibles aux TLRs, notamment au TLR3 (récepteur des structures dsRNAs). Toutefois, les cellules infectées par ces types de virus produisent des IFNs de type I, des cytokines essentielles pour la génération d'une réponse antivirale efficace, de façon indépendante des TLRs. En effet, il a été montré que des fibroblastes et

des DCs conventionnels (cDCs) qui n'expriment pas MyD88 et TRIF (MyD88^{-/-}, TRIF^{-/-}) ont la capacité d'induire l'expression des IFNs de type I suite à une infection par des virus à ARN, indiquant que le système des TLRs n'est pas requis pour la détection de certains virus⁸⁵. Par conséquent, ces évidences suggèrent l'existence d'un autre mécanisme, qui est indépendant des TLRs, pour détecter les ARNs viraux intracellulaires et induire une réponse antivirale.

C'est en 2004 que le Dr Fujita et son équipe ont identifié *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I), une protéine hélicase d'ARN avec un domaine DExD/H. En effet, cette dernière détecte des structures dsRNAs viraux intracellulaires, ce qui permet l'induction d'une réponse cellulaire par la production d'IFNs de type I et de cytokines pro-inflammatoires.²⁴ Aussi, dans la même année et indépendamment de l'étude précédente, l'équipe du Dr Randall a montré pour la première fois que *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5), aussi connu sous le nom *interferon induced with helicase C domain 1* (IFIH1), était impliqué dans la production des IFNs de type I. Cette protéine avait été initialement connue pour être impliquée dans la régulation de la croissance et de la différenciation des cellules de mélanome. En effet, ce groupe de recherche a montré que la protéine V des paramyxovirus lie la protéine MDA5, inhibant la capacité de cette dernière à induire l'expression de l'IFN β ⁸⁶. Aussi, MDA5 est une protéine *RIG-I-like* car elle possède des domaines homologues à RIG-I. Une analyse du génome humain a permis d'identifier trois protéines hélicases d'ARN avec un domaine DExD/H homologue : RIG-I (aussi connue sous les nom de DDX58), MDA5 et *laboratory of genetics and physiology-2* (LGP-2). Étant donné que ces dernières ont une homologie structurale et fonctionnelle, elles ont été regroupées sous le terme *RIG-I-like RNA helicases* (RLH). Ainsi, suite à une détection virale intracellulaire, les RLHs peuvent initier (RIG-I et MDA5) et/ou réguler (LPG2) la production d'IFN de type I et la réponse antivirale.

1.2.2.3 Distribution cellulaire

Les RLHs RIG-I et MDA5 sont exprimés de façon ubiquitaire dans la plupart des tissus et elles sont inductibles par l'acide rétinoïque, les IFNs et une infection virale^{24, 87, 88}. De plus, LGP2 est une protéine induite par les IFNs, un traitement au dsRNA et une infection au Sendai Virus (SeV)^{89, 90}. Ainsi, cette inductibilité génère une boucle à rétroaction positive pour RIG-I et MDA5, ou négative pour LGP2. Plus précisément, elle génère une amplification/régulation autocrine et paracrine du système de détection du matériel viral intracellulaire et de la réponse antivirale engendrée par les cellules hôtes et environnantes^{24, 88, 91}.

1.2.2.2 Structures

RIG-I et MDA5 partagent une même structure : deux domaines *caspase recruitment domain* (CARD) situés en N-terminal (23% d'homologie) suivi d'un domaine hélicase DExD/H localisé près du C-terminal (35% d'homologie) (voir Figure 5)⁹⁰. Plus précisément, le domaine hélicase de RIG-I contient plusieurs motifs hélicases (I-VI) communs à des protéines hélicases DExD/H^{92, 93}. Suite à une infection virale, les domaines DExD/H et CARD sont respectivement responsables de la détection des acides nucléiques cytoplasmiques et du recrutement de protéines effectrices impliquées dans la signalisation cellulaire importante pour l'induction de l'expression des IFNs de type I. De plus, RIG-I possède un domaine *repressor domain* (RD) à son extrémité C-terminale servant à inhiber sa signalisation. Ainsi, en absence de stimulus d'ARN, RIG-I est latent sous forme de monomère grâce à son domaine RD. Celui-ci s'associe au domaine CARD localisé en N-terminal, ce qui provoque un repliement dissimulant l'exposition et la disponibilité des domaines CARDS et inhibe l'activation des cascades de signalisation cellulaire. La liaison de structure d'ARN induit un changement conformationnel de RIG-I, lui permettant de dimériser et d'interagir avec une protéine adaptatrice *IFN β promoter*

stimulator (IPS-1) *via* leurs domaines CARDS respectifs ⁹². Comme RIG-I, suite à sa liaison avec le dsRNA, MDA5 s'associe à IPS-1 par une interaction homotypique de leurs domaines CARDS. À son tour IPS-1 conduit à l'activation des facteurs de transcription NF-κB et IRF3/7, qui sont importants pour l'expression des IFNs de type I.

LGP2, le troisième membre de cette famille à avoir été identifié et caractérisé, possède un domaine hélicase DExD/H homologue à RIG-I (41%) et MDA5 (31%) à son extrémité amino-terminal (voir Figure 5) ⁹⁰. Cependant, contrairement aux autres membres de cette famille, il ne possède pas de domaines CARD et n'induit pas la production d'IFNs de type I ⁸⁹. De plusieurs façons, LGP2 joue plutôt un rôle inhibiteur dans la production de ces cytokines. En effet, il semble antagoniser les voies de signalisation de RIG-I et MDA5 en séquestrant les structures d'ARN ^{89, 90}. Aussi, à son extrémité C-terminal, LGP2 possède un domaine RD homologue à RIG-I. Par conséquent, ce domaine pourrait lui permettre d'inhiber la dimérisation et l'activation de RIG-I en interagissant avec ce dernier ⁹⁴. Finalement, LGP2 lie le C-terminal d'IPS-1, plus précisément dans la région impliquée dans l'activation de la protéine kinase IKKi ⁹⁵. Cependant, le rôle exact de LGP2 dans l'inhibition de la production des IFNs de type I reste encore peu caractérisé.

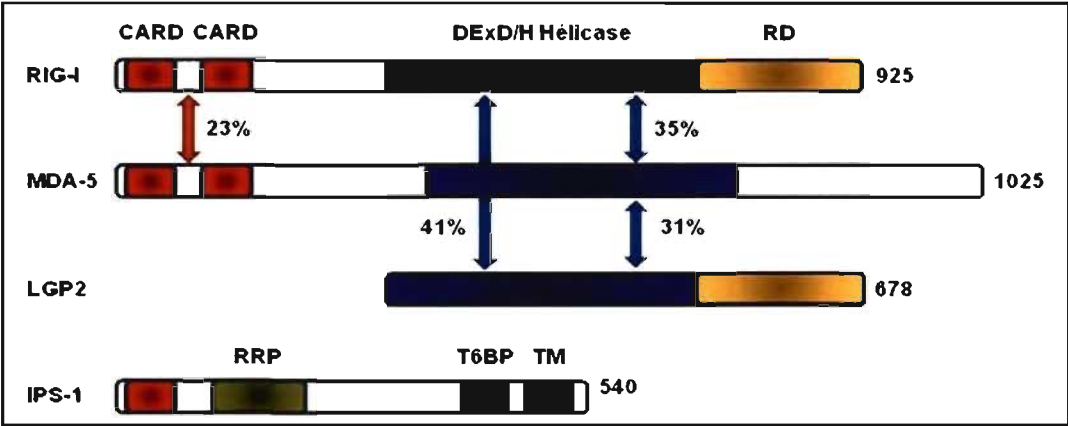


Figure 5 : Représentation schématique de la structure des RLHs et de l'adaptateur IPS-1.

1.2.2.3 Ligands

Initialement, RIG-I et MDA5 ont été identifiés comme étant des détecteurs cytoplasmiques de dsRNAs, plus précisément de l'acide polyinosique-polycytidylique (poly I:C), un analogue synthétique des structures dsRNA virales²⁴. Par la suite, les résultats obtenus par l'utilisation de souris RIG-I^{-/-} ou MDA5^{-/-} ont révélé que MDA5, mais pas RIG-I, est responsable de la réponse induite par un traitement au poly I:C^{23,96}.

Récemment, il a été démontré que ces récepteurs reconnaissent des formes différentes de dsRNA et des ensembles d'ARNs viraux distincts. D'abord, RIG-I reconnaît préférentiellement les ARN simple brin (ssRNA) avec une extrémité 5'-triphosphate (5'PPP-ssRNA) produits par des polymérases virales^{25, 26, 94}. Les ARNs de certains virus sont triphosphorylés sur leur extrémité 5' et non-coiffés alors que les ARNs messagers (ARNms) de l'hôte disposent d'une coiffe en 5'. Par conséquent, RIG-I discrimine les ARNs de virus de ceux des cellules hôtes par les modifications apportées sur leurs extrémités 5'. Ensuite, la longueur de la structure du dsRNA est importante pour la spécificité de reconnaissance de RIG-I et MDA5.

Premièrement, il a été montré que le poly I:C, qui est le ligand de MDA5, peut être converti en ligand de RIG-I lorsque la longueur de ce dsRNA est raccourcie par un traitement à la RNaseIII²². Ainsi, RIG-I et MDA5 reconnaissent respectivement des séquences dsRNA courtes (~1 kbp) et longues (~2 kbp), ce qui permet l'induction une production d'IFN β .

Deuxièmement, des séquences courtes et longues de dsRNAs viraux sont aussi reconnues différemment par RIG-I et MDA5. Puisque le génome du *Reovirus* contient des fragments de dsRNAs de longueurs variables, il a été montré que les longs segments induisent la production d'IFNs de façon dépendante de MDA5 alors que les courts l'induisent de façon dépendante de RIG-I²². De plus, des données récentes indiquent que les ligands d'ARN de RIG-I sont des structures linéaires et contiennent des séquences ribonucléiques riches en résidus uridines et adénosines⁹⁷. Pour finir, RIG-I est essentiel à

la reconnaissance de plusieurs virus incluant les Flavivirus, Orthomyxovirus, Filovirus, Paramyxovirus et Rhabdovirus. De son côté, MDA5 est aussi impliqué dans la reconnaissance de différents sous-ensembles de virus, dont les Picornavirus²³. En résumé, il existe deux motifs moléculaires responsables de la discrimination des structures d'ARNs virales par les hélicases RIG-I et MDA5 : -1- la présence d'une extrémité 5'-triphosphate; - 2- la longueur du duplex d'ARN (dsRNA).

1.2.2.4 Adaptateurs et voies de signalisation cellulaire

Tel que mentionné précédemment (section 1.2.2.2), ce sont les domaines CARDs de RIG-I et MDA5 qui sont responsables de l'initiation des cascades de signalisation. En effet, une fois que les récepteurs ont lié leurs structures d'ARNs respectives, ceux-ci subissent un changement conformationnel leur permettant de dimériser et de s'associer à la protéine adaptatrice IPS-1 par une interaction homotypique CARD.

IPS-1 a été identifié simultanément par quatre groupes de recherche et par conséquent, est aussi connu sous les noms suivants : *CARD adaptor inducing IFN β* (Cardif), *mitochondrial antiviral signaling* (MAVS) et *virus-induced signaling adaptor* (VISA)^{98, 99 100}. À des fins de simplicité, pour le reste de cette thèse, le nom IPS-1 sera utilisé pour référer à cette molécule. Cette protéine est essentielle à l'induction de la réponse par les RLHs. En effet, la surexpression de cette dernière permet une induction des IFN α/β . De plus, les souris n'exprimant pas IPS-1 (IPS-1 $^{-/-}$) présentent un défaut majeur dans la production d'IFN β en réponse à des infections virales activant RIG-I et MDA5¹⁰¹. Ainsi, les fonctions de la protéine adaptatrice IPS-1 sont essentielles pour la signalisation induite par RIG-I et MDA5. Aussi, bien que la nécessité de RIG-I et MDA5 est variable selon le type de virus impliqué dans l'infection, IPS-1 est essentielle pour induire l'activation d'IRF3, la production des IFNs de type I et l'expression des gènes induits par les interférons, soit les *IFN-stimulated gene* (ISG)¹⁰².

IPS-1 est composée de 540 acides aminés et de quelques domaines : un domaine CARD en N-terminale (lui permettant d'interagir avec les domaines CARD de RIG-I et de MAD5), suivie d'une région riche en prolines (RRP), d'un domaine T6BP et à son extrémité C-terminale, un domaine transmembranaire (TM) (lui permettant de s'ancrer à la membrane externe de la mitochondrie) (voir Figure 5) ¹⁰³. Il a été démontré que la localisation d'IPS-1 à la mitochondrie est essentielle à la signalisation de RIG-I ⁹⁹. Par conséquent, l'association de RIG-I à l'adaptateur IPS-1 *via* leur domaine CARD respectif est localisée à la mitochondrie, une nouvelle plateforme pour l'assemblage de complexes de signalisation des PRRs cytoplasmiques et l'induction des IFNs de type I. En outre, l'activation d'IPS-1 semble être régulée par la protéine *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor X1* (NLRX1) également localisée à la membrane externe de la mitochondrie. Cette dernière se fixe au domaine CARD d'IPS-1, ce qui empêche le recrutement de RIG-I et donc, inhibe l'induction des IFNs de type I ¹⁰⁴.

La signalisation des RLHs par IPS-1 nécessite le recrutement de protéines membres de la famille des TRAFs : TRAF3 et TRAF6, respectivement responsables de l'activation des facteurs de transcription IRF3/7 et NF- κ B ¹⁰⁵. D'une part, le domaine RRP d'IPS-1 contient un site de liaison à TRAF3 nécessaire au recrutement de ce dernier, qui est essentiel pour la production des IFNs de type I mais non de l'activation de NF- κ B ⁸⁷. Comme expliqué dans la section de TRIF (1.2.1.4.3), TRAF3 recrute et active un complexe protéique composé de TANK et des deux protéines kinases homologues à celles du complexe IKK classique, soit TBK1 et IKKi ⁷⁸. Ainsi, l'activation de ces dernières conduit à la phosphorylation, à la dimérisation et à la translocation nucléaire des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 (voir Figure 6). D'autre part, IPS-1 possède un domaine T6BP responsable du recrutement de TRAF6, un intermédiaire important pour l'activation du facteur de transcription NF- κ B, tel que décrit précédemment (section 1.2.1.4.1). Ainsi, NF- κ B migre au noyau pour induire l'expression de gènes cibles (voir Figure 6).

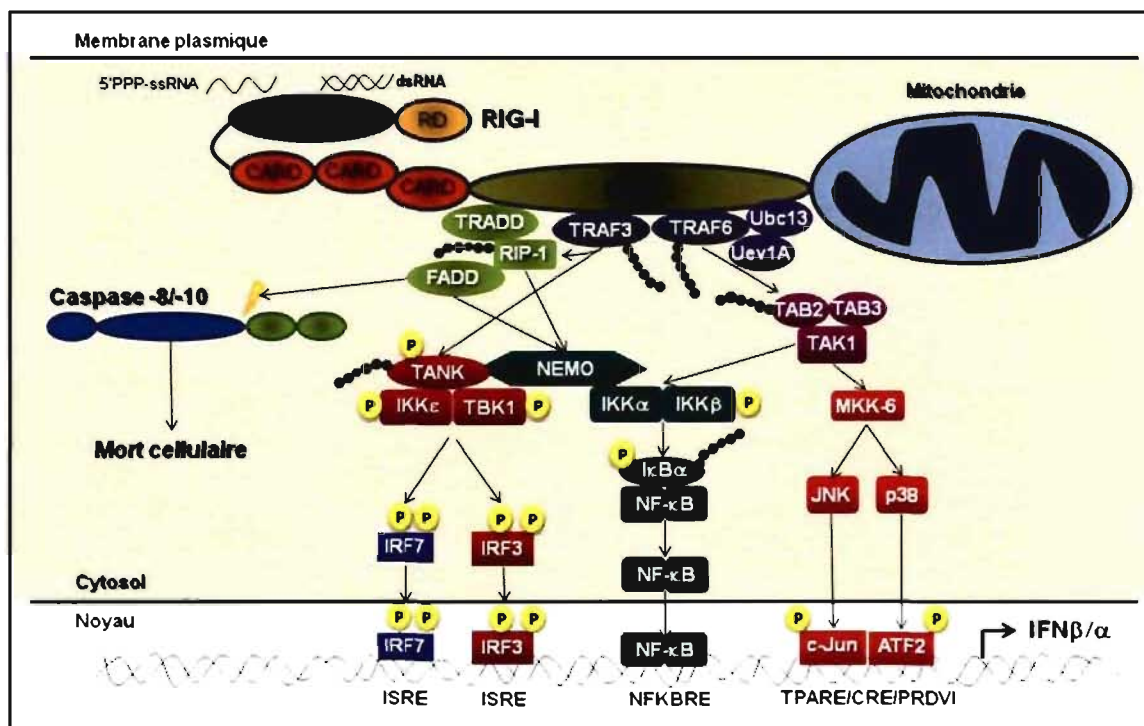


Figure 6 : Voies de signalisation induites par les récepteurs RLHs.

Aussi, une fois activé, IPS-1 recrute la protéine adaptatrice *TNFR-associated death domain* (TRADD), essentielle pour l'induction de l'IFN β par IPS-1¹⁰⁶. Elle orchestre l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et IRF3 par la formation de deux complexes : -1- TRAF3/TANK, en favorisant le recrutement de TRAF3 à IPS-1; -2- RIP1/*Fas association death domain* (FADD). Ainsi, l'association de TRADD à IPS-1 induit l'ubiquitination de RIP1 par TRAF3 et le recrutement de NEMO. Ces 2 événements permettent l'activation du complexe IKK et par conséquent, du facteur de transcription NF- κ B¹⁰⁶. De plus, il a été montré que le recrutement de NEMO à IPS-1 est requis pour permettre l'activation des protéines kinases TBK1 et IKKi et donc, du facteur de transcription IRF3¹⁰⁷. Finalement, IPS-1 recrute les caspases 8 et 10 *via* leur association à FADD, qui est dépendante d'une interaction homotypique de leurs domaines CARD respectifs. FADD active également les facteurs de transcription NF- κ B et IRFs¹⁰⁶.

Pour finir, récemment, deux groupes de recherche ont identifié la nouvelle protéine *mediator of IRF3 activation* (MITA) (aussi connue sous le nom *stimulator of interferon genes* (STING)). Celle-ci serait également impliquée dans l'induction des IFNs de type I lors d'une reconnaissance de séquences d'acide nucléique intracellulaires d'origine pathogénique^{108, 109}. MITA est une protéine adaptatrice possédant 5 domaines transmembranaires à son extrémité amino-terminale. Elle est localisée à la membrane externe de la mitochondrie et celle du réticulum endoplasmique (RE). Suite à une activation de RIG-I par une reconnaissance de structures dsRNA et 5'PPP-ssRNA, RIG-I s'associe et active IPS-1 ancrée à la membrane externe de la mitochondrie. Ensuite, MITA interagit avec RIG-I et IPS-1 au niveau de la membrane mitochondriale, ce qui favorise le recrutement de TBK1 et d'IRF3 à IPS-1. Par la suite, TBK1 phosphoryle MITA sur le résidu sérine 358, ce qui favorise la phosphorylation et l'activation du facteur de transcription IRF3 par TBK1, une étape importante pour l'induction des IFNs de type I. Aussi, MITA semble être importante dans le mécanisme d'induction des IFNs en réponse à des virus à ADN de forme B (ADN-B) de façon indépendante des TLRs. Toutefois, le rôle de cette nouvelle protéine adaptatrice dans l'activation du facteur de transcription NF- κ B est peu caractérisé.

Aussi, la fraction de MITA localisée à la membrane du RE est associée avec le complexe *translocon-associated protein* (TRAP). Cet ensemble protéique facilite la translocation des protéines nouvellement traduites à travers la membrane du RE par le complexe translocon Sec61, qui est également associé au complexe exocyste (complexe octamérique Sec6-Sec8). Finalement, il a déjà été montré que TBK1 lie le complexe exocyste et que ce dernier est impliqué dans la production de l'IFN β ¹¹⁰. Par conséquent, la découverte de MITA suggère un rôle important des protéines ancrées aux membranes mitochondriales et du RE dans la signalisation de l'immunité innée pour induire les IFNs de type I en réponse à différentes classes de virus (à ARN et ADN).

En somme, les signalisations induites par l'activation des RLHs bifurquent vers celles des facteurs de transcription NF- κ B et des IRFs. Il est bien caractérisé qu'IRF3,

IRF7 et NF- κ B sont importants pour l'assemblage du complexe enhancesome, un groupe de facteurs de transcription et de co-activateurs essentiels à l'activation transcriptionnelle du promoteur de l'IFN β , dont nous allons discuter plus loin dans cette thèse (section 1.3.2). Ainsi, IPS-1 est essentiel à la réponse antivirale car il permet l'activation de NF- κ B et des IRFs importants pour la production des IFNs de type I.

1.2.3 DAI

Bien qu'on ait caractérisé la reconnaissance des PAMPs d'acides nucléiques (ARN et ADN) présentés aux membranes plasmiques et de compartiments intracellulaires par les TLRs et des structures d'ARN viraux intracellulaires par les RLHs, aucun détecteur de structures d'ADN virales intracellulaires n'avait été identifié jusqu'en 2006. Toutefois, plusieurs études ont suggéré l'existence d'un senseur d'ADN cytoplasmique (autre que les NLRs) responsable de la production des IFNs de type I^{111, 112}. En effet, les NLRs sont des récepteurs de structures ADNs intracellulaires qui n'ont pas l'habileté d'induire la synthèse des IFNs de type I. D'abord, une administration d'ADN synthétique intracellulaire induit l'expression des IFNs de type I de façon dépendante des protéines kinases TBK1 et IKKi¹¹¹. De plus, des infections par le virus herpes simplex (virus à ADN) et par des bactéries comme *Listeria monocytogenes* et *Legionella pneumophila* induisent la production des IFNs de type I de façon indépendante des TLRs et des NLRs, ce qui suggère l'implication d'un senseur d'ADN cytoplasmique inconnu^{58, 111, 112}. Pour finir, l'entrée cytoplasmique de structures d'ADN double brin (dsDNA) stimule une réponse immunitaire de façon indépendante de TLR9¹¹³⁻¹¹⁵.

C'est en 2007 que le groupe de recherche du Dr Taniguchi propose un candidat détecteur d'ADN cytoplasmique provenant de sources diverses nommé *DNA-dependent activator of IRFs* (DAI), initialement connu sous les noms DLM-1 et *Z-DNA-binding protein* (ZBP1)¹¹⁶⁻¹¹⁸. En effet, il a été montré que cette protéine interagit avec de l'ADN

via un domaine de liaison et induit la production d'IFNs de type I. Aussi, une autre équipe de recherche suggère l'existence d'autres récepteurs de structure d'ADN intracellulaire ¹¹⁹.

1.2.3.1 Distribution tissulaire et cellulaire et localisation cellulaire

L'ARNm de DLM-1 est exprimé dans plusieurs tissus tels que la rate, le thymus, les poumons, le foie et le cœur ¹¹⁷. DLM-1 est induit dans les cellules stromales tumorales et dans les macrophages suite à une stimulation à des IFNs de type II (IFN γ) ¹¹⁷. Aussi, il a été démontré que ce gène est inductible par un traitement aux IFNs de type I ¹¹⁶. En effet, une analyse de séquence a montré la présence de séquences typiques des éléments de réponse *IFN-stimulated responsive element* (ISRE) (motif reconnu par les facteurs de transcription IRFs) et *IFN γ -activated site* (GAS) dans la région 5' du promoteur du gène *DLM-1*. De plus, l'ARNm de DAI est régulé par la signalisation induite par certains PAMPs tels que l'ADN-B, le LPS et le *IFN-stimulatory DNA* (ISD) (un oligonucléotide de 45 pb stimulant la production d'IFNs de type I) ^{112, 116, 117}. Ainsi, comme les détecteurs d'ARN cytoplasmique RIG-I et MDA5, DAI est un gène induit par les IFNs, formant une boucle à rétroaction positive afin de s'assurer d'une activation robuste du système immunitaire.

Enfin, étant donnée sa fonction (senseur d'ADN intracellulaire), DAI est localisé majoritairement dans le cytoplasme. Cependant, de façon diffuse, ce détecteur se retrouve partiellement dans des granules ¹¹⁶.

1.2.3.2 Structure

DAI est composé de 429 acides aminés et de plusieurs domaines de liaison à l'ADN: deux domaines de liaison à l'ADN de forme Z (ADN-Z) nommés Z α et Z β et un autre domaine de liaison à l'ADN, possiblement de forme B nommé D3 (voir Figure 7).

Une étude récente montre que le domaine D3 est essentiel pour la liaison du ligand contrairement aux domaines $Z\alpha$ et $Z\beta$. Cependant, les trois domaines sont importants pour permettre le recrutement du facteur de transcription IRF3 et par conséquent, une induction de l'ARNm de l'IFN β ¹²⁰. Ce groupe de recherche suggère que l'interaction du domaine D3 avec l'ADN induit un changement conformationnel de DAI, rendant ainsi les deux autres domaines ($Z\alpha$ et $Z\beta$) accessibles pour lier l'ADN. La liaison de ces derniers est dépendante du changement engendré par la liaison du ligand au domaine D3. L'interaction des trois domaines de liaison à l'ADN permet une association stable entre DAI et son PAMP, ce qui lui permet d'activer des voies de signalisation cellulaires (voir Figure 8).

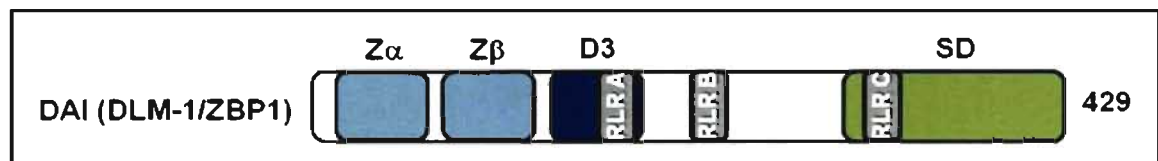


Figure 7 : Représentation schématique de la structure de DAI (DLM-1/ZBP1).

Aussi, DAI possède un domaine de signalisation (SD) peu caractérisé et localisé à son extrémité C-terminale (voir Figure 7). Cette région permet une association et une activation des protéines TBK1 et IRF3, importantes pour l'induction des IFNs de type I¹¹⁶. Étant donnée la découverte récente de ce détecteur d'ADN cytosolique, plusieurs paramètres restent à être étudiés afin de comprendre le rôle de cette protéine et ses mécanismes d'activation et de régulation.

Pour finir, DAI possède trois séquences d'acides aminés similaires aux domaines RHIM retrouvées dans les protéines RIP1, RIP3 et TRIF. Elles ont été nommées *RHIM-like repeat* (RLR) A, B et C (voir Figure 7). RLR A est le seul motif à permettre l'association des protéines RIP1 et RIP3. Ces dernières activent le facteur de transcription NF- κ B responsable de l'induction des IFNs de type I par DAI. De plus, RLR A est localisé

dans le domaine de liaison à l'ADN D3 et RLR C, dans le domaine de liaison de TBK1 et d'IRF3 (SD) ¹²¹.

1.2.3.3 Ligands

DAI reconnaît différentes structures d'ADN : ADN-Z synthétique (acide poly(2'-deoxyguanyle-2'-deoxycytidylrique) (poly (dG-dC) · poly (dG-dC))), ADN-B synthétique (acide poly(deoxyadenylique-thymidylique) (poly(dA-dT) · poly(dT-dA))), de bactéries (*Escherichia coli*), d'un extrait du génome de mammifère (thymus de bovin) et de virus (*vaccinia virus*) ^{116, 120}. Ces liaisons induisent toutes une production d'IFNs de type I dépendante de DAI. De plus, ce détecteur cytoplasmique induit une réponse plus importante contre de l'ADN-B que de l'ADN-Z. Pour finir, la production de l'IFN β induite par DAI est dépendante de la longueur du segment de l'ADN cytoplasmique, c'est-à-dire que plus la longueur est importante, plus la réponse est forte ¹²⁰.

1.2.3.4 Voie de signalisation cellulaire

Certaines évidences suggèrent qu'IRF3 est le facteur de transcription majeur impliqué dans l'induction des IFNs de type I en réponse à de l'ADN cytosolique alors qu'IRF7 est un coopérateur partiel d'IRF3 ¹¹⁶. En effet, la production d'IFN β et la synthèse de l'ARNm de l'IFN- α 4 induites par un traitement à l'ADN-B sont sévèrement affectées lorsque l'expression d'IRF3 est abolie (*mouse embryonic fibroblasts* (MEF) IRF3 $-/-$). Par contre, suite à un même traitement, l'abolition de l'expression d'IRF7 (MEF IRF7 $-/-$) n'affecte pas la production de l'ARNm de l'IFN β et n'affecte que partiellement celui de l'IFN- α 4. Dans cette optique, la voie de l'induction des IFNs de type I déclenchée par l'ADN cytoplasmique semble distincte de celle induite par le TLR9 (un récepteur d'ADN extracellulaire) car ce dernier induit une production des IFNs strictement dépendante d'IRF7.

Bien qu'il reste beaucoup de travail à faire afin de bien comprendre les mécanismes de régulation de l'induction des IFNs de type I par l'ADN cytoplasmique détecté par DAI, un mécanisme à été proposé. Lorsque l'ADN est exposé dans le cytoplasme, DAI interagit d'abord avec ces séquences *via* sa région D3. Subséquemment, ceci engendre un changement de conformation de DAI et entraîne le resserrement du complexe DAI-ADN grâce aux domaines $Z\alpha$ et $Z\beta$. Ce complexe stable permet une oligomérisation/multimérisation de DAI et un faible recrutement de TBK1 et d'IRF3. La phosphorylation de DAI par TBK1 sur les résidus sérines 352/353 amplifie le recrutement de TBK1 et d'IRF3, ce qui induit la phosphorylation et la dimérisation d'IRF3, des modifications importantes pour son activation et par conséquent, l'induction des IFNs de type I (voir Figure 8) ^{116, 120, 121}.

DAI active aussi le facteur de transcription NF- κ B. Cependant, aucun mécanisme n'a été clairement identifié pour expliquer cette voie de signalisation. Une fois que DAI est activé par la liaison de séquences d'ADN cytoplasmiques, son motif RLR A est responsable du recrutement des protéines RIP1 et RIP3. La protéine RIP1 est essentielle pour l'activation de NF- κ B et l'induction des IFNs de types I par DAI. Aussi, la liaison de RIP3 augmente les effets de RIP1. Finalement, l'activation du facteur de transcription NF- κ B par RIP1 stimulé par DAI est dépendante de l'activité de la protéine kinase IKK β et non pas de TBK1 (voir Figure 8) ¹²¹.

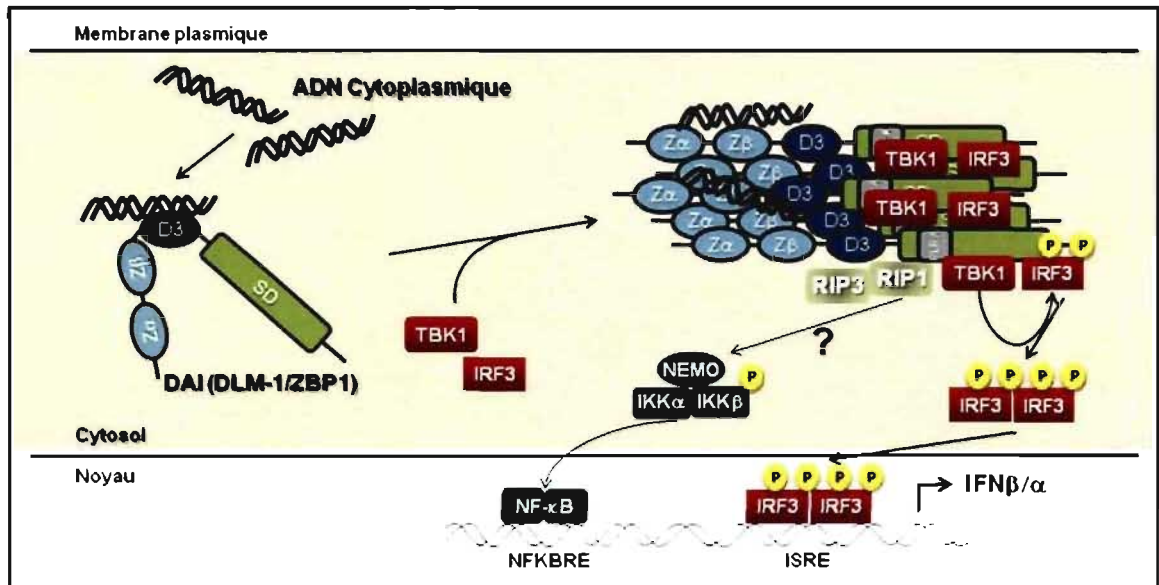


Figure 8 : Modèle d'activation de DAI et de ses voies de signalisation.

La plupart des PRRs de signalisation impliqués dans la reconnaissance de virus (tels que TLR3, TLR 7, TLR 8, TLR9, RIG-I, MDA5 et DAI) induisent la synthèse des IFNs de type I importants pour contrer l'infection. Par conséquent, le prochain chapitre de cette introduction discutera de cette grande famille de cytokines et plus particulièrement des IFNs de type I. Ainsi, la famille des IFNs sera présentée par leur classification et ensuite, les IFNs de type I seront approfondis par la présentation du promoteur de l'IFN β , la séquence d'évènements permettant leur induction, leurs rôles et fonctions, ainsi que la présentation de certains gènes induits par ces derniers.

1.3 Interférons

Les interférons appartiennent au système d'immunité innée et sont essentiels à la défense de l'hôte contre les infections microbiennes. C'est en 1957 qu'Isaacs et

Lindenmann observent qu'un milieu extracellulaire de cellules infectées par un virus confère une résistance à des cellules naïves contre l'infection par ce même pathogène. Ils expliquent ce phénomène par la présence d'une substance protectrice contenue dans le milieu de culture des cellules initialement infectées. Ainsi, ils nomment cette molécule «interféron» car elle a pour rôle d'interférer avec la diffusion et la multiplication du virus¹²². Depuis ce temps, il est maintenant reconnu que les interférons constituent la première ligne de défense contre l'invasion, la multiplication et l'expansion des pathogènes (virus, bactéries et parasites) en générant une protection rapide des cellules infectées et de leurs voisines. Aussi, ils forment une grande famille de cytokines et possèdent plusieurs autres activités telles qu'antiproliférative, pro-apoptotique et immuno-modulatrice.

1.3.1 Classification

Les interférons forment une grande famille de cytokines. Selon leurs récepteurs membranaires et les effets engendrés par cette liaison ligand-récepteur, ils sont classés en trois catégories : type I (IFN β/α s), type II (IFN γ) et type III (IFN λ).

Tout d'abord, les IFNs de type I sont composés de plusieurs membres : IFN α , IFN β , IFN ω , IFN ϵ , IFN κ , IFN τ et IFN ζ . Chez l'humain, il existe 13 IFN- α s et un seul IFN β , IFN ω , IFN ϵ , ou IFN κ ^{123, 124}. Il existe plus d'une quinzaine de gènes encodant pour les différents sous-types d'IFNs de type I, tous dépourvus d'introns à l'exception de l'IFN κ et sont regroupés sur le chromosome 9 humain. Certains sont exprimés seulement dans un tissu spécifique tel que l'IFN κ (kératinocyte) et l'IFN ϵ (ovaire)¹²⁵. Chez les animaux, le nombre d'IFNs de type I exprimés est variable. En effet, certains n'en expriment qu'un seul, tel que l'IFN ζ chez le porc et l'IFN τ chez les ruminants alors que la souris n'exprime pas l'IFN ω . Par contre, les IFN α s et l'IFN β sont présents chez tous les mammifères. De plus, les IFN- α s et l'IFN ω sont exprimés essentiellement dans les leucocytes et l'IFN β , par la plupart des cellules de l'organisme et plus particulièrement par les fibroblastes.

Finalement, ces interférons sont des cytokines très conservées au cours de l'évolution et les représentants majeurs de cette sous-famille sont les IFN α s et l'IFN β ^{123, 126}. Ces derniers sont induits très rapidement et jouent un rôle primordial dans la réponse de l'hôte contre les infections par des pathogènes et plus particulièrement des virus. Dans ce contexte, l'IFN β est le premier sous-type à être induit et à son tour, engendre l'amplification de la réponse contre le pathogène en stimulant la synthèse des IFN α s. Aussi, ces cytokines possèdent également d'autres propriétés très importantes telles qu'antiproliférative, pro-apoptotique et immuno-modulatrice, lesquelles seront développées dans la section 1.3.5 ^{126, 127}.

Ensuite, les IFN de type II ne sont composés que d'un seul membre, soit l'IFN γ . Ce gène est localisé sur le chromosome 12 humain et est exprimé dans les cellules activées du système immunitaire comme les leucocytes, les cellules présentatrices d'antigènes (APC), les cellules B et les cellules NK ¹²⁸⁻¹³². Ce type d'interféron est induit par la sécrétion des IL-12 et IL-18, selon le type cellulaire impliqué. Bien que la première fonction identifiée pour l'IFN γ soit son activité antivirale, son rôle majeur est sa contribution à activer et réguler les réponses immunitaires innée et adaptative. Ainsi, il possède plusieurs fonctions : -1- augmenter la quantité et la diversité des peptides présentés à la surface des cellules par des molécules *major histocompatibility complex* (MHC) de classe 1; -2- favoriser la présentation de peptides par des molécules MHC de classe 2 et ainsi, promouvoir l'activation des cellules T CD4+; -3- participer à la réponse de cellules Thp1 (c'est-à-dire l'activation des cellules NKs et des macrophages et l'interaction entre les cellules T et APC); -4- réguler les fonctions des cellules B. Finalement, l'IFN γ induit l'expression d'effecteurs pro-apoptotiques et d'inhibiteurs de la prolifération et de la croissance cellulaire ¹³³.

Pour finir, les IFNs de type III, aussi nommés IFN λ s, ont été découverts très récemment et sont composés des IL-28A, IL-28B et IL-29 ^{134, 135}. Les gènes sont localisés sur le chromosome 19 humain ¹³⁴. Bien qu'il y ait une grande analogie entre les IFNs de type I et III, c'est-à-dire qu'ils régulent des groupes de gènes similaires et partagent des

fonctions communes (antivirale et pro-apoptotique), ces deux classes de cytokines possèdent des séquences avec seulement 20% d'homologie et induisent leurs effets par des récepteurs différents ¹³⁶. La différence entre ces deux familles est expliquée par la spécificité d'expression de leurs récepteurs dans les tissus. En effet, la réponse aux IFN λ s semble restreinte aux cellules épithéliales contrairement aux IFN β/α s, qui sont générés par la plupart des tissus ^{137, 138}.

Puisque le contexte de ce projet de thèse est la réponse précoce de l'immunité innée suite à des infections par des pathogènes, nous nous sommes strictement intéressés aux processus intracellulaires impliqués dans la production des IFNs de type I et plus précisément, les IFN β/α s. Par conséquent, la suite de cette section discutera strictement de ce type d'IFN.

1.3.2 Présentation de l'enhanceosome de l'IFN β

Étant donné le rôle primordial de l'IFN β , celui-ci constitue le modèle d'IFN le mieux caractérisé jusqu'à maintenant. Dans des conditions normales, un nucléosome formé des histones H3 et H4 est localisé et cache le site de départ de la transcription du gène de l'IFN β , ce qui inhibe son induction transcriptionnelle ¹³⁹. Par contre, sa synthèse est induite très rapidement suite à une infection par un pathogène ¹⁴⁰. En effet, la reconnaissance des PAMPs par les PRRs des cellules hôtes stimule des cascades de signalisation importantes pour induire des modifications post-traductionnelles responsables de l'activation de facteurs de transcription, notamment NF- κ B, les IRF3 et IRF7 et le complexe ATF-2/cJun (AP-1) (section 1.2). Ces derniers sont importants pour l'activation transcriptionnelle du promoteur de l'IFN β ^{123, 141-144}. Le promoteur de l'IFN β est composé de quatre domaines à régulation positive, nommés *positif regulatory domain* (PRD) et ceux-ci sont reconnus de façon spécifique par les facteurs de transcription présentés précédemment (voir Figure 9) ^{144, 145}.

Tout d'abord, le domaine PRDII est reconnu et activé par le facteur de transcription NF- κ B. Dans des conditions normales, celui-ci est présent sous forme inactive et de latence dans le cytoplasme de la cellule, lié à son inhibiteur I κ B α . Suite à la reconnaissance des PAMPs par les PRRs, le complexe IKK, composé des protéines sérine/thréonine kinases IKK α et IKK β et de la protéine adaptatrice IKK γ (aussi connu sous le nom de NEMO), phosphoryle I κ B α et par conséquent, entraîne son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Cet évènement induit la libération de NF- κ B, sa translocation et son accumulation nucléaire afin de lier des éléments de réponse localisés dans les promoteurs, notamment la séquence PRDII du promoteur de l'IFN β ¹⁴⁴.

Ensuite, le domaine PRDIV est reconnu par le complexe ATF-2/c-Jun. En effet, lors d'une infection, les protéines sérine/thréonine kinases de stress, les *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) p38 et JNK sont activées ¹⁴⁶. Celles-ci phosphorylent et activent respectivement les facteurs de transcription ATF-2 et c-Jun localisés dans le compartiment nucléaire. Ceux-ci s'hétérodimérisent pour former le complexe ATF-2/c-Jun (aussi appelé AP-1) et migrent au noyau pour fixer et activer l'élément de réponse PRDIV du promoteur de l'IFN β ^{143, 146, 147}.

Pour finir, les domaines PRDI et PRDIII sont reconnus et activés par les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 ^{141, 142, 148, 149}. IRF3 est exprimé dans tous les types cellulaires de façon constitutive et est essentiellement localisé dans le cytoplasme sous forme de latence alors qu'IRF7 est exprimé très faiblement grâce à une expression basale et constante de l'IFN β ¹⁵⁰. Ainsi, suite à une infection, l'activation des protéines sérine/thréonine kinases TBK1 et IKKi permet la phosphorylation et l'initiation de l'activation de ces facteurs de transcription. Ainsi, IRF3 s'homodimérise ou s'hétérodimérise avec IRF7, migre au noyau où il interagit avec ses co-activateurs, les histones acétyltransférases (HAT) *cAMP responsive element (CRE)-binding protein (CREB)-binding protein (CBP)/p300*. Cette association permet la séquestration d'IRF3 dans le compartiment nucléaire et ensuite, ce complexe lie les éléments de réponse PRDI et

PRDIII pour activer le promoteur de l'IFN β ^{141, 151-154}. Aussi, il a été démontré que le facteur de transcription IRF1 est capable d'activer de façon significative les éléments de réponse PRDI et PRDIII ¹⁵⁵⁻¹⁵⁷.

Une fois que ces facteurs de transcription sont activés (NF- κ B, ATF-2/c-Jun (AP-1) et IRF3/7), ceux-ci sont associés et fixés de façon coopérative au niveau du promoteur de l'IFN β afin de former un complexe nucléoprotéique très structuré appelé enhanceosome (voir Figure 9). Cet assemblage est effectué par la famille des protéines HMGI(Y) ¹⁵⁸⁻¹⁶². Par la suite, la protéine HAT *general control nonderepressible 5* (CGN5), en conjugaison avec CBP/p300, acétyle certains résidus lysines des histones H3 et H4 du nucléosome initialement responsable de l'inhibition de la transcription du gène. Cette modification facilite le recrutement du complexe protéique *Brahma-related gene* (BRG)-*Brahma* (BRM)-*associated factor* (BAF), responsable de déplacer le nucléosome du site de départ de la transcription. Pour finir, cet évènement permet l'association du facteur TFIID au promoteur, une étape essentielle pour l'induction de l'expression du gène de l'IFN β ^{139, 163}.

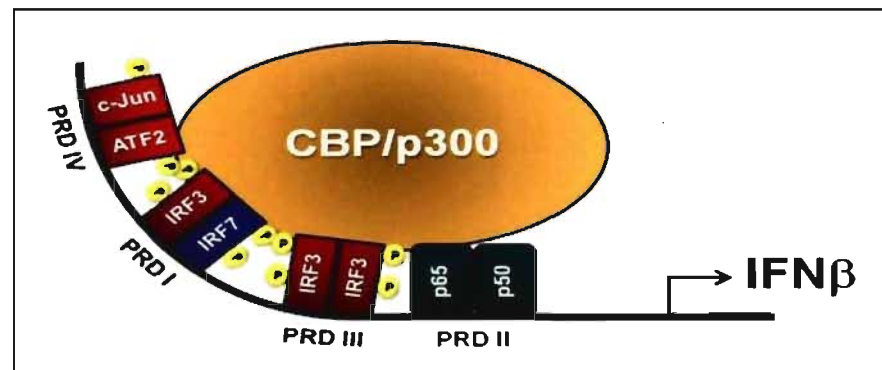


Figure 9 : Présentation de l'enhanceosome du promoteur de l'IFN β .

1.3.3 Induction biphasique des IFN β et IFN α s

L'induction de la production des IFNs de type I est un système de boucle à rétroaction positive. Lors d'une infection virale, cette expression se produit en deux phases : -1- la phase précoce (ou inductrice) est la génération d'une première vague d'IFNs spécifiques, soit l'IFN β et l'IFN α 1 (ou IFN α 4 chez la souris); -2- la phase tardive (ou amplificatrice) est l'amplification de la production des IFNs de type I induite par l'activation des récepteurs IFNARs des IFNs de la première phase ¹⁶⁴.

La phase précoce est initiée par les cellules infectées par le virus. Ces dernières reconnaissent les PAMPs viraux *via* leurs PRRs (TLR3, TLR4, RLHs) localisés dans la plupart des types cellulaires. Tel qu'expliqué dans la section précédente (1.3.2), cette détection induit l'activation de ces récepteurs et engendre des cascades de signalisation intracellulaires menant à l'activation, *via* des processus de phosphorylation très rapide, des facteurs de transcription NF- κ B, AP-1 et IRF3/7. Ceux-ci s'assemblent pour former l'enhancesome de l'IFN β et induire la synthèse des IFN β/α s (voir Figure 10). Par conséquent, cette première vague d'induction s'effectue très rapidement car elle ne requiert pas la synthèse de protéines.

Une fois synthétisé, l'IFN β est sécrété par les cellules hôtes. De façon autocrine et paracrine, celui-ci lie et active son récepteur membranaire IFNAR localisé à la surface des cellules infectées et naïves avoisinantes, ce qui induit le commencement de la phase tardive. À son tour, le récepteur IFNAR génère des cascades de signalisation conduisant à l'expression de plusieurs gènes appelés *IFN-stimulated genes* (ISG) ^{165, 166}. Ceux-ci sont importants pour exercer les multiples fonctions des IFNs et seront développés dans les sections 1.3.5 et 1.3.6. Par ailleurs, parmi ces ISGs, le facteur de transcription IRF7 est important pour générer la deuxième vague de production des IFNs de type I. En effet, il reconnaît les éléments de réponse PRD-*like* localisés dans les promoteurs de tous les IFN α s et ainsi, IRF7 induit l'expression de ces derniers ¹⁶⁴. Ainsi, les cellules stimulées à l'IFN β sont en état d'alerte car lorsqu'elles sont exposées à leur tour à l'agent pathogène, tous les

IFN α s sont synthétisés (grâce à l'expression d'IRF7) et sécrétés pour communiquer l'information à d'autres cellules avoisinantes (voir Figure 10). Finalement, cette deuxième phase d'induction des IFNs est plus lente car elle nécessite la synthèse de protéines, notamment du facteur de transcription IRF7 et de l'IFN β ¹⁶⁴.

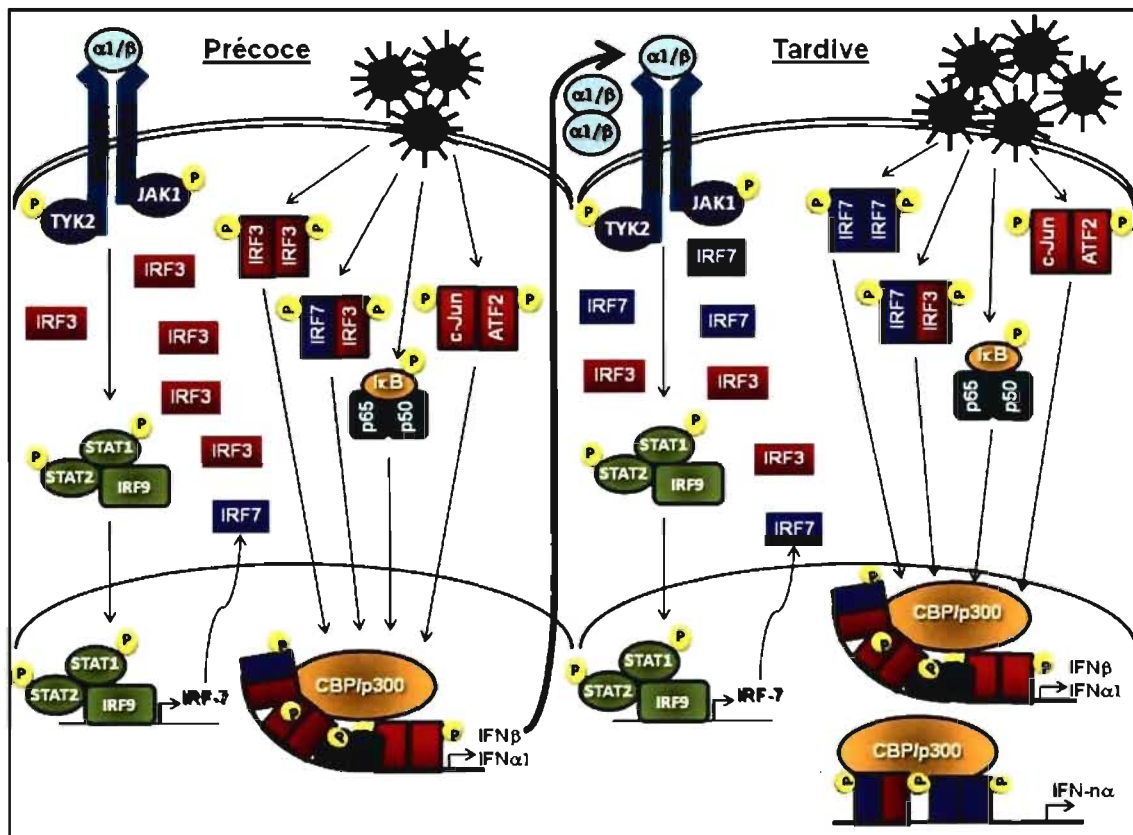


Figure 10 : Modèle d'induction biphasique des IFNs de type I.

Bien que l'expression de l'IFN β s'effectue de façon très rapide grâce à la présence constitutive et ubiquitaire (notamment dans l'épithélium) de son régulateur majeur, le facteur de transcription IRF3, il a été suggéré qu'une synthèse très puissante de cette cytokine implique également l'expression initiale très faible du facteur de transcription

IRF7^{164, 167, 168}. En effet, celle-ci est assurée par une expression constitutive et basale de l'IFN β ¹⁵⁰. Ainsi, lors de la première vague de synthèse des IFNs de type I, IRF3 (présent naturellement) et IRF7 (faiblement exprimé) s'homodimérisent et/ou s'hétérodimérisent pour induire une synthèse plus imposante de l'IFN β . Ainsi, les cellules exposées à l'IFN β expriment de façon plus massive IRF7, responsable de la stimulation forte des IFN α s par sa liaison aux éléments de réponse *PRD-like* localisés dans leurs promoteurs¹⁶⁹. Par conséquent, l'exposition de ces cellules à l'agent pathogène induit une variété et une quantité imposante d'IFNs de type I (voir Figure 10).

1.3.4 Récepteurs et signalisation cellulaires

Une fois synthétisés et sécrétés par les cellules hôtes, les IFNs de type I ont la propriété de stimuler de façon autocrine et paracrine les cellules avoisinantes, sensibles à ces derniers. En effet, celles-ci expriment à leur surface le récepteur de ces cytokines nommé IFNAR. Ce dernier fait partie de la grande famille des récepteurs à activité tyrosine kinase. Il est composé de deux sous-unités glycoprotéiques : IFNAR1 et IFNAR2. Chacune possède un domaine extracellulaire responsable de la liaison des ligands, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire responsable de la liaison des protéines effectrices lorsque le récepteur est activé. La sous-unité IFNAR2 est retrouvée sous trois formes : -1- une forme soluble composée uniquement du domaine extracellulaire dont les effets sont dominant négatifs; -2- une forme transmembranaire courte nommée IFNAR2-1 ou β S, dont le domaine cytoplasmique est court; -3- une forme transmembranaire longue nommée IFNAR2-2 ou β L, qui est le récepteur entier^{170, 171}. Les trois isoformes proviennent d'un même gène dont l'ARNm subit un épissage alternatif.

Les sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque. Cependant, la liaison des IFN α/β induit la dimérisation des sous-unités IFNAR1 et IFNAR2, qui recrutent à leur domaine cytoplasmique respectif les protéines

tyrosine kinases Tyk2 et *janus kinase 1* (JAK1)¹⁷². Ainsi, ces protéines kinases se retrouvent à proximité l'une de l'autre et subissent une série d'autophosphorylations et de transphosphorylations nécessaires pour leur activation. Aussi, elles induisent la phosphorylation des glycoprotéines IFNAR1 et IFNAR2. La phosphorylation d'IFNAR1 sur son résidu tyrosine 466 permet l'association de la protéine *signal transducer and activator of transcription* (STAT)2 via son domaine *Src homology region* (SH2). Puisque STAT2 est situé près des protéines kinases Tyk2 et JAK1, à son tour, il se fait phosphoryler sur la tyrosine 690 et recrute STAT1 au récepteur, qui se fait aussi phosphoryler sur la tyrosine 701. Une fois que STAT2 et STAT1 sont phosphorylés, ces protéines s'associent ensemble afin de former un hétérodimère pour lier à la protéine IRF9 (aussi connue sous le nom de p48 ou *ISG factor* (ISGF)3 γ) et former le complexe transcriptionnel ISGF3. IRF9 fait partie de la grande famille des IRFs dont nous allons discuter un peu loin dans cette thèse (section 1.4).

Par l'intermédiaire de son domaine de liaison à l'ADN, IRF9 lie des séquences d'ADN *IFN-stimulated response element* (ISRE) présentes dans certains promoteurs des ISGs et active la transcription de nombreux gènes, notamment du facteur de transcription IRF7 (voir Figure 11)¹⁷². Par ailleurs, le domaine de liaison à l'ADN d'IRF9 est un motif très conservé chez tous les membres des IRFs et ainsi, ces derniers reconnaissent tous les motifs ISRE. Par conséquent, puisqu'IRF3 et IRF7 sont activés très rapidement par les PRRs pour stimuler la synthèse des IFNs de type I, ces facteurs de transcription induisent également certains ISGs de façon indépendante de la signalisation induite par le récepteur IFNAR (section 1.4.3).

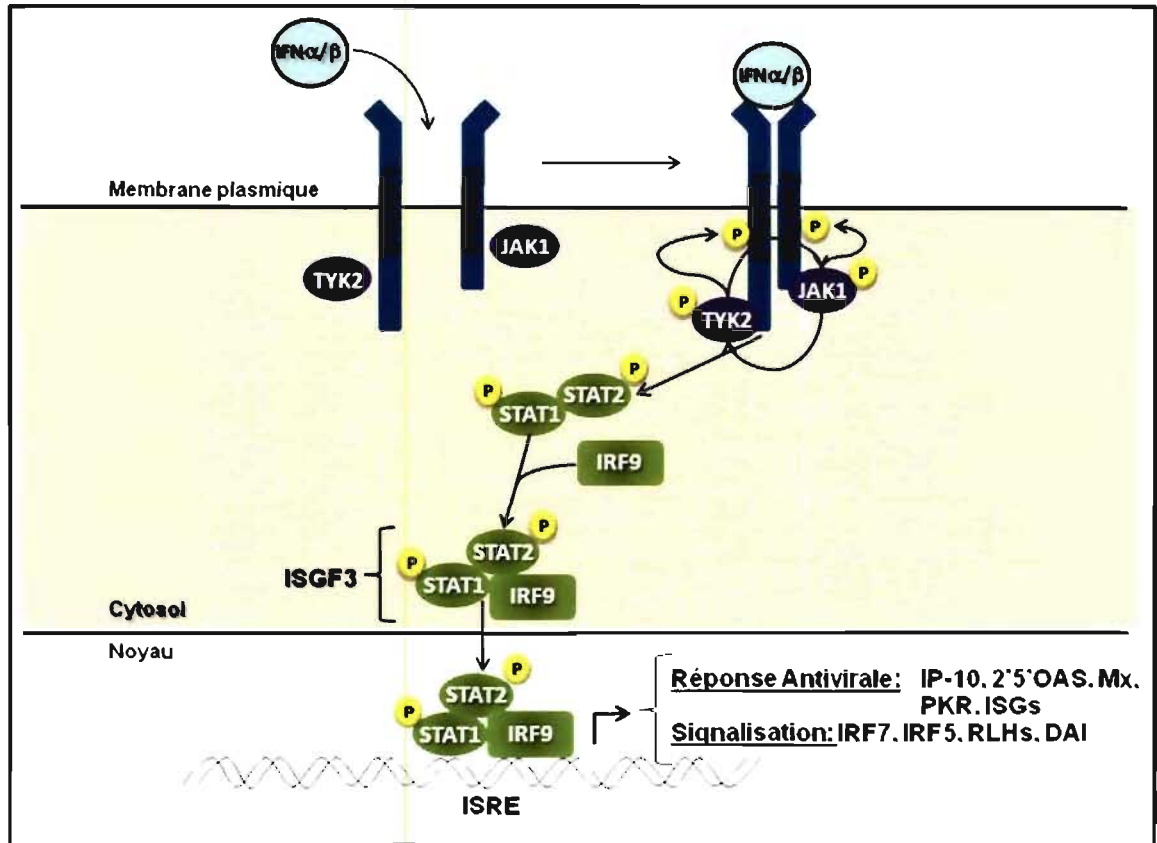


Figure 11 : Voie de signalisation induite par les IFNs de type I.

De plus, les IFNs de type I ont aussi la capacité d'induire la formation d'autres complexes STATs : -1- les homodimères STAT1-STAT1, STAT3-STAT3, STAT4-STAT4, STAT5-STAT5 et STAT6-STAT6; -2- les hétérodimères STAT1-STAT2, STAT1-STAT3, STAT1-STAT4, STAT1-STAT5, STAT2-STAT3 et STAT5-STAT6. Ces différents complexes ont la capacité de fixer des éléments de réponse *IFN-γ-activated site* (GAS) aussi localisés dans les promoteurs des ISGs¹⁷³⁻¹⁷⁷.

Parmi tous les ISGs induits par les IFNs de type I (> 200 gènes), certains possèdent seulement des éléments ISRE ou GAS dans leur promoteur alors que d'autres ISGs

possèdent les deux. Les différentes combinaisons ainsi que les différents complexes STATs impliqués permettent une spécificité des gènes induits^{165, 166, 174-179}.

1.3.5 Rôles et fonctions des IFN β/α

La réponse immunitaire innée engendrée par une infection virale repose principalement sur la production et la réponse des IFNs de type I, dont les représentants majeurs sont l'IFN β et les IFN α s. Ce sont des gènes induits suite à la reconnaissance et à la liaison des PAMPs viraux par les PRRs des cellules hôtes et ils n'ont pas une fonction intrinsèque antivirale. Par contre, puisque ce sont des cytokines, ils servent de médiateur afin de communiquer de façon autocrine et paracrine et de propager un signal d'intrusion aux cellules environnantes des cellules infectées. Cet avertissement permet aux cellules hôtes et naïves d'exprimer des effecteurs antiviraux afin de se préparer à contrer et décimer l'infection virale (voir Figure 12).

Les gènes induits en réponse aux IFNs de type I, c'est-à-dire à l'activation du récepteur IFNAR, sont désignés *IFN-stimulated genes* (ISG) et il en existe plus de 200^{165, 166, 180, 181}. Tout d'abord, comme expliqué précédemment (section 1.2), certains de ces gènes sont impliqués dans l'induction des IFNs de type I (IRF7, RLHs, DAI, certains IRFs, etc.), ce qui crée une boucle à rétroaction positive de signalisation intracellulaire activée par le pathogène (voir Figure 11). Aussi, parmi ces gènes, on retrouve les IFN α s (section 1.3.4). Par conséquent, les IFNs de type I ont la faculté de s'amplifier. Finalement, d'autres gènes ont plutôt une activité antivirale (voir Figure 11). Des exemples de ces ISGs et leurs fonctions antivirales seront développés dans la prochaine sous-section (1.3.6).

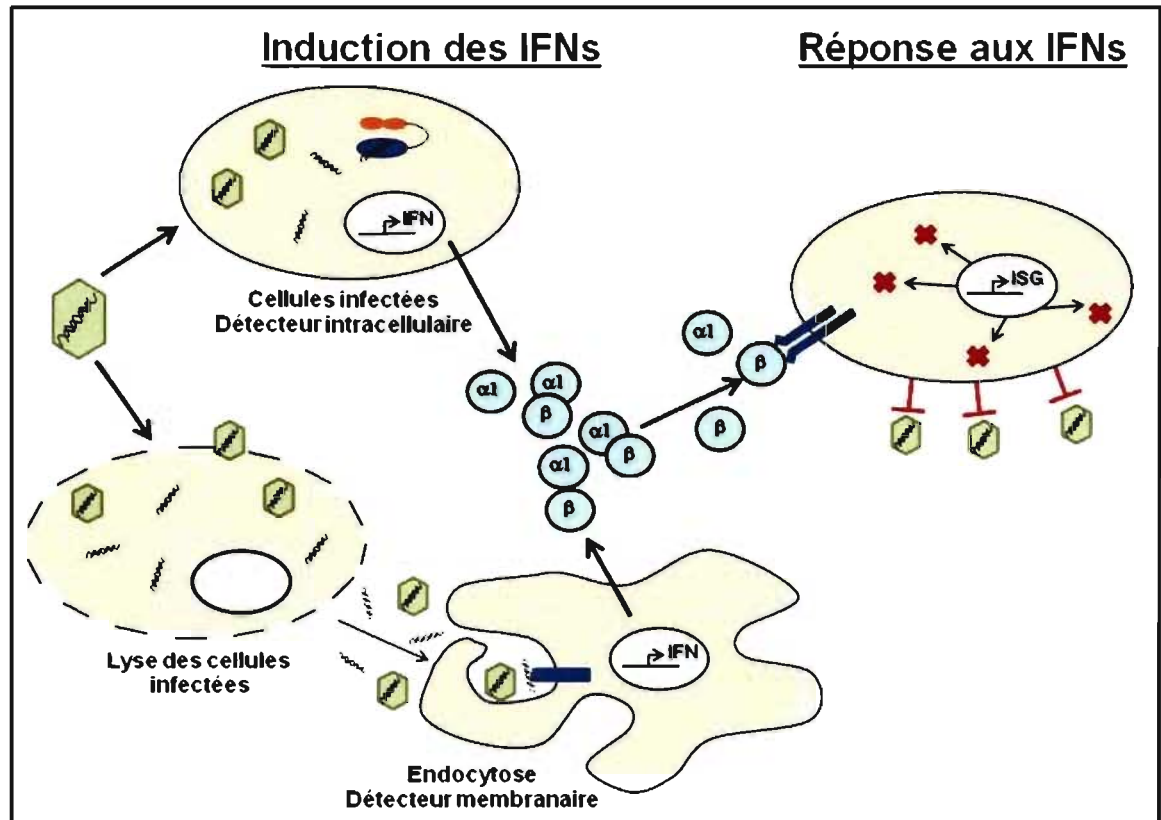


Figure 12 : Induction et rôle des IFNs de type I suite à une infection virale.

Outre leurs propriétés antivirales, les IFN β/α s modulent la réponse immunitaire adaptative afin de répondre de façon plus adéquate contre l'agent pathogène en plus d'avoir des activités antiprolifératives.

Tout d'abord, ce sont les inducteurs majeurs de l'activation des cellules DC immatures. Ceci mène à la promotion de l'expression des protéines MHC de classe 1, de chimiokines, des récepteurs de chimiokines et des molécules de co-stimulation. D'une façon efficace, ces effecteurs permettent une migration aux organes lymphoïdes secondaires et une réponse des cellules T CD4⁺ ou CD8⁺. La maturation des cellules DC induite par les IFN β/α s permet également l'activation et la maturation des cellules T CD8⁺ contre la cible virale. Aussi, les IFN β/α s permettent la conservation et le maintien des

cellules T CD4+ et CD8+ activées et augmentent leur prolifération. De plus l'activation adéquate des cellules T CD8+ naïves semble dépendante de la chimiokine *IFN γ inducible protein 10* (IP-10) et de son récepteur CXCR3, tous les deux induits par les IFN β/α . Finalement, les IFN β/α induisent la cytotoxicité des cellules NKs et l'activation de la prolifération clonale des cellules B^{126, 182}. Ainsi, les IFNs de type I sont primordiaux pour limiter l'infection initiale d'un pathogène et permettre la communication et par conséquent, la transition entre l'immunité innée et adaptative de l'hôte.

Ensuite, les effets antiprolifératifs et proapoptotiques des IFN β/α sont associés à une variété de changements moléculaires. D'une part, ils répriment l'expression de plusieurs protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire (cycline D3, cycline E, cycline A et cdc25A). Ainsi, ceci engendre une réduction de l'activité des protéines cyclines et des protéines kinases dépendantes des cyclines, ce qui supprime la phosphorylation de la protéine pRB et ralentit la progression en phase S des cellules. D'autre part, ils stimulent la synthèse de plusieurs molécules proapoptotiques : Fas/FasL, p53, Bax, Bak, *X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-associated factor-1* (XAF-1) et *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL). Ils induisent aussi l'activation des pro-caspases 8 et 3^{126, 127}.

Étant donné le large spectre d'activités biologiques des IFN de type I, ceux-ci sont utilisés dans le traitement de certaines maladies virales (hépatite B et C et des infections aux cytomégalovirus, herpes zoster et HSV) et de nombreux cancers (leucémie, myelome, lymphome, mélanome, carcinome rénale et le sarcome de karposi)¹²³. Ils sont aussi de potentiels adjuvants pour des infections virales et des cancers¹⁸³.

1.3.6 ISGs

Le traitement des cellules aux IFNs de type I induit l'activation de la transcription de plus de 200 gènes nommés les ISGs^{165, 166}. Parmi ces gènes, certains participent à

l'amplification de la signalisation induite pour contrer et décimer l'infection du pathogène comme IRF7, RIG-I, MDA5 ou DAI, qui ont été longuement discutés dans les sections précédentes. Aussi, d'autres contribuent aux effets antiviraux, antiprolifératives et immuno-modulatrices des IFNs. De plus, certains ISGs sont induits de façon indépendante de l'activation du récepteur IFNAR, soit directement par le facteur de transcription IRF3.

Le rôle majeur des IFNs de type I et par conséquent, la fonction prépondérante des ISGs, est d'induire un état antiviral chez les cellules sensibles. Il existe plusieurs mécanismes, dont voici les exemples les mieux caractérisés : la protéine kinase *dsRNA-dependant kinase* (PKR), les protéines Mx, l'olygoadénylate synthétase (OAS) et la famille de P56.

1.3.6.1 PKR

La protéine PKR est une enzyme avec une activité sérine/thréonine kinase. Elle possède deux sites de liaison aux structures dsRNA nommés *dsRNA-binding protein* (DRBD) à son extrémité N-terminale, un domaine kinase dans sa portion C-terminale et un domaine central nécessaire au fonctionnement adéquat de son domaine kinase¹⁸⁴.

La PKR est exprimée faiblement de façon basale et est induite fortement suite à un traitement aux IFNs de type I. Dans des conditions normales, elle est localisée dans le cytoplasme sous forme de monomère. En présence de dsRNA, PKR lie ces structures et subit un changement conformationnel, ce qui active son domaine kinase. Ainsi, PKR se transphosphoryle et s'homodimérise *via* son domaine DRBD, une étape essentielle pour son état d'activation. Une fois activée, PKR phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α sur le résidu sérine 51 et par conséquent, inhibe la traduction des ARNm viraux et cellulaires. Aussi, PKR active le facteur de transcription NF- κ B par son interaction avec les TRAFs (2 et 5) et induit la formation de l'apoptosome (Apaf-

l/cytochrome c/caspase-9) par son association avec FADD ¹⁸⁴. Ces deux événements induisent une dégradation de l'ADN et par conséquent, induisent aussi l'apoptose.

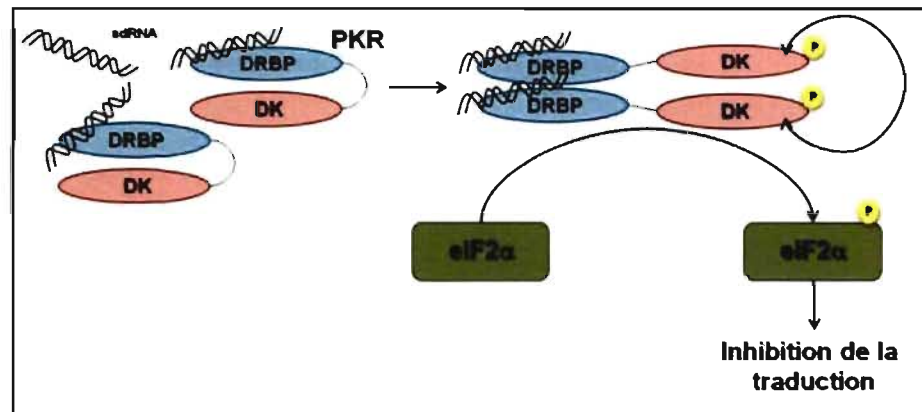


Figure 13 : Activation de PKR et inhibition de la traduction.

