



Caractérisation des processus d'ubiquitination régulant le facteur de transcription NF-kappaB au cours de l'activation lymphocytaire Rôle de l'E3 ligase TRIM13 et de la déubiquitinase USP34

Emeline Hatchi

► To cite this version:

Emeline Hatchi. Caractérisation des processus d'ubiquitination régulant le facteur de transcription NF-kappaB au cours de l'activation lymphocytaire Rôle de l'E3 ligase TRIM13 et de la déubiquitinase USP34. Immunologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T040 . tel-01126886

HAL Id: tel-01126886

<https://theses.hal.science/tel-01126886>

Submitted on 6 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 25/09/2014 par

Emeline HATCHI

Pour obtenir le grade de Docteur de l'université Paris-Sud 11

Caractérisation des processus d'ubiquitination régulant le facteur de transcription NF- κ B au cours de l'activation lymphocytaire

Rôle de l'E3 ligase TRIM13 et de la déubiquitinase USP34

Directeur de thèse

Nicolas BIDERRE

CR1 INSERM, Institut Cochin

Composition du jury

Président du jury

Pierre BOBÉ, Professeur (Paris XI)

Rapporteurs

Jérôme DELON, CR1 INSERM (Institut Cochin)

Solange DESAGHER, CR1 CNRS (IGMM)

Examineurs

Pierre BOBÉ, Professeur (Paris XI)

Jean KANELLOPOULOS, Professeur (Paris XI)

Champ disciplinaire: *Immunologie*

Université Paris Sud, Faculté de Médecine

École doctorale 418 Cancérologie

Biologie, Médecine, Santé

Laboratoire INSERM UMR 1014

Régulation de la survie cellulaire et des
allogreffes

A ma famille,

Remerciements

Je remercie mes rapporteurs Solange Desagher et Jérôme Delon ainsi que les autres membres du jury Jean Kanellopoulos et Pierre Bobé d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie également Aimé Vazquez de m'avoir accueillie au sein de l'unité 1014 à l'institut Lwoff ainsi que le directeur de l'institut Cochin Pierre-Olivier Couraud pour son accueil à l'institut Cochin.

Je remercie aussi la Ligue Nationale Contre le Cancer qui a financé ma thèse.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude à mon mentor Nicolas Bidère, sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Je tiens également à le remercier pour ses encouragements, sa patience (à toute épreuve), sa disponibilité et sa gentillesse.

Je tiens à remercier tout particulièrement le docteur Konstantinos Poalas, Naïma Zemirli, Gorbatchev Ambroise ainsi que Marie Pourcelot avec qui j'ai partagé des moments inoubliables et qui ont été bien plus que des amis.

Je remercie également Mélissa N'Debi, Nélia Cordeiro, Véronica Acevedo et Lola Lecru pour leur aide et leur gentillesse ainsi que les autres étudiants que j'ai connus au laboratoire (Emilie, Charlotte, Claire, Chus, Neslihan, Ahmed, Nathalie, Estefania ...) ainsi que le docteur Julie Gavard et Héloïse Leclair de l'institut Cochin, le docteur Mikael Lerner de l'institut Karolinska, les docteurs Cathy Alexia, Gabrielle Carvalho et Damien Arnoult, Alain Portier et l'équipe du bâtiment Lavoisier.

Je remercie également tous mes amis et tous ceux qui ont été présents pour moi pendant ma thèse.

Un grand merci à ma mère, à mon père et à tous mes proches.

Table des matières

Abréviations	6
Résumé	7
Introduction	8
I. NF-κB	9
1) <i>Prélude</i>	9
2) <i>NF-κB : le chef d'orchestre</i>	11
3) <i>NF-κB, un quintet qui joue en duo</i>	12
1. Les membres NF- κ B pourvus d'un domaine de transactivation (TAD) : RelA/p65, c-Rel/REL et RelB	13
a. RelA/p65	13
b. c-Rel/Rel	14
c. RelB	15
2. Les membres NF- κ B dépourvus d'un domaine de transactivation (TAD) : p105/p50 et p100/p52	16
4) <i>L'activation de NF-κB, une vraie symphonie</i>	17
1. Les protéines - clés	18
a. Les I κ B : dièse ou bémol	18
b. Le complexe IKK (I κ B kinase)	21
2. Les voies d'activation	22
3. La signalisation NF- κ B au cours de l'activation des lymphocytes T	23
II. L'ubiquitination	28
1) <i>L'ubiquitination, le leitmotiv</i>	28
2) <i>L'ubiquitination, la valse à trois temps</i>	30
1. L'E1 ou l'enzyme qui active l'ubiquitine	31
2. Les E2 ou les enzymes de conjugaison	32
3. Les E3 ou les E3 ubiquitine ligases (E3 ligases)	32
a. Les HECT (Homologous to E6Ap Carboxy Terminus)	33
b. Les RING (Really Interesting New Genes)	34
4. Les déubiquitinases (DUBs)	38
III. Processus d'ubiquitination régulant le facteur de transcription NF-κB au cours de l'activation lymphocytaire	42
1) <i>La mono-ubiquitination : l'ubiquitine se la joue en solo</i>	42
2) <i>NF-κB danse la polK63 (polyubiquitination K63)</i>	43
a. MALT	43
b. BCL10	44
c. NEMO	45
3) <i>L'ubiquitination de type K48</i>	46
a. I κ B α	46
b. CARMA1	46

c. BCL10.....	47
d. c-Rel et RelA (p65).....	47
4) Les autres types d'ubiquitination.....	47
5) Les DUBs	48
a. CYLD.....	49
b. A20.....	50
c. Les autres DUBs	52
 <i>Interlude : La régulation du facteur de transcription NFAT activé au cours de l'activation lymphocytaire et responsable de la synthèse de la sous-unité NF-κB c-Rel</i>	 55
 Description du projet de thèse	 59
Résultats	60
Article I.	61
Article II.	78
Discussion	87
I. USP34, une enzyme méconnue aux multiples fonctions.....	88
II. TRIM13, une E3 ligase énigmatique	94
Outro	101
Annexes	102
<i>Annexe I : The Endoplasmic Reticulum Acts as a Platform for Ubiquitylated Components of Nuclear Factor κB Signaling</i>	<i>103</i>
<i>Annexe II : Participation of the Cell Polarity Protein PALS1 to T-Cell Receptor-Mediated NF-κB Activation</i>	<i>112</i>
Bibliographie.....	120

Abréviations

ABC Activated B cell	MAPK Mitogen-activated protein kinase
APF-1 ATP-dependent proteolysis factor 1	MTDH Metadherin
ARD Ankyrin repeat domain	NEMO NF- κ B essential modulator
BCL 3/10 B-cell CLL/lymphoma 3/10	NES Nuclear Export Signal
BCR B-cell receptor	NFAT Nuclear factor of activated T-cells
CARD Caspase recruitment domain	NF-κB Nuclear factor of immunoglobulin κ -light chain enhancer in activated B-cells
CARMA1 CARD and MAGUK scaffold protein 1	NIK NF- κ B inducing kinase
CBM CARMA1-MALT1-BCL10 complex	NLS Nuclear Localization Signal
CD Cluster of differentiation	NUTs NF- κ B ubiquitinated transmitters
CHUK Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	OTU Ovarian tumour domain
cIAP cellular Inhibitor of apoptosis	PKC Protein kinase C
CK1α Casein Kinase 1 α	PMA Phorbol Myristate Acétate
CLL Chronic Lymphocytic Leukemia	RBCC RING B-box Coiled-Coil
CMH Complexe majeur d'histocompatibilité	RE Réticulum Endoplasmique
CPA Cellule présentatrice d'antigène	RHD Rel Homology Domain
CYLD Cylindromatosis	RING Really interesting new gene
DLBCL Diffuse large B-cell lymphoma	RIP Receptor-interacting protein kinase
DUB Deubiquitinase	RNF RING-finger protein
EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)	SCF SKP1-CUL1-F-box-protein
ERK Extracellular signal-regulated kinase	SDD Scaffold Dimerization Domain
E3 E3 ubiquitin ligase	TAB TAK1-binding protein
HECT Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus	TAD Transactivation Domain
IFN Interferon	TAK1 TGF β -activated kinase 1
IKK I κ B kinase	TBP TATA-binding protein
Ig Immunoglobine	TCR T-cell receptor
IL Interleukin	TLR Toll-like receptor
ITAM Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif	TNFAIP3 : Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
IκB Inhibitor of NF- κ B	TNFR Tumour necrosis factor receptor
JNK JUN N-terminal kinase	TNFα Tumour necrosis factor α
LPS Lipopolysaccharide	TRAF TNF-receptor-associated factor
LUBAC Linear ubiquitin chain assembly complex	TRIM Tripartite Motif
LZ Leucine Zipper	UBD Ubiquitin-binding domain
MAGUK Membrane-associated guanylate kinase	UBIP Ubiquitous Immunopoietic polypeptide
MALT1 Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1	UPS Ubiquitin Proteasome System
	USP Ubiquitin-specific protease
	Wnt Wingless integration
	β-TrCP beta-transducing repeat containing E3

Résumé

Le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle essentiel dans le développement, l'homéostasie, la survie du système immunitaire, mais également dans la propagation de certains lymphomes. L'activation optimale de NF- κ B en réponse à l'engagement de nombreux immunorécepteurs repose sur la mise en place de larges signalosomes dans lesquels des adaptateurs spécifiques sont recrutés et poly-ubiquitinylés de façon non-dégradative. En réponse à des cytokines pro-inflammatoires ou à l'activation des récepteurs antigéniques, ces adaptateurs ubiquitinylés s'accumulent sur la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique (RE) *via* la protéine du RE metadherine (MTDH) qui assure la propagation du signal NF- κ B. Toutefois, la nature des E3 ligases en charge de relayer NF- κ B au niveau des organites intracellulaires reste méconnue. C'est pourquoi j'ai réalisé le crible par bioluminescence d'une librairie de siRNA dirigée contre les 46 E3 ubiquitine ligases humaines pourvues d'un domaine transmembranaire qui les ancrent au niveau de différents compartiments cellulaires afin d'étudier leur impact sur l'activation de NF- κ B en réponse à une stimulation antigénique dans un modèle de lymphocytes T immortalisés Jurkat. Nous avons identifié la protéine du RE TRIM13 comme un régulateur positif de la signalisation NF- κ B. Nos données suggèrent un modèle dans lequel TRIM13 régule l'activation de NF- κ B en modulant indépendamment l'activation de deux membres clés de la famille NF- κ B au cours de l'activation lymphocytaire, RelA (p65) et c-Rel.

Lors de cette thèse, j'ai également participé au crible d'une librairie de siRNA ciblant les 96 déubiquitinases (DUBs) codées par le génome humain afin d'identifier celles en charge de ramener les cellules vers leur état basal. Ceci a permis la caractérisation de la protéase spécifique de l'ubiquitine USP34 (Ubiquitin specific protease 34). La réduction des niveaux endogènes de USP34 potentialise l'activation de NF- κ B en réponse à l'engagement du récepteur antigénique T ou du récepteur au TNF α et la liaison de NF- κ B à l'ADN est accrue. Collectivement, ces résultats suggèrent que USP34 est un nouvel acteur impliqué dans la régulation négative de NF- κ B.

Ces résultats illustrent l'importance des processus d'ubiquitination réversibles dans la régulation de la signalisation NF- κ B et introduisent les cribles génétiques comme un outil efficace pour l'identification de régulateurs de processus biologiques divers.

Introduction

I. NF- κ B

1) Prélude

L'histoire de NF- κ B commence en 1986, lorsque Ranjan Sen et David Baltimore tentent de caractériser des protéines qui interagissent avec les séquences enhancers des immunoglobulines (Ig). Les séquences enhancers sont des séquences régulatrices capables d'activer la transcription. Les premières séquences enhancers ayant été définies comme spécifiques d'un tissu donné sont celles des immunoglobulines.

En réalisant une expérience de retard sur gel (EMSA), Sen et Baltimore détectent 3 facteurs capables de se lier aux séquences enhancers des immunoglobulines. Le premier, appelé NF-A, est détecté dans toutes les lignées testées (lignées lymphoïdes ou non et d'origines humaines, murines ou simiennes). NF-A se lie à l'octamère ATTTGCAT, présent en amont des gènes de toutes les régions variables des immunoglobulines mais aussi en amont des séquences enhancers des chaînes lourdes. Capable de se lier aux séquences enhancers des chaînes lourdes et des chaînes légères kappa (κ), le deuxième facteur est lui aussi ubiquitaire contrairement au troisième qui lui se lie uniquement au niveau des séquences enhancers des chaînes légères κ des lymphocytes B. Ce dernier facteur sera appelé **Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B** [1].

Quelques mois plus tard, Sen et Baltimore démontrent que l'activité transcriptionnelle de NF- κ B est inducible grâce à une expérience de retard sur gel sur des extraits nucléaires issus de cellules pré-B 70Z/3 stimulées par du lipopolysaccharide (LPS), une endotoxine bactérienne mitogène. En effet, au cours de la maturation des lymphocytes B, la protéine κ est synthétisée, ce qui va permettre l'assemblage et le transport à la surface cellulaire de l'immunoglobuline M (IgM). Les cellules pré-B 70Z/3 ont un phénotype comparable à une cellule B immature car elles disposent d'un locus κ **fonctionnel mais transcriptionnellement inactif**.

De plus, la liaison à l'ADN de NF- κ B est observée même en présence de deux inhibiteurs de la traduction, la cycloheximide et l'anisomycine ce qui indique que cette induction est indépendante de la synthèse protéique *de novo* et suggère le concours de **modifications post-traductionnelles**.

Parallèlement, ils établissent qu'un ester de phorbol pro-tumoral, le phorbol myristate acétate (PMA) peut induire la synthèse de la protéine κ dans les lymphocytes B et T (Jurkat) mais aussi dans des lignées non lymphoïdes (HeLa). Toutefois, les cinétiques d'activation par la PMA et le LPS sont différentes; alors que dans les cellules stimulées par le LPS, le niveau de NF- κ B croît progressivement jusqu'à atteindre un maximum et demeurer constant, le niveau maximal de NF- κ B est atteint rapidement suite à la stimulation par le PMA puis décroît jusqu'à ce que NF- κ B ne soit pratiquement plus détectable lorsque cette stimulation est prolongée. Cette décroissance pourrait s'expliquer par le fait qu'une activité continue de la protéine kinase C (PKC) est nécessaire au maintien de NF- κ B, or l'exposition prolongée aux esters de phorbol diminue l'activité endogène de la PKC. L'étude

comparative des cinétiques d'activation par le PMA et le LPS suggère que ces inducteurs de NF- κ B empruntent des voies différentes. Elle introduit aussi la **phosphorylation comme un potentiel mécanisme régulateur de NF- κ B**; la phosphorylation directe de NF- κ B ou de son éventuel inhibiteur par la PKC serait un pré-requis à son activation.

Des travaux de Sen et Baltimore vont naître le concept selon lequel des facteurs contrôlant la transcription génique de façon spécifique sont fonctionnels mais inactifs à l'état quiescent et peuvent être activés par des processus impliquant des modifications post-traductionnelles [2, 3].