1.3.6.2 OAS

L'oligoadénylate synthétase (OAS) existe sous plusieurs formes dont les poids moléculaires varient (40/46, 69/71 et 100 kDa) grâce à l'expression de gènes distincts ou à un mécanisme d'épissage alternatif. Aussi, les deux plus petites formes peuvent également générer deux autres sous-types par épissage alternatif. Chacune de ces isoenzymes possède un nombre différent de domaines répétitifs : p40 et p46 possèdent un seul domaine, les protéines p69 et p71, deux et p100, trois. Aussi, afin d'assurer leur activité catalytique, ces différentes formes s'associent. Ainsi, les formes p40 et p46 s'associent pour former des tétramères alors que les formes p69 et p71 forment un dimère. Finalement, la forme de p100 reste monomérique ¹⁸⁵.

L'OAS est exprimé à des niveaux variables basaux et sa synthèse est induite très fortement par les IFNs de type I. Son activité peut être localisée dans le cytoplasme et le noyau. Elle est activée par des séquences dsRNA et certains ssRNA, dont la structure

tridimensionnelle s'apparente à celle des dsRNA. Une fois que l'OAS lie les motifs RNAs, celle-ci catalyse la polymérisation de l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) en oligoadénylate lié en 2'-OH-5' (2',5' oligo A). Ces séquences d'oligonucléotides activent la protéine endonucléase latente RNaseL, qui est exprimée de façon constitutive dans les cellules. Ainsi, la RNaseL dimérise et dégrade les structures ssRNA virales et de la cellule hôte. Par conséquent, il y a une inhibition de la multiplication virale et cellulaire ^{180, 181, 185}.

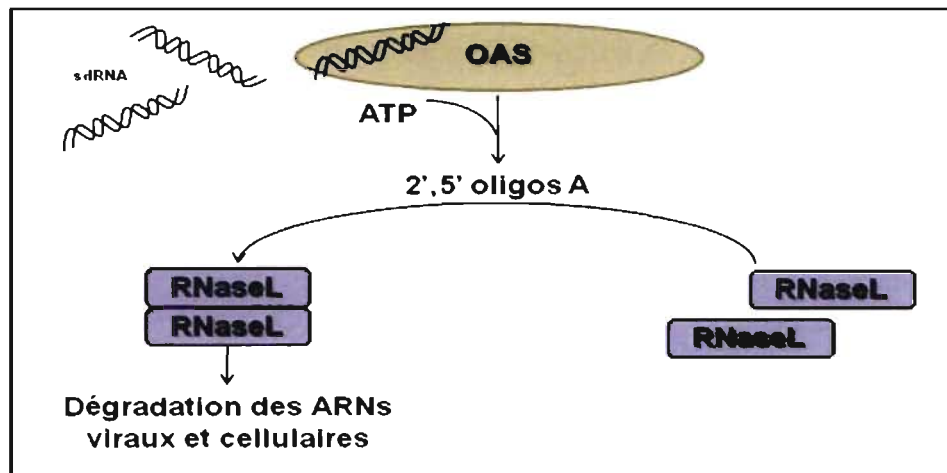


Figure 14 : Activation de l'oligoadénylate synthétase (OAS) et dégradation des ARNs viraux et cellulaires.

1.3.6.3 Mx

Les protéines Mx sont uniquement induites par les IFN β/α s. Chez l'humain, il existe deux formes de protéines Mx : MxA et MxB. Elles sont localisées dans le cytoplasme des cellules, et des analyses par microscopie suggèrent une liaison de MxA à des membranes intracellulaires ¹⁸⁶. Ces protéines appartiennent à la grande famille des guanosine triphosphatase (GTPase) apparentées aux dynamines ¹⁸⁷. Ces dernières possèdent trois domaines indispensables pour leur activité antivirale : un motif tripartite

localisé sur l'extrémité amino-terminale (servant à la fixation et l'hydrolyse de la molécule guanosine-5'-phosphate (GTP)), deux séquences d'acides aminés basiques localisés dans la portion C-terminale (dont la structure s'apparente au *leucine zipper*) et un domaine central (important pour des interactions intra- et intermoléculaires avec les structures *leucine zipper* des protéines Mxs)¹⁸⁶.

MxA a pour fonction de séquestrer des composantes virales nécessaires à la réplication et ce, dans le cytosol, par des processus d'homopolymérisation. Ainsi, la protéine MxA semble pouvoir inhiber un large spectre de virus à ARN comme les orthomyxovirus, paramyxovirus, rhabdovirus et bunyavirus (des virus à ARN monocaténaire à polarité négative), togavirus, et picornavirus. Aussi, elle inhibe la réplication du virus de l'hépatite B, un virus à ADN qui possède un stade de réplication sous forme d'ARN¹⁸⁷. Par contre, la protéine MxB ne semble pas avoir d'activité antivirale¹⁸⁶.

1.3.6.4 La famille p56

L'expression de la protéine p56, issue du gène *ISG56*, est fortement et rapidement induite par les IFNs de type I, des structures dsRNA et plusieurs virus. Aussi, l'activation transcriptionnelle de son promoteur est régulée par le facteur de transcription IRF3. De plus, l'induction de p56 est transitoire et les demie-vies de son ARNm et de sa protéine sont très courtes. Chez l'humain, il existe trois autres membres à cette famille de protéines dont la structure est très similaire : p60, p58 et p54. La marque de cet ensemble de protéines est la présence de plusieurs motifs tétratricopeptides (TPR) qui génèrent des interactions protéine-protéine nécessaires pour permettre plusieurs fonctions¹⁸⁰.

Généralement cytoplasmique, p56, aussi connu sous le nom *interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1* (IFIT1), a la capacité de bloquer la traduction et par conséquent, la synthèse protéique. En effet, p56 inhibe le facteur d'induction de la traduction eIF3 en interagissant avec sa sous-unité p48^{180, 181}.

1.3.6.5 ISG20

ISG20 est une exonucléase 3'-5' qui est induite par les IFN β / α s et les structures dsRNA et qui a pour fonction de dégrader les structures ssRNA ^{180, 188}.

Tel que développé au cours de ce dernier chapitre, l'expression des IFNs de type I est hautement régulée par les facteurs de transcription IRF3 et IRF7. Toutefois, IRF3 demeure le régulateur majeur de l'induction de la transcription de l'IFN β , le premier sous-type à être induit pour ensuite permettre la synthèse des autres membres du même type. Par conséquent, IRF3 est un facteur clé dans la réponse antivirale engendrée par une cellule infectée. Ainsi, la famille des facteurs de transcription IRFs sera présentée dans le prochain chapitre et discutera principalement d'IRF3, en y décrivant sa structure, son mécanisme d'activation, les gènes qu'il régule, les mécanismes de régulation de son activité et son implication dans des processus pathologiques.

1.4 Les IRFs

La découverte de la famille des facteurs de transcription *IFN regulatory factors* (IRF) a révolutionné le monde de la recherche sur l'immunité et l'oncogenèse. En 1988, les premiers membres ont été découverts. En effet, IRF1 et IRF2 ont été identifiés comme étant respectivement des régulateurs positifs et négatifs du système d'induction de l'IFN β ^{155, 156}. Par la suite, plusieurs protéines avec une structure similaire à IRF1 ont été identifiées, constituant maintenant la famille des IRFs ^{168, 189-191}.

La famille des facteurs de transcription IRFs est composée de 9 membres : IRF1, IRF2, IRF3, IRF4 (aussi connu sous les noms *prolactin induced protein* (PIP) ou *Interferon Consensus Sequence binding protein for Activated T cells* (ICSAT)), IRF5, IRF6, IRF7,

IRF8 (aussi connu sous le nom de *IFN consensus sequence binding protein* (ICSBP)) et IRF9 (aussi connu sous les noms ISGF3 γ et p48). Aussi, un isoforme IRF10 a été identifié chez le poulet, mais pas chez l'humain et la souris¹⁹². Ces protéines sont caractérisées par certains domaines communs.

Tout d'abord, ces protéines partagent un domaine de liaison à l'ADN (DBD) très conservé et localisé dans leur portion amino-terminale (voir Figure 15). Ce motif est composé d'environ 120 acides aminés et caractérisé par une signature particulière, la répétition de cinq résidus tryptophanes. Celle-ci a une ressemblance notable avec le facteur de transcription Myb^{190, 191, 193}. Aussi, ce DBD des IRFs est une structure d'hélice-boucle-hélice et reconnaît des séquences d'ADN similaires, les motifs ISRE (5'-A/GNGAAANNGAAACT-3') identifiés dans les promoteurs des gènes IFNs de type I et ceux induits par ces derniers¹⁹⁴. Des analyses de cristallographie ont révélé qu'IRF1 et qu'IRF2 interagissent avec l'ADN en reconnaissant spécifiquement les séquences 5'-GAAA-3' et 5'-AANNGAAA-3'^{190, 195, 196}. La séquence ISRE est maintenant retrouvée dans plusieurs autres gènes impliqués dans l'immunité et l'oncogenèse¹⁹⁷.

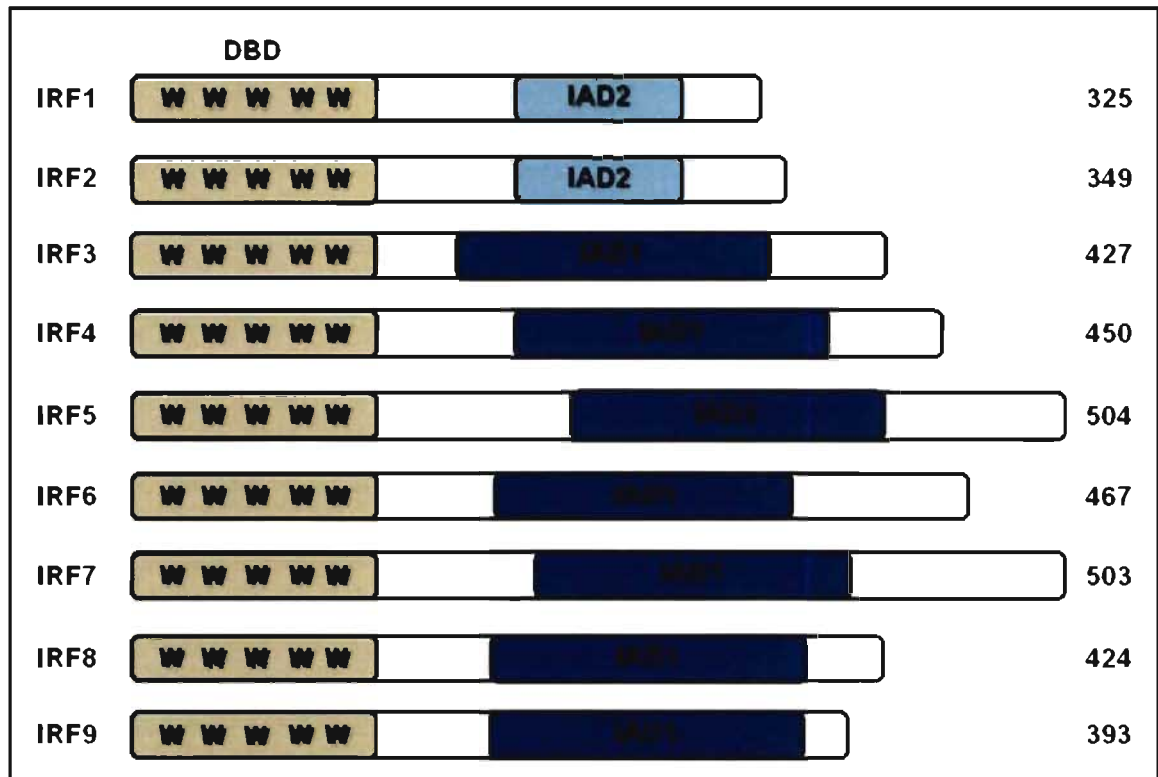


Figure 15 : Schéma des structures et domaines conservés des IRFs.

Ensuite, la région carboxy-terminale des IRFs varie parmi les membres et est responsable de leurs effets biologiques. En plus de leur potentiel intrinsèque de se transactiver, certains IRFs ont la capacité de s'homodimériser et s'hétérodimériser avec un autre membre de cette famille (comme par exemple IRF3 et IRF7) ou encore, de s'associer avec un autre facteur de transcription (comme par exemple l'association d'IRF9 avec STAT1 et STAT2). De plus, leurs activités transcriptionnelles varient, menant à une activation ou à une répression (et parfois les deux) de l'expression de gènes cibles. Ce phénomène s'explique par l'identité des partenaires associés aux IRFs. Ces interactions sont possibles grâce à deux types de domaines d'association localisés dans leur région C-terminale : -1- le domaine *IRF associated domain* (IAD) 1, conservé chez tous les IRFs à l'exception des IRF1 et IRF2; -2- IAD2, retrouvé seulement dans les séquences d'IRF1 et

d'IRF2 (voir Figure 15). Malgré leur faible homologie de séquence, le domaine IAD1 partage une structure similaire au domaine *Mad-homology 2* (MH2) de la famille des facteurs de transcription Smad, également responsable de permettre des interactions entre protéines^{198, 199}. Dans la plupart des cas, cette interaction augmente l'habileté des IRFs à lier leur séquence d'ADN, tel que les séquences ISRE (exemple : IRF9 et STAT1/2)^{189, 190}.

Bien que certains IRFs sont exprimés essentiellement dans les cellules hématopoïétiques, d'autres sont exprimés de façon ubiquitaire (voir Tableau II)¹⁸⁹. Aussi, la plupart de ces facteurs de transcription sont des gènes induits suite à différents stimuli, à l'exception d'IRF3, qui est synthétisé de façon constitutive et prêt à être activé rapidement par un signal¹⁸⁹. Ces informations font d'IRF3 un candidat très intéressant. Pour finir, depuis les vingt dernières années, différentes études réalisées ont montré l'importance des fonctions remplies par ces IRFs. Effectivement, l'analyse des différents gènes induits par chacun d'entre eux révèle une versatilité des rôles joués par cette famille (voir les exemples de gènes induits dans le Tableau II)^{189, 197}. Ceux-ci ont des charges centrales et distinctes dans le développement de la réponse immunitaire et dans la différenciation des cellules hématopoïétiques.

Tableau II : Distribution, conditions d'expression et inducteurs des IRFs et exemples de gènes induits par les IRFs.

IRFs	Distribution et Expression	Inducteurs	Gènes cibles
IRF1	Ubiquitaire; Constitutive et inductible;	IFN γ , IFN α/β , IL-1, etoposide;	NOS2, GBP1, gp91 ^{PHOX} , IL12, IL- 15, TAP1, LMP2, CDKN1A, caspase 1;
IRF2	Ubiquitaire et constitutive;	IFN γ , IFN α/β ;	ISGs (ex. : OAS, PKR, IRF7)
IRF3	Ubiquitaire et constitutive;	–	IFN β , IFN α 1, ISG56, CXCL9, IP- 10, CCL5;
IRF4	Cellules hématopoïétiques; Constitutive et inductible;	Anti-CD3, anti-IgM, anti- CD40, ConA, PMA, HTLV- 1-Tax, GM-CSF, IL-4, c-rel;	IL-4, GATA3, IGK, CD23;
IRF5	Ubiquitaire; Constitutive et inductible;	IFN α/β , polyI :C, adriamycin, irinotecan;	IL-6, IL-12, TNF, NFKB1K, CXCL2;
IRF6	Exprimé au niveau de la peau;	–	
IRF7	Ubiquitaire; Constitutive et inductible;	IFN α/β , TNF- α , etoposide;	IFN β et IFN α ;
IRF8	Cellules hématopoïétiques; Constitutive et inductible;	IFN γ , IFN α/β ;	IL-12, IL-18;
IRF9	Ubiquitaire; Constitutive et inductible;	IFN γ , IFN α/β ;	ISGs (ex. : OAS, PKR, IRF7)

(Informations provenant des articles de revue suivants : ^{189, 197}.)

Abréviations: CCL, *CC-chemokine ligand*; CDKN1A, *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*; ConA, *concanavaline A*; CXCL, *CXC-chemokine ligand*; GATA3, *GATA-binding protein 3*; GBP1, *guanylate-binding protein 1*; GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; gp91^{PHOX}, *glycoprotein 91 (phagocyte oxidase)*; HTLV-1 Tax, *human T cell lymphotropic virus Type 1 transactivator Tax*; IFN, *interféron*; IGK, *immunoglobulin κ light chain*; IL, *interleukine*; IP-10, *IFN γ inducible protein 10*; ISG, *IFN-stimulated genes*, LMP2, *low-molecular-mass protein 2*; NOS2, *nitric-oxide synthase 2*; IRF, *IFN regulatory factor*; NFKB1K, *inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B)- ζ* ; OAS, *oligoadénylate synthétase*, PKR, *dsRNA-dependant kinase*; PMA, *phorbol myristate acetate*; TAP1, *transporter associated with antigen processing 1*; TNF- α , *tumor necrosis factor*;

Par conséquent, à la lumière des fonctions définies des IRFs jusqu'à maintenant, les membres de cette famille peuvent être classifiés en quatre catégories, selon leur rôle majeur :

1. IRFs interférons :
 - a. IRF3 et IRF7 sont des régulateurs clés de la production des IFNs;
 - b. IRF2 et IRF9 sont respectivement des médiateurs négatifs et positifs de la signalisation des IFNs;
2. IRFs en réponse aux stress : IRF1 et IRF5;
3. IRFs hématopoïétiques : IRF4 et IRF8;
4. IRFs morphogénique : IRF6;

De plus, la plupart des IRFs, sinon tous, sont impliqués dans l'immunité et l'oncogénèse (voir Tableau II).

Quatre IRFs (IRF1, IRF3, IRF5 et IRF7) ont été identifiés comme étant des régulateurs positifs de la transcription des IFNs de type I suite à des infections par des pathogènes^{168, 191}. Comme mentionné précédemment, IRF1 est le premier membre des IRFs à avoir été découvert comme étant impliqué dans l'activation du promoteur de l'IFN β ¹⁵⁶. Cependant, par la suite, une étude a montré qu'une infection de cellules qui n'expriment pas IRF1 (MEF IRF1^{-/-}) par le *Newcastle disease virus* (NDV) induit de façon normale la production des ARNm des IFN α s et IFN β ²⁰⁰. Aussi, des expériences *in vitro* de surexpression ont montré qu'IRF5 induisait fortement IFN α 1^{201, 202}. Par contre, une autre étude avec des cellules MEF IRF5^{-/-} a montré qu'IRF5 était un inducteur crucial de l'expression de gènes de cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-12 et le TNF α , mais pas des gènes des IFNs de type I⁵³. Par conséquent, la compréhension du rôle d'IRF1 et d'IRF5 dans la production des IFNs de type I reste primaire.

La recherche des nouveaux facteurs de transcription pouvant être responsables de l'activation des promoteurs des IFN α s et de l'IFN β a conduit à l'identification d'IRF3 et d'IRF7^{164, 203-205}. La découverte de ces deux IRFs et de leur rôle dans l'activation

transcriptionnelle des gènes des IFNs de type I a eu un impact majeur sur la compréhension des mécanismes moléculaires engendrés par des cellules infectées par des pathogènes afin de générer une réponse immunitaire adéquate.

Tel qu'expliqué précédemment, IRF3 est un facteur de transcription ubiquitaire et exprimé de façon constitutive. Suite à une infection par différents pathogènes, l'activation de plusieurs PRRs (TLR3, TLR4, RIG-I, MDA5 et DAI) induit rapidement son activation (section 1.2). Cet événement permet à IRF3 de migrer au noyau pour s'associer à plusieurs éléments de réponse localisés dans des promoteurs et ainsi, induire l'activation transcriptionnelle de gènes cibles importants pour permettre une réponse cellulaire appropriée (par exemples des ISGs de façon indépendante des IFNs (ISG56 et ISG54) et des cytokines/chimiokines (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted* (RANTES) et IP-10)). Aussi, parmi ces gènes, on retrouve celui de l'IFN β . En effet, l'expression d'IRF3 seule est suffisante pour induire l'activation du promoteur de l'IFN β ^{148, 206}. Comme expliqué dans la section 1.3.3, ce facteur de transcription est essentiel pour la phase précoce de l'induction des IFNs de type I, étape primordiale pour permettre une réponse adéquate contre le pathogène. En effet, IRF3 est essentiel pour l'activation des gènes *IFN β* et *IFN α 1* (ou IFN α 4 chez la souris) et IRF7, des gènes IFN α s¹⁵⁰. Ainsi, dans le cadre de cette thèse, nos intérêts de recherche étaient strictement orientés vers l'implication d'IRF3 dans l'immunité innée induite par des infections par des pathogènes.

1.4.1 Structure d'IRF3

IRF3 est une protéine de 55 kDa et comme tous les autres IRFs, il possède un domaine de liaison à l'ADN (DBD) dans son extrémité amino-terminale liant le motif d'ADN conservé ISRE et un domaine AID dans sa portion C-terminale, responsable de son homo- et hétérodimérisation (voir Figure 16). IRF3 possède également un domaine de

transactivation localisé entre les acides aminés 134 à 394. Aussi, il possède une séquence de localisation nucléaire atypique définie par deux résidus basiques, la lysine (K) 77 et l'arginine (R) 78 et un domaine d'exportation nucléaire (NES) caractérisé par une séquence riche en leucines (L) localisée entre les résidus 139-149 (ILDELLGNMVL) (voir Figure 16). Ces deux séquences semblent constitutivement actives permettant à IRF3 de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau de façon basale. Cependant, le motif NES serait dominant en absence de signaux activateurs et ainsi, en état de latence, IRF3 serait localisé essentiellement au niveau cytoplasmique^{167, 207}.

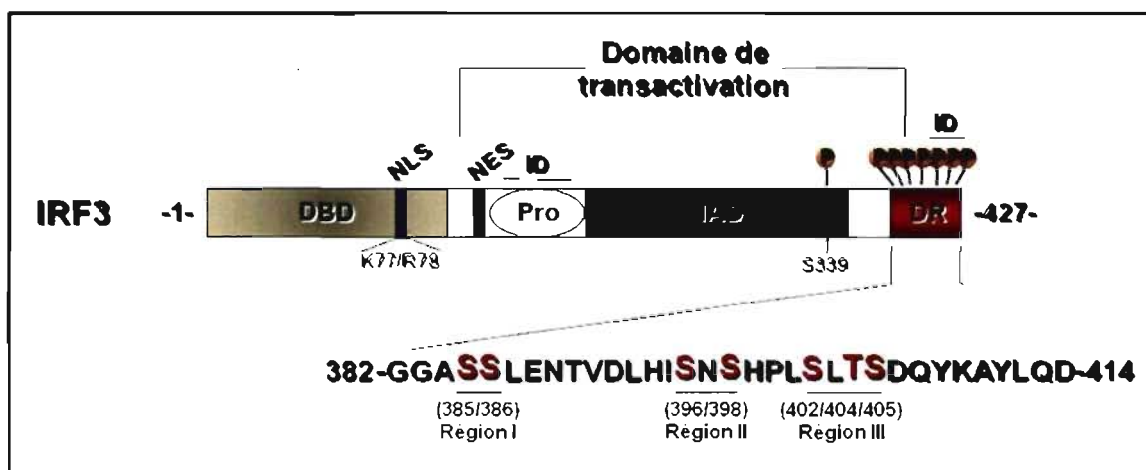


Figure 16 : Représentation schématique du facteur de transcription IRF3.

De plus, tout comme IRF7, IRF3 utilise son domaine AID pour moduler une interaction intramoléculaire inhibitrice. Pour ce faire, IRF3 possède deux domaines d'autoinhibition (ID) localisés dans sa séquence riche en proline (des acides aminés 134-197) et à son extrémité C-terminale (des acides aminés 407-414) (voir Figure 16). Ainsi, en absence de conditions activatrices, ces deux domaines inhibiteurs interagissent ensemble afin de donner une conformation fermée à IRF3, cachant la portion C-terminale du domaine AID, le DBD et la séquence de localisation nucléaire (NLS)^{152, 167}.

Pour finir, suite à une infection virale ou à une exposition à des PAMPs, IRF3 subit plusieurs modifications post-traductionnelles responsables de son activation, entre autres une hyperphosphorylation. En effet, IRF3 est une phosphoprotéine qui se fait phosphoryler sur plusieurs résidus sérines (S) et thréonines (T) localisés dans sa portion C-terminale. Cette séquence est définie comme son domaine de régulation (DR) (382-GGASSLENTVDLHISNSHPLSLTSDQYKAYLQD-414). Ces sites phosphoaccepteurs sont classifiés en trois régions : région I (S385/S386), région II (396/398) et région III (402/404/405) ^{141, 154, 167}. Toutes ces régions sont importantes pour permettre à ce facteur de transcription d'avoir une activité transcriptionnelle optimale. IRF3 est également phosphorylé sur la sérine en position 339, responsable de son état d'hyperactivation, et aussi son ultime signal pour induire sa polyubiquitination et sa dégradation ^{208, 209}.

1.4.2 Mécanisme d'activation d'IRF3

Tel que mentionné précédemment, IRF3 est un facteur de transcription constitutivement exprimé dans tous les types cellulaires. Dans des conditions normales, il réside dans le cytosol sous forme de latence, replié sur lui-même grâce à l'interaction de ses deux domaines IDs ^{203, 210}. Plusieurs stimuli peuvent induire l'activation d'IRF-3 : une infection virale (virus à ARN et ADN), une transfection du polyI:C, un traitement au lipopolysaccharide (LPS) ou encore, un dommage à l'ADN ^{3, 167, 211-214}. Suite à l'activation de PRRs (TLR3, TLR4, RLHs, DAI) (section 1.2), les voies de signalisation activées par ces récepteurs bifurquent pour induire l'activation des protéines sérine/thréonine kinases TBK1 et IKKi et la phosphorylation d'IRF3 dans ses trois régions. En effet, jusqu'à ce jour, TBK1 et IKKi sont les protéines kinases identifiées responsables de la phosphorylation d'IRF3, plus précisément sur les résidus sérine 402 et 396 ^{209, 215, 216}.

La phosphorylation des différents résidus localisés dans son domaine DR permet un changement conformationnel d'IRF3 en induisant la dissociation des deux domaines IDs ¹⁵². Par conséquent, les domaines DBD, NLS et AID sont exposés et permettent à IRF3 de

s'homo- et/ou s'hétérodimériser avec IRF7 *via* son domaine AID et de migrer au noyau. Par la suite, IRF3 s'associe à ses co-activateurs CBP/p300 afin de former le complexe *double-stranded RNA-activated factor 1* (DRAF1), ce qui le séquestre dans ce compartiment cellulaire et lui permet de s'associer à ses éléments de réponse d'intérêts (voir Figure 17) ^{153, 207}. Ainsi, IRF3 induit l'activation transcriptionnelle de gènes ayant différentes fonctions tels que IP-10 et RANTES (chimiokines), TRAIL et NOXA (médiateurs de l'apoptose), certains ISGs de façon indépendante des IFNs et certains IFNs de type I (cytokines) ²¹⁵⁻²²⁰.

Finalement, suite à son activation par des virus à ARN, à ADN ou par un traitement au polyI :C, IRF-3 est dégradé ^{141, 208, 210, 211}. D'une part, une étude a montré qu'il est phosphorylé sur son résidu sérine en position 339, ce qui lui permet de s'associer à la protéine prolyl isomérase Pin1 et induit sa polyubiquitination et sa dégradation par le protéasome ²⁰⁸. D'autre part, une seconde étude a démontré que suite à une infection virale par le Sendai Virus, IRF-3 est dégradé de façon dépendante du protéasome. En effet, un prétraitement des cellules par un inhibiteur du protéasome (MG132) prévient la dégradation d'IRF-3 suite à l'infection virale ¹⁴¹. Cependant, à la lumière de ces résultats préliminaires, les mécanismes moléculaires menant à cette dégradation restent peu caractérisés (voir Figure 17).

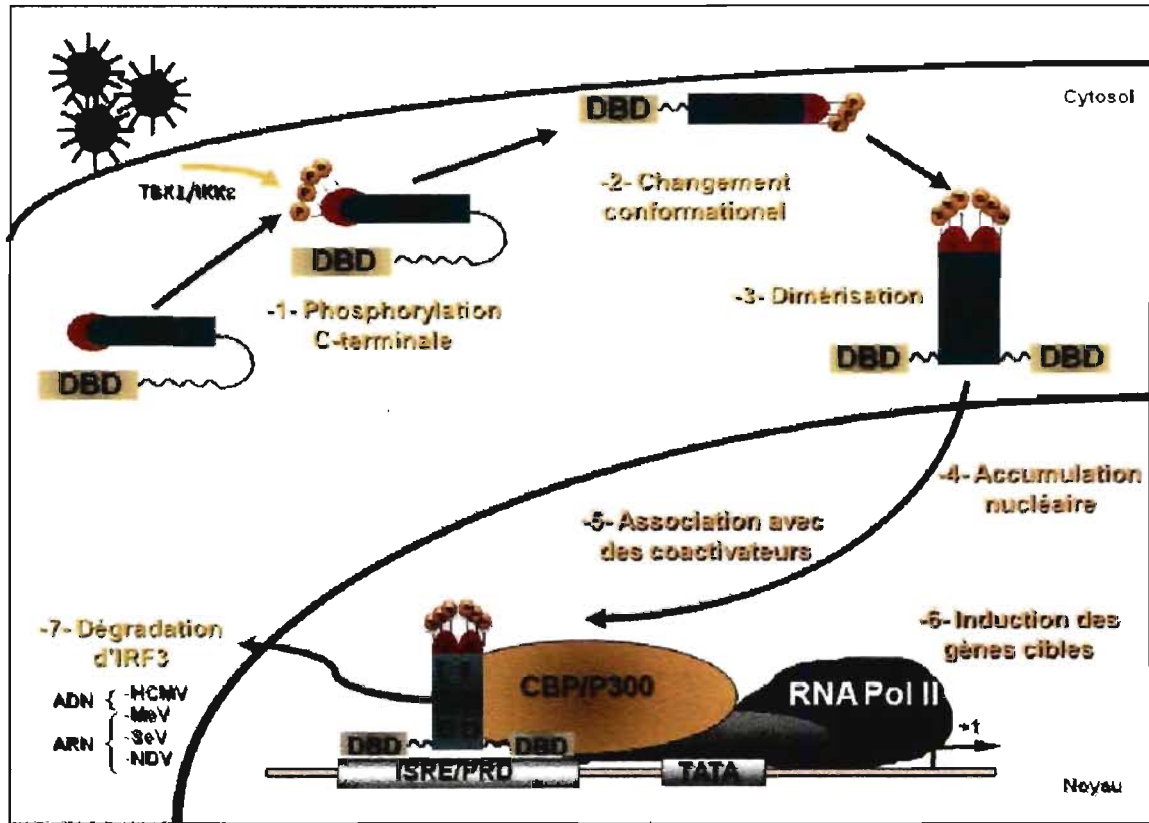


Figure 17 : Mécanisme d'activation du facteur de transcription d'IRF3.

1.4.3 Gènes induits par IRF3

IRF3 est un médiateur essentiel dans l'activation de l'immunité innée suite à une infection pathogénique. Pour ce faire, il est responsable de l'induction de différents groupes de gènes : IFNs de type I (IFN β , section 1.3), certains ISGs (ISG56 et ISG54, section 1.3.6.4), des cytokines/chimiokines (RANTES, IP-10 et IL-15) et des médiateurs de l'apoptose (*TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) et NOXA)²¹⁹⁻²²⁵.

Tout d'abord, IRF3 induit la production de la chimiokine IP-10²²⁴. Celle-ci a une activité chimiotactique pour les cellules T, les cellules NK, les DCs et les monocytes et elle est synthétisée par plusieurs types cellulaires, notamment les lymphocytes, les fibroblastes,

les monocytes et les cellules endothéliales. IP-10 stimule l'adhésion des cellules T aux cellules endothéliales. Ensuite, IRF3 stimule l'expression de la chimiokine RANTES, qui exerce son activité sur les cellules T, les éosinophiles, les basophiles et permet le recrutement des leucocytes au site d'inflammation²²³. Aussi, IRF3 permet la synthèse de la cytokine IL-15²²⁵. Cette dernière est sécrétée essentiellement par les phagocytes mononucléaires suite à une infection virale et induit la prolifération cellulaire des cellules NK en stimulant l'expression d'inhibiteurs de l'apoptose.

De plus, suite à certaines infections virales, IRF3 induit l'expression de certains médiateurs de l'apoptose, notamment TRAIL et NOXA, afin de limiter la propagation du virus^{219, 220}.

Pour finir, IRF3 est reconnu pour réguler l'expression de l'IFN β et de certains ISGs de façon indépendante de l'action des IFNs. En effet, il a été démontré qu'une version d'IRF3 hyperactivée induit fortement la production des protéines ISG54 et ISG56, des inhibiteurs de l'initiation de la traduction (voir section 1.3.6.4)²²¹. Ainsi, en plus des IFNs de type I, IRF3 cible l'induction de l'expression de plusieurs gènes importants pour permettre une réponse immunitaire innée adéquate et décimer le pathogène.

1.4.4 Mécanisme de régulation de l'activité d'IRF3

Les modifications post-traductionnelles sont des mécanismes de régulation de l'activité des différentes protéines contenues dans les cellules. Tel qu'expliqué précédemment, IRF3 est un facteur de transcription crucial dans la réponse immunitaire contre des agents pathogènes et nécessite d'être hautement régulé afin de contrôler son activité transcriptionnelle, car les gènes induits ont un potentiel néfaste si leur expression est prolongée.

1.4.4.1 Phosphorylation

IRF3 est une protéine hautement phosphorylée. Tel qu'expliqué dans la section 1.4.2, suite à une infection microbienne, IRF3 est phosphorylé sur les résidus localisés dans les trois régions présentées plus tôt, tous importants pour l'activation complète du facteur de transcription²⁰⁹. Cependant, l'ordre de phosphorylation de ces trois régions est indéfini. Jusqu'à ce jour, les seules protéines kinases identifiées pour induire l'activation d'IRF3 lors d'une infection virale sont les sérine/thréonine kinases TBK1 et IKKi, homologues aux protéines kinases du complexe IKK classique, IKK β et IKK α ^{215, 216, 226}. Les dernières études suggèrent leur implication dans la phosphorylation des résidus en position 396 et 402, dont le site phosphoaccepteur minimum pour permettre une activation d'IRF3 est la sérine 396^{209, 227}. Dernièrement, un nouveau site phosphoaccepteur a été identifié et caractérisé : la sérine 339^{208, 209}. Celle-ci serait responsable, de pair avec la sérine 396 phosphorylée, de générer une forme hyperactive d'IRF3 nécessaire pour lui permettre de dimériser et d'interagir avec ses coactivateurs CBP/p300, un signal adéquat pour induire sa déstabilisation²⁰⁹.

Aussi, il a été démontré que suite à une infection virale, le résidu thréonine en position 135 d'IRF3 est un substrat de la protéine kinase *DNA dependent protein kinase* (DNA-PK). Cette phosphorylation est un évènement activateur d'IRF3 induisant une rétention nucléaire et une stabilisation d'IRF3²²⁸.

De plus, il a été démontré qu'IRF3 est une protéine phosphorylée de façon basale dans sa portion amino-terminale et plus précisément entre les résidus 186 à 198. Des traitements avec des inducteurs de stress (anisomycin, sorbitol, des agents causant des dommages à l'ADN (doxorubicin), des cytokines (TNF α) et des facteurs de croissance (PMA)) induisent l'activation des voies de signalisation de stress (les MAPK kinase kinase (MAPKKK)), notamment l'activation de MEKK1 et Cot, responsables d'une augmentation de la phosphorylation d'IRF3 en N-terminale²²⁹. Toutefois, cette modification est

insuffisante pour permettre une accumulation nucléaire, une activation transcriptionnelle ou encore une dégradation d'IRF3.

Finalement, un essai kinase *in vitro* à partir des protéines surexprimées a suggéré qu'IRF3 est un substrat potentiel d'IKK β ²³⁰. Aussi, dans un système de surexpression, il a été récemment démontré que les protéines kinase *NF- κ B-inducing kinase* (NIK) et IKK α induisent une activation d'IRF3 indépendante de TBK1. En effet, la phosphorylation sur des résidus sérines en position 176 et 180 d'IKK α par NIK induit respectivement une activation constitutive et une inhibition des facteurs de transcription IRF3 et IRF7²³¹.

1.4.4.2 S-glutathionylation

Il a été récemment démontré que dans des conditions normales, IRF3 est modifié par un processus de s-glutathionylation. Suite à une infection virale, IRF3 est déglutathionylé par l'enzyme *glutaredoxin 1* (GRX-1). Cette étape est nécessaire pour permettre une association efficace entre IRF3 et ses coactivateurs CBP/p300 et ainsi, induire l'activation transcriptionnelle de gènes *IFN β* ²³².

1.4.4.3 Acétylation

L'acétylation est une modification post-traductionnelle qui se caractérise par l'ajout d'un groupement acétyl (COCH₃) sur la chaîne latérale d'un résidu lysine. Cet évènement neutralise la charge positive et modifie la taille de la ramification de cet acide aminé. Ainsi, ceci induit un changement de conformation des protéines modifiées et altère le mode d'interaction avec leurs partenaires. Bien que ce processus ait d'abord été identifié chez les histones, l'acétylation des lysines est maintenant reconnue pour modifier plus de 80 facteurs de transcription, plusieurs régulateurs nucléaires et une grande variété de protéines cytoplasmiques²³³. Cette modification est régulée par deux groupes d'enzymes : les

histones acétyltransférases (HAT) et les histones déacétyltransférases (HDAC). Aussi, il existe trois familles de HATs : -1- *Gcn5-related N-acetyltransferases* (GNATs); -2- *E1A-associated protein of 300 kDa* (p300)/*CREB-binding protein* (CBP); -3- les protéines MYST^{234, 235}.

Il est bien caractérisé qu'une fois qu'IRF3 est phosphorylé, il interagit avec ses coactivateurs, les HATs CBP/p300²³⁶. La formation de ce complexe est essentielle pour permettre l'association d'IRF3 à des séquences d'ADN. Cette liaison entre IRF3 et ses éléments de réponse nécessite également l'activité acétyltransférases de ses coactivateurs. Cependant, l'implication d'une acétylation directe d'IRF3 par CBP/p300 pour permettre à ce facteur de transcription d'être activé a été peu investiguée. En effet, il existe qu'une seule évidence *in vitro* que CBP/p300 modifie IRF3 par acétylation²³⁷. Toutefois, il est maintenant connu que certains IRFs sont acétylés *in vivo* sur un résidu lysine hautement conservé chez tous les membres de cette famille de facteurs de transcription, notamment IRF2, IRF7 et IRF9²³⁸⁻²⁴¹. Par conséquent, ceci suggère que ce type de modification post-traductionnelle pourrait être impliquée dans la régulation de l'activité d'IRF3.

1.4.4.4 ISGylation

Le processus d'ISGylation est une modification post-traductionnelle qui se caractérise par la fixation de la petite protéine ISG15, dont l'expression est induite par les IFNs et des infections virales, à une protéine substrat. Suite à une infection par un virus, IRF3 est un récepteur d'un tel processus, ce qui le stabilise dans son état hyperactif. Puisque certains virus antagonisent les effets d'IRF3 en induisant sa dégradation, cette modification contrecarre les effets de ces derniers. En effet, l'infection pathogénique induit la synthèse d'ISG15 et par conséquent, stabilise IRF3 afin de prolonger ses effets et la réponse antivirale générée²⁴².

1.4.4.5 Sumoylation

La sumoylation est une modification post-traductionnelle de la même famille de l'ubiquitination et l'ISGylation, c'est-à-dire, la liaison covalente d'une petite protéine SUMO (SUMO1, SUMO2 ou SUMO3) à une protéine substrat. Récemment, il a été montré qu'en réponse à une infection virale (des voies dépendantes des TLR et de RIG-I), IRF3 était activé et par la suite, sumoylé sur son résidu lysine 152. Cet évènement est une boucle à rétroaction négative indépendante des IFNs et a pour utilité de réprimer l'activité transcriptionnelle d'IRF3. Par conséquent, cette modification semble être induite par la cellule hôte afin de réguler les effets biologiques d'IRF3²⁴³.

1.4.4.6 Ubiquitination/dégradation

Le processus d'ubiquitination se caractérise par la liaison covalente d'une petite protéine, qui est l'ubiquitine, à une protéine substrat. Cette modification post-traductionnelle est un marquage protéique servant à moduler différentes fonctions dans la cellule, notamment la dégradation par le protéasome. Aussi, la modification sera discutée de façon plus élaborée dans la section 1.5.

Tel qu'expliqué précédemment (section 1.4.2), il existe peu d'évidences sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la dégradation d'IRF3 suite à son activation. Dans cette optique, une étude a démontré que suite à la phosphorylation de la sérine 339 d'IRF3, la protéine prolyl isomérase Pin1 s'associe à IRF3 pour induire sa dégradation dépendante du protéasome et son ubiquitination²⁰⁸. Dans un autre contexte, deux nouvelles études ont identifié des E3 ligases responsables de l'ubiquitination et de la dégradation d'IRF3 nommées Ro52 et *RBCC protein interacting with PKC1* (RBCK1)^{244, 245}. Cependant, ces dernières ne semblent pas réguler la stabilité d'IRF3 à l'état actif mais plutôt son niveau basal d'expression. Ainsi, à la lumière de ces analyses, les mécanismes moléculaires responsables de la régulation négatives d'IRF3 suite à son activation,

notamment par ubiquitination et dégradation, restent peu caractérisés. Par conséquent, ce champ d'études mérite d'être investigué d'avantage afin de comprendre comment les cellules hôtes répriment les effets biologiques antiviraux induits par le facteur de transcription IRF3.

1.4.5 Inhibition de l'activité d'IRF3 par les virus

Puisqu'IRF3 joue un rôle primordial dans la réponse des cellules hôtes contre une infection par des pathogènes, plusieurs virus ont développé des stratégies afin d'antagoniser son activité, notamment en induisant sa dégradation (voir Tableau III). En effet, afin de réprimer l'activité d'une protéine, l'induction de sa dégradation est un mécanisme irréversible et très efficace. Pour récupérer l'activité de la protéine, la cellule doit générer une *néosynthèse* de cette protéine, ce qui peut prendre quelques heures contrairement à certains mécanismes de modification post-traductionnelles (tels que la phosphorylation/déphosphorylation) pouvant être exercés en quelques minutes ou quelques secondes. Il existe plusieurs exemples de protéines virales impliquées dans la dégradation d'IRF3 afin de bloquer ses effets : (1) La protéine NSP1 du rotavirus; (2) la protéine NPro du *Classical swine fever virus* (CSFV); (3) la protéine bICP0 du *Bovine Herpes Virus 1* (BHV1) ²⁴⁶⁻²⁴⁸. Pour finir, la protéine RTA du *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus* (KSHV) est une protéine E3 ligase responsable de l'ubiquitination d'IRF3 et ainsi, induit sa dégradation ²⁴⁹.

Tableau III : Présentation de différents virus ayant la faculté d'antagoniser l'activité transcriptionnelle d'IRF3.

Virus	Protéine virale	Mécanisme d'action	Références
HAV	Inconnue	Inhibition de RIG-I et de TLR3 responsable de l'activation d'IRF3;	250
HCV	NS3/4A	Le domaine protéase induit la dégradation d'IPS-1;	251-253
VV	E3L	Inhibition de la phosphorylation d'IRF3;	254
	A46R	Inhibition de TRIF responsable de l'activation d'IRF3;	255
HHV1	ICP0	Le domaine RING inhibe l'activation d'IRF3;	256-258
Mengovirus	Leader protein	Inhibition de la dimérisation d'IRF3;	259
Influenza A Virus	NS1	Inhibition de RIG-I et d'IPS-1 responsable de la dimérisation d'IRF3;	260, 261
WNV	Inconnue	Inhibition de la dimérisation d'IRF3	262
Rabies Virus	P	Prévient la dimérisation d'IRF3;	263
HRSV	NS1 & NS2	Inhibition de la dimérisation et la translocation nucléaire d'IRF3;	264
Ebola virus	VP35	Prévient la dimérisation et la translocation nucléaire d'IRF3;	265
SARS-CoV	PLpro domain	Intéragit avec IRF3 afin de prévenir sa dimérisation et sa translocation nucléaire;	266

Tableau III (suite)

Virus	Protéine virale	Mécanisme d'action	Références
HHV6	IE1	Prévient la dimérisation, la translocation nucléaire et la liaison au promoteur IFN β d'IRF3;	267
Influenza B Virus	NS1	Inhibition de la translocation nucléaire d'IRF3;	268
HHV5	pp65	Inhibition de la translocation nucléaire d'IRF3;	269
HHV8	vIRF1	Inhibition de la formation du complexe transcriptionnel actif CBP/p300 et d'IRF3;	270
KSHV	RTA	Induction de l'ubiquitination d'IRF3;	249
CSFV	NPro	Induction de la dégradation d'IRF3;	247
Rotavirus	NSP1	Induction de la dégradation d'IRF3 et d'IRF7;	246
BHV1	bICP0	Induction de la dégradation d'IRF3;	248

Abréviations : CSFV, *Classical Swine Fever Virus*; BHV1, *Bovin Herpesvirus 1*; HAV, *Hepatitis A Virus*; HCV, *Hepatitis C Virus*; HHV, *Human Herpesvirus*; HRSV, *Human Respiratory Syncytial Virus*; KSHV, *Karposi's Sarcoma-associated Herpesvirus*; PLpro domain, *Papain-like protease domain*; NS, *nonstructural protein*; NSP, *nonstructural protein*; SARS-CoV, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*; VV, *Vaccinia Virus*; WNV, *West Nile Virus*;

1.4.6 Implication pathologique d'IRF3

Étant données les diverses fonctions biologiques exercées par IRF3 dans le contexte de défense immunitaire innée, les cellules doivent contrôler de façon très stricte l'activité de ce facteur de transcription. Dans le cas contraire, ceci peut nuire aux cellules hôtes. En effet, une activation incontrôlée d'IRF3 semble responsable de mécanisme d'induction du choc endotoxique généré par le LPS car il a été montré que des souris qui n'expriment pas IRF3 (IRF3^{-/-}) résistent à ce traitement ²⁷¹. De plus, il a été démontré qu'IRF3, *via* l'activation du TLR4, était impliqué dans la réaction d'inflammation induite par le phénomène d'ischémie reperfusion du foie ²⁷². Aussi, suite à certaines infections virales, notamment le Sendai Virus, IRF3 est responsable d'induire l'apoptose des cellules ^{273, 274}. Finalement, il a été montré récemment qu'IRF3 aurait un rôle à jouer dans certaines maladies autoimmunes, telles que le syndrome d'Aicardi Gouttière (une encéphalopathie infantile progressive), le chilblain lupus (ou lupus à type d'engelure, qui est un lupus érythémateux chronique) et le lupus érythémateux systémique. Ces maladies sont induites par la perte de fonction de l'exonucléase Trex1, normalement responsable, en parallèle avec l'enzyme RNase H2, de la dégradation de structures ssDNA ou des hybrides ARN:ADN générées durant la réplication de rétrovirus ou de rétrotransposons endogènes. Ainsi, une accumulation de ces structures d'acides nucléiques intracellulaires seraient responsable d'une activation inappropriée du facteur de transcription IRF3 ^{275, 276}.

Ainsi, l'activité du facteur de transcription IRF3 est hautement régulé par plusieurs types de modifications post-traductionnel. La plupart d'entre elles permettent un contrôle de son activité de façon relativement rapide et réversible (comme par exemple, la phosphorylation). Toutefois, les processus moléculaires impliqués dans la dégradation d'IRF3, un mécanisme irréversible et très efficace, demeurent peu caractérisés. Tel que mentionné précédemment, certaines évidences suggèrent qu'IRF3 pourrait être une cible du système ubiquitine-protéasome, qui est un régulateur important des niveaux d'expression des protéines. Par conséquent, le prochain chapitre discutera de ce système et de son rôle de la régulation de l'immunité innée.

1.5 Ubiquitination

Les modifications post-traductionnelles sont très importantes car elles régulent l'activité des protéines dans les cellules. La plus caractérisée jusqu'à ce jour est le processus de phosphorylation. Cependant, il existe plusieurs autres types de modifications post-traductionnelles très versatiles, dont notamment le processus d'ubiquitination. Celui-ci a été découvert entre la fin des années 1970 et le début des années 1980 et a d'abord été caractérisé par sa capacité à diminuer l'expression de protéines nocives pour la cellule de façon dépendante de l'ATP²⁷⁷. L'identification d'un mode de dégradation non-lysosomale des protéines a permis à Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose de recevoir un prix Nobel en chimie en 2004. Depuis ce temps, beaucoup d'études ont permis de caractériser ce système très complexe et mobile impliqué dans la régulation de plusieurs fonctions cellulaires telles que la déstabilisation, la localisation et les interactions des protéines.

Le système ubiquitine-protéasome (SUP) joue un rôle important dans la régulation du niveau d'expression de la plupart des protéines dans la cellule. Il implique deux grandes étapes : -1- l'ubiquitination, qui est une liaison covalente d'un polymère d'ubiquitine (Ub) (une protéine de 76 acides aminés) à une protéine substrat; -2- la reconnaissance et la liaison de la protéine ubiquitinée par le protéasome, qui a pour fonction de la détruire. La fixation de l'ubiquitine sur la protéine d'intérêt s'effectue *via* trois enzymes : E1 (protéine activatrice de l'Ub), E2 (l'enzyme de conjugaison de l' Ub) et E3 ligase (responsable de la liaison de l'Ub au substrat d'intérêt)²⁷⁸⁻²⁸⁰. La liaison covalente de l'ubiquitine à son substrat s'effectue en trois étapes. Premièrement, le résidu glycine localisé à l'extrémité carboxy-terminale de l'Ub est activé par l'enzyme E1, menant à la formation d'un lien thioester très élevé en énergie entre la glycine de l'Ub et le résidu cystéine du site actif de l'enzyme E1. Deuxièmement, l'Ub activée est transférée sur le résidu cystéine du site actif de l'enzyme E2. Troisièmement, le complexe Ub-E2 est recruté à une troisième enzyme, la E3 ligase, qui est responsable de la reconnaissance et de la liaison spécifique la protéine

substrat et ainsi, facilite le transfert de l'Ub associée à la E2 au résidu lysine du substrat (voir Figure 18). Ainsi, cette chaîne de réactions induit la formation d'un lien isopeptidique entre le résidu glycine localisé à l'extrémité C-terminale de l'Ub (G76) et le groupement ϵ -NH₂ de la chaîne latérale de la lysine du substrat^{278, 281}. Cependant, le processus d'ubiquitination d'un substrat peut avoir lieu indépendamment d'une lysine. En effet, les protéines ERK3 et p21^{Cip1} subissent une ubiquitination sur leur extrémité N-terminale afin de leur permettre d'être dégradées par le protéasome²⁸².

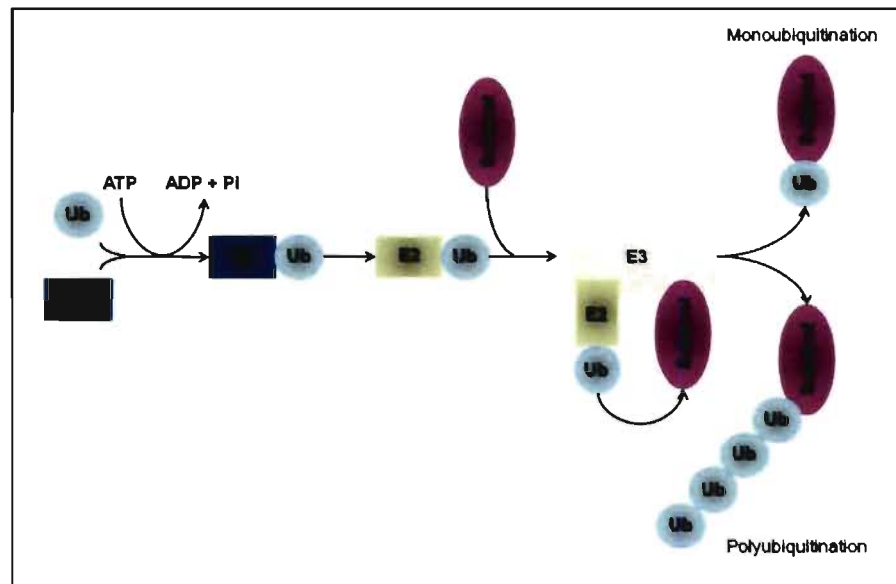


Figure 18 : Mécanisme de conjugaison de l'ubiquitine à une protéine substrat.

Un substrat peut être marqué par une seule molécule d'Ub, un processus appelé monoubiquitination, ou encore par un polymère d'Ub, nommé polyubiquitination. La monoubiquitination peut avoir lieu sur une seule ou plusieurs lysines d'un même substrat. La synthèse d'un polymère d'Ub s'effectue par la conjugaison d'une molécule d'Ub à un résidu lysine interne de l'Ub conjugué précédemment²⁸¹. En effet, la molécule ubiquitine possède elle-même sept résidus lysines. Ainsi, les Ubs contenues dans une chaîne

d'ubiquitines lient généralement les résidus lysines en position 48 ou 63 de l'Ub initiale, nommées respectivement des liaisons en K48 et en K63. Cependant, d'autres lysines de l'Ub semblent participer à la formation de polymère. Les diverses possibilités de marquage (monoubiquitination, polyubiquitination en K48 ou K63, etc.) déclenchent des effets biologiques différents ²⁸¹. En effet, le processus de monoubiquitination régule l'expression membranaire de certains récepteurs en induisant leur internalisation dans des endosomes ²⁸³. Aussi, une polyubiquitination en K63 d'un substrat module ses interactions avec d'autres protéines alors qu'une polyubiquitination en K48 induit sa reconnaissance et sa dégradation par le protéasome 26S ⁴⁷.

La protéine E3 ligase joue un rôle crucial car elle est responsable de la reconnaissance spécifique la protéine d'intérêt et complète le transfert de l'ubiquitine sur cette dernière. Aussi, la versatilité et la spécificité des E3 ligases à reconnaître leurs substrats respectifs sont exprimées par le nombre d'E3 ligases encodées par le génome humain, soit 600 ²⁷⁸. Les protéines E3 ligases ont été classifiées en trois groupes : les E3 ligases de type « RING-finger » monomérique, de type « RING-finger » sous forme de complexe protéique et de type « HECT-domain » ²⁸⁴⁻²⁸⁶. Les protéines de type culline sont retrouvées dans la plupart des E3 ligases de type « RING-finger » multi-mérique et servent de protéines d'échafaudage. Les E3 ligases de type culline sont également régulées par un processus de neddylation, une modification covalente réversible qui a lieu sur la protéine culline et qui est de la même famille de l'ubiquitination. Cette modification post-traductionnelle est la liaison covalente de la glycine localisée à l'extrémité C-terminale de la protéine *neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 8* (NEDD8) sur un résidu lysine des cullines. Cet événement facilite le recrutement de l'enzyme E2 au complexe E3 ligase de type culline et favorise un processus d'ubiquitination adéquate sur le substrat d'intérêt ²⁸⁷.

Les E3 ligases de type complexe SCF forment la sous-famille de E3 ligases de type « RING-finger » multi-mérique la plus caractérisée jusqu'à ce jour. Les E3 ligases de type complexe SCF sont composés de trois sous-unités invariables – Rbx1/Roc1 (protéine avec

des motifs de doigts de zinc), Skp1 (protéine adaptatrice) et Culline 1 – et une sous-unité variable, la protéine F-box (récepteur du substrat), qui reconnaît et lie le phosphodegron (séquence phosphorylée spécifique de la protéine substrat)²⁸⁴. Ainsi, les protéines F-box sont responsables de la reconnaissance du substrat phosphorylé et par conséquent, de la spécificité du processus d'ubiquitination. L'analyse du génome humain suggère l'existence de 70-80 gènes encodant pour des protéines F-box^{278, 284}. De plus, les E3 ligases de type complexe SCF sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires comme la prolifération et la différenciation cellulaire, l'apoptose et l'inflammation^{284, 285, 288, 289}.

L'article de revue présenté dans les prochaines sous-sections a été rédigé dans le cadre de ma thèse et discute des rôles primordiaux de l'ubiquitination dans la régulation des voies de signalisation des PRRs et des IFNs de type I. Aussi, les prochaines parties vont présenter les différentes familles et sous-familles d'E3 ligases impliquées dans ces réponses, ainsi que leurs mécanismes moléculaires respectifs.

Référence :

Bibeau-Poirier A, Servant MJ. **Roles of ubiquitination in pattern-recognition receptors an type I interferon receptor signalling.** *Cytokine.* 2008 Sep;43(3):359-67.

Contribution de chaque auteur pour cet article :

Bibeau-Poirier A : 50% de l'écriture;

Servant MJ: 50% de l'écriture;

1.5.1 Roles of ubiquitination in pattern recognition receptor and interferon type I receptor signaling

Annie Bibeau-Poirier^{1,2} and Marc J. Servant^{1,2*}

¹Faculty of Pharmacy, ²Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament, University of Montreal, Montreal, H3C 3J7, Canada

*Corresponding author: Mailing Address: Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7; [REDACTED]

[REDACTED]

1.5.1.1 Abstract

Posttranslational protein modifications are involved in all functions of living cells. This includes the ability of cells to recognize pathogens and regulate genes involved in their clearance, a concept known as innate immunity. While phosphorylation mechanisms play essential roles in regulating different aspects of the innate immune response, ubiquitination is now recognized as another posttranslational modification that works in parallel with phosphorylation to orchestrate the final proper innate immune response against invading pathogens. More precisely, this review will discuss the most recent advances that address the role of ubiquitination in pattern recognition receptors and type I interferon receptor signaling.

KEYWORDS

Ubiquitination, phosphorylation, Interferon, Pattern-recognition receptors, innate immunity

ABBREVIATIONS

PAMPs, pathogen-associated molecular patterns; PRR, pattern-recognition receptor; TLRs, Toll-like receptors; IRFs, interferon regulatory factors; IKK, I kappa B kinase; TBK1, TANK-binding kinase 1; TANK, TRAF-associated NF- κ B activator; STAT, signal transducer and activator of transcription; ISRE, interferon-stimulated response element; RING, really interesting new gene; TRAFs, tumor necrosis factor receptor-associated factors; TNF, tumor necrosis factor, LPS, lipopolysaccharide; NDV, Newcastle Disease Virus; SeV, Sendai virus; TAK1, TGFbeta-activating kinase 1; UBD, Ubiquitin binding domain, TRIM, tripartite motif; IFN, interferon; SCF, SKP1-Cul1-fbox; Cul, cullin; SOCS, suppressor of cytokine signaling; ECS, ElonginB/C-Cul2/5-SOCS; COMMD1, copper metabolism gene MURR1 domain; DUB, deubiquitilating;

1.5.1.2 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)[1]. 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-activated kinase (PKR), the RIG-I-like helicases (RLHs) RIG-I and MDA5, the DNA-dependent activator of interferon regulatory factors (IRFs) (DAI), and the nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) receptors]. Regardless of their location within the cell, all signaling receptors have the ability to activate several phosphorylation-dependent signaling cascades that lead to the activation of transcription factors. Among them, NF- κ B, ATF-2/cJun heterodimers (AP-1), IRF-3, and IRF-7 are currently the most important and the best studied.

In unstimulated cells, NF- κ Bs are retained in the cytoplasm in association with inhibitory subunits known as I κ Bs. PAMPs-induced phosphorylation at conserved N-terminal residues is accomplished by the I κ B kinase (IKK) complex. Phosphorylation triggers a signal that induces ubiquitin-dependent degradation of I κ B and subsequent nuclear translocation of NF- κ B dimers [2]. Unlike NF- κ B, ATF-2/c-Jun heterodimers are expressed as nuclear proteins that are activated by phosphorylation of their activation domains by c-Jun amino-terminal kinases (JNKs), which are downstream of a well-defined stress-activated kinase cascade [3]. The pathways regulating IRF-3 phosphorylation and activation are the focus of considerable investigation. IRF-3 belongs to the IRF family, which includes IRFs 1 through 9 [4]. Following TLR3, TLR4 or RLH engagement, two IKK homologs, namely IKK ϵ [5] (also called IKKi) [6] and TANK-binding kinase (TBK)1 [7], were recently shown to control the transcriptional activity of IRF-3 through phosphorylation of its C-terminal regulatory domain [8-11].

Once activated, the NF- κ B, AP-1 (ATF-2/c-Jun), and IRF-3 transcription factors are responsible for inducing a repertoire of genes that are known to impede pathogens' survival in the host. These include several cytokines and chemokines, such as the well-known type I interferons (IFN α 1 and IFN β), RANTES, and IP10, as well as many others [12]. The engagement of cell surface IFN receptors (IFNR) on neighboring cells amplifies the early innate immune response through the activation of JAK1 and TYK2 tyrosine kinases, which leads to phosphorylation and dimerization of signal transducer and activator of transcription (STAT)1 and STAT2 transcription factors. IRF-9 associates with STAT1/STAT2 heterodimers to form the heterotrimeric transcription factor complex interferon-stimulated gene factor (ISGF)3. Upon translocation to the nucleus, this complex recognizes interferon-stimulated response elements (ISRE) found on promoters of numerous IFN-induced genes, such as IRF-7, PKR, RNase L, and Mx proteins. This recognition results in the induction of proteins that impair viral gene expression and replication. Thus, phosphorylation mechanisms clearly play a major role in the innate immune response. Ubiquitination, another posttranslation modification, results from the covalent attachment of ubiquitin (a small, ubiquitous polypeptide) to target proteins and is also essential for the proper regulation of the innate immune response [13]. The formation of ubiquitin conjugates is accomplished through a three-step cascade reaction involving ubiquitin activation (catalyzed by the ubiquitin-activating enzyme (E1)), ubiquitin transfer (catalyzed by a ubiquitin carrier protein or conjugating enzyme (E2)), and ubiquitin ligation (catalyzed by a ubiquitin-protein ligase enzyme (E3)). For most proteins, the first ubiquitin molecule is attached *via* an isopeptide bond between its C-terminal glycine residue and the ϵ -NH₂ group of an internal lysine from the substrate [14]. The polyubiquitin chain is then synthesized by the successive conjugation of ubiquitin molecules to an internal lysine of the previously conjugated ubiquitin. There is no known consensus about the positioning of the internal lysine residues of a substrate that are conjugated to ubiquitin. In addition to this lack of consensus, the existence of structurally distinct polyubiquitin chains represents another way to enhance diversity in ubiquitin-dependent signaling. Notably, the linkage of

corresponding polyubiquitin chains through different ubiquitin lysine residues triggers different biological processes for the tagged proteins. Ubiquitin itself has seven lysine residues, and it is generally accepted that polyubiquitination through Lys⁴⁸ is involved in proteasome-mediated degradation. On the other hand, the proteasome-independent function of ubiquitin during endocytosis and signaling largely occurs through monoubiquitination or polyubiquitination of Lys⁶³ [14]. Recent structural studies have shown that ubiquitin chains linked by Lys⁴⁸ and Lys⁶³ adopt different configurations; this observation could explain the distinct signaling functions of these polyubiquitin chains [15]. Notably, the function of ubiquitin and polyubiquitin chains is largely dependent upon their recognition by several different classes of ubiquitin-binding domains (UBDs), which are present in a wide variety of proteins [16]. These domains include UIM (Ubiquitin-Interacting Motifs), UBA (UBiquitin-Association), CUE (CUE1-homologue), UEV (Ubiquitin E2 Variant), PAZ (Polyubiquitin-Associated Zinc finger), and NZF (Novel Zinc Finger) [17]. Like phosphatases that act on phosphorylated proteins, substrate-conjugated ubiquitin is removed by deubiquitylating (DUB) enzymes [18]. Next paragraphs will summarize and discuss the roles of E3 ubiquitin ligases and DUB enzymes in PRR and IFNR signaling.

1.5.1.3 E3 ubiquitin ligases

The diversity of protein kinases (518) and phosphatases (120) in humans is largely responsible for the complex variety of biological responses that these enzymes regulate. Likewise, the human genome project revealed the presence of over 40 different E2s, over 500 different E3s, and more than 80 different DUBs. The two major E3 groups are classified according to the presence of one of the following motifs: the Homology to the E6-associated protein Carboxyl Terminus (HECT) domain-containing E3s and the Really Interesting New Gene (RING) domain-containing E3s [13]. HECT domain E3 ubiquitin ligases function as ubiquitin carriers that form thiol-ester intermediates with ubiquitin. On the other hand, the RING finger E3 ubiquitin ligases do not directly bind to ubiquitin

intermediates. They do so via their RING domain or structural variants of it (the plant homeodomain (PHD) fingers and the U-box), which recruits an E2 ubiquitin-conjugating enzyme. The RING domain-containing proteins represent the largest class of E3s and are found in single subunits or multicomponent protein complexes. As described below, this type of E3 ubiquitin ligase has an essential role in innate immunity (see Table I).

1.5.1.3.1 TRAFs

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 is implicated in E3 ubiquitin ligase activity and signaling events [19, 20]. All mammalian TRAFs localize to the cytoplasm except TRAF4, which is found in the nucleus.

Of all the TRAF proteins, TRAF3 and TRAF6 are most important in PRR signaling (Figs.1 and 2). Notably, gene disruption studies have recently identified TRAF3 as a critical protein required for the activation of IRF-3 and the induction of type I IFN, but not NF- κ B, which regulates the transcription of inflammatory cytokines in response to viral infection and TLR ligation [21, 22]. On the other hand, the TRAF6-dependent pathway engages MAPKs and IKK, which activate transcription factors, such as AP-1 and NF- κ B, that participate in pro-inflammatory cytokine induction.

1.5.1.3.1.1 TRAF6

TRAF6 is essential for IKK, Jun N-terminal kinase (JNK), and p38 activation in the IL1R and TLR pathways, which leads to the rapid activation of NF- κ B and AP-1 transcription factors [23, 24]. Upon receptors engagement, TRAF6 is rapidly recruited through a MyD88-IRAK4-IRAK1 signaling complex (Fig. 1). TRAF6 is also recruited to TLR3 and 4 receptors, which utilize TRIF-RIP1 as a signaling platform, leading to slower kinetic activation of the NF- κ B pathway (see [1] for a recent review). These receptor-dependent recruitments induce TRAF6 oligomerization and TRAF6 association with two distinct signaling complexes termed TRAF6-regulated IKK activators (TRIKA) 1 and 2. TRIKA1, an E2 ubiquitin-conjugating enzyme complex composed of UBC13 (ubiquitin-conjugation enzyme 13) and UEV1A (ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1A), was proposed to bind the RING domain of TRAF6 complex and induce the formation of a Lys⁶³-linked polyubiquitin chain on TRAF6 [25, 26]. In addition to UBC13, however, other E2 ubiquitin-conjugating enzymes, such as UbcH7 and Ubc5, are also likely to be involved in TRAF6 signaling events [27]. Polyubiquitinated TRAF6 then results in TAK1 activation by serving as a platform that recruits the TGF β -activated kinase (TAK)1 holoenzyme, which consists of the catalytic subunit TAK1 and the regulatory subunits TAK1-binding protein (TAB)1 and either TAB2 or TAB3 [28]. TRAF6 was also shown to recruit another MAPKKK family member, MEKK3 [29]. TAK1 and MEKK3 then catalyze T-loop phosphorylation of several kinases, such as IKK β , MEK3-6, and MEK4-7, which lead to the activation of NF- κ B and AP-1 transcription factors and the induction of pro-inflammatory cytokines (Fig. 1) [25, 30]. In addition to self-polyubiquitination, TRAF6-dependent Lys⁶³-linked polyubiquitination of NEMO, RIP1, and IRAK1 is essential for proper NF- κ B signaling [26, 31, 32]. The molecular relationship between these modifications and IKK complex activation remains unclear. Through its atypical UBD, a domain better known as the NEMO ubiquitin-binding (NUB) domain, polyubiquitinated NEMO may help control its oligomeric states [33] or its binding with other Lys⁶³-linked

polyubiquitinated proteins, such as IRAK1 [32, 34] and RIP1 [35]. Reciprocally, polyubiquitination of NEMO could also promote it to bind with other UBD-containing proteins, such as TAB2; this interaction could then lead to the recruitment of TAK1 in close proximity with the IKK complex. Polyubiquitinated RIP1 could also serve as a scaffold to recruit TAK1 and the IKK complex (for a recent review see [36]).

In addition to controlling NF- κ B and AP-1 transcription factors, TRAF6 regulates IRF-5 and IRF-7 transcription factors. The production of inflammatory cytokines initiated by TLRs 4, 5, 7, and 9 depends on an association of IRF-5 with Myd88 and TRAF6 through an unknown mechanism [37]. In plasmacytoid dendritic cells (pDCs), TRAF6 also interacts with IRF-7 and is involved in the ubiquitin-dependent activation of IRF-7 and IFN α production following engagement of TLRs 7 and 9 [38, 39].

1.5.1.3.1.2 TRAF3

In response to virus infection and TLR3 and 4 engagement, TBK1 and IKKi, increase type I IFN production by becoming involved in the phosphorylation and activation of IRF-3 and IRF-7 transcription factors [8, 9]. The requirement of TRAF6 for TLR-mediated activation of the IKK complex and MAPK signaling cascades and the observation that TRAF6 is also recruited to TLR3 and 4 receptors that utilize TRIF-RIP1 as a signaling platform (see above) have prompted investigators to ask whether TRAF6 also regulates TBK1 and IKKi activities. Surprisingly, however, IRF-3 activation by TRIF is independent of both TRAF6 and RIP1 [40, 41]. Another TRAF family member, TRAF3, was recently shown to be involved in the induction of type I IFN through TLRs 3, 4, 9 and the intracellular RNA sensors RIG-I and Mda5 [21, 22] (Figs. 1 and 2). Like TRAF6, the E3 ubiquitin ligase activity of TRAF3 is required to activate downstream signaling cascades, an effect that is thought to largely depend on its Lys⁶³-linked self-ubiquitination [42, 43].