Pendant la décennie qui va suivre sa découverte, NF- κ B est l'objet de plus de 1200 publications [4]. En 1988, Baeuerle et Baltimore vont faire successivement deux découvertes majeures qui vont valider l'hypothèse selon laquelle la phosphorylation joue un rôle déterminant dans l'activation de NF- κ B. L'étude de répartition subcellulaire de NF- κ B dans des cellules 70Z/3 et des HeLa (lignées non lymphoïdes) montre que **NF- κ B est séquestré par un inhibiteur dans le cytosol** des cellules non stimulées et que la stimulation par les esters de phorbol va lever une inhibition permettant alors la translocation nucléaire de NF- κ B et sa liaison à l'ADN. Cette nouvelle découverte suggère que la phosphorylation d'un inhibiteur par la protéine kinase C est un pré-requis à la translocation nucléaire et à l'activation de NF- κ B [5]. En accord avec ces résultats, **l'inhibiteur I κ B** est identifié comme étant une protéine de 60 à 70 kDa capable de former de façon réversible un complexe avec NF- κ B. L'activation de la protéine kinase C (PKC) par les esters de phorbol va conduire à la dissociation de ce complexe et libérer NF- κ B [6].

Puis, en 1989, une sous-unité NF- κ B de 50 kDa, **p50** est identifiée et définie comme celle qui se lie à l'ADN tandis qu'une autre de 65 kDa, p65 se lie à I κ B permettant ainsi l'inhibition de NF- κ B [7]. Un an plus tard, le clonage de p50 révèle son homologie avec v-Rel, un oncogène d'origine virale. En effet, p50 partage un domaine amino-terminal de 300 acides aminés avec v-Rel mais aussi avec ses homologues cellulaire et drosophilien, respectivement, **c-Rel** et Dorsal. Une identité de séquence entre p65 et c-Rel suggère que p65 est également un membre de la famille Rel [8]. Tous les membres de la famille Rel possèdent une région amino-terminale appelée **Rel Homology Domain (RHD)** qui permet leur dimérisation et leur liaison à l'ADN et contient une séquence de localisation nucléaire (NLS) [9]. La famille de facteurs de transcription Rel est impliquée dans la régulation de l'expression de nombreux gènes cellulaires et viraux et le gène Rel est très conservé dans l'évolution.

Avec l'identification de deux sous-unités NF- κ B **p52** et **RelB**, la famille Rel/NF- κ B s'agrandit. NF- κ B2/p52, initialement appelé p49 a été identifié comme un produit de 49 kDa issu de l'épissage alternatif d'une protéine de 100 kDa, p100. Alors que p52 (p49) est présenté comme un protagoniste majeur de la régulation de gènes contenant des sites κ B [10], la faible affinité de RelB pour l'ADN et son incapacité à activer seul la transcription font de RelB une sous-unité NF- κ B, un peu particulière [11].

En 1994, le facteur de transcription **NFAT** (Nuclear Factor of Activated T cells) est caractérisé et malgré un **fort degré d'homologie avec la famille Rel/NF- κ B**, son incapacité à se lier aux sites κ B et à former des dimères avec les membres de la famille Rel/NF- κ B l'exclut de cette famille de facteurs de transcription [12, 13].

Plus de 25 ans après sa découverte, l'engouement pour NF- κ B n'a cessé de croître (Figure 1) et a permis l'émergence de nombreux paradigmes et de nouveaux concepts faisant de NF- κ B, un véritable modèle pour les réponses cellulaires, tissulaires et organismiques orchestrées par des facteurs de transcription inductibles [14].

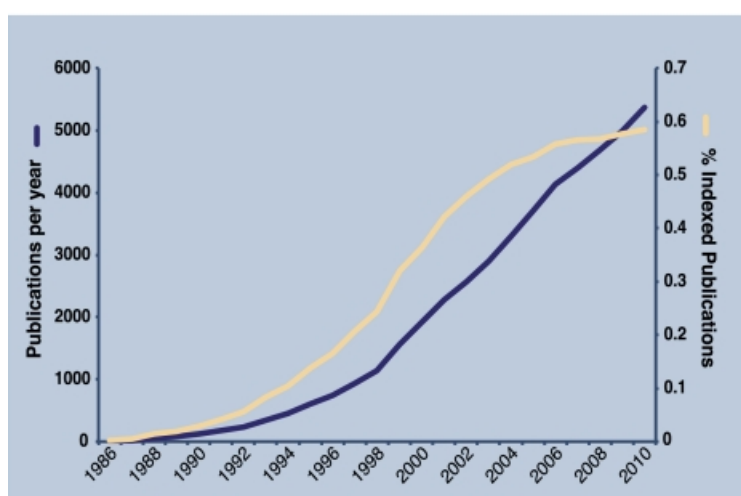


Figure 1. 25 ans de littérature NF- κ B. Le tracé bleu représente le nombre total de publications identifiées dans PubMed en utilisant les mots-clés NF- κ B, Rel ou IKK pour chaque année depuis 1986 (axe de gauche). Le tracé jaune correspond au pourcentage représenté par les publications identifiées avec les mots-clés précédemment indiqués par rapport à l'ensemble des publications sur PubMed pour la même durée (axe de droite) [14].

2) NF- κ B : le chef d'orchestre

Au-delà de l'aspect mécanistique, la communauté scientifique s'intéresse aussi aux rôles de NF- κ B chez l'Homme.

L'étude de NF- κ B dans le **système immunitaire** est à l'origine de la plupart des connaissances sur ses **implications physiologiques et pathologiques** [15]. NF- κ B participe non seulement à la différenciation, à la maturation et au fonctionnement des cellules immunitaires mais aussi à l'activation des récepteurs antigéniques, aux réponses immunes aux infections virales et bactériennes, à l'inflammation et à bien d'autres mécanismes de défenses immunitaires [15, 16].

Mais les fonctions de ce facteur de transcription ne se limitent pas au système immunitaire, NF- κ B est également impliqué dans des fonctions physiologiques telles que la survie, la différenciation et la prolifération cellulaires, participant ainsi à des processus comme le développement embryonnaire [4].

Cependant, la complexité du système NF- κ B qui lui permet de régir de nombreux programmes transcriptionnels essentiels à l'Homme a pour conséquence directe son implication dans la pathogenèse de nombreuses maladies humaines. En effet, la dérégulation de NF- κ B est à l'origine et/ou contribue au maintien de **nombreuses pathologies** telles que les **désordres métaboliques, les maladies neurodégénératives et certains types de cancers** [17-23].

De plus, la multitude de stimuli capable d'activer NF- κ B, sa capacité à moduler la transcription selon le type cellulaire et le contexte et le fait que son activité transcriptionnelle soit étroitement liée à celle de nombreux autres régulateurs transcriptionnels confèrent à NF- κ B un **niveau de sophistication** qui en fait une **cible très complexe** [22, 23, 24, 25].

Les nombreuses études menées depuis la découverte de NF- κ B ont permis de cartographier l'étendue de son champ d'action et d'appréhender certains acteurs fondamentaux et certaines étapes décisives de son activation. Toutefois, de nombreuses zones d'ombre persistent et comme l'illustre si bien la couverture du numéro spécial qui lui est consacré par Nature Immunology (Figure 2) [23], *NF- κ B est un véritable chef d'orchestre, dont on a déchiffré qu'une partie de la partition.*

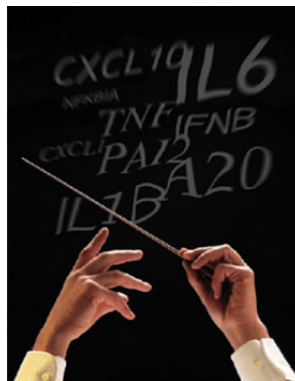


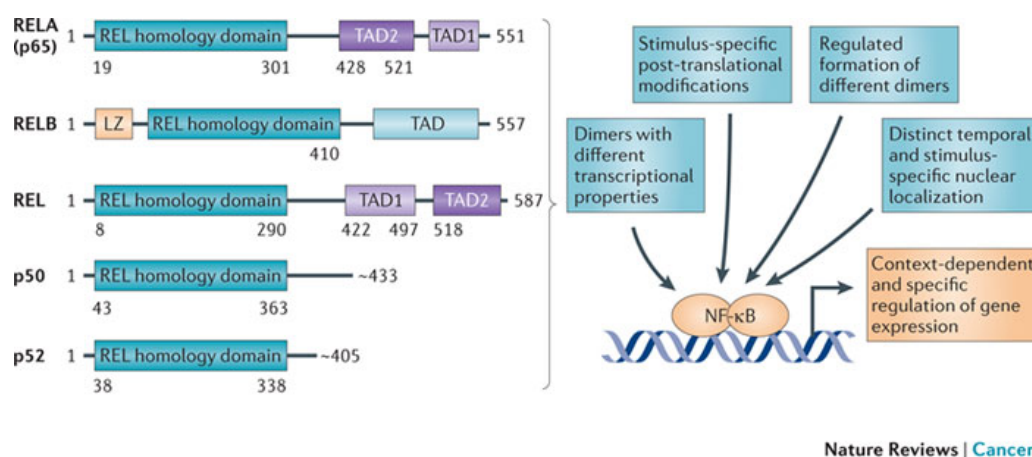
Figure 2. Première de couverture du numéro spéciale de Nature Immunology - NF- κ B is 25 [23].

3) NF- κ B, un quintet qui joue en duo

Les facteurs de transcription sont généralement des familles de protéines partageant des caractéristiques communes qui peuvent avoir des fonctions similaires, distinctes ou complémentaires.

Les 5 membres de la famille NF- κ B, **RelA/p65, c-Rel/REL, p105/p50, RelB et p100/p52** possèdent tous un domaine amino-terminal de 300 acides aminés appelé **Rel Homology Domain (RHD)** qui comprend un domaine de **liaison à l'ADN**, un domaine de **dimérisation** ainsi qu'une séquence de localisation nucléaire, **NLS**. Toutes les sous-unités NF- κ B peuvent former des homo- ou des hétéro- dimères à l'exception de RelB qui ne peut se dimériser qu'avec p50 et p52 [8-10]. C'est uniquement **sous forme dimérique** que NF- κ B est **transcriptionnellement actif** et peut **activer ou réprimer la transcription des gènes-cibles** [26].

Toutefois, seuls RelA/p65, c-Rel/Rel et RelB sont pourvus d'un **domaine de transactivation (TAD)** de 9 acides aminés qui interagit avec des éléments de la machinerie transcriptionnelle basale tels que TBP (TATA-binding protein) et p300 [8, 27-29]. Le TAD est fonctionnellement indépendant du domaine RHD mais ils peuvent tous les deux subir des modifications post-traductionnelles qui vont affecter l'activité transcriptionnelle aussi bien que la liaison à l'ADN (Figure 3) [26].



1. Les membres NF-κB pourvus d'un domaine de transactivation (TAD) : RelA/p65, c-Rel/REL et RelB.

a. RelA/p65

Pourvu d'un domaine de transactivation subdivisé en TA1 et TA2, p65 ou RelA est une **protéine ubiquitaire** [30]. Dès 1991, l'étude du dimère p50/p65 introduit p65 comme une sous-unité NF-κB capable d'activer la transcription [31]. RelA assure la transcription de gènes-clés impliqués dans **diverses fonctions cellulaires** comme l'inflammation ou encore le cycle cellulaire (Tableau 1) [27, 32].

De plus, l'étude de souris RelA^{-/-} a permis de définir RelA comme un acteur central de la résistance à l'apoptose induite par de nombreux stimuli, notamment le TNFα [33-37].

Par ailleurs, il a été démontré que certains stimuli induisent l'association de p65 avec des co-répresseurs, ce qui a pour effet une répression des gènes-cibles [37].

Directement régulée par son **inhibiteur IκBα** (Inhibitor of NF-κB isoforme α), l'activité transcriptionnelle de p65 est aussi modulée par de nombreuses **modifications post-traductionnelles**. RelA est notamment la cible de diverses kinases cytosoliques et nucléaires qui vont influencer sa capacité à se lier à l'ADN, à former des dimères et à recruter des co-facteurs transcriptionnels. Le recrutement de ces co-facteurs est également sous l'influence d'acétylations [27] et p65 est sujet à différents types d'ubiquitination qui régulent sa stabilité.

Comme tous les membres NF- κ B, RelA exerce ses fonctions de régulateur transcriptionnel sous forme dimérique et hormis lui-même, p65 a deux **partenaires privilégiés p50 et c-Rel**. Le dimère **p65/p50** est d'ailleurs **l'hétérodimère prédominant et prototypique** [38].

Tableau 1. Exemples de gènes - cibles de différents dimères de la famille REL, selon Chen et al. [27].

Membres NF- κ B	Dimères	Gènes - cibles
RelA	RelA – RelA	IL8, collagène de type VII, ICAM1
	RelA - p50	I κ B α , IL8, IL6, TNF α , GM-CSF, HIV1
	RelA - c-Rel	uPA, IL2R α , MCP1
RelB	RelB - p50	MDC
	RelB - p52	SLC, ELC, MDC
c-Rel	c-Rel - c-Rel	IL8
	c-Rel - p50	IL12/p40, IL12/p35, ILR2 α
p50	p50 - p50	TNF α , IL6, gène de la chaîne invariante associée au CMH de classe II
	p50 - BCL3	BCL2
p52	p52 - p52	gène de la chaîne invariante associée au CMH de classe II
	p52 - BCL3	Cycline D1, BCL2

BCL, B-Cell leukemia/lymphoma; ELC, EBV-induced-molecule-1 Ligand Chemokine ; GM-CSF, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor ; HIV, Human-Immunodeficiency Virus-1 ; ICAM1, Intercellular Adhesion Molecule-1 ; IL, Interleukine ; ILR, IL Receptor ; MDC, Macrophage Derived Chemokine ; MCP1, Monocyte Chemoattractant Protein-1 ; SLC, Secondary-Lymphoid-tissue Chemokine ; TNF α , Tumour Necrosis Factor- α , uPa ; human Urokinase

b. c-Rel/REL

Structurellement proche de p65, c-Rel/REL est une sous-unité NF- κ B très particulière qui possède un **domaine de transactivation inhibiteur, RID** situé entre son TAD et son RHD [39-41] et qui se lie de façon optimale à une séquence d'ADN légèrement différente de celle avec laquelle se lient les autres dimères NF- κ B et cela en utilisant des résidus différents de ceux utilisés par les autres protéines NF- κ B [42, 43]. Contrairement aux dimères contenant p65 qui sont trouvés dans la plupart des cellules, les dimères contenant c-Rel sont majoritairement retrouvés dans les **cellules hématopoïétiques**. Initialement identifié comme un homologue cellulaire de v-Rel, un oncogène de Rev-T, un rétrovirus aviaire capable d'immortaliser les lymphocytes B et T *in vitro*, c-Rel régule l'expression de **différents gènes dans les lymphocytes B et T** déterminants pour la division cellulaire et les fonctions immunes. En régulant de façon spécifique certains gènes codant pour des protéines impliquées dans les fonctions immunes telles que l'interleukine 2 ou Foxp3, c-Rel contrôle **l'équilibre entre la tolérance et l'immunité**.