TBK1 was originally identified in a yeast-two-hybrid screen that used TRAF-associated NF- κ B activator (TANK) as bait [7]. Interestingly, TANK also binds TRAF3. Thus, it has been proposed that TANK forms a bridge between upstream (TRIF, Cardif, and TRAF3) and downstream signaling mediators (TBK1, IKKi, and IRF-3) [43-45] (Figs. 1 and 2). In such a scenario, the interaction of IKKi or TBK1 with TANK induces its polyubiquitination through a TRAF3- and Ubc13-dependent Lys⁶³ linkage [44]. It is currently unclear how Lys⁶³-linked TANK polyubiquitination regulates IRF3 and IRF-7 activation.

1.5.1.3.2 TRIAD3A

A subset of the RING-domain-containing proteins are characterized by the presence of RING-IBR-RING motif (two RING motifs and an in-between-RING (IBR) motif), which is a new cysteine-rich signature known as the TRIAD domain [46]. Interestingly, a yeast two-hybrid screen that used the TIR domain of TLR9 as bait identified Triad domain-containing protein 3 variant A (TRIAD3A) as an interacting partner [47]. It is expressed in many cell lines and tissues and represents a novel RING-type E3 ubiquitin ligase that promotes the ubiquitination and degradation of TLR9 and possibly of TLR3, 4 and 5 (Fig. 1). Notably, TRIAD3A is involved in the desensitization process that occurs following ligand binding because its depletion in target cells results in enhanced responses to flagelin, LPS, and CpG DNA. Because TRIAD3A interacts with the TIR domains, the latter was also shown to interact and induce the degradation of TIRAP (MAL) and TRIF, two TIR domain-containing adapter proteins [48]. Intriguingly, RIP1 does not contain a TIR domain, but its C-terminal region has significant homology with the TIR domains; this may explain why TRIAD3A overexpression also induces the degradation of RIP1 [48]. Thus, TRIAD3A potentially negatively regulates both TLRs and TNFR signaling.

1.5.1.3.3 TRIM

The tripartite motif (TRIM) protein family represents also a novel subclass of “single protein RING finger E3 ubiquitin ligase”. TRIM proteins are also known as RBCC proteins because they contain an RBCC motif (or tripartite motif) at their N-termini. This domain includes a RING finger domain, one or two zinc-binding motifs named B-boxes, and a coiled-coil region. The RING domain is involved in protein-protein interactions and, for some TRIM members, has ubiquitin E3 ligase activity. Following the RING domain are B-box motifs (CHC3H2 zinc-finger motif); B1 and B2 have been found exclusively in TRIM proteins, but no functions have been clearly assigned to them. Finally, the coiled-coil domains mediate homo- or hetero-oligomerization with other coiled-coil domains, forming large protein complexes. Usually, the RBCC motif is followed by one or two specific domains at the C-terminal regions; these additional domains characterize each TRIM member. Of the 66 human TRIM proteins, 40 contain a SPRY domain C-terminal to the RBCC motif [49]. TRIM family members play important roles in innate immunity.

1.5.1.3.3.1 TRIM25

TRIM25, also known as estrogen-responsive finger protein (EFP), controls the host antiviral response through its interaction with the DED/H box RNA helicase RIG-I [50] (Fig. 2). RIG-I is polyubiquitinated following SeV infection or IFN β treatment. Part of this polyubiquitination occurs through an interaction of the C-terminal SPRY domain of TRIM25 with the N-terminal CARD domain of RIG-I, a process that leads to the formation of a Lys⁶³-linked polyubiquitin chain on Lys 172. This modification of RIG-I is crucial for its signaling capacity because it creates a docking platform for MAVS. TRIM25 expression is up-regulated by type 1 IFN treatment, creating a positive feedback loop in the antiviral response [51].

1.5.1.3.3.2 TRIM21

Overexpression and shRNA-knock down studies suggest that TRIM 21, also known as Ro52, is involved in both Lys⁴⁸-linked polyubiquitination of IRF-3 leading to its proteosomal degradation [52] (Figs. 1 and 2). TRIM21 (Ro52), an IFN-inducible gene, also ubiquitinates IRF-8 [53].

1.5.1.3.3.3 TRIM30 α

TLR ligands that induce NF- κ B also induce TRIM30 α , a recently identified negative regulator of NF- κ B signaling. Once produced, TRIM30 α interacts with the TAB3-TAB3-TAK1 adaptor-kinase complex and induces the polyubiquitination and degradation of TAB2 and TAB3. This prevents TRAF6 autoubiquitination [54] (Fig. 1).

1.5.1.3.4 *Cullin-based E3 ligases*

Cullin-based E3 ligases target substrates for ubiquitin-dependent degradation by the 26S proteasome. The SCF and ECS complexes are the best-characterized cullin-based E3 ligases.

1.5.1.3.4.1 SCF complex

This family of E3 ubiquitin ligases consists of the following three invariable subunits: Skp1, Cullin 1, and the RING finger protein Rbx/Roc1, and a variable component known as the F-box protein. Together, they form a ubiquitin-protein ligase complex termed the SCF complex (Skp1-Cul1-F-box) [55]. While Rbx/Roc1 proteins provide a docking site for an E2 enzyme, the F-box proteins are responsible for substrate recognition and specificity. Members of the SCF E3 ligase family generally polyubiquitinate substrates that

are phosphorylated at specific sites, such as I κ B α , p27^{Kip1}, and c-Myc. Therefore, they play key roles in cell cycle regulation, signal transduction, and transcriptional activation [13, 55-57].

Analysis of the human genome suggests that there are more than 70 genes that encode for F-box proteins in mammals [55, 58]. So far, only a few SCFs have been characterized in detail. Among them, SCF ^{β TrCP1/Fbw1A} and SCF ^{β TrCP2/Fbw1B} play an essential role in innate immune response and inflammation. Indeed, SCF ^{β TrCP1/Fbw1A} specifically recognizes I κ B α , I κ B β , and I κ B ϵ as substrates only when these proteins are phosphorylated at both serine residues in the conserved DSGXXS motif by the IKK complex [2]. SCF ^{β TrCP2/Fbw1B} is also involved in I κ B α ubiquitination and degradation. Furthermore, SCF ^{β TrCP1/Fbw1A} contributes to the endocytosis and lysosomal degradation of INF- α/β receptor 1 (IFNAR1) ([59] and reference therein). Following ligand treatment, IFNAR1 is phosphorylated within its cytoplasmic tail on Ser535 and Ser539; this allows SCF ^{β TrCP1/Fbw1A} to bind to the ₅₃₄DSGNYS phosphodegron and polyubiquitinate a cluster of Lys residues (Fig. 3). Remarkably, it is proposed that SCF ^{β TrCP1/Fbw1A} conjugates both type of chains (Lys⁴⁸ and Lys⁶³) that are necessary but not sufficient for robust IFNAR1 turnover and internalization.

Targeted gene-disruption studies have demonstrated that IRF-3 is essential for the normal host response to pathogens [60]. On the other hand, sustained activation of IRF-3 can be detrimental for the host because it can lead to cell death and diseases, such as ischemia-reperfusion injuries of the liver and septic shock syndrome [61]. Virally induced phosphorylation is a prerequisite for the initiation of the presumed conformational changes that are responsible for unmasking the potent transactivation ability of IRF-3 (see [61] and reference therein). This activated form of IRF-3 is also subject to protein degradation. Notably, phosphorylation of the C-terminal end of IRF-3 by TBK1 and IKKi is involved in its proteasomal degradation [61]. Whether these phosphosites directly represent the phosphodegron, or they are a prerequisite for the phosphorylation of other sites involved in

the recognition of the E3 ligase is still an open question. Nevertheless, using a combination of pharmacological, biochemical, and genetic approaches, we proposed that phosphorylation of the C-terminal phosphoacceptor sites by the IKK-related kinases TBK1/IKKi creates a signal that leads to the recognition of IRF-3 by a Cullin-based ubiquitin ligase pathway that then induces the polyubiquitination-dependent degradation of IRF-3 [61] (Fig. 2). This conclusion was based on several observations. First, two unrelated protease inhibitors, MG-132 and lactacystin, stabilized the hyperphosphorylated-activated forms of IRF-3. Second, high molecular mass ubiquitin conjugates accumulated in MG-132-treated cells following viral infection. Third, the IRF-3 protein was stabilized at nonpermissive temperatures in cells that bear a thermolabile allele of E1. Fourth, blocking the NEDDylation pathway completely abrogated the degradation of IRF-3 following virus infection, which suggests the implication of a Cullin-based E3 ubiquitin ligase. Fifth, IRF-3 was recruited by Cullin1 following virus infection and stabilized in cells that overexpressed a Cullin1-N252 mutant that cannot associate with the RING domain-containing protein Rbx1. Given that Cul1 is one of the invariable components of SCF complexes, our data suggest an important role for this family of E3 ligases in the control of IRF-3 stability.

Overexpression of Cul1-N252 did not completely prevent IRF-3 degradation following SeV infection. This suggests that E3 ubiquitin ligases other than the SCF complex are likely to be involved in IRF-3 degradation. Notably, the phosphorylation of Ser 339 is also involved in IRF-3 ubiquitination and degradation [10, 62], a process that requires proline isomerase 1 (Pin1) and an unidentified E3 ubiquitin ligase. Ro52 is another recently identified candidate that is thought to be involved in IRF-3 ubiquitination and degradation (see section on TRIM 21).

1.5.1.3.4.2 ECS

ECS (EloB/C-Cul2/5-SOCS) is as SCF-like complex that contains Elongins B and C, Cullin 2 or 5, the RING finger protein Rbx/Roc1, and SOCS-box protein [63].

Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 is a well characterized negative regulator of JAK-STAT signaling. It was first described as an IFN-inducible protein that binds tyrosine-phosphorylated JAK molecules and blocks JAK kinase activity. In addition to its SH2 domain, SOCS-1 contains a SOCS box domain in its C-terminal region that allows for the binding of Elongin B/C and the recruitment of Cullin 2 or 5 and Rbx/Roc1. Like the SCF complex described above, SOCS-1 is the receptor that recognizes target proteins and induces their polyubiquitination. Thus, many tyrosine phosphorylated proteins, such as JAK2, ISR1-2, and oncogenic TEL-Jak2, are polyubiquitinated and degraded in an SOCS-1-dependent manner [64] (Fig. 3). Recently, MAL (TIRAP) was also shown to be a substrate of SOCS-1 [64, 65]. Following stimulation of TLRs that use the MAL adaptor protein (TLR2 and TLR4), MAL undergoes tyrosine phosphorylation by Bruton's tyrosine kinase (BTK), which allows it to be recognized by SOCS-1. This then mediates MAL's polyubiquitination and proteosomal degradation (Fig. 1). NF- κ B is also under the control of ECS. Notably, recent evidence demonstrates that the COMMD1 (copper metabolism gene MURR1 domain) controls the polyubiquitination of p65(RelA) and induces its nuclear degradation after TNF α stimulation [66]. In this situation, COMMD1 serves as a scaffold that increases the association between SOCS-1 and p65(RelA). It is possible that COMMD1 affect as well TLR signaling (Fig. 1).

1.5.1.3.5 RNF125

RNF125, also named TRAC-1 (T-cell RING protein in activation 1), was first identified as a positive regulator of T- cell activation [67]. This protein belongs to a novel family of small single RING E3 ligases known as RNF (RING finger protein). This family is characterized by an N-terminal RING domain followed by three atypical zinc finger motifs and a C-terminal UIM-type domain that binds Lys⁴⁸-linked polyubiquitin chains [68]. The recent characterization of RNF125 also revealed that both UIM and RING domains are required for its autoubiquitination and short half-life [68]. Importantly,

RNF125 is involved in the negative regulation of RIG-I signaling. Upon IFN α or poly I:C treatment, its expression is rapidly increased and leads to the polyubiquitination and degradation of RIG-I, MDA5, and IPS-/MAVS/CARDIF/ VISA [69] (Fig. 2).

1.5.1.3.6 SLIM/PDLIM2

The LIM domain was first described as a cysteine-rich sequence common to the following small group of homeodomain transcription factors: LIN11, Isl1, and MEC-3. Over 50 genes that encode for LIM domain-containing proteins have now been identified in the human genome. These LIM domains play important roles in mediating protein-protein interactions and are found on proteins with diverse biological functions. The LIM domain is composed of tandem two zinc-finger structures that are separated by a two-residue spacer [70]. This zinc-finger structure is similar to a RING finger domain; therefore not surprisingly, some of the LIM proteins function as E3 ubiquitin ligases [71, 72].

The STAT-interacting LIM protein (SLIM), also named PDLIM2 or Mystique, is a constitutively expressed nuclear protein that has a PDZ domain in its N-terminus and a LIM domain important for its E3 ubiquitin ligase activity in its C-terminus. It was first discovered in a yeast two-hybrid screen as a negative regulator of the IFN-STAT signaling cascade. In response to IFN α stimulation, SLIM/PDLIM2 can associate with polyubiquitinated STAT proteins (STAT1 and 4), causing their proteasome-dependent degradation [71] (Fig. 3). Moreover, SLIM/PDLIM2 is involved in STAT1 polyubiquitination and degradation upon LPS treatment of macrophages [73]. Furthermore, this E3 ubiquitin ligase has been identified as the negative regulator of p65 following LPS treatment. Indeed, SLIM/PDLIM2 binds p65 in the nucleus and, through its PDZ domain, acts as a chaperone to sequester p65 in PML bodies that are enriched for components of the 26S proteasome [72] (Fig. 1). Thus, by targeting both “early” (p65) and “delayed” (STATs) transcription factors, SLIM/PDLIM2 is an important negative regulator of PRR signaling.

1.5.1.4 Deubiquitin enzymes that regulate PRR and IFN signaling

Lys⁶³-linked polyubiquitination is essential for the activation of TAK1, MEKK3, IKK, and the IKK-related kinases. Thus, the negative feedback regulation of these kinases depends in part on DUB enzymes.

1.5.1.4.1 CYLD

The tumor suppressor cylindromatosis protein CYLD contains the cysteine and histidine boxes that are found in the ubiquitin-specific protease (UBP) family of DUB enzymes [74]. CYLD exhibits DUB activity and has an affinity restricted to Lys⁶³-linked ubiquitin chains. More importantly, it directly binds to NEMO, promoting its deubiquitination and abrogating NF- κ B activation [75]. CYLD may also use NEMO as a docking site for access to polyubiquitin chains found on TRAF2, TRAF6, and RIP1, leading to their deubiquitination (Fig. 1) [75, 76]. CYLD targets the cytoplasmic RNA sensor RIG-I and inhibits the polyubiquitination of this IKK β /TBK1 stimulator [77] (Fig. 2).

1.5.1.4.2 A20

A20 is another well-known IKK complex inhibitor. It contains a deubiquitinating enzyme domain, termed the ovarian tumor (OTU) domain, in its N-terminal region and an E3 ubiquitin ligase domain in its C-terminal region that contains seven novel zinc finger structures. Like CYLD, A20 is a cytoplasmic protein that is induced by NF- κ B and provides a negative feedback loop to regulate NF- κ B activity [78-80]. In the TNFR pathway, the OTU domain of A20 disassembles Lys⁶³-linked polyubiquitin chain from RIP1. RIP1 is then polyubiquitinated through Lys⁴⁸ by the fourth finger in the C-terminal zinc finger domain of A20, a process that rapidly leads to RIP1 degradation by the

proteasome [81]. Interestingly, A20 is required to terminate TLR-induced activation of the NF- κ B transcription factor by removing Lys⁶³-linked polyubiquitin chain from TRAF6 [82] (Fig. 1). Because RIP1 and TRAF6 are involved in TLR-mediated NF- κ B activation [31, 41], it is possible that A20 might also modulate RIP1 polyubiquitination and deubiquitination following TLR engagement.

In addition to activating NF- κ B, A20 efficiently inhibits TLR3- and RIG-I-mediated signaling to IRF-3 and NF- κ B transcription factors [83-85]. Overexpression of A20 inhibits the induction of ISG56 by a constitutively active version of RIG-I (Δ RIG-I) or following Sendai virus (SeV) infection [85]. A20 also inhibits the capacity of poly I:C, SeV and Newcastle Disease virus (NDV) to induce transactivation of ISRE, NF- κ B, and IFN β response elements [83, 84]. Conversely, silencing A20 expression enhanced ISRE-dependent transcription induced by virus infection, polyI:C treatment, and TBK1 overexpression [83, 85]. Although the C-terminal zinc finger domain of A20 is both necessary and sufficient to completely block Δ RIG-I-, NDV-, and polyI:C-mediated signaling [84, 85], the targets of A20 in TLR3- and RIG-I signaling cascades remain uncertain. TBK1 and IKKi interact with A20 [83] but are not prone to degradation in its presence [85]. On the other hand, A20 interacts with TRIF and could be involved in its instability [84, 85]. The complete loss of TRIF protein by A20 does not, however, correlate with the weak inhibition of TRIF-mediated transactivation [85]. RIG-I also interacts weakly with A20, and Δ RIG-I expression is reduced in the presence of A20. A20 inhibition of Δ RIG-I-mediated transactivation, however, was far greater than the decrease in Δ RIG-I protein. Therefore, it was suggested that the target of A20 is an unidentified RIG-I pathway adapter [85].

1.5.1.4.3 DUBA

A20 belongs to a subfamily of 14 DUBs characterized by an OTU domain. DUBA, another member of this family, acts as a negative regulator of the innate immune response [42]. Reduction of DUBA augmented the PRR-induced type I IFN response, and overexpression of DUBA abrogated it. Further experiments clearly demonstrated that the substrate of DUBA is TRAF3 (Figs. 1 and 2). Notably, DUBA selectively cleaved the Lys⁶³-linked polyubiquitin chains on TRAF3 that resulted in its dissociation from TBK1 and TANK. As for A20 and CYLD, the expression of DUBA is induced following LPS stimulation.

1.5.1.4.4 YopJ

Infectious pathogens are well-known to overcome cellular defenses by antagonizing the IFN response. For example, *Yersinia enterocolitica* delivers *Yersinia* Outer Protein (Yop)J, a cysteine protease, into the cytoplasm of the host cell and interferes with immune signal transduction to inhibit pro-inflammatory cytokine production. YopJ has DUB activity against TRAF2, TRAF6, and I κ B α because it cleaves both Lys⁴⁸- and Lys⁶³-linked chains [86, 87]. YopJ also affects TAK1 activation [86, 88] and blocks TLR-mediated IFN response by deubiquitinating TRAF3 [89] (Fig. 1).

1.5.1.5 Conclusion

The human genome encodes only for 25000 genes and in addition to alternative splicing, posttranslational modifications of proteins create the molecular diversity needed to elicit a proper response. For several years, phosphorylation was viewed as one of the most important posttranslational modifications leading to the activation of signaling cascades. There is now clear evidence that polyubiquitination works in parallel with phosphorylation

to orchestrate the overall physiological response. Phosphorylation and ubiquitination mechanisms share several common features that were recently reviewed [17]. Remarkably, one aspect of protein phosphorylation and dephosphorylation is the capacity of a limited number of protein kinases and phosphatases to target thousand of proteins. Recent studies presented in this review demonstrate that this rule also apply to polyubiquitination mechanisms observed in innate immune signaling. Thus one of the next challenge in this field will be to understand how these E3 ubiquitin ligases and DUBs enzymes are integrated in order to give the final proper response. The importance of polyubiquitination in the innate immune response is also reflected at the level of transcriptional feedback loop regulation, where several E3 ubiquitin ligases and DUBs are induced upon PRR or IFNR engagement (TRIM21, TRIM25, TRIM30 α , SOCS-1, RNF125, CYLD, A20, DUBA). In addition to their upregulation, these E3 ubiquitin ligases are likely regulated posttranslationally following exposition to PAMPs. One example of this is the recent demonstration that β -arrestin, a scaffold protein normally involved in G-protein-coupled receptor signaling and desensitization, negatively regulates TRAF6 [90].

1.5.1.6 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. A.B.P is recipient of a studentship from the Robert Dugal-Health Research Foundation.

1.5.1.7 References

1. Lee MS, Kim YJ. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem* 2007;76: 447-80.

2. Hacker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* 2006;2006: re13.
3. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001;410: 37-40.
4. Mamane Y, Heylbroeck C, Genin P, Algarte M, Servant MJ, LePage C, DeLuca C, Kwon H, Lin R, Hiscott J. Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* 1999;237: 1-14.
5. Peters RT, Liao SM, Maniatis T. IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible Ikbeta kinase complex. *Mol Cell* 2000;5: 513-22.
6. Shimada T, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Inoue J, Tatsumi Y, Kanamaru A, Akira S. IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to Ikbeta kinases. *Int Immunol* 1999;11: 1357-62.
7. Pomerantz JL, Baltimore D. NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *Embo J* 1999;18: 6694-704.
8. Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, Hiscott J. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 2003;300: 1148-51.
9. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2003;4: 491-6.
10. Clement JF, 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. *J Virol* 2008;82: 3984-96.

11. Panne D, McWhirter SM, Maniatis T, Harrison SC. Interferon regulatory factor 3 is regulated by a dual phosphorylation-dependent switch. *J Biol Chem* 2007;282: 22816-22.
12. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 2001;14: 778-809, table of contents.
13. Liu YC. Ubiquitin ligases and the immune response. *Annu Rev Immunol* 2004;22: 81-127.
14. Liu YC, Penninger J, Karin M. Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification. *Nat Rev Immunol* 2005;5: 941-52.
15. Varadan R, Assfalg M, Haririnia A, Raasi S, Pickart C, Fushman D. Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling. *J Biol Chem* 2004;279: 7055-63.
16. Hicke L, Schubert HL, Hill CP. Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6: 610-21.
17. Sun L, Chen ZJ. The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16: 119-26.
18. Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, Bernards R. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 2005;123: 773-86.
19. Hoebe K, Beutler B. TRAF3: a new component of the TLR-signaling apparatus. *Trends Mol Med* 2006;12: 187-9.
20. Bradley JR, Pober JS. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 2001;20: 6482-91.
21. Hacker H, Redecke V, Blagoev B, Kratchmarova I, Hsu LC, Wang GG, Kamps MP, Raz E, Wagner H, Hacker G, Mann M, Karin M. Specificity in Toll-like receptor

- signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 2006;439: 204-7.
22. Oganessian G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, Perry A, Cheng G. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 2006;439: 208-11.
 23. Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, Morony S, Capparelli C, Van G, Kaufman S, van der Heiden A, Itie A, Wakeham A, Khoo W, Sasaki T, Cao Z, Penninger JM, Paige CJ, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Goeddel DV, Mak TW. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* 1999;13: 1015-24.
 24. Gohda J, Matsumura T, Inoue J. Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *J Immunol* 2004;173: 2913-7.
 25. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001;412: 346-51.
 26. Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000;103: 351-61.
 27. Yamamoto M, Okamoto T, Takeda K, Sato S, Sanjo H, Uematsu S, Saitoh T, Yamamoto N, Sakurai H, Ishii KJ, Yamaoka S, Kawai T, Matsuura Y, Takeuchi O, Akira S. Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat Immunol* 2006;7: 962-70.

28. Kanayama A, Seth RB, Sun L, Ea CK, Hong M, Shaito A, Chiu YH, Deng L, Chen ZJ. TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell* 2004;15: 535-48.
29. Huang Q, Yang J, Lin Y, Walker C, Cheng J, Liu ZG, Su B. Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3. *Nat Immunol* 2004;5: 98-103.
30. Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, Matsumoto K, Takeuchi O, Akira S. Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005;6: 1087-95.
31. Cusson-Hermance N, Khurana S, Lee TH, Fitzgerald KA, Kelliher MA. Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF-kappaB activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J Biol Chem* 2005;280: 36560-6.
32. Conze DB, Wu CJ, Thomas JA, Landstrom A, Ashwell JD. Lys63-linked polyubiquitination of IRAK-1 is required for interleukin-1 receptor- and toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 2008;28: 3538-47.
33. Wu CJ, Conze DB, Li T, Srinivasula SM, Ashwell JD. Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]. *Nat Cell Biol* 2006;8: 398-406.
34. Windheim M, Stafford M, Peggie M, Cohen P. Interleukin-1 (IL-1) induces the Lys63-linked polyubiquitination of IL-1 receptor-associated kinase 1 to facilitate NEMO binding and the activation of IkappaBalpha kinase. *Mol Cell Biol* 2008;28: 1783-91.
35. Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G, Chen ZJ. Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* 2006;22: 245-57.

36. Adhikari A, Xu M, Chen ZJ. Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene* 2007;26: 3214-26.
37. Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, Kano S, Honda K, Ohba Y, Mak TW, Taniguchi T. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 2005;434: 243-9.
38. Kawai T, Sato S, Ishii KJ, Coban C, Hemmi H, Yamamoto M, Terai K, Matsuda M, Inoue J, Uematsu S, Takeuchi O, Akira S. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* 2004;5: 1061-8.
39. Honda K, Yanai H, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, Ohba Y, Takaoka A, Yeh WC, Taniguchi T. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101: 15416-21.
40. Jiang Z, Mak TW, Sen G, Li X. Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101: 3533-8.
41. Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, Tschopp J. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 2004;5: 503-7.
42. 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. DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production. *Science* 2007;318: 1628-32.
43. Saha SK, Pietras EM, He JQ, Kang JR, Liu SY, Oganessian G, Shahangian A, Zarnegar B, Shiba TL, Wang Y, Cheng G. Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *Embo J* 2006;25: 3257-63.

44. 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. Lipopolysaccharide-mediated interferon regulatory factor activation involves TBK1-IKKepsilon-dependent Lys(63)-linked polyubiquitination and phosphorylation of TANK/I-TRAF. *J Biol Chem* 2007;282: 31131-46.
45. Guo B, Cheng G. Modulation of the interferon antiviral response by the TBK1/IKK α adaptor protein TANK. *J Biol Chem* 2007;282: 11817-26.
46. Van der Reijden BA, Erpelinck-Verschueren CA, Lowenberg B, Jansen JH. TRIADs: a new class of proteins with a novel cysteine-rich signature. *Protein Sci* 1999;8: 1557-61.
47. Chuang TH, Ulevitch RJ. Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2004;5: 495-502.
48. Fearn C, Pan Q, Mathison JC, Chuang TH. Triad3A regulates ubiquitination and proteasomal degradation of RIP1 following disruption of Hsp90 binding. *J Biol Chem* 2006;281: 34592-600.
49. Nisole S, Stoye JP, Saib A. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* 2005;3: 799-808.
50. Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 2007;446: 916-920.
51. Nakasato N, Ikeda K, Urano T, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. A ubiquitin E3 ligase Efp is up-regulated by interferons and conjugated with ISG15. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;351: 540-6.
52. Higgs R, Jefferies CA. Targeting IRFs by ubiquitination: regulating antiviral responses. *Biochem Soc Trans* 2008;36: 453-8.

53. Kong HJ, Anderson DE, Lee CH, Jang MK, Tamura T, Taylor P, Cho HK, Cheong J, Xiong H, Morse HC, 3rd, Ozato K. Cutting edge: autoantigen Ro52 is an interferon inducible E3 ligase that ubiquitinates IRF-8 and enhances cytokine expression in macrophages. *J Immunol* 2007;179: 26-30.
54. Shi M, Deng W, Bi E, Mao K, Ji Y, Lin G, Wu X, Tao Z, Li Z, Cai X, Sun S, Xiang C, Sun B. TRIM30 alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation. *Nat Immunol* 2008;9: 369-77.
55. Cardozo T, Pagano M. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5: 739-51.
56. Willems AR, Schwab M, Tyers M. A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim Biophys Acta* 2004;1695: 133-70.
57. Okayama Y, Kawakami T. Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol Res* 2006;34: 97-115.
58. Nakayama KI, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6: 369-81.
59. Kumar KG, Barriere H, Carbone CJ, Liu J, Swaminathan G, Xu P, Li Y, Baker DP, Peng J, Lukacs GL, Fuchs SY. Site-specific ubiquitination exposes a linear motif to promote interferon-alpha receptor endocytosis. *J Cell Biol* 2007;179: 935-50.
60. Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N, Taniguchi T. 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: 539-48.
61. Bibeau-Poirier A, Gravel SP, Clement JF, Rolland S, Rodier G, Coulombe P, Hiscott J, Grandvaux N, Meloche S, Servant MJ. Involvement of the I kappa B kinase (IKK)-related kinases tank-binding kinase 1/IKKi and cullin-based ubiquitin ligases in IFN regulatory factor-3 degradation. *J Immunol* 2006;177: 5059-67.

62. Saitoh T, Tun-Kyi A, Ryo A, Yamamoto M, Finn G, Fujita T, Akira S, Yamamoto N, Lu KP, Yamaoka S. Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat Immunol* 2006;7: 598-605.
63. Kile BT, Schulman BA, Alexander WS, Nicola NA, Martin HM, Hilton DJ. The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends Biochem Sci* 2002;27: 235-41.
64. Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2007;7: 454-65.
65. Mansell A, Smith R, Doyle SL, Gray P, Fenner JE, Crack PJ, Nicholson SE, Hilton DJ, O'Neill LA, Hertzog PJ. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat Immunol* 2006;7: 148-55.
66. Maine GN, Mao X, Komarck CM, Burstein E. COMMD1 promotes the ubiquitination of NF-kappaB subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase. *Embo J* 2007;26: 436-47.
67. Zhao H, Li CC, Pardo J, Chu PC, Liao CX, Huang J, Dong JG, Zhou X, Huang Q, Huang B, Bennett MK, Molineaux SM, Lu H, Daniel-Issakani S, Payan DG, Masuda ES. A novel E3 ubiquitin ligase TRAC-1 positively regulates T cell activation. *J Immunol* 2005;174: 5288-97.
68. Giannini AL, Gao Y, Bijlmakers MJ. T-cell regulator RNF125/TRAC-1 belongs to a novel family of ubiquitin ligases with zinc fingers and a ubiquitin-binding domain. *Biochem J* 2008;410: 101-11.
69. Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, Konishi H, Fujita T, Shimotohno K. Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104: 7500-5.

70. Kadrmas JL, Beckerle MC. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5: 920-31.
71. Tanaka T, Soriano MA, Grusby MJ. SLIM is a nuclear ubiquitin E3 ligase that negatively regulates STAT signaling. *Immunity* 2005;22: 729-36.
72. Tanaka T, Grusby MJ, Kaisho T. PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF-kappaB activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit. *Nat Immunol* 2007;8: 584-91.
73. Gao C, Guo H, Mi Z, Grusby MJ, Kuo PC. Osteopontin induces ubiquitin-dependent degradation of STAT1 in RAW264.7 murine macrophages. *J Immunol* 2007;178: 1870-81.
74. 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. Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat Genet* 2000;25: 160-5.
75. Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israel A, Wallach D, Courtois G. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* 2003;424: 801-5.
76. Trompouki E, Hatzivassiliou E, Tschirritzis T, Farmer H, Ashworth A, Mosialos G. CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature* 2003;424: 793-6.
77. Zhang M, Wu X, Lee AJ, Jin W, Chang M, Wright A, Imaizumi T, Sun SC. Regulation of IKK-related kinases and antiviral responses by tumor suppressor CYLD. *J Biol Chem* 2008.

78. Beyaert R, Heyninck K, Van Huffel S. A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor-kappa B-dependent gene expression and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2000;60: 1143-51.
79. Heyninck K, Beyaert R. A20 inhibits NF-kappaB activation by dual ubiquitin-editing functions. *Trends Biochem Sci* 2005;30: 1-4.
80. Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* 2005;7: 758-65.
81. Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, Wu P, Wiesmann C, Baker R, Boone DL, Ma A, Koonin EV, Dixit VM. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* 2004;430: 694-9.
82. Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad RC, Wheeler MT, Tsui C, Hurley P, Chien M, Chai S, Hitotsumatsu O, McNally E, Pickart C, Ma A. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* 2004;5: 1052-60.
83. Saitoh T, Yamamoto M, Miyagishi M, Taira K, Nakanishi M, Fujita T, Akira S, Yamamoto N, Yamaoka S. A20 is a negative regulator of IFN regulatory factor 3 signaling. *J Immunol* 2005;174: 1507-12.
84. Wang YY, Li L, Han KJ, Zhai Z, Shu HB. A20 is a potent inhibitor of TLR3- and Sendai virus-induced activation of NF-kappaB and ISRE and IFN-beta promoter. *FEBS Lett* 2004;576: 86-90.
85. Lin R, Yang L, Nakhaei P, Sun Q, Sharif-Askari E, Julkunen I, Hiscott J. Negative regulation of the retinoic acid-inducible gene I-induced antiviral state by the ubiquitin-editing protein A20. *J Biol Chem* 2006;281: 2095-103.

86. Haase R, Richter K, Pfaffinger G, Courtois G, Ruckdeschel K. Yersinia outer protein P suppresses TGF-beta-activated kinase-1 activity to impair innate immune signaling in Yersinia enterocolitica-infected cells. *J Immunol* 2005;175: 8209-17.
87. Zhou H, Monack DM, Kayagaki N, Wertz I, Yin J, Wolf B, Dixit VM. Yersinia virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF-kappa B activation. *J Exp Med* 2005;202: 1327-32.
88. Thiefes A, Wolf A, Doerrie A, Grassl GA, Matsumoto K, Autenrieth I, Bohn E, Sakurai H, Niedenthal R, Resch K, Kracht M. The Yersinia enterocolitica effector YopP inhibits host cell signalling by inactivating the protein kinase TAK1 in the IL-1 signalling pathway. *EMBO Rep* 2006;7: 838-44.
89. Sweet CR, Conlon J, Golenbock DT, Goguen J, Silverman N. YopJ targets TRAF proteins to inhibit TLR-mediated NF-kappaB, MAPK and IRF3 signal transduction. *Cell Microbiol* 2007;9: 2700-15.
90. Wang Y, Tang Y, Teng L, Wu Y, Zhao X, Pei G. Association of beta-arrestin and TRAF6 negatively regulates Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 2006;7: 139-47.
91. 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. TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway. *Immunity* 2008;28: 651-61.

1.5.1.8 Figure legends

Figure 1. Polyubiquitination mechanisms observed in TLR4 signaling. Upon TLR4 engagement, several effectors are recruited through the homodimerized receptors. See text for details. Posttranslational modifications are show as follow: yellow cicles, phosphorylation; black circles, Lys⁴⁸-linked polyubiquitination; red circles, Lys⁶³-linked polyubiquitination. The signaling events induced upon TLR3 engagement are not shown but are identical as the TLR4-TRIF-dependent pathway (without TRAM).

Figure 2. Polyubiquitination mechanisms observed in RLH signaling. Dectection of viral nucleic acids by the RNA helicases allow an interaction with Cardif. The Cardif-bound TRADDosome [91] composed of TRADD, RIP1 and FADD allow the activation of NF- κ B. Through the TRAF-interating motifs (TIM), Cardif also recruits TRAF6 and TRAF3 to induce the activation of the IKK complex and TBK1-IKKi respectively. See text for details. Posttranslational modifications are show as follow: yellow circles, phosphorylation; black circles, Lys⁴⁸-linked polyubiquitination; red circles, Lys⁶³-linked polyubiquitination.

Figure 3. Polyubiquitination mechanisms observed in IFNR signaling. See text for details. Posttranslational modifications are show as follow: yellow circles, phosphorylation; black circles, Lys⁴⁸-linked polyubiquitination; red circles, Lys⁶³-linked polyubiquitination.

Table I. Summary of the different E3 ubiquitin ligases involved in innate immune signaling.

1.5.1.9 Figures

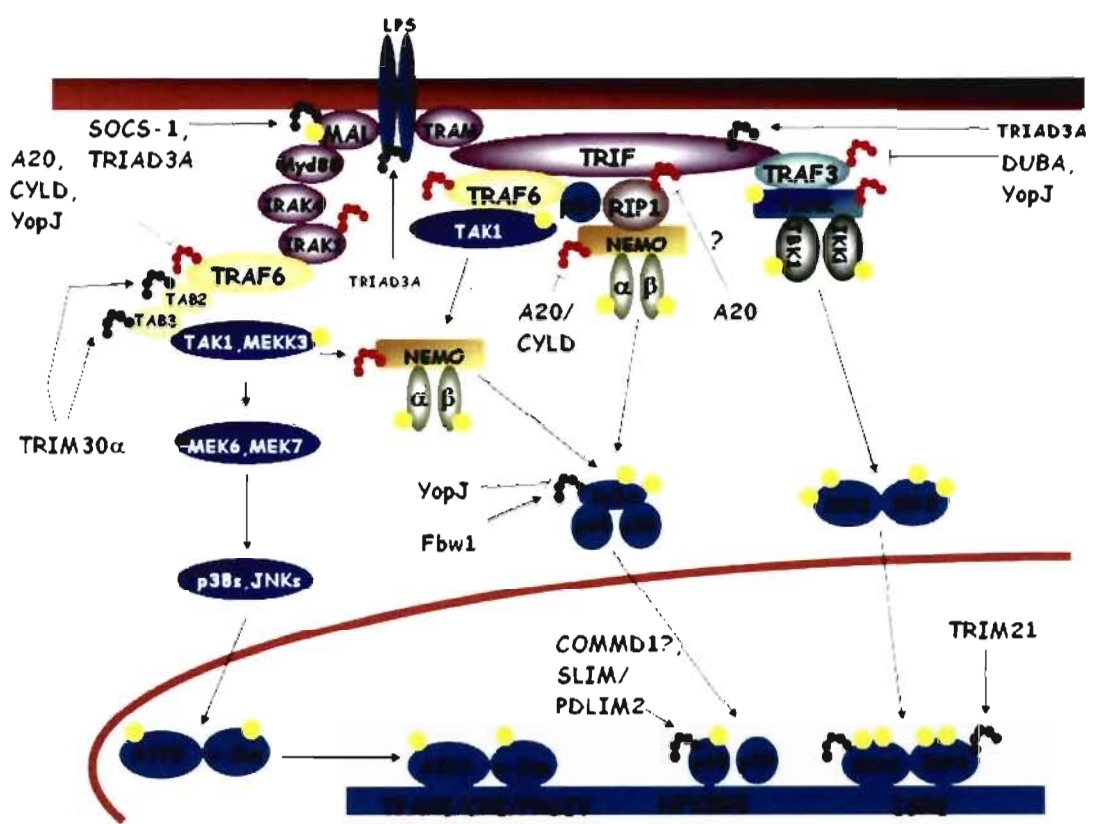


FIGURE 1

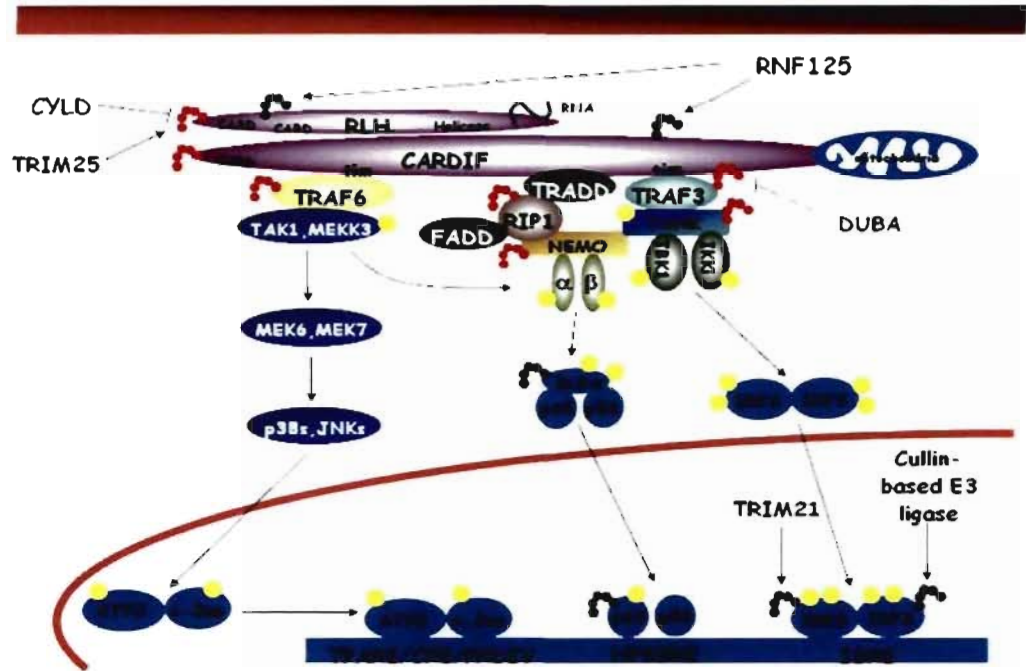


FIGURE 2

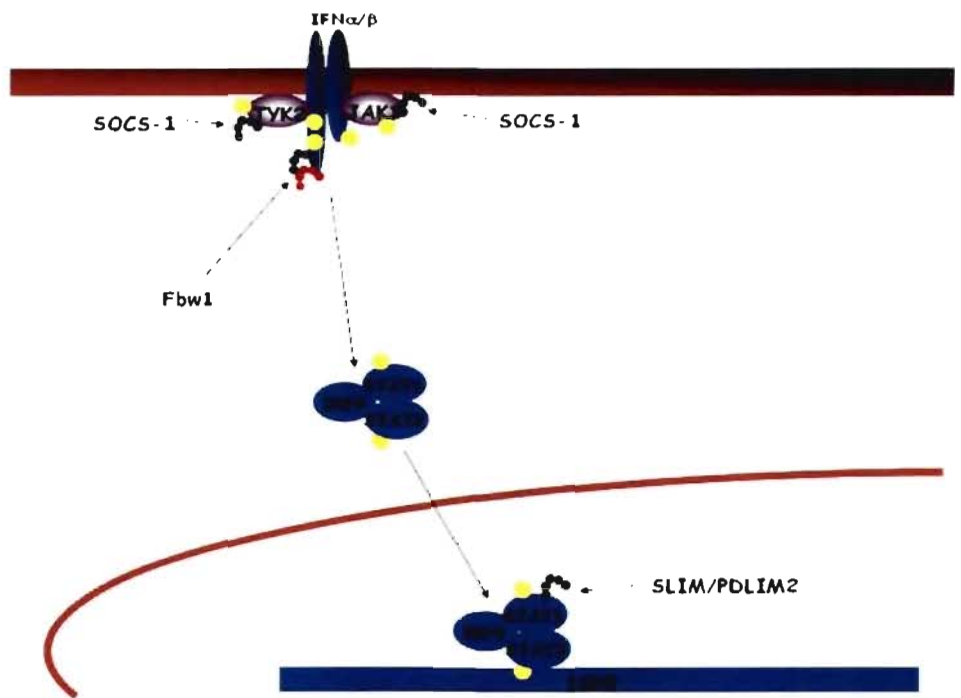


FIGURE 3

1.5.1.10 Tables

Enzyme type	Substrat	Regulation Type	References
E3 ubiquitin ligases			
TRAFs			
TRAF6	TRAF6, NEMO, RIP1, IRAK1, IRF7	+	[25], [26], [30], [31], [32], [38], [39]
TRAF3	TRAF3, TANK	+	[42], [43], [44]
Triad3A	TLR9, (TLR3, 4 & 5?), MAL, TRIF, RIP1	-	[47], [48]
TRIMs			
TRIM25	RIG-I	+	[50]
TRIM21	IRF3 IRF8	- +	[52] [53]
TRIM30□	TAB2, TAB3	-	[54]
SCF complex			
□TrCP1/Fbw1A	IκB□, IκB□, IκB□, IFNAR1	-	[2], [59]
□TrCP2/Fbw1B	IκB□,	-	[2]
unknow	IRF3	-	[61]
ECS			
SOCS-1	JAK2, ISR1-2, TEL-Jak2, MAL	-	[65], [64]
COMMD1	p65	-	[66]
RNF125	RIG-I, Mda5, IPS-1	-	[69]
SLIM/PDLIM2	STAT1, STAT4, p65	-	[71], [73], [72]
DUBs			
CYLD	NEMO, TRAF2, TRAF6, RIP1, RIG-I	-	[75], [76], [77]
A20	RIP1, TRAF6, (TRIF?), RIG-I	-	[81], [82], [84], [85]
DUBA	TRAF3	-	[42]
YopJ	TRAF2, TRAF6, IκB□, TRAF3	-	[86], [87], [89]

2. Hypothèse et objectifs de travail

Suite à l'infection d'une cellule hôte par un pathogène, il y a une activation rapide des PRRs de signalisation (TLRs, RLHs et DAI), responsables du recrutement et de l'activation de facteurs de transcription latents nécessaires à l'induction de gènes responsables de la clairance de l'agent infectieux. Parmi ces effecteurs, le facteur de transcription IRF3 est un médiateur essentiel de cette réponse. IRF3 est constitutivement exprimé dans tous les tissus, et dans des conditions normales, il est sous forme de latence dans le cytoplasme. Suite à une infection par un pathogène, ce dernier est phosphorylé par les protéines kinases TBK1 et IKKi sur certains résidus spécifiques localisés dans sa portion C-terminale. Ainsi, IRF-3 s'homodimérise et s'accumule au noyau afin de lier ses éléments de réponse et de moduler l'expression de plusieurs gènes, tels que RANTES et IP-10 (chimiokine) et les IFNs de type I (cytokines), essentiels pour induire une réponse adéquate contre l'agent pathogène.

Étant donné qu'IRF3 module l'expression de plusieurs gènes primordiaux pour générer une réponse antivirale puissante et rapide, plusieurs virus ont développé des stratégies afin d'antagoniser ses effets, notamment en induisant sa dégradation. Opposément, les effets biologiques engendrés par une activation incontrôlée d'IRF3 peuvent nuire aux cellules hôtes et induire certaines pathologies, telles que le choc endotoxique ou des maladies autoimmunes (lupus). Par conséquent, l'activité d'IRF-3 a besoin d'être contrôlée de façon très stricte par les cellules.

Le système ubiquitine-protéasome (UPS) joue un rôle important dans la régulation du niveau d'expression de plusieurs protéines nécessaires à différents processus cellulaires, comme par exemple des facteurs de transcription. Bien que le processus d'ubiquitination ait été d'abord identifié pour moduler la dégradation des protéines par le protéasome, il est également reconnu pour réguler plusieurs autres fonctions dans la cellule. La versatilité et la spécificité de ce système de marquage protéique sont modulées par la grande famille des E3 ligases.

Au début de mon doctorat, il avait été démontré que suite à son activation par des virus à ARN, à ADN ou par le polyI:C, IRF-3 était dégradé^{141, 208, 210, 211}. Cependant, les mécanismes moléculaires menant à cette dégradation restaient peu caractérisés. Dans cette optique, à la lumière des connaissances de l'époque, les travaux de ma thèse avaient pour objectif principal de caractériser les voies de signalisation et les processus moléculaires impliqués dans la dégradation des formes hyperactives d'IRF3. Puisqu'il avait été démontré que cette déstabilisation était prévenue par un inhibiteur du protéasome (MG132), **nous avons suggéré qu'IRF3 était un substrat du système UPS**. Aussi, étant donné que ce facteur de transcription était dégradé suite à une infection virale, **nous avons proposé que la phosphorylation en C-terminal d'IRF3 était un signal de déstabilisation**.

Pour répondre à ces hypothèses de travail, deux objectifs ont été énoncés :

1. **Caractériser les voies de signalisation et les partenaires impliqués dans la dégradation d'IRF3** (voir le premier manuscrit, chapitre 3);

Conclusion des résultats obtenus : L'utilisation d'approches pharmacologiques, biochimiques et génétiques nous a permis de caractériser les voies de signalisation de la cellule hôte qui modulent spécialement le niveau d'expression d'IRF-3. D'abord, IRF-3 est phosphorylé dans sa portion C-terminale par les protéines kinases IKKi/TBK1; et ensuite, il est polyubiquitiné en partie par une E3 ligase de type complexe SCF. Ce processus est important pour induire la dégradation d'IRF3 par le protéasome.

2. **Identifier les résidus lysines, les récepteurs majeurs de l'ubiquitine, impliqués dans la régulation de l'activité d'IRF3** (voir le deuxième manuscrit, chapitre 4);

Conclusion des résultats obtenus : L'utilisation de plusieurs approches moléculaires, biochimiques et de biologie cellulaire nous a permis de caractériser le rôle de la lysine en position 77 (K77), qui est un résidu hautement conservé chez tous les IRFs, dans la régulation de l'activité transcriptionnelle d'IRF3. Nous avons démontré que la K77 est essentielle pour l'association d'IRF3 à l'ADN et que ce résidu est probablement

acétylé *in vivo* par les histones acétyltransférases CBP/p300 de façon dépendante des protéines kinases TBK1/IKKi. Finalement, nos résultats remettent en question le rôle de la séquence NLS atypique dans l'accumulation nucléaire d'IRF3.

Référence :

Bibeau-Poirier A, Gravel SP, Clément JF, Rolland S, Rodier G, Coulombe P, Hiscott J, Grandvaux N, Meloche S, Servant MJ. **Involvement of the I κ B kinase (IKK)-related kinases tank-binding kinase 1/IKKi and cullin-based ubiquitin ligases in IFN regulatory factor-3 degradation.** *J Immunol.* 2006 Dec 15; 177 (8):5059-67.

Contribution de chaque auteur pour cet article :

Bibeau-Poirier A : 90% du travail de laboratoire;

Gravel SP: Production du virus HCMV;

Clément JF: Produit quelques expériences qui n'ont pas été publiées;

Rolland S: Produit une première expérience sur l'ubiquitination;

Rodier G: Nous a fournit les lignées cellulaires Ts20 et Ts41 et plusieurs conseils;

Coulombe P: Nous a fournit les lignées cellulaires Ts20 et Ts41 et plusieurs conseils;

Hiscott J: Nous a fournit les cellules TBK1-/-;

Grandvaux N: Nous a fournit les cellules TBK1-/-;

Meloche S: Directeur de P Coulombe et G Rodier;

Servant MJ: Investigateur du projet, directeur scientifique et écriture de l'article;

3. Involvement of the IKK-related kinases TBK1/IKKi and Cullin-based Ubiquitin Ligases in IRF-3 Degradation

Annie Bibeau-Poirier^{*}, Simon-Pierre Gravel^{*}, Jean-François Clément^{*}, Sébastien Rolland^{*}, Geneviève Rodier[†], Philippe Coulombe[†], John Hiscott[§], Nathalie Grandvaux[‡], Sylvain Meloche[†] and Marc. J. Servant^{*}

^{*}Faculty of Pharmacy, [†]Institute of Research in Immunology and Cancer, [‡]Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and Department of Biochemistry, University of Montreal, Montreal, H3C 3J7, Canada and [§]Lady Davis Institute for Medical Research, McGill University, Montreal, H3T 1E2, Canada.

Running title: Ubiquitin-dependent degradation of IRF-3

Address correspondence to: Marc Servant, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7, [REDACTED]

Keywords: Viral, kinases, transcription factors, signal transduction

3.1 Abstract

Activation of the innate arm of the immune system following pathogen infection relies on the recruitment of latent transcription factors involved in the induction of a subset of genes responsible for viral clearance. One of these transcription factors, Interferon Regulatory Factor (IRF)-3, is targeted for proteosomal degradation following virus infection. However, the molecular mechanisms involved in this process are still unknown. Here, we show that polyubiquitination of IRF-3 increases in response to Sendai virus infection. Using an E1 temperature-sensitive cell line, we demonstrate that polyubiquitination is required for the observed degradation of IRF-3. Inactivation of NEDD8-activating E1 enzyme also results in stabilization of IRF-3 suggesting the NEDDylation also plays a role in IRF-3 degradation following Sendai virus infection. In agreement with this observation, IRF-3 is recruited to Cullin1 following virus infection and overexpression of a dominant negative mutant of Cullin1 significantly inhibits the degradation of IRF-3 observed in infected cells. We also asked whether the C-terminal cluster of phosphoacceptor sites of IRF-3 could serve as a destabilization signal and we therefore measured the half-life of C-terminal phosphomimetic IRF-3 mutants. Interestingly, we found them to be short-lived in contrast to wild-type IRF-3. In addition, no degradation of IRF-3 was observed in TBK1^{-/-} mouse embryonic fibroblasts. All together, these data demonstrate that virus infection stimulates a host cell signaling pathway that modulates the expression level of IRF-3 through its C-terminal phosphorylation by the IKK-related kinases followed by its polyubiquitination, which is mediated in part by a Cullin-based ubiquitin ligase.

3.2 Introduction

In response to pathogens, infected cells activate multiple signaling cascades involved in the induction of latent transcription factors. These transcription factors are responsible for the induction of a repertoire of genes known to impede pathogens' survival in the host (reviewed in (1)). One of these transcription factors, Interferon Regulatory Factor (IRF)-3 is essential for the normal host response to pathogens (reviewed in (2)). Several reports have now documented the activation of IRF-3 following infection with RNA viruses, as well as DNA viruses (3-8). These infectious particles activate several kinases in the host including the recently described I κ B kinase (IKK) homologs, IKK ϵ (9), also called IKK-i (10), and Tank-binding kinase (TBK)1 (11). These kinases target a Ser-Thr rich cluster located in the C-terminal end of IRF-3 (3, 8, 12, 13) (for review see (2)). Phosphorylation of IRF-3 induces its homodimerization and accumulation into the nucleus where it induces gene transcription through recognition of specific DNA response elements located in the promoters of genes encoding the chemokines IL-15, IP-10 and RANTES, as well as cytokines such as the Type I interferon (12, 14-16).

It has been suggested that following virus infection, IRF-3 is targeted for degradation by the proteasome based on the observation that MG-132, a proteasome inhibitor, abrogates its degradation (17, 18). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway plays key roles in regulating the levels of many proteins involved in diverse cellular processes. Proteins targeted for degradation are first tagged with a polyubiquitin chain in a three-step cascade reaction involving ubiquitin activation (catalyzed by the ubiquitin-activating enzyme (E1)), ubiquitin transfer (catalyzed by a ubiquitin carrier protein or conjugating enzyme (E2)) and ubiquitin ligation (catalyzed by a ubiquitin-protein ligase enzyme (E3)) (see (19, 20) for reviews). There are two major groups of E3s classified according to a common motif shared by one of the enzyme components: the Homology to the E6-associated protein Carboxyl Terminus (HECT) domain-containing E3s and the Really Interesting New Gene (RING) domain-containing E3s (reviewed in (19)). Other

RING-like domain-containing E3 ligases have also been identified and include the PIAS family SUMO ligases, the plant homeodomain (PHD) domain-containing E3s and the U-box E3s. The RING family represents the largest class of E3s, which are found in single subunits or multicomponent protein complexes (see (21, 22) for reviews). The best characterized of these multi-subunit complexes consist of the three invariable subunits Skp1, Cullin1 (Cul1) and the RING finger protein Rbx1/Roc1 and a variable component known as the F-box protein. Together they formed a ubiquitin-protein ligase complex termed SCF (Skp1-Cul1-F-box) (21, 22). Whereas Rbx1/Roc1 proteins are thought to provide a docking site for the E2 enzyme, the F-box proteins act as receptors and are responsible for substrates recognition and specificity. Members of the SCF E3 ligases family generally polyubiquitinate substrates phosphorylated at specific sites such as I κ B α , p27^{Kip1} and c-Myc and therefore play a key role in the regulation of the cell cycle, signal transduction and transcriptional activation (23-26). NEDD8 is a mammalian member of ubiquitin-like (Ubl) proteins, which modify proteins in a manner similar to ubiquitin (reviewed in (27)). The ability of SCF E3 ligases to ubiquitinate their substrates is enhanced by covalent modification of Cul1 proteins with NEDD8. This NEDDylation of Cul1 on arginine 720 is thought to result in an increased affinity of SCF E3 ligases for some E2 enzymes (28). The NEDDylation reaction requires the coordinated action of APP-BPI/Uba3 (a heterodimeric E1-like enzyme) and UBC12 (an E2-like enzyme) (29, 30).

Many viruses execute multiple immune-evasive activities in infected cells by targeting the type 1 Interferon (IFN) signaling pathway (5, 31). Notably, it was recently reported that a viral product from rotavirus, the nonstructural protein 1 (NSP1), induces a rapid degradation of IRF-3 through a proteasome-dependent pathway (32). On the other hand, uncontrolled IRF-3 activation is detrimental for the host since reports have demonstrated a role of activated IRF-3 in septic shock syndrome, ischemia-reperfusion injury of the liver as well as apoptosis (33-37). Thus, IRF-3 activity needs to be strictly controlled. In this context, the host cell-mediated degradation of IRF-3 following virus infection may play an important role in the termination of an IRF-3 mediated response.

This study was undertaken to characterize the cellular mechanisms involved in IRF-3 degradation following virus infection.

3.3 Materials and Methods

3.3.1 Reagent, antibodies, and plasmids

MG-132 and Lactacystin were purchased from Boston Biochem. Doxycyclin was obtained from Sigma. Poly(I:C) (Amersham-Pharmacia) was reconstituted in PBS at 2 mg/ml, denatured at 55°C for 30 min, and allowed to anneal to room temperature before use. N,N,N',N',-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN) was obtained from Sigma. Commercial antibodies were from the following suppliers: anti-IRF-3 antibodies specific for human and rodent species were from Immuno-Biological Laboratories Co. (IBL, Japan) and Zymed respectively; anti-IKK ϵ antibody (IMG-270A) (that recognize as well TBK1) was from Imgenex (San Diego, CA); anti-ubiquitin monoclonal antibody (clone P4D1) and monoclonal antibody to MYC were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); monoclonal antibodies to HA (clone HA-7) and Flag epitopes and β -actin (clone AC-74) were from Sigma. Plasmids encoding for Flag-wtIRF-3, Flag-IRF3 5D, Flag-IRF-3 J2D, Flag-IRF-3 7D, Flag-IRF-3 5A, and Myc-wtIRF-3 have been described (17, 38). Plasmids encoding for Flag-IKKiwt and the dominant negative version Flag-IKKi K38A were kind gifts of Dr. Rongtuan Lin (McGill University, Montreal, Qc). Flag-Cull1 was a gift from Dr. Michele Pagano (New York University School of Medicine). pMT123-HA-ubiquine has been described (39).

3.3.2 Cell types, transfection and virus strains.

The ts20 and ts41 were used as previously described (39, 40). TBK1 wild type and knockout murine embryonic fibroblasts (MEFs) have been described (8) and were

immortalized using the 3T3 protocol (41). Immortalized MEFs were maintained in minimal essential medium (MEM) containing 10% FBS, 2 mM glutamine, 0.1 mM nonessential amino acids. The Tet-inducible cell line HEK 293 expressing a dominant negative version of Cull1 (Flag-Cul1 N252) was a kind gift of Michele Pagano (New York University School of Medicine) and cultured in DMEM containing 10% FBS tetracycline-free fetal bovine serum (FBS). Human diploid fibroblasts (Hel 299), HeLa and human embryonic Kinney 293T cell lines (293T) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in DMEM containing 10% FBS. 293T cells were transfected with the calcium phosphate coprecipitation method. HeLa cells were transfected with Lipofectamine 2000. When specified, cells were also transfected with 12.5 μ g of poly(I:C) in 30 μ l of Lipofectamine2000. An HCMV Towne strain was obtained from ATCC and propagated as previously described (3). Sendai virus (SeV) was obtained from Specific Pathogen-Free Avian Supply (SPAFAS).

3.3.3 Infection

Cells were infected with HCMV Towne strain at a multiplicity of infection (MOI) of 1.0 plaque forming unit (pfu)/cell or with SeV at 100 hemagglutinating units (HAU)/ 10^6 cells for 2 hours in serum free medium (SFM). Then the SFM was replaced with complete media for the rest of the kinetic.

3.3.4 Immunoprecipitation, Immunoblot analysis and Native-PAGE

Preparation of whole cell extracts, immunoprecipitation, Native-PAGE and immunoblot analysis were performed as described previously (3, 42).

3.3.5 In vivo ubiquitination assays

To monitor the polyubiquitination of IRF-3, cells were lysed in a RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM sodium fluoride, 40 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% sodium deoxycholate and protease inhibitors cocktail (Sigma)). Cells lysates were transferred to microcentrifuge tubes and passed through a 25-gauge needle five times and then centrifuged at 14,000 rpm for 20 min at 4°C. Immunoprecipitated IRF-3 (epitope tagged or endogenous) was washed 5 times with RIPA buffer prior to electrophoresis on 7.5% acrylamide gels. Proteins were electrophoretically transferred to Hybound-C nitrocellulose membranes and polyubiquitinated IRF-3 was detected by immunoblotting using monoclonal anti-HA or anti-ubiquitin antibodies.

3.3.6 Biosynthetic Labeling Experiments

To examine the stability of the different IRF-3 phosphomimetic point mutants, transiently transfected HeLa cells in 60-mm Petri dishes were pulse-labeled for 2 h with 170 μ Ci/ml of [³⁵S]methionine and [³⁵S]cysteine and then chased for the indicated times in complete medium containing excess methionine and cysteine. The cells were then washed twice with ice-cold PBS and lysed in Triton X-100 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM sodium fluoride, 40 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, and protease inhibitors cocktail (Sigma)). Lysates (300 μ g protein) were precleared for 1 h with 2 μ g of normal mouse serum and the resulting supernatants were incubated with protein G-Sepharose beads preabsorbed with 2 μ g of anti-Flag for 16 h at 4°C. Immune complexes were washed five times with Triton X-100 lysis buffer. Proteins were eluted by heating at 95°C for 5 min in denaturing sample buffer and analyzed by SDS-gel electrophoresis on 10% acrylamide gels. The IRF-3 proteins were detected by fluorography and visualized using a gel documentation device

(Typhoon scanner 9410, Amersham Biosciences) for densitometric analysis. For qualitative measurement of the stability of the different IRF-3 phosphomimetic point mutants, transiently transfected HeLa cells in 60-mm were treated with 100 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide (cycloheximide chase) for up to 8 hours. Cell extracts were prepared and subjected to immunoblotting analysis.

3.4 Results

3.4.1 Virus infection results in proteasome-dependent degradation of IRF-3

IRF-3 activation has been observed with both DNA and RNA enveloped viruses. In addition to its activation, a number of studies have shown that IRF-3 is degraded following infection with RNA viruses such as Vesicular Stomatitis Virus, Newcastle disease virus, Measles virus and SeV (6-8, 17, 18, 38, 42, 43). On the opposite, DNA viruses such as the Herpesvirus family member HSV-1 do not induce IRF-3 degradation (6). Since human cytomegalovirus (HCMV), another Herpesvirus family member, was recently shown to induce IRF-3 activation and degradation (3, 44), we wanted to revisit the possibility that both RNA as well as DNA viruses target IRF-3 to the proteasome. Infection of Hel 299 fibroblasts with SeV resulted in a dramatic reduction in the steady-state level of IRF-3 (Fig. 1A, lanes 3 to 5). Native gel electrophoresis demonstrated that it is the activated form of IRF-3 that is subjected to degradation as observed by the reduction in the activated dimeric forms of IRF-3 (Fig. 1B, lanes 3 to 5). As shown in Figure 1A, treatment of cells with small concentration (1 μM) of MG-132 significantly diminished the degradation of IRF-3 following virus infection and induced the accumulation of C-terminal hyperphosphorylated forms of IRF-3 (compare lanes 3 to 5 with lanes 8 to 10), which migrate more slowly on SDS-gel (17, 38). Higher concentrations of MG-132 totally blocked IRF-3 degradation but also inhibited the activation of the latter following virus infection (data not shown). The

concentration of MG-132 used in this study did not affect IRF-3 activation as observed by its dimerization state (Fig. 1B). Treatment with lactacystin, another structurally unrelated proteasome inhibitor, also resulted in the accumulation and stabilization of activated forms of IRF-3 following virus infection (Fig. 1A and 1B). Similar results were observed in HCMV-infected cells (data not shown). These results further substantiate the importance of the proteasome in IRF-3 degradation following infection by with both DNA and RNA viruses and also reiterate a potential role for the C-terminal phosphorylation of IRF-3 as a destabilization signal (17).

3.4.2 An ubiquitin-dependent process is involved in the degradation of IRF-3 following SeV infection

Since previous reports have suggested that some proteins may be targeted to the proteasome without ubiquitination (45-47), we first verified if IRF-3 was polyubiquitinated following infection with SeV. Cotransfection of 293T cells with a HA-tagged ubiquitin construct together with a Flag-tagged-IRF-3 construct revealed that IRF-3 is polyubiquitinated in intact cells as noted by the appearance of a high molecular weight HA-signal (Fig. 2A, lane 4). Reciprocally, in the presence of HA-ubiquitin, a subpopulation of IRF-3 is also represented by a significant high molecular weight Flag-signal (Fig. 2B, lane 4). Importantly, polyubiquitination of endogenous IRF-3 increased following SeV infection and was only observed in the presence of MG-132 (Fig. 2C, upper panel). This increase in the polyubiquitination of IRF-3 clearly correlated with the stabilization of the hyperphosphorylated forms of IRF-3 (Fig. 2C, lower panel). To address the role of ubiquitination in the modulation of the steady state abundance of IRF-3 following SeV infection, we used the temperature-sensitive cell line *ts20*, in which the ubiquitin-activating enzyme E1 is active at 34°C but inactive at 39°C (48). Figure 2D shows that the expression level of IRF-3 declined significantly at 8 and 12 h post-infection (hpi) when cells were infected at the permissive temperature (see lanes 3 and 4, panel a). However, shifting the

cells at the non-permissive temperature resulted in the stabilization of IRF-3 (Fig. 2D, panel a, lanes 7-8). This effect was not related to a lower infectibility of the cells at 39°C since the expression of viral proteins was comparable between the two conditions of infection (Fig. 2D, panel c). These data demonstrate that ubiquitination of IRF-3 is involved in its degradation following SeV infection.

3.4.3 A Cullin-based ubiquitin ligase pathway is involved in host cell-mediated IRF-3 degradation following SeV infection

Since we observed the stabilization of phosphorylated forms of IRF-3 in the presence of proteasome inhibitors (Fig. 1), we then asked whether a SCF complex was involved in IRF-3 degradation. Rbx1/Roc1 is a RING finger protein that binds Zn²⁺. TPEN is a Zn²⁺ chelator that has been shown to inhibit the activity of purified RING domain-containing E3 ligases, presumably by removing the Zn²⁺ that is normally complexed with the RING domain (49-51). However, high concentrations of TPEN are often used, which can lead to nonspecific effects. Interestingly, the use of only 5 μM TPEN on Hel 299 fibroblasts did not prevent IRF-3 activation as judged by the accumulation of the dimeric forms, but totally blocked its degradation following virus infection (Fig. 3A). Addition of ZnCl₂ completely antagonized the effect of TPEN. Next, given that Cull1 protein is one of the invariable components of SCF complexes, we specifically targeted this subunit to inactivate the complex. First, we used the temperature-sensitive cell line *ts41*, in which the APP-BPI subunit of the NEDD8-activating enzyme E1 is inactivated at the non-permissive temperature (39°C) (52), thus enabling the use of these cells as a model for study of Cull1-dependent protein degradation (53). Infection of *ts41* cells at the permissive temperature (34°C) resulted in a significant loss of IRF-3 at 12 hpi, whereas no degradation of IRF-3 was observed when cells were infected at the non-permissive temperature (Fig. 3B, panel a, compare lanes 6 and 12) under similar conditions of infection (Fig. 3B, panel c). Infection of the parental cell lines at the non-permissive temperature (39°C) did not affect the

degradation of IRF-3 following virus infection (data not shown). We also tested whether IRF-3 was recruited to Cull1 following virus infection. Coimmunoprecipitation experiments in 293T cells overexpressing IRF-3 and Cull1 clearly demonstrated the recruitment of IRF-3 to Cull1 following SeV infection (Fig. 3C). To further substantiate the hypothesis of a possible involvement of Cull1 in host cells-mediated IRF-3 degradation following SeV infection, we took advantage of a deletion mutant version of Cull1 (Cul1-N252), which lacks the docking sites for Rbx1/Roc1 but is able to bind and sequester Skp1 (54). When overexpressed in cells, it acts in a dominant negative fashion to prevent degradation of known SCF E3 ligases substrates such as p27^{Kip1}, cyclin E, β -catenin, p105 and I κ B α ((54) and (data not shown)). Induction of Cull1 mutant by doxycycline resulted in a net increase in the stability of phosphorylated forms of IRF-3 following SeV infection of HEK 293 cells (Fig. 3D, panel *a*, compare lanes 3-5 with lanes 8-10). Interestingly, this increase in the stability of the hyperphosphorylated forms of IRF-3 was also associated with a sustained activation of IRF-3 as verified by the presence of dimers or its association to CBP coactivator after infection with SeV (Fig. 3E). These data strongly suggest that upon C-terminal phosphorylation, IRF-3 is recognized by a cullin-based ubiquitin ligase, belonging to the SCF complex family, thereby leading to its polyubiquitination and targeting to the proteasome.

3.4.4 Degradation of IRF-3 is dependent of the TBK1/IKKi signaling pathway

Phosphorylation of IRF-3 always precedes its degradation (see (3, 6, 17, 38, 42, 43) and this study). In addition, phosphorylation of IRF-3 correlates with its polyubiquitination (Fig. 2C). Therefore, we next addressed whether C-terminal phosphorylation of IRF-3 is essential for its degradation. To determine the effect of the C-terminal Ser/Thr cluster on the rate of IRF-3 turnover, pulse-chase experiments were conducted in HeLa cells transfected with different phosphomimetic point mutants (Figure 4 A). Whereas IRF-3wt

and the phosphomimetic J2D were very stable over a 12 hours period, the phosphomimetics IRF-3 5D and 7D were unstable (Fig. 4B, panels *a* and *b* and Fig. 4C). IRF-3 5D behaves as constitutive activated forms of IRF-3 when overexpressed in target cells (reviewed in (5) and (2)) and the cluster ranging from Ser396 to Ser405 is thought to be directly phosphorylated by TBK1 and IKKi (3, 8, 13). As suspected, in the presence of IKKi, IRF-3 was significantly phosphorylated but also very unstable (Fig. 4B, panel *c* and Fig. 4C). Quantification of the data revealed that the half-lives of IRF-3 5D, IRF-3 7D and IRF-3 in the presence of IKKi were reduced to 7.2, 5.9 and 5.5 hours respectively compared with that of wild type IRF-3 and IRF-3 J2D (15.5 and 17.5 hours respectively). Similar results were obtained using cycloheximide chase experiments (data not shown).

We next directly examined the contribution of the IKK-related kinases in IRF-3 degradation by first using RNAi silencing technology. Upon transfection of siRNA duplexes directed against IKKi and TBK1, the expression levels of both kinase isoforms were down regulated by approximately 70%. However, under these conditions, IRF-3 was still phosphorylated and degraded upon SeV infection (data not shown). We therefore switched to TBK1^{-/-} MEFs, in which the activation of IRF-3 was reported to be dramatically reduced in response to LPS, dsRNA and viral infection (15, 16), and observed a complete stabilization of IRF-3 following infection (Fig. 5A). The antibody used to verify the expression level of TBK1 also detected a lower migrating band below TBK1, which is likely the other isoform IKKi. However, IKKi was not significantly involved in IRF-3 activation as neither dimerization nor degradation was observed in Native-PAGE assay (Fig. 5B and 5D). Transfection of poly I:C into TBK1^{+/+} MEFs also resulted in IRF-3 degradation (Fig. 5C) and activation (Fig. 5D) whereas both of these biochemical processes were completely abolished in TBK1-deficient MEFs. All together, our data suggest that the phosphorylation of the phosphoacceptor sites (between amino acid 396 to 405) by the IKK-related kinases TBK1/IKKi create a signal that leads to the destabilization of IRF-3.

3.5 Discussion

Over the last five years, the regulation of the innate immune response through activation of IRF-3 has been the subject of several reports. These studies have led to the characterization of new inducers of IRF-3 activity as well as the intracellular signaling pathways leading to IRF-3 activation (38, 42, 43, 55, 56). Notably, two IKK homologs, IKKi and TBK1, were shown to be involved in IRF-3 phosphorylation and activation (12-16, 57). Another important issue, which remains poorly understood, is the molecular mechanisms that trigger the degradation of IRF-3 following virus infection. Using a combination of pharmacological, biochemical, and genetic approaches, the results presented here strongly suggest that phosphorylation of the C-terminal phosphoacceptor sites by the IKK-related kinases TBK1/IKKi create a signal that leads to the recognition of IRF-3 by a Cullin-based ubiquitin ligase pathway, which then induces the polyubiquitination-dependent degradation of IRF-3. This conclusion is based on several observations. First, the two unrelated protease inhibitors MG-132 and lactacystin stabilized the hyperphosphorylated-activated forms of IRF-3. Second, the accumulation of high-molecular-weight ubiquitin conjugates in MG-132-treated cells following viral infection. Third, the stabilization of IRF-3 protein at the nonpermissive temperature in cells bearing a thermolabile allele of E1 or APP-BP1. Fourth, the ability of TPEN to stabilize IRF-3 following virus infection, suggesting the implication of a RING domain-containing E3 in the polyubiquitination-dependent degradation of IRF-3. Fifth, the recruitment of IRF-3 by Cull1 following virus infection and its stabilization in cells overexpressing the Cull1-N252 mutant. Finally, the half-lives of C-terminal phosphomimetic IRF-3 mutants were shorter than that of wild-type IRF-3. Overexpression of IKKi resulted in a net decrease in the half-life of IRF-3 and reciprocally, no degradation of IRF-3 was observed in TBK1^{-/-} mouse embryonic fibroblasts. Given that Cull1 is one of the invariable components of SCF complexes our data thus suggest an important role for this family of E3 ligases in the control of IRF-3 stability (see Fig. 6).

Analysis of the human genome suggests that there are more than 70 genes encoding for F-box proteins in mammals (reviewed in (58)). So far, only four SCFs have been characterized in details: SCF^{βTrCP1/Fbw1A}, SCF^{βTrCP2/Fbw1B}, SCF^{Skp2}, and SCF^{hCDC4/Fbw7} (reviewed in references (59-61)). SCF^{βTrCP1/Fbw1A} specifically recognizes IκBα, IκBβ, IκBε and β-catenin as substrates only when they are phosphorylated at both serine residues in the conserved DSGXXS motif (reviewed in (19)). This motif is not found in IRF-3. SCF^{βTrCP2/Fbw1B} contributes also to IκBα ubiquitination (62), whereas SCF^{Skp2} ubiquitinates various cell cycle regulators including p27^{Kip1} (23), p21^{Cip1} (63) and p130 (64). SCF^{hCDC4/Fbw7} was shown to target cyclin E (65). Interestingly, both SCF^{Skp2} and SCF^{hCDC4/Fbw7} interact and promote de degradation of c-Myc transcription factor (25, 26). In addition to promoting c-Myc degradation, SCF^{Skp2} increases its transactivation activity, suggesting that SCF^{Skp2} is a transcriptional cofactor (25, 26). Given these interesting observations, we speculate that SCF complexes might also regulate IRF-3 transcriptional activity. Other posttranslational modifications such as the conjugation of small ubiquitin-related modifier SUMO to IRF-3 might also be involved in the regulation of its transcriptional activity (66).

Overexpression of Cull1-N252 does not completely prevent IRF-3 degradation following SeV infection (Fig. 3B and C), therefore suggesting that ubiquitin ligases other than the SCF complex are also likely to be involved in IRF-3 degradation following virus infection. The nature of these other E3 ligases is presently unknown. However, because chelating the Zn²⁺ and blocking the neddylation pathway completely abrogated the degradation of IRF-3 following virus infection (see Fig. 3A and B), this suggests that Ring-type E3 ligases or more specifically members of Cullin-Ring ubiquitine ligase family may be involved in IRF-3 degradation (21, 22).

In order to circumvent the innate immune response, several RNA and DNA viruses express viral proteins with antagonistic activities toward essential components of the innate immune system. For example, a recent study has shown that the immediate-early transcription factor RTA from HHV8 has an unconventional intrinsic Ub E3 ligase activity

that targets both IRF-7 and IRF-3 for proteasome-mediated degradation. These authors also observed that RTA was associated with a HECT domain E3 ligase protein that also catalyses polyUb-conjugation of IRF-3 and IRF-7 (67). Rotavirus NSP1 also induces IRF-3 degradation but the molecular mechanism by which this viral protein targets IRF-3 to the proteasome remains to identify (32). These two recent reports thus support the concept that viruses have evolved proteins to target IRF-3 for degradation. On the other hand, several studies have shown that infection of target cells with replication-incompetent viruses (UV-inactivated viruses) or treatment with dsRNA alone lead to IRF-3 degradation ((8, 44) and see Fig. 5C and D). Therefore, these observations suggest a role of the host cell's degradation machinery, part of which is the ubiquitin proteasome system, for the control of IRF-3 stability following its activation through C-terminal phosphorylation.

In conclusion, we show that, in addition to virus-encoded E3 ligases, infected cells use an endogenous Cullin-based ubiquitin ligase to regulate the steady-state levels of IRF-3. Because IRF-3 activation is linked with cell death and endotoxin shock syndrome (33-37), IRF-3 activation needs to be finely controlled and we believe that in addition to A20, a negative regulator of IRF-3/NF- κ B signaling pathways (68-70), host cell-mediated IRF-3 degradation following virus infection plays a significant role in the termination of the IRF-3 response. While our paper was in revision, a related paper was published (Saitoh, T., Tunkyi, A., Ryo, A., Yamamoto, M., Finn, G., Fujita, T., Akira, S., Yamamoto, N., Ping Lu, K and Yamaoka, S. *Nature Immunology* 2006 ; Epub ahead of print), indicating a role of the prolyl isomerase Pin1 in poly I:C-induced polyubiquitination of IRF-3.

3.6 Acknowledgments

We thank Rongtuan Lin and Michele Pagano for reagents used in this study and Valérie Chénard for technical assistance. We thank also Guy Servant for helpful discussions.

3.7 Footnotes

The abbreviations used are: HCMV, human cytomegalovirus; SeV, Sendai virus; IRF-3, Interferon Regulatory Factor-3; I κ B kinase, IKK; LPS, Lipopolysaccharide; dsRNA, double-stranded RNA; IFN, Interferon; RANTES, regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted; IP-10, interferon-gamma-inducible protein 10; TBK1, Tank-binding kinase 1; MOI, multiplicity of infection; h.p.i, hours post-infection, SCF, Skp1-Cul1-F-box; Cullin1, Cul1; HECT, Homology to the E6-associated protein Carboxyl Terminus.

This work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to M.S. (MOP-53282) and S.M. (MOP-14168). M.S. is a recipient from a Rx&D/CIHR Health Research Foundation Career Awards in Health Sciences. S.M. and N.G. are both recipients of Canada Research Chairs. J.H. is supported by a CIHR Senior Scientist award. P.C. is a recipient of a studentship from the CIHR. P.C. is a recipient of a studentship from the CIHR. J.F.C and S.P.G are both recipients of a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). G.R. holds a fellowship from the American Association for Cancer Research (AACR).

3.8 References

1. Samuel, C. E. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14:778-809, table of contents.
2. 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* 1010:237-248.

3. 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* 280:7477-7486.
4. Preston, C. M., A. N. Harman, and M. J. Nicholl. 2001. Activation of interferon response factor-3 in human cells infected with herpes simplex virus type 1 or human cytomegalovirus. *J Virol* 75:8909-8916.
5. 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.
6. 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* 78:1706-1717.
7. 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* 76:3659-3669.
8. 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 IKKvarepsilon kinases by vesicular stomatitis virus infection and the role of viral ribonucleoprotein in the development of interferon antiviral immunity. *J Virol* 78:10636-10649.
9. Peters, R., S. M. Liao, and T. Maniatis. 2000. IKKe is part of a novel PMA-inducible Ikb kinase complex. *Molecular Cell* 5:513-522.
10. 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 IkappaB kinases. *Int Immunol* 11:1357-1362.
11. 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* 18:6694-6704.

12. 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* 300:1148-1151.
13. 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* 101:233-238.
14. 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* 4:491-496.
15. Hemmi, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yamamoto, T. Kaisho, H. Sanjo, T. Kawai, K. Hoshino, K. Takeda, and S. Akira. 2004. The Roles of Two IkkappaB Kinase-related Kinases in Lipopolysaccharide and Double Stranded RNA Signaling and Viral Infection. *J Exp Med* 199:1641-1650.
16. Perry, A. K., E. K. Chow, J. B. Goodnough, W. C. Yeh, and G. Cheng. 2004. Differential Requirement for TANK-binding Kinase-1 in Type I Interferon Responses to Toll-like Receptor Activation and Viral Infection. *J Exp Med* 199:1651-1658.
17. 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.
18. Ronco, L., A. Karpova, M. Vidal, and P. Howley. 1998. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes & Development* 12:2061-2072.
19. Liu, Y. C. 2004. Ubiquitin ligases and the immune response. *Annu Rev Immunol* 22:81-127.
20. Pickart, C. M. 2004. Back to the future with ubiquitin. *Cell* 116:181-190.

21. Petroski, M. D., and R. J. Deshaies. 2005. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:9-20.
22. Willems, A. R., M. Schwab, and M. Tyers. 2004. A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim Biophys Acta* 1695:133-170.
23. Carrano, A. C., E. Eytan, A. Hershko, and M. Pagano. 1999. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* 1:193-199.
24. Winston, J. T., P. Strack, P. Beer-Romero, C. Y. Chu, S. J. Elledge, and J. W. Harper. 1999. The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro. *Genes Dev* 13:270-283.
25. Kim, S. Y., A. Herbst, K. A. Tworkowski, S. E. Salghetti, and W. P. Tansey. 2003. Skp2 regulates Myc protein stability and activity. *Mol Cell* 11:1177-1188.
26. von der Lehr, N., S. Johansson, S. Wu, F. Bahram, A. Castell, C. Cetinkaya, P. Hydbring, I. Weidung, K. Nakayama, K. I. Nakayama, O. Soderberg, T. K. Kerppola, and L. G. Larsson. 2003. The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteosomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription. *Mol Cell* 11:1189-1200.
27. Hochstrasser, M. 2000. Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat Cell Biol* 2:E153-157.
28. Wu, K., A. Chen, and Z. Q. Pan. 2000. Conjugation of Nedd8 to CUL1 enhances the ability of the ROC1-CUL1 complex to promote ubiquitin polymerization. *J Biol Chem* 275:32317-32324.
29. Gong, L., and E. T. Yeh. 1999. Identification of the activating and conjugating enzymes of the NEDD8 conjugation pathway. *J Biol Chem* 274:12036-12042.

30. Osaka, F., H. Kawasaki, N. Aida, M. Saeki, T. Chiba, S. Kawashima, K. Tanaka, and S. Kato. 1998. A new NEDD8-ligating system for cullin-4A. *Genes Dev* 12:2263-2268.
31. Grandvaux, N., B. R. tenOever, M. J. Servant, and J. Hiscott. 2002. The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. *Curr Opin Infect Dis* 15:259-267.
32. Barro, M., and J. T. Patton. 2005. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4114-4119.
33. 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* 15:501-515.
34. 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* 74:3781-3792.
35. Zhai, Y., X. D. Shen, R. O'Connell, F. Gao, C. Lassman, R. W. Busuttil, G. Cheng, and J. W. Kupiec-Weglinski. 2004. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol* 173:7115-7119.
36. Dang, O., L. Navarro, and M. David. 2004. Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Interferon Regulatory Factor 3 Activation and Protection from Septic Shock by Hydroxystilbenes. *Shock* 21:470-475.
37. Sakaguchi, S., H. Negishi, M. Asagiri, C. Nakajima, T. Mizutani, A. Takaoka, K. Honda, and T. Taniguchi. 2003. Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon-beta gene expression and endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun* 306:860-866.

38. 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* 276:355-363.
39. Coulombe, P., G. Rodier, S. Pelletier, J. Pellerin, and S. Meloche. 2003. Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol Cell Biol* 23:4542-4558.
40. Li, Y., S. Gazdoui, Z. Q. Pan, and S. Y. Fuchs. 2004. Stability of homologue of Slimb F-box protein is regulated by availability of its substrate. *J Biol Chem* 279:11074-11080.
41. 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.
42. 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* 278:9441-9447.
43. 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* 99:2818-2823.
44. 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* 80:226-235.
45. Verma, R., and R. J. Deshaies. 2000. A proteasome howdunit: the case of the missing signal. *Cell* 101:341-344.

46. Murakami, Y., S. Matsufuji, T. Kameji, S. Hayashi, K. Igarashi, T. Tamura, K. Tanaka, and A. Ichihara. 1992. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* 360:597-599.
47. Sheaff, R. J., J. D. Singer, J. Swanger, M. Smitherman, J. M. Roberts, and B. E. Clurman. 2000. Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol Cell* 5:403-410.
48. Chowdary, D. R., J. J. Dermody, K. K. Jha, and H. L. Ozer. 1994. Accumulation of p53 in a mutant cell line defective in the ubiquitin pathway. *Mol Cell Biol* 14:1997-2003.
49. Lorick, K. L., J. P. Jensen, S. Fang, A. M. Ong, S. Hatakeyama, and A. M. Weissman. 1999. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11364-11369.
50. Fang, S., J. P. Jensen, R. L. Ludwig, K. H. Vousden, and A. M. Weissman. 2000. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem* 275:8945-8951.
51. Bays, N. W., R. G. Gardner, L. P. Seelig, C. A. Joazeiro, and R. Y. Hampton. 2001. Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. *Nat Cell Biol* 3:24-29.
52. Chen, Y., D. L. McPhie, J. Hirschberg, and R. L. Neve. 2000. The amyloid precursor protein-binding protein APP-BP1 drives the cell cycle through the S-M checkpoint and causes apoptosis in neurons. *J Biol Chem* 275:8929-8935.
53. Ohh, M., W. Y. Kim, J. J. Moslehi, Y. Chen, V. Chau, M. A. Read, and W. G. Kaelin, Jr. 2002. An intact NEDD8 pathway is required for Cullin-dependent ubiquitylation in mammalian cells. *EMBO Rep* 3:177-182.

54. Piva, R., J. Liu, R. Chiarle, A. Podda, M. Pagano, and G. Inghirami. 2002. In vivo interference with Skp1 function leads to genetic instability and neoplastic transformation. *Mol Cell Biol* 22:8375-8387.
55. Smith, E. J., I. Marie, A. Prakash, A. Garcia-Sastre, and D. E. Levy. 2001. IRF3 and IRF7 phosphorylation in virus-infected cells does not require double-stranded RNA-dependent protein kinase R or Ikappa B kinase but is blocked by Vaccinia virus E3L protein. *J Biol Chem* 276:8951-8957.
56. 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* 6:375-388.
57. Ehrhardt, C., C. Kardinal, W. J. Wurzer, T. Wolff, C. von Eichel-Streiber, S. Pleschka, O. Planz, and S. Ludwig. 2004. Rac1 and PAK1 are upstream of IKK-epsilon and TBK-1 in the viral activation of interferon regulatory factor-3. *FEBS Lett* 567:230-238.
58. Cardozo, T., and M. Pagano. 2004. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:739-751.
59. Deshaies, R. J. 1999. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:435-467.
60. Tyers, M., and P. Jorgensen. 2000. Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr Opin Genet Dev* 10:54-64.
61. Schwab, M., and M. Tyers. 2001. Cell cycle. Archipelago of destruction. *Nature* 413:268-269.
62. Suzuki, H., T. Chiba, M. Kobayashi, M. Takeuchi, T. Suzuki, A. Ichiyama, T. Ikenoue, M. Omata, K. Furuichi, and K. Tanaka. 1999. IkappaBalpha ubiquitination is catalyzed by an SCF-like complex containing Skp1, cullin-1, and two F-

- box/WD40-repeat proteins, betaTrCP1 and betaTrCP2. *Biochem Biophys Res Commun* 256:127-132.
63. Bornstein, G., J. Bloom, D. Sitry-Shevah, K. Nakayama, M. Pagano, and A. Hershko. 2003. Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J Biol Chem* 278:25752-25757.
 64. Tedesco, D., J. Lukas, and S. I. Reed. 2002. The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF(Skp2). *Genes Dev* 16:2946-2957.
 65. Koepp, D. M., L. K. Schaefer, X. Ye, K. Keyomarsi, C. Chu, J. W. Harper, and S. J. Elledge. 2001. Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* 294:173-177.
 66. Zhang, J., L. G. Xu, K. J. Han, X. Wei, and H. B. Shu. 2004. PIASy represses TRIF-induced ISRE and NF-kappaB activation but not apoptosis. *FEBS Lett* 570:97-101.
 67. Yu, Y., S. E. Wang, and G. S. Hayward. 2005. The KSHV immediate-early transcription factor RTA encodes ubiquitin E3 ligase activity that targets IRF7 for proteasome-mediated degradation. *Immunity* 22:59-70.
 68. Lin, R., L. Yang, P. Nakhaei, Q. Sun, E. Sharif-Askari, I. Julkunen, and J. Hiscott. 2006. Negative regulation of the retinoic acid-inducible gene I-induced antiviral state by the ubiquitin-editing protein A20. *J Biol Chem* 281:2095-2103.
 69. Beyaert, R., K. Heyninck, and S. Van Huffel. 2000. A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor-kappa B-dependent gene expression and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 60:1143-1151.
 70. Saitoh, T., M. Yamamoto, M. Miyagishi, K. Taira, M. Nakanishi, T. Fujita, S. Akira, N. Yamamoto, and S. Yamaoka. 2005. A20 is a negative regulator of IFN regulatory factor 3 signaling. *J Immunol* 174:1507-1512.

3.9 Figure Legends

Figure 1. Proteasome-dependent degradation of IRF-3 in virus-infected cells.

A) Hel 299 fibroblasts were pretreated for 30 min with 1 μ M of MG-132, 10 μ M Lactacystin, or vehicle (0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO)). Then, cells were either uninfected (-) or infected with SeV for the indicated periods of time in the continuous presence of the drug inhibitors. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with anti-IRF-3 antibody. When indicated, membranes were stripped and reprobed with anti- β -actin antibody. B) Cell lysates from above were used in a Native PAGE assay to verify the dimerization status of IRF-3.

Figure 2. IRF-3 is polyubiquitinated in vivo. A and B) 293 T cells were cotransfected with the indicated constructs. After 48 h, cell lysates were divided in two groups that were both subjected to immunoprecipitation using anti-Flag antibody. The immunoprecipitated material was washed several times in RIPA buffer and simultaneously analyzed by immunoblotting with anti-HA (A) or anti-Flag (B) antibodies. The membrane was stripped and reprobed with anti-Flag antibody (A, lower panel). The proteasome inhibitor MG-132 was added for the last 16 hours of transfection. C) Hel 299 fibroblasts were pretreated for 30 min with 1 μ M of MG-132 and then uninfected (-) or infected with SeV for the indicated period of time in the continuous presence of the drug inhibitor. Cell lysates were prepared in RIPA buffer and endogenous IRF-3 was immunoprecipitated. The immunoprecipitated material was washed several times in RIPA buffer and analyzed by immunoblotting with anti-ubiquitin antibody. D) Ubiquitination of IRF-3 is required for its degradation following SeV infection. E1-thermosensitive mutant (*ts20*) cells were preincubated at the permissive temperature (34°C) or shifted to the restrictive temperature (39°C) for 16 h. Then, cells were left uninfected (-) or infected with SeV for the indicated times and temperatures. Cell lysates were analyzed by IRF-3 immunoblotting (panel *a*). Membranes were stripped and reprobed with an anti- β actin antibody (panel *b*) to control

for the amount of extract proteins. Membrane was then revealed with an anti-paramyxovirus antibody (panel *c*).

Figure 3. A cullin-based ubiquitin ligases is involved in host cell-mediated IRF-3 degradation following SeV infection. A) A RING domain-containing E3 ligase is involved in IRF-3 degradation. Hel 299 cells were preincubated for 30 min with 5 μ M TPEN in presence of 10 μ M ZnCl₂ when indicated. Then cells were left uninfected (-) or infected with SeV for 8 h in the continuous presence of the Zn²⁺ chelator. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with an anti-IRF-3 antibody. The membrane was stripped and reprobed with an anti-paramyxovirus antibody. The same cellular extracts were also used in a Native PAGE assay to verify the dimerization status of IRF-3 (lower panel). B) IRF-3 requires a functional NEDD8 conjugation pathways for its efficient degradation. *ts41* cells were preincubated at the permissive temperature (34°C) of shifted to the restrictive temperature (39°C) for 16 h. Then, cells were left uninfected (-) or infected with SeV for the indicated times and temperatures. Cell lysates were analyzed by IRF-3 immunoblotting (panel *a*). Membranes were stripped and reprobed with an anti- β actin antibody (panel *b*) to show equal amount of cell extracts. Membrane was then revealed with an anti-paramyxovirus antibody (panel *c*). C) IRF-3 is recruited to Cul1 following virus infection. 293 T cells were cotransfected with the indicated constructs. After 30 h, cell lysates were subjected to immunoprecipitation using anti-Flag antibody. The immunoprecipitated material was analyzed by immunoblotting with anti-Myc antibody. The membrane was stripped and reprobed with anti-Flag antibody. D) Expression of a Cul1 dominant-negative mutant increases IRF-3 stability following SeV infection. The tetracycline-inducible cell line HEK 293-Cul1 N252 was either left untreated (- dox) or incubated with 1 μ g/ml doxycycline (+ dox) for 20 h. Then, the cells were left uninfected (-) or infected with SeV for the indicated periods of time in the continuous presence of doxycycline. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with anti-IRF-3 antibody (panel *a*), anti-Flag antibody (panel *b*), anti-paramyxovirus antibody (panel *c*) and anti- β actin antibody (panel *d*) to

show equal amount of cell extracts. E) The increase in IRF-3 stability by Cull1N252 results in a prolonged activation of the transcription factor. The tetracycline-inducible cell line HEK 293-Cull1 N252 was treated and infected as above. Cell lysates were prepared and analyzed by immunoblotting with anti-IRF-3 antibody, anti-Flag antibody, anti-paramyxovirus antibody and anti- β actin antibody as indicated. The same cellular extracts were also used in Native PAGE analysis (Native gel) or in co-immunoprecipitation experiments with an anti-CBP antibody (IP CBP). Following the electrophoresis, gels were transferred to nitrocellulose membranes which were probed with an anti-IRF-3 antibody.

Figure 4. Role of the C-terminal cluster of phosphoacceptor sites in the degradation of IRF-3. A) Schematic representation of the different phosphomimetic point mutants of IRF-3 used in this study. B) Analysis of IRF-3 turnover using [35 S] methionine/cysteine biosynthetic labeling methodology. Transiently transfected HeLa cells were pulse-labeled with [35 S]methionine/[35 S]cysteine for 120 min and chased for the times indicated in complete medium containing excess methionine and cysteine. Cell extracts were subjected to immunoprecipitation with anti-Flag antibody (panels *a* and *b*) or anti-Myc antibody (panel *c*). After extensive washing, the immunoprecipitated proteins were separated by SDS-gel electrophoresis and analyzed by fluorography using a gel documentation device (Typhoon 9410). C) Quantitative analysis of the data shown in B. Data points represent the densitometric analysis of IRF-3 degradation rate. Closed diamonds, IRF-3 J2D ($r=0.994$); closed squares, wtIRF-3 ($r=0.959$); closed circles, IRF-3 5D ($r=0.996$); closed triangles, IRF-3 7D ($r=0.995$); open squares, wtIRF-3+IKKi ($r=0.957$). The data points represent mean \pm SEM of three separate experiments.

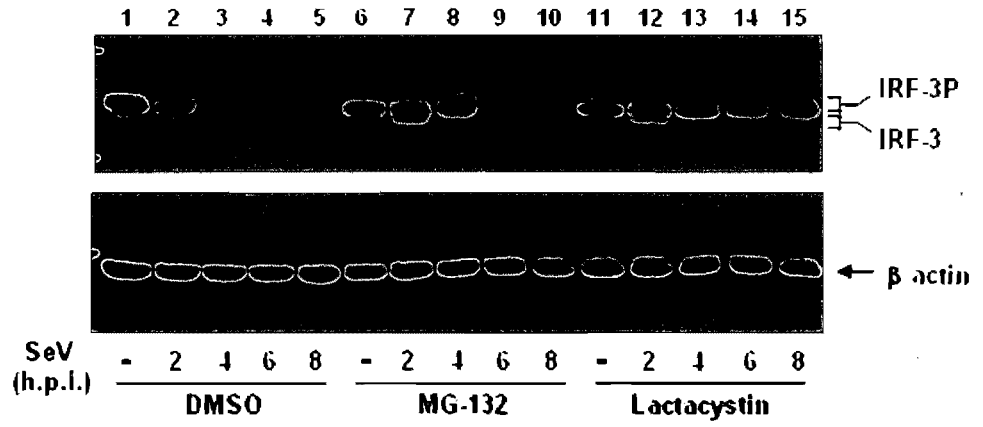
Figure 5. The IKK-related kinase TBK1 is essential for the degradation of IRF-3 following infection of fibroblasts with SeV. A) TBK1^{+/+} and TBK1^{-/-} MEFs were

infected with SeV for the indicated time. Whole cell extracts were prepared and analyzed for IRF-3, viral proteins, and TBK1/IKKi expression by immunoblotting. B) Cell extracts from above were also subjected to Native-PAGE analysis. C) TBK1^{+/+} and TBK1^{-/-} MEFs were transfected with 5 µg/ml poly I:C for the indicated time. Whole cell extracts were prepared and analyzed for IRF-3 and TBK1/IKKi expression by immunoblotting. D) Cell extracts from (C) were also subjected to Native-PAGE analysis.

Figure 6. Proposed model for IRF-3 degradation. Following virus infection, replicative intermediates such as dsRNA is recognized by intracellular sensors like the RNA helicases RIGI and MDA5. These intracellular sensors transmit a signal to the mitochondrial-associated protein VISA (also termed IPS-1, Cardif or MAVS). This adaptor protein activates IRF-3 through the IKK-related kinases TBK1/IKKi. Phosphorylated IRF-3 dimerizes and accumulates into the nuclear compartment where it induces anti-viral genes. Phosphorylated IRF-3 is recognized by a Cullin-based E3 ligase such as a SCF complex that induces its polyubiquitination. The use of leptomycin B, an antibiotic that specifically bind and inhibits chromosome region maintenance/exportin 1 (CRM1), resulted in nuclear trapping of IRF-3 but did not prevent its degradation (data not shown) suggesting that the degradation of IRF-3 occurs in this cellular compartment.

3.10 Figures

A



B

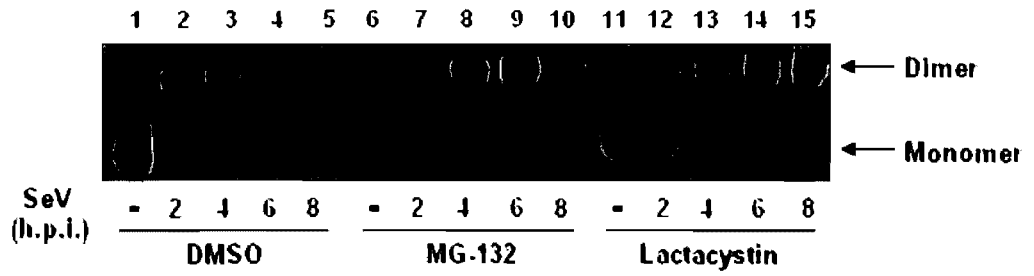


Figure 1

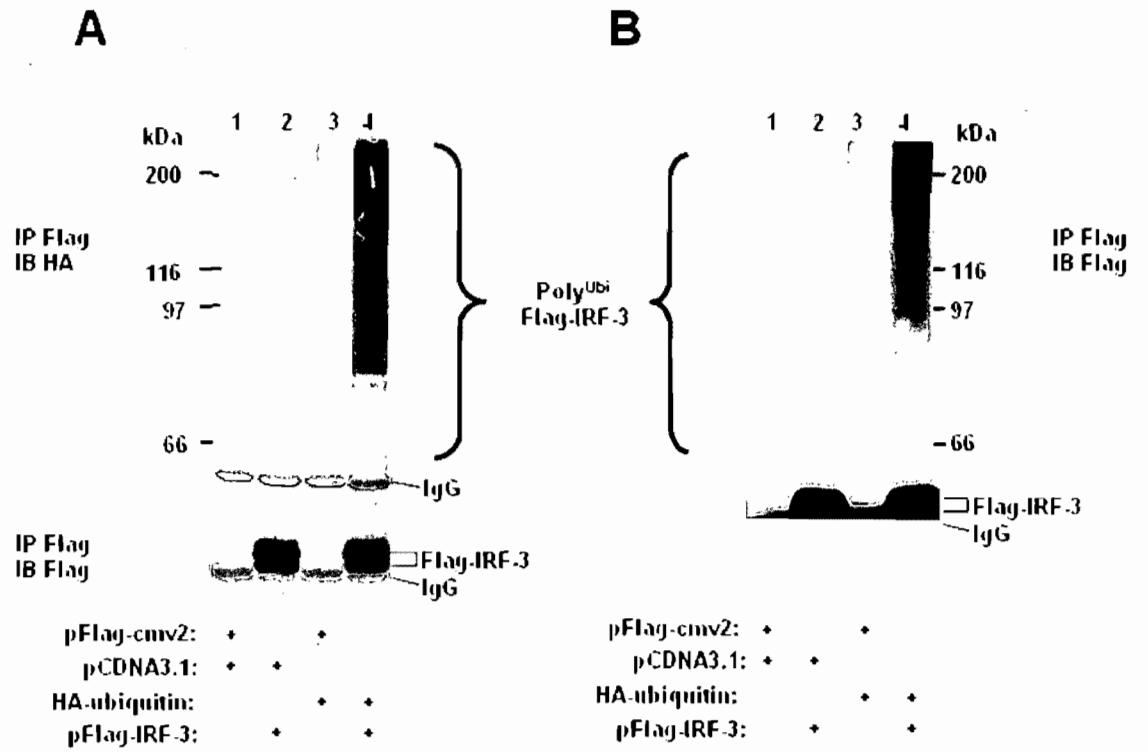


Figure 2

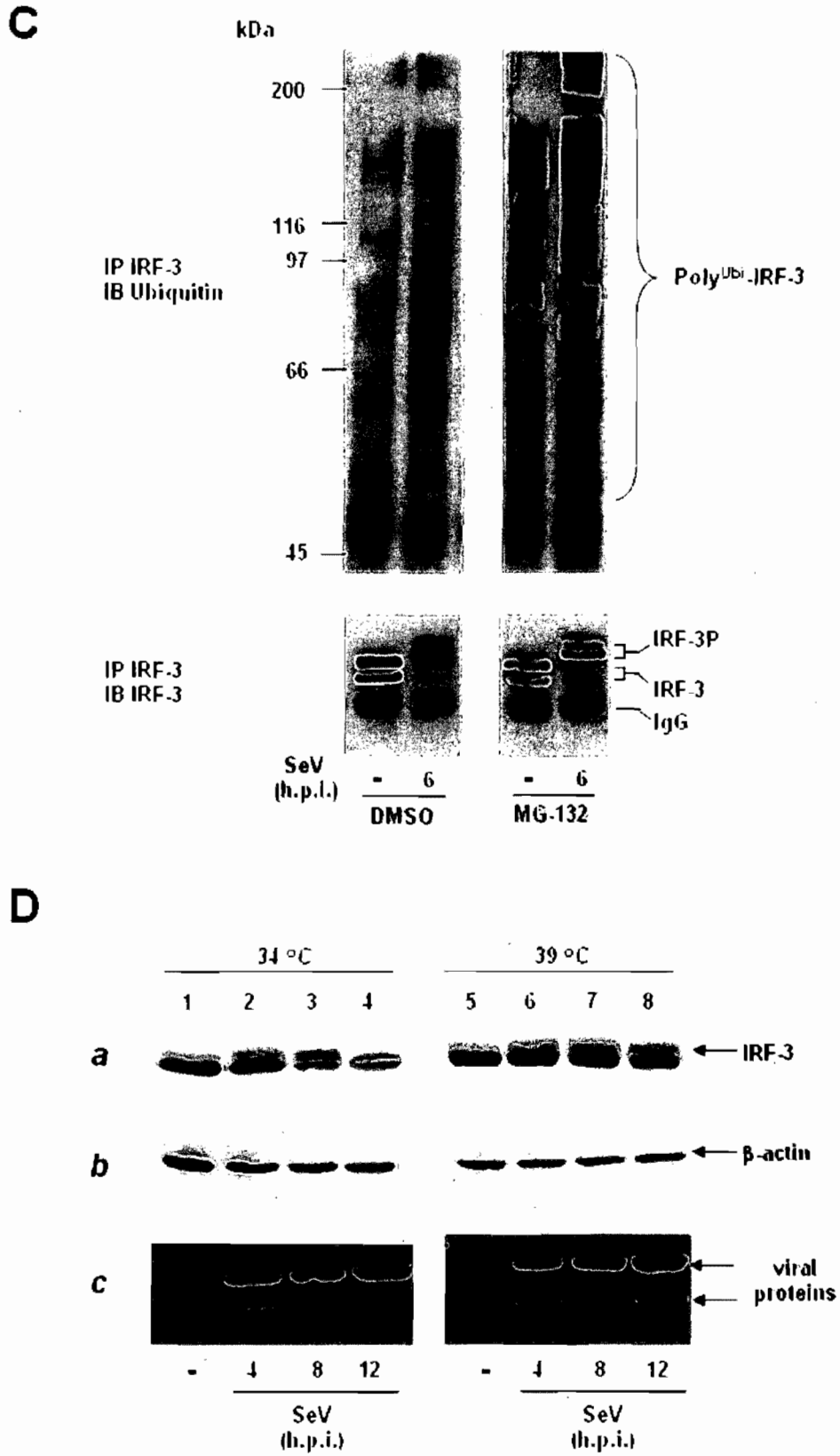


Figure 2

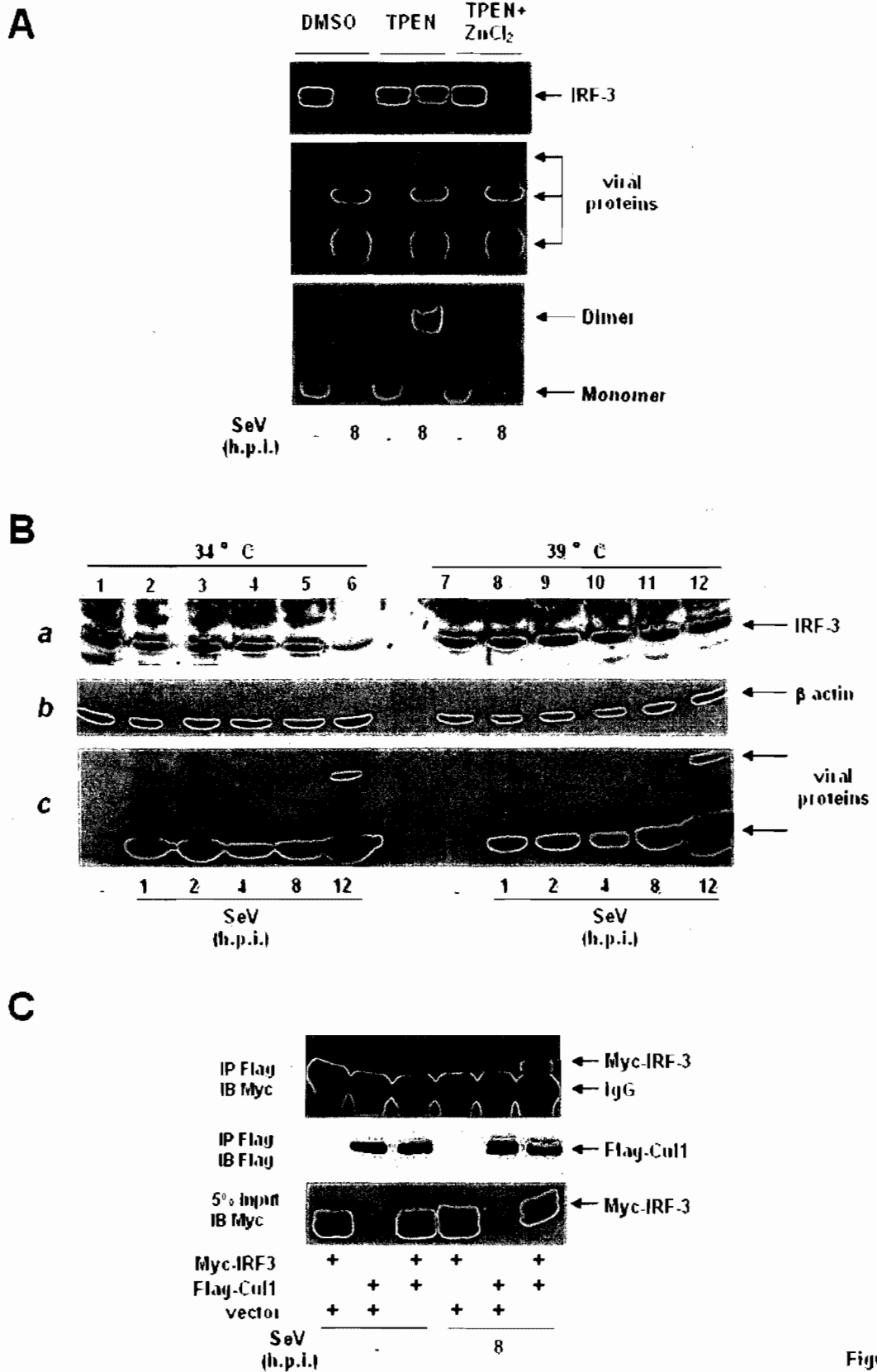


Figure 3

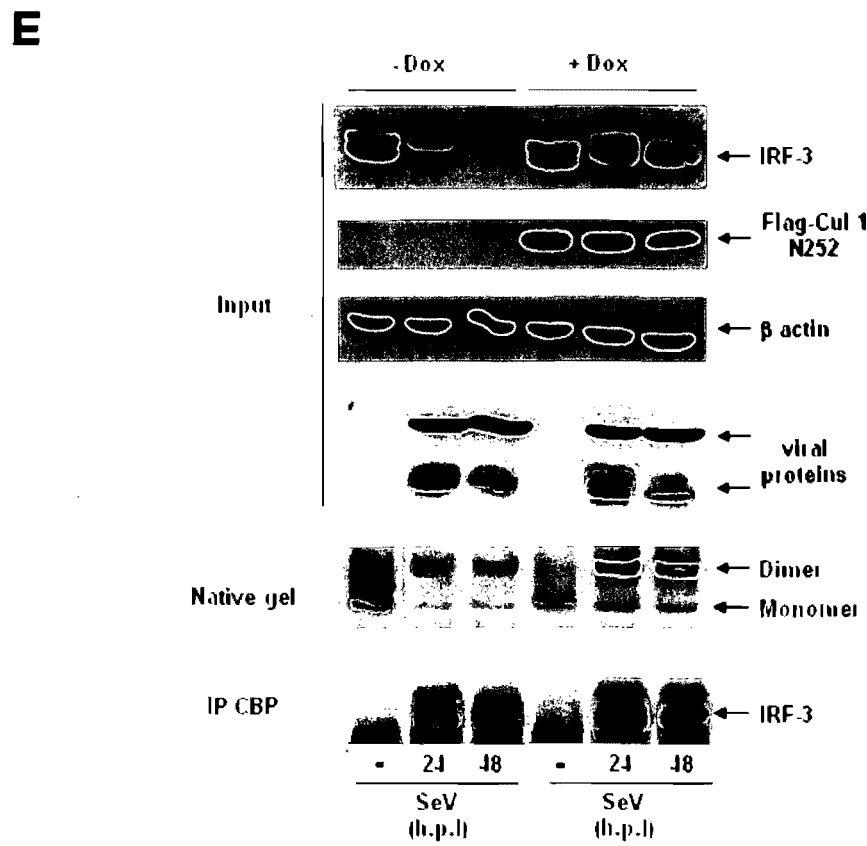
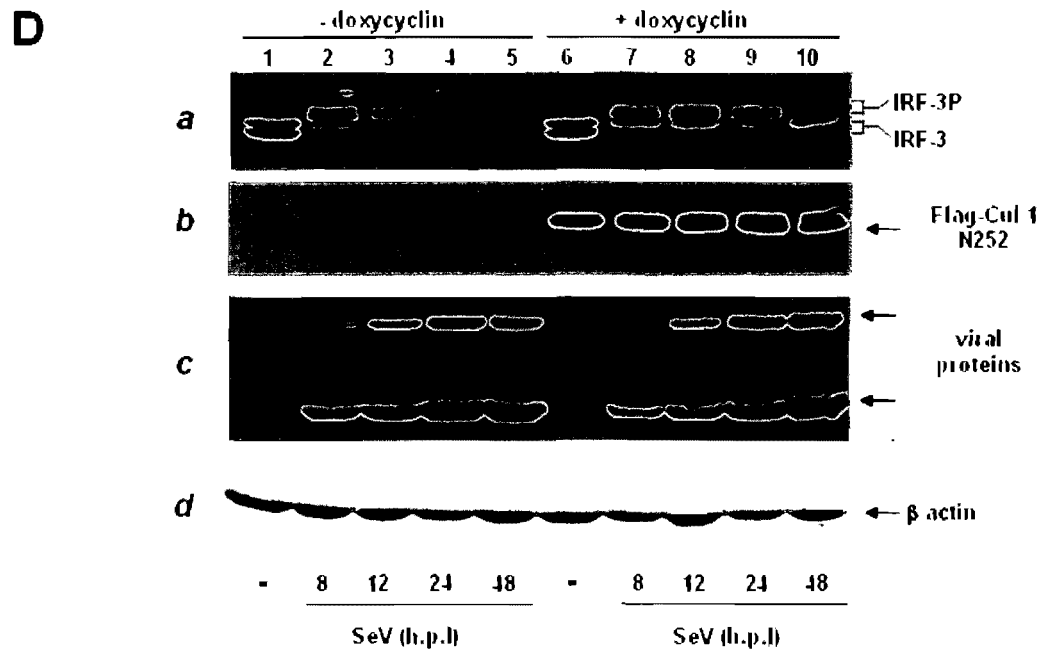


Figure 3

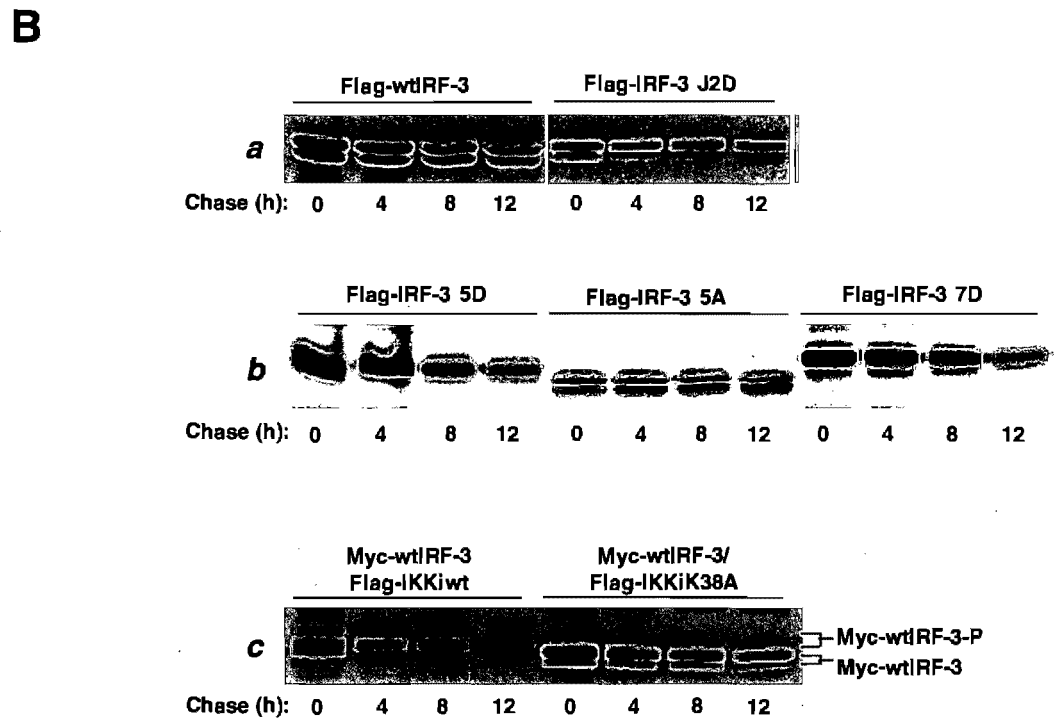
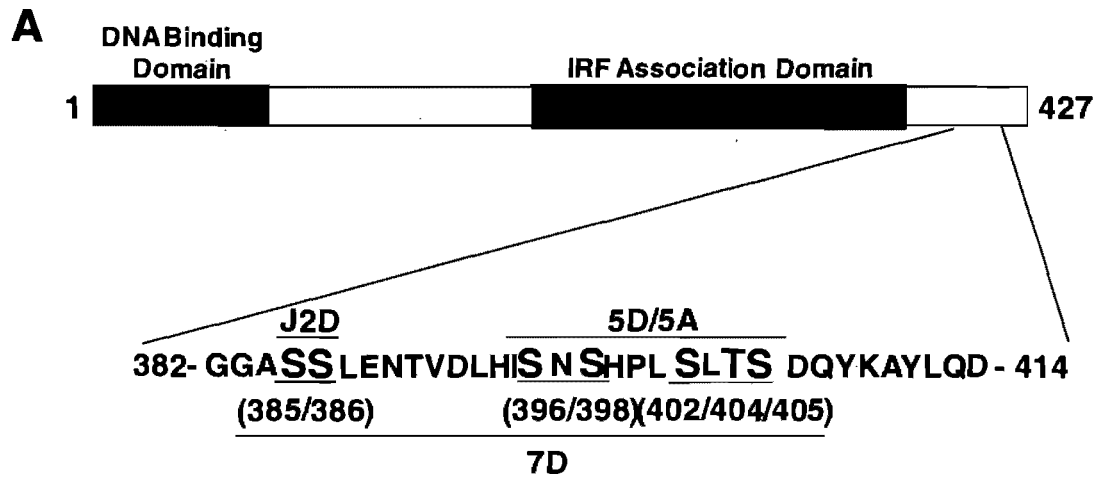


Figure 4

C

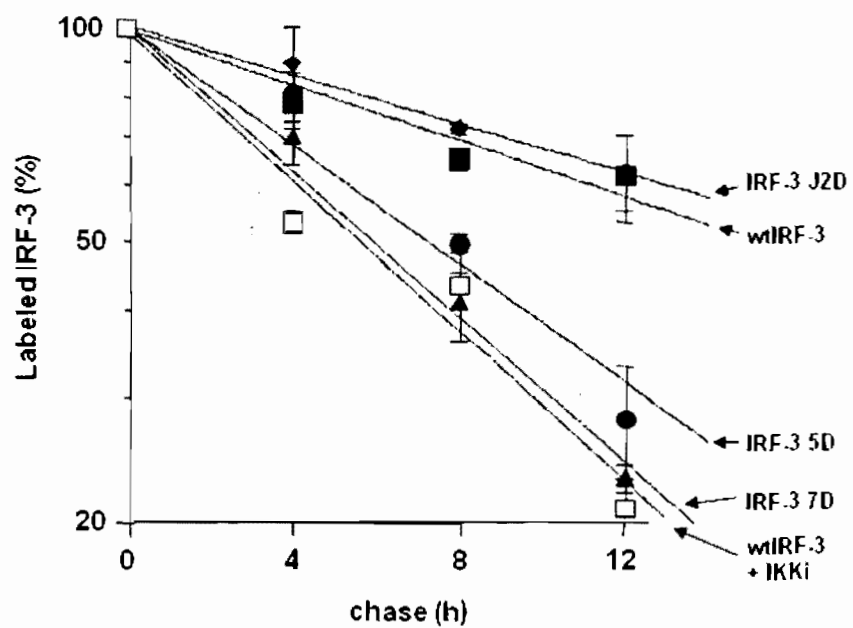
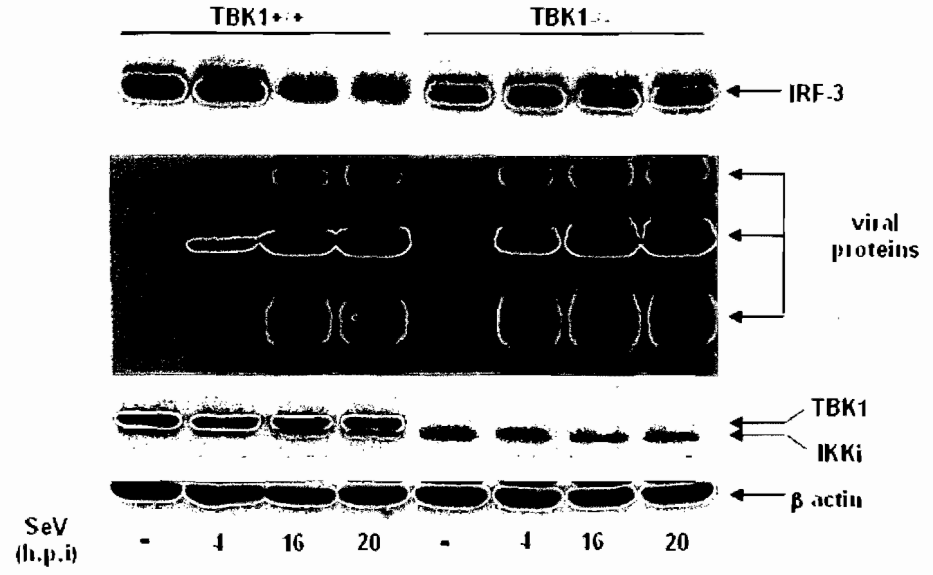


Figure 4

A



B

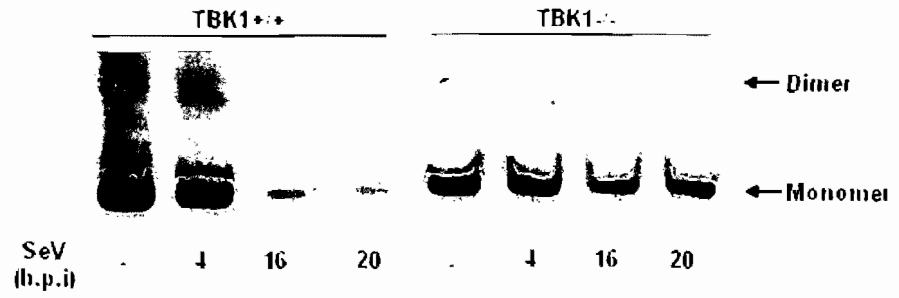


Figure 5

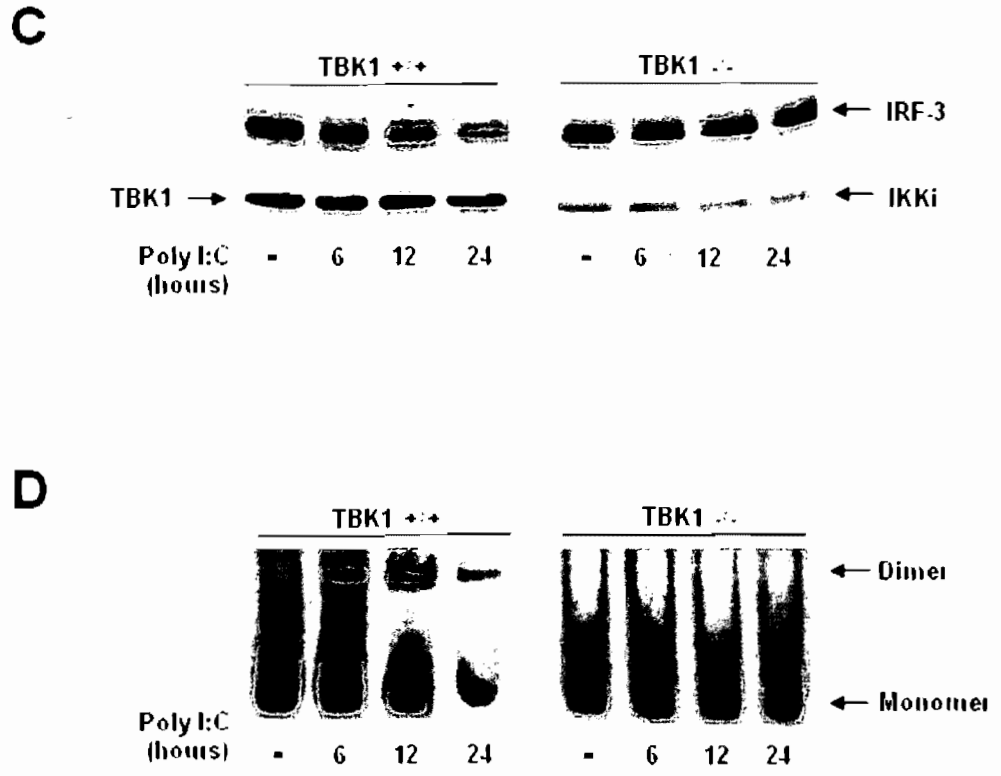


Figure 5

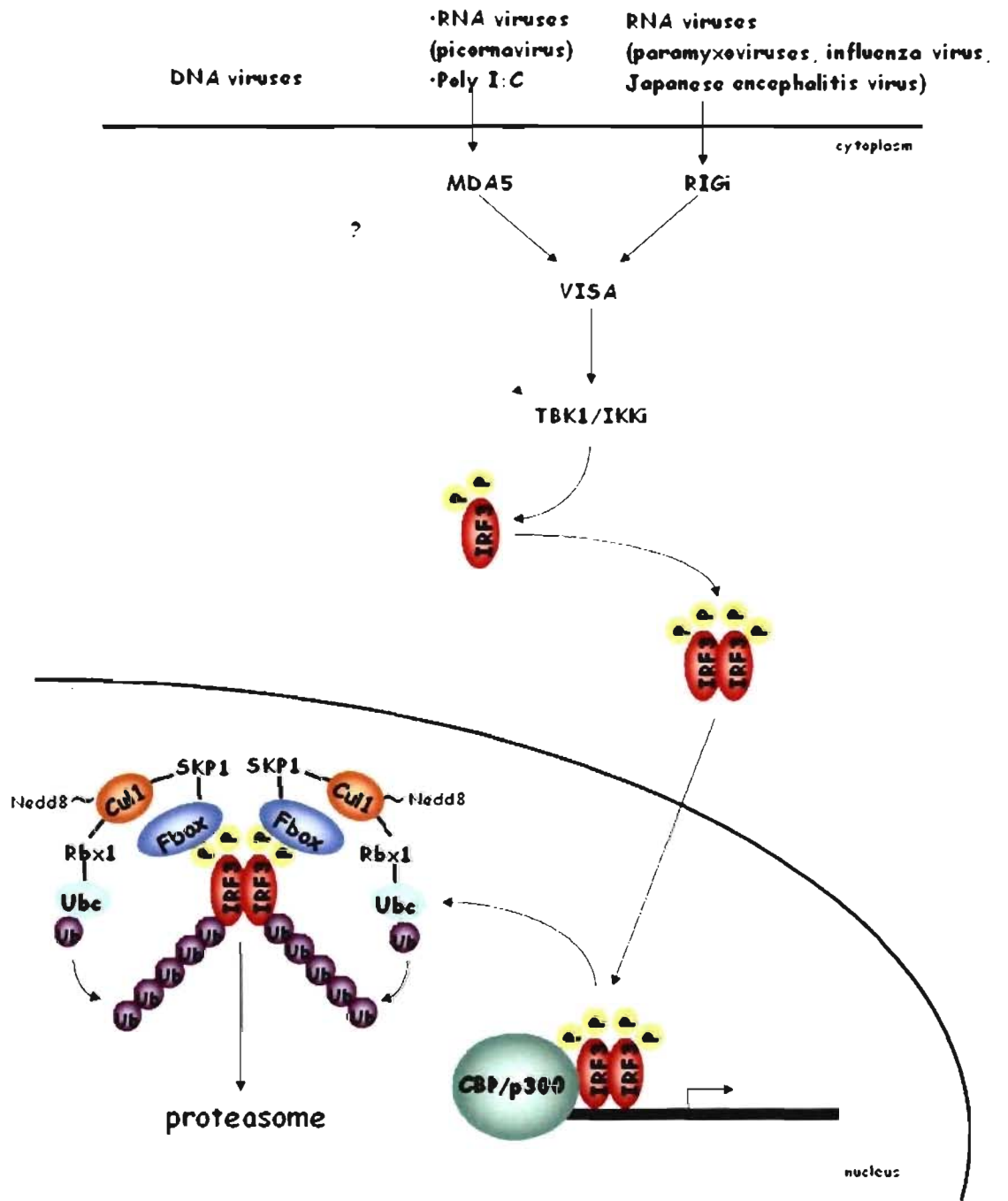


Figure 6

Statut de l'article :

Bibeau-Poirier A, Clément JF, Rongtuan L, Servant MJ. Lysine residue 77, located in the DNA binding domain of Interferon Regulatory Factor-3 transcription factor, is not part of a predicted NLS but is rather acetylated by CBP/p300 and essential for DNA binding.

Manuscrit en phase finale de préparation pour être envoyé à *Journal of Biological Chemistry*

Contribution de chaque auteur pour cet article :

Bibeau-Poirier A : 80% du travail de laboratoire;

Clément JF: 16% du travail;

Rongtuan L : 4% du travail;

Servant MJ : Investigateur du projet, directeur scientifique et écriture de l'article;

4. Lysine residue 77, located in the DNA binding domain of Interferon Regulatory Factor-3 transcription factor, is not part of a predicted NLS but is rather acetylated by CBP/p300 and essential for DNA binding

Annie Bibeau-Poirier¹, Jean-François Clément¹, Rongtuan Lin², and Marc J Servant¹.

¹Faculty of Pharmacy, Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament, University of Montreal, Montreal, H3C 3J7, Canada. ²Terry Fox Molecular Oncology Group, Lady Davis Institute for Medical Research, McGill University, Montreal H3T 1E2, Canada

Running title: IRF-3 acetylation by CBP/p300 on Lys 77

Address correspondence to: Marc J. Servant, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada [REDACTED]

Keywords: Coactivators, Transcription Factors, Phosphorylation, Acetylation, IKK-related kinases

4.1 ABSTRACT

The transcription factor Interferon Regulatory Factor (IRF)-3 is a key mediator of innate immunity and is found associated with CREB-binding protein (CBP)/p300 co-activators, which were shown to be essential for both its nuclear accumulation and DNA binding activity. An atypical Nuclear Localization Sequence (NLS) is thought to be responsible for the nuclear localization of IRF3 following virus infection. Moreover, acetylation of IRF-3 was suggested to be required for its DNA binding activity. Interestingly, the NLS of IRF3 is composed of one lysine residue, lysine 77, which is conserved throughout the IRF family members and is acetylated in IRF-2, -7 and -9. We therefore investigated the role of this lysine in the transcriptional activity of IRF3. Replacing lysine 77 with an arginine residue or mutating the atypical NLS by replacing the two basic residues Lys-Arg to neutral residues Asn-Gly, creating IRF3 KR77/78NG, completely abrogated IRF3 transcriptional activity as verified by reporter gene assays as well as reconstitution into mouse embryonic fibroblasts IRF3 *-/-* cells. As expected, the strong constitutive transcriptional activity of a constitutively activated form of IRF3, IRF3-5D, was also totally blunted by the introduction of these mutations. The capacity of IRF3 K77R or IRF3 KR77/78NG to become phosphorylated, to homodimerize and, unexpectedly, to associate with CBP/p300 co-activators and to accumulate into the nucleus upon virus infection was not affected. Moreover, IRF3-5D K77R and IRF3-5D KR77/78NG were still able to associate with co-activators and accumulate into the nuclear compartment. On the other hand, these mutants were devoided of detectable DNA binding activity. Furthermore, we show that K77 is subjected to *in vivo* acetylation by CBP/p300 in a TBK1/IKKi dependent manner. Thus, our data questioned the proposed role of the atypical NLS sequence in the nuclear accumulation of IRF-3 and suggest that acetylation of IRF-3 on K77 by CBP/p300 represent one of last modifications required for its transcriptional activity.

4.2 INTRODUCTION

Interferon Regulatory Factor (IRF)-3 is an essential component of the innate immune system (1,2). This transcription factor is constitutively present in resting cells and becomes rapidly activated in response to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) recognition by Toll-like receptors (TLR3 and TLR4) and the Helicases-like receptors (HLRs) RIGI and MDA5 (2). Signaling through these receptors results in recruitment and activation of the IKK-related kinases TBK1/IKKi and phosphorylation of IRF-3 in the C-terminal region allowing its homodimerization (3-5). Inactive IRF-3 dimers then associate with histone acetyltransferase (HAT) activity to form an active holocomplex (5-8). The use of the adenovirus E1A oncogene product as well as co-immunoprecipitation experiments demonstrated that CREB-binding protein (CBP) and p300 are the principal coactivators tightly associated with IRF-3 following its phosphorylation and involved in regulating its transcriptional activity (5,9-12). P300/CBP-associated factor (PCAF) and TBP-associated factor 250 (TAFII250), other proteins with HAT activity, were also shown to associate with IRF-3 after its activation (8). Chromatin remodeling through histone acetylation by the HAT activity of these proteins may be essential for constituents of basal transcriptional machinery, such as transcription factor IID (TFIID), to gain access to transcriptionally repressed chromatin containing IRF target promoters (13). In addition, the association of IRF-3 to CBP/p300 seems to be a key step in its nuclear accumulation and sequence-specific DNA binding (6,14). In this scenario, homodimerized IRF-3 first get access to the nuclear compartment following the recognition of an atypical nuclear localization sequence (NLS), composed of two basic residues at a.a positions 77 and 78 (KR), by a subset of importin- α shuttling receptors. Once in the nuclear compartment, IRF-3 homodimers binds the Q-rich region of CBP/p300 proteins resident in the nucleus allowing their nuclear accumulation. In this context of the holocomplex, the HAT domain of CBP/p300 acetylates IRF-3 homodimers allowing DNA binding activity.

Interestingly, K77 is the only conserved lysine residue throughout the IRF family members. Whereas this conserved residue does not exist in the context of a NLS for the other IRF members, it was shown to act as the major acetyl-acceptor site for IRF-2 (K78), -7 (K92) and -9 (K81), and is thought to regulate DNA-binding activity (15-17). Because of the potential roles of K77 in both the context of an NLS and a potential acetyl-acceptor site, we investigated its role in the regulation of IRF-3 activity. The use of different IRF-3 mutants allowed us to identify K77 as a target of CBP/p300. Moreover, our results questioned the proposed role of the atypical NLS in the nuclear translocation of IRF-3.

4.3 MATERIALS AND METHODS

4.3.1 Reagent, antibodies, and plasmids.

Commercial antibodies were obtained from the following suppliers: anti-IRF-3 antibody (IBL, Japan); anti-Flag epitope (M2) and anti- β -actin (clone AC-74) were from Sigma (Oakville, Ontario, Canada). The anti-CBP (A22) was purchased from Santa Cruz (Santa Cruz, CA) and the anti-acetylated Lysine (catalogue number 9441), from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). The anti-mISG56 and mISG54 polyclonal antibodies were a kind gift of Dr. Ganes Sen (Lerner Research Institute, Cleveland, OH). A rabbit anti-serum raised against proteins of Sendai virus (SeV) was generously provided by Dr. John Hiscott (McGill University, Montreal, Qc). The pFlag-CMV2-IRF-3wt, IRF3-5D and IRF3 S396D plasmids containing the K77R and KR77/78NG were generated by site-directed mutagenesis (QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, La Jolla, CA). GST-IRF3 (1-133)wt, IRF3 (1-133)K77R and IRF3 KR77/78NG(1-133) were produced by subcloning PCR-amplified fragments in pGEX-4T-2. The ISG56 reporter plasmid, pGL3-ISG56-LUC was described previously (18). 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.

4.3.2 Cell culture, transfection and infections.

HeLa, 293T, Vero and MEFs IRF-3 KO cells (kindly provided by Tom Maniatis, Harvard University) were maintained in Dubelcco modified Eagle Medium supplemented with 10% fetal bovine serum. All cells tested negative for mycoplasma contamination. 293T cells were transfected with the calcium phosphate coprecipitation method. HeLa and MEFs IRF-3 *-/-* cells were transfected with lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) according the manufacturer's protocol with Lipofectamine 2000. Cells were infected with SeV at 100 hemagglutinating units (HAU)/10⁶ cells for 2 hours in serum free medium (SFM). Then the SFM was replaced with complete media for the rest of the kinetic.

4.3.3 Immunoblot analysis, Immunoprecipitation, and Native-PAGE.

Preparation of whole cell extracts (WCE), immunoprecipitation, Native-PAGE and immunoblot analysis were performed as described previously (19,20). 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 A-22 antibody preabsorbed 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 (19,20). For *in vivo* acetylation assays,

WCE (1 mg) were precleared for 30 minutes with 2 μ g of normal rabbit serum and 30 μ l of G-Sepharose beads. The resulting supernatants were incubated with 1:100 of anti-acetyl Lysine antibody for 16h at 4°C. Then, immune complexes were incubated with 30 μ l of protein G-Sepharose beads for 3h 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. Acetylated IRF-3 was revealed using immunoblotting against the Flag epitope. 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 μ g) 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 an anti-Flag monoclonal antibody.

4.3.4 Immunofluorescence.

HeLa cells were transfected with the different IRF-3 constructs for 12h and then left untreated or 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. The presence of the nucleus was revealed by a conventional 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining.

4.3.5 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 was omitted for the phosphomimetic IRF-3 mutants.

4.3.6 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

For electrophoretic mobility shift assay (EMSA), WCE (15 μ g) were incubated at 15°C for 5 min. in a buffer containing 20 mM HEPES pH 7.0, 40 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 mM NaF, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 4% (vol/vol) Ficoll, 0.08% (vol/vol) Triton X-100, 2 μ g of poly(dI)-poly(dC), and approximately 0.1 ng of ³²P-5'-end-labeled oligonucleotide in a final volume of 25 μ l. 1 μ l of an anti-Flag antibody was included in some experiments for 15 min. at 4°C before the addition of the radiolabeled oligonucleotides. Reactions were resolved using a 6% acrylamide-0.2% N,N'-methylenebisacrylamide polyacrylamide gel. Following electrophoresis the gels were dried and exposed to a Typhoon scanner 9410 for imaging. Double-stranded oligonucleotides

representing the ISG15 ISRE sequence and a mutated ISRE version have been described (21). EMSA using recombinant IRF-3 was performed as describes previously (8).

4.3.7 Production of recombinant GST-IRF-3.

PGEX-4T-2-IRF3 (1-133)wt, IRF3 (1-133)K77R and IRF3 KR77/78NG (1-133) were transformed in *Escherichia coli* and following isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG) induction (1 mM for 3 h at 37°C), purified over a glutathione agarose column (Amersham).

4.3.8 Reporter Gene Assays.

Subconfluent cells in 24-well plates were transfected with 50 ng of pRLTK reporter (Renilla luciferase for internal control) and 200 ng of pGL3-ISG56-LUC using the calcium phosphate coprecipitation method. Cells were harvested 20h 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.

4.4 RESULTS

4.4.1 Essential role of Lys77 in the transactivating activity of IRF-3

When aligned with other IRF family members, lysine in position 77 (K77) of IRF3, the helix- α 3 lysine, is the only one conserved among all members (Fig. 1). Since this residue is critical for the activity of IRF-2, -7 and -9 (15-17), we first substituted the K77 to

arginine in the context of IRF-3wt, creating IRF-3 K77R and verified the transcriptional activity of this mutant. Overexpression of IRF-3wt alone was able to transactivate the ISG56 promoter and as expected, ectopic expression of the IKK-related kinases TBK1 and IKKi further increased the transcription of the reporter gene (Fig. 2A). Importantly, in this reporter assay, IRF-3 K77R was devoided of any measurable transcriptional activity. It has been shown that the substitution of residues 396 to 405 with the phosphomimetic Asp generates two strong, constitutive transactivators named IRF-3 5D and IRF-3 S396D (10,22). Mutating K77 to Arg in the context of these mutants completely abrogated their transcriptional activities (Fig. 2A). In MEFs, ISG56 induction is totally dependent on the presence of IRF-3 (20,23). 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. As observed with the reporter assay, mISG56 induction is compromised only when Lys77 is mutated to Arg following SeV infection or ectopic expression of IRF3-5D and S396D (Fig 2B). To further substantiate these results, we took advantage of a biological assay where supernatants of HeLa cells overexpressing the different 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 (20). This protection was only effective following an infection of wtIRF-3-transfected HeLa cells with SeV. Consequently, involvement of endogenous IRF-3 is ruled out since SeV infection of GFP-transfected HeLa cells did not result in any sign of protection (Fig. 2C lanes 1 and 2). As expected, none of the K77R mutants tested (IRF-3 K77R, IRF3 5D K77R and IRF3 S396D K77R) conferred resistance to VSV challenge. These data indicate that Lys77 of IRF-3 is essential for its transcriptional and antiviral activities.