En synergie avec d'autres membres NF- κ B, notamment p65 et p50, la sous-unité c-Rel joue un rôle déterminant dans les programmes de régulation génique associée à **l'activation des lymphocytes matures** [39, 44-52]. Comme le laisse présager les nombreuses implications de c-Rel dans la régulation de la réponse immunitaire, c-Rel joue un rôle critique dans de nombreux processus pathologiques, notamment les cancers [39, 53-55].

C'est également en raison de ces nombreuses implications que l'activation de c-Rel est finement contrôlée. Cette régulation met en jeu des **modifications post-traductionnelles** et des **protéines de la famille IκB** qui varient selon le type cellulaire. Ainsi, la signalisation suffisante pour activer NF-κB et c-Rel dans les lymphocytes B ne permet pas la translocation de c-Rel dans les lymphocytes T. La stimulation antigénique des lymphocytes B entraîne une rapide dégradation de IκBα et IκBβ et la redistribution nucléaire du pool de c-Rel constitutivement présent dans le cytosol. En revanche, l'engagement du TCR n'a qu'un modeste effet sur IκBβ et le c-Rel préexistant demeure donc maintenu en échec dans le cytosol des lymphocytes T. L'activation de c-Rel survient secondairement et requiert une boucle d'amplification transcriptionnelle. Diverses études utilisant des inhibiteurs de la calcineurine tels que le FK506 ou la cyclosporine A ont permis d'établir que l'induction et la translocation subséquente de c-Rel sont essentiellement **sous le contrôle du facteur de transcription NFAT** [56-64].

Alors que divers mécanismes de rétrocontrôle négatif de RelA ont été décrits, **les processus contrôlant c-Rel demeurent méconnus**. Toutefois, il a récemment été démontré que l'ubiquitination de type 48¹ de c-Rel par l'E3-ubiquitine ligase Peli1 régulerait son activité [65].

c. RelB

Identifié comme un membre de la famille Rel en 1992, RelB est une **protéine instable** et sa structure lui permet de former des dimères uniquement avec les sous-unités p50 et p52 et leurs précurseurs, qui permettent sa stabilisation[11, 66, 67].

Seul membre NF-κB à posséder un domaine Leucine Zipper (LZ), RelB est pourvu d'un TAD fonctionnel mais ne présente qu'une faible affinité pour l'ADN et ne peut être **actif transcriptionnellement que sous forme hétérodimérique** [11, 68, 69]. Lorsqu'il est **associé aux sous-unités NF-κB p50 et p52** dépourvus de TAD, RelB active la transcription tandis que la séquestration de RelA par RelB dans des dimères transcriptionnellement inactifs est un mécanisme moléculaire qui permet la répression de l'activité NF-κB.

Contrairement à RelA ou c-Rel, RelB n'est pas contrôlé par les protéines IκB. L'activation des lymphocytes T entraîne la **phosphorylation de RelB** suivie de son clivage par la paracaspase MALT1 qui va aboutir à sa **dégradation par le protéasome** [70]. Ce mode de dégradation inductible est similaire à celui des inhibiteurs de NF-κB et introduit RelB comme un **régulateur négatif de NF-κB** [69]. Ce rôle d'inhibiteur est corroboré par des études menées dans des cellules déficientes pour RelB [71-73] mais aussi par des études plus mécanistiques. Il a été démontré que RelB séquestre RelA dans des dimères cytosoliques et nucléaires insensibles aux IκB et transcriptionnellement inactifs [74, 75]. De plus, l'étude du clivage de RelB par MALT1 a mis en évidence le rôle crucial de la dégradation de

¹ L'ubiquitination de type K48 conduit à la dégradation de la protéine ciblée (page 29).

RelB dans l'activation de NF- κ B consécutive à la stimulation antigénique. La dégradation de RelB permettrait la liaison à l'ADN des dimères contenant p65 et c-Rel [70].

Toutefois, la fonction d'inhibiteur de RelB, également nommé i-Rel, en raison de son **incapacité à se lier à l'ADN** [76] est sujette à controverse. En présentant RelA comme un inhibiteur de RelB, Jacque et al. suggèrent que RelB **active NF- κ B**. La phosphorylation du résidu sérine 276 de RelA induite par le TNF récepteur serait déterminante pour la formation de dimères RelA/RelB et l'inhibition subséquente de la liaison à l'ADN de RelB. Le défaut de phosphorylation de RelA sur sa sérine 276 aurait pour conséquence une augmentation de l'expression endogène d'un gène-cible de NF- κ B, le gène *Bcl-xL*, dont la transcription est régulée positivement par RelB. Il a également été démontré que dans des lignées de myélomes multiples, RelB active la transcription de gènes NF- κ B anti-apoptotiques [69, 72, 77, 78].

2. Les membres NF- κ B dépourvus d'un domaine de transactivation (TAD) : p105/p50 et p100/p52.

Les sous-unités p50 (NF- κ B1) et p52 (NF- κ B2) sont d'abord **synthétisées sous forme de précurseurs**, respectivement p105 et p100. Le domaine carboxy-terminal de ces précurseurs est dégradé de façon sélective par le protéasome. Alors que ce processus de dégradation est constitutif pour p105, la génération de p52 est induite.

Contrairement à RelA, c-Rel et RelB, p50 et p52 ne disposent pas de TAD et n'ont donc **pas d'activité transcriptionnelle**. Les homodimères p50 ou p52 se lient de façon constitutive à l'ADN et sont déplacés par des dimères NF- κ B transcriptionnellement compétents. Ils peuvent également **moduler l'activité transcriptionnelle en formant des dimères avec des membres NF- κ B pourvus d'un TAD** [15, 79, 80].

Tableau 2. Phénotypes des souris knockout pour les membres NF- κ B [79]

Mutated gene product	Phenotype in knockout mice
NF-κB family	
p65 (RelA)	Die at E15.5–E16.5; TNF-dependent liver apoptosis; defect in lymphocyte activation
NF- κ B1 (both p105 and p50)	Survival to adult; defect in lymphocyte activation
NF- κ B2 (both p100 and p52)	Survival to adult; no mature B cells and defect in lymphocyte activation; disruption of splenic and lymph-node architecture
RelB	Die postnatally from multi-organ inflammation; required for dendritic-cell development
c-Rel	No developmental defects; defects in lymphocyte and macrophage functions
p65 and NF- κ B1	Die at E13.5–E14.5
NF- κ B1 and NF- κ B2	Die postnatally; lack mature B cells and osteoblasts
NF- κ B1 and RelB	Die postnatally owing to immune deficiency

Bien que les membres et les dimères NF- κ B arborent des caractéristiques spécifiques, il existe une redondance fonctionnelle au sein de la famille NF- κ B (Tableau 2) [79]. Activé par des stimuli divers et variés, NF- κ B participe à une multitude de processus cellulaires et la régulation de son activation est complexe.

4) L'activation de NF- κ B, une vraie symphonie

L'activation de NF- κ B est régulée à différents niveaux, selon le type cellulaire et le contexte. Elle est orchestrée par des **protéines-clés** qui vont subir diverses **modifications post-traductionnelles**. Par ailleurs, les membres NF- κ B sont eux-mêmes la cible de modifications post-traductionnelles qui vont moduler leur activité. De plus, la transcription associée à NF- κ B peut aussi être influencée par d'autres facteurs de transcription.

On distingue classiquement deux voies de signalisation menant à l'activation de NF- κ B : la **voie classique** (ou canonique) et la **voie alterne** (ou non canonique)². Ces deux voies impliquent les protéines du **complexe IKK** (IkB Kinase) pour dégrader les **inhibiteurs de NF- κ B, les I κ B** [40, 81]. Toutefois, certains stimuli comme le stress génotoxique vont initier d'autres voies d'activation de NF- κ B, dépendantes ou non d'IKK [40].

La transduction des signaux activateurs de NF- κ B nécessite le recrutement de divers **adaptateurs** et **protéines d'échafaudages** ainsi que l'activation de nombreuses **kinases** afin de connecter les immunorécepteurs situés à la membrane cellulaire au complexe IKK dans le cytoplasme. Bien que ce soit toujours **IKK** qui donne le La, ces intermédiaires exclusifs ou partagés par plusieurs cascades de signalisation sont des catalyseurs ou des cibles de **modifications post-traductionnelles** essentielles à l'activation de NF- κ B.

² Voir partie sur les voies d'activation (page 22)

1. Les protéines – clés

a. Les IκB : dièse ou bémol ?

La découverte de NF-κB est liée au concept selon lequel les facteurs de transcription sont fonctionnels mais inactifs à l'état quiescent et peuvent être activés par des processus impliquant des **modifications post-traductionnelles** [2, 3]. NF-κB n'échappe pas à cette règle. Très vite, on identifie son **inhibiteur IκB** et la **phosphorylation** de celui-ci comme signal initiateur de la translocation nucléaire de NF-κB et de sa liaison à l'ADN [5-7].

Différents dimères NF-κB coexistent dans une cellule donnée et leur activité doit être régulée de façon indépendante et coordonnée. C'est pourquoi les différents membres de la famille NF-κB sont séquestrés dans le cytoplasme par **une famille d'inhibiteurs, les IκB** [82, 83].

Les inhibiteurs de NF-κB se divisent en trois groupes: les **IκBs classiques ou typiques**, les **IκBs atypiques** et les **précurseurs** (Figure 4) [84]. Tous trois possèdent néanmoins une caractéristique commune, ils sont tous pourvus de **multiples domaines de répétition ankrynes (ARD)** grâce auxquels ils peuvent se complexer à au moins un des dimères NF-κB [85].

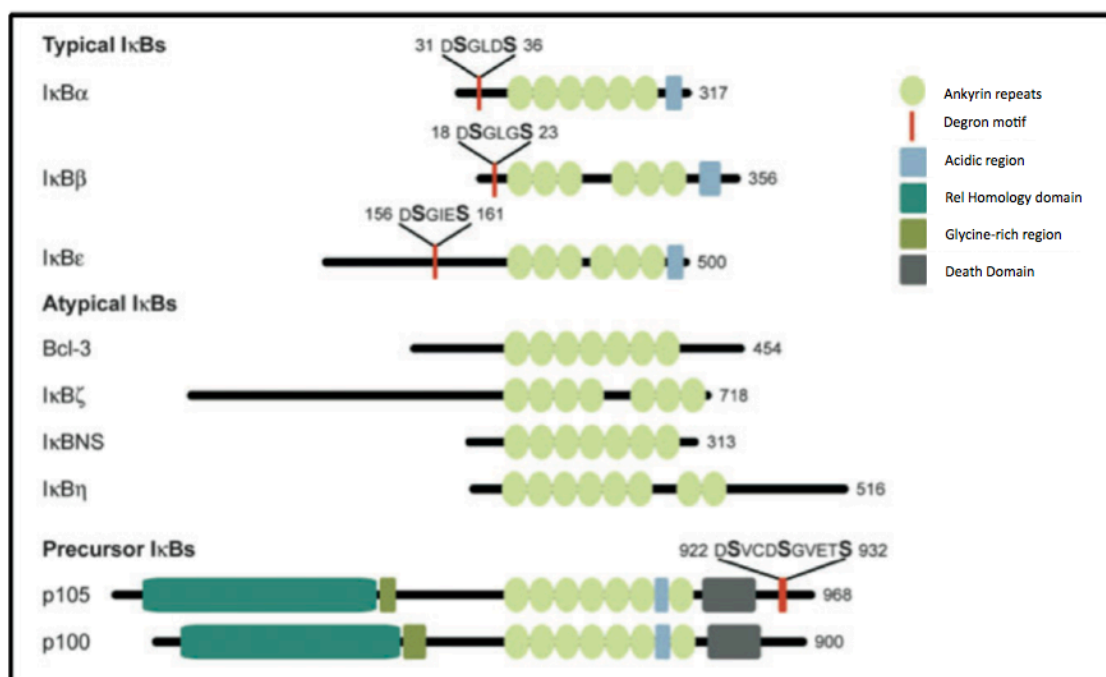


Figure 4. Les inhibiteurs de NF-κB. Domaines et motifs structuraux des protéines IκB humaines. La base de données uniprot a été utilisée comme référence pour la séquence protéique des membres de la famille IκB. [84]

Les IκB typiques

IκBα (*NFKBIA*), **IκBβ** (*NFKBIB*) et **IκBε** (*NFKBIE*) sont les IκB **typiques ou classiques** (Figure 4). Ces protéines sont constitutivement **liées aux dimères NF-κB** dans le cytoplasme, leur **dégradation** induite par un stimulus va rendre la NLS accessible et autoriser la translocation nucléaire et la liaison à l'ADN de NF-κB afin d'initier la transcription des gènes cibles.

La **phosphorylation des IκB par le complexe IKK** sur des résidus sérines conservés appelés résidus sérines de la **boîte de destruction** (DSGXXS) va permettre leur reconnaissance par les protéines βTrCP (β-Transducin repeat-Containing Protein). Ceci induit leur **polyubiquitination de type K48³** par les SCFβTrCP (Skp1-Culin-Roc1/Rbx1/Hrt-1-F-box βTrCP), une famille d'E3 ligases en partenariat avec l'E2-ligase UbcH5 et leur **dégradation subséquente par le protéasome** [14, 86-89].

Cependant, des études menées dans des cellules murines déficientes pour les IκB typiques ont montré que les protéines IκBα, IκBβ et IκBε ne sont pas strictement indispensables pour le maintien de NF-κB dans le cytoplasme, cette fonction pouvant être partiellement assurée par les précurseurs p100 et p105 ou d'autres protéines. En revanche, elles seraient essentielles pour **inhiber la liaison à l'ADN de NF-κB** à l'état quiescent, NF-κB étant capable de se lier à l'ADN et d'activer la transcription en absence de stimulation et elles joueraient un rôle déterminant dans **l'activation de NF-κB en réponse à la stimulation**, puisqu'en leur absence, des facteurs cellulaires liés à NF-κB empêchent son activation en réponse aux stimuli [90].

IκBα, une protéine de 37 kDa purifiée en 1990, est **l'archétype des IκB typiques** [91]. L'étude de sa phosphorylation et de sa protéolyse au cours de l'activation de NF-κB initie les travaux sur la régulation de NF-κB [6, 92]. La **dégradation rapide d'IκBα** au cours de l'activation de la voie canonique permet la libération de divers dimères NF-κB, même si l'hétérodimère p65/p50 est considéré comme sa principale cible. Lorsqu'IκBα est lié au dimère p65/p50, seule la NLS de p65 est masquée. Les complexes IκBα/p65/p50 transitent donc constamment entre le noyau et le cytoplasme en raison de la NLS de p50 qui est exposée et des NES (Nuclear Export Sequence) de IκBα. A l'état quiescent, les complexes paraissent presque exclusivement cytosoliques, la dégradation d'IκBα va alors faire basculer l'équilibre vers le noyau. IκBα étant une cible de NF-κB, il va être synthétisé à nouveau et permettre l'export de NF-κB vers le cytosol, participant ainsi **au rétrocontrôle négatif de NF-κB** [14, 15, 27, 93-97].