4.4.2 The dimerization and the nuclear accumulation of IRF3 are not affected in the context of a mutated NLS

Using high multiplicity of infection (MOI), the transactivating ability of IRF3 is dramatically increased which correlates with the generation of hyperactive forms of IRF3 that are easy to follow when looking at the dimerization, co-activators association and nuclear accumulation status of IRF-3 (20,23). Thus, we next verified the behavior of the different K77R mutants using these biochemical assays. Native PAGE analysis indicated that neither the dimerization of IRF-3 following SeV infection nor the ability of IRF3-5D and S396D to constitutively dimerize was affected by introduction of the K77R point mutant (Fig. 3A). Lys77 is located in the context of an atypical NLS for IRF3 (14) and we therefore suspected that the incapacity of the K77R-bearing mutants to activate transcription could have been related to the incapacity of these mutants to accumulate into the nuclear compartment. Intriguingly, the nuclear accumulation of IRF3 as measured by CBP association, immunofluorescence and cellular extract partitioning clearly indicated that Lys77 is not part of a functional NLS (Fig. 3B, C, and D). To further substantiate these data, we mutated the described NLS for IRF-3 (Fig. 1) by replacing the two basic residues Lys-Arg to neutral residues Asn-Gly, creating IRF3 KR77/78NG. This mutant was again totally devoided of any measurable transcriptional activity even if it kept its ability to homodimerize and more importantly to accumulate into the nuclear compartment (Fig. 4). Taken together, these results show that IRF-3 accumulates into the nuclear compartment independent of the characterized NLS.

4.4.3 Lysine 77 is a residue critical for DNA binding

The absence of transcriptional activity of IRF3 K77R and IRF3 KR77/78NG still in the presence of CBP association and nuclear accumulation could be due to impaired DNA binding. To test this hypothesis, we investigated the DNA binding ability of the K77R

mutant by EMSA on an ISRE probe. Using bacterially produced IRF3 N-terminal as well as overexpressed IRF3 mutants (with TBK1 or infected with SeV) isolated from cellular extracts, our results demonstrate that the K77R mutant was unable to bind DNA (Fig. 5).

4.4.4 IRF3 is acetylated *in vivo* in an IKK-related kinases-CBP/p300 dependent manner

IRF-2, -7, and -9 are acetylated *in vivo* by PCAF, CBP and p300 (15-17). Moreover, IRF-3 is acetylated by p300 *in vitro* but the precise acetyl-acceptor site is still unknown (6). Thus, Flag-IRF3wt and Flag-IRF3 K77R were overexpressed alone or in the presence of TBK1 and CBP or p300 co-activators in order to access whether IRF3 is acetylated *in vivo* on Lys77. Co-expression of TBK1 resulted in the phosphorylation of Flag-IRF3wt and K77R as observed by the formation of slow migrating forms in SDS-gel (Fig. 6, middle panel). Overexpression of IRF3wt (lane 1) alone or together with TBK1 (lane 2), p300 (lane 3) or CBP (lane 4) did not show any sign of IRF3 acetylation (Fig. 6). However, co-transfection of IRF3wt, in combination with TBK1 and CBP or p300, resulted in a significant acetylation of IRF-3wt (Fig. 6, lanes 5 and 6). Importantly, using Flag-IRF-3 K77R construct in this assay demonstrated that K77 is a major acetyl-acceptor site used by CBP or p300 (Fig. 6, compare lanes 5 and 6 to lanes 12 and 13). Thus, IRF-3wt is acetylated *in vivo* by CBP/p300 and requires C-terminal phosphorylation by TBK1.

4.5 DISCUSSION

Many proteins that are targeted to the nuclear compartment have imbedded in their amino acid sequences a canonical NLS that exist as a stretch of basic amino acids or a bipartite sequence of basic amino acids spaced by nonconserved amino acids (24). Using the search algorithm from PSORT II (25), the context and sequence of IRF3 did not reveal

the presence of a canonical NLS (Servant et al, data not shown). Thus one pair of basic residues situated amino terminal to the NES, K77-R78, was proposed to act as an atypical NLS (14). However, using confocal microscopy, CBP association assays and cellular extract partitioning, our data clearly demonstrate that mutating K77 alone or in the context of the atypical NLS did not prevent IRF3 to get access to the nucleus in response to virus infection or following ectopic expression of TBK1. Same conclusion was reached using the phosphomimetic IRF3 5D and 396D mutants that constitutively associate with CBP. We further demonstrate that the incapacity of the K77R bearing mutants to transactivate genes and induce an antiviral response was related to their failure to bind DNA. According to the crystal structure of IRF1 DNA-binding domain bound to a DNA element from the interferon- β promoter, Lys 78 (corresponding to Lys 77 in IRF3) is responsible for stabilizing the protein-DNA complex through hydrogen bonds (26).

Since of the lack of a functional NLS in IRF3, we propose that the nuclear translocation of IRF3 can be achieved by two scenarios. First, it is possible that a protein without its own NLS enters the nucleus *via* cotransport with a protein that has one. Albeit interacting with itself in the cytoplasm, IRF3 can directly interact with TBK1 and HSP90 (4,27). However, these proteins do not shuttle in and out from the nucleus (28,29). Recently, CBP/p300 were shown to translocate into the cytoplasm following type I IFN stimulation, resulting in IFNR acetylation (17). Thus another scenario could involve these co-activators not only in the nuclear accumulation of IRF3, where they are thought to serve in its nuclear sequestration (14), but also as cargos, allowing cytoplasmic IRF3 to enter into the nuclear compartment. Second, other transcription factors such as SMAD3, that do not contain a classical NLS, translocate into the nucleus using another general nuclear translocation signal known as the Ser/Thr-Pro-Ser/Thr (S/T-P-S/T) sequence (30). Phosphorylation of these phosphoacceptor sites is required for interaction of SMAD3 with the nuclear import protein importin β . S/T-P-S/T sequence may thus act as a general nuclear translocation signal for the NLS-independent translocation of various signaling molecules, such as IRF3, to the nucleus. Notably, Ser 123 of IRF3 could fit this consensus

as it is being followed by Pro and the acidic a.a. aspartic acid. Work is in progress to verify whether these mechanisms are involved in the nuclear translocation of IRF3.

The DNA binding activity of several transcription factors such as E2F1 and p53 is regulated through their acetylation by co-activators CBP, p300 and PCAF (31,32) and IRF-3 seems to follow the same rule. *In vitro* experiments have demonstrated that GST-IRF-3 was acetylated by p300 and that CBP/p300 is a necessary subunit for the ISRE binding activity of IRF-3 (6). However, several questions are still unanswered. Does IRF-3 is acetylated in a TBK1/IKKi dependent pathway *in vivo*? Which coactivators are involved? Which lysine residue(s) is (are) targeted? What is(are) the role(s) of the(se) lysine residue(s) in the antiviral activity of IRF-3? We show here that IRF3 is acetylated *in vivo* by CBP/p300 in a TBK1-dependent manner. Lys 77 is the major residue targeted by the HATs because IRF3K77R was severely impaired in its ability to become acetylated in our assay.

Acetylation of IRF7 by PCAF at the conserved Lys residue (Lys 92) decreases its DNA binding ability (15). However, the acetylation of IRF2 does not alter its DNA binding activity (33). In opposite to IRF7, we propose here that acetylation of IRF3 on Lys 77 by CBP/p300 is required for its DNA binding because the use of an IRF3 mutant that was not acetylated by CBP/p300 but in which K77 was preserved, was totally blunted in its capacity to transactivate gene (Bibeau-Poirier and Servant, unpublished data). Since the recruitment of IRF3 to the IFN β promoter is dependent upon the binding of ATF2-c-jun heterodimers (34), it will be interesting to address to role of K77 acetylation in AP-1 transcription factors association.

4.6 ACKNOWLEDGMENTS

We thank John Hiscott and Ganes Sen for reagents used in this study. This work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to M.S. (MOP-53282). M.S. is a recipient from a Rx&D/CIHR Health Research Foundation Career Awards in Health Sciences. A.B.P. and J.F.C are both recipients of studentships from the Robert Dugal-Health Research Foundation and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

4.7 REFERENCES

1. Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N., and Taniguchi, T. (2000) *Immunity* 13, 539-548.
2. Honda, K., and Taniguchi, T. (2006) *Nat Rev Immunol* 6, 644-658
3. Sharma, S., tenOever, B. R., Grandvaux, N., Zhou, G. P., Lin, R., and Hiscott, J. (2003) *Science* 300, 1148-1151
4. Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., Coyle, A. J., Liao, S. M., and Maniatis, T. (2003) *Nat Immunol* 4, 491-496
5. Lin, R., Mamane, Y., and Hiscott, J. (1999) *Mol Cell Biol* 19, 2465-2474.
6. Suhara, W., Yoneyama, M., Kitabayashi, I., and Fujita, T. (2002) *J Biol Chem* 277, 22304-22313
7. Suhara, W., Yoneyama, M., Iwamura, T., Yoshimura, S., Tamura, K., Namiki, H., Aimoto, S., and Fujita, T. (2000) *J Biochem (Tokyo)* 128, 301-307.
8. Lin, R., Genin, P., Mamane, Y., and Hiscott, J. (2000) *Mol Cell Biol* 20, 6342-6353.

9. Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Fukada, M., Nishida, E., and Fujita, T. (1998) *EMBO Journal* 17, 1087-1095
10. Lin, R., Heylbroeck, C., Pitha, P. M., and Hiscott, J. (1998) *Molecular and Cellular Biology* 18, 2986-2996
11. Weaver, B. K., Kumar, K. P., and Reich, N. C. (1998) *Mol Cell Biol* 18, 1359-1368.
12. Juang, Y. T., Lowther, W., Kellum, M., Au, W. C., Lin, R., Hiscott, J., and Pitha, P. M. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9837-9842
13. Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000) *Nature* 403, 41-45
14. Kumar, K. P., McBride, K. M., Weaver, B. K., Dingwall, C., and Reich, N. C. (2000) *Mol Cell Biol* 20, 4159-4168.
15. Caillaud, A., Prakash, A., Smith, E., Masumi, A., Hovanessian, A. G., Levy, D. E., and Marie, I. (2002) *J Biol Chem* 277, 49417-49421
16. Masumi, A., Yamakawa, Y., Fukazawa, H., Ozato, K., and Komuro, K. (2003) *J Biol Chem* 278, 25401-25407
17. Tang, X., Gao, J. S., Guan, Y. J., McLane, K. E., Yuan, Z. L., Ramratnam, B., and Chin, Y. E. (2007) *Cell* 131, 93-105
18. Grandvaux, N., Servant, M. J., tenOever, B., Sen, G. C., Balachandran, S., Barber, G. N., Lin, R., and Hiscott, J. (2002) *J Virol* 76, 5532-5539
19. Bibeau-Poirier, A., Gravel, S. P., Clement, J. F., Rolland, S., Rodier, G., Coulombe, P., Hiscott, J., Grandvaux, N., Meloche, S., and Servant, M. J. (2006) *J Immunol* 177, 5059-5067
20. Clement, J. F., Bibeau-Poirier, A., Gravel, S. P., Grandvaux, N., Bonneil, E., Thibault, P., Meloche, S., and Servant, M. J. (2008) *J Virol* 82, 3984-3996
21. Preston, C. M., Harman, A. N., and Nicholl, M. J. (2001) *J Virol* 75, 8909-8916

22. Servant, M. J., Grandvaux, N., tenOever, B. R., Duguay, D., Lin, R., and Hiscott, J. (2003) *J Biol Chem* 278, 9441-9447
23. Collins, S. E., Noyce, R. S., and Mossman, K. L. (2004) *J Virol* 78, 1706-1717
24. Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E., and Corbett, A. H. (2007) *J Biol Chem* 282, 5101-5105
25. Nakai, K., and Horton, P. (1999) *Trends Biochem Sci* 24, 34-36
26. Escalante, C. R., Yie, J., Thanos, D., and Aggarwal, A. K. (1998) *Nature* 391, 103-106.
27. Yang, K., Shi, H., Qi, R., Sun, S., Tang, Y., Zhang, B., and Wang, C. (2006) *Mol Biol Cell* 17, 1461-1471
28. Passinen, S., Valkila, J., Manninen, T., Syvala, H., and Ylikomi, T. (2001) *Eur J Biochem* 268, 5337-5342
29. Lin, R., Lacoste, J., Nakhaei, P., Sun, Q., Yang, L., Paz, S., Wilkinson, P., Julkunen, I., Vitour, D., Meurs, E., and Hiscott, J. (2006) *J Virol* 80, 6072-6083
30. Chuderland, D., Konson, A., and Seger, R. (2008) *Mol Cell* 31, 850-861
31. Martinez-Balbas, M. A., Bauer, U. M., Nielsen, S. J., Brehm, A., and Kouzarides, T. (2000) *Embo J* 19, 662-671.
32. Luo, J., Li, M., Tang, Y., Laszkowska, M., Roeder, R. G., and Gu, W. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2259-2264
33. Masumi, A., and Ozato, K. (2001) *J Biol Chem* 276, 20973-20980.
34. Falvo, J. V., Parekh, B. S., Lin, C. H., Fraenkel, E., and Maniatis, T. (2000) *Mol Cell Biol* 20, 4814-4825.

4.8 FIGURE LEGENDS

Figure 1. The N-terminal DNA binding domain alignment among IRF family members. $\alpha 2$ and 3 helices are depicted. Grey shading indicates the only conserved lysine residue among the IRF family members. The asterisk denote the atypical NLS suggested for IRF-3.

Figure 2. Lysine 77 (K77) of IRF3 is involved in its anti-viral activity. A) 293Ad5 QBI cells were cotransfected with the indicated constructs: 100 ng of Flag-IRF3 *wt* or K77R +/- 5 ng de Flag-TBK1 or Flag-IKK ϵ , or 20 ng of Flag-IRF3 5D, 5DK77R, 396D or 396DK77R, 200 ng of luciferase rapporter ISG56 (RLU1) and 50 ng of pRL-TK (RLU2). 24 hours post-transfection, the luciferase activity was analyzed and normalized on renilla activity. B) MEF IRF3^{-/-} cells were transfected with the indicated constructs. 24 hours post-transfection, the cells were infected with Sendai Virus (SeV) (200 HAU/mL) for 12 hours. Whole cell extracts were prepared and analyzed for IRF-3, ISG54, ISG56, actin and viral proteins. C) HeLa cells in a 6-well plates were transfected with 0.5 μ g 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-transfection, supernatants containing anti-viral cytokines were collected, cleared of cellular contaminants and transferred on Vero cells plated in 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 IRF3 construct to confer viral resistance. Cellular

extracts were also analyzed by immunoblot for Flag-IRF-3 expression levels and viral proteins in HeLa cells 20 h postinfection.

Figure 3. IRF3 dimerization, nuclear translocation and nuclear accumulation are not affected in K77R mutant. A) 293Ad5 QBI cells were cotransfected with the indicated constructs. 24 hours post-transfection, cells were left untreated or infected with SeV (200 HAU/mL) for the indicated time. Whole cell extracts were prepared and subjected to native PAGE analysis. B) 293Ad5 QBI cells were cotransfected with the indicated constructs. 48 hours post-transfection, cell lysates were prepared and subjected to immunoprecipitation with anti-CBP antibody. The immunoprecipitated material was analyzed by immunoblotting with anti-Flag antibodies. The same cellular extracts were also used in native PAGE analysis. C) HeLa cells in a 6-well plates were transfected with 0.5 µg of the indicated plasmid for 12 hours and the cells were left untreated or infected with SeV (200 HAU/mL) for the indicated time. Cellular localization of the different Flag-IRF3 mutants was analyzed by immunofluorescence using an antibody anti-Flag. D) 293Ad5 QBI cells were cotransfected with the indicated constructs. 24 hours post-transfection, nuclear extracts were prepared. Nuclear and cytoplasm extracts were analyzed for IRF3 expression by immunoblotting.

Figure 4. The nuclear translocation of IRF3 following its conventional activation seem not regulated by its characterize NLS KR77/78. A) 293Ad5 QBI cells were cotransfected with the indicated constructs: 20 ng of Flag-IRF3 5D, 5DKR77/78NG or 5DK77R, 200 ng of luciferase rapporter ISG56 (RLU1) and 50 ng of pRL-TK (RLU2). 24 hours post-transfection, the luciferase activity was analyzed and normalized on renilla activity; B) 293T cells were cotransfected with the indicated constructs. 24 hours post-transfection, cells were left untreated or infected with SeV (200 HAU/mL) for the indicated time. Whole cell extracts were prepared and subjected to native PAGE analysis; C) HeLa

cells in a 6-well plates were transfected with 0.5 µg of the indicated plasmid for 12 hours and the cells were left untreated or infected with SeV (200 HAU/mL) for the indicated time. Cellular localization of the different Flag-IRF3 mutants was analyzed by immunofluorescence using a antibody anti-Flag. D) 293Ad5 QBI cells were cotransfected with the indicated constructs. 24 hours post-transfection, nuclear and cytoplasm extracts were prepared. Nuclear and cytoplasm extracts were analyzed for IRF3 expression by immunoblotting. E) 293Ad5 QBI cells were cotransfected with the indicated constructs. 48 hours post-transfection, cell lysates were prepared and subjected to immuno-precipitation with anti-CBP antibody. The immunoprecipitated material was analyzed by immunoblotting with anti-Flag antibodies.

Figure 5. Lysine 77 is a residue critical for DNA binding of IRF3. A) 293Ad5 QBI cells were cotransfected with the indicated constructs. 24 hours post-transfection, cells were left untreated or infected with SeV (200 HAU/mL) for 20 hours. Whole cell extracts were prepared and subjected to EMSA analysis using $\gamma^{32}\text{P}$ -labeled ISG15 probe. An anti-Flag antibody was used for supershifted. B) An EMSA was performed with the indicated amounts of recombinant N-terminal of IRF3 *wt*, K77R or KR77/78NG. The ^{32}P -labeled probe corresponded to the ISRE of the RANTES gene.

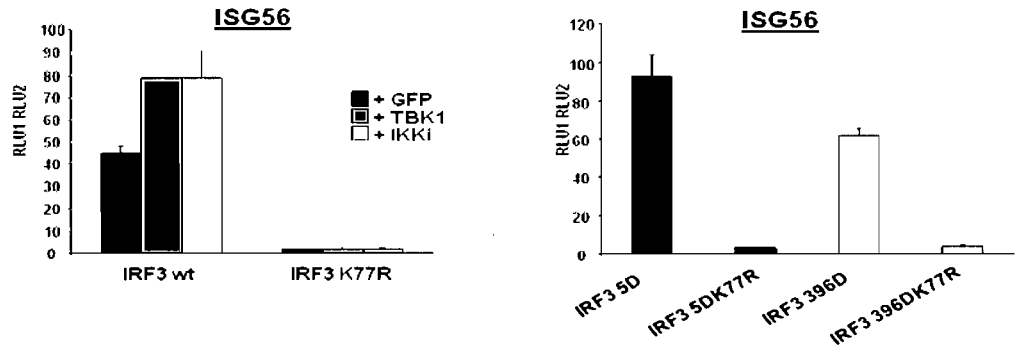
Figure 6. IRF3 is acetylated *in vivo* in an IKK-related kinases-CBP/p300 dependent manner. 293Ad5 QBI cells were cotransfected with the indicated constructs. 48 hours post-transfection, cell lysates were prepared and subjected to immuno-precipitation with anti-KAc antibody. The immunoprecipitated material was analyzed by immunoblotting with anti-Flag antibodies.

	$\alpha 2$	$\alpha 3$	
hIRF4	55 KHAGKQDYNREEDAALFKAWALFKGKFREGIDKPDP-----	PTWKTRLRCALNKS	105
hIRF8	41 KHAGKQDYNQEVDAIFKAWAVFKGKFKEG-DKAEP-----	ATWKTRLRCALNKSP	90
hIRF9	43 KHAGKQDFREDQDAAFFKAWAIFKGYKEG-DTGGP-----	AVWKTRLRCALNKSS	92
hIRF5	48 RHATRHGPSQDGDNTIFKAWAKETGKYTEGVDEADP-----	AKWKANLRCALNKS	98
hIRF6	41 KHATRHSPQEEENTIFKAWAVETGKYQEGVDDPDP-----	AKWKAQLRCALNKS	91
hIRF1	39 KHAACHGWDINKDAFLFRSWAIHTGRYKAGEKEPDP-----	KTWKANFRFCAMNSLP	89
hIRF2	39 MHAARHGWDVEKDAPLFRNRAIHTGKHQPGVDKPDP-----	KTWKANFRFCAMNSLP	89
hIRF7	45 KHFAKDLSEADARIFKAWAVARGRWPPSSRGGGPPPEAETAERAGWKTNFRFCALRSTR	103	
hIRF3	39 KHGLRQDAQ-QEDFGIFQAWAEATGAYVPGRDKPDL-----	PTWKRNFRCALNRKE	88

*

Figure 1

A)



B)

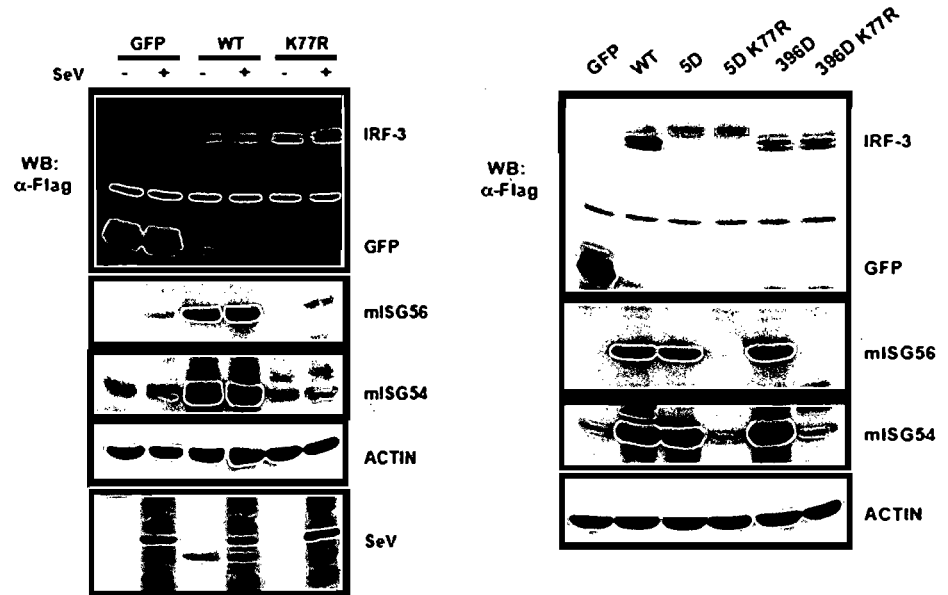


Figure 2

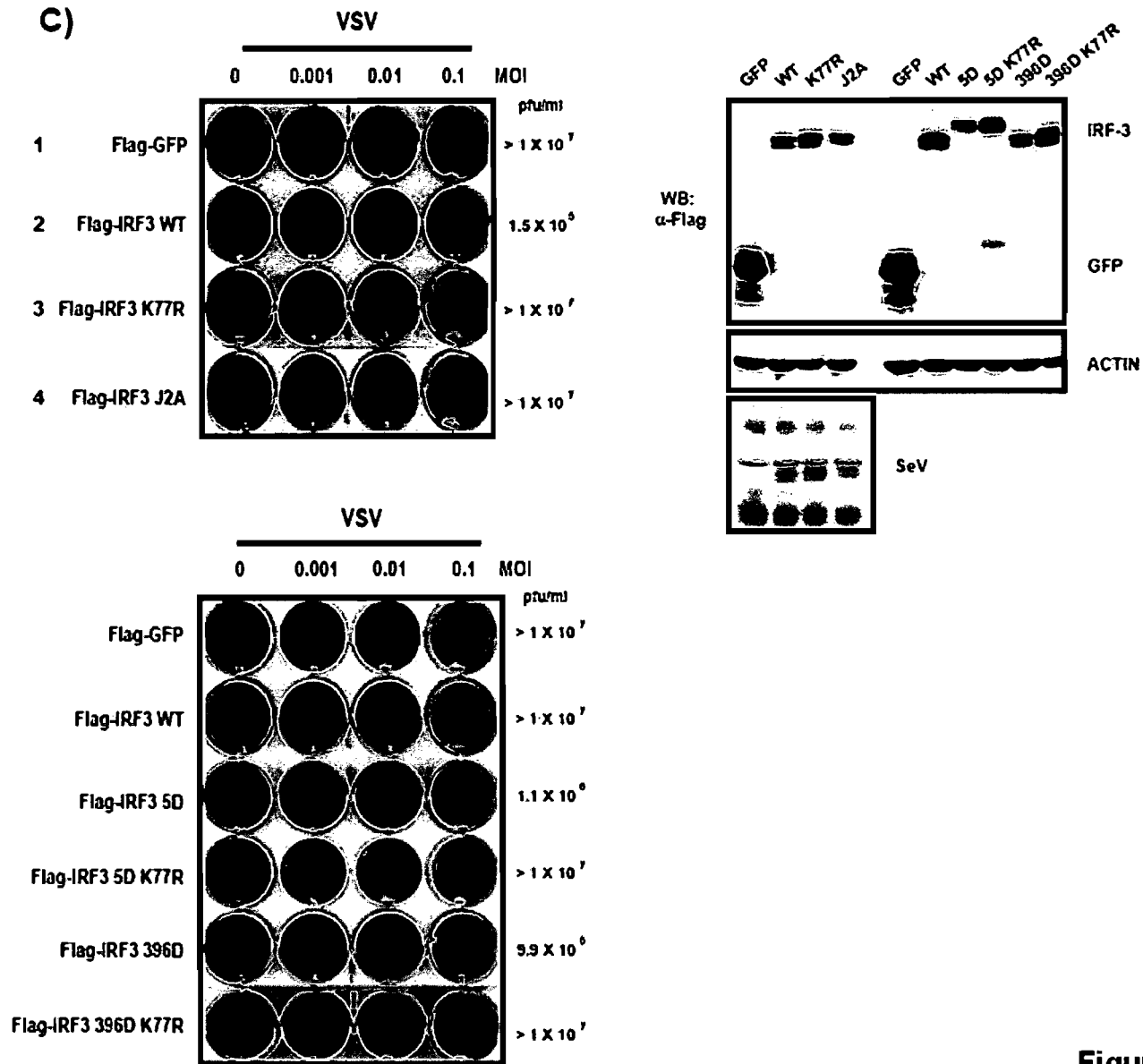


Figure 2

A)

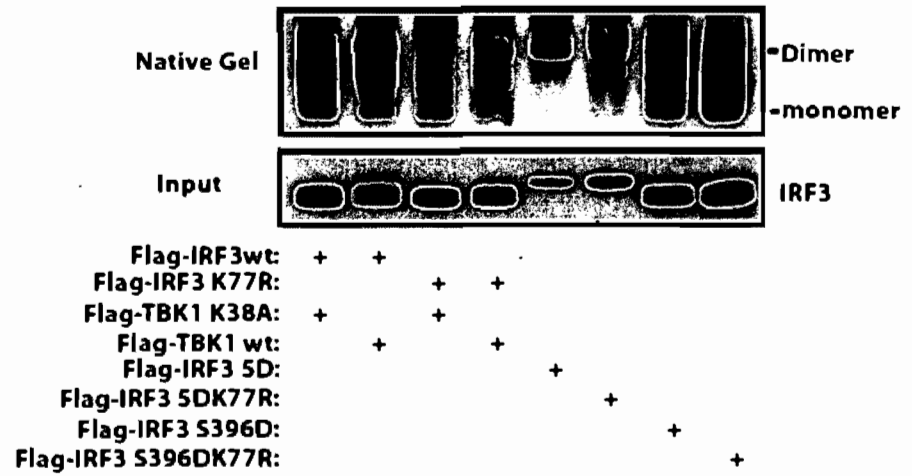
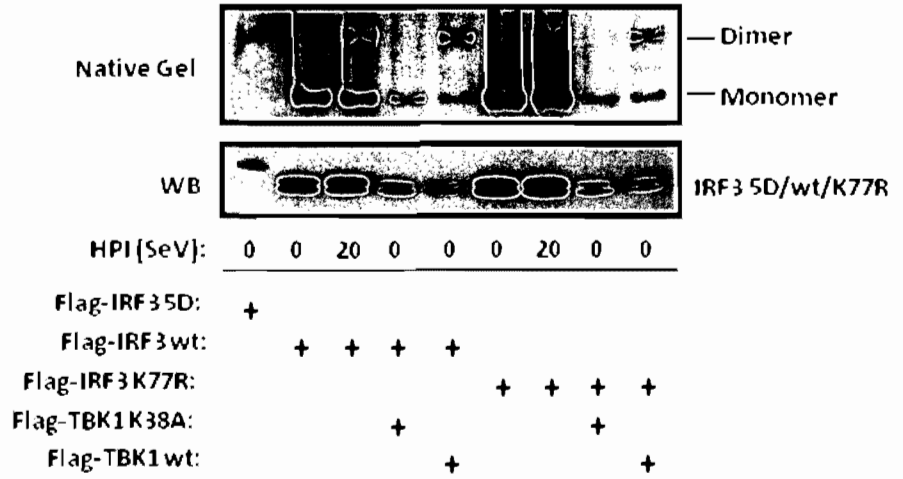


Figure 3

B)

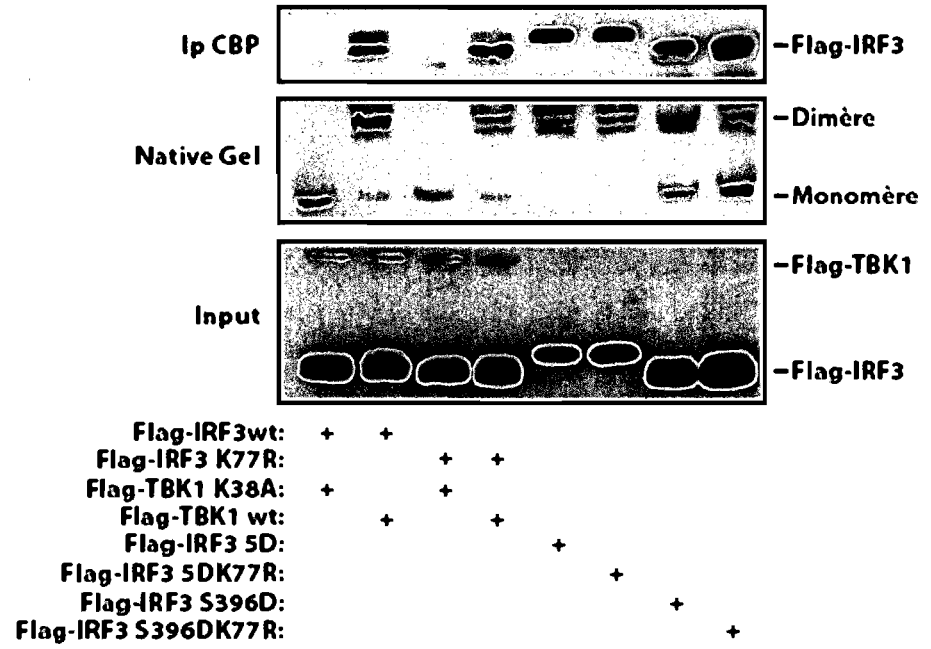


Figure 3

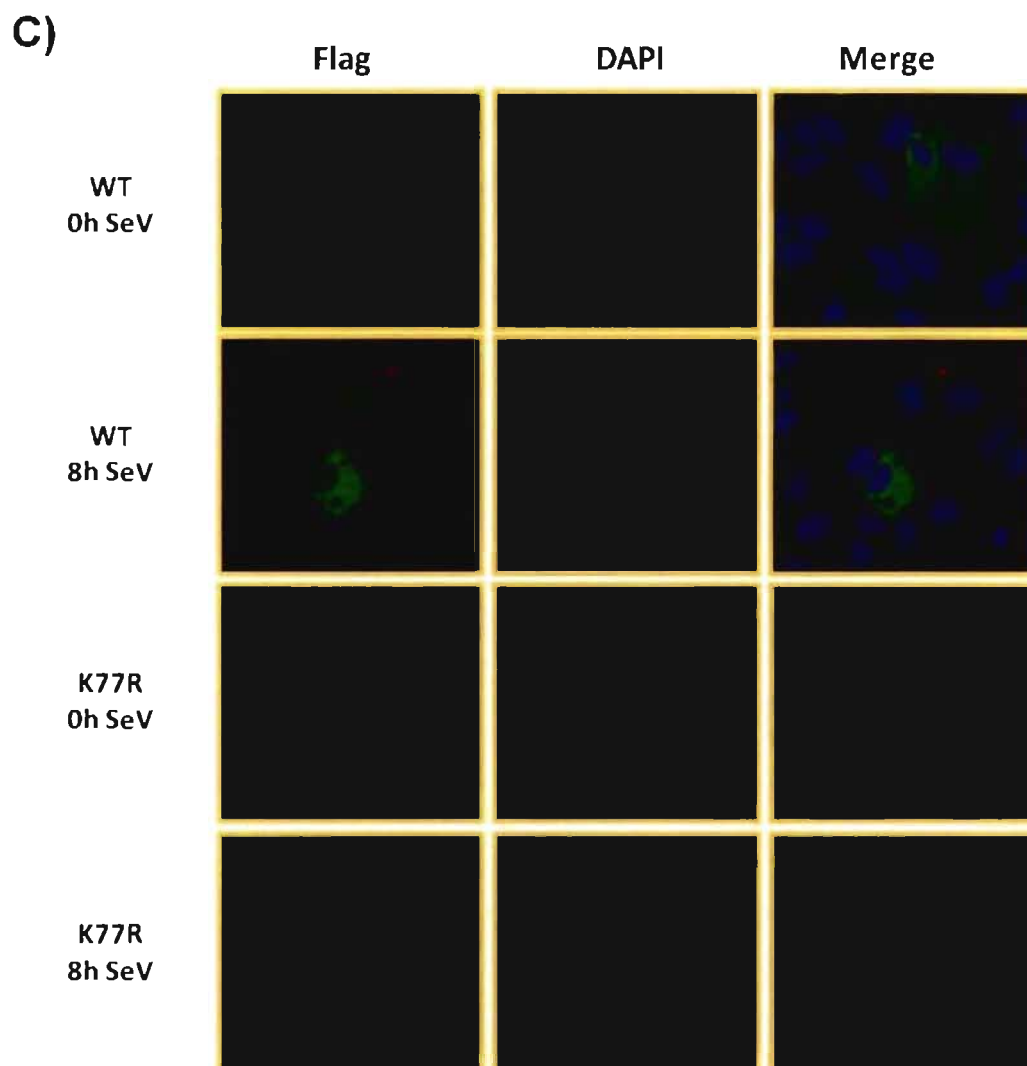


Figure 3

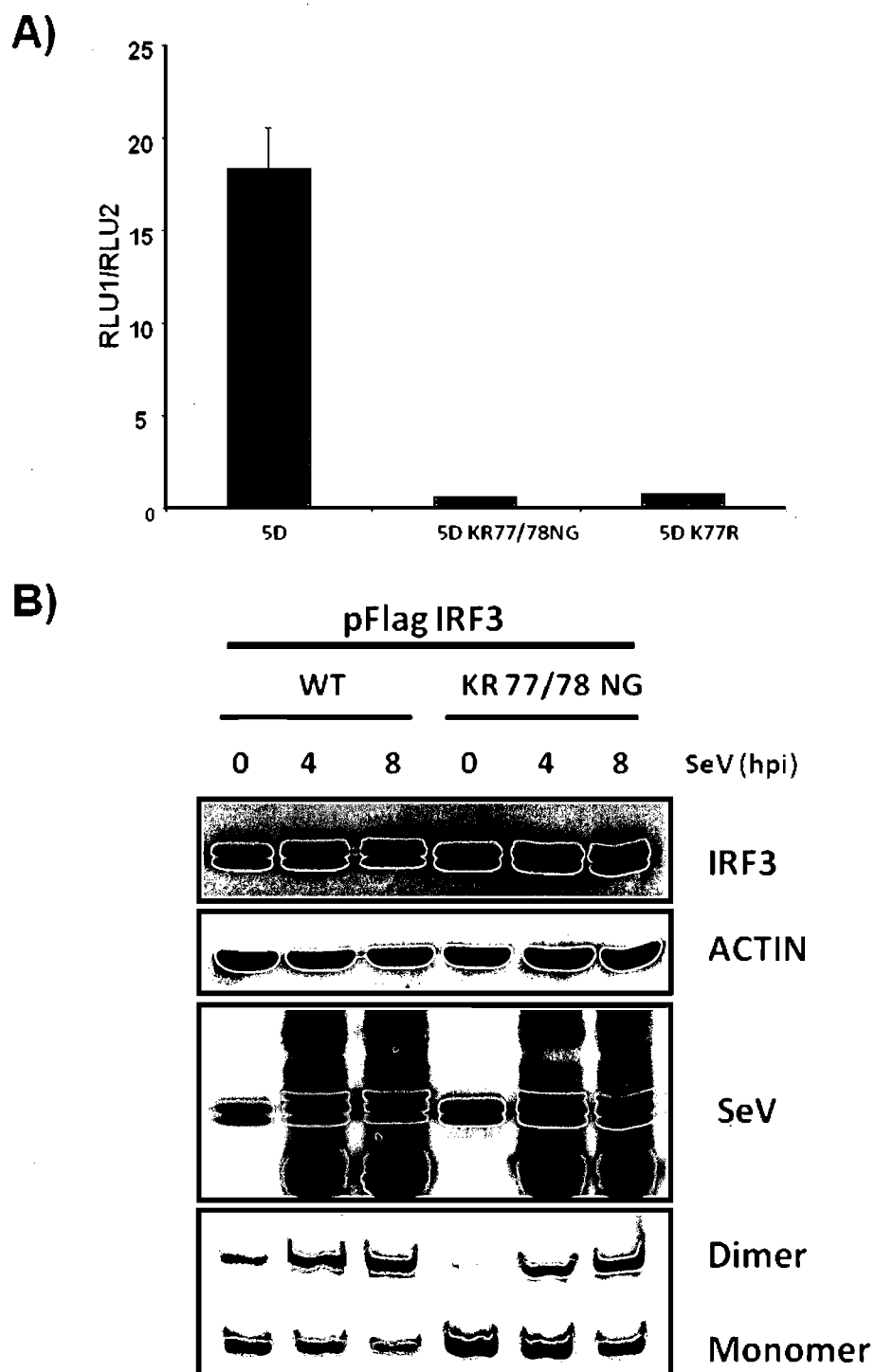


Figure 4

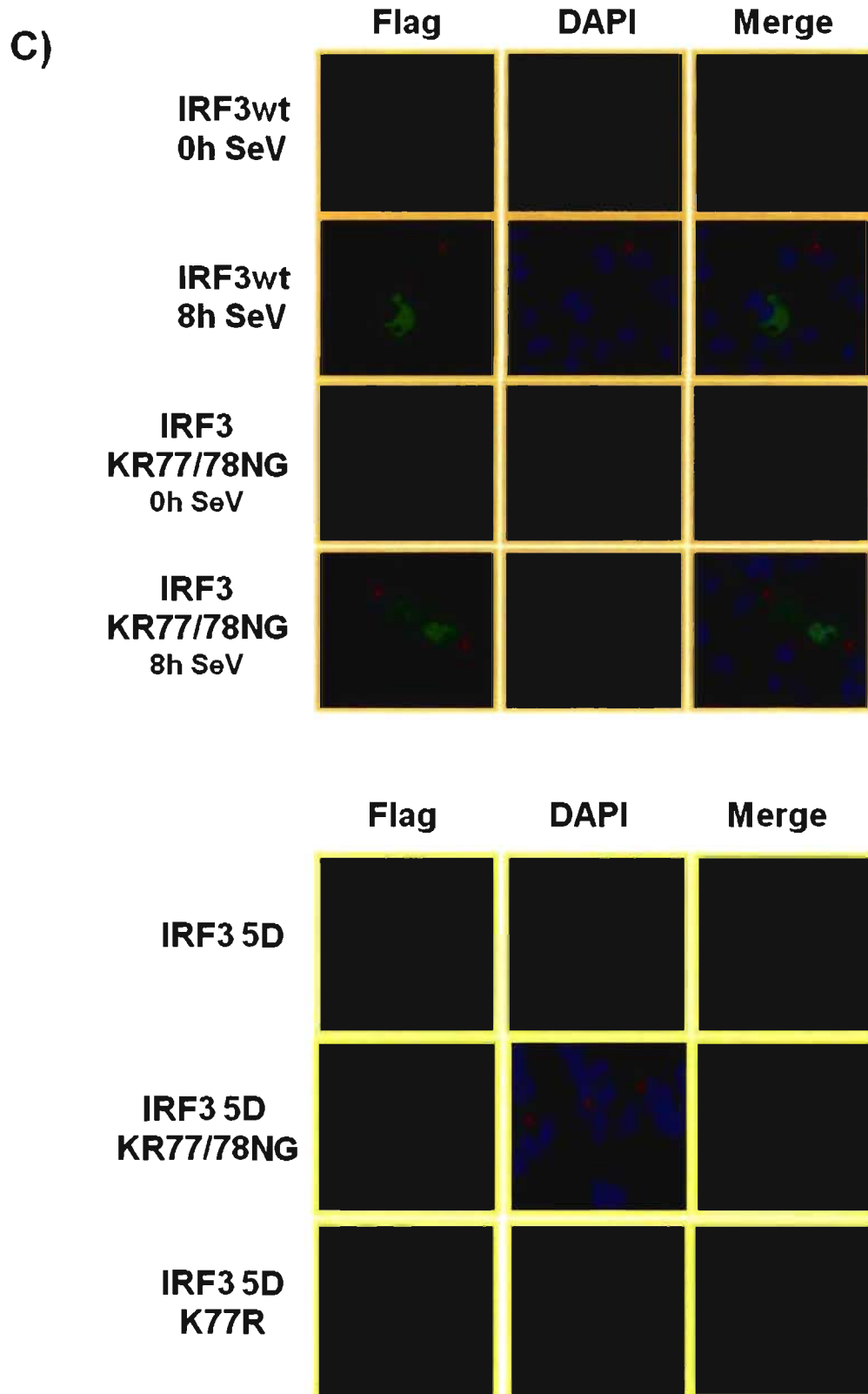


Figure 4

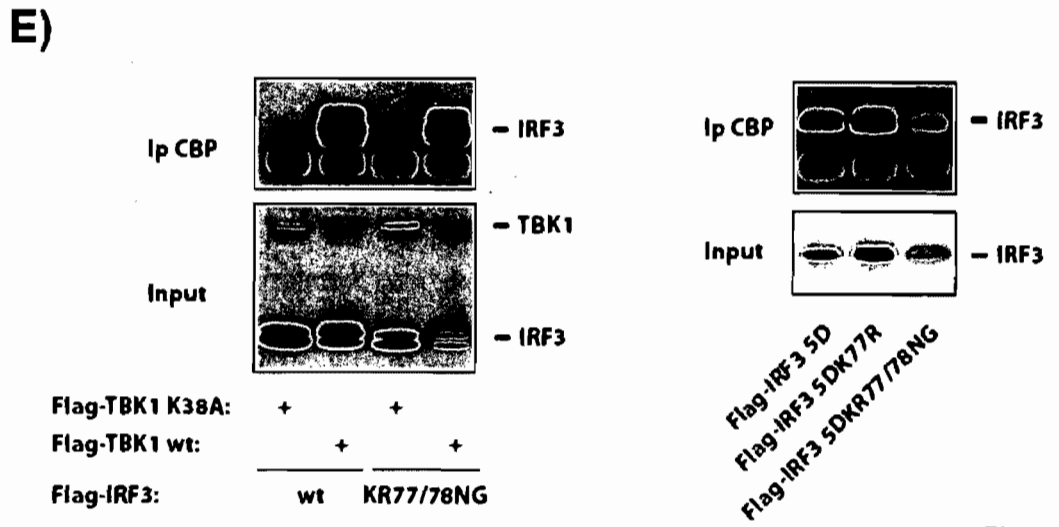
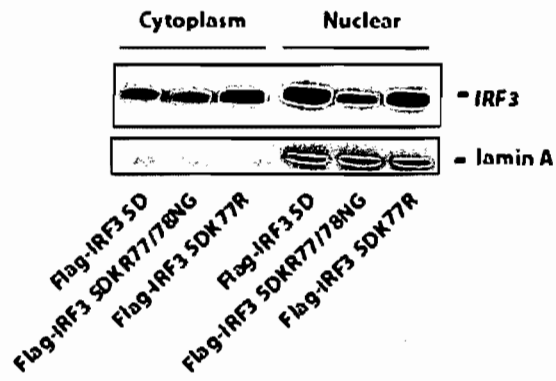
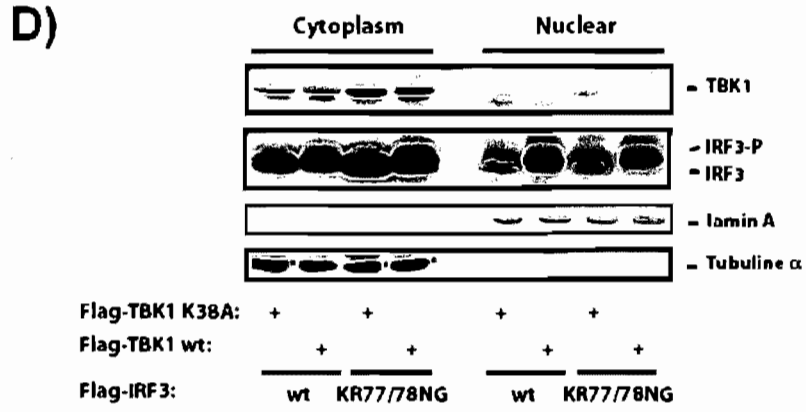


Figure 4

A)

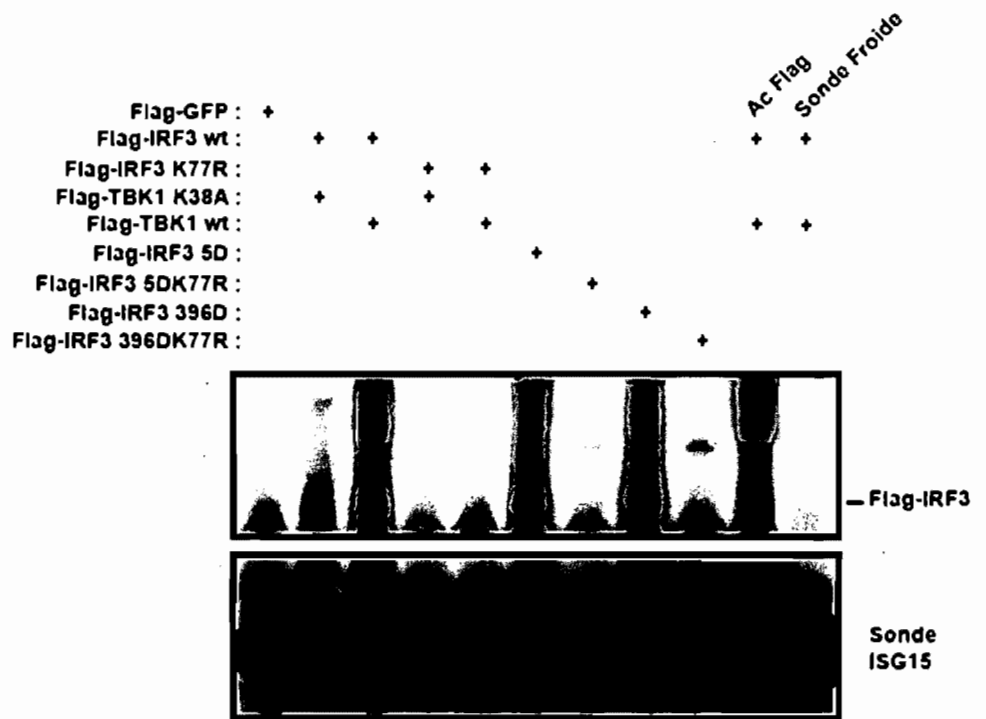
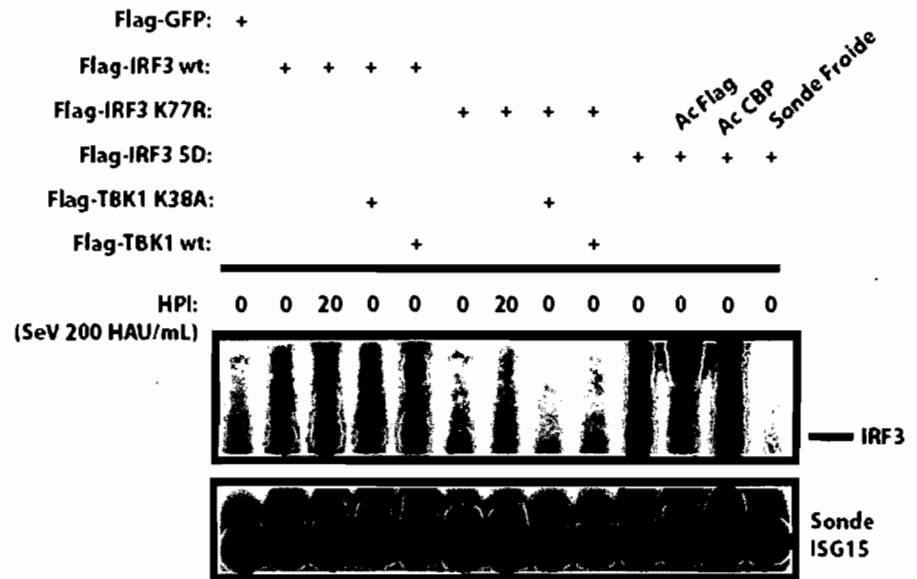


Figure 5

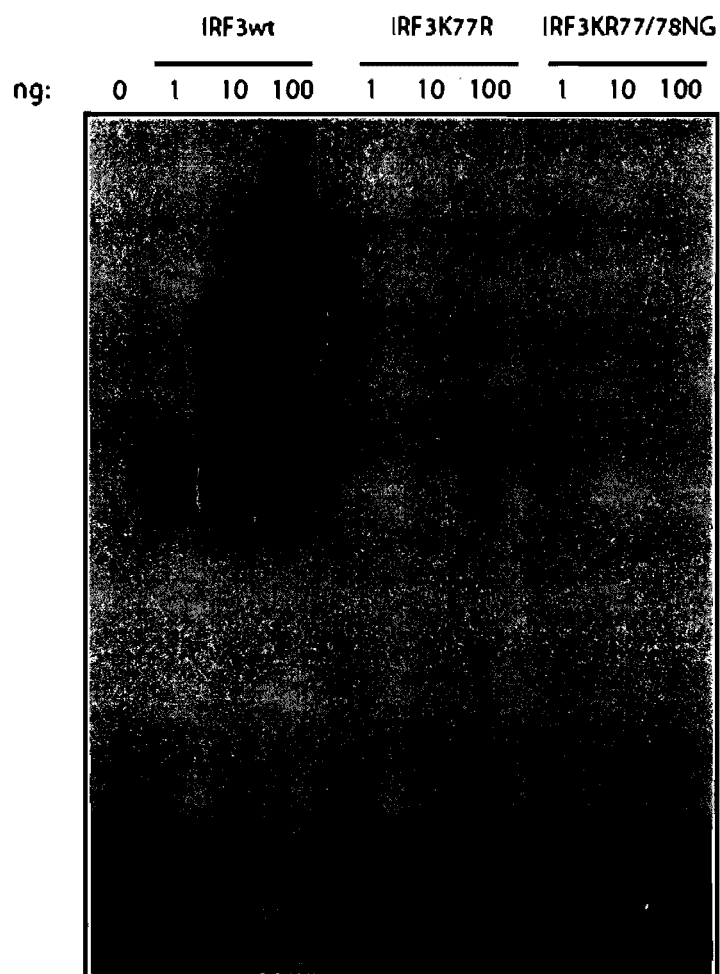
B)

Figure 5

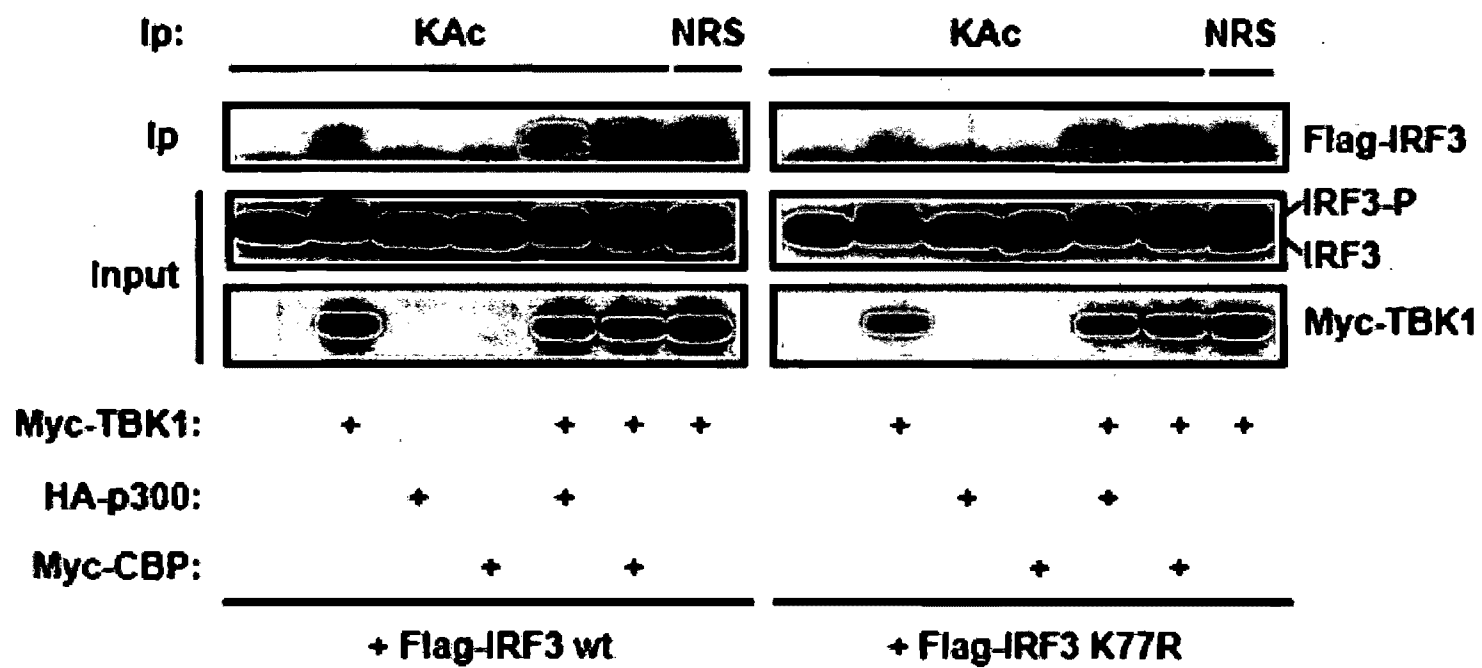


Figure 6

5. Discussion et perspectives

Dans notre première étude, nous avons caractérisé les processus moléculaires impliqués dans la dégradation des formes actives d'IRF3, dépendante du protéasome. L'utilisation d'approches pharmacologiques, biochimiques et génétiques suggèrent fortement que la phosphorylation d'IRF3 à son extrémité carboxy (C)-terminale, par les sérine/thréonine kinases TBK1 et IKKi, est un signal de reconnaissance pour la liaison d'une E3 ligase associée à la protéine d'échafaudage culline 1. Celle-ci est responsable de la polyubiquitination et de la dégradation dépendante du protéasome de ce facteur de transcription. En effet, l'inhibition du protéasome par le MG132 ou la lactacystine permet une stabilisation des formes hyperactives d'IRF3. Aussi, nous avons démontré qu'IRF-3 est une protéine polyubiquitinée *in vivo* et que cette ubiquitination augmente en réponse à une infection virale. De plus, l'utilisation de lignées cellulaires thermosensibles nous a permis de démontrer que la dégradation d'IRF-3 induite par un virus est dépendante des processus d'ubiquitination et de neddylation. En accord avec ces observations, la surexpression d'une version dominante négative de la protéine culline 1 réduit de façon significative la dégradation d'IRF-3 induite par une infection virale. Afin de déterminer si les sites phospho-accepteurs localisés dans la portion C-terminale d'IRF-3 pourraient servir de signal de déstabilisation, nous avons mesuré la demie-vie de différentes versions constitutivement actives d'IRF-3 (IRF3-5D et IRF3-7D). En effet, nous avons montré que ces derniers ont une demie-vie plus courte (respectivement 7,2 et 5,9 heures) que celui de type sauvage non phosphorylé (15,5 heures). De plus, aucune dégradation d'IRF-3 n'a été observée chez les fibroblastes embryonnaires de souris TBK1^{-/-}. Ainsi, l'ensemble de nos résultats suggère qu'une infection virale stimule, chez la cellule hôte, une voie de signalisation qui module spécialement le niveau d'expression d'IRF-3. D'abord, IRF-3 est phosphorylé dans sa portion C-terminale par les protéines kinases IKKi/TBK1 et ensuite, il est polyubiquitiné en partie par une E3 ligase associée à la protéine d'échafaudage culline 1. Par conséquent, le premier objectif de cette thèse, qui était de caractériser les voies de signalisation et les partenaires impliqués dans la dégradation d'IRF3, a été en partie atteint.

Tel qu'expliqué dans la section 1.4.5 de l'introduction, certains virus ont la faculté d'induire la dégradation d'IRF3 afin d'antagoniser ses effets biologiques. En effet, le virus *kaposi's sarcoma-associated herpesvirus* (KSVH ou HHV8) encode et induit rapidement l'expression de la protéine E3 ligase RTA responsable de la dégradation d'IRF3²⁴⁹. Cependant, dans le cadre de notre étude, nous pensons que les mécanismes moléculaires responsables d'une dégradation d'IRF3 suite à son activation par une infection virale (Sendai Virus) sont stimulés par la cellule hôte. Premièrement, tel que présenté à la Figure 5C du premier manuscrit (chapitre 3), un traitement des cellules au PolyI :C, un analogue de structures dsRNA, induit la dégradation d'IRF3 suite à son activation. Deuxièmement, notre laboratoire a démontré que l'inhibition de la *néo*-synthèse protéique à l'aide d'un pré-traitement des cellules avec de la cycloheximide, inhibiteur pharmacologique, ne bloque pas la dégradation d'IRF3 engendrée par une infection virale avec le *human cytomegalovirus* (HCMV)²¹¹. Pour finir, l'infection de cellules en culture avec un virus HCMV inactivé aux rayons ultra-violet induit une activation et une dégradation d'IRF3 (voir Figure 19). Par conséquent, l'activation de PRRs des cellules hôtes par la reconnaissance de PAMPs a la capacité d'activer IRF3 pour induire les effets biologiques désirés et ensuite, stimuler sa dégradation pour contrôler et réprimer ces fonctions immunitaires pouvant devenir néfastes lorsqu'elles sont prolongées.

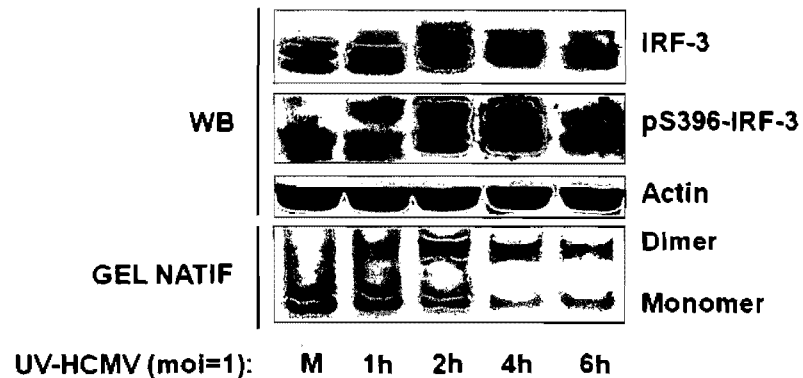


Figure 19 : IRF3 est activé et dégradé suite à une infection par le virus HCMV inactivé aux rayons ultra-violet.

Des cellules MRC5 ont été infectées avec du HCMV (préalablement inactivé par une exposition de 60 minutes aux rayons ultra-violet) durant les périodes de temps indiquées. Les extraits cellulaires ont été chargés sur gel dénaturant ou non-dénaturant (gel natif) et analysés par immunobuvardage à l'aide des anticorps indiqués.

Bien que nous ayons identifié un type d'E3 ligase impliqué dans la dégradation d'IRF3 suite à son activation, c'est-à-dire un complexe SCF, cette classe de protéines ne semble pas être la seule à moduler cet événement. En effet, la surexpression d'une version dominante négative de culline 1 (Cul1-N252) ne prévient pas complètement la dégradation d'IRF3 suite à une infection par le SeV (voir Figure 3C du premier manuscrit (chapitre 3)). Ceci suggère l'existence d'une ou plusieurs autres E3 ligases impliquées dans ce processus. Toutefois, puisque l'utilisation d'un chélateur de Zn^{++} bloque totalement cette dégradation (voir Figure 3A du premier manuscrit (chapitre 3)), ceci suggère que ces E3 ligases soient de type RING. Dans ce contexte, deux E3 ligases d'IRF3 ont été identifiés depuis la publication de notre étude. Tout d'abord, comme discuté dans la section 1.4.4.6, Ro52 (aussi connue sous le nom de TRIM21), une E3 ligase de type RING, module l'ubiquitination et la dégradation d'IRF3²⁴⁴. Cependant, de façon surprenante, ceci se fait indépendamment de l'état d'activation d'IRF3. Aussi, ce groupe de recherche montre que l'inhibition de synthèse de Ro52 par la technique de shRNA induit : -1- un niveau

d'expression d'IRF3 plus faible au niveau basal; -2- une augmentation de l'expression d'IRF3 suite à un traitement au PolyI :C. L'ensemble de ces résultats suggère plutôt un rôle de Ro52 dans la stabilité basale d'IRF3. Ensuite, un autre groupe de recherche montre que la protéine RCBK1, une E3 ligase avec un domaine RING-IBR-RING dans son extrémité C-terminale comme Triad3A (section 1.5.1.3.2), est induite suite à une infection virale et permet l'ubiquitination et la dégradation d'IRF3 à l'état inactif. Ainsi, depuis la publication de notre étude, ces deux équipes ont identifié des E3 ligases de type RING responsables de la stabilité basale d'IRF3 et donc, l'identité des E3 ligases impliquées dans la dégradation des formes phosphorylées et hyperactives d'IRF3 reste inconnue.

Pour notre part, la première partie de mon projet de recherche nous a permis d'identifier un type de protéines impliquées dans la dégradation des formes actives d'IRF-3, dépendante du protéasome. Plus précisément, nous avons réussi à discriminer la famille d'E3 ligase, c'est-à-dire de type complexe SCF dont il existe environ 70-80 membres chez l'homme, de toutes les E3 ligases encodées par le génome humain, soit 600^{278, 284}. De plus, seulement quatre E3 ligases de type complexe SCF ont été bien caractérisées : SCF^{βTrCP1/Fbw1A}, SCF^{βTrCP2/Fwd2}, SCF^{Skp2} et SCF^{hCDC4/Fbw7}. SCF^{βTrCP1/Fbw1A} (que nous allons nommer Fbw1a) reconnaît spécifiquement les substrats IκBα, IκBβ, IκBε et β-caténine lorsqu'ils sont phosphorylés sur les deux résidus sérines du motif phosphodegron suivant : DSG(X)_nS où n>2²⁹⁰. Cette séquence n'est pas retrouvée chez IRF3. SCF^{βTrCP2/Fbw1B} contribue également à l'ubiquitination d'IκBα en reconnaissant le même motif phosphodegron que SCF^{βTrCP1/Fbw1A}²⁹¹. SCF^{Skp2} (que je vais nommer Skp2) ubiquitine plusieurs régulateurs du cycle cellulaire, tels que p27^{kip1} et p21^{Cip1}^{292, 293}. SCF^{hCDC4/Fbw7} (que nous allons nommer Fbw7) est une E3 ligase qui a la capacité de moduler plusieurs facteurs de transcription, tels que SRBP1, c-Myc et c-Jun^{294, 295}. Fbw7 reconnaît des motifs phosphodegrons imparfaits, dont la seule restriction est un résidu sérine (S) ou thréonine (T) phosphorylé, suivi d'un acide aminé proline (P)²⁹⁶. Ce motif est retrouvé chez IRF3 : S339/P340.

Fbxw2 et Fbxw4 sont des protéines F-box de complexe SCF peu caractérisées. Fwd2 (aussi connue sous les noms de Fbxw2, Fbw2 et MD6) est une composante de la E3 ligase SCF^{Fwd2} responsable de l'ubiquitination et de la dégradation du facteur de transcription GCMa²⁹⁷. Fbxw4 (aussi connue sous les noms de *dactylin* et *split hand/foot malformation 3* (SHFM3)) ne possède pas de substrat identifié jusqu'à ce jour. Cependant, elle joue un rôle important au niveau du développement embryonnaire des vertébrés. Il a été suggéré que son rôle serait d'induire la dégradation de protéines cibles impliquées dans l'inhibition de la prolifération cellulaire²⁹⁸.

La poursuite de ce projet de recherche consistera à l'identification du complexe SCF responsable de l'ubiquitination et dégradation d'IRF3 suite à son activation. Afin de répondre à cette question, certains collaborateurs, Dr Sylvain Meloche et Dr. K.I. Nakayama, nous ont donné les vecteurs recombinants permettant l'expression de certaines E3 ligases de type complexe SCF: Skp2, Fbw1a, Fbw7, Fbw4 et Fwd2. À l'aide de ces constructions, j'ai pu réaliser certaines expériences afin de récolter quelques résultats préliminaires.

Tout d'abord, j'ai vérifié par des essais rapporteurs si l'activité transcriptionnelle d'IRF3 est affectée en présence des différentes E3 ligases. La surexpression d'IRF3^{wt} seule induit légèrement l'activation transcriptionnelle du promoteur naturel d'ISG56. Lorsqu'on co-transfecte IRF3^{wt} avec ses protéines kinases TBK1 ou IKKi, la transcription du gène luciférase augmente de façon significative. Cependant, la cotransfection (à IRF3 et TBK1 ou IKKi) de quantités croissantes des E3 ligases Fbw4 et Fwd2 affecte l'activité transcriptionnelle d'IRF3 de façon dose-dépendante mais pas Fbw7 et Fbw1a (voir Figure 20 A et B). Aussi, cette activité n'est pas altérée par la E3 ligase Skp2 (résultats non présentés). De plus, l'activité transcriptionnelle d'une version constitutivement active d'IRF3 nommée IRF3 5D est également fortement inhibée par Fbw4 et Fwd2, mais non par Fbw7, Fbw1a et Skp2 (voir Figure 21). L'ensemble de ces résultats suggère que les E3 ligases Fbw4 et Fwd2 régulent de façon négative l'activité d'IRF3, soit en induisant sa

dégradation par des processus d'ubiquitination ou encore, comme répresseur en réprimant sa capacité à transactiver les promoteurs.

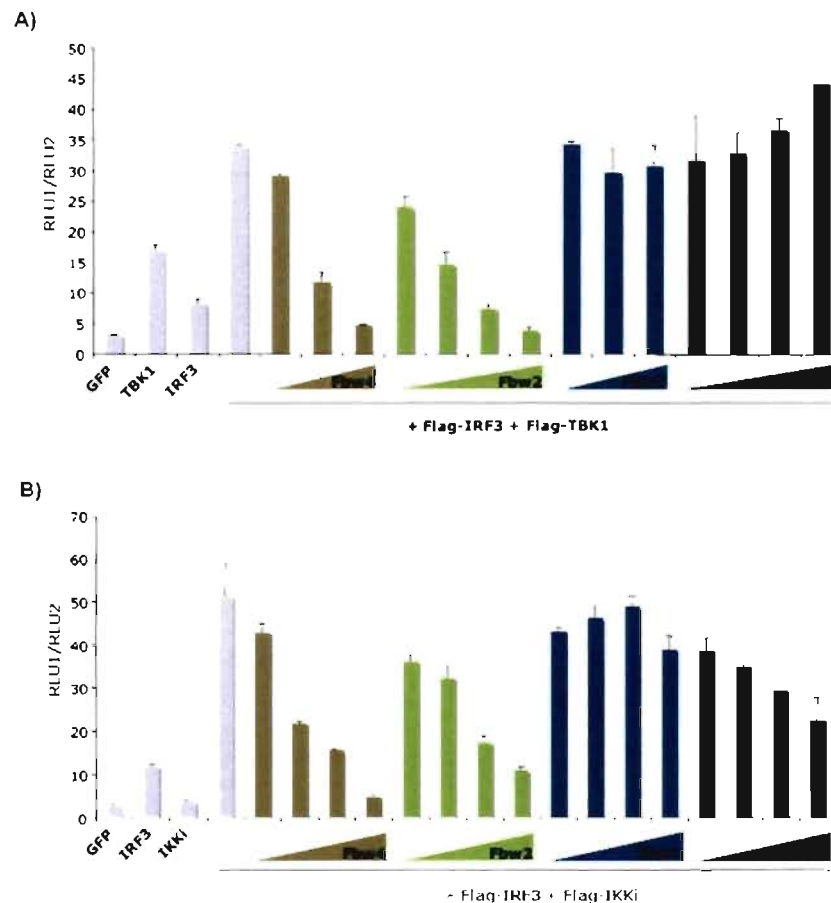


Figure 20 : La surexpression de Fwd2 et Fbw4 diminue l'activité transcriptionnelle d'IRF-3 suite à son activation.