Alors que la régulation de NF-κB par IκBα peut paraître fluctuante en raison des oscillations entre le noyau et le cytosol, IκBβ et IκBε mettent la pédale douce. Tout comme IκBα, la dégradation d'**IκBβ** est inductible mais **plus lente**. Synthétisé *de novo* sous une forme hypophosphorylée détectable dans le noyau, IκBβ est capable de se lier à l'ADN avec p65 et c-Rel. Ces complexes IκBβ/NF-κB liés à l'ADN sont résistants à IκBα, suggérant que la présence dans le noyau d'**IκBβ hypophosphorylé** prolonge l'expression de certains gènes. Bien qu'IκBβ soit **absent de certaines cellules** et que certaines études *in vivo* suggèrent une **redondance entre IκBβ et IκBα**, IκBβ arbore des **caractéristiques spécifiques**, telles que sa forte affinité pour NF-κB et sa capacité à masquer les deux NLS d'un dimère NF-κB, qui régissent sa fonction de régulateur de NF-κB [58, 98-102].

³ La polyubiquitination de type 48 conduit à la dégradation de la protéine ciblée (page 29).

L'étude d'**IκBε** dans des lymphocytes B et T a révélé son rôle dans la régulation des fonctions immunitaires impliquant NF-κB. IκBε participe à la régulation de l'activité NF-κB notamment dans la **phase tardive d'activation** *via* des mécanismes impliquant **RelA** et **c-Rel**. Après la stimulation, la transcription d'IκBε initiée par NF-κB est plus tardive que celle d'IκBα. IκBε participe donc au rétrocontrôle négatif de NF-κB lors de **stimulations persistantes**. Il a toutefois été montré qu'IκBε est également requis pour suspendre l'activité NF-κB et l'expression génique associée en réponse à une stimulation transitoire [103-105].

Les IκB atypiques

Les IκB atypiques constituent la **sous-famille BCL-3**. En effet, BCL-3 est le premier IκB non conventionnel identifié. En 1992, Wulczyn et al. émettent l'hypothèse selon laquelle en se liant au domaine conservé de dimérisation de NF-κB *via* son domaine de répétition ankyrines (ARD), le produit du proto-oncogène *bcl-3* modulerait la formation de dimères NF-κB [106], en accord avec les travaux d'Hatada et al. [107]. La même année, Franzoso et al. introduisent la protéine BCL-3, pourvue de 7 ARD, comme un activateur de NF-κB [108]. A ce jour, on dénombre **4 IκB atypiques**, qui possèdent tous au moins **7 domaines de répétition ankyrines (ARD)** (Figure 4).

Alors que les IκB classiques agissent au niveau cytoplasmique, **BCL-3, IκBζ, IκBNS et IκBη** interviennent **dans le noyau** avec une cinétique d'activation et un mode de fonctionnement différents. Peu exprimés à l'état quiescent, ils sont **induits par l'activation de NF-κB**, notamment lors de l'engagement des récepteurs antigéniques des cellules B et T mais ne sont pas dégradés comme leurs homologues. En se **liant aux homodimères p50 et p52 associés à l'ADN**, les IκB atypiques peuvent **inhiber leur dégradation**, permettre le **recrutement de co-facteurs nucléaires** et ainsi **augmenter ou réduire leur activité transcriptionnelle**.

Les IκB atypiques sont certes **en compétition** avec les IκB classiques pour la liaison aux dimères NF-κB liés à l'ADN, mais leur aptitude à moduler **positivement ou négativement NF-κB** et leur **localisation nucléaire** permettent leur implication dans la **régulation tardive** de la transcription des gènes-cibles de NF-κB [84-86, 109].

Les IκB précurseurs

Les protéines **p105** et **p100** se lient à NF-κB en se dimérisant avec des protéines NF-κB *via* leur **RHD** ou en interagissant *via* leur **ARD** avec des dimères NF-κB. Grâce à ces deux modes de liaisons, et leur fonction de précurseurs respectifs de p50 et p52, ils contrôlent la formation de dimères NF-κB et leur capacité à inhiber les dimères NF-κB latents et à les libérer en réponse à une stimulation cellulaire spécifique en fait d'authentiques inhibiteurs de NF-κB. En effet, il a été démontré qu'ils forment des complexes de poids moléculaire élevé, p105 et p100 étaient capables de réguler toutes les isoformes NF-κB [110].

b. Le complexe IKK (IκB Kinase)

Le complexe IKK a d'abord été identifié comme une énorme kinase qui phosphoryle IκBα sur ses résidus sérines 32 et 36, initiant ainsi sa dégradation par la sous-unité 26S du protéasome. Chen et al. démontrent que l'**ubiquitination d'IKK** est requise pour la **phosphorylation d'IκBα** et introduisent une nouvelle fonction de l'ubiquitination qui n'implique pas de protéolyse (Figure 5) [111].

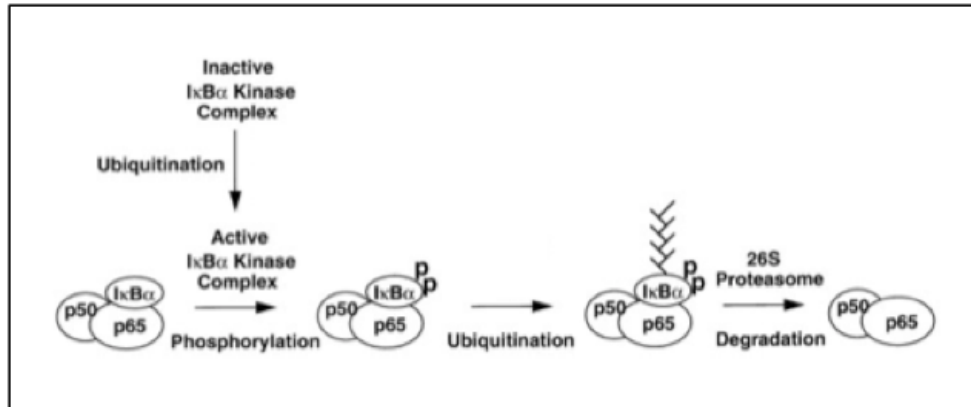


Figure 5. Induction par IKK de la dégradation d'IκBα par la sous-unité 26S du protéasome, selon Chen et al. [111]

Des études biochimiques ont permis d'établir que le complexe IKK d'un poids moléculaire d'environ 700 kDa est composé de **deux kinases IKKα (IKK1 ou CHUK) et IKKβ (IKK2)** et d'une troisième **protéine appelée NEMO (NF-κB Essential MODulator) ou IKKγ** (Figure 6). Cependant, la somme de ses trois sous-unités est de 220 kDa, ce qui suggère la présence de sous-unités additionnelles et qu'IKK présente une **structure oligomérique** [112]. D'autres protéines comme la protéine chaperonne Hsp90 [113] ou encore ELKS, une protéine régulant NF-κB [114] interagissent avec IKK et diverses études ont montré qu'en réalité plusieurs dimères IKKα/β s'assemblaient à des trimères ou des tétramères d'IKKγ grâce à des domaines et des motifs protéiques spécifiques (Figure 6). La constitution exacte du complexe IKK n'a pas été déterminée mais il est probablement constitué d'hétérodimères IKKα/IKKβ et d'homodimères NEMO dans une proportion **1 : 1 : 2 (IKKα₁ : IKKβ₁ : NEMO₂)**.

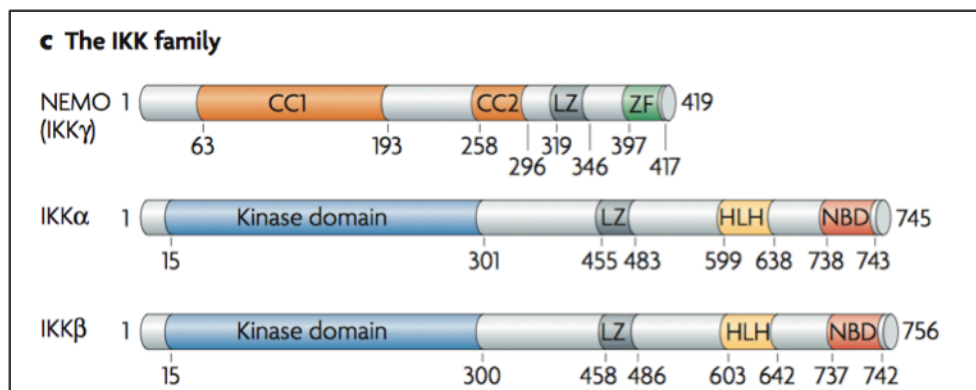


Figure 6. Les 3 sous-unités du complexe IKK : NEMO (IKKγ), IKKα et IKKβ. Les principaux motifs structuraux et le nombre d'acides aminés pour chaque protéine sont représentés. CC, coiled-coil; HLH, hélix-loop-helix; LZ, leucine-zipper; NBD, NEMO-binding domain; ZF, zinc-finger domain, selon Perkins et al. [81]

Pourvus d'un **domaine kinase (KD)**, **IKK α** et **IKK β** sont responsables de l'activité **catalytique** du complexe, tandis qu'**IKK γ** ou **NEMO** est la sous-unité **régulatrice**. La **dimérisation des sous-unités catalytiques** est requise pour l'activation d'IKK induite par la **phosphorylation** de certains résidus sérines des sous-unités catalytiques, respectivement les **résidus sérines 176 et 180 d'IKK α** et **177 et 181 d'IKK β** [14, 81, 87, 111, 112, 115-130].

Selon les stimuli, l'activation du complexe I κ B Kinase (IKK) est modulée par la phosphorylation de ses sous-unités catalytiques IKK α et IKK β par les IKK-kinases TAK1 et NIK et par l'ubiquitination de sa sous-unité régulatrice NEMO. Dans certaines conditions, l'oligomérisation de multiples complexes IKK en réponse à un stimulus activateur peut conduire à un phénomène d'autophosphorylation et d'auto-activation. L'activation des kinases du complexe I κ B Kinase (IKK) initie la phosphorylation et la dégradation subséquente des I κ B.

2. Les voies d'activation

A ce jour, deux voies d'activation de NF- κ B ont été clairement définies : **la voie canonique ou classique et la voie non canonique ou alterne**. Initiées par des récepteurs différents, elles mettent en jeu différentes sous-unités du complexe IKK et requièrent le recrutement et l'oligomérisation de protéines adaptatrices et d'E3 ubiquitine ligases⁴.

La **voie canonique** induite par de nombreux récepteurs, notamment le TNF récepteur et le récepteur des cellules T (TCR) conduit à l'activation **de NEMO et d'IKK β** et aboutit principalement à la translocation nucléaire des dimères **p50/RelA**.

Activée par un nombre plus limité de récepteurs, la **voie non canonique** est responsable de l'activation des complexes **p52/RelB** et requiert l'activation de la sous-unité **IKK α ou IKK1** (Figure 7) [40, 81, 131].

⁴ Les E3 ubiquitine ligases sont des enzymes impliquées dans les processus d'ubiquitination (page 32).

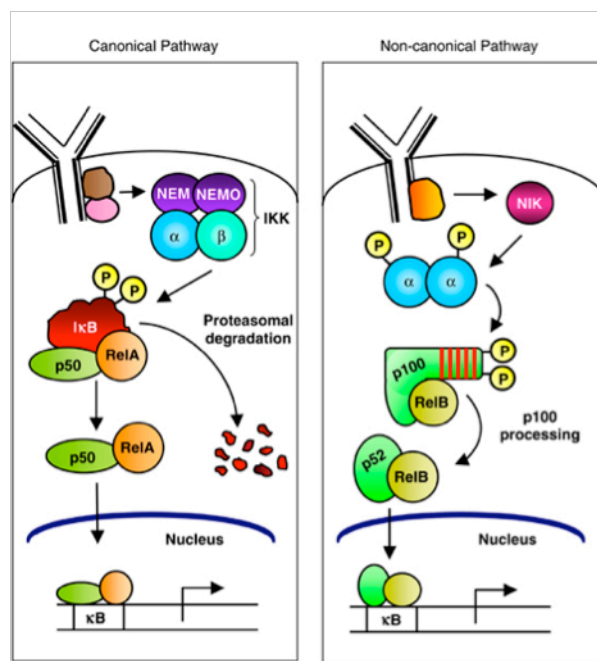


Figure 7. Les principales voies d'activation de NF-κB. La voie canonique et la voie non canonique. [40]

3. La signalisation NF-κB au cours de l'activation des lymphocytes T

Le facteur de transcription NF-κB est requis pour l'activation des lymphocytes T. Les récepteurs à la surface des lymphocytes T reconnaissent des antigènes protéiques, découpés en polypeptides, associés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou II et présentés par des cellules présentatrices d'antigène (CPA). La reconnaissance d'un antigène par le TCR associé au **complexe CD3 (Cluster de Différenciation 3)** constitué des sous-unités γ , δ , ϵ et ζ induit la signalisation associée à NF-κB et ainsi permet l'activation lymphocytaire. Pour que l'activation lymphocytaire soit optimale et n'aboutisse pas à une anergie, une co-stimulation du **récepteur CD28 (Cluster de Différenciation 28)** par la **protéine B7** présente à la surface des CPA activée est requise. Les lymphocytes T expriment également à leur surface des **TNF récepteurs** qui participent à cette **co-stimulation** (Figure 8) [132-137].

L'activation lymphocytaire s'accompagne d'une **augmentation de la concentration calcique intracellulaire** qui mène à l'activation d'un autre facteur de transcription : **le facteur nucléaire des lymphocytes T activés, NFAT**. La synthèse du facteur NF-κB **c-Rel** est directement contrôlée par NFAT, ce qui en fait un régulateur indirect de NF-κB⁵ [57, 63, 64, 138-140]. Avec RelA, c-Rel joue un rôle crucial dans l'activation lymphocytaire [45, 48, 141-143].

⁵ Voir Interlude sur NFAT (page 55)

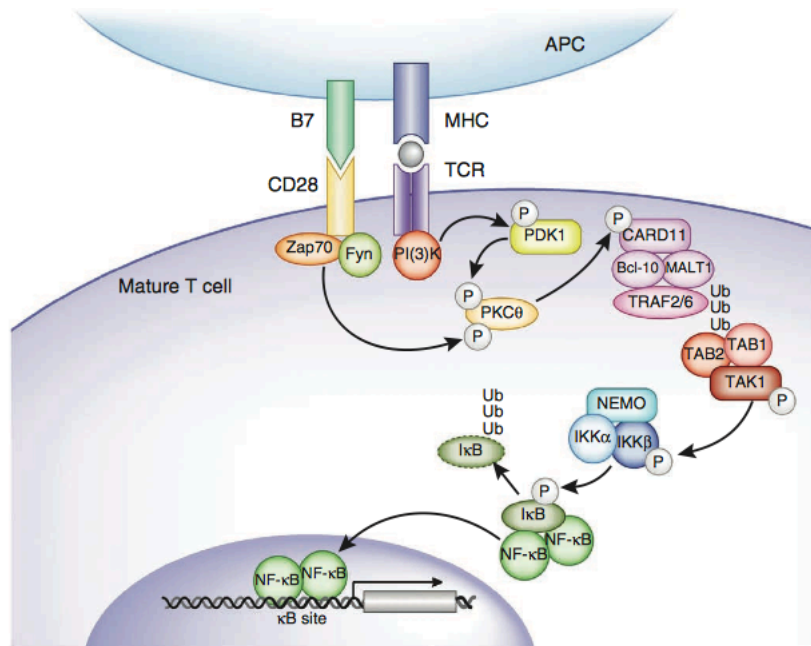


Figure 8. Signalisation associée NF-κB au récepteur des cellules T (TCR) [144]

L'activation de NF-κB lors d'une stimulation antigénique repose sur la formation d'un complexe multiprotéique de poids moléculaire supérieur à 1500 kDa contenant une multitude de protéines.

Parmi ces protéines, **CARMA1** (CARD-containing MAGUK protein 1), **BCL10** (B-cell lymphoma 10) et **MALT1** (Mucosa-Associated lymphoid tissue Lymphoma Translocation protein 1) s'assemblent pour former le CBM, un **complexe multiprotéique déterminant** pour la propagation du signal NF-κB (Figure 9).

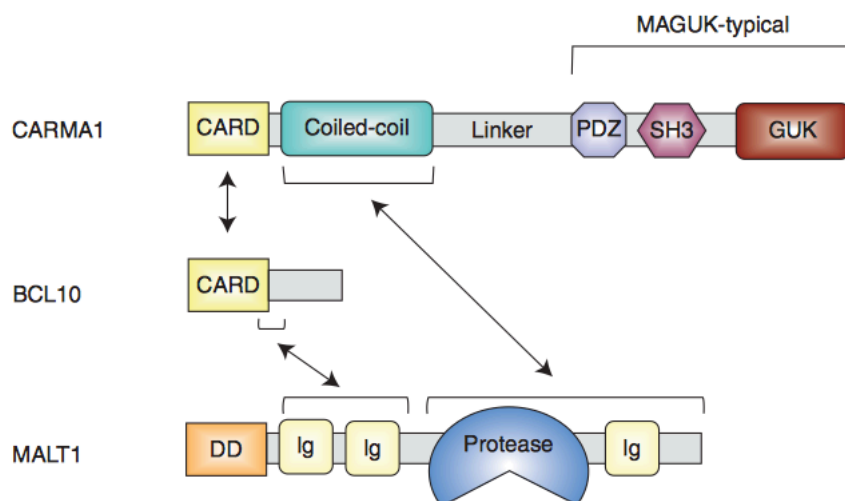


Figure 9. Structure moléculaire et domaines d'interaction de CARMA1, BCL10 et MALT1. CARMA1 possède un domaine amino-terminal de recrutement caspase (CARD) suivi d'un domaine coiled-coil et d'une région linker et d'un motif caractéristique des protéines de la famille des guanylate kinases associées aux membranes (MAGUK). BCL10 arbore un domaine CARD N-terminal suivi d'une structure non caractérisée C-terminale. Le domaine CARD et les 13 acides aminés suivants sont requis pour la liaison constitutive à MALT1. MALT1 contient un domaine de mort (DD) suivi de deux domaines Immunoglobulines-like (Ig) requis pour la liaison à BCL10. La partie carboxy-terminale de MALT1 contient un domaine protéase, un troisième domaine Ig et une extension de structure inconnue. Selon Thome et al. [145]

Des expériences menées dans des souris ou des lignées lymphocytaires déficientes pour CARMA1 ont révélé que son **domaine CARD** (Caspase Recruitment Domain) est **essentiel à l'activation de NF- κ B** associée à la mitose des lymphocytes T primaires mais aussi à celle induite par le TCR des lymphocytes T matures. De plus, les souris exprimant un mutant de CARMA1 dépourvu de son domaine CARD (Δ CARD) présentent un défaut de développement et de prolifération des lymphocytes B. *Via* son domaine CARD, la **protéine d'échafaudage** CARMA1 (ou CARD11) joue donc un rôle crucial dans **la prolifération des lymphocytes T et B** et dans la cascade de signalisation induite par **l'engagement des récepteurs antigéniques** [146-150].

Des expériences similaires ont permis de définir le rôle de **BCL10** dans l'activation lymphocytaire. BCL10 est une **protéine CARD** identifiée dans les lymphomes de type MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) [151]. Les embryons BCL10^{-/-} viables présentent une réponse immune déficiente caractérisée notamment par un dysfonctionnement des lymphocytes. L'étude de ces lymphocytes a permis d'établir que BCL10 connecte le récepteur antigénique des lymphocytes T et B à l'activation de NF- κ B et participe ainsi à la **régulation positive de l'activation et de la prolifération lymphocytaires** [152].

BCL10 forme un hétérodimère constitutif avec la protéine MALT1 [153-155]. A l'origine, MALT1 a été identifié à partir d'une translocation chromosomique, t(11;18)(q21;q21) retrouvée dans les lymphomes de type MALT dérivés de lymphocytes B. De cette translocation résulte la fusion du gène MALT1 avec le gène cIAP2 (cellular Apoptosis Inhibitor-2), à l'origine de la protéine cIAP2-MALT1 qui active de façon constitutive NF- κ B [155, 156]. La **synergie entre MALT1 et BCL10** permet l'activation de NF- κ B [155]. Des expériences de mutagenèse menées dans des cellules Jurkats (lymphocytes T) démontrent que MALT1 joue un rôle fondamental dans **l'activation de NF- κ B induite par le TCR**. L'activation lymphocytaire s'accompagne du recrutement de MALT1 au niveau des rafts lipidiques par CARMA1. [153, 154, 157, 158]. Telle une protéine d'échafaudage, MALT1 fait le lien entre CARMA1, BCL10 et TRAF6 pour activer le complexe IKK [156, 159]. En réponse à l'engagement des récepteurs antigéniques, BCL10 catalyse l'oligomérisation de MALT1 et des **chaînes d'ubiquitine de type K63⁶** sont alors fixées sur MALT1 fournissant ainsi une surface d'ancrage pour le **recrutement de NEMO, la sous-unité régulatrice d'IKK** [120]. Le clivage des chaînes d'ubiquitine conjuguées à MALT1 corrèle avec une réapparition d'I κ B α , ce qui indique une **régulation de l'activité d'IKK par MALT1** (Figure 10) [155, 156, 159, 160].

⁶ L'ubiquitination de type K63 est non dégradative (page 29).

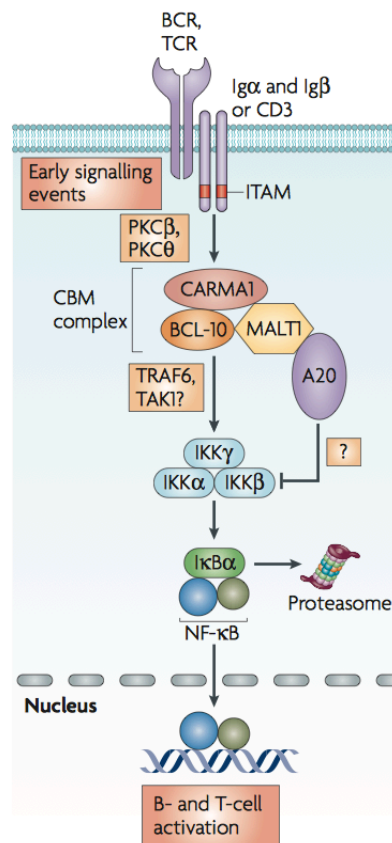


Figure 10. BCL10 et MALT1 coopèrent au cours de l'activation de NF-κB en réponse à l'engagement du BCR et du TCR. BCL10 ; B-cell lymphoma 10, MALT1 ; Mucosa-associated-lymphoid-tissue lymphoma-translocation gene 1, ITAM ; Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, BCR,TCR ; B- and T-cell receptor, CARMA1 ; caspase-recruitment domain (CARD)-containing membrane-associated guanylate kinase protein 1, IKK ; Inhibitor of NF-κB (IκB) kinase complex, TRAF6 ; Tumour-necrosis-factor-receptor-associated factor 6, TAK1 ; transforming-growth-factor--activated kinase 1, PKC, protein kinase C. [156]

MALT1 joue un **rôle mineur** dans la signalisation IKK/IκBα/p65 associée au BCR mais en initiant la **dégradation des molécules IκBβ**, il contrôle la **translocation nucléaire de c-Rel** [161].

Tout comme les protéases, MALT1 possède des résidus cystéines et histidines très conservées qui lui confèrent une **activité catalytique** dont les fonctions commencent à être élucidées. [145, 162, 163]. L'étude de l'inhibition pharmacologique de l'activité catalytique de MALT1 dans des ABC DLBCL (Activated B Cell like Diffuse Large B cell lymphoma), des lignées de lymphomes dérivées de cellules B et dépendantes de l'axe CBM/IKK pour l'activation de NF-κB a mis en évidence l'importance de l'activité paracaspase de MALT1 pour la signalisation NF-κB dans les lymphocytes B [164]. Rebeaud et al. démontrent qu'il en est de même dans les lymphocytes T où, bien que le clivage de BCL10 par MALT1 ne soit pas requis pour l'activation de NF-κB en réponse à la stimulation du TCR, la **fonction catalytique de MALT1 est nécessaire à une activation optimale de NF-κB** [156, 165].

D'autres protéines telles que les déubiquitinases⁷ A20 [166] et CYLD [167], la regnase-1[168] ou encore RelB sont des substrats de MALT1 mais **seul le clivage de RelB par MALT1 participe à la régulation de NF-κB** au cours de l'activation lymphocytaire, ce clivage étant un pré-requis à la dégradation de RelB, aussi appelé i-Rel, en raison de sa fonction de régulateur négatif de NF-κB [70, 156].

Il est également important de noter que l'augmentation de la **concentration calcique intracellulaire** qui accompagne l'activation du TCR joue un rôle crucial dans l'assemblage du CBM. En effet, la réduction de l'expression par ARN interférence de la calcineurine, une phosphatase dont l'activité dépend des flux calciques a pour conséquence une diminution de l'activation de NF-κB et de la formation du complexe CBM. Il apparaît également que l'utilisation d'inhibiteurs de la calcineurine induit une augmentation de la phosphorylation basale de BCL10 et que cette phosphatase interagit avec le CBM. En déphosphorylant BCL10, **la calcineurine** favoriserait la formation du CBM [169].

L'activation de NF-κB par le CBM est un processus séquentiel qui met en jeu une série de **modifications post-traductionnelles**. De multiples **phosphorylations de CARMA1** dans sa région linker, notamment par **la protéine kinase C θ**, induisent un changement conformationnel de CARMA1 et ainsi l'exposition de son **domaine CARD** [170, 171]. *Via* ce domaine CARD, CARMA1 interagit avec BCL10 et MALT1, formant ainsi le CBM.

Au sein du CBM, **l'ubiquitination de MALT1** autorise le recrutement du complexe IKK *via* **NEMO**. IKK va alors favoriser les interactions entre la sous-unité catalytique **IKKβ** et l'IKK-kinase TAK1[87]. La **phosphorylation d'IKKβ** sur ses résidus sérines 177 et 181 par **TAK1** permet son activation [14, 80, 117, 172-175]. IKKβ **phosphoryle IκBα** (inhibiteur spécifique de p65) sur ses résidus sérines 32 et 36 et induit ainsi son **ubiquitination de type K48**⁸ et sa dégradation subséquente par le protéasome [88, 89, 95]. La dégradation d'IκBα autorise alors la translocation nucléaire de **NF-κB** [15].

De la stimulation des récepteurs membranaires à l'initiation de la transcription, la cascade d'activation de NF-κB met en jeu une multitude de protéines et de modifications post-traductionnelles, notamment l'ubiquitination.

⁷ Les déubiquitinases clivent la liaison entre l'ubiquitine et la lysine d'un substrat ou entre les molécules d'ubiquitine (page 38)

⁸ La polyubiquitination de type 48 conduit à la dégradation de la protéine ciblée (page 29).

II. L'ubiquitination

1) L'ubiquitination, le leitmotiv

L'ubiquitine ou UBIP (Ubiquitous Immunoproteic Polypeptide) a été découverte en 1975 par Goldstein et al. et définie comme un polypeptide ubiquitaire de 8,5 kDa capable d'induire la différenciation des lymphocytes T et B *in vitro* [176, 177].

Grâce à leurs travaux de 1979 et 1980 visant à comprendre par quels mécanismes l'ATP participe à la dégradation protéique, Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose caractérisent l'ubiquitine, sous le nom de **APF-1** (ATP-dependent Proteolysis Factor 1). La liaison covalente de l'APF-1 à une protéine-cible conduit à sa **dégradation par le protéasome** *via* une série de réactions dépendantes de l'ATP [178-181]. Ce mécanisme correspond au système **UPS (Ubiquitin Proteasome System)** [182].

Environ 25 ans plus tard, le trio se voit décerner le **prix Nobel de chimie** pour la caractérisation de l'ubiquitine [181, 183-185] et des centaines de publications décrivent son implication dans des processus physiologiques variés tels que le cycle cellulaire, le trafic membranaire, la réponse immune mais aussi dans des processus pathologiques comme la tumorigenèse ou le développement de certaines maladies neurodégénératives.

L'ubiquitination participe à la régulation de nombreux réseaux de signalisation et module des paramètres déterminants pour les protéines ciblées tels que leur stabilité, leur localisation ou encore leur activité [177, 186-195]. Lorsque cette modification post-traductionnelle cible un ou plusieurs résidus lysines d'une protéine, il s'agit respectivement de **mono-ubiquitination** ou de **multimono-ubiquitination**.

En 1989, Chau et al. découvrent que les 7 résidus lysines de l'ubiquitine peuvent également être la cible de processus d'ubiquitination et un nouveau type d'ubiquitination est alors défini: la **polyubiquitination** (Figure 11) [193, 196]. **Différents types de polyubiquitination** sont décrits selon le résidu lysine de l'ubiquitine impliqué (Figure 12) [192, 197-199].

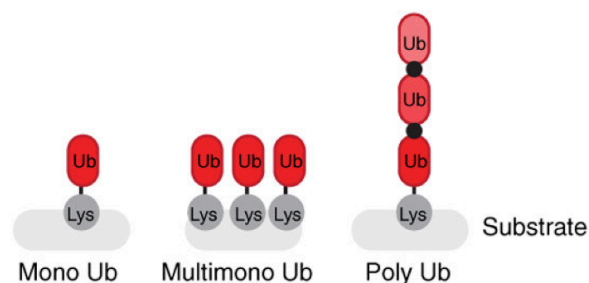


Figure 11. Mono-, Multimono- et poly- ubiquitination, selon Behrends & Harper [193].

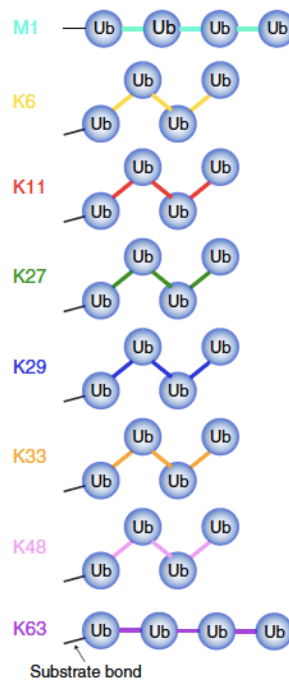


Figure 12. Huit types de liaison des chaînes d'ubiquitine. Sept mettent en jeu un résidu lysine K de l'ubiquitine tandis que l'ubiquitination linéaire utilise l'acide aminé N-terminal de l'ubiquitine, la méthionine (M1) [199].