Des cellules 293Ad5 QB1 ont été cotransfectées avec les vecteurs recombinants suivants: 100ng de Flag-IRF3wt +/- (A) 50ng de Flag-TBK1wt ou (B) 10ng de Flag-IKKi, des quantités croissantes de HA-Fbw4, HA-Fwd2, HA-Fbw7 ou HA-Fbw1a, 200ng du vecteur rapporteur luciférase comportant le promoteur naturel du gène ISG56 (RLUI) et 50ng de pRL-TK (RLUII). 24 heures post-transfection, l'activité luciférase a été mesurée et normalisée par l'activité rénilla.

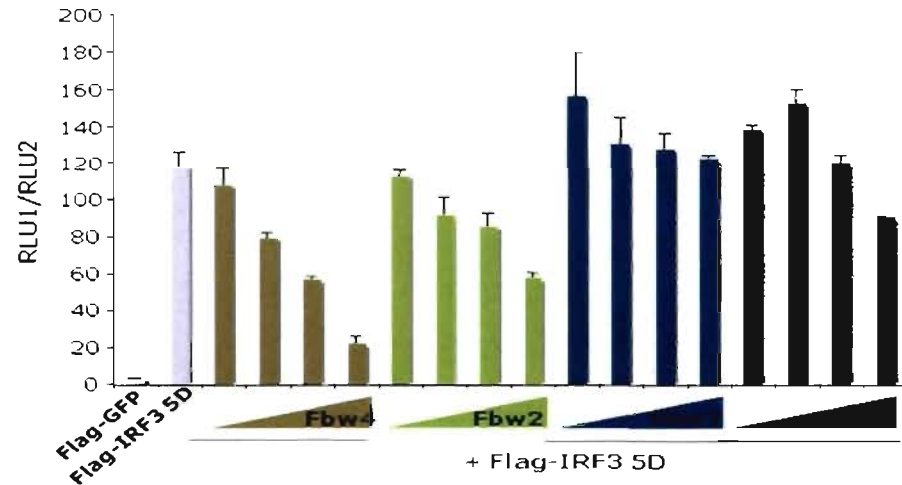


Figure 21 : La surexpression de Fwd2 et Fbw4 diminue l'activité transcriptionnelle d'une version constitutivement active d'IRF3, IRF-3 5D.

Des cellules 293Ad5 QB1 ont été cotransfectées avec les vecteurs recombinants suivants: 20ng de Flag-IRF35D, des quantités croissantes de HA-Fbw4, HA-Fwd2, HA-Fbw7 ou HA-Fbw1a, 200ng du vecteur rapporteur luciférase comportant le promoteur naturel du gène ISG56 (RLUI) et 50ng de pRL-TK (RLUII). 24 heures post-tansfection, l'activité luciférase a été mesurée et normalisée par l'activité rénilla.

Ensuite, afin de vérifier l'implication de ces E3 ligases dans l'induction de la dégradation des formes phosphorylées d'IRF3, nous avons co-exprimé différentes combinaisons de protéines. D'une part, nous avons surexprimé IRF3 $_{wt}$ avec une version dominante négative de sa protéine kinase TBK1, nommée TBK1 K38A, où la lysine (K) en position 38, qui est le site de liaison des molécules d'ATP, a été mutée en alanine (A) et ainsi, la protéine ne peut plus lier l'ATP pour transférer le phosphate en position γ sur ses substrats. D'autre part, nous avons co-transfecté IRF3 $_{wt}$ avec une version de TBK1 $_{wt}$. Combiné à ces deux ensembles de protéines, nous avons surexprimé différentes E3 ligases et les extraits cellulaires ont été analysés par immunobuvardage. La surexpression de

TBK1_{wt} induit une phosphorylation d'IRF3, ce qui induit un retard sur gel et une dégradation des formes hyperphosphorylées de ce facteur de transcription. L'expression de TBK1 K38A n'induit aucune phosphorylation d'IRF3. Aussi, la surexpression des E3 ligases Fbw4 et Fwd2 inhibe l'apparition des formes hyperphosphorylées d'IRF3 observées en présence de TBK1_{wt}, alors que la surexpression de Fbw1a, Fbw7 et Skp2 ne l'affecte pas (voir Figure 22). Ceci suggère que les E3 ligases Fbw4 et Fwd2 pourraient être impliquées dans les processus d'ubiquitination et de dégradation des formes hyperphosphorylées d'IRF3 ou, dans l'inhibition de l'activation d'IRF3 par TBK1.

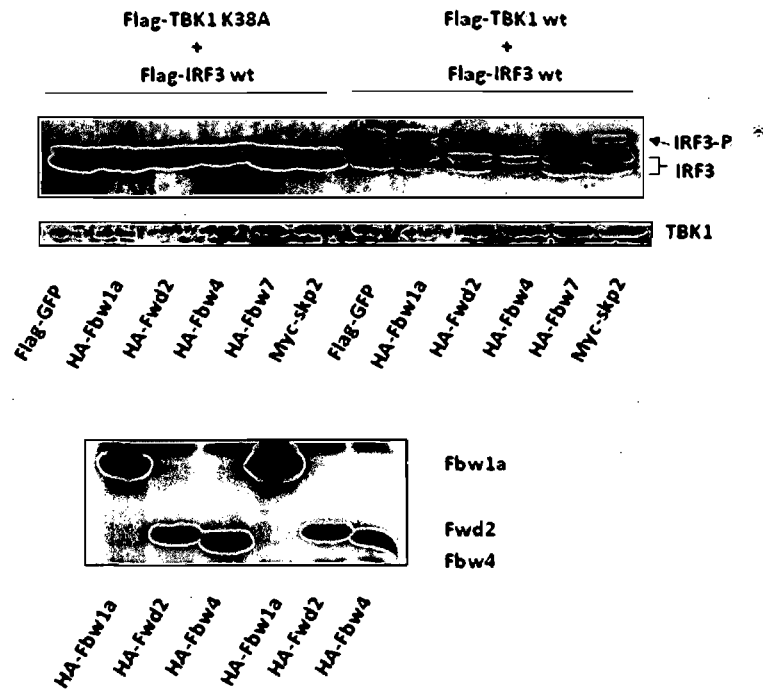


Figure 22 : La surexpression de Fwd2 ou Fbw4 favorise la dégradation d'IRF3 suite à sa phosphorylation.

Des cellules 293Ad5 QB1 ont été cotransfectées avec les vecteurs recombinants indiqués. Après 48 heures, les cellules ont été lysées et les extraits cellulaires ont été analysés par immunobuvardage avec un anticorps anti-Flag et anti-HA.

L'ensemble de ces résultats préliminaires (essais rapporteurs et dégradation) nous suggère que le rôle de Fbw4 et Fwd2 est d'induire la dégradation des formes hyperphosphorylées d'IRF3. En effet, d'une part, l'activité transcriptionnelle d'IRF3 5D est affectée malgré le fait qu'en utilisant ce mutant, nous prévenons l'atteinte des processus d'activation d'IRF3 par ces E3 ligases. D'autre part, nous n'observons pas d'accumulation basale du niveau d'expression d'IRF3 comme son contrôle (IRF3_{wt} + TBK1K38A) en présence de ces E3 ligases, ce qui suggère que les formes phosphorylées ont été dégradées. Toutefois, il reste plusieurs expériences à compléter afin de démontrer clairement que Fbw4 et Fwd2 sont impliquées dans les processus d'ubiquitination et de dégradation des formes hyperphosphorylées d'IRF3. Premièrement, il faudrait traiter les cellules avec un inhibiteur du protéasome (MG132 ou lactacystine) pour prévenir cet événement. En effet, nous devrions observer une récupération ces formes hyperphosphorylées d'IRF3 en présence de Fwd2 et Fbw4. Deuxièmement, pour vérifier le rôle de ces E3 ligases dans les mécanismes de dégradation d'IRF3 induits par les cellules hôtes suite à une infection virale, il faudrait générer, par la technique de shRNA, des lignées cellulaires stables qui n'expriment pas Fbw4 ou Fwd2. Pour ce faire, nous pourrions utiliser des MRC5, des fibroblastes humains, qui sont un très bon modèle pour analyser la dégradation d'IRF3. Ainsi, nous pourrions vérifier l'application des résultats préliminaires obtenus en surexpression dans un modèle de culture de cellules primaires. Troisièmement, il faudrait réaliser des essais d'ubiquitination *in vivo* afin de vérifier la capacité de ces E3 ligases à induire l'ubiquitination d'IRF3 hyperphosphorylé. Quatrièmement, il faudrait générer des versions de ces E3 ligases dont le domaine F-box (responsable de la reconnaissance des substrats) est absent (Fbw4 Δ F-box et Fwd2 Δ F-box) afin de vérifier l'importance de leur activité E3 ligase dans le processus de dégradation d'IRF-3.

En parallèle à l'identification des E3 ligases de type complexe SCF d'IRF3, nous nous sommes intéressés à ses résidus lysines, les récepteurs majeurs de l'ubiquitine dans les processus d'ubiquitination, qui pourraient être impliqués dans la régulation de son activité et de sa dégradation. En effet, il a été démontré que l'ubiquitination pouvait réguler

positivement l'activité transcriptionnelle et négativement le niveau d'expression du facteur de transcription c-Myc²⁹⁹. De plus, l'acide aminé lysine est un élément central dans la régulation de multiples fonctions des protéines de la cellule. D'une part, il sert de récepteur pour plusieurs modifications post-traductionnelles, telles que celles de type ubiquitine (ubiquitination, sumoylation, neddylation, ISGylation), acétylation et méthylation. D'autre part, les résidus lysines font partie de séquences classiques de reconnaissance permettant à certaines protéines d'être discriminées pour transloquer dans le noyau et que l'on appelle des séquences de localisation nucléaire (NLS). Plus précisément, le NLS d'une protéine permet à cette dernière de s'associer à un cargo dans le cytosol, qui lui permet à son tour de passer à travers les pores nucléaires pour accéder à ce compartiment. Le NLS le plus caractérisé pour permettre à une protéine de migrer au noyau est celui que l'on appelle le NLS classique (NLSc) et qui se définit par une (monopartite) ou deux (bipartites) séquences d'acides aminés basiques (lysine (K) et arginine (R)). La séquence monopartite a été caractérisée comme la suivante : K(K/R)X(K/R), où X est un acide aminé quelconque³⁰⁰. Un NLS classique bipartite ne possède pas de motif conservé. Il semble se caractériser par deux séquences riches en K et R, la première plus courte que la deuxième, espacées par quelques résidus quelconques (environ 10 à 15 a.a.)^{300, 301}. Toutefois, plusieurs protéines migrent au noyau malgré l'absence de NLSc dans leur séquence primaire. Une analyse par algorithmes des séquences mono- et bipartites encodées par le génome du *S. cerevisiae* a permis de tirer quelques conclusions intéressantes. D'abord, seulement 45% des protéines ont le potentiel de migrer au noyau grâce à un NLSc. De plus, 57% des protéines nucléaires possèdent un NLSc alors que 43% s'y retrouvent par un autre mécanisme. Donc, des études plus approfondies devront être effectuées afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la translocation nucléaire des protéines. Une des caractéristiques principales d'un NLS est que cette séquence est nécessaire à l'importation de la protéine d'intérêt au noyau et ce transport est drastiquement altéré si ce motif est modifié³⁰⁰.

Dans cette optique, pour notre deuxième étude, nous avons identifié 14 lysines dans la séquence en acides aminés d'IRF3. De façon intéressante, la lysine en position 77 (K77) est un résidu conservé chez tous les membres des IRFs et elle est acétylé chez IRF-2, -7 et -9. Elle est localisée dans le domaine de liaison à l'ADN des IRFs et dans la séquence NLS atypique d'IRF3. Nous avons utilisé plusieurs approches moléculaires, biochimiques et de biologie cellulaire afin de caractériser le rôle de la K77 dans la régulation de l'activité transcriptionnelle d'IRF3. Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus nous permet de remettre en question le NLS atypique d'IRF3 et suggère que l'acétylation de la K77 par les histones acétyltransférases CBP/p300 est parmi les dernières modifications post-traductionnelles nécessaires pour son activité transcriptionnelle. Tout d'abord, la substitution de la K77 en arginine (K77R) d'IRF3 abolit totalement l'activité transcriptionnelle et les effets antiviraux générés par les formes hyperphosphorylées et les versions constitutivement actives d'IRF3 (IRF3 5D et IRF3 396D). Ensuite, cette mutation ne modifie pas la faculté d'IRF3 à dimériser, accumuler au noyau et lier CBP/p300, qui ont la responsabilité de le séquestrer dans le compartiment nucléaire. Cependant, une analyse de la capacité d'IRF3 à lier une sonde d'ADN ISRE démontre que la K77 joue un rôle crucial dans cet événement, une étape importante pour induire les gènes cibles impliqués dans la réponse anti-virale générée par notre facteur de transcription. Finalement, IRF3 est acétylé *in vivo* suite à sa phosphorylation et cette acétylation est augmentée en présence de CBP/p300. Cette modification post-traductionnelle semble être effectuée sur la lysine 77 d'IRF3 puisque la mutation K77R affecte drastiquement son habileté à subir cette acétylation suite à sa phosphorylation.

Il a été démontré que l'acétylation d'IRF7, qui est l'homologue d'IRF3, par PCAF/GCN5 sur la lysine conservée (K92) diminue son habileté à lier l'ADN ²⁴⁰. Toutefois, il a été montré que CBP/p300 étaient nécessaires à la liaison à l'ADN d'IRF3 ²³⁷. Ainsi, contrairement à IRF7, nous croyons que suite à sa phosphorylation en C-terminale, IRF3 est acétylé *in vivo* sur sa K77 par ses coactivateurs CBP/p300, ce qui lui permet de lier et d'activer transcriptionnellement ses promoteurs pour induire une réponse anti-virale

adéquate. Pour terminer, l'identification et la caractérisation du rôle de la K77 dans la régulation de l'activité d'IRF3 a permis d'atteindre le deuxième objectif de cette thèse.

Puisque la mutation de la K77 d'IRF3 en arginine abolit totalement sa capacité à lier des éléments de réponse et affecte fortement son acétylation (un résultat qui devra être confirmé par spectrométrie de masse), nous nous intéressons sur le rôle réel de ce résidu dans la régulation de l'activité d'IRF3. Tout d'abord, plusieurs évidences montrent que cette lysine conservée est essentielle pour la liaison à l'ADN des IRF-1, -2, -7, -8 et -9 car lorsque mutée, ces IRFs perdent cette faculté^{195, 239-241, 302}. Ensuite, il a été démontré que l'acétylation des domaines de liaison à l'ADN d'IRF1 et d'IRF2 n'affecte pas leur capacité à lier une séquence ISRE²³⁸. Aussi, il a été montré que l'acétylation d'IRF9 sur cette lysine conservée était importante pour sa liaison à l'ADN²⁴¹. Finalement, il a été démontré *in vitro* que l'association de CBP/p300 à IRF3 et leur activité acétyltransférase étaient importantes pour permettre la liaison de notre facteur de transcription à l'ADN²³⁷. Ainsi, l'ensemble de ces observations, combiné à nos résultats, suggère une double fonction de la lysine 77 d'IRF3 : (1) la lysine 77 est essentielle à la modulation de la capacité d'IRF3 à lier l'ADN et comme suggéré pour IRF1, ce résidu permettrait une stabilisation du complexe protéine-ADN¹⁹⁵; (2) la lysine 77 est acétylée par CBP/p300 suite à sa phosphorylation, une étape probablement essentielle pour lier et activer des promoteurs cibles²³⁷. Par conséquent, il serait intéressant de démontrer *in vivo* que l'acétylation de la K77 est essentielle pour l'activité transcriptionnelle d'IRF3. Cependant, étant donné le double rôle de la K77, cette hypothèse demeure difficile à vérifier. Puisque la mutation de cet acide aminé inhibe la faculté de notre facteur de transcription à lier des éléments de réponse, la K77 ne peut pas être substituée et une stratégie alternative devra être utilisée.

Il a été montré qu'IRF7 était acétylé sur cette lysine conservée par les histones acétyltransférases PCAF/GCN5, contrairement à notre facteur de transcription d'intérêt, qui est modifié par CBP/p300 (voir Figure 6 du deuxième manuscrit (chapitre 4))²⁴⁰. Ainsi, nous avons commencé à vérifier l'implication de l'acétylation de la K77 dans la régulation de l'activité transcriptionnelle d'IRF3 par le stratagème suivant : la génération d'une

version d'IRF3, où les acides aminés à proximité de la K77 sont modifiés pour reproduire l'environnement de la lysine acétylée d'IRF7, une séquence spécifiquement reconnue par PCAF/GCN5, mais non par CBP/p300 (voir Figure 23)²⁴⁰. Nous avons nommé le mutant IRF3 T75G/R78T.



Figure 23 : Stratégie utilisée afin de créer un mutant d'IRF3 ne pouvant plus être acétylé par CBP/p300 sans modifier le résidu K77 nécessaire à la liaison à l'ADN.

Ainsi, la production du mutant IRF3 T75G/R78T permet de conserver la K77, qui est nécessaire pour la liaison à l'ADN d'IRF3, tout en changeant la séquence reconnue par CBP/p300, importante pour l'acétylation de cette lysine. Aussi, puisque le site d'association entre CBP/p300 et IRF3 est localisé dans la portion C-terminale d'IRF3, ces mutations ne devraient pas affectées cette étape cruciale. Bien qu'il soit nécessaire de regarder si l'état d'acétylation d'IRF3 et sa liaison à CBP/p300 sont des évènements affectés par les mutations T75G/R78T, nous avons obtenu quelques résultats préliminaires très intéressants. Tout d'abord, l'insertion des mutations T75G/R78T dans le domaine de liaison à l'ADN d'IRF3 n'affecte pas la capacité intrinsèque de cette séquence à lier une sonde d'ADN radiomarquée (résultats non présentés). Ensuite, des résultats d'essais rapporteurs nous montrent que le mutant IRF3 T75G/R78T, tout comme la version IRF3 K77R (voir Figure 1A du deuxième manuscrit (chapitre 4)), n'a pas la capacité d'activer les promoteurs cibles. En effet, tel que montré précédemment, la surexpression d'IRF3^{wt} en

présence de TBK1 ou IKKi transactive fortement le promoteur naturel du gène *ISG56*. Par contre, la version IRF3 T75G/R78T n'induit pas d'activation transcriptionnelle du promoteur, même en présence des protéines kinases (voir Figure 24).

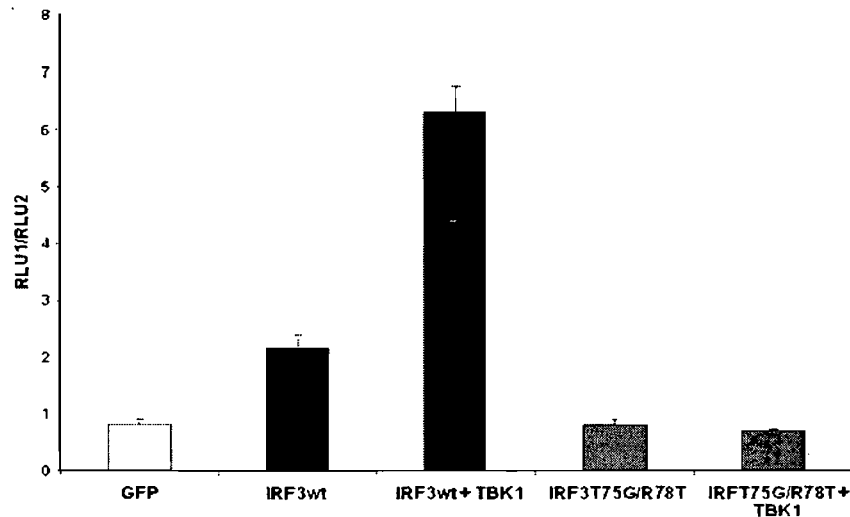


Figure 24 : Les mutations des acides aminés entourant la K77 (T75G/R78T) affectent l'activité transcriptionnelle d'IRF3.

Des cellules 293Ad5 QB1 ont été cotransfectées avec les vecteurs recombinants suivants: 100ng de Flag-IRF3wt ou Flag-IRF3T75G/R78T, +/- 50ng de Flag-TBK1wt, 200ng du vecteur rapporteur luciférase comportant le promoteur naturel du gène *ISG56* (RLUI) et 50ng de pRL-TK (RLUII). 24 heures post-tansfection, l'activité luciférase a été mesurée et normalisée par l'activité rénilla.

Ainsi, ces résultats suggèrent que l'acétylation de la K77 d'IRF3 est nécessaire pour son activité transcriptionnelle. Toutefois, cette hypothèse devra être confirmée à l'aide de deux techniques : (1) par des essais d'acétylation *in vivo*, afin de s'assurer que le mutant IRF3 T75G/R78T n'est pas modifié par acétylation suite à sa phosphorylation (contrairement à la version de type sauvage (voir Figure 6 du deuxième manuscrit (chapitre 4))); (2) par des EMSA, afin de s'assurer que la liaison à l'ADN d'une protéine IRF3

entière est altérée par les mutations T75G/R78T puisqu'en réalité, cette version ne devrait plus être acétylée.

Dans le cas où cette stratégie n'est pas concluante, nous pourrions vérifier d'une autre façon l'implication de l'acétylation de la K77 d'IRF3 dans sa capacité à lier l'ADN. Tout d'abord, nous pourrions développer un essai d'acétylation *in vitro* afin de confirmer que le domaine de liaison à l'ADN (DBD) d'IRF3 est capable d'être acétylé. Ensuite, il faudrait que nous montrions que la version du DBD acétylé a plus d'affinité pour lier une sonde d'ADN que celle non-acétylée. Finalement, il faudrait que nous confirmions que l'acétylation du DBD est abolie lorsque nous insérons la mutation K77R. Ainsi, nous pourrions confirmer le rôle de l'acétylation de la K77 d'IRF3 dans la liaison de ce dernier à des éléments de réponse sans toutefois démontrer son implication directe dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de notre facteur de transcription.

Une dernière alternative possible serait de créer une version d'IRF3 acétyl-mimétique, où la K77 est substituée par une glutamine (IRF3 K77Q). En effet, cette stratégie a été utilisée pour l'étude de l'acétylation du facteur de transcription STAT1³⁰³. Ainsi, nous pourrions vérifier, par des essais rapporteurs ou par la reconstitution de cellules IRF3^{-/-}, la capacité de ce mutant à induire l'expression de gènes cibles. Cependant, cette option pourrait être utilisée seulement dans le cas où cette version d'IRF3 (IRF3 K77Q) conserve sa capacité à lier l'ADN. Puisque dans ce cas, la K77 ne serait plus présente, nous pouvons supposer que la liaison à l'ADN d'IRF3 devrait être abolie. Ainsi, la surexpression d'IRF3 K77Q devrait plutôt jouer le rôle d'une version dominante négative de notre facteur de transcription.

Donc, étant donné le rôle crucial de la K77 dans la liaison d'IRF3 à l'ADN, ces quelques stratégies pourraient être utilisées afin de démontrer indirectement l'importance de ce résidu dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de notre facteur de transcription.

De plus, il a été montré *in vitro* que l'activité acétyltransférase de CBP/p300 est nécessaire pour permettre à IRF3 de lier des éléments de réponse ISRE et d'activer les

promoteurs cibles ²³⁷. Aussi, nos résultats montrent que l'acétylation d'IRF3 est dépendante de sa phosphorylation. Ainsi, nous pensons que l'acétylation de la K77 de ce facteur de transcription est la dernière modification post-traductionnelle essentielle pour lui permettre d'exercer ses fonctions. Cependant, il a été montré que le processus de déacétylation était important pour l'activité transcriptionnelle d'IRF3 ³⁰⁴. En effet, un prétraitement avec le trichostatine A (TSA), un inhibiteur des histones déacetyltransférases (HDAC), induit une stabilisation du niveau d'expression d'IRF3 dans le compartiment nucléaire suite à une stimulation au dsRNA. Par conséquent, on observe une augmentation de la population d'IRF3 lié à l'ADN. Cependant, le TSA réprime de façon significative l'activité transcriptionnelle des IRFs liant des éléments de réponse PRDI/III. De plus, l'utilisation de la technique de siRNA a démontré que HDAC6 est requise pour l'expression de l'IFN β et pour la génération de la réponse antivirale alors que les HDAC8 et HDAC1 répriment l'expression de l'IFN β . Ainsi, nous pourrions penser que le processus d'acétylation par CBP/p300 permet à IRF3 de lier des éléments de réponse et que l'induction de son activité transcriptionnelle nécessite une déacétylation. Aussi, puisqu'un traitement au TSA induit une stabilisation d'IRF3, des résultats que nous avons également observés dans notre laboratoire, ceci suggère que la déacétylation d'IRF3 est une étape importante pour sa dégradation.

Afin de caractériser correctement le rôle de la lysine 77 d'IRF3, nous avons choisi de substituer ce résidu pour le changer en arginine, un acide aminé dont la structure de la chaîne latérale se rapproche de celle de la lysine. De cette façon, la structure tridimensionnelle d'IRF3 est affectée de façon minimale et le résidu localisé à cette position ne peut pas subir les modifications post-traductionnelles qui lui sont propres. Toutefois, étant donné ce choix de mutation, la propriété acido-basique du résidu en position 77 est conservée. Aussi, nous savons que la lysine 77 fait partie de la séquence NLS atypique (K77/R78) d'IRF3. Par conséquent, puisque les capacités du mutant IRF3K77R à transloquer au noyau et lier ses coactivateurs CBP/p300 ne sont pas affectées par la mutation, nous avons choisi d'investiguer davantage le rôle de la K77 dans la

modulation de la translocation nucléaire d'IRF3. En effet, normalement, l'altération d'un résidu composant la séquence NLS doit affecter de façon significative la fonction de ce motif. Pour répondre à nos interrogations, nous avons choisi de substituer les résidus basiques du NLS (K77/R78) pour des acides aminés neutres afin de générer le mutant IRF3 KR77/78NG. Cependant, tel que présenté à la Figure 4 du deuxième manuscrit (chapitre 4), ce mutant peut aussi transloquer dans le compartiment nucléaire et s'associer à CBP, tout comme le mutant IRF3 K77R et IRF3 $_{wt}$. Par conséquent, ces évidences remettent en question le modèle de reconnaissance responsable de la translocation nucléaire d'IRF3.

Comme mentionné précédemment, plus de 47% des protéines nucléaires ne possèdent pas de NLS et par conséquent, se retrouvent dans ce compartiment par un autre mécanisme³⁰⁰. Tel est le cas d'IRF3. Bien que nos résultats montrent que le NLS atypique ne semble pas être impliqué dans la modulation de la translocation nucléaire d'IRF3 hyperactivé, il a été démontré que cette séquence s'associe directement avec les importines α Qip1 et KPNA3²⁰⁷. Les importines α sont des protéines qui ont la responsabilité de reconnaître et de lier les séquences NLS des protéines cibles pour leur permettre de transloquer au noyau (un transport actif) *via* les pores nucléaires, des complexes protéiques très sélectifs³⁰¹. Aussi, il a été montré que chez les cellules non-infectées, les séquences NES et NLS d'IRF3 sont constitutivement actives, ce qui lui permet de faire la navette entre les compartiments cytoplasmique et nucléaire. Cependant, dans ces conditions, l'effet prédominant du NES induit une localisation cytoplasmique d'IRF3. Lors d'une infection virale, la phosphorylation d'IRF3 entraîne son association nucléaire avec CBP/p300, ce qui le séquestre et permet son accumulation dans ce compartiment²⁰⁷. Dans ce cas, nous pouvons penser que nos résultats n'excluent pas totalement la possibilité que la séquence K77/R78 joue un rôle fonctionnel dans la modulation de la localisation nucléaire d'IRF3. En effet, celle-ci pourrait réguler la translocation nucléaire basale d'IRF3 et lorsque ce dernier est activé, un autre mécanisme serait activé et dominant.

Puisque le NLS atypique actuellement caractérisé pour IRF3 ne semble pas moduler sa translocation nucléaire suite à son activation, quelques scénarios peuvent être proposés.

Premièrement, il a été démontré que la séquence primaire de STAT1 ne contient pas de séquence NLSc. Cependant, suite à son homo- ou hétérodimérisation avec STAT2, chaque sous-unité possédant respectivement une séquence riche en lysine et arginine contribue à la formation d'un NLS reconnue par l'importine $\alpha 5$ ^{305, 306}. Tout comme STAT1, la séquence primaire d'IRF3 ne contient pas de NLSc. Aussi, ce facteur de transcription nécessite une dimérisation pour transloquer au noyau. Ainsi, puisqu'IRF3 possède quelques résidus basiques (surtout en N-terminale), nous pourrions penser que la structure tridimensionnelle d'un homodimère IRF3 pourrait former un NLS responsable de sa localisation nucléaire. Deuxièmement, il est possible qu'une protéine qui ne contient pas de NLSc dans sa séquence primaire migre au noyau grâce à son association à une autre protéine qui possède ce motif³⁰⁷. Récemment, il a été démontré que suite à une stimulation aux IFNs de type I, CBP, qui est le coactivateur d'IRF3 normalement localisé strictement dans le compartiment nucléaire, transloque dans le cytoplasme pour acétyler le domaine intracellulaire du récepteur IFNRI²⁴¹. D'un autre côté, il est bien connu qu'une fois phosphorylé, IRF3 dimérise et transloque au noyau pour s'associer à CBP/p300, qui le séquestre dans ce compartiment. Ainsi, nous pourrions penser que CBP transloque dans le cytoplasme pour s'associer à IRF3 et servir de cargo pour permettre à ce facteur de transcription d'accéder au noyau. Troisièmement, il est bien caractérisé que certaines protéines, telles que les ERKs, MEKs et SMADs, une fois activées par phosphorylation, ont la faculté de transloquer au noyau de façon indépendante de la présence d'un NLSc dans leur séquence primaire^{308, 309}. Une étude récente a identifié une nouvelle séquence en acides aminés (Ser/Thr-Pro-Ser/Thr) nommée signal de translocation nucléaire (NTS). Ce motif, une fois phosphorylé sur les résidus sérines et thréonines, serait responsable de l'interaction des protéines ERK-2, MEK1 et SMAD3 à l'importine 7, le médiateur qui permet leur translocation dans le noyau *via* les pores nucléaires. Ce groupe de recherche propose que la phosphorylation d'une séquence S/T-P-S/T agit comme un NTS général, en particulier pour les protéines qui ne possèdent pas de NLSc et qui migrent au noyau une fois activées. Étant donné que l'efficacité de cette séquence pour moduler la translocation nucléaire des

protéines nécessite la phosphorylation des résidus sérines et thréonines localisés à proximité de la proline, la séquence NTS pourrait être plus souple lorsqu'un résidu localisé à côté de la proline est acide (S/T-P-D/E ou D/E-P-S/T). Ainsi, après une analyse de séquence, nous savons qu'IRF3 possède deux motifs de ce genre : -1- au niveau de son résidu sérine en position 123 (S-P-D); -2- au niveau de la sérine en position 173 (S-P-S). Toutefois, il a été démontré que la portion N-terminale d'IRF3 (les acides aminés 1-134) transloque spontanément au noyau, ce qui suggère que son NTS devrait se situer dans cette séquence²⁰⁷. Par conséquent, il serait intéressant d'analyser le rôle de la séquence S-P-D dans la modulation de la translocation nucléaire des formes hyperactives d'IRF3 et par conséquent, la possible phosphorylation en Ser123. Cette hypothèse est très intéressante puisque nous savons qu'IRF3 est une protéine phosphorylée sur un acide aminé non-caractérisé à son extrémité N-terminal²²⁹.

Tel qu'expliqué dans l'introduction (sections 1.4.5 et 1.4.6), IRF3 est impliqué dans la pathogénèse de certaines maladies. D'une part, plusieurs virus ont développé des stratégies afin d'inhiber son activité et d'antagoniser ses effets biologiques, notamment en induisant sa dégradation ou son interaction avec CBP/p300. D'autre part, une activation incontrôlée d'IRF3 semble être responsable : (1) du mécanisme d'induction du choc endotoxique généré par le LPS ; (2) de la réaction inflammatoire induite par le phénomène d'ischémie-reperfusion du foie ; (3) de l'apoptose induite suite à certaines infections virales ; (4) de certaines maladies autoimmunes. Ainsi, l'activité du facteur de transcription IRF3 a besoin d'être contrôlé de façon très stricte pour les cellules hôtes. Dans cette optique, bien qu'il reste plusieurs hypothèses à vérifier dans le cadre de ce projet de recherche, nos résultats ont permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes importants de régulation de l'activité du facteur de transcription IRF3. Tout d'abord, nous avons démontré pour la première fois que suite à sa phosphorylation, IRF3 est une protéine ubiquitinée par une E3 ligase de type culline 1. Ce processus est essentiel à la modulation de sa dégradation par le protéasome. De plus, cette régulation du niveau d'expression d'IRF3 serait induite par la cellule hôte, suite à son infection virale. D'autre part, nous avons en partie caractérisé les

rôles de la K77 dans l'activité d'IRF3 : (1) ce résidu est essentiel à la liaison de notre facteur de transcription à des éléments de réponse; (2) cet acide aminé semble être modifié par un processus d'acétylation. Finalement, certains résultats obtenus nous permettent de s'interroger sur le rôle réel du NLS atypique d'IRF3. Ainsi, nous croyons que la caractérisation des mécanismes de régulation de l'activité d'IRF3 pourra nous permettre de mieux comprendre son rôle dans les différentes conditions pathologiques présentées plus haut. En effet, nous pensons que l'avancement de ces connaissances pourrait nous aider à développer de nouvelles avenues thérapeutiques afin de cibler spécifiquement et contrôler l'activité d'IRF-3 selon le contexte pathologique.

L'ubiquitination et l'acétylation sont des modifications post-traductionnelles impliquées dans la régulation de certaines fonctions cellulaires telles que la prolifération cellulaire et l'inflammation. Une dérégulation de ces processus peut conduire à une pathogenèse, notamment le développement de plusieurs types de tumeurs. Dans cette optique, différentes compagnies pharmaceutiques essaient de développer des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques à l'ubiquitination (comme par exemple des inhibiteurs du protéasome) ou l'acétylation (comme par exemple des inhibiteurs des HDACs), selon le contexte pathologique^{310, 311}. Ainsi, il serait possible de penser que nous pourrions éventuellement utiliser ces stratégies afin de réguler spécifiquement l'activité transcriptionnelle d'IRF3, c'est-à-dire en essayant de moduler son niveau d'acétylation et/ou de dégradation dans les cellules d'intérêts.

6. Conclusion

En conclusion, le facteur de transcription IRF3 est médiateur central de l'immunité innée engendrée par des infections microbiennes. Il est activé de façon très rapide par la phosphorylation de plusieurs résidus, expliquant le fait que plusieurs groupes de recherche se sont intéressés à la caractérisation de ce processus. De façon très intéressante, mon projet de recherche a permis un avancement au niveau de la compréhension d'autres mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'activité du facteur de transcription IRF3. Premièrement, nous avons démontré pour la première fois que suite à la phosphorylation à l'extrémité C-terminale d'IRF3, ce dernier est ubiquitiné pour moduler sa reconnaissance et sa dégradation par le protéasome et que cet événement implique en partie un complexe SCF. Deuxièmement, nous avons caractérisé le rôle de la lysine en position 77 d'IRF3, un résidu hautement conservé chez tous les IRFs. D'une part, cette dernière est impliquée dans la capacité de notre facteur de transcription à lier l'ADN et d'autre part, elle est un acide aminé acétylé suite à la phosphorylation d'IRF3 par TBK1. Cette double fonction remet en question le NLS atypique et le mécanisme régulant la translocation nucléaire d'IRF3 suite à son hyperphosphorylation. Ainsi, l'ensemble de ces résultats démontre que l'ubiquitination et l'acétylation, parallèlement à la phosphorylation, orchestrent l'activité transcriptionnelle d'IRF3.

En effet, depuis plusieurs années, plusieurs groupes de recherche ont axé leurs recherches sur la caractérisation des différents sites de phosphorylation d'IRF3. Toutefois, nos résultats suggèrent des rôles importants de la polyubiquitination et l'acétylation dans la modulation de son activité. Ainsi, la caractérisation des processus de régulation de l'activité d'IRF-3 nous permettra de mieux comprendre son rôle dans les maladies immunitaires innées, pro-inflammatoires et autoimmunes. Puisqu'IRF-3 est reconnue pour son implication dans le choc endotoxique, la mort cellulaire induite par l'infection virale, les réactions d'inflammation dans le phénomène d'ischémie reperfusion du foie et dans certaines maladies autoimmunes, son activité nécessite d'être contrôlée de façon très stricte par la cellule hôte. Nous pensons qu'une compréhension plus approfondie des mécanismes de régulation de l'activité du facteur de transcription IRF3 pourrait nous aider à développer

de nouvelles avenues thérapeutiques afin de contrôler son activité dans un contexte pathologique.

7. Bibliographie

1. Janeway, C.A., Jr. , P. Travers, M. Walport and M. Shlomchik *Immunobiology: the immune system in health and disease*, Edn. 5. (Garland, United States of America; 2001).
2. Krishnan, J., Selvarajoo, K., Tsuchiya, M., Lee, G. & Choi, S. Toll-like receptor signal transduction. *Exp Mol Med* **39**, 421-438 (2007).
3. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801 (2006).
4. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 499-511 (2004).
5. Lee, M.S. & Kim, Y.J. Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space. *Mol Cells* **23**, 1-10 (2007).
6. Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295-298 (1997).
7. Thompson, A.J. & Locarnini, S.A. Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response. *Immunol Cell Biol* **85**, 435-445 (2007).
8. Takaoka, A. & Taniguchi, T. Cytosolic DNA recognition for triggering innate immune responses. *Adv Drug Deliv Rev* **60**, 847-857 (2008).
9. Fritz, J.H., Ferrero, R.L., Philpott, D.J. & Girardin, S.E. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* **7**, 1250-1257 (2006).
10. Kanneganti, T.D. *et al.* Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem* **281**, 36560-36568 (2006).

11. Muruve, D.A. *et al.* The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* **452**, 103-107 (2008).
12. Bowie, A.G. & Hago, I.R. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Mol Immunol* **42**, 859-867 (2005).
13. Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R. & Flavell, R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738 (2001).
14. Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-1531 (2004).
15. Heil, F. *et al.* Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-1529 (2004).
16. Hemmi, H. *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-745 (2000).
17. Lund, J.M. *et al.* Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5598-5603 (2004).
18. Reis e Sousa, C. Immunology. Eating in to avoid infection. *Science* **315**, 1376-1377 (2007).
19. Iwasaki, A. Role of autophagy in innate viral recognition. *Autophagy* **3**, 354-356 (2007).
20. Schmid, D. & Munz, C. Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity* **27**, 11-21 (2007).
21. Lee, H.K., Lund, J.M., Ramanathan, B., Mizushima, N. & Iwasaki, A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* **315**, 1398-1401 (2007).

22. Kato, H. *et al.* Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* **205**, 1601-1610 (2008).
23. Kato, H. *et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**, 101-105 (2006).
24. Yoneyama, M. *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**, 730-737 (2004).
25. Hornung, V. *et al.* 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994-997 (2006).
26. Pichlmair, A. *et al.* RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**, 997-1001 (2006).
27. Roach, J.C. *et al.* The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9577-9582 (2005).
28. Kumagai, Y., Takeuchi, O. & Akira, S. Pathogen recognition by innate receptors. *J Infect Chemother* **14**, 86-92 (2008).
29. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M. & Hoffmann, J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983 (1996).
30. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C.A., Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397 (1997).
31. Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**, 335-376 (2003).

32. Muzio, M. *et al.* Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* **164**, 5998-6004 (2000).
33. Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**, 675-680 (2001).
34. Matsumoto, M. *et al.* Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* **171**, 3154-3162 (2003).
35. Kagan, J.C. *et al.* TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* **9**, 361-368 (2008).
36. Choe, J., Kelker, M.S. & Wilson, I.A. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* **309**, 581-585 (2005).
37. Watters, T.M., Kenny, E.F. & O'Neill, L.A. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunol Cell Biol* **85**, 411-419 (2007).
38. Ozinsky, A. *et al.* The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13766-13771 (2000).
39. Nunez Miguel, R. *et al.* A dimer of the Toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins. *PLoS ONE* **2**, e788 (2007).
40. O'Neill, L.A. & Bowie, A.G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **7**, 353-364 (2007).
41. Wang, J. *et al.* The functional effects of physical interactions among Toll-like receptors 7, 8, and 9. *J Biol Chem* **281**, 37427-37434 (2006).
42. Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**, 1-14 (2005).

43. Medzhitov, R. *et al.* MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* **2**, 253-258 (1998).
44. Wesche, H., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Li, S. & Cao, Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* **7**, 837-847 (1997).
45. Gohda, J., Matsumura, T. & Inoue, J. Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *J Immunol* **173**, 2913-2917 (2004).
46. Qian, Y., Commane, M., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K. & Li, X. IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the interleukin-1-induced activation of NFkappa B. *J Biol Chem* **276**, 41661-41667 (2001).
47. Deng, L. *et al.* Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**, 351-361 (2000).
48. Conze, D.B., Wu, C.J., Thomas, J.A., Landstrom, A. & Ashwell, J.D. Lys63-linked polyubiquitination of IRAK-1 is required for interleukin-1 receptor- and toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* **28**, 3538-3547 (2008).
49. Wang, C. *et al.* TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**, 346-351 (2001).
50. Kanayama, A. *et al.* TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell* **15**, 535-548 (2004).
51. Chen, Z.J. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* **7**, 758-765 (2005).

52. Lee, S.W., Han, S.I., Kim, H.H. & Lee, Z.H. TAK1-dependent activation of AP-1 and c-Jun N-terminal kinase by receptor activator of NF-kappaB. *J Biochem Mol Biol* **35**, 371-376 (2002).
53. Takaoka, A. *et al.* Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* **434**, 243-249 (2005).
54. Negishi, H. *et al.* Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15136-15141 (2006).
55. Honda, K. *et al.* Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* **434**, 1035-1040 (2005).
56. Honda, K. *et al.* 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**, 15416-15421 (2004).
57. Kawai, T. *et al.* Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* **5**, 1061-1068 (2004).
58. Hochrein, H. *et al.* Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11416-11421 (2004).
59. Hoshino, K. *et al.* IkappaB kinase-alpha is critical for interferon-alpha production induced by Toll-like receptors 7 and 9. *Nature* **440**, 949-953 (2006).
60. Yamamoto, M. *et al.* Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* **420**, 324-329 (2002).

61. Dunne, A., Ejdeback, M., Ludidi, P.L., O'Neill, L.A. & Gay, N.J. Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88. *J Biol Chem* **278**, 41443-41451 (2003).
62. Kagan, J.C. & Medzhitov, R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* **125**, 943-955 (2006).
63. Mansell, A., Brint, E., Gould, J.A., O'Neill, L.A. & Hertzog, P.J. Mal interacts with tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-6 to mediate NF-kappaB activation by toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *J Biol Chem* **279**, 37227-37230 (2004).
64. Gray, P. *et al.* MyD88 adapter-like (Mal) is phosphorylated by Bruton's tyrosine kinase during TLR2 and TLR4 signal transduction. *J Biol Chem* **281**, 10489-10495 (2006).
65. Jefferies, C.A. *et al.* Bruton's tyrosine kinase is a Toll/interleukin-1 receptor domain-binding protein that participates in nuclear factor kappaB activation by Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* **278**, 26258-26264 (2003).
66. Liljeroos, M. *et al.* Bruton's tyrosine kinase together with PI 3-kinase are part of Toll-like receptor 2 multiprotein complex and mediate LTA induced Toll-like receptor 2 responses in macrophages. *Cell Signal* **19**, 625-633 (2007).
67. Miggin, S.M. *et al.* NF-kappaB activation by the Toll-IL-1 receptor domain protein MyD88 adapter-like is regulated by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3372-3377 (2007).
68. Fitzgerald, K.A. *et al.* LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adaptors TRAM and TRIF. *J Exp Med* **198**, 1043-1055 (2003).
69. Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T. & Seya, T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* **4**, 161-167 (2003).

70. Yamamoto, M. *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640-643 (2003).
71. Yamamoto, M. *et al.* 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**, 6668-6672 (2002).
72. Sato, S. *et al.* Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* **171**, 4304-4310 (2003).
73. Meylan, E. *et al.* RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* **5**, 503-507 (2004).
74. Cusson-Hermance, N., Khurana, S., Lee, T.H., Fitzgerald, K.A. & Kelliher, M.A. Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF-{kappa}B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J Biol Chem* **280**, 36560-36566 (2005).
75. Hacker, H. *et al.* Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* **439**, 204-207 (2006).
76. Oganessian, G. *et al.* Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* **439**, 208-211 (2006).
77. Gatot, J.S. *et al.* Lipopolysaccharide-mediated interferon regulatory factor activation involves TBK1-IKKepsilon-dependent Lys(63)-linked polyubiquitination and phosphorylation of TANK/I-TRAF. *J Biol Chem* **282**, 31131-31146 (2007).
78. Guo, B. & Cheng, G. Modulation of the interferon antiviral response by the TBK1/IKKi adaptor protein TANK. *J Biol Chem* **282**, 11817-11826 (2007).

79. Hiscott, J. Triggering the innate antiviral response through IRF-3 activation. *J Biol Chem* **282**, 15325-15329 (2007).
80. Oshiumi, H. *et al.* TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* **278**, 49751-49762 (2003).
81. Rowe, D.C. *et al.* The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6299-6304 (2006).
82. Tanimura, N., Saitoh, S., Matsumoto, F., Akashi-Takamura, S. & Miyake, K. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **368**, 94-99 (2008).
83. Mink, M., Fogelgren, B., Olszewski, K., Maroy, P. & Csiszar, K. A novel human gene (SARM) at chromosome 17q11 encodes a protein with a SAM motif and structural similarity to Armadillo/beta-catenin that is conserved in mouse, *Drosophila*, and *Caenorhabditis elegans*. *Genomics* **74**, 234-244 (2001).
84. Carty, M. *et al.* The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* **7**, 1074-1081 (2006).
85. Kato, H. *et al.* Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* **23**, 19-28 (2005).
86. Andrejeva, J. *et al.* 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**, 17264-17269 (2004).
87. Takeuchi, O. & Akira, S. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol* **20**, 17-22 (2008).

88. Kang, D.C. *et al.* Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene. *Oncogene* **23**, 1789-1800 (2004).
89. Rothenfusser, S. *et al.* The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* **175**, 5260-5268 (2005).
90. Yoneyama, M. *et al.* Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* **175**, 2851-2858 (2005).
91. Meylan, E. & Tschopp, J. Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol Cell* **22**, 561-569 (2006).
92. Vitour, D. & Meurs, E.F. Regulation of interferon production by RIG-I and LGP2: a lesson in self-control. *Sci STKE* **2007**, pe20 (2007).
93. Yoneyama, M., Onomoto, K. & Fujita, T. Cytoplasmic recognition of RNA. *Adv Drug Deliv Rev* **60**, 841-846 (2008).
94. Saito, T. *et al.* Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 582-587 (2007).
95. Komuro, A. & Horvath, C.M. RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2. *J Virol* **80**, 12332-12342 (2006).
96. Gitlin, L. *et al.* 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**, 8459-8464 (2006).
97. Saito, T., Owen, D.M., Jiang, F., Marcotrigiano, J. & Gale, M., Jr. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* **454**, 523-527 (2008).

98. Meylan, E. *et al.* Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167-1172 (2005).
99. Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K. & Chen, Z.J. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**, 669-682 (2005).
100. Xu, L.G. *et al.* VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* **19**, 727-740 (2005).
101. Sun, Q. *et al.* The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity* **24**, 633-642 (2006).
102. Loo, Y.M. *et al.* Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol* **82**, 335-345 (2008).
103. Hiscott, J., Lin, R., Nakhaei, P. & Paz, S. MasterCARD: a priceless link to innate immunity. *Trends Mol Med* **12**, 53-56 (2006).
104. Moore, C.B. *et al.* NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature* **451**, 573-577 (2008).
105. Saha, S.K. *et al.* Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J* **25**, 3257-3263 (2006).
106. Michallet, M.C. *et al.* TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway. *Immunity* **28**, 651-661 (2008).
107. Zhao, T. *et al.* The NEMO adaptor bridges the nuclear factor-kappaB and interferon regulatory factor signaling pathways. *Nat Immunol* **8**, 592-600 (2007).
108. Ishikawa, H. & Barber, G.N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**, 674-678 (2008).
109. Zhong, B. *et al.* The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* **29**, 538-550 (2008).

110. Chien, Y. *et al.* RalB GTPase-mediated activation of the IkappaB family kinase TBK1 couples innate immune signaling to tumor cell survival. *Cell* **127**, 157-170 (2006).
111. Ishii, K.J. *et al.* A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* **7**, 40-48 (2006).
112. Stetson, D.B. & Medzhitov, R. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* **24**, 93-103 (2006).
113. Ishii, K.J. *et al.* Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. *J Immunol* **167**, 2602-2607 (2001).
114. Suzuki, K. *et al.* Activation of target-tissue immune-recognition molecules by double-stranded polynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2285-2290 (1999).
115. Yasuda, K. *et al.* Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J Immunol* **174**, 6129-6136 (2005).
116. Takaoka, A. *et al.* DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* **448**, 501-505 (2007).
117. Fu, Y. *et al.* Cloning of DLM-1, a novel gene that is up-regulated in activated macrophages, using RNA differential display. *Gene* **240**, 157-163 (1999).
118. Schwartz, T., Behlke, J., Lowenhaupt, K., Heinemann, U. & Rich, A. Structure of the DLM-1-Z-DNA complex reveals a conserved family of Z-DNA-binding proteins. *Nat Struct Biol* **8**, 761-765 (2001).
119. Lippmann, J. *et al.* IFNbeta responses induced by intracellular bacteria or cytosolic DNA in different human cells do not require ZBP1 (DLM-1/DAI). *Cell Microbiol* **10**, 2579-2588 (2008).

120. Wang, Z. *et al.* Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5477-5482 (2008).
121. Kaiser, W.J., Upton, J.W. & Mocarski, E.S. Receptor-interacting protein homotypic interaction motif-dependent control of NF-kappaB activation via the DNA-dependent activator of IFN regulatory factors. *J Immunol* **181**, 6427-6434 (2008).
122. Isaacs, A. & Lindenmann, J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**, 258-267 (1957).
123. Borden, E.C. *et al.* Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 975-990 (2007).
124. Weissmann, C. & Weber, H. The interferon genes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **33**, 251-300 (1986).
125. LaFleur, D.W. *et al.* Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes. *J Biol Chem* **276**, 39765-39771 (2001).
126. Theofilopoulos, A.N., Baccala, R., Beutler, B. & Kono, D.H. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* **23**, 307-336 (2005).
127. Chawla-Sarkar, M. *et al.* Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* **8**, 237-249 (2003).
128. Carnaud, C. *et al.* Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol* **163**, 4647-4650 (1999).
129. Flaishon, L. *et al.* Autocrine secretion of interferon gamma negatively regulates homing of immature B cells. *J Exp Med* **192**, 1381-1388 (2000).
130. Frucht, D.M. *et al.* IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol* **22**, 556-560 (2001).

131. Gessani, S. & Belardelli, F. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev* **9**, 117-123 (1998).
132. Yoshimoto, T. *et al.* IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* **161**, 3400-3407 (1998).
133. Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T. & Hume, D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* **75**, 163-189 (2004).
134. Kotenko, S.V. *et al.* IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* **4**, 69-77 (2003).
135. Sheppard, P. *et al.* IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* **4**, 63-68 (2003).
136. Dumoutier, L. *et al.* Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. *J Biol Chem* **279**, 32269-32274 (2004).
137. Ank, N., West, H. & Paludan, S.R. IFN-lambda: novel antiviral cytokines. *J Interferon Cytokine Res* **26**, 373-379 (2006).
138. Sommereyns, C., Paul, S., Staeheli, P. & Michiels, T. IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog* **4**, e1000017 (2008).
139. Honda, K., Takaoka, A. & Taniguchi, T. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* **25**, 349-360 (2006).
140. Maniatis, T., Goodbourn, S. & Fischer, J.A. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* **236**, 1237-1245 (1987).

141. Lin, R., Heylbroeck, C., Pitha, P.M. & Hiscott, J. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* **18**, 2986-2996 (1998).
142. Sato, M. *et al.* Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett* **441**, 106-110 (1998).
143. Chu, W.M. *et al.* JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity* **11**, 721-731 (1999).
144. Panne, D. The enhanceosome. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 236-242 (2008).
145. Maniatis, T. *et al.* Structure and function of the interferon-beta enhanceosome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**, 609-620 (1998).
146. Iordanov, M.S. *et al.* Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase by double-stranded RNA and encephalomyocarditis virus: involvement of RNase L, protein kinase R, and alternative pathways. *Mol Cell Biol* **20**, 617-627 (2000).
147. Kim, T., Kim, T.Y., Lee, W.G., Yim, J. & Kim, T.K. Signaling pathways to the assembly of an interferon-beta enhanceosome. Chemical genetic studies with a small molecule. *J Biol Chem* **275**, 16910-16917 (2000).
148. Schafer, S.L., Lin, R., Moore, P.A., Hiscott, J. & Pitha, P.M. Regulation of type I interferon gene expression by interferon regulatory factor-3. *J Biol Chem* **273**, 2714-2720 (1998).
149. Wathelet, M.G. *et al.* Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol Cell* **1**, 507-518 (1998).

150. Sato, M. *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* **13**, 539-548 (2000).
151. Lin, R., Genin, P., Mamane, Y. & Hiscott, J. Selective DNA binding and association with the CREB binding protein coactivator contribute to differential activation of alpha/beta interferon genes by interferon regulatory factors 3 and 7. *Mol Cell Biol* **20**, 6342-6353 (2000).
152. Lin, R., Mamane, Y. & Hiscott, J. Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains. *Mol Cell Biol* **19**, 2465-2474 (1999).
153. Weaver, B.K., Kumar, K.P. & Reich, N.C. Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAF1. *Mol Cell Biol* **18**, 1359-1368 (1998).
154. Yoneyama, M. *et al.* Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J* **17**, 1087-1095 (1998).
155. Fujita, T., Kimura, Y., Miyamoto, M., Barsoumian, E.L. & Taniguchi, T. Induction of endogenous IFN-alpha and IFN-beta genes by a regulatory transcription factor, IRF-1. *Nature* **337**, 270-272 (1989).
156. Fujita, T. *et al.* Evidence for a nuclear factor(s), IRF-1, mediating induction and silencing properties to human IFN-beta gene regulatory elements. *EMBO J* **7**, 3397-3405 (1988).
157. Reis, L.F., Harada, H., Wolchok, J.D., Taniguchi, T. & Vilcek, J. Critical role of a common transcription factor, IRF-1, in the regulation of IFN-beta and IFN-inducible genes. *EMBO J* **11**, 185-193 (1992).

158. Falvo, J.V., Thanos, D. & Maniatis, T. Reversal of intrinsic DNA bends in the IFN beta gene enhancer by transcription factors and the architectural protein HMG I(Y). *Cell* **83**, 1101-1111 (1995).
159. Kim, T.K. & Maniatis, T. The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled interferon-beta enhanceosome. *Mol Cell* **1**, 119-129 (1997).
160. Thanos, D. & Maniatis, T. 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**, 777-789 (1992).
161. Thanos, D. & Maniatis, T. Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* **83**, 1091-1100 (1995).
162. Yie, J., Liang, S., Merika, M. & Thanos, D. Intra- and intermolecular cooperative binding of high-mobility-group protein I(Y) to the beta-interferon promoter. *Mol Cell Biol* **17**, 3649-3662 (1997).
163. Agalioti, T. *et al.* Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell* **103**, 667-678 (2000).
164. Marie, I., Durbin, J.E. & Levy, D.E. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J* **17**, 6660-6669 (1998).
165. de Veer, M.J. *et al.* Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol* **69**, 912-920 (2001).
166. Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R. & Silverman, R.H. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15623-15628 (1998).
167. Servant, M.J., Tenoever, B. & Lin, R. Overlapping and distinct mechanisms regulating IRF-3 and IRF-7 function. *J Interferon Cytokine Res* **22**, 49-58 (2002).

168. Mamane, Y. *et al.* Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* **237**, 1-14 (1999).
169. Honda, K., Yanai, H., Takaoka, A. & Taniguchi, T. Regulation of the type I IFN induction: a current view. *Int Immunol* **17**, 1367-1378 (2005).
170. Pfeffer, L.M. *et al.* The short form of the interferon alpha/beta receptor chain 2 acts as a dominant negative for type I interferon action. *J Biol Chem* **272**, 11002-11005 (1997).
171. Novick, D., Cohen, B. & Rubinstein, M. The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* **77**, 391-400 (1994).
172. Plataniias, L.C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* **5**, 375-386 (2005).
173. Parmar, S. & Plataniias, L.C. Interferons: mechanisms of action and clinical applications. *Curr Opin Oncol* **15**, 431-439 (2003).
174. Plataniias, L.C. & Fish, E.N. Signaling pathways activated by interferons. *Exp Hematol* **27**, 1583-1592 (1999).
175. Aaronson, D.S. & Horvath, C.M. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* **296**, 1653-1655 (2002).
176. Darnell, J.E., Jr. STATs and gene regulation. *Science* **277**, 1630-1635 (1997).
177. Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. & Schreiber, R.D. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**, 227-264 (1998).
178. Fasler-Kan, E., Pansky, A., Wiederkehr, M., Battegay, M. & Heim, M.H. Interferon-alpha activates signal transducers and activators of transcription 5 and 6 in Daudi cells. *Eur J Biochem* **254**, 514-519 (1998).

179. Matikainen, S. *et al.* Interferon-alpha activates multiple STAT proteins and upregulates proliferation-associated IL-2Ralpha, c-myc, and pim-1 genes in human T cells. *Blood* **93**, 1980-1991 (1999).
180. Sarkar, S.N. & Sen, G.C. Novel functions of proteins encoded by viral stress-inducible genes. *Pharmacol Ther* **103**, 245-259 (2004).
181. Sen, G.C. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* **55**, 255-281 (2001).
182. Sen, G.C. & Sarkar, S.N. The interferon-stimulated genes: targets of direct signaling by interferons, double-stranded RNA, and viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **316**, 233-250 (2007).
183. Tovey, M.G., Lallemand, C. & Thyphronitis, G. Adjuvant activity of type I interferons. *Biol Chem* **389**, 541-545 (2008).
184. Garcia, M.A., Meurs, E.F. & Esteban, M. The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* **89**, 799-811 (2007).
185. Hovanessian, A.G. & Justesen, J. The human 2'-5'oligoadenylate synthetase family: unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2'-5' instead of 3'-5' phosphodiester bond formation. *Biochimie* **89**, 779-788 (2007).
186. Haller, O., Stertz, S. & Kochs, G. The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins. *Microbes Infect* **9**, 1636-1643 (2007).
187. Haller, O. & Kochs, G. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* **3**, 710-717 (2002).
188. Degols, G., Eldin, P. & Mehti, N. ISG20, an actor of the innate immune response. *Biochimie* **89**, 831-835 (2007).
189. Takaoka, A., Tamura, T. & Taniguchi, T. Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis. *Cancer Sci* **99**, 467-478 (2008).

190. Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D. & Taniguchi, T. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol* **26**, 535-584 (2008).
191. Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A. & Tanaka, N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* **19**, 623-655 (2001).
192. Nehyba, J., Hrdlickova, R., Burnside, J. & Bose, H.R., Jr. A novel interferon regulatory factor (IRF), IRF-10, has a unique role in immune defense and is induced by the v-Rel oncoprotein. *Mol Cell Biol* **22**, 3942-3957 (2002).
193. Veals, S.A. *et al.* Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* **12**, 3315-3324 (1992).
194. Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M. & Stark, G.R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-1421 (1994).
195. Escalante, C.R., Yie, J., Thanos, D. & Aggarwal, A.K. Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation. *Nature* **391**, 103-106 (1998).
196. Fujii, Y. *et al.* Crystal structure of an IRF-DNA complex reveals novel DNA recognition and cooperative binding to a tandem repeat of core sequences. *EMBO J* **18**, 5028-5041 (1999).
197. Honda, K. & Taniguchi, T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* **6**, 644-658 (2006).
198. Qin, B.Y. *et al.* Crystal structure of IRF-3 in complex with CBP. *Structure* **13**, 1269-1277 (2005).

199. Takahasi, K. *et al.* X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications. *Nat Struct Biol* **10**, 922-927 (2003).
200. Matsuyama, T. *et al.* Targeted disruption of IRF-1 or IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development. *Cell* **75**, 83-97 (1993).
201. Barnes, B.J., Moore, P.A. & Pitha, P.M. Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes. *J Biol Chem* **276**, 23382-23390 (2001).
202. Barnes, B.J. *et al.* Global and distinct targets of IRF-5 and IRF-7 during innate response to viral infection. *J Biol Chem* **279**, 45194-45207 (2004).
203. Au, W.C., Moore, P.A., Lowther, W., Juang, Y.T. & Pitha, P.M. 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**, 11657-11661 (1995).
204. Sato, M., Tanaka, N., Hata, N., Oda, E. & Taniguchi, T. Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN-beta gene. *FEBS Lett* **425**, 112-116 (1998).
205. Au, W.C., Moore, P.A., LaFleur, D.W., Tombal, B. & Pitha, P.M. Characterization of the interferon regulatory factor-7 and its potential role in the transcription activation of interferon A genes. *J Biol Chem* **273**, 29210-29217 (1998).
206. Juang, Y.T. *et al.* Primary activation of interferon A and interferon B gene transcription by interferon regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9837-9842 (1998).
207. Kumar, K.P., McBride, K.M., Weaver, B.K., Dingwall, C. & Reich, N.C. Regulated nuclear-cytoplasmic localization of interferon regulatory factor 3, a subunit of double-stranded RNA-activated factor 1. *Mol Cell Biol* **20**, 4159-4168 (2000).

208. Saitoh, T. *et al.* Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat Immunol* **7**, 598-605 (2006).
209. Clement, J.F. *et al.* Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 generates a hyperactive form of IRF-3 through regulation of dimerization and CBP association. *J Virol* **82**, 3984-3996 (2008).
210. Ronco, L.V., Karpova, A.Y., Vidal, M. & Howley, P.M. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* **12**, 2061-2072 (1998).
211. Gravel, S.P. & Servant, M.J. 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**, 7477-7486 (2005).
212. Kawai, T. *et al.* Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* **167**, 5887-5894 (2001).
213. Preston, C.M., Harman, A.N. & Nicholl, M.J. Activation of interferon response factor-3 in human cells infected with herpes simplex virus type 1 or human cytomegalovirus. *J Virol* **75**, 8909-8916 (2001).
214. tenOever, B.R. *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. *J Virol* **78**, 10636-10649 (2004).
215. Fitzgerald, K.A. *et al.* IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* **4**, 491-496 (2003).
216. Sharma, S. *et al.* Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* **300**, 1148-1151 (2003).

217. Hemmi, H. *et al.* The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med* **199**, 1641-1650 (2004).
218. Perry, A.K., Chow, E.K., Goodnough, J.B., Yeh, W.C. & Cheng, G. Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection. *J Exp Med* **199**, 1651-1658 (2004).
219. Kirshner, J.R., Karpova, A.Y., Kops, M. & Howley, P.M. Identification of TRAIL as an interferon regulatory factor 3 transcriptional target. *J Virol* **79**, 9320-9324 (2005).
220. Lallemand, C. *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* **26**, 328-338 (2007).
221. Hiscott, J. *et al.* 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 (2003).
222. Andersen, J., VanScoy, S., Cheng, T.F., Gomez, D. & Reich, N.C. IRF-3-dependent and augmented target genes during viral infection. *Genes Immun* **9**, 168-175 (2008).
223. Lin, R., Heylbroeck, C., Genin, P., Pitha, P.M. & Hiscott, J. Essential role of interferon regulatory factor 3 in direct activation of RANTES chemokine transcription. *Mol Cell Biol* **19**, 959-966 (1999).
224. Ohmori, Y. & Hamilton, T.A. Cooperative interaction between interferon (IFN) stimulus response element and kappa B sequence motifs controls IFN gamma- and lipopolysaccharide-stimulated transcription from the murine IP-10 promoter. *J Biol Chem* **268**, 6677-6688 (1993).

225. Azimi, N., Shiramizu, K.M., Tagaya, Y., Mariner, J. & Waldmann, T.A. Viral activation of interleukin-15 (IL-15): characterization of a virus-inducible element in the IL-15 promoter region. *J Virol* **74**, 7338-7348 (2000).
226. Hacker, H. & Karin, M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* **2006**, re13 (2006).
227. Servant, M.J. *et al.* 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**, 9441-9447 (2003).
228. Karpova, A.Y., Trost, M., Murray, J.M., Cantley, L.C. & Howley, P.M. Interferon regulatory factor-3 is an in vivo target of DNA-PK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2818-2823 (2002).
229. Servant, M.J. *et al.* Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Biol Chem* **276**, 355-363 (2001).
230. Han, K.J. *et al.* Mechanisms of the TRIF-induced interferon-stimulated response element and NF-kappaB activation and apoptosis pathways. *J Biol Chem* **279**, 15652-15661 (2004).
231. Wang, R.P. *et al.* Differential regulation of IKK alpha-mediated activation of IRF3/7 by NIK. *Mol Immunol* **45**, 1926-1934 (2008).
232. Prinarakis, E., Chantzoura, E., Thanos, D. & Spyrou, G. S-glutathionylation of IRF3 regulates IRF3-CBP interaction and activation of the IFN beta pathway. *EMBO J* **27**, 865-875 (2008).
233. Glozak, M.A., Sengupta, N., Zhang, X. & Seto, E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* **363**, 15-23 (2005).
234. Lee, K.K. & Workman, J.L. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 284-295 (2007).

235. Yang, X.J. & Seto, E. Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell* **31**, 449-461 (2008).
236. Suhara, W. *et al.* Analyses of virus-induced homomeric and heteromeric protein associations between IRF-3 and coactivator CBP/p300. *J Biochem* **128**, 301-307 (2000).
237. Suhara, W., Yoneyama, M., Kitabayashi, I. & Fujita, T. Direct involvement of CREB-binding protein/p300 in sequence-specific DNA binding of virus-activated interferon regulatory factor-3 holocomplex. *J Biol Chem* **277**, 22304-22313 (2002).
238. Masumi, A. & Ozato, K. Coactivator p300 acetylates the interferon regulatory factor-2 in U937 cells following phorbol ester treatment. *J Biol Chem* **276**, 20973-20980 (2001).
239. Masumi, A., Yamakawa, Y., Fukazawa, H., Ozato, K. & Komuro, K. Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation. *J Biol Chem* **278**, 25401-25407 (2003).
240. Caillaud, A. *et al.* Acetylation of interferon regulatory factor-7 by p300/CREB-binding protein (CBP)-associated factor (PCAF) impairs its DNA binding. *J Biol Chem* **277**, 49417-49421 (2002).
241. Tang, X. *et al.* Acetylation-dependent signal transduction for type I interferon receptor. *Cell* **131**, 93-105 (2007).
242. Lu, G. *et al.* ISG15 enhances the innate antiviral response by inhibition of IRF-3 degradation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **52**, 29-41 (2006).
243. Kubota, T. *et al.* Virus infection triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, leading to the negative regulation of type I interferon gene expression. *J Biol Chem* **283**, 25660-25670 (2008).

244. Higgs, R. *et al.* The E3 ubiquitin ligase Ro52 negatively regulates IFN-beta production post-pathogen recognition by polyubiquitin-mediated degradation of IRF3. *J Immunol* **181**, 1780-1786 (2008).
245. Zhang, M. *et al.* Negative feedback regulation of cellular antiviral signaling by RBCK1-mediated degradation of IRF3. *Cell Res* **18**, 1096-1104 (2008).
246. Barro, M. & Patton, J.T. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4114-4119 (2005).
247. Bauhofer, O. *et al.* Classical swine fever virus Npro interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation. *J Virol* **81**, 3087-3096 (2007).
248. Saira, K., Zhou, Y. & Jones, C. The infected cell protein 0 encoded by bovine herpesvirus 1 (bICP0) induces degradation of interferon response factor 3 and, consequently, inhibits beta interferon promoter activity. *J Virol* **81**, 3077-3086 (2007).
249. Yu, Y., Wang, S.E. & Hayward, G.S. The KSHV immediate-early transcription factor RTA encodes ubiquitin E3 ligase activity that targets IRF7 for proteasome-mediated degradation. *Immunity* **22**, 59-70 (2005).
250. Fensterl, V. *et al.* Hepatitis A virus suppresses RIG-I-mediated IRF-3 activation to block induction of beta interferon. *J Virol* **79**, 10968-10977 (2005).
251. Foy, E. *et al.* Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* **300**, 1145-1148 (2003).
252. Johnson, C.L., Owen, D.M. & Gale, M., Jr. Functional and therapeutic analysis of hepatitis C virus NS3.4A protease control of antiviral immune defense. *J Biol Chem* **282**, 10792-10803 (2007).

253. Loo, Y.M. *et al.* Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6001-6006 (2006).
254. Smith, E.J., Marie, I., Prakash, A., Garcia-Sastre, A. & Levy, D.E. IRF3 and IRF7 phosphorylation in virus-infected cells does not require double-stranded RNA-dependent protein kinase R or Ikappa B kinase but is blocked by Vaccinia virus E3L protein. *J Biol Chem* **276**, 8951-8957 (2001).
255. Stack, J. *et al.* Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *J Exp Med* **201**, 1007-1018 (2005).
256. Eidson, K.M., Hobbs, W.E., Manning, B.J., Carlson, P. & DeLuca, N.A. Expression of herpes simplex virus ICP0 inhibits the induction of interferon-stimulated genes by viral infection. *J Virol* **76**, 2180-2191 (2002).
257. Lin, R., Noyce, R.S., Collins, S.E., Everett, R.D. & Mossman, K.L. The herpes simplex virus ICP0 RING finger domain inhibits IRF3- and IRF7-mediated activation of interferon-stimulated genes. *J Virol* **78**, 1675-1684 (2004).
258. Melroe, G.T., Silva, L., Schaffer, P.A. & Knipe, D.M. Recruitment of activated IRF-3 and CBP/p300 to herpes simplex virus ICP0 nuclear foci: Potential role in blocking IFN-beta induction. *Virology* **360**, 305-321 (2007).
259. Hato, S.V. *et al.* The mengovirus leader protein blocks interferon-alpha/beta gene transcription and inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *Cell Microbiol* **9**, 2921-2930 (2007).
260. Kochs, G., Garcia-Sastre, A. & Martinez-Sobrido, L. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *J Virol* **81**, 7011-7021 (2007).
261. Opitz, B. *et al.* IFNbeta induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cell Microbiol* **9**, 930-938 (2007).

262. Scholle, F. & Mason, P.W. West Nile virus replication interferes with both poly(I:C)-induced interferon gene transcription and response to interferon treatment. *Virology* **342**, 77-87 (2005).
263. Brzozka, K., Finke, S. & Conzelmann, K.K. Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* **79**, 7673-7681 (2005).
264. Spann, K.M., Tran, K.C. & Collins, P.L. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines. *J Virol* **79**, 5353-5362 (2005).
265. Basler, C.F. *et al.* The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* **77**, 7945-7956 (2003).
266. Devaraj, S.G. *et al.* Regulation of IRF-3-dependent innate immunity by the papain-like protease domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Biol Chem* **282**, 32208-32221 (2007).
267. Jaworska, J., Gravel, A., Fink, K., Grandvaux, N. & Flamand, L. Inhibition of transcription of the beta interferon gene by the human herpesvirus 6 immediate-early 1 protein. *J Virol* **81**, 5737-5748 (2007).
268. Donelan, N.R. *et al.* The N- and C-terminal domains of the NS1 protein of influenza B virus can independently inhibit IRF-3 and beta interferon promoter activation. *J Virol* **78**, 11574-11582 (2004).
269. Abate, D.A., Watanabe, S. & Mocarski, E.S. Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J Virol* **78**, 10995-11006 (2004).
270. Lin, R. *et al.* HHV-8 encoded vIRF-1 represses the interferon antiviral response by blocking IRF-3 recruitment of the CBP/p300 coactivators. *Oncogene* **20**, 800-811 (2001).

271. Sakaguchi, S. *et al.* Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon-beta gene expression and endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun* **306**, 860-866 (2003).
272. Zhai, Y. *et al.* Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol* **173**, 7115-7119 (2004).
273. Heylbroeck, C. *et al.* The IRF-3 transcription factor mediates Sendai virus-induced apoptosis. *J Virol* **74**, 3781-3792 (2000).
274. Weaver, B.K., Ando, O., Kumar, K.P. & Reich, N.C. Apoptosis is promoted by the dsRNA-activated factor (DRAF1) during viral infection independent of the action of interferon or p53. *FASEB J* **15**, 501-515 (2001).
275. Bhoj, V.G. & Chen, Z.J. Linking retroelements to autoimmunity. *Cell* **134**, 569-571 (2008).
276. Stetson, D.B., Ko, J.S., Heidmann, T. & Medzhitov, R. Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell* **134**, 587-598 (2008).
277. Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L. & Rose, I.A. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1783-1786 (1980).
278. Nakayama, K.I. & Nakayama, K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 369-381 (2006).
279. Pickart, C.M. Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* **25**, 544-548 (2000).
280. Shcherbik, N. & Haines, D.S. Ub on the move. *J Cell Biochem* **93**, 11-19 (2004).
281. Liu, Y.C., Penninger, J. & Karin, M. Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification. *Nat Rev Immunol* **5**, 941-952 (2005).

282. Coulombe, P., Rodier, G., Bonneil, E., Thibault, P. & Meloche, S. N-Terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome. *Mol Cell Biol* **24**, 6140-6150 (2004).
283. Hicke, L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 195-201 (2001).
284. Cardozo, T. & Pagano, M. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 739-751 (2004).
285. Liu, Y.C. Ubiquitin ligases and the immune response. *Annu Rev Immunol* **22**, 81-127 (2004).
286. Petroski, M.D. & Deshaies, R.J. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 9-20 (2005).
287. Saha, A. & Deshaies, R.J. Multimodal activation of the ubiquitin ligase SCF by Nedd8 conjugation. *Mol Cell* **32**, 21-31 (2008).
288. Okayama, Y. & Kawakami, T. Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol Res* **34**, 97-115 (2006).
289. Willems, A.R., Schwab, M. & Tyers, M. A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 133-170 (2004).
290. Fuchs, S.Y., Spiegelman, V.S. & Kumar, K.G. The many faces of beta-TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer. *Oncogene* **23**, 2028-2036 (2004).
291. Suzuki, H. *et al.* IkappaBalpha ubiquitination is catalyzed by an SCF-like complex containing Skp1, cullin-1, and two F-box/WD40-repeat proteins, betaTrCP1 and betaTrCP2. *Biochem Biophys Res Commun* **256**, 127-132 (1999).
292. Bornstein, G. *et al.* Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J Biol Chem* **278**, 25752-25757 (2003).

293. Carrano, A.C., Eytan, E., Hershko, A. & Pagano, M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* **1**, 193-199 (1999).
294. Minella, A.C. & Clurman, B.E. Mechanisms of tumor suppression by the SCF(Fbw7). *Cell Cycle* **4**, 1356-1359 (2005).
295. Sundqvist, A. *et al.* Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF(Fbw7). *Cell Metab* **1**, 379-391 (2005).
296. Orlicky, S., Tang, X., Willems, A., Tyers, M. & Sicheri, F. Structural basis for phosphodependent substrate selection and orientation by the SCFCdc4 ubiquitin ligase. *Cell* **112**, 243-256 (2003).
297. Yang, C.S. *et al.* FBW2 targets GCMA to the ubiquitin-proteasome degradation system. *J Biol Chem* **280**, 10083-10090 (2005).
298. Sidow, A. *et al.* A novel member of the F-box/WD40 gene family, encoding dactylin, is disrupted in the mouse dactylaplasia mutant. *Nat Genet* **23**, 104-107 (1999).
299. von der Lehr, N. *et al.* The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteosomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription. *Mol Cell* **11**, 1189-1200 (2003).
300. Lange, A. *et al.* Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem* **282**, 5101-5105 (2007).
301. Sorokin, A.V., Kim, E.R. & Ovchinnikov, L.P. Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Mosc)* **72**, 1439-1457 (2007).
302. Tamura, T., Nagamura-Inoue, T., Shmeltzer, Z., Kuwata, T. & Ozato, K. ICSBP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. *Immunity* **13**, 155-165 (2000).

303. Kramer, O.H. *et al.* Acetylation of Stat1 modulates NF-kappaB activity. *Genes Dev* **20**, 473-485 (2006).
304. Nusinzon, I. & Horvath, C.M. Positive and negative regulation of the innate antiviral response and beta interferon gene expression by deacetylation. *Mol Cell Biol* **26**, 3106-3113 (2006).
305. Melen, K., Kinnunen, L. & Julkunen, I. Arginine/lysine-rich structural element is involved in interferon-induced nuclear import of STATs. *J Biol Chem* **276**, 16447-16455 (2001).
306. Fagerlund, R., Melen, K., Kinnunen, L. & Julkunen, I. Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin alpha 5. *J Biol Chem* **277**, 30072-30078 (2002).
307. Xu, L. & Massague, J. Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 209-219 (2004).
308. Massague, J., Seoane, J. & Wotton, D. Smad transcription factors. *Genes Dev* **19**, 2783-2810 (2005).
309. Yoon, S. & Seger, R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**, 21-44 (2006).
310. Haberland, M., Montgomery, R.L. & Olson, E.N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* **10**, 32-42 (2009).
311. Hoeller, D. & Dikic, I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature* **458**, 438-444 (2009).

Liste de publications

A- Articles scientifiques:

1. **Annie Bibeau-Poirier**, Jean-François Clément, Rongtuan Lin & Marc J Servant. Lysine residue 77, located in the DNA binding domain of Interferon Regulatory Factor-3 transcription factor, is not part of a predicted NLS but is rather acetylated by CBP/p300 and essential for DNA binding. Sous forme de manuscript et sera envoyé à *J Biol chem*;
2. JPaz S, Vilasco M, Arguello M, Sun Q, Lacoste J, Nguyen TL, Shestakova EA, Zaari S, **Bibeau-Poirier A**, Servant MJ, Lin R, Meurs EF, Hiscott J (2009). Ubiquitin-related recruitment of IKK{epsilon} to MAVS interferon signaling adapter. *Mol Cell Bio*, 2009 Apr 20;
3. **Bibeau-Poirier A** & Servant M (2008). Roles of ubiquitination in pattern-recognition receptors and type I interferon receptor signaling. *Cytokine*, 2008 Sep;43(3):359-67.
4. Clément JF, **Bibeau-Poirier A**, Gravel SP, Grandvaux N, Bonneil É, Thibault P, Meloche S & Servant M (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):3984-96;
5. Lepicier P, **Bibeau-Poirier A**, Lagneux C, Servant MJ, Lamontagne D (2006). Signaling pathways involved in the cardioprotective effects of cannabinoids. *J Pharmacol Sci*, 102(2) :155-66 ;
6. **Bibeau-Poirier A**, Gravel SP, Clément 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):5059-67;

7. *Douillette A, ***Bibeau-Poirier A**, *Gravel S-P, Clément JF, Chenard V, Moreau P & Servant MJ. (2006) The proinflammatory actions of angiotensin II are dependent on p65 phosphorylation by the IkappaB kinase complex. *J Biol Chem*, 281(19):13275-84;

* Ces auteurs ont fournis un travail équivalent.

B- Communications orales:

1. **Bibeau-Poirier**, J.F. Clément, R. Lin & M. Servant. Influence de la lysine 77 du facteur de transcription IRF3 dans le mécanisme de régulation de son activation. *3ème Journée scientifique du Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament*, Montreal, Canada, mai 2008
2. Jean-Francois Clement, Simon-Pierre Gravel, **Annie Bibeau-Poirier**, Sylvain Meloche and Marc J Servant. GSK-3 Beta, a new kinase of IRF-3. *2ème Journée scientifique du Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament*, Montreal, Canada, juin 2007
3. **Bibeau-Poirier A**, Gravel SP, Clément JF, Rolland S, Rodier G, Coulombe P, Hiscott J, Grandvaux N, Meloche S and Servant MJ. Involvement of the IKK-related kinases TBK1/IKKi and Cullin- based Ubiquitin Ligases in IRF-3 Degradation. *4th Northern Lights Fall Conferences: Infection and Immunity. October 10-13, 2006. Ottawa Congress Centre, Ottawa, ON.*
4. Douillette A, **Bibeau-Poirier A**, Gravel SP, Servant MJ. (2006) L'activation du facteur de transcription NF-kappaB par l'angiotensine II est dépendante de la phosphorylation de p65 sur le résidu sérine 536 par IKKbeta. *1ère Journée scientifique du Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament*. Université de Montréal, Qc, 10 mars 2006;
5. **Bibeau-Poirier A**, Rodier G, Coulombe P, Meloche S & Servant MJ. (2005) Une voie de conjugaison de type NEDD8 impliquée dans la dégradation de facteur de transcription IRF-3. *16ème Journée scientifique annuelle du Groupe de Recherche sur le système Nerveux Autonome*. Université de Montréal, Qc, 22 avril 2005;

6. **Bibeau-Poirier A**, Rodier G, Coulombe P, Meloche S & Servant MJ. (2004) Une voie de conjugaison de type NEDD8 impliquée dans la dégradation de facteur de transcription IRF-3. *Médecine Sciences* 20(0):23. *46ème Ed Club de Recherche Clinique du Québec*. Ste-Anne, Qc, 23-25 septembre 2004;

C- Communications par affiches:

1. St-Amant Verret M, **Bibeau-Poirier A** & Servant M. Phosphorylation of the NF-kappaB subunit p65/RelA on tyrosine residue in vascular smooth muscle cells exposed to Angiotensin II. *Canadian Cardiovascular Congress*, Toronto, ON, 25-29 octobre 2008;
2. **Annie Bibeau-Poirier**, Jean-François Clément, Rongtuan Lin, Marc J. Servant. DOES THE NUCLEAR ACCUMULATION OF INTERFERON REGULATORY FACTOR (IRF)-3 IS DEPENDENT OF A FUNCTIONAL NUCLEAR LOCALIZATION SEQUENCE? *Cytokines 2008*, Montreal, Quebec, Canada, 12-17 octobre 2008;
3. **A. Bibeau-Poirier**, J.F. Clément, R. Lin & M. Servant. Influence de la lysine 77 du facteur de transcription IRF3 dans le mécanisme de régulation de son activation. *Signalisation Québec 2008*, Centre de Recherche en cancérologie de l'université Laval, Québec, Canada, 11-13 juin 2008;
4. Clément JF, **Bibeau-Poirier A**, Gravel SP, Grandvaux N, Bonneil E, Thibault P, Meloche S & Servant M. Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 generates a hyperactive form of IRF-3 through regulation of dimerization and CBP association. *Keystone Symposia*, Keystone, Colorado, février 2008;
5. **Bibeau-Poirier A.**, Clément J.-F., Rodier G., Coulombe P., Meloche S. & Servant M. Implication de E3 ligases de types complexe SCF dans le processus de dégradation du facteur de transcription IRF-3. *49ème Ed Club de Recherche Clinique du Québec*. Mont-Tremblant, Qc, 20-22 septembre 2007;

6. Jean-Francois Clement, **Annie Bibeau-Poirier**, Simon-Pierre Gravel, Nathalie Grandvaux, Sylvain Meloche and Marc J Servant. Ser/Thr cluster I and II located in C-terminal end of IRF3 are both important for its optimal transactivation ability and are involved in different aspects of IRF3 life cycle. *Congrès de l'AFPC*, Montreal, Canada, juin 2007;
7. Jean-Francois Clement, **Annie Bibeau-Poirier**, Simon-Pierre Gravel, Nathalie Grandvaux, Sylvain Meloche and Marc J Servant. Ser/Thr cluster I and II located in C-terminal end of IRF3 are both important for its optimal transactivation ability and are involved in different aspects of IRF3 life cycle. *Keystone Symposia*, Steamboat Spring, Colorado, janvier 2007;
8. **Bibeau-Poirier A**, Rodier G, Coulombe P, Gravel SP, Clément JF, Meloche S & Servant MJ. (2006) A cullin-based ubiquitin ligase is involved in virus-mediated IRF-3 degradation. *100th Ed American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, San Francisco, États-Unis, 1-5 avril 2006;
9. Douillette A, **Bibeau-Poirier A**, Gravel SP, Servant MJ. (2006) The proinflammatory actions of angiotensin II are mediated through the phosphorylation of p65/Rel A on Serine 536. *100th Ed American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, San Francisco, États-Unis, 1-5 avril 2006;
10. **Bibeau-Poirier A**, Gravel SP, Clément JF, Rolland S, Rodier G, Coulombe P, Hiscott J, Grandvaux N, Meloche S & Servant MJ. (2006) Involvement of the IKK-related kinases TBK1/IKKi and Cullin-based Ubiquitin Ligases in Virus-Mediated IRF-3 Degradation. *1ère Journée scientifique du Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament*. Université de Montréal, Qc, 10 mars 2006;
11. Douillette A, **Bibeau-Poirier A**, Gravel SP & Servant MJ. (2006) L'activation du facteur de transcription NF-kappaB par l'angiotensine II est dépendante de la phosphorylation de p65 sur le résidu serine 536. *14ème reunion scientifique annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle*, Montréal, Qc, 12-14 janvier 2006;

12. Douillette A, **Bibeau-Poirier A**, Gravel SP & Servant MJ. (2005) The proinflammatory actions of Angiotensin II are mediated through the phosphorylation of p65/RelA by both I κ B kinase alpha and RSK1. *Canadian Cardiovascular Congress*, Montréal, Qc 22-26 octobre 2005;
13. **Bibeau-Poirier A**, Douillette A & Servant MJ. (2004) Characterization of the signaling pathways involved in the pro-inflammatory actions of angiotensin II. *Canadian Cardiovascular Congress*, Calgary, Ab, 23-27 octobre 2004;
14. Lépiciér P, **Bibeau-Poirier A**, Lagneux C, Sirois MG, Servant MJ & Lamontagne D. (2004) Endothelial CB1-receptors limit infarct size in rat isolated hearts through nitric oxide production. *J Mol Cell Cardiol* 37: 197-98. *18th Ed International Society for Heart Research*. Brisbane, Australie, 7-11 août 2004;
15. **Bibeau-Poirier A**, Rodier G, Coulombe P, Meloche S & Servant MJ. (2004) A Nedd8 conjugation pathway is involved in virus-mediated IRF-3 degradation. *47th Ed congress Canadian Society of Biochemistry, Molecular & Cellular Biology*. Mont-Tremblant, Qc, 27-30 mai 2004;

**THE PROINFLAMMATORY ACTIONS OF
ANGIOTENSIN II ARE DEPENDENT ON p65
PHOSPHORYLATION BY THE I κ B KINASE
COMPLEX**

Annie Douillette*, Annie Bibeau-Poirier*, Simon-Pierre Gravel*, Jean-François Clément,
Valérie Chénard, Pierre Moreau and Marc J. Servant

From the Faculty of Pharmacy, University of Montreal

Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

Running title: IKK-dependent phosphorylation of p65 by Ang II

* These authors contributed equally to this work.

Address correspondence to: Marc Servant, Faculty of Pharmacy, University of Montreal,
P.O. Box 6128, Downtown station, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7, [REDACTED]

[REDACTED]

ABSTRACT

The vasoactive hormone Angiotensin II (Ang II) probably triggers inflammatory cardiovascular diseases by activating transcription factors such as NF- κ B. We describe here a novel mode of NF- κ B activation in cultured vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to Ang II. Ang II treatment resulted in an increase in the phosphotransferase activity of the IKK complex, which was mediated through the AT1 receptor subtype. The typical phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the NF- κ B inhibitor I κ B α were not observed. Rather, Ang II treatment of VSMC led to the phosphorylation of p65 on serine 536, a signal detected in both the cytoplasm and the nuclear compartments. The use of pharmacological inhibitors that inhibit the activation of MEK by Ang II revealed that phosphorylation of p65 on serine 536 did not require the MEK-ERK-RSK signaling pathway. On the other hand, specifically targeting the IKK β subunit of the IKK complex by overexpression of a dominant negative version of IKK β (IKK β K44A) or silencing RNA technology demonstrated that the IKK β subunit of the IKK complex was responsible for the detected phosphoserine 536 signal in Ang II-treated cells. Characterization of the signaling pathway leading to activation of the IKK complex by Ang II revealed that neither epidermal growth factor receptor transactivation nor the phosphatidylinositol-3 kinase-AKT signaling cascade were involved. Collectively, our data demonstrate that the proinflammatory activity of Ang II is independent of the classical pathway leading to I κ B α phosphorylation and degradation but clearly depends on the recruitment of an IKK complex signaling cascade leading to phosphorylation of p65 on serine 536.

INTRODUCTION

Hypertension is a classical risk factor for the development of atherosclerosis (for review see (1)). Epidemiological studies showed that among hypertensive patients, those

who have an activated renin-angiotensin (RAS) have a higher incidence of myocardial infarction than other forms of hypertension (2-6). The octapeptide angiotensin II (Ang II) is the multifunctional effector of the RAS. It binds to two distinct receptor subtypes, designated AT1 and AT2 (7). Most of the known effects of Ang II are relayed through binding of the AT1 subtype and studies in models of vascular injury have demonstrated that blockade of the RAS or gene disruption of the AT1 receptor can prevent the development of atherosclerosis (8-12). In addition to its vasoconstrictive role, Ang II may also acts locally as a growth factor. Indeed, it is a hypertrophic factor for vascular smooth muscle cells (VSMC) and cardiac myocytes and has mitogenic effects for different cell type such as cardiac fibroblasts (for review see (13-15)). Interestingly, other studies have demonstrated that Ang II has proinflammatory actions by promoting an increase in the expression level of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and several chemokines such as monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES), interleukin (IL)-8, IL-6 and interferon-gamma- inducible protein 10 (IP-10) (for reviews see (16,17)). However, the molecular understanding of the proinflammatory action of Ang II is still unclear.

Activation of the Ang II AT1 receptor (AT1R) in VSMC is functionally link to the recruitment and activation of cytosolic kinases such as the classical Ras/mitogen-activated protein kinase kinase-1 (MEK1)/extracellular signal-regulated kinase (ERK)/ribosomal S6 kinase (RSK), protein kinases C (PKCs), calmodulin (CAM) kinases and Janus kinases (JAKs). These kinases can in turn lead to the activation of transcription factors involved in genes regulation and the growth promoting effect of Ang II (15,18). The transcription factor nuclear factor κ B (NF- κ B) is a key regulator of inflammation, immune response, and cellular survival (19) and the proinflammatory actions of Ang II have been attributed to its activation (16,20-26).

The NF- κ B family is represented by five members: p50, p65(RelA), c-Rel, p52, and RelB. In resting cells, they exist as homo- or heterodimers that are sequestered in the cytoplasm in an inactive form through their association with one of several inhibitory

molecules, namely I κ B- α , - β , - ϵ , p105, and p100. These inhibitors mask the nuclear localization sequence (NLS) in the rel homology domain (RHD) of NF- κ B, thereby preventing it from accumulating in the nucleus (for recent reviews see (27,28)). I κ B α is the most characterized member of this family. It is composed of three domains: an N-terminal signal responsive domain, a central ankyrin repeat domain that interacts with NF- κ B and a C-terminal PEST domain which is responsible for the basal turnover of the protein (29). In the classical pathway, the first phase of NF- κ B activation mainly consists of the regulated degradation of I κ B α and is triggered by prototypical activators such as tumor necrosis factor (TNF)- α , lipopolysaccharide (LPS), IL-1 β and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). These stimuli induce the phosphorylation of I κ B α at Ser-32 and Ser-36 in the N-terminal signal responsive domain by the canonical I κ B kinase (IKK) complex, which is composed of two catalytic subunits called IKK α and β and one regulatory subunit IKK γ . Phosphorylated I κ B α is subsequently polyubiquitinated and targeted to the 26S proteasome complex, resulting in the release and nuclear accumulation of NF- κ B, which can now stimulate target gene transcription. Studies report that Ang II can stimulate degradation of I κ B α , but the decrease in its expression level is very small suggesting the existence of other pathways to regulate NF- κ B activity (24,26).

Notably, several lines of evidence suggest the existence of a second phase of NF- κ B activation. Part of this second phase involves phosphorylation of the p65 subunit, which plays a key role in determining both the strength and duration of the NF- κ B-mediated transcriptional response (for recent reviews see (30,31)). The sites of phosphorylation reported to date are Ser-276 and Ser-311 in RHD and three phosphoacceptor sites located in the transactivation domain (TAD), Ser 468, Ser-529 and Ser-536. Several candidate kinases that phosphorylate each serine residue have been identified, such as protein kinase A and mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) for Ser-276 (32,33), PKC ζ for Ser-311, GSK-3 β for Ser-468, casein kinase II (CKII) for Ser-529 (34), and IKK α/β as well as RSK for Ser-536 (35-37). Importantly, phosphorylation at Ser-536 was recently shown to reduce the ability of p65 to bind I κ B α (36) and to allow the recruitment of TAFII31, a

component of the basal transcriptional machinery (37). Phosphorylation at Ser-536 is also responsible for recruitment of coactivators such as p300 (38) and also triggers its rapid turnover in the nucleus (39). All these evidences support the importance of p65 phosphorylation at Ser-536 in the function of NF- κ B. Notably, a recent study proposed that Ang II induces NF- κ B through a RSK-dependent pathway leading to Ser-536 phosphorylation of p65 (40). In the light of these interesting findings, we have set up experiments to identify more precisely the molecular mechanism by which Ang II induces proinflammatory action in VSMC and now describe a series of studies dissecting the novel mechanism by which Ang II activates NF- κ B. We show that following binding to the AT1R, Ang II leads to an increase in the phosphotransferase activity of the IKK complex, which leads to phosphorylation of p65 on Ser-536. Because I κ B α is not degraded in response to Ang II, we propose a model where it is the phosphorylation of p65 on Ser-536 that is likely to be involved in the pro-inflammatory actions of Ang II in VSMC.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagent, antibodies, and plasmids

Angiotensin II (Ang II) was purchased from Hubakel Scientific (St. Laurent, QC). EGF and TNF- α were from BioSource (Camarillo, CA). The tyrphostin AG1478, a selective EGFR kinase inhibitor, the PI3-kinase inhibitor LY294002, the MEK1/2 inhibitors UO126 and PD98059 were all from Biomol (Plymouth Meeting, PA). G418 was from Invitrogen. Commercial antibodies were from the following suppliers: anti-IKK γ (SC-8330), anti-I κ B α (SC-371), anti-p65 (SC-372) and anti-IKK α (SC-7218) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); anti- β -actin clone AC-74 (A5316) was from Sigma (Saint Louis, MO); anti-IKK β antibody, phospho-I κ B α (Ser32) antibody (#9241), phospho-AKT (Ser473) antibody (#9271), phospho-ERK1/2 (Thr202-Tyr204) antibody (#9101), phospho-p65 (Ser536) antibody (#3031), and phospho-RSK (Ser380) antibody (#9341) were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA); anti-phosphotyrosine, clone

4G10 and anti-Lamin A/C were from Upstate cell signaling solution (Lake Placid, NY). An antibody that recognizes both p105 and p50 was a generous gift of Dr. John Hiscott (McGill University, Montreal, Qc). Glutathione-S-transferase (GST)-I κ B α (1-54) has been described (41). GST-p65 (354-551) was produced by subcloning PCR-amplified fragments in pGEX-KG. The resulting construct were transformed in *Escherichia coli* and following isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) induction (1 mM for 3 h at 37°C), purified over a glutathione agarose column (Amersham). The expression plasmids pTrack-Flag-IKK β (K44A) and pCDNA3.1-HA-AT1R were provided by Drs. John Hiscott and Stephane Laporte (McGill University, Montreal, Qc) respectively.

Cell types and Transfection

Rat VSMC and VSMC overexpressing a dominant-negative version of EGFR (HERCD533) (42) were obtained from Dr. Sylvain Meloche (University of Montreal, Montreal, Qc) and grown in low glucose DMEM supplemented with 10% calf serum, 2 mM-glutamine, and antibiotics (50 units/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin). Cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air, 5% CO. All experiments were conducted on cells at passage levels 9-14. Quiescent VSMC were obtained by incubation of 95% confluent cell cultures in serum-free DMEM-Ham's F-12 (1:1) supplemented with 15 mM HEPES (pH 7.4), 0.1% bovine serum albumin, and 5 μ g/ml transferrin for 48 h. For experiments with pharmacological inhibitors, the cells were treated with vehicle alone or with the indicated concentrations of inhibitors for 30 min before addition of Ang II. 293T cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC), cultured in minimal essential medium containing 10% fetal bovine serum and transfected using calcium phosphate coprecipitation method. All cells tested negative for mycoplasma contamination.

Small Interfering RNA (siRNA)

Two 21-nucleotide siRNA duplexes with 2-nucleotide (2'-deoxy)-thymidine 3' overhangs were obtained from Dharmacon Research (Lafayette, CO) and directed against rat IKK β : IKK β #1 (nucleotide 1460 to 1478 (AAACCAGCATCCAGATTGA)) and IKK β #2 (nucleotide 2028 to 2046 (GAATGTGTCTCGACTTAGT)). A siCONTROL Non-targeting silencing RNA (siRNA) (#D-001210-01-20) as described previously (41). For transfection, cells were trypsinized and seeded into six-well plates (8.0×10^5 cells/well) without antibiotics. After 24h, cells were transfected with siRNA using Lipofectamine2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's specifications. siRNA were used at a concentration of 120 nM in transfections. Cells were harvested for analysis 72 h after transfection.

Retrovector construction, transduction and generation of rat VSMC overexpressing I κ B α 2N Δ 4

The pMSCVneo I κ B α 2N Δ 4 retrovector was a kind gift of Dr. John Hiscott (McGill University) and has been described (43). The Phoenix Amphotropic packaging cell line was transiently transfected as described (www.stanford.edu/group/nolan/phxhelper.html) with the plasmids pMSCVneo and pMSCVneo I κ B α 2N Δ 4. At 48 h post-transfection, retrovirus-containing medium was harvested and used to infect rat VSMC. VSMC were infected twice at 24 h intervals in the presence of 10 μ g/ml of polybrene (Sigma); selection with 800 μ g/ml of G418 (Invitrogen) was started 5 days later. After 14 days, a population of resistant VSMC was selected. For selection of clones from both rat VSMC (Neo) and rat VSMC (I κ B α 2N Δ 4), cloning rings were used and expression of the transgene was verified by immunoblot analysis.

RT-PCR analysis

Total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen). DNase-treated (Ambion, Austin, TX) cellular RNA (1 μ g) was reverse transcribed with AMV reverse transcriptase (Sigma)

in a 20 μ l reaction volume according to manufacturer's instructions. PCRs were subsequently performed per the manufacturer's specifications with the following primers: rat IL-6 forward and reverse, 5'-TGTTGTTGACAGCCACTGC-3' and 5'-TTTCAAGATGAGTTGGATGGTC-3' respectively; rat MCP-1 forward and reverse, 5'-CAGGTCTCTGTCACGCTTCT-3' and 5'-AGTATTCATGGAAGGGAATAG-3' respectively and rat RPL32 forward and reverse, 5'-GTGAAGCCCAAGATCGTC-3' and 5'-GAACACAAAACAGGCACAC -3' respectively. PCR were performed using the following schedule: denaturation, annealing, and primer extension at 94, 56, and 72°C for 1 min, 1 min and 2 min respectively for 30 cycles. PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gels containing ethidium bromide and visualized using a gel documentation device (Typhoon scanner 9410).

Immunoblot analysis

After the different treatment, cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and whole cell extracts were prepared using Triton X-100 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM NaCl, 50 mM sodium fluoride, 5 mM EDTA, 40 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 10^{-4} M phenylmethylsulfonyl fluoride, 10^{-6} M leupeptin, 10^{-6} M pepstatin A, 1% Triton X-100) for 30 min at 4°C. Lysates were clarified by centrifugation at 13,000 g for 10 min and equal amounts of lysate proteins (30-75 μ g) were subjected to electrophoresis on 7.5, 10 or 12 % acrylamide gels. Proteins were electrophoretically transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes (Amersham) in 25 mM Tris, 192 mM glycine, and fixed for 10 min in methanol/acetic acid/glycerol (40:7:3). Immunoblot analysis of I κ B α and β -actin were accomplished as described previously (41). Phospho-I κ B α (Ser32), phospho-AKT (Ser473), phospho-ERK1/2 (Thr202-Tyr204), phospho-p65 (Ser536), and phospho-RSK (Ser380) were used following manufacturer's instructions. Both anti-p65 and anti-IKK β were used at 1 μ g/ml. Rabbit anti-p105/p50 and mAb 4G10 were used at 1:1000 and 1:5000 respectively.

In vitro kinase assays

The phosphotransferase activity of the IKK complex was measured as described previously (41). Briefly, 250 to 400 μg of whole cell extracts were incubated for 4 hours at 4°C with specific antibody to IKK γ (anti-IKK γ (SC-8330)) preabsorbed to protein-A-sepharose beads. The immune complexes were washed three times with lysis buffer and once with kinase buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 20 mM MgCl₂, and 2 mM dithiothreitol (DTT)). IKK complex activities was assayed by resuspending the beads in 40 μl of kinase buffer containing 1 μg of GST-substrates (GST-I κ B α or GST-p65) as indicated, 20 μM ATP, and 20 μCi of [γ -³²P]ATP. The reactions were incubated at 30°C for 30 min. and stopped by the addition of 5X Laemmli's sample buffer. The samples were analyzed by SDS-gel electrophoresis. Following Coomassie staining, the gels were dried and exposed to a Gel Documentation device (Typhoon scanner 9410, Amersham) for imaging and quantification. In some experiments, the upper part of the gel was electrophoretically transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes and immunoprecipitated IKK complex was revealed by immunoblotting.

Phosphorous 32 labeling and Immunoprecipitation

Quiescent VSMC in 100-mm petri dishes were metabolically labeled for 5 h at 37°C in bicarbonate and phosphate-free Hepes-buffered Dulbecco's modified Eagle's medium containing 0.75 mCi/ml [³²P]phosphoric acid. The cells were then stimulated by the addition of 100 nM Ang II or 20 ng/ml TNF- α to the medium for the indicated period of time. Following a quick wash with ice-cold PBS, whole cell extracts were prepared as described above and precleared for 1 h with 10 μl of normal rabbit serum and incubated for 4 h at 4°C with anti-p65 antibody preabsorbed to protein A-Sepharose beads. Immune complex were washed six times with lysis buffer. Protein complexes were eluted by heating at 95°C for 5 min in denaturing sample buffer and analyzed by SDS-gel electrophoresis on 10% acrylamide gels. The proteins were then electrophoretically transferred to PVDF membranes (Millipore) in 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 20% methanol, and exposed

to a gel documentation device (Typhoon scanner 9410, Amersham Biosciences) for imaging and quantification. The membranes were after use in immunoblotting experiments using anti-p65 antibody to verify the immunoprecipitated p65.

Biosynthetic Labeling Experiments

To examine the turnover of I κ B α protein, quiescent VSMC in 100-mm Petri dishes were pulse-labeled for 1 h with 166 μ Ci/ml of [³⁵S]methionine and [³⁵S]cysteine and then chased for the indicated times in serum-free medium containing excess methionine and cysteine and either Ang II or TNF- α . The cells were then washed twice with ice-cold PBS and lysed in Triton X-100 lysis buffer. Lysates (500 μ g protein) were precleared for 1 h with 5 μ l of normal rabbit serum and the resulting supernatants were incubated with protein A-Sepharose beads preabsorbed with 2 μ g of anti-I κ B α for 4 h at 4°C. Immune complexes were washed five times with Triton X-100 lysis buffer. Proteins were eluted by heating at 95°C for 5 min in denaturing sample buffer and analyzed by SDS-gel electrophoresis on 12% acrylamide gels. The I κ B α protein was detected by fluorography and visualized using a gel documentation device (Typhoon scanner 9410, Amersham Biosciences).

Electromobility shift assays (EMSA)

Preparation of cytosolic and nuclear extracts as well as EMSA was accomplished as described previously (44).

RESULTS

NF- κ B-dependent chemokines gene induction by Ang II in VSMC

Since controversy exist in the literature as to know whether Ang II has the ability to activate NF- κ B transcription factor (45,46), we first verified the state of activation of known NF- κ B-regulated chemokines, namely IL-6 and MCP-1, in VSMC stably

overexpressing the superrepressor version of I κ B α , I κ B α 2N Δ 4. This mutant molecule has been shown to abrogate totally NF- κ B induction by different stimuli. It involves mutation of the I κ B serine phosphorylation sites to alanine (Ser32/36Ala) and removal of the C-terminal PEST domain to generate a form of I κ B (I κ B α 2N Δ 4). The basal turnover of this mutated I κ B is diminished but most importantly, I κ B α 2N Δ 4 is no longer responsive to inducer-mediated phosphorylation and degradation, and thus acts as a transdominant repressor of the NF- κ B pathway (by sequestering NF- κ B subunits in the cytoplasm) (43). Following selection of the stable transfectant, clones were isolated and analyzed for the transgene expression in western blot analysis (see Fig. 1A). Note that when the level of I κ B α 2N Δ 4 is high, the expression of endogenous I κ B α is diminished due to the fact that the *I κ B* gene is itself regulated by NF- κ B transcription factor (Fig. 1A, compare clones I κ B α 2N Δ 4 #1 with #4). This illustrates that overexpression of I κ B α 2N Δ 4 titrates out any free NF- κ B subunits thus allowing reduction in basal NF- κ B transcription of target genes such as I κ B α . Following Ang II stimulation, induction of both *MCP-1* and *IL-6* transcripts was observed in the two clones of rat VSMC expressing only the neomycin cassette (clones neo #3 and #6). However, the presence of high level of I κ B α 2N Δ 4 in clone #4 strongly abrogated the induction of these transcripts by Ang II (Fig. 1B). The clone expressing moderate level of I κ B α 2N Δ 4 (clone#1) had an intermediate effect on the induction of *IL-6* and *MCP-1*. Together, these data clearly demonstrate a role of NF- κ B in Ang II-induced proinflammatory genes in VSMC.

IKK complex activation by Ang II in VSMC

Given the essential role of the IKK in the activation of NF- κ B, we next verified the phosphotransferase activity of this complex when VSMC were exposed to Ang II. Following immunoprecipitation of the scaffolding protein of the IKK complex, IKK γ , we observed that Ang II treatment of VSMC resulted in a time-dependent (Fig. 2A) and dose-dependent (Fig. 2B) stimulation of the IKK complex as observed by an increase phosphotransferase activity towards the *in vitro* substrate GST-I κ B α . The maximal increase

in the phosphotransferase was observed at 1 μ M Ang II and sustained for at least 60 minutes starting at 1 min. post stimulation (Fig. 2A and 2B). Importantly, the observed IKK complex stimulation was completely abrogated when cells were pre-incubated with the AT1 antagonist Irbezartan demonstrating that the activation of the IKK complex by Ang II is AT1R-dependent (Fig. 2B). The use of the recombinant protein GST-I κ B α 2N, where Ser-32 and 36 were mutated to alanine, showed no phosphorylation under our conditions thus confirming the specificity of the immunoprecipitated IKK complex in VSMC (Fig. 2C).

Nonclassical activation of NF- κ B by Ang II in VSMC

Through phosphorylation-dependent degradation of I κ B proteins by the proteasome, activation of the IKK complex is a rate-limiting step in the activation of NF- κ B transcription factor (27,47). Notably, several groups have published data showing that Ang II induces weak or strong degradation of I κ B proteins in VSMC (22,24). However, another recent study reported no degradation of the I κ B α / β NF- κ B inhibitors in the same model exposed to Ang II (40). Given that we observed a significant increase in the phosphotransferase activity of the IKK complex in VSMC stimulated with Ang II (Fig. 2), we wanted to revisit the possibility that the expression level of I κ B proteins might be reduced following Ang II treatment. Western blot analysis clearly demonstrated no degradation of the two NF- κ B inhibitors, I κ B α and I κ B β , nor phosphorylation of I κ B α on Ser 32 when cells were exposed to Ang II (see Fig. 3A, panels a, b and c) as opposed to TNF- α -treated cells where a specific I κ B α phosphoserine 32 signal was observed after 5 min of stimulation (Fig. 3A, panel b, lanes 11-12) followed by a net decrease of I κ B α isoform after 10 min (Fig. 3A, panel a, lane 12). To confirm this observation, we next determined the rate of I κ B α turnover by pulse-chase experiments on VSMC treated with Ang II and TNF- α . When compared to untreated cells, stimulation of cells with Ang II did not affect the stability of I κ B α , as opposed to stimulation with TNF- α where 90% of NF- κ B inhibitor was degraded after 15 min of treatment (Fig. 3B). Albeit the lack of I κ B α

degradation by Ang II, we observed a significant DNA binding activity of p50/p65 heterodimers in VSMC (see Supplemental Data, Fig. 1). Ang II has pleiotropic actions at multiple points in the NF- κ B activation pathway in VSMC. Reports have indeed demonstrated that Ang II could lead to NF- κ B activation through an increased processing of p105 to p50 (24), which is considered to be a constitutive process (27). In addition, Ang II induces tyrosine phosphorylation of I κ B α in fetal VSMC (48), a process thought to promote its physical dissociation from NF- κ B. However, our own immunoprecipitation studies and Western blot analysis clearly demonstrated no tyrosine phosphorylation of I κ B α when VSMC were exposed to Ang II as opposed to pervanadate treatment (see Supplemental Data, Fig. 2A). No processing of p105 to p50 was also observed over a 16 hours period treatment with Ang II (see Supplemental Data, Fig. 2B). Collectively, these data demonstrate that, albeit a significant activation of the IKK complex by Ang II and the increase in DNA binding activity of p65/p50 complexes, the classical pathway leading to degradation of I κ B proteins and atypical models of activation (tyrosine phosphorylation of I κ B α and p105 processing), are not involved in Ang II-induced activation of NF- κ B transcription factor.

Ang II induces phosphorylation of p65 on Ser-536 in an IKK-dependent manner

In addition to I κ B proteins, it is now well recognized that components of the IKK complex have several other substrates including histone H3, p100 and p65. Whereas p65 is a substrate for IKK α and β (for recent reviews see (30,31)), histone H3 and p100 are phosphorylated only by IKK α (47,49,50). Since we observed a significant activation of the IKK complex by Ang II, we next analyzed the phosphorylation state of p65 after immunoprecipitation from ³²P-labeled VSMC stimulated with Ang II or TNF- α . p65 is expressed as a phosphoprotein in quiescent VSMC (Fig. 4A lane 1) and exposure to Ang II or TNF- α significantly increased its phosphorylation level (Fig. 4A). Using a phosphospecific antibody, we next addressed if p65 phosphorylation was occurring on an IKK phosphorylation site, namely Ser-536. A specific phosphoserine 536 signal was

detected when cells were exposed to Ang II (Fig. 4B, panel *a*). Interestingly, a treatment of 15 min with another growth factor for VSMC, epidermal growth factor (EGF), which like Ang II induces the activation of AKT and ERK (see Fig. 4B, panels *c* and *d*, lane 6), failed to induce phosphorylation of p65 on Ser-536 thus demonstrating the specificity of the signaling cascades activated by Ang II and leading to p65 phosphorylation in VSMC. In addition to IKK α and β , RSK1 was recently shown to target Ser-536 of p65 (36). Since Ang II is a strong activator of the MEK-ERK-RSK signaling cascade in VSMC, we first verified if RSK was recruited by Ang II to induce phosphorylation of p65 on Ser-536. The use of pharmacological inhibitors that target specifically MEK1/2, namely PD98059 and UO126, completely abrogated Ang II-induced RSK1 activation in VSMC without affecting the specific phosphoserine 536 signal (Fig. 5A). Inhibition of the MEK-ERK-RSK signaling cascade for up to 1 h did not prevent the rapid induction neither the sustained phosphorylation of p65 on Ser-536 by Ang II (Fig. 5B). In order to verify the possible role of the IKK complex in Ang II-induced p65 phosphorylation on Ser-536, we next verified if the activation of the IKK complex followed a kinetic similar to the phosphoserine 536 signal. A detailed kinetics in VSMC revealed that the activation of the IKK complex by Ang II was rapid and sustained for at least 24 hours (Fig. 5C panel *a*). Interestingly, the activation of the IKK complex followed the same kinetic of phosphorylation of p65 on Ser-536 (Fig. 5C, panel *c*). As predicted, stimulation of the IKK complex by Ang II also resulted in an increase phosphotransferase activity towards the *in vitro* substrate GST-p65 (354-551) (see Supplemental Data, Fig. 3). Since IKK-induced p65 phosphorylation was previously shown to occur in the cytoplasm (51,52), we next addressed in which cellular compartments phosphorylation of p65 occurred in Ang II-treated cells. Figure 5D shows the presence of a strong inducible phosphoserine 536 signal that was predominantly detected in the cytoplasmic compartment. Interestingly, a significant amount was also observed in the nucleus. To further substantiate the hypothesis of a possible involvement of the IKK complex in Ang II-mediated p65 phosphorylation, we took advantage of a point mutant version of IKK β (IKK β K44A), which lacks the ATP binding site and therefore acts in a dominant negative fashion. When co-expressed with the AT1R in 293T cells, it totally prevented the phosphorylation of p65 by Ang II (Fig. 5E). In

order to directly ask whether the IKK β subunit of the IKK complex was responsible for the detected p65 phosphoserine 536 signal in Ang II-treated cells, we next used RNA silencing technology. Upon transfection of the indicated siRNA duplexes, the expression levels of IKK β was down regulated by 90% and correlated with a net decrease of the phosphoserine 536 signal in Ang II-treated cells (Fig. 5F). Silencing IKK β in VSMC did not however affect the phosphorylation of the ERK isoforms by Ang II. Altogether, these data demonstrate that the IKK β subunit of the IKK complex plays an essential role in Ser-536 phosphorylation of p65 by Ang II.

IKK β is a cytoplasmic kinase and the above results suggest that it is the cytoplasmic phosphorylation of p65 that trigger its nuclear accumulation possibly through a process involving loss of affinity for I κ B α without the requirement for its degradation (36). Consequently, to further substantiate the hypothesis of a dispensable role of the I κ B inhibitors in Ang II-induced nuclear accumulation of phosphorylated p65, VSMC were pre-treated with the proteasome inhibitor MG-132 and again a significant amount of phosphorylated p65 was found in the nucleus of Ang II-treated cells (see Supplemental Data Fig. 4).

Molecular characterization of AT1 receptor signaling to the IKK complex

Since we observed an important role of the IKK complex in the proinflammatory actions of Ang II, we next wanted to verify what might be the signaling pathways coupling the AT1R to the IKK complex. Using pharmacological as well as molecular approaches, we address the roles of the EGF receptor and the PI3-kinase-AKT pathway in Ang II-mediated IKK complex activation in VSMC. Figure 6A shows that pretreatment with the tyrosine kinase inhibitor AG1478, a selective EGFR kinase inhibitor that efficiently block the activation of ERK1 by Ang II ((41) and data not shown), did not antagonize the activation of the IKK complex. This observation is in agreement with an activation of the phosphotransferase activity of the IKK complex in rat VSMC overexpressing a dominant-negative version of EGFR (HERCD533) (42) (Fig. 6B). Inhibition of the PI3-kinase pathway by the use the specific

inhibitor LY294002 inhibited activation of AKT by Ang II (data not shown) but was also without any consequence on Ang II-induced activation of the IKK complex in VSMC (Fig. 6C). Together, these data show that AT1R-mediated transactivation of the EGFR and the PI3-kinase-AKT pathway are not involved in the induction of the IKK complex by Ang II in VSMC.

DISCUSSION

After primary injury of the vasculature, the inflammation response that follows is characterized by three key events: 1) increment of vascular permeability, 2) infiltration of inflammatory cells and 3) tissue repair and remodeling (for review see (16)). Through the induction of a repertoire of NF- κ B-regulated genes such as, IL-6, MCP-1, IL-8, RANTES, VCAM-1, and ICAM-1, it is now well appreciated that Ang II participates in these key events of the inflammatory response leading to the development of cardiovascular diseases like atherosclerosis (16). Whereas the pathways leading to NF- κ B activation following treatment with prototypical activators such as TNF- α , LPS or IL-1 β is well characterized, the molecular understanding of the signaling pathways that is involved in the coupling of G protein-coupled receptors (GPCR) such as AT1R or AT2R to NF- κ B are still unclear. The results presented in this report show that Ang II activates NF- κ B in cultured VSMC, and that, independently of I κ B α phosphorylation and I κ B α / β degradation (see Fig. 3). These observations strongly suggest that the classical pathway of NF- κ B activation is not triggered by Ang II in VSMC. Moreover, other mechanisms described as being responsible for Ang II-induced NF- κ B activation, namely p105 processing and tyrosine phosphorylation of I κ B α (24,48), are not observed in Ang II-treated VSMC. Instead, we now propose a new model where Ang II treatment leads to an AT1R-dependent activation of the IKK complex. The activated IKK complex then phosphorylates Ser-536 of p65 (see Fig. 7 for the detailed mechanism). The extent to which the present mechanism can account for the known pro-inflammatory action of Ang II in the cardiovascular system is unknown at the moment as other transcription factors are also involved in the pro-inflammatory

action of the peptide such as CREB and AP-1 (ATF-2/c-Jun) (53,54). However, p65 phosphorylation on Ser-536 has also been observed in Ang II-treated cultured adipocytes as well as in pressure-dependent activation of NF- κ B in arterial segments (55,56). Thus, a possible molecular link may exist between two known risk factors for the development of atherosclerosis, namely obesity and hypertension, for the activation of NF- κ B through p65 phosphorylation.

No degradation of I κ B α in Ang II-treated VSMC

Many studies have looked at I κ Bs degradation when VSMC are exposed to Ang II. Intriguingly, no studies have addressed if the canonical IKK complex was activated by Ang II. Using in vitro kinase assays, our report clearly demonstrates a rapid and sustained phosphotransferase activity of the IKK complex, which was mediated by the AT1R and dependent on the concentration of Ang II used (see Figs. 2 and 5C). In response to prototypical activators of NF- κ B, activation of the IKK complex normally leads to phosphorylation and degradation of I κ B α . Why then Ang II does not induce the degradation of I κ B α ? One possible scenario that might account for this observation is the recent observation demonstrating recruitment of β -arrestin proteins to I κ B α when cells are exposed to β 2 adrenergic receptors (57,58). Interestingly, this association between β -arrestin proteins and I κ B α was shown to abrogate TNF- α -induced I κ B α phosphorylation and degradation (57). Thus, experiments are underway to try to verify if the stimulation of VSMC with Ang II promotes the recruitment of β -arrestin proteins to I κ B α , a process that could explain the incapacity of Ang II to induce the degradation of I κ B α .

Phosphorylation of p65 by IKK β

A recent report by Zhang and colleagues demonstrated phosphorylation of p65 on Ser-536 in VSMC exposed to Ang II (40). Using the MEK 1/2 inhibitor U0126 as well as silencing RNA technology, they suggested that this was essentially occurring in a RSK-dependent manner. However, several observations from our study suggest a more important

contribution of the IKK complex in this process. First, our study clearly shows that the two MEK 1/2 inhibitors PD98059 and U0126, significantly abrogated the activation of RSK by Ang II without affecting the phosphoserine 536 signal (Fig. 5A and B). Second, the kinetic of the IKK complex activation follows the same kinetic as p65 Ser-536 phosphorylation (Fig. 5C). Third, it was shown that IKK β -dependent phosphorylation of Ser-536 of p65 occurs in the cytoplasm (51,52), similar to what we observed in Ang II-treated cells (Fig. 5D), whereas RSK-dependent phosphorylation of p65 happens exclusively in the nuclear compartment (36). Fourth, overexpression of a dominant negative version of IKK α completely abrogated Ang II-induced phosphorylation of p65 on Ser-536 in 293T cells expressing the AT1R (Fig. 5E). Fifth, downregulation of IKK β expression by siRNA technology has allowed us to conclude that activation of the IKK complex is responsible for the detected phosphoserine 536 signal observed in Ang II-treated VSMC (Fig. 5F). We do not have an explanation for the difference between the report by Zhang and colleagues (40) and this study. Notably, the two MEK1/2 inhibitors UO126 and PD98059 had no effect on the phosphorylation of p65 on Ser-536 by Ang II in VSMC derived from Sprague-Dawley or Wistar-Kyoto rats (data not shown).

Pleitropic roles for the phosphorylation of p65 on Ser-536

Although the exact roles of this covalent modification of p65 are not precisely characterized, it seems to affect several aspects of NF- κ B signaling. Thus, Ser-536 phosphorylation of p65 has been implicated in many nuclear effects cumulating to activation of NF- κ B target genes (37,38). Through an increased association of a phosphomimetic form of p65 with TAFII31 (37), and the role of this phosphoacceptor site in recruiting p300 (38), it has become clear that phosphorylation of p65 may play a major role in NF- κ B-mediated transcriptional response. Ser-536 phosphorylation of p65 could also affect its ability to associate with I κ B α inhibitor. Notably, p53 was recently reported to induce NF- κ B activity without I κ B α degradation (36) and a model has been proposed to explain the enhanced nuclear localization and increased DNA binding of NF- κ B. In this model, p65 phosphorylated at Ser-536 loses its affinity of I κ B α and alters the basal

nucleocytoplasmic shuttling properties of the NF- κ B-I κ B α complex favoring nuclear retention. Based on this model, our data suggest that a subpopulation of p65 phosphorylated on Ser-536 loose their affinity for I κ B α and accumulate into the nuclear compartment (see Fig. 5D and Supplemental Data Fig. 4). Finally, phosphorylation of p65 on Ser-536 also triggers its rapid turnover in the nucleus (39). Interestingly, we also noticed a prolonged nuclear signal of p65 phosphorylated on Ser-536 in the presence of MG132 (compare Figs. 5D and Supplemental Data Fig. 4). Thus, it is likely that the induction of phosphorylation of p65 by Ang II regulates the overall NF- κ B response through both positive inputs (increase in nuclear accumulation and p65 transcriptional activity) as well as negative inputs (increase in p65 turnover).

AT1R coupling to the IKK complex

The mechanisms by which GPCR are able to transduce a signal from the cellular environment into the cytoplasm have been studied for decades. Albeit the essential roles of heterotrimeric G proteins in this process, it has now become well appreciated that GPCR uses tyrosine kinase receptors in order to activate multiple signaling pathways, most of which influencing cell growth and surviving. Thus, for AT1R, it has been clearly established that transactivation of the EGFR is essential to activation of the Raf/MEK/ERK as well as PI3-kinase/PDK/AKT modules (42,59,60). In addition to ERKs and AKT, activation of NF- κ B is also linked to cellular growth and surviving, and with the observations that both PDK1 and AKT can act as IKK-activating kinases (61,62), it was therefore important to address if EGFR transactivation and the PI3-kinase/PDK/AKT module were involved in the activation of the IKK complex by Ang II. A pharmacological approach using EGFR kinase and PI3-kinase inhibitors and a molecular approach using VSMC overexpressing a dominant negative version of EGFR have allowed us to conclude that neither EGFR transactivation nor the PI3-kinase pathway were involved in AT1R-mediated activation of the IKK complex.

In conclusion, our data suggest that AT1R is coupled to a nonclassical mode of activation of NF- κ B in VSMC involving an IKKcomplex/p65 Ser-536 signaling cascades.

Understanding the role of inflammation in atherosclerosis might pave the way for the development of new therapeutics to treat this cardiovascular disease such as IKK α inhibitors (28). While our paper was submitted, a related paper was published (Zhang, L., Cheng, J., Ma, Y., Thomas, W., Zhang, J., and Du, J. 2005. *Circ. Res.* Oct 13 ; Epub ahead of print), indicating a role of IKK β in p65 phosphorylation by Ang II. Acknowledgments- We thanks Drs. Sylvain Meloche and John Hiscott for reagents used in this study. We thank also Dr. Guy Servant for helpful discussions.

FOOTNOTES

The abbreviations used are: Ang II, angiotensin II; I κ B kinase, IKK; RANTES, regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted; IP-10, interferon-gamma-inducible protein 10; TBK1, Tank-binding kinase 1; GPCR, G protein-coupled receptor; EGFR, epidermal growth factor receptor; VSMC, vascular smooth muscle cells; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; EGF, epidermal growth factor, IL-6, interleukin-6; siRNA, silencing RNA; AT1R, Ang II AT1 receptor.

This work was supported by a research grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to M.S. M.S. is a recipient from a Rx&D/CIHR Health Research Foundation Career Awards in Health Sciences. P.M. is a CIHR scholar. A.D. and S.P.G are recipients of a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). J.F.C. holds a studentship from Rx&D/CIHR.

REFERENCES

1. Maas, R., and Boger, R. H. (2003) *Atheroscler Suppl* 4(4), 5-17
2. Alderman, M. H., Madhavan, S., Ooi, W. L., Cohen, H., Sealey, J. E., and Laragh, J. H. (1991) *N. Engl. J. Med.* 324, 1098-1104
3. Cambien, F., Poirier, O., Lecerf, L., Evans, A., Cambou, J. P., Arveiler, D., Luc, G., Bard, J. M., Bara, L., Ricard, S., and et al. (1992) *Nature* 359(6396), 641-644.
4. Meade, T. W., Cooper, J. A., and Peart, W. S. (1993) *N. Engl. J. Med.* 329, 616-619
5. Alderman, M. H. (1995) *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 4, 201-203
6. Kon, V., and Jabs, K. (2004) *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13(3), 291-297
7. De Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W., and Unger, T. H. (2000) *Pharmacol. Rev.* 52, 415-472
8. Aberg, G., and Ferrer, P. (1990) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 15, S65-S72
9. Chobanian, A. V., Haudenschild, C. C., Nickerson, C., and Hope, S. (1990) *Hypertension* 12, 327-331
10. Chobanian, A. V., Haudenschild, C. C., Nickerson, C., and Hope, S. (1992) *Hypertension* 20, 473-477
11. Furukawa, Y., Matsumori, A., Hirozane, T., and Sasayama, S. (1996) *Circulation* 93, 333-339
12. Wassmann, S., Czech, T., Van Eickels, M., Fleming, I., Bohm, M., and Nickenig, G. (2004) *Circulation*

13. Schelling, P., Fischer, H., and Ganten, D. (1991) *J. Hypertens.* 9, 3-15
14. Pratt, R. E., and Dzau, V. J. (1993). In: Raizada, M. K., Phillips, M. I., and Sumners, C. (eds). *Cellular and molecular biology of the renin-angiotensin system*, CRC Press, Inc, Boca Raton
15. Méloche, S., Pelletier, S., and Servant, M. J. (2000) *Mol Cell Biochem* 212(1-2), 99-109.
16. Suzuki, Y., Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V., and Egido, J. (2003) *Int J Biochem Cell Biol* 35(6), 881-900
17. Brasier, A. R., Recinos, A., 3rd, and Eledrisi, M. S. (2002) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(8), 1257-1266
18. Griendling, K. K., Ushio-Fukai, M., Lassegue, B., and Alexander, R. W. (1997) *Hypertension* 29(1 Pt 2), 366-373.
19. Pahl, H. L. (1999) *Oncogene* 18(49), 6853-6866
20. Kranzhofer, R., Schmidt, J., Pfeiffer, C. A., Hagl, S., Libby, P., and Kubler, W. (1999) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(7), 1623-1629.
21. Ortego, M., Bustos, C., Hernandez-Presa, M. A., Tunon, J., Diaz, C., Hernandez, G., and Egido, J. (1999) *Atherosclerosis* 147(2), 253-261.
22. Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Konig, S., Wittig, B., and Egido, J. (2000) *Circ Res* 86(12), 1266-1272.
23. Funakoshi, Y., Ichiki, T., Shimokawa, H., Egashira, K., Takeda, K., Kaibuchi, K., Takeya, M., Yoshimura, T., and Takeshita, A. (2001) *Hypertension* 38(1), 100-104.
24. Han, Y., Runge, M. S., and Brasier, A. R. (1999) *Circulation Research* 84, 695-703

25. Pueyo, M. E., Gonzalez, W., Nicoletti, A., Savoie, F., Arnal, J. F., and Michel, J. B. (2000) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(3), 645-651.
26. Wolf, G., Wenzel, U., Burns, K. D., Harris, R. C., Stahl, R. A., and Thaiss, F. (2002) *Kidney Int* 61(6), 1986-1995
27. Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2004) *Genes Dev* 18(18), 2195-2224
28. Karin, M., Yamamoto, Y., and Wang, Q. M. (2004) *Nat Rev Drug Discov* 3(1), 17-26
29. Lin, R., Beauparlant, P., Makris, C., Meloche, S., and Hiscott, J. (1996) *Mol.Cell.Biol.* 16, 1401-1409
30. Chen, L. F., and Greene, W. C. (2004) *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(5), 392-401
31. Viatour, P., Merville, M. P., Bours, V., and Chariot, A. (2005) *Trends Biochem Sci* 30(1), 43-52
32. Zhong, H., Voll, R. E., and Ghosh, S. (1998) *Mol Cell* 1(5), 661-671
33. Vermeulen, L., De Wilde, G., Van Damme, P., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2003) *Embo J* 22(6), 1313-1324
34. Wang, D., Westerheide, S. D., Hanson, J. L., and Baldwin, A. S., Jr. (2000) *J Biol Chem* 275(42), 32592-32597
35. Sakurai, H., Chiba, H., Miyoshi, H., Sugita, T., and Toriumi, W. (1999) *J Biol Chem* 274(43), 30353-30356
36. Bohuslav, J., Chen, L. F., Kwon, H., Mu, Y., and Greene, W. C. (2004) *J Biol Chem* 279(25), 26115-26125
37. Buss, H., Dorrie, A., Schmitz, M. L., Hoffmann, E., Resch, K., and Kracht, M. (2004) *J Biol Chem*

38. Chen, L. F., Williams, S. A., Mu, Y., Nakano, H., Duerr, J. M., Buckbinder, L., and Greene, W. C. (2005) *Mol Cell Biol* 25(18), 7966-7975
39. Lawrence, T., Bebien, M., Liu, G. Y., Nizet, V., and Karin, M. (2005) *Nature* 434(7037), 1138-1143
40. Zhang, L., Ma, Y., Zhang, J., Cheng, J., and Du, J. (2005) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(6), 1148-1153
41. Gravel, S. P., and Servant, M. J. (2005) *J Biol Chem* 280(9), 7477-7486
42. Voisin, L., Foisy, S., Giasson, E., Lambert, C., Moreau, P., and Meloche, S. (2002) *Am J Physiol Cell Physiol* 283(2), C446-455
43. Kwon, H., Pelletier, N., DeLuca, C., Genin, P., Cisternas, S., Lin, R., Wainberg, M. A., and Hiscott, J. (1998) *Journal of Biological Chemistry* 273, 7431-7440
44. Sun, Z., Arendt, C. W., Ellmeier, W., Schaeffer, E. M., Sunshine, M. J., Gandhi, L., Annes, J., Petrzilka, D., Kupfer, A., Schwartzberg, P. L., and Littman, D. R. (2000) *Nature* 404(6776), 402-407
45. Sano, M., Fukuda, K., Sato, T., Kawaguchi, H., Suematsu, M., Matsuda, S., Koyasu, S., Matsui, H., Yamauchi-Takahara, K., Harada, M., Saito, Y., and Ogawa, S. (2001) *Circ Res* 89(8), 661-669
46. Jiang, B., Xu, S., Hou, X., Pimentel, D. R., and Cohen, R. A. (2004) *J Biol Chem* 279(19), 20363-20368
47. Bonizzi, G., and Karin, M. (2004) *Trends Immunol* 25(6), 280-288
48. Wu, L., Iwai, M., Li, Z., Shiuchi, T., Min, L. J., Cui, T. X., Li, J. M., Okumura, M., Nahmias, C., and Horiuchi, M. (2004) *Mol Endocrinol* 18(3), 666-678

49. Anest, V., Hanson, J. L., Cogswell, P. C., Steinbrecher, K. A., Strahl, B. D., and Baldwin, A. S. (2003) *Nature* 423(6940), 659-663
50. Yamamoto, Y., Verma, U. N., Prajapati, S., Kwak, Y. T., and Gaynor, R. B. (2003) *Nature* 423(6940), 655-659
51. Sakurai, H., Suzuki, S., Kawasaki, N., Nakano, H., Okazaki, T., Chino, A., Doi, T., and Saiki, I. (2003) *J Biol Chem* 278(38), 36916-36923
52. Mattioli, I., Sebald, A., Bucher, C., Charles, R. P., Nakano, H., Doi, T., Kracht, M., and Schmitz, M. L. (2004) *J Immunol* 172(10), 6336-6344
53. Schmidt-Ott, K. M., Kagiya, S., and Phillips, M. I. (2000) *Regul Pept* 93(1-3), 65-77.
54. Funakoshi, Y., Ichiki, T., Ito, K., and Takeshita, A. (1999) *Hypertension* 34(1), 118-125.
55. Lemarie, C. A., Esposito, B., Tedgui, A., and Lehoux, S. (2003) *Circ Res* 93(3), 207-212
56. Skurk, T., van Harmelen, V., and Hauner, H. (2004) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(7), 1199-1203
57. Gao, H., Sun, Y., Wu, Y., Luan, B., Wang, Y., Qu, B., and Pei, G. (2004) *Mol Cell* 14(3), 303-317
58. Witherow, D. S., Garrison, T. R., Miller, W. E., and Lefkowitz, R. J. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(23), 8603-8607
59. Eguchi, S., and Inagami, T. (2000) *Regul Pept* 91(1-3), 13-20.
60. Shah, B. H., Neithardt, A., Chu, D. B., Shah, F. B., and Catt, K. J. (2006) *J Cell Physiol* 206(1), 47-57

61. Romashkova, J. A., and Makarov, S. S. (1999) *Nature* 401(6748), 86-90.
62. Tanaka, H., Fujita, N., and Tsuruo, T. (2005) *J Biol Chem*

FIGURE LEGENDS

Figure 1. A NF- κ B superrepressor antagonizes Ang II-induced *IL-6* transcription in VSMC. A) Production of stable cell lines expressing NF- κ B superrepressor. VSMC were infected with a retroviral construct expressing the NF- κ B superrepressor (I κ B α 2N Δ 4) or encoding for the neomycin cassette only (Neo). Following selection of a stable population, clones were isolated and analyzed for the transgene expression by Western blot analysis. B) The expression of the NF- κ B superrepressor significantly abrogates Ang II-induced *IL-6* transcription. Quiescent Neo and I κ B α 2N Δ 4 clones were stimulated for different times with 100 nM Ang II. Total RNA was isolated and subjected to RT-PCR analysis with primers directed against rat *IL-6* and *MCP-1* transcripts. Normalization was accomplished using primers against the *RPL32* house keeping gene.

Figure 2. Activation of the canonical IKK complex in Ang II-treated VSMC. A) Quiescent VSMC were stimulated with 100 nM Ang II for different times or with 20 ng/ml TNF- α for 10 min. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoprecipitation with anti-IKK γ antibody. The phosphotransferase activity of the immunoprecipitates was assayed as described in Experimental Procedures using GST-I κ B α as substrate. After the kinase assay, reactions were run on SDS-gels, dried and exposed to the TYPHOON image analyzer for quantification. B) The activation of the IKK complex is dose-dependent and mediated by the AT1R. Quiescent VSMC were pretreated for 30 min with 1 μ M Irbezartan or 0.01% vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO) and then stimulated with the indicated concentrations of Ang II for 5 min. Whole cell extracts were prepared and subjected to in vitro kinase assay as described in A. C) IKK complex in vitro kinase assay is specific for

Ser32/36 of I κ B α . Quiescent VSMC were stimulated for the indicated times with 100 nM Ang II. Whole cell extracts were prepared and the immunoprecipitated IKK complex was either incubated in the presence of GST-I κ B α wt or GST-I κ B α 2N in which the two phosphoacceptor sites were mutated to alanine. After the kinase assay, reactions were run on SDS-gels, dried and exposed to the TYPHOON image analyzer for quantification.

Figure 3. Ang II does not lead to N-terminal phosphorylation of I κ B α nor its degradation in VSMC. A) Quiescent VSMC were stimulated for different periods of time with 100 nM Ang II or 20 ng/ml TNF- α . Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblot analysis using anti-I κ B α antibody (panel *a*), anti-phospho-I κ B α (Ser32) antibody (panel *b*), and anti-I κ B β antibody (panel *c*). Normalization of the protein samples was conducted using anti- β -actin antibody (panel *d*). B) Turnover of I κ B α . Quiescent VSMC were pulse-labeled with [³⁵S]methionine/[³⁵S]cysteine for 60 min after which the medium was changed to fresh medium containing an excess of non-radiolabeled methionine/cysteine and 100 nM Ang II or 20 ng/ml TNF- α . At different times, cell extracts were prepared and subjected to immunoprecipitation with anti-I κ B α antibody. After extensive washing, the immunoprecipitated proteins were separated by electrophoresis on 12% acrylamide gels and analyzed by fluorography using a TYPHOON image analyzer.

Figure 4. Ang II-induced rapid phosphorylation of p65 in VSMC. A) *in vivo* phosphorylation of p65. Quiescent VSMC were pulse-labeled with [³²P] orthophosphate for 5 hours after which the labeled cells were stimulated with 100 nM Ang II or 20 ng/ml TNF- α . At different times, cells extracts were prepared and subjected to immunoprecipitation with anti-p65 antibody. After extensive washing, the immunoprecipitated proteins were separated by electrophoresis on 10% acrylamide gels and transferred to a PVDF membrane. The membrane was then exposed to a gel documentation device for imaging and

quantification (TY) or revealed by immunoblotting (IB) with an anti-p65 antibody to confirm equal amount of immunoprecipitated proteins. B) Ser-536 phosphorylation of p65 by Ang II. Quiescent VSMC were stimulated for the indicated times with 100 nM Ang II, 20 ng/ml TNF- α and 100 ng/ml EGF. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblotting analysis using anti-phospho-p65 (Ser536) antibody (*a*), anti-p65 antibody (*b*), anti-phospho-AKT (Ser473) antibody (*c*), and anti-phospho-ERK1/2 (Thr202-Tyr204) antibody (*d*). Membranes were stripped between each blotting experiment.