Le type d'ubiquitination détermine le **devenir de la protéine ciblée**. Alors que l'ubiquitination de type K48, polyubiquitination impliquant le résidu 48 de l'ubiquitine, destine sa cible à la dégradation par le protéasome et que l'ubiquitination de type K63 module les interactions protéine-protéine, d'autres types d'ubiquitination auraient d'autres **fonctions non protéolytiques** encore méconnues et sont l'objet de nombreuses études (Figure 13) [177, 187, 192, 193, 198, 200-203].

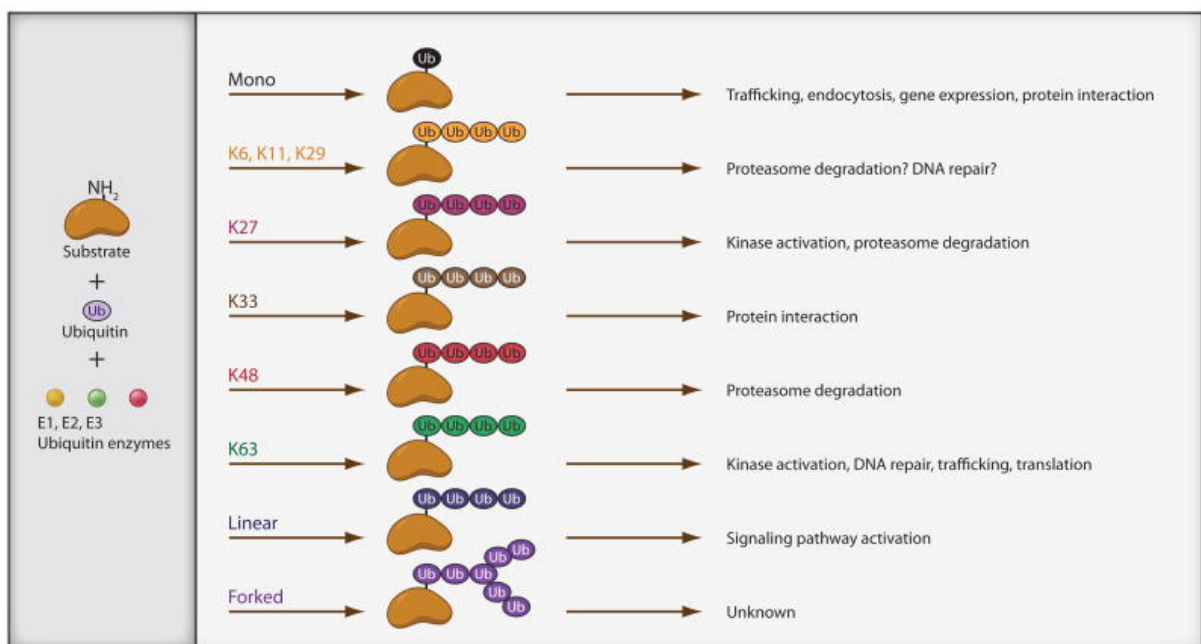


Figure 13. Le type d'ubiquitination définit le devenir du substrat et résulte en différents types de réponses cellulaires. [201, 202].

Il est intéressant de noter que la plupart des cellules contiennent des **chaînes de polyubiquitine « libre »** *id est non ancrées à un substrat* [204]. Heride et al. démontrent que plus d'un tiers de ces chaînes « libres » est en réalité lié à des ubiquitine ligases à l'état quiescent [192, 199].

De plus, certaines de ces chaînes « libres » peuvent être synthétisées par des E2 sans l'aide d'une E3 [192, 205].

Récemment, Chen et al. proposent une explication quant à la génération de ces chaînes libres. En effet, lorsque les enzymes productrices de chaînes d'ubiquitine sont proches d'accepteur d'ubiquitine, elles leur transmettent, ce qui permet l'initiation de la signalisation associée, les déubiquitinases ou protéases spécifiques de l'ubiquitine cliveraient alors les chaînes d'ubiquitine afin de prévenir l'excès de chaînes d'ubiquitine et des activations inutiles [206]. Ils démontrent aussi que des chaînes de polyubiquitine de type K63 libres peuvent se lier à la protéine TAB2, une sous-unité du complexe de kinases TAK1 et activer l'autophosphorylation et l'activation subséquente de TAK1 [207]. Ils soulignent également que la plupart des réactions d'ubiquitination génèrent beaucoup plus de chaînes libres d'ubiquitine que de chaînes liées à une cible et que les chaînes d'ubiquitine de type K63 libres endogènes sont **actives *in vitro***, bien que leur rôle reste à déterminer [206].

Les mécanismes mis en jeu pendant l'ubiquitination, l'étendue de ses fonctions et sa myriade de cibles sont encore méconnus. Toutefois, il apparaît qu'en ciblant les protéines, elle distribue les rôles et met tout le monde au diapason.

2) L'ubiquitination, la valse à trois temps.

L'ubiquitination correspond à la formation d'une **liaison isopeptidique** entre le groupe amine primaire (ϵ -amino) d'un **résidu lysine** d'une protéine et le domaine carboxy-terminal de l'ubiquitine. L'assemblage des chaînes d'ubiquitine est un processus séquentiel en 3 étapes catalysées par **3 types d'enzymes** : E1 ou UBE1 (Ubiquitin-activating Enzyme 1), E2 ou UBC (Ubiquitin-Conjugating enzyme) et E3 ou E3 ubiquitine ligase (Figure 14) [194, 208, 209].

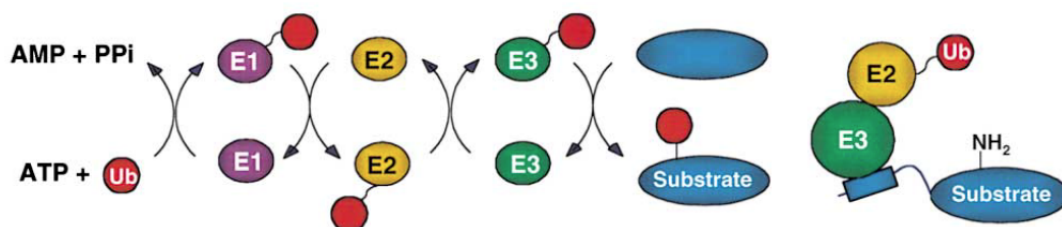


Figure 14. Cascade de liaison de l'ubiquitine (à gauche). L'ubiquitine est activée par l'E1, puis conjuguée par l'E2 puis transférée sur un résidu lysine (ou un acide aminé N-terminal) d'un substrat par les E3 ubiquitine ligases (ici est représenté le mécanisme utilisé par les HECT). **Spécificité de liaison** (à droite) Les E3 se lient au substrat et aux E2 *via* des sites distincts. Le substrat est souvent reconnu *via* un signal d'ubiquitination ou « degron » (boîte bleue), selon Pickart et al. [198]

Viennent ensuite les **déubiquitinases (DUBs) ou protéases spécifiques de l'ubiquitine**, souvent complexées aux E3 ligases, qui clivent les molécules d'ubiquitine sur le substrat (Figure 15) [210, 211]. En effet, comme la plupart des modifications post-traductionnelles, cette réaction **ATP-dépendante est réversible**.

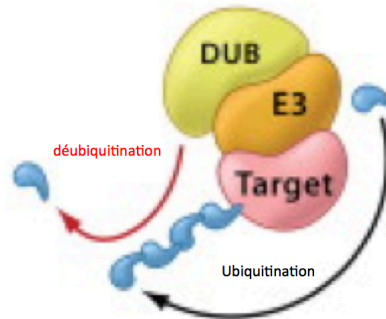


Figure 15. Ubiquitination/déubiquitination par un complexe E3/DUB, selon Nijman et al. [210].

1. L'E1 ou l'enzyme qui active l'ubiquitine

Pendant longtemps, **une seule enzyme d'activation de l'ubiquitine E1 ou UBE1** a été décrite chez l'Homme mais récemment d'autres protéines ayant des propriétés semblables à UBE1 ont été identifiées, notamment UBE6 (Ubiquitin-activating Enzyme 6) et UBE1L2 (Ubiquitin-activating E1-like protein 2) [202, 212, 213].

L'enzyme d'activation **E1** utilise de l'ATP pour générer une **liaison thioesther** entre le résidu cystéine de son site actif et le domaine carboxy-terminal de l'ubiquitine. L'ubiquitine est ensuite transférée sur le résidu cystéine du site actif de l'enzyme de conjugaison **E2 ou UBC (Ubiquitin-Conjugating enzyme)** qui coopère avec l'**E3 ligase ou E3 ubiquitine ligase** pour ubiquitinyler le substrat (Figure 16). **Diverses combinaisons d'E2 et d'E3 ligases** collaborent avec l'E1 pour catalyser la fixation de différents types de chaînes d'ubiquitine sur des substrats spécifiques [192, 201, 214, 215].

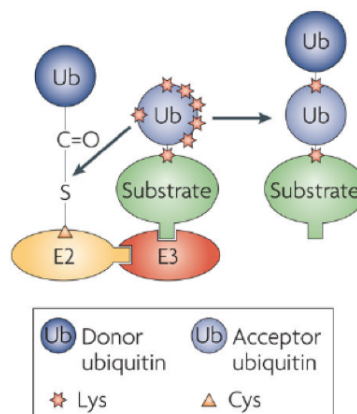


Figure 16. Modèle de sélection du type d'ubiquitine par les E2s. L'E2 oriente l'ubiquitine acceptrice afin que soit exposé à son site actif uniquement un résidu lysine privilégié et permet la formation d'un certain type de chaînes d'ubiquitine, selon Ye et al. [201]

2. Les E2 ou les enzymes de conjugaison

In silico, environ **40 enzymes de conjugaison E2** ont été décrites et classées en 17 sous-familles selon des analyses phylogénétiques [201, 216]. Toutes les E2 partagent un **domaine globulaire d'environ 150 résidus** et certaines possèdent aussi des domaines amino- ou carboxy- terminaux qui moduleraient leur association avec les E3 ligases, leur activité intrinsèque ou leur capacité à reconnaître leurs substrats. La liaison des E2 à certains co-facteurs influence aussi leur localisation, leur activité et leur spécificité [201, 217].

Les E2 ont une **faible affinité pour l'ubiquitine**, l'E1 joue donc un rôle essentiel dans l'interaction entre l'E2 et l'ubiquitine [194, 200]. Elles sont pourvues d'un **domaine UBC** (Ubiquitin Conjugating domain) qui leur permet d'interagir avec l'E1, d'y récupérer l'ubiquitine activée et non une molécule apparentée ou UBL (Ubiquitin-Like modifier) et de solliciter l'E3 ligase appropriée [201].

Des études menées en bioinformatique ont permis de décompter plus de 700 E3 ubiquitine ligases, les E2 peuvent donc interagir **avec différentes E3 ubiquitine ligases** pour catalyser l'ubiquitination des substrats [201, 202]. Bien que les mécanismes impliqués dans l'activation allostérique des E2 restent méconnus, un résidu hydrophobe très conservé (Ile) a été identifié comme un médiateur possible entre les E3 et les E2s. Les E2 présentent une **faible affinité pour les E3 ligases**, ce qui facilite la formation de chaînes d'ubiquitine étant donné que les sites d'interaction des E2 avec les E1 et les E3 se chevauchent [201, 218].

Les E2s peuvent catalyser **le transfert d'ubiquitine** sur les résidus lysines d'un substrat ou sur les résidus lysines de l'ubiquitine elle-même permettant ainsi la **polyubiquitination**. Elles peuvent donc participer à **l'initiation et/ou à l'élongation de chaînes d'ubiquitine** [192, 201, 219]. De plus, leur capacité à former des oligomères, à transférer en bloc des chaînes d'ubiquitine pré-assemblées au niveau de leur site actif et à moduler l'affinité des E3 ligases permet aux E2 de réguler la **processivité de l'ubiquitination** [201, 220].

Par ailleurs, la formation de liaison non covalente entre l'E2 et le substrat va exposer des résidus spécifiques du substrat, ce qui va moduler **le type de chaînes d'ubiquitine** qui lui sera fixé et par conséquent son devenir (Figure 16) [201, 221].

3. Les E3 ou E3 ubiquitine ligases (E3 ligases)

Le nombre d'E3 ubiquitine ligases ne cesse de croître. A ce jour, plus de **700 E3 ubiquitine ligases** ont été définies *in silico*. Elles sont directement responsables de l'extraordinaire diversité de substrats de l'ubiquitination[208].

Très tôt, elles ont été décrites comme des **passerelles entre les E2 et les substrats** [222] et divers mécanismes et modifications post-traductionnelles se sont révélés capable de moduler la reconnaissance des substrats par les E3 (Figure 17) [186, 223].

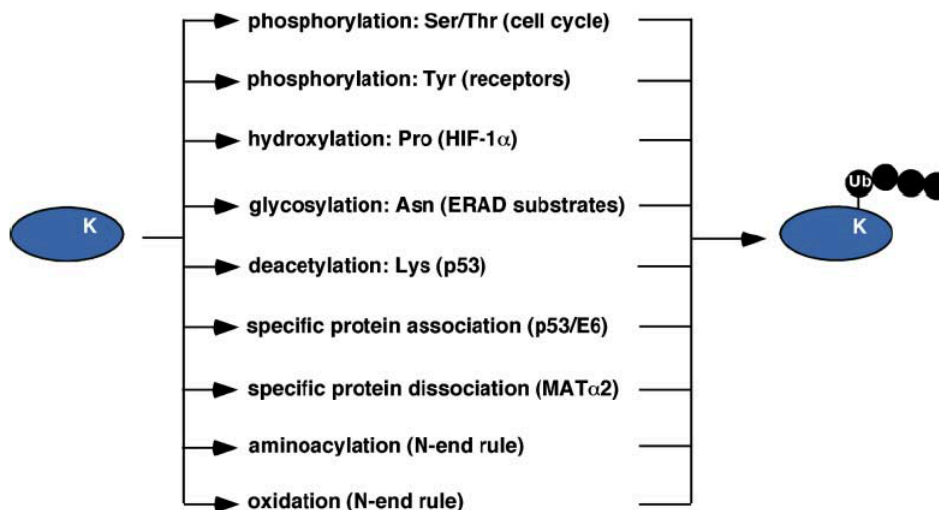


Figure 17. Mécanismes modulant la reconnaissance des substrats par les E3 ligases, selon Pickart et al. [186]

Bien que de nouvelles familles d'E3 ligases aient été récemment décrites [224-226], les E3 ligases sont classées en fonction de leur domaine caractéristique en 2 familles principales : les **HECT (Homologous to E6Ap Carboxy Terminus)** et les **RING (Really Interesting New Gene)** [186, 194, 227].

a. Les HECT (Homologous to E6Ap Carboxy Terminus)

Au nombre de 30 chez l'Homme, les HECT doivent leur nom à **E6-associated protein (E6AP ou UBE3A)**, la première HECT E3 ligase identifiée [228]. Elles ont de **multiples implications**, notamment dans le trafic cellulaire, les réponses immunes et certaines voies de signalisation [229-231]. Alors que leur domaine amino-terminal est variable et module l'interaction avec le substrat, elles possèdent toutes un domaine **HECT carboxy-terminal** ($\approx$ 350 acides aminés) partagé en deux lobes, un lobe amino-terminal **N-lobe** qui interagit avec l'E2 et un carboxy-terminal **C-lobe** qui contient le site actif permettant la liaison thioesther avec l'ubiquitine (Figure 18) [229]. Il est intéressant de noter que la spécificité de liaison des chaînes d'ubiquitine est intrinsèquement dépendante des 60 derniers résidus du domaine C-lobe [231, 232] .

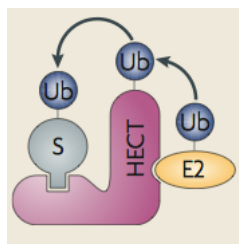


Figure 18. Mécanisme de fonctionnement des HECT E3 ubiquitine ligases. Les HECT E3s ligases contiennent une cystéine catalytique conservée qui joue le rôle d'accepteur d'ubiquitine. L'ubiquitine est ensuite transférée à un résidu lysine spécifique du substrat, selon Rotin et al. [229]

b. Les RING (Really Interesting New Gene)

Avec ses 600 membres, la famille des RING E3 ligases est non seulement **la plus grande famille d'E3 ligases** mais aussi l'une des plus vastes familles d'enzymes chez l'Homme. Elles sont impliquées dans la régulation d'innombrables processus cellulaires et dans de nombreuses maladies humaines [223, 227, 231, 233]. Initialement découvert par Freemont et al. en 1991 [234], le **domaine RING** est un domaine zinc-finger de 40 à 60 résidus, qui se distingue par un **motif spécifique riche en cystéines** (Figure 19a). Sa structure 3D révèle que les résidus cystéines et le résidu histidine sont enfouis au cœur du domaine et permettent le maintien de l'ensemble de la structure en se liant à deux atomes de zinc (figure 19b). D'autres résidus moins conservés sont impliqués dans la formation du cœur hydrophobique ou dans le recrutement d'autres protéines [223, 235].

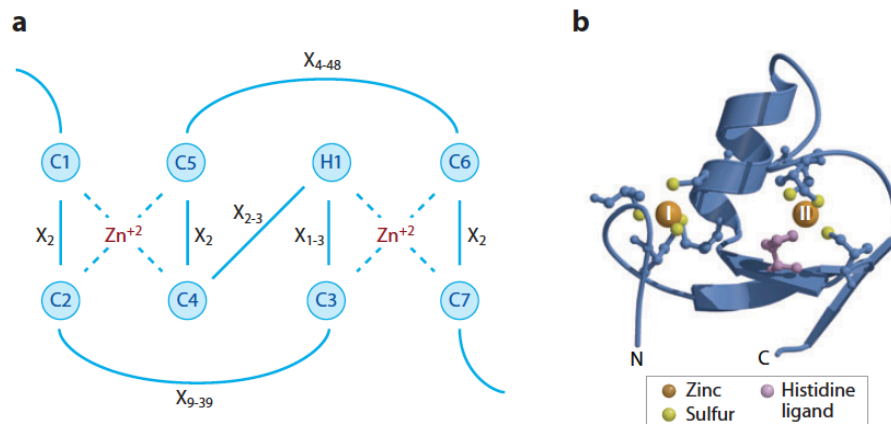


Figure 19. The RING finger domain. (a) La séquence primaire du domaine RING. C1-7 : Résidu cystéine 1 à 7; H1: Histidine H1. (b) Structure cristallographique tridimensionnelle du domaine RING de l'E3 ubiquitine ligase Cbl murin, selon Deshaies et al. [223].

Contrairement au domaine HECT, le domaine RING finger ne forme pas d'intermédiaire catalytique avec l'ubiquitine. Le domaine RING finger **recrute l'E2 liée à l'ubiquitine** et l'active pour qu'elle transfère l'ubiquitine sur la cible (Figure 20). Diverses études suggèrent que le domaine RING est **capable d'activer allostériquement l'E2** [223, 231, 236].

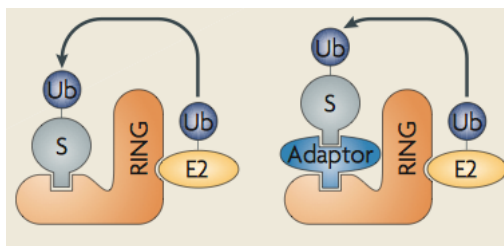


Figure 20. Mécanisme de fonctionnement des RING E3 ubiquitine ligases. Les RING E3 ligases favorisent l'interaction entre les E2s et les substrats, selon Rotin et al. [229].

Les RING E3 ligases fonctionnent sous forme de monomères ou de complexe multiprotéiques. Leur dimérisation se fait *via* leur domaine RING ou des régions voisines et peut conduire à la formation d'homodimères ou d'hétérodimères. Souvent, au sein des hétérodimères, un des domaines RING est inactif et sert d'adaptateur ou de stabilisateur du domaine RING actif [231]. Les RING E3 peuvent catalyser la mono-ubiquitination ou la synthèse de chaînes de polyubiquitine en utilisant **divers mécanismes** (Figure 21) [223, 231].

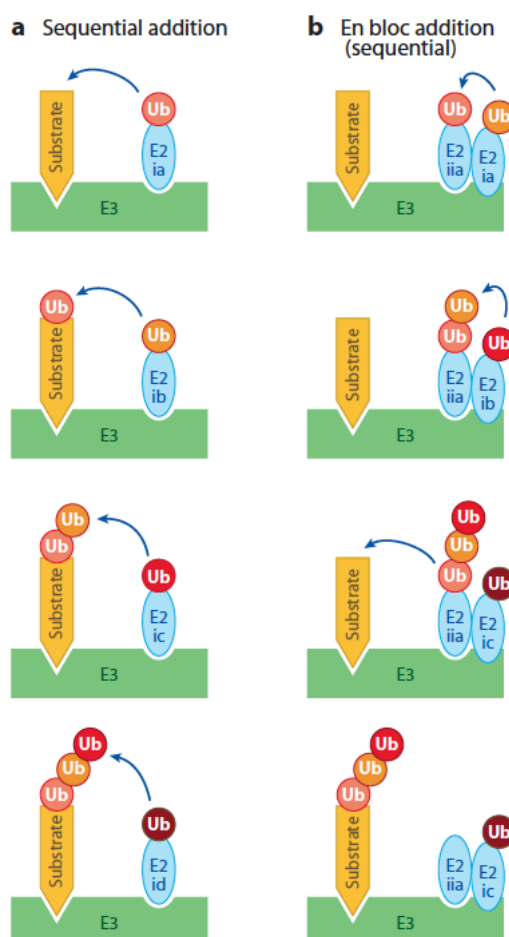


Figure 21. Les RING E3 utilisent probablement différents mécanismes pour catalyser l'ubiquitination. Le modèle séquentiel (a), une addition successive de molécules d'ubiquitine à un substrat *via* différentes E2. L'addition en bloc (b), des chaînes pré - assemblées sont transférées en bloc sur le substrat. Dans ce modèle, l'E3 recrute deux E2 dont une accumule les molécules d'ubiquitine transmises par l'autre, selon Deshaies et al. [223].

75% des RING protéines renferment un autre domaine ou motif selon l'analyse bioinformatique de leur séquence primaire. Ces domaines variables sont impliqués dans des processus biologiques divers, notamment la signalisation. En fonction de ces domaines et de l'homologie de séquence de ces protéines, des **sous-familles de RING** ont été définies. La plus grande sous-famille est constituée des **76 TRIM/RBCC (Tripartite motif /RING finger, B-box and coiled-coil) protéines** [223].

Les TRIM/RBCC protéines

Les protéines TRIM ont été caractérisées au cours des années 90 [237-239]. Des études phylogénétiques ont montré que des gènes codant pour les protéines TRIM sont présents chez l'Homme mais aussi chez tous les métazoaires et chez certains organismes invertébrés. Le grand nombre de gènes TRIM/RBCC chez les eucaryotes supérieurs suggère une évolution rapide de cette famille. A l'exception de quelques membres qui partagent un haut degré de conservation, toute la famille se caractérise par une homologie de séquence primaire relativement faible. Seuls les résidus cystéine et histidine qui définissent les types de RING et B-box et les résidus hydrophobes qui participent au maintien du domaine TRIM et à sa fonction sont très conservés. Il est intéressant de noter que le domaine RING et B-box sont absents chez les procaryotes qui ne disposent d'un système d'ubiquitination. Le domaine B-box est également absent chez les virus et les champignons [240, 241].

Les protéines TRIM transfèrent l'ubiquitine sur des substrats spécifiques mais sont aussi impliquées dans les modifications ubiquitine-like (UBL) (Figure 22) [242].

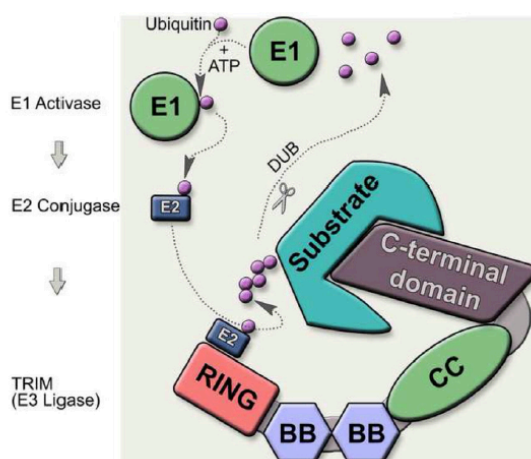


Figure 22. Modèle de fonctionnement des TRIM E3 ubiquitine ligase. Les protéines TRIM reconnaissent l'E2 *via* leur RING domaine et interagissent avec le substrat, généralement *via* leur domaine C-terminal, selon Rajsbaum et al. [242]

Les membres de la famille TRIM sont impliqués dans une pléthore de processus biologiques et physiologiques comme les réponses immunes ou la régulation des récepteurs nucléaires mais aussi dans des processus pathologiques comme les cancers ou les maladies génétiques [242, 243].

Les domaines RING, B-box et coiled-coil (CC) sont toujours organisés dans le même ordre du N- au C-terminal ce qui suggère une fonction modulaire du motif tripartite.

Exclusivement présents dans la famille TRIM, les domaines B-box sont structurellement apparentés au domaine RING. Requis pour la fonction biologique de beaucoup de protéines TRIM, leur rôle est encore mal défini. Toutefois, il a été démontré que les B-box de TRIM18/MID1 sont mono-ubiquitinylées et que la B-box1 amplifie l'activité E3 ligase du domaine RING [244]. Il reste encore à déterminer si cette propriété est partagée par toutes les protéines TRIM.

Invariablement située après la B-box2, le domaine CC (coiled-coil) est une région hélicoïdale de 100 résidus. Dans la famille TRIM, ce domaine est impliqué dans les homo- et les hétéro - interactions promouvant ainsi la formation de complexes de poids moléculaires élevés et dans la définition de compartiments subcellulaires spécifiques de TRIM (Figure 23) [240, 242, 245, 246].

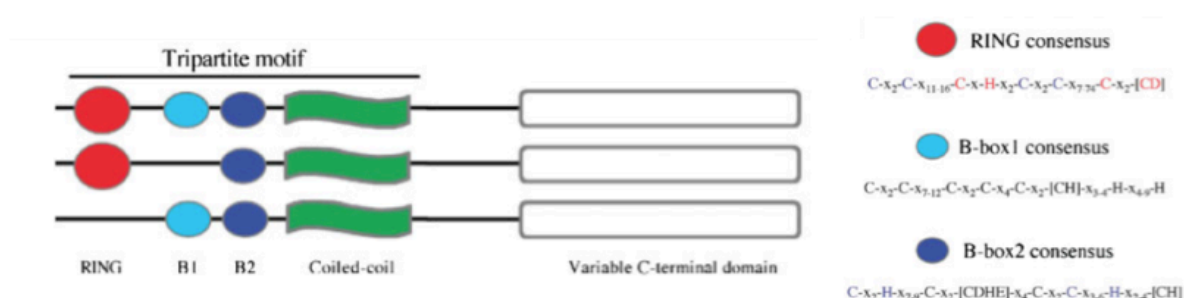


Figure 23. Représentation des domaines composant les protéines TRIM, selon Meroni et al.[240]

Les TRIM protéines sont subdivisées en sous-famille en fonction de leurs domaines carboxy-terminaux. Leur participation à la fonction des protéines TRIM est encore mal définie.

Approximativement 60% des protéines TRIM possède un domaine PRY-SPRY, qui semble fonctionner comme un module de ciblage. D'autres domaines carboxy-terminaux moins fréquents peuvent être présents seuls ou en différentes combinaisons. La sous-famille C-VIII (Figure 24) est caractérisée par la présence d'un domaine MATH (Meprin And TRAF-Homology domain), ce qui suggère une potentielle connexion au cours de l'évolution entre les protéines TRIM et les ubiquitine ligases TRAF qui possèdent un domaine MATH similaire [240, 247].

Seules les deux TRIM protéines TRIM13 et TRIM59 disposent d'un domaine transmembranaire (TM) (Figure 24) [246, 247].

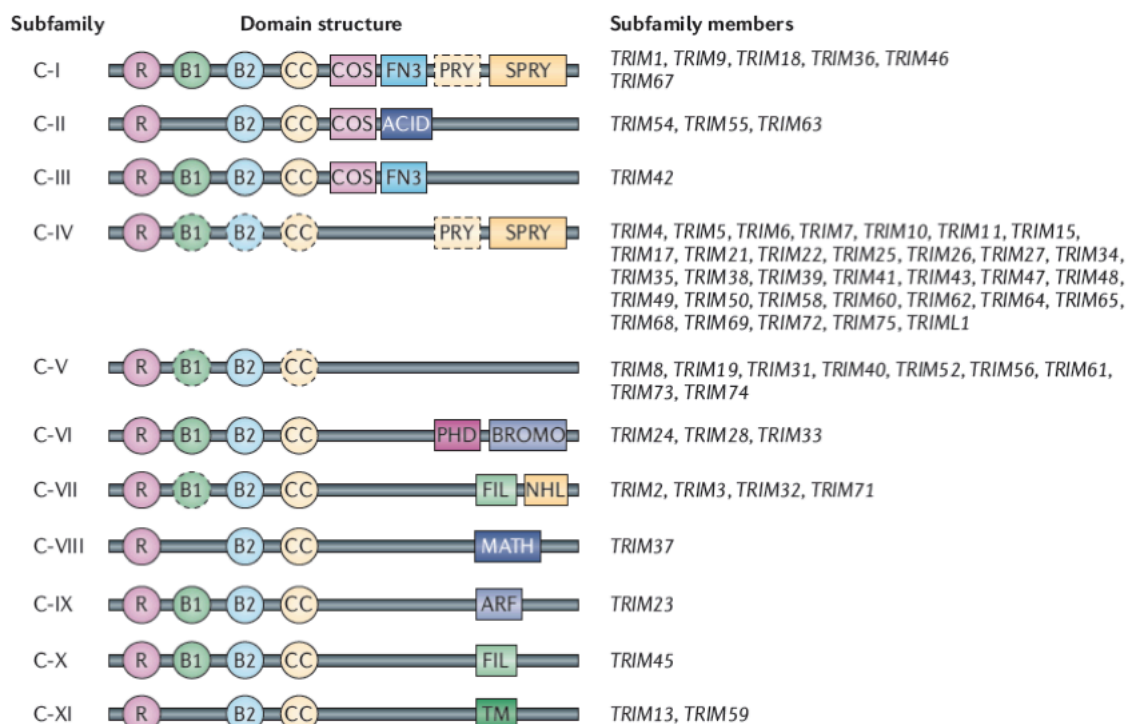


Figure 24. Classification des sous-familles TRIM. La plupart des protéines TRIM ont un domaine RING (R), un ou deux domaines B-box (B) et un domaine coiled-coil (CC) et sont classées en fonction de leurs autres domaines caractéristiques. ACID, acid-rich region; ARF, ADP-ribosylation factor family domain; BROMO, bromodomain; COS, cos-box; FIL, filamin-type I G domain; FN3, fibronectin type III repeat; MATH, meprin and TRAF-homology domain; NHL, NCL1, HT2A and LIN41 domain; PHD, PHD domain; PRY, PRY domain; SPRY, SPRY domain; TM, transmembrane région, selon Hatakeyama et al. [243]

4. Les déubiquitinasés (DUB)

En 1993, Papa et Hochstrasser découvrent l'oncogène *trc-2* chez l'Homme, une enzyme déubiquitinante similaire à celle retrouvée chez la levure, Doa4 [248].