Figure 5. Ang II-induced Ser-536 phosphorylation of p65 is dependent of IKK β . A) Pharmacological inhibition of MEK blocks RSK activation by Ang II but not phosphorylation of p65 on Ser-536. Quiescent VSMC were pretreated for 30 min with 30 μ M PD98049, 10 μ M U0126, or 0.01% DMSO and then stimulated with 100 nM Ang II for 10 min. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblot analysis using anti-phospho-p65 (Ser536) antibody (*upper panel*), anti-p65 antibody (*middle panel*), and anti-phospho-RSK (Ser380) antibody (*lower panel*). Membranes were stripped between each blotting experiment. B) Sustained inhibition of the MEK-ERK signaling cascade does not inhibit phosphorylation of p65 on Ser-536 by Ang II. Quiescent VSMC were pretreated for 30 min with 10 μ M U0126, or 0.01% DMSO and then stimulated with 100 nM Ang II for the indicated times. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblot analysis using anti-phospho-p65 (Ser536) (panel *a*), anti-p65 (panel *b*), anti-phospho-ERK1/2 (Thr202-Tyr204) (panel *c*) or anti-phospho-RSK (panel *d*) antibodies. C) The kinetic of Ser-536 phosphorylation of p65 paralleled the activation of the IKK complex. Quiescent VSMC were stimulated for the indicated times with Ang II. Whole cell extracts were prepared and subjected to IKK complex kinase assay (*a*) as described in Fig. 2. For immunoblotting (lower panel), the upper part of the gel was probed with an anti-IKK β antibody to confirm equal amounts of the immunoprecipitated kinase complex (*b*). WCE were also analyzed by immunoblotting using anti-phospho-p65 (Ser536) antibody (*c*) and anti-p65 antibody (*d*). Membranes were stripped between each blotting experiment. D) Ang

II treatment leads to phosphorylation of p65 on Ser-536 in the cytoplasm. Quiescent VSMC were stimulated for the indicated periods of time with Ang II. Cytoplasmic and nuclear extracts were prepared and analyzed by immunoblotting using anti-phospho-p65 (Ser536) antibody and anti-p65. The purity of the nuclear fractions was demonstrated by the virtual exclusion of p105. Using a higher sensitivity setting on the documentation device allowed us to better appreciate the presence of p65 phosphorylated on Ser-536 in the nucleus (lower right panel). E) Overexpression of a dominant negative version of IKK β in 293T abrogates the phosphorylation of p65 on Ser-536 by Ang II. 293T cells were cotransfected with AT1R in the presence of either pFlag-IKK β (K44A) or the vector alone. 30h posttransfection, cells were incubated in serum free medium for the next 18h before stimulation with Ang II (100 nM) for the indicated periods of time. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblot analysis using anti-phospho-p65 (Ser536) antibody and anti-Flag antibody as indicated. F) Reducing the expression level of IKK β inhibits the phosphorylation of p65 on Ser-536 by Ang II. VSMC were transfected with a siCONTROL non-targeting silencing RNA (Control) or two different RNA duplexes designed to specifically target IKK β as indicated. 24 h post-transfection, cells were incubated in serum-free medium for 48 h and then stimulated with Ang II for the indicated time. Whole cell extracts were prepared and analyzed by immunoblotting using the indicated antibodies. Membranes were stripped between each blotting experiment.

Figure 6. Activation of the IKK complex by Ang II is independent of EGFR transactivation and the PI3-kinase pathway. A) Quiescent VSMC were pretreated for 30 min with 250 nM AG1478, or 0.01% DMSO and then stimulated for 10 min with 100 nM Ang II as indicated. In vitro IKK complex kinase assay was measured as described in Fig. 2. B) Quiescent parental (wt) and HERCD533 (mut) cells were stimulated with 100 nM Ang II for the indicated times and the phosphotransferase activity of the IKK complex was assayed as described above. C) Quiescent VSMC were pretreated for 30 min with 30 μ M LY294002, or 0.01% DMSO and then stimulated for 10 min with 100 nM Ang II. An IKK complex kinase assay was conducted as above.

Figure 7. Proposed model for the activation of NF- κ B by Ang II in

VSMC. Following binding to AT1R, Ang II induces the transactivation of the EGFR which then transmits downstream signals to two different kinase modules: the Raf/MEK/ERK and the PI3-kinase/PDK/AKT modules (42,59,60). These signaling cascades are not involved in the activation of the canonical IKK complex by Ang II. Activated IKK complex is likely not able to engage I κ B α because of the possible recruitment of β arrestin to the latter (57,58). Instead, the IKK complex induces the phosphorylation of p65 at Ser-536 in a complex formed of I κ B α /p50/p65 in the cytoplasm (52). This complex shuttle in and out from the nucleus. A subpopulation of p65 phosphorylated at Ser-536 losses its affinity for I κ B α (36) thereby allowing a significant nuclear accumulation of p65 and engagement of the latter with coactivators (CBP/p300) (38) to κ B-response element found on NF- κ B-regulated genes. Phosphorylation of p65 on Ser-536 could also be involved in the increase turnover of the protein (39) thus regulating the overall NF- κ B response.

Supplemental Data : Figure 1. Increase DNA binding activity in VSMC exposed to Ang II. Quiescent VSMC were stimulated for different periods of time with 100 nM Ang II. Nuclear extracts were prepared and subjected to EMSA analysis. The use of an anti-p50 antibody supershifted (SS) whereas p65 antibody inhibited the formation of the specific NF- κ B signal possibly by competing with the binding of the I κ B probe to p65.

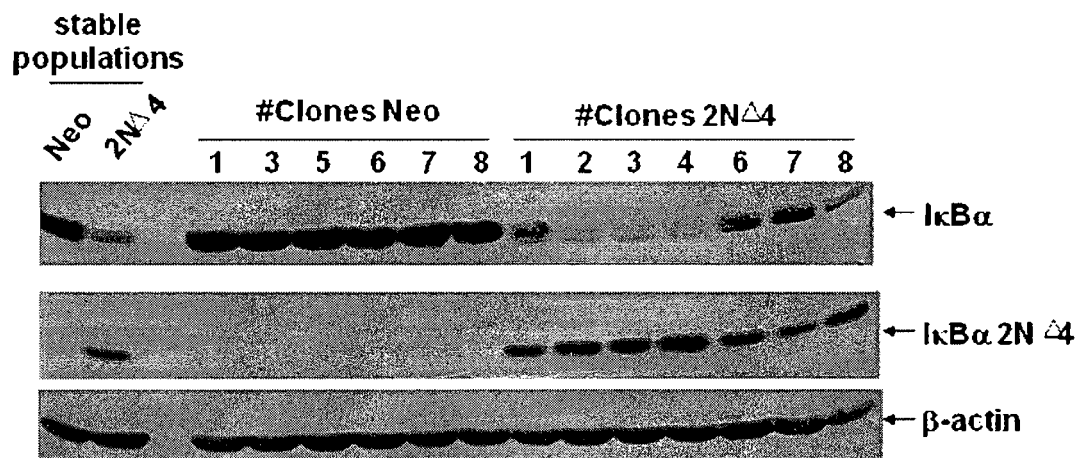
Supplemental Data: Figure 2. A) Ang II does not lead to phosphorylation of I κ B α on tyrosine residues. Quiescent VSMC were stimulated for different periods of time with 100 nM Ang II or 0.5 mM pervanadate, a tyrosine phosphatase inhibitor. Whole cell extracts (500 μ g) were prepared and subjected to immunoprecipitation with an anti-I κ B α antibody. After extensive washing, the immunoprecipitated proteins were separated by electrophoresis on 12% acrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes, which were then probed with an anti-phosphotyrosine antibody (upper panel). The membrane was stripped and reprobed with an anti-I κ B α antibody (lower panel). **B) No processing of p105**

is observed in Ang II-treated VSMC. Quiescent VSMC were stimulated for different periods of time with 100 nM Ang II. Endogenous p105 and p50 proteins were detected in WCE (50 μ g) by immunoblotting using anti-p105/p50 antibody. The membrane was stripped and reprobed with an anti-I κ B α antibody (lower panel).

Supplemental Data: Figure 3. In vitro phosphorylation of the TAD domain of p65 by the IKK complex. Quiescent VSMC were pretreated for 30 min with 1 μ M Irbezartan (lane 5) or 0.01% vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO) (lanes 1 to 4) and then stimulated with 100 nM Ang II for the indicated periods of time (lanes 1 to 5) or with 20 ng/ml TNF- α for 10 min (lane 7). Whole cell extracts were prepared and the immunoprecipitated IKK complex was incubated in the presence of GST-p65 (354-551). After the kinase assay, reactions were run on SDS-gels, dried and exposed to the TYPHOON image analyzer.

Supplemental Data: Figure 4. Ang II treatment leads to nuclear accumulation of phosphorylated p65 in the presence of MG-132. Quiescent VSMC were pre-treated with 25 μ M MG-132 for 30 min and then stimulated for the indicated periods of time with Ang II. Cytoplasmic and nuclear extracts were prepared and analyzed by immunoblotting using anti-phospho-p65 (Ser536) antibody and anti-p65. The purity of the different fractions was verified by the presence of Lamin A/C and p105 in the nuclear and cytoplasmic fractions respectively.

A



B

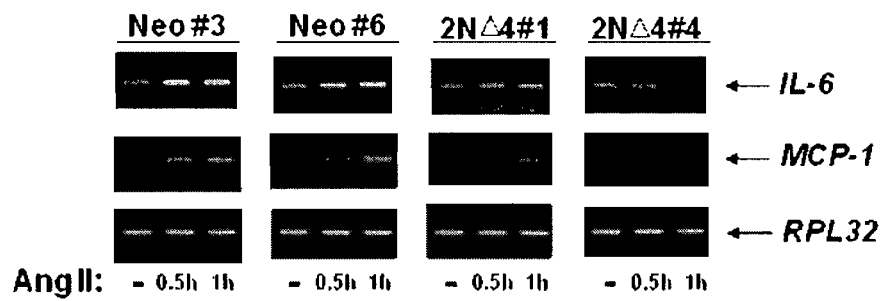
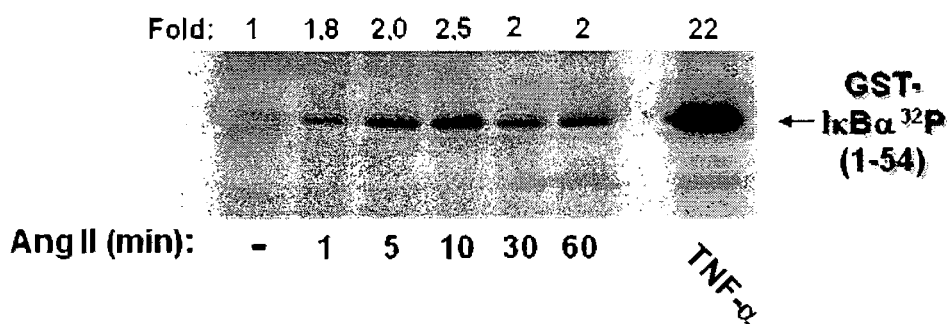
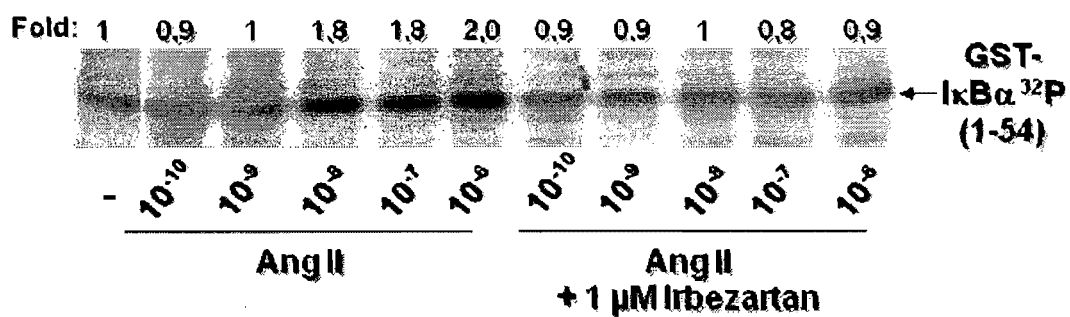


Figure 1

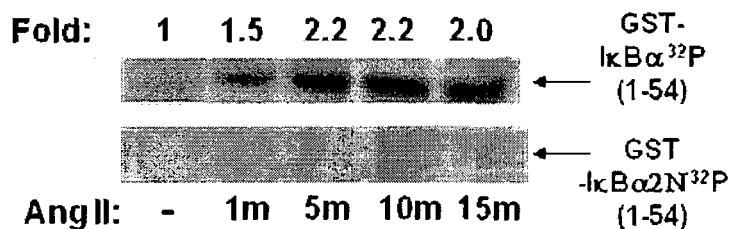
A



B



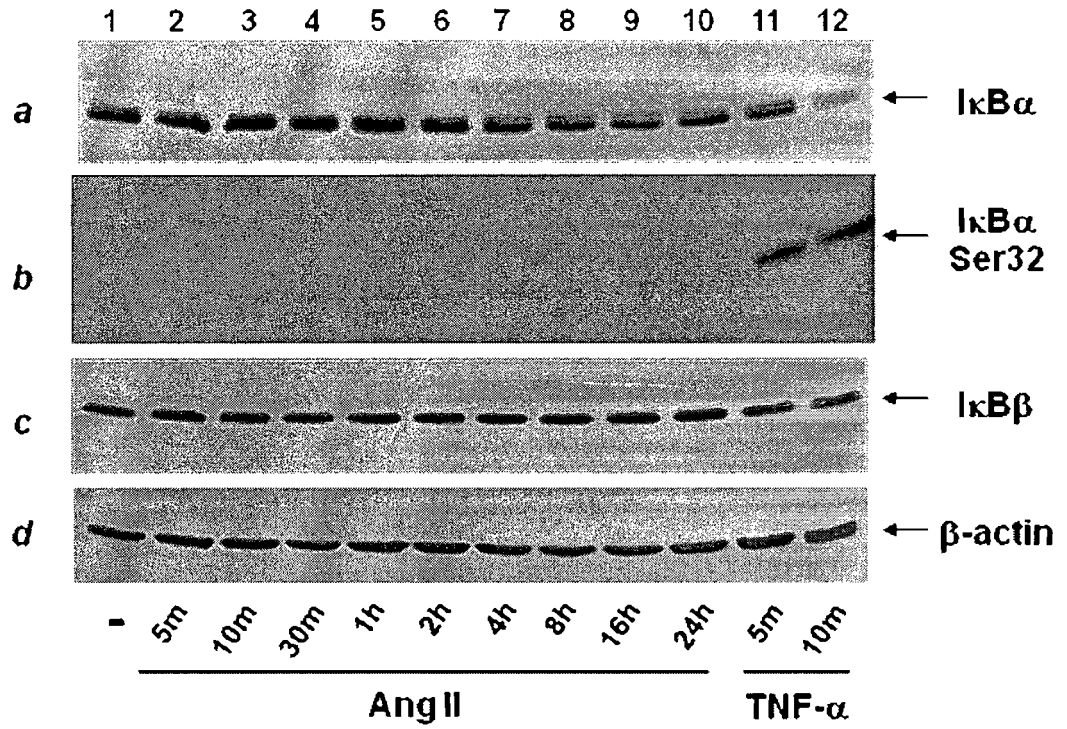
C



GST-I κ B α wt (1-55): 21-KKGRLLDDRHD**S**GLD**S**MKDEEYEQMVKELQEIRLE-55
 GST-I κ B α 2N (1-55): 21-KKGRLLDDRHD**A**GLD**A**MKDEEYEQMVKELQEIRLE-55

Figure 2

A



B

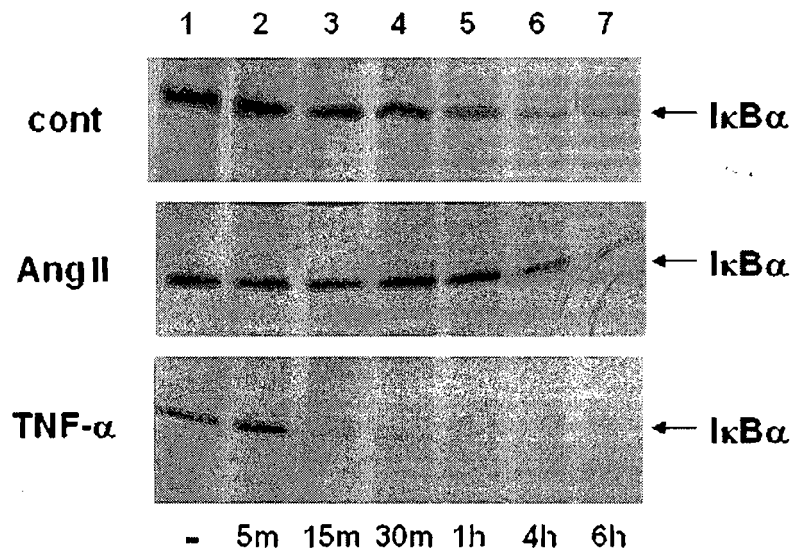
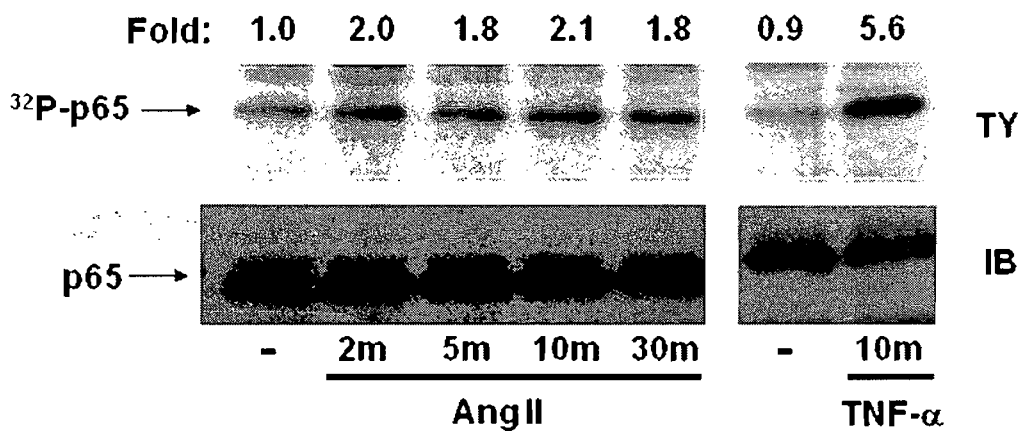


Figure 3

A



B

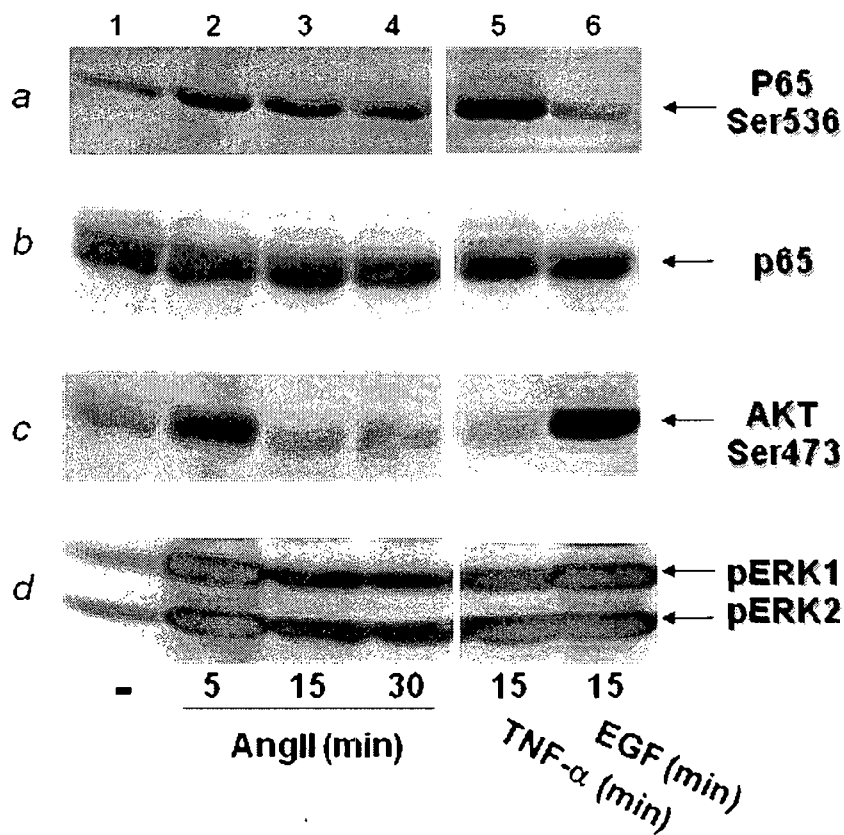


Figure 4

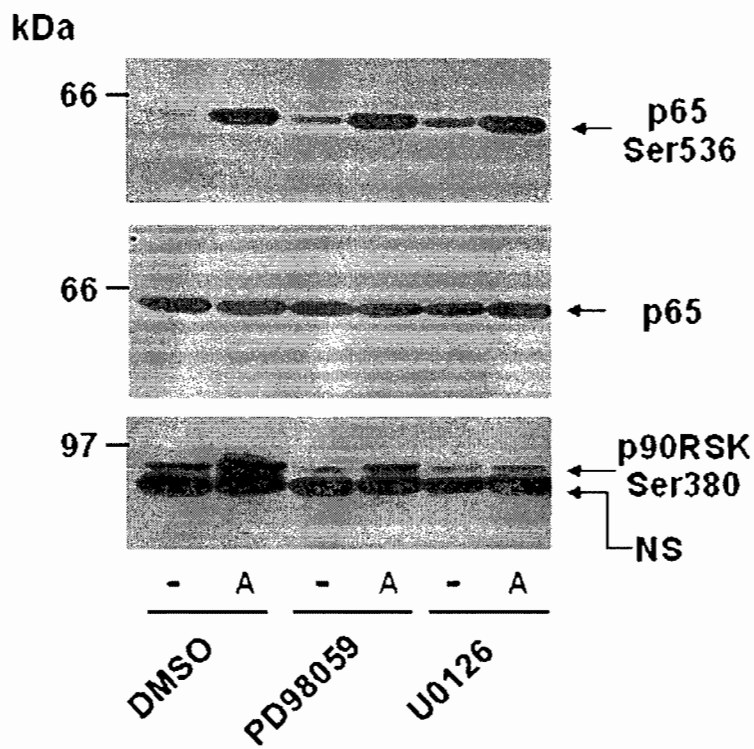
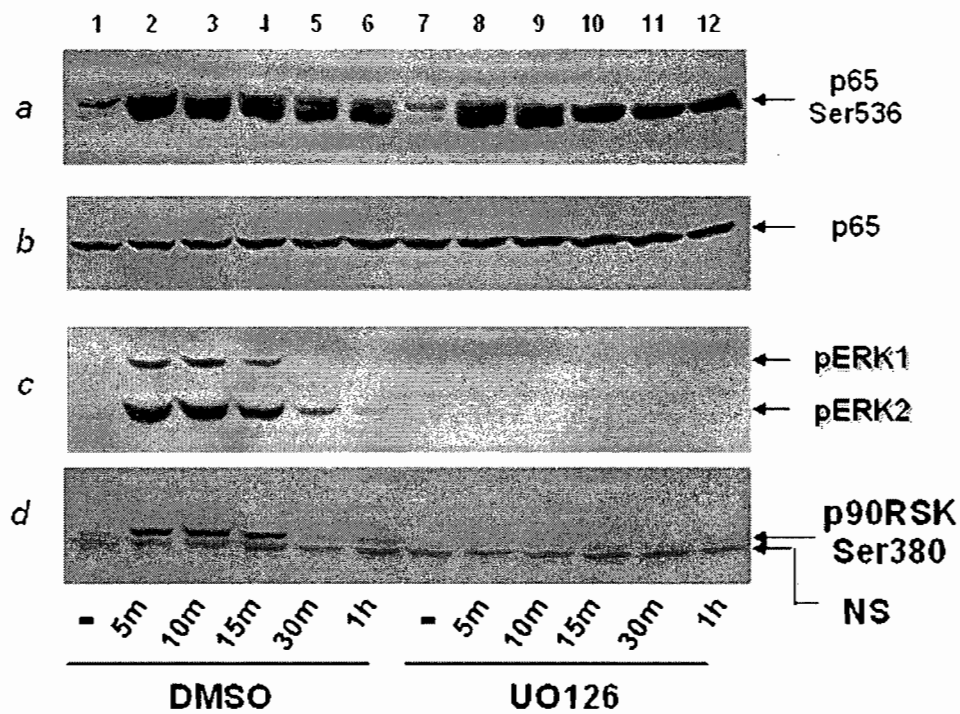
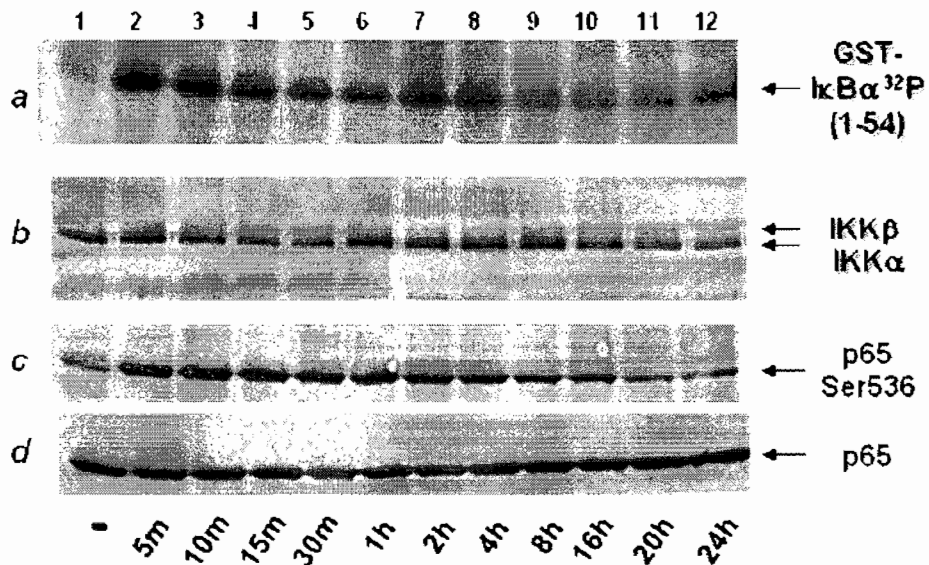
A**B**

Figure 5

C



D

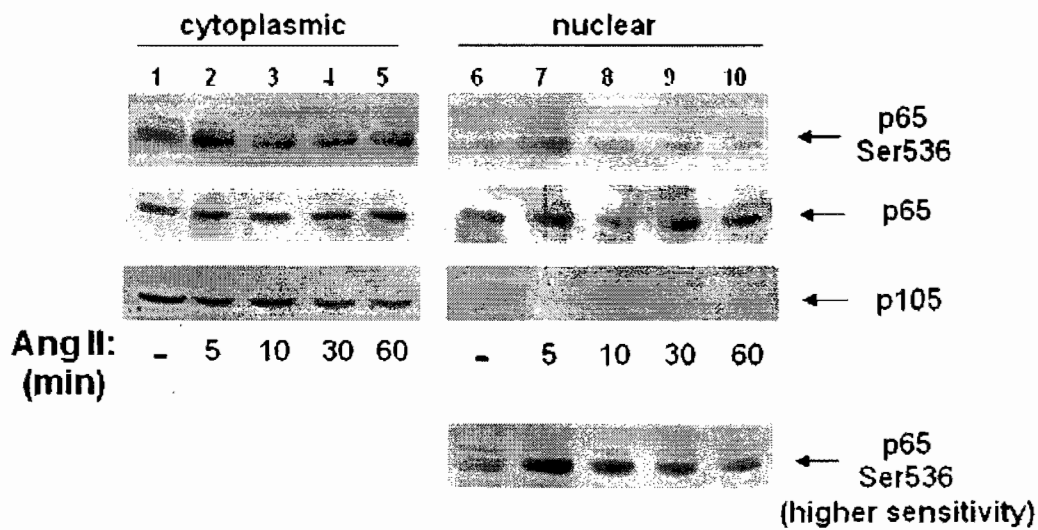


Figure 5

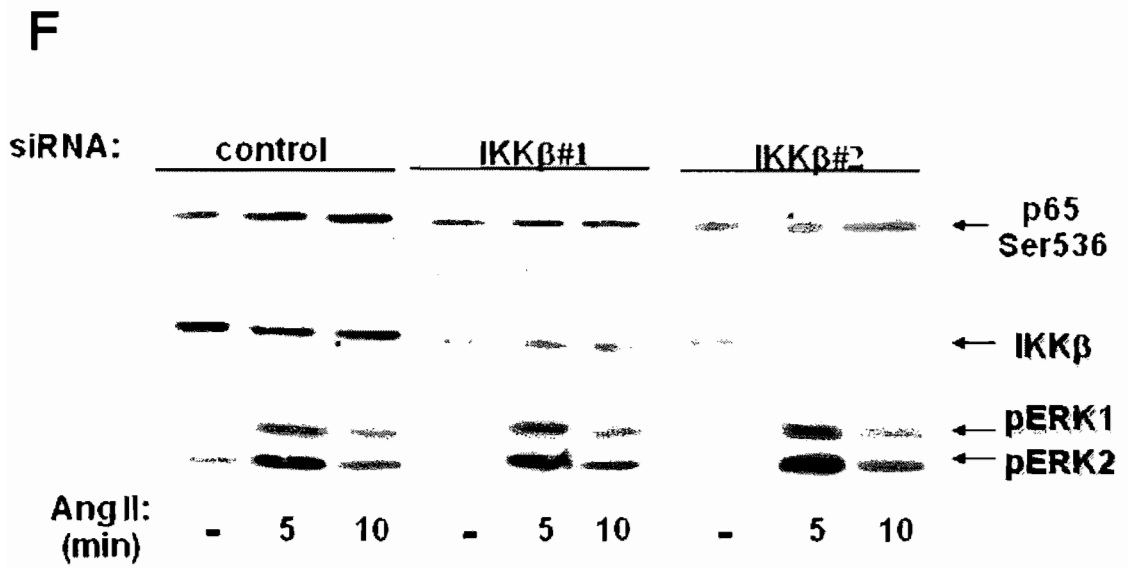
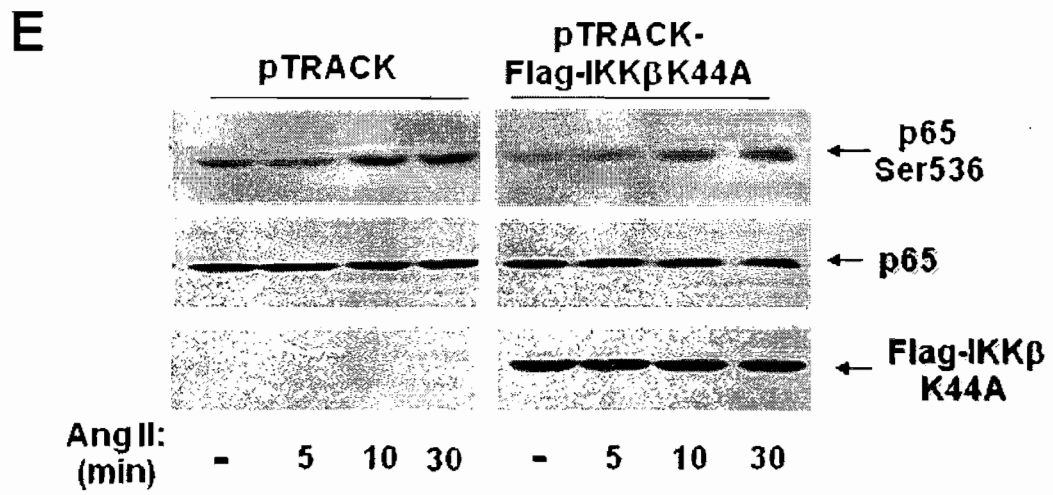
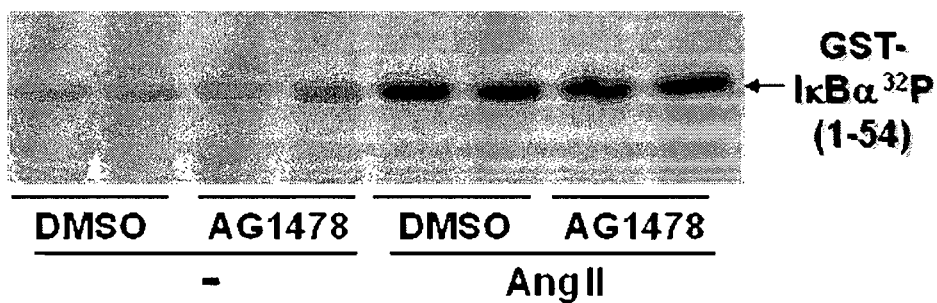
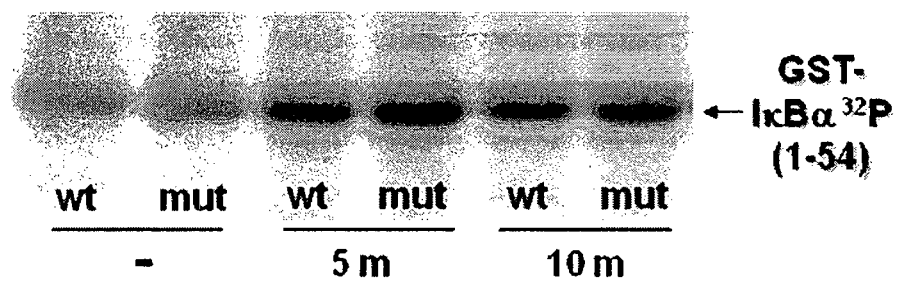


Figure 5

A



B



C

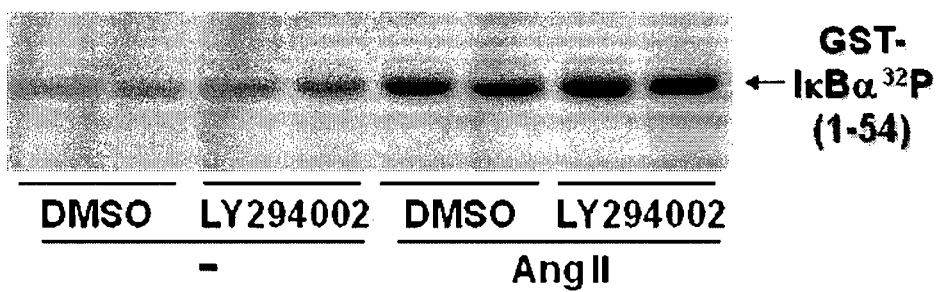
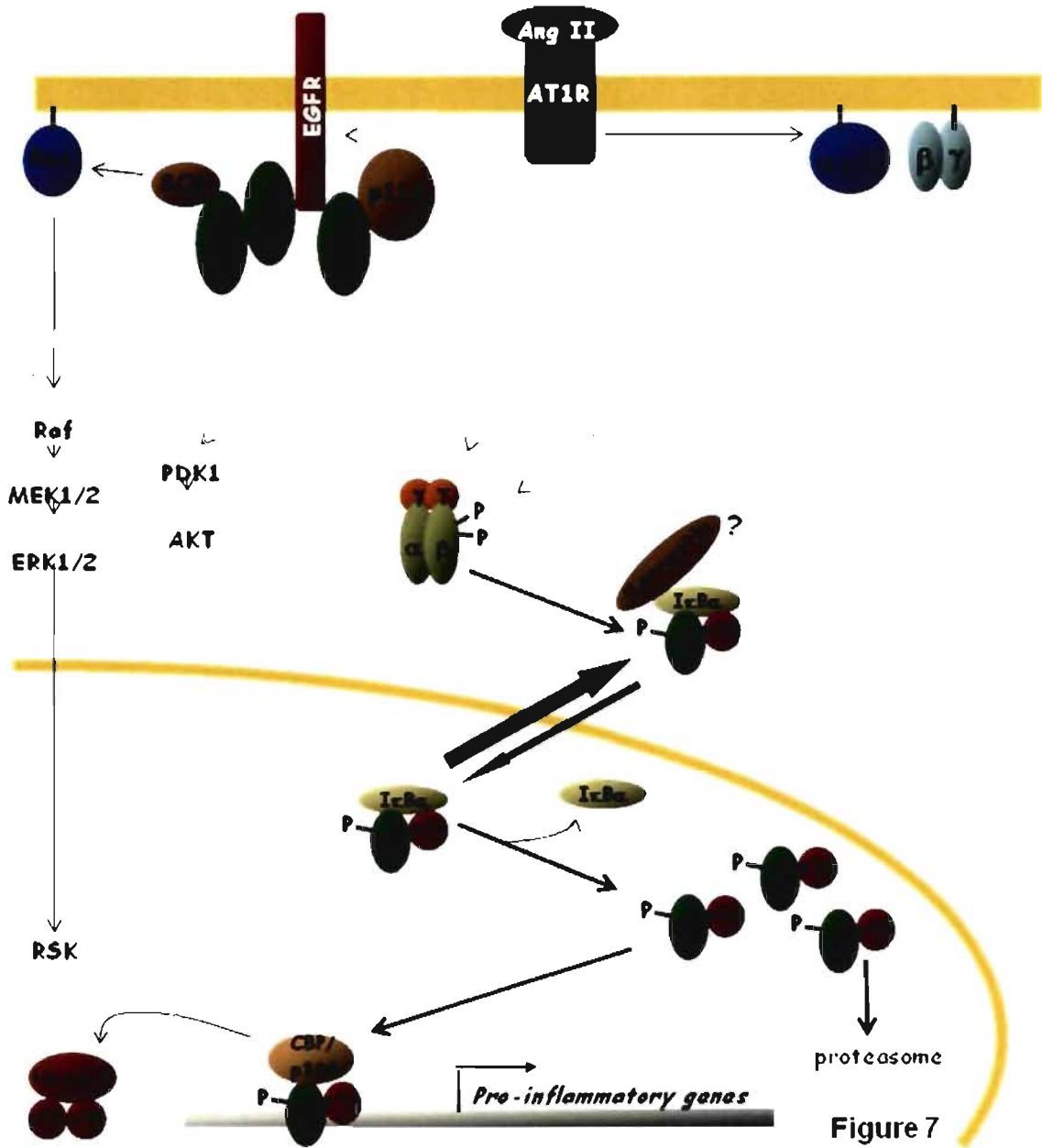
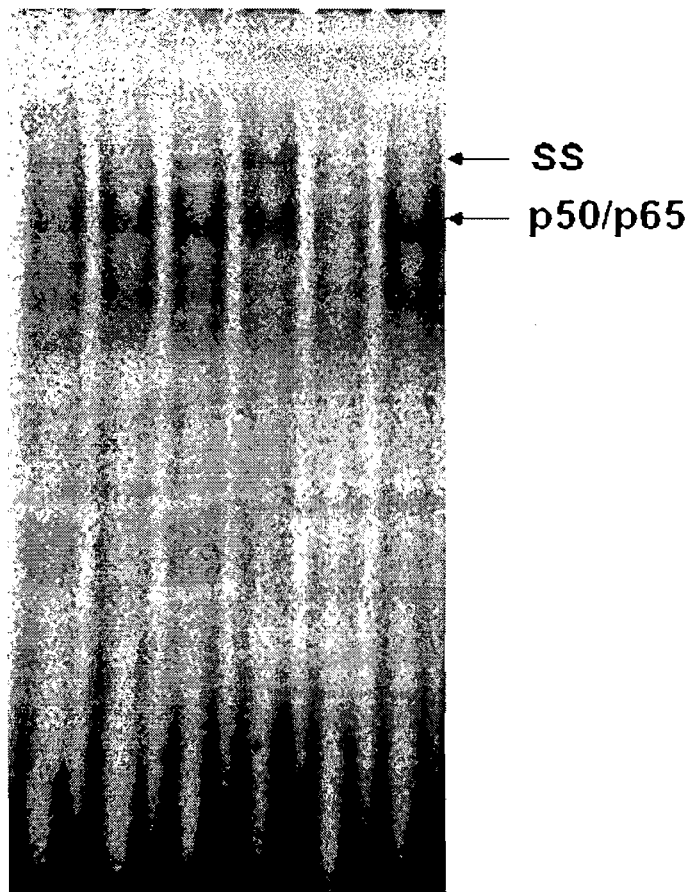


Figure 6

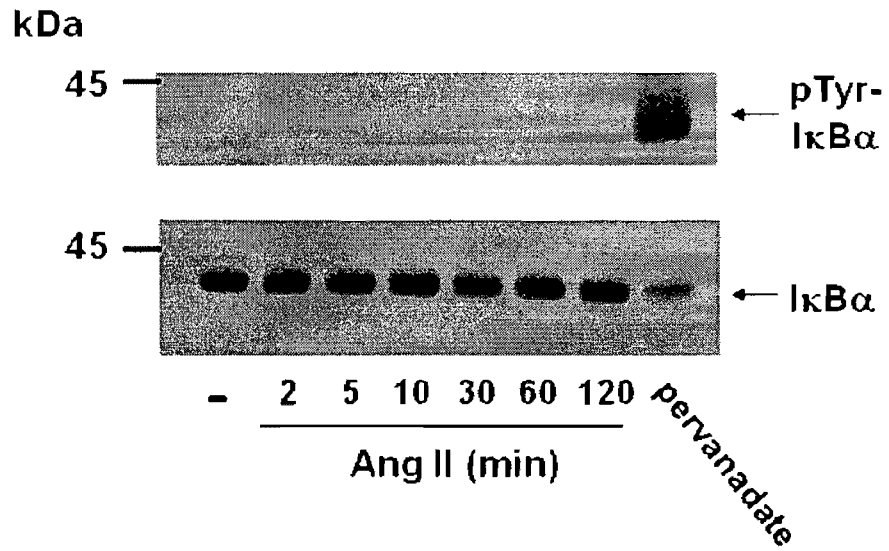


Ab: - - - p50 p65 -
Ang II: - 30 45 45 45 60

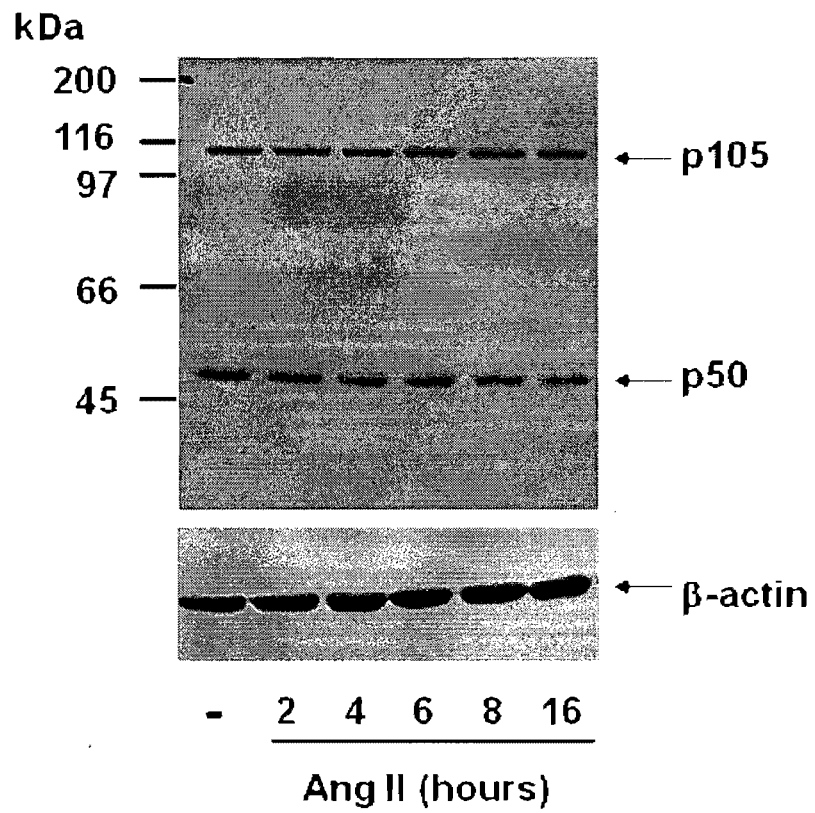


Supp. Data Figure 1

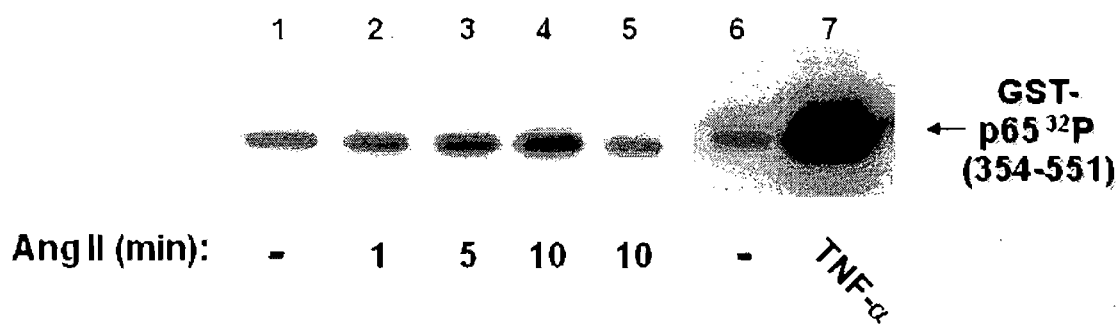
A



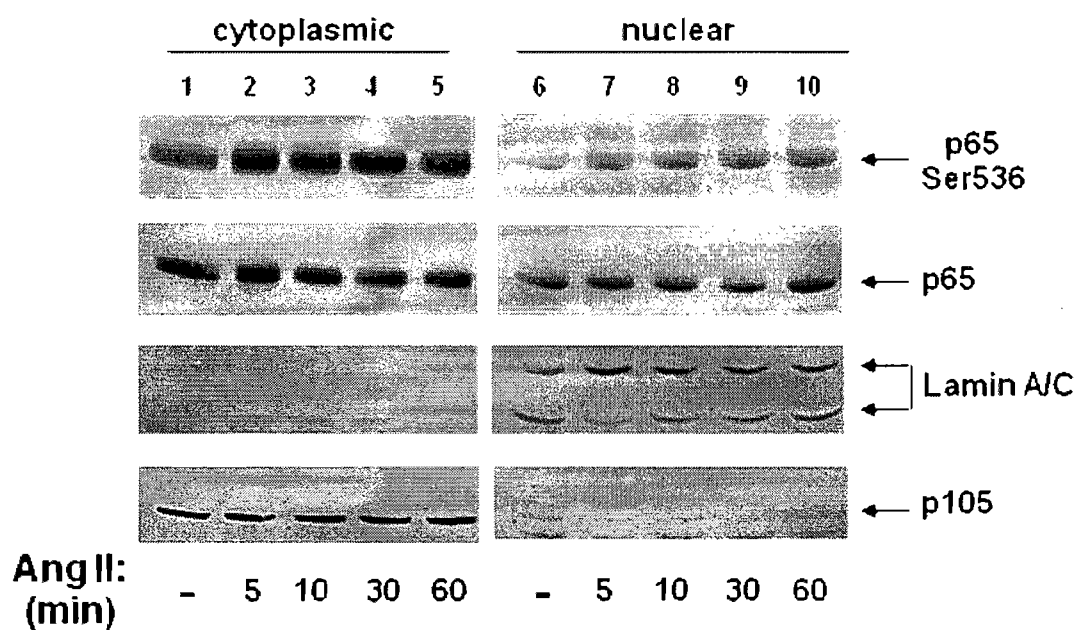
B



Supp. Data Figure 2



Supp. Data Figure 3



Supp. Data Figure 4

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

*Corresponding author. Mailing Address : Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7, [REDACTED]
[REDACTED] [REDACTED]

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 ((27) and reviewed in (7)) 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 pathogens-activated molecular patterns (PAMPs) (2, 5, 7, 14, 28, 29). 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 (29). Two IKK homologs, namely IKKe (22) (also called IKKi (32)), and Tank-binding kinase (TBK)1 (23) 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) (4, 31). 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 -382GGASSLENTVDLHISNSHPLSLTSDQY408-. 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 (17, 31, 38). On the other hand, crystallographic studies revealed that Ser 402 is unlikely to be an important target site because it is located in a α -strand region (36). Phosphoacceptor sites in cluster I are the most accessible amino acids and Ser 386 could be the initial target for TBK1/IKKi (19, 36). 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 (14, 16, 30, 43)). Notably, mutation of the cluster I Ser 385/386 to Ala (creating IRF-3 J2A) abolishes IRF-3 activation (43). Intriguingly, mutation of Ser 385/386 to Asp (creating

IRF-3 J2D), also abrogates IRF-3 activation (16). 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 (14, 38). 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 (16, 34). 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 (14, 16), and induces apoptosis in the absence of virus infection (6, 40). 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 (28). Importantly, immunoblotting analysis with phosphospecific antibodies showed that Ser 396 and Ser 386 are targeted *in vivo* following virus infection (19, 28).

Based on these observations and crystallographic studies (24, 36), 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 (36). 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) (16, 24). C-terminal phosphorylation by TBK1/IKKi is thought to abrogate these intramolecular interactions allowing IRF-3 to homodimerize or heterodimerize with IRF-7 (8). 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 (12) 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 (25) and 2)

phosphorylation of clusters II and III resulting in IRF-3 recognition by a Cullin-based E3 ligase (1).

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 (2). Other studies also reported a lack of correlation between nuclear accumulation of IRF-3 and its hyperphosphorylation, homodimerization and CBP association state (3, 33).

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 (13-16). 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 Dubelcco modified Eagle Medium supplemented with 10% fetal bovine serum. MEFs IRF3 +/+ and -/- were immortalized using the 3T3 protocol (39). DNA transfections were performed with lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) according 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 (1, 5, 29). 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 μ g/ml of Leupeptin, Pepstatin, and Aprotinin, 1% Triton X-100). For co-immunoprecipitation

LV

studies, WCE (400-500 μ g) were incubated with 1.5 μ g of anti-CBP antibody A-22 cross-linked to 30 μ l 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 (29). 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 μ g) 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 μ g of bacterially produced His-wtIRF-3 was resuspended in a kinase buffer containing 0.5 μ g of recombinant His-TBK1 (Upstate, Lake Placid, NY) or GST-IKKi (Cell Signaling), 20 mM Hepes, pH 7.4, 20 mM $MgCl_2$, 2 mM dithiothreitol and 20 μ M 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 [$\gamma^{32}P$]-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 C_{18} precolumn and a 150 μ m \times 10 cm in-house C_{18} 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 phosphoacceptors 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. (14, 17, 19, 24, 28, 36, 38, 43). 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 γ 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 α antibody in the collected supernatant completely prevented the antiviral 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 (16). 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).

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 (28). 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 (16). 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 (16, 28, 41) 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.

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 (4, 31), 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 H_3PO_4 moiety through a α -elimination giving rise to a dehydro-alanine residue shifted by 69 Da from its adjacent γ -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 (28). 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.

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 (28), 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 (12, 35). 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 (14, 28). 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 (9). 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).

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 (33) 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 (12). 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 (14). 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 (16) 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 (1). Interestingly, the Prolyl Isomerase Pin1 was recently shown to bind and promote IRF-3 degradation following virus infection or poly I:C stimulation (25). 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 (1), 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.

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 (10). 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 lost 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 α 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.

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 ((29) 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 (11, 14, 19, 25, 28, 43), 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 (37). 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 (21). 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 (21)). 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 (14, 28, 29), 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 (9, 19, 28). 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* (2). Another study also reported early nuclear accumulation of IRF-3 without any sign of hyperphosphorylation, homodimerization, or CBP association (33). 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 (3).

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 (19) despite its strong transcriptional activity (this study and (28)). 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 (1).

We and others have demonstrated that the hyperphosphorylated/dimerized forms of IRF-3 are unstable in infected cells (1, 2, 5, 11, 14, 25, 28, 29). 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 (1, 14, 28). Ser 339 is involved in IRF-3 degradation following virus infection (25) 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 (42). 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 α 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 (25), 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 (1, 25). Our results thus favor the two-step activation model of IRF-3 as previously suggested (26, 33) 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 (20, 26). 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 (21). 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.

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 (18). 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. IKKε is part of a novel PMA-inducible IκB kinase complex. *Molecular Cell* 5:513-522.
23. Pomerantz, J. L., and D. Baltimore. 1999. NF-κB 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 IkappaB 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. Takahashi, K., 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. Wathlet. 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.

FIGURE LEGENDS

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) HeLa cells in a 6-well plates were transfected with 0.5 μ g 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. 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. 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). 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.

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.

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) 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). 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. 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.

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. 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 (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.

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) 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. 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. H) HeLa cells were transiently co-transfected with luciferase reporter constructs containing the IFN β 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.

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. 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 (21) or by an atypical PI3K pathway (20, 26). 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.

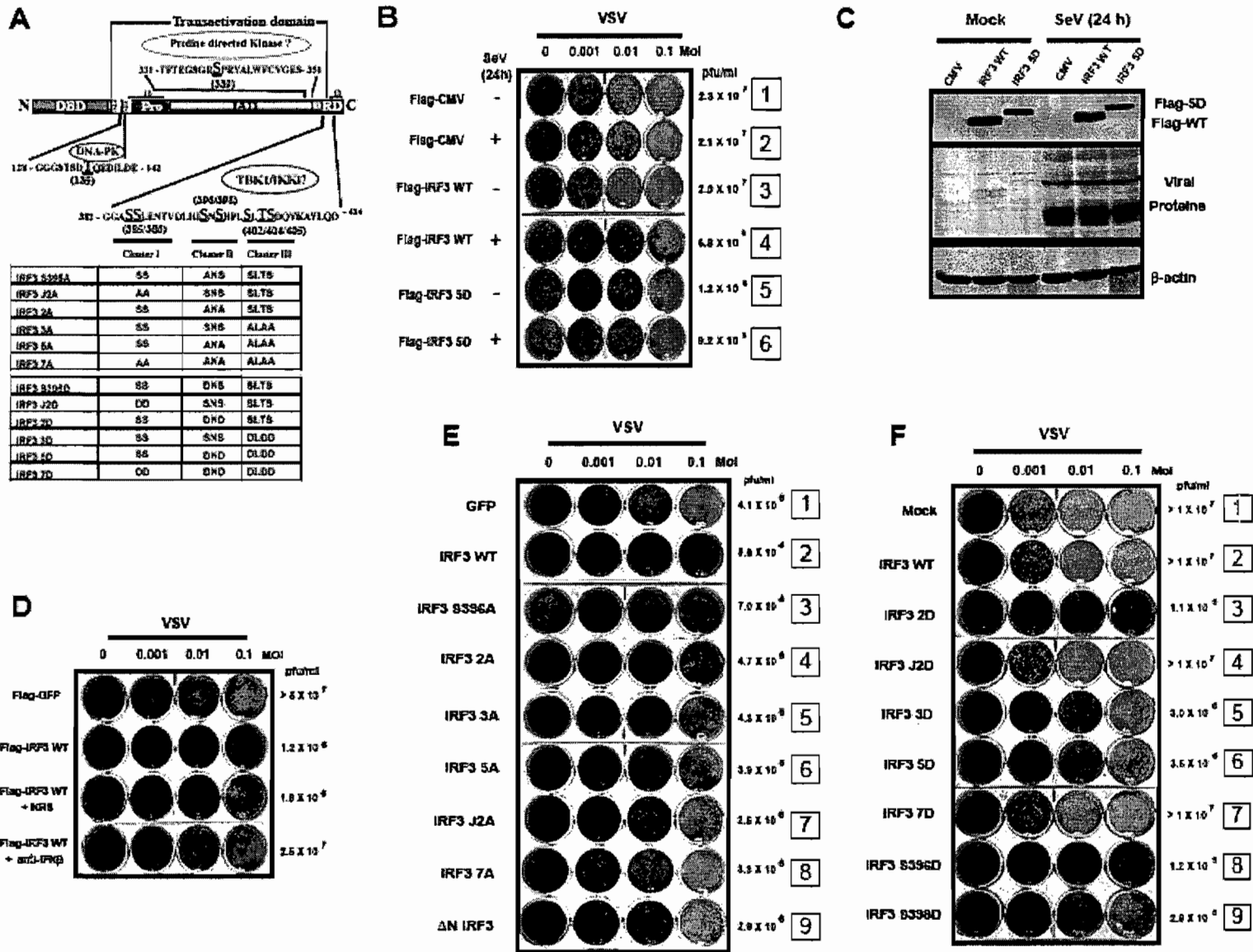


Figure 1

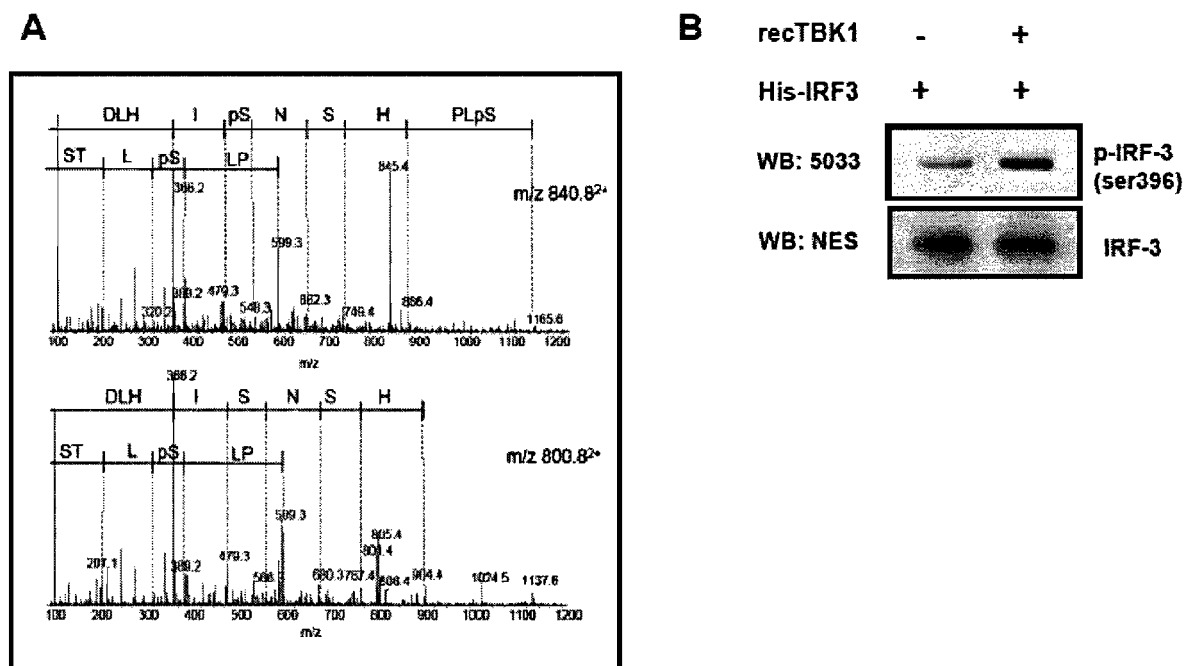


Figure 2

Figure 3

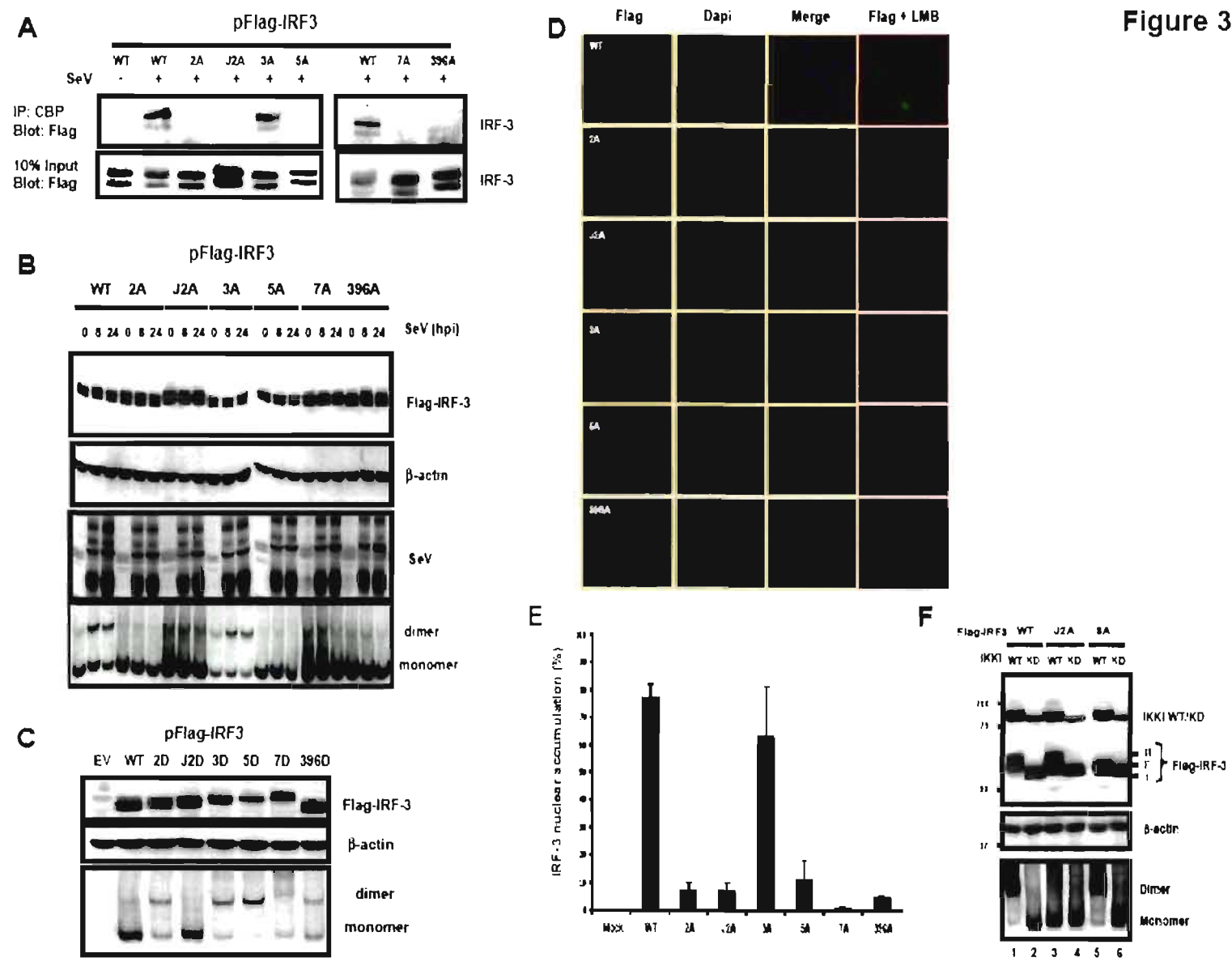
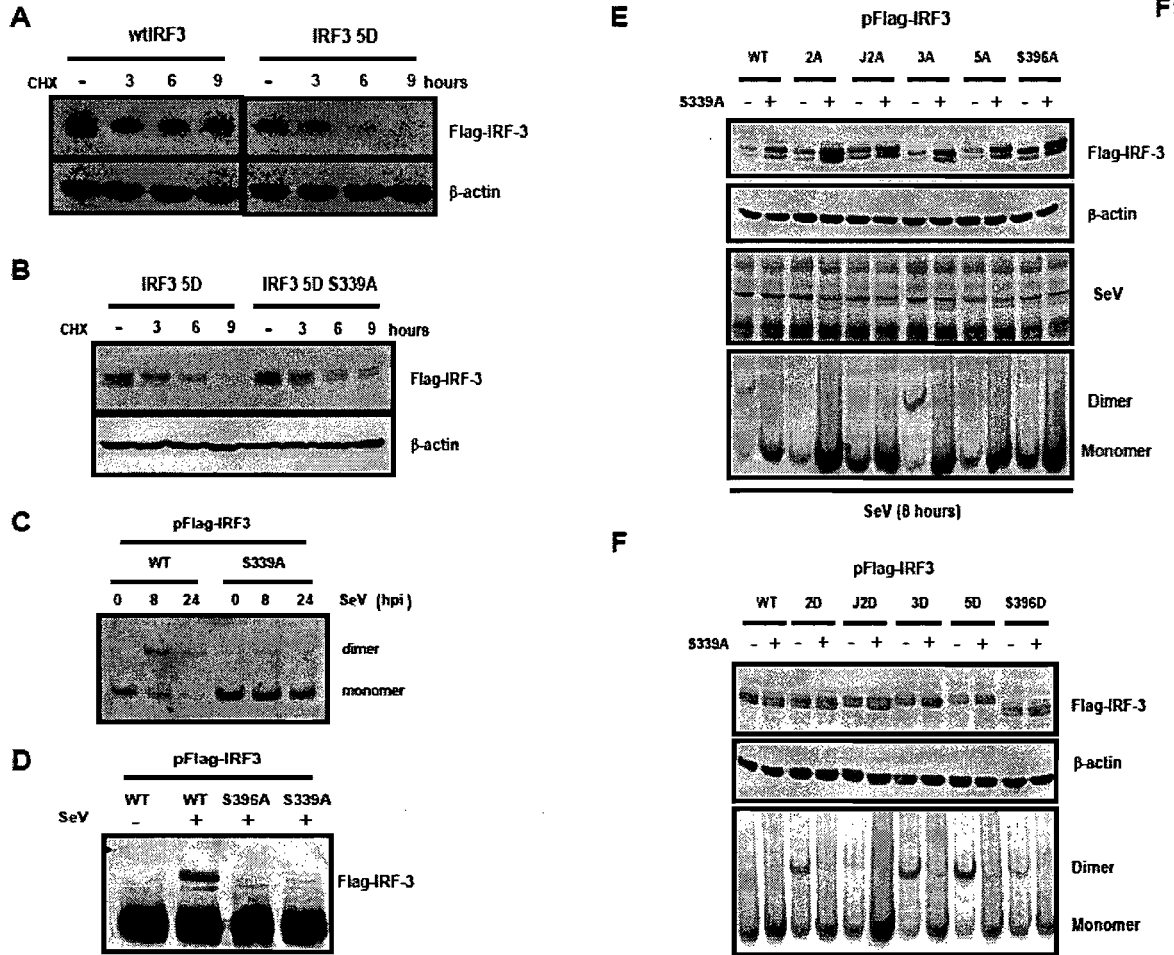


Figure 4



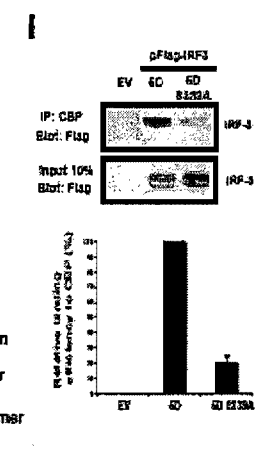
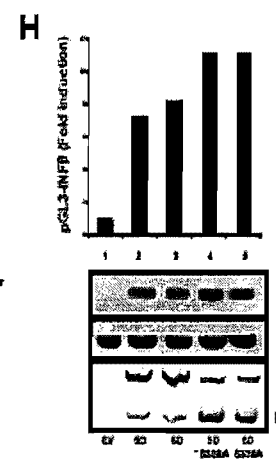
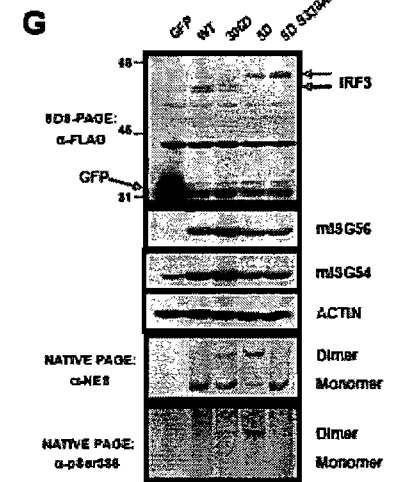
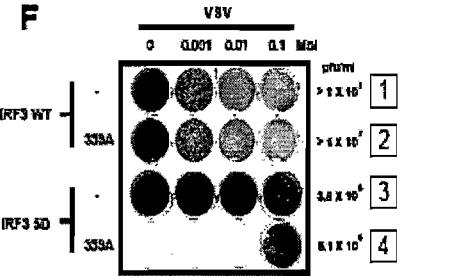
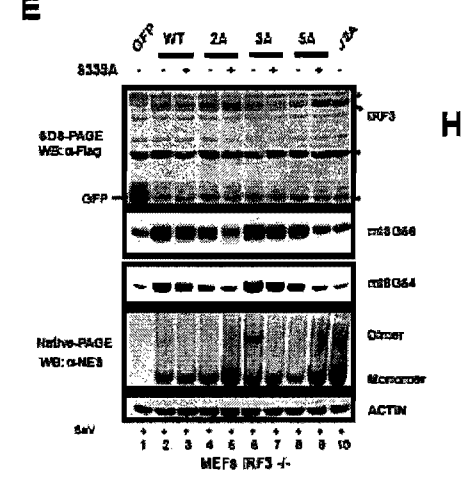
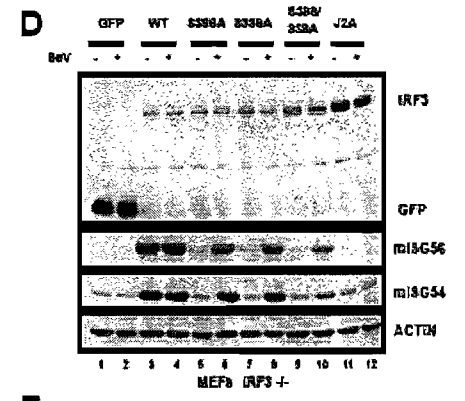
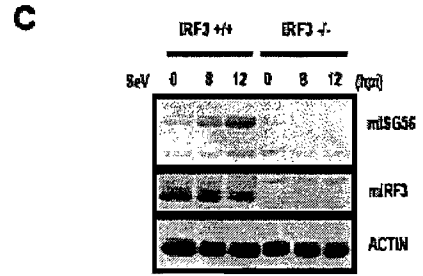
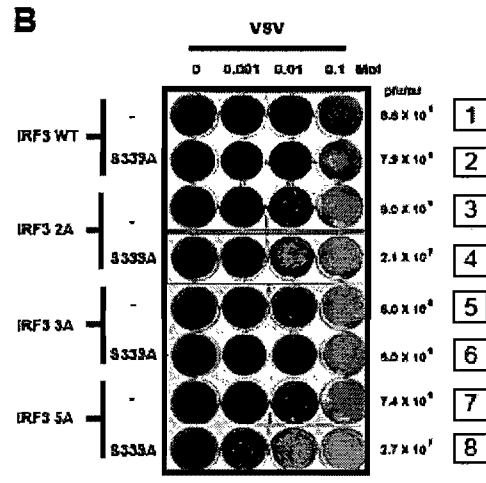
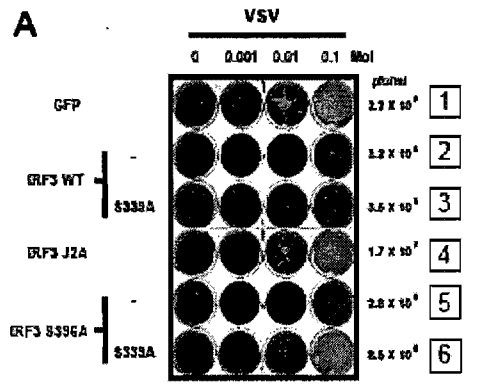


Figure 5

1111111