Aujourd'hui, on dénombre près de **100 protéases spécifiques de l'ubiquitine ou déubiquitinasés (DUB)** codées par le génome humain. Elles sont classifiées en **6 familles** en fonction de la structure de leur **domaine catalytique** et donc de leur mécanisme d'action subséquent : les OTU (Ovarian Tumor proteases), les MCPIP (Monocyte Chemotactic Protein-Induced Protein), les MJD (Machado-Joseph Disease protein domain protéases), les JAMM (JAB1/MPN/Mov37 Metalloproteases) et les USP qui avec ses 60 membres pourvus d'un domaine **USP (Ubiquitin Specific Proteases)** très conservé constituent **la plus vaste famille de DUB chez l'Homme**. Comme le nombre d'E3 ligases, le nombre d'USP a augmenté au cours de l'évolution, ce qui suggère une relation intime entre ces deux enzymes résultant de leur co-évolution [210]. Les premières USP sont caractérisées chez la levure [249] puis en 1998, USP1 est identifiée chez l'Homme [250].

Toutes les familles de DUB sont des cystéine protéases à l'exception des JAMM qui appartiennent à la classe des zinc-métalloprotéases (Figures 25 et 26) [210, 251, 252].

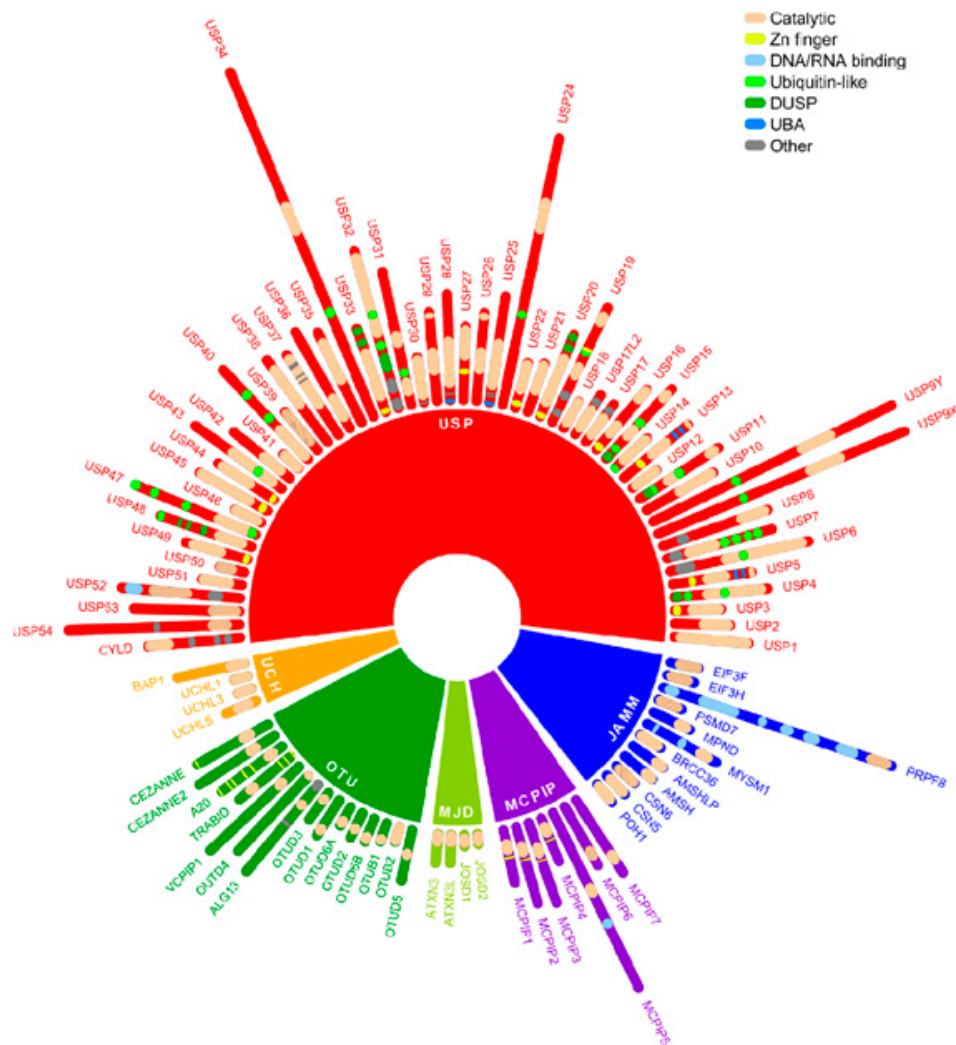


Figure 25. Classification des DUBs humaines. Les DUBs humaines sont classées en 6 familles représentées par différentes couleurs: USPs, UCHs, OTUs, MJDs, JAMMs and MCP/IPs. Le domaine catalytique central est indiqué en trait plein si la DUB est active et discontinu si elle est inactive. Les domaines additionnels sont indiqués en différentes couleurs. Les extrémités N-terminales des DUBs sont orientées vers le centre et la longueur de chaque DUB correspond à sa taille en acides aminés. Selon Fraile et al. [252]

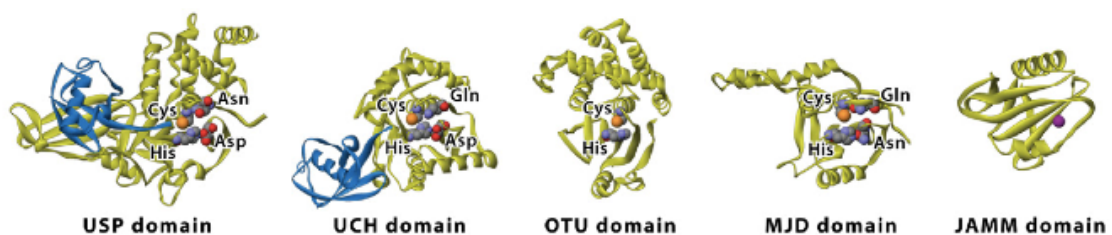


Figure 26. Structure des domaines catalytiques des 5 sous-classes de DUBs, selon Nijman et al. [210].

Lorsque les DUB se lient à l'ubiquitine, elles adoptent une conformation fonctionnelle et **hydrolysent la liaison isopeptide** qui lie les molécules d'ubiquitine entre elles ou avec leur substrat. Tout comme les autres enzymes de l'ubiquitination, elles participent à des événements variés comme le contrôle du cycle cellulaire, le remodelage de la chromatine ou la régulation de facteur de transcription mais sont également impliquées dans le processing des précurseurs de l'ubiquitine. En

modifiant l'état d'ubiquitination d'une protéine, les DUB déterminent son devenir (Figure 27) [252, 253].

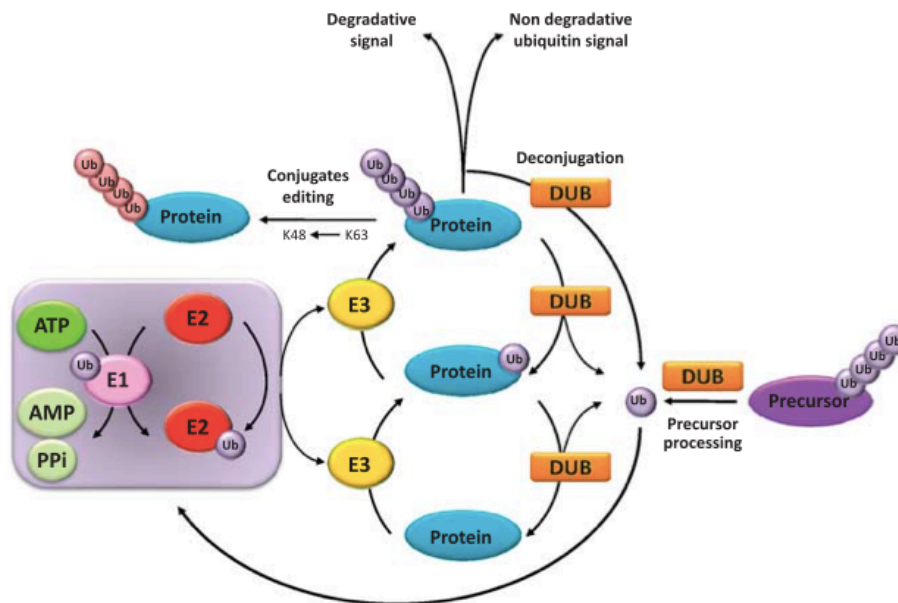


Figure 27. Activités enzymatiques des DUBs. Représentation schématique de l'implication des DUBs dans différentes étapes des processus d'ubiquitination. Les DUBs peuvent générer des chaînes d'ubiquitine libres à partir de précurseurs d'ubiquitine, assurant ainsi le maintien de l'homéostasie de l'ubiquitine. Certaines DUBs peuvent modifier des chaînes d'ubiquitine et ainsi induire des changements de signalisation. Elles peuvent aussi empêcher la dégradation d'une protéine ou ôter des chaînes d'ubiquitine non dégradatives, selon Fraile et al. [252]

Les réactions d'ubiquitination et de déubiquitination sont généralement couplées. Certaines DUB peuvent former des dimères avec des E3 ligases afin de limiter leur auto-ubiquitination empêchant ainsi leur dégradation et d'ajuster leur activité. De plus, **l'association entre les E3 et les DUB** permet un meilleur adressage des DUB. Ce couplage joue un rôle déterminant car il favorise la liaison entre le DUB et sa cible respective, l'interaction entre la DUB et sa cible étant faible et transitoire (Figure 28) [210, 252].

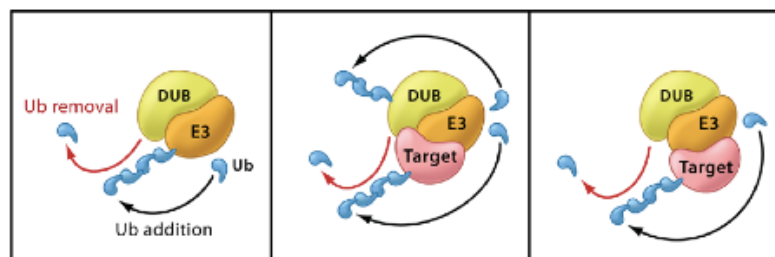


Figure 28. Interactions DUB/E3. Les DUBs et les E3 ligases sont souvent complexées et ces interactions permettent aux DUBs d'inverser les processus d'auto-ubiquitination médiés par les E3 (à gauche) ou aux E3s de réguler le substrat et sa DUB simultanément (au milieu). Par ailleurs, les interactions DUB/E3 confèrent à la DUB une certaine spécificité de substrat (à droite). Les activités E3 ubiquitine ligase et ubiquitine protéase sont indiquées avec des flèches noires et rouges respectivement, selon Nijman et al. [210].

Les DUB ont un impact majeur sur **la proportion cellulaire de chaînes de polyubiquitine** qu'elles soient fixées ou non sur des substrats spécifiques. Les caractéristiques mécanistiques de

l'assemblage des chaînes, notamment le degré de processivité, influencent la probabilité pour un substrat modifié par l'ubiquitine d'être déubiquitinylé [210, 254].

Bien que les mécanismes déterminant la **sélectivité de chaque famille de DUB** pour certains types de chaînes restent méconnus, des analyses structurales et fonctionnelles ont permis de déterminer que les USP et les OTU reconnaissent les chaînes de polyubiquitine de type K48, K63 et K11 [252]. Leur sélectivité, leur disponibilité ainsi que leur activité sont modulées par leur localisation cellulaire, par des protéines adaptatrices et des partenaires mais aussi par des modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations et des ubiquitinations [209, 210, 252, 255].

A l'unisson, les E1, E2 et E3 orchestrent les processus d'ubiquitination impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires tandis qu'en mettant la sourdine, les DUB harmonisent pour éviter la cacophonie.

III. Processus d'ubiquitination régulant le facteur de transcription NF- κ B au cours de l'activation lymphocytaire

L'engagement du récepteur des lymphocytes T (TCR) déclenche de nombreuses cascades de signalisation responsables de l'activation de divers facteurs de transcriptions. Parmi eux, le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle crucial dans l'activation lymphocytaire. L'ubiquitination joue un rôle décisif dans l'activation de NF- κ B [202, 203, 256].

1) La mono-ubiquitination : l'ubiquitine se la joue en solo.

A ce jour, peu de protéines ont été décrites comme étant modifiées par une seule molécule d'ubiquitine dans le cadre d'un réseau de signalisation.

En 2005, Carter et al. montrent que la phosphorylation d'IKK β sur ses résidus sérines 177 et 181 induite par l'oncoprotéine Tax du virus HTLV-1 (Human T cell Leukemia Virus type-1) entraîne sa mono-ubiquitination sur son résidu lysine 163 et ils démontrent également que cette mono-ubiquitination est requise pour le maintien de la signalisation liée à IKK β en réponse à l'activation du TNF récepteur. Ainsi, ils introduisent le résidu lysine 163 comme le site majeur accepteur d'ubiquitine d'IKK β et la mono-ubiquitination d'IKK β comme un événement commun à différentes voies d'induction de NF- κ B [257]. Par ailleurs, il a été démontré *in vitro* que la mono-ubiquitination d'IKK β catalysée par l'E3 ubiquitine ligase Ro52 (TRIM21) régule négativement l'activation de NF- κ B induite par Tax [258].

Alors que la polyubiquitination dégradative de p65 a été très largement décrite⁹, des études récentes mettent en évidence la mono-ubiquitination non dégradative de p65 sur de multiples résidus lysines. En 2012, Hochrainer et al. observent que dans le noyau, la mono-ubiquitination des résidus lysines 62, 123 et 315 de p65 inhibe l'activité transcriptionnelle de NF- κ B sans affecter sa stabilité [259]. En accord avec cette observation, Heyne et al. montrent que **l'E3 ligase Mdm2** (responsable de la régulation négative de p53) peut transférer sur p65 des molécules d'ubiquitine capables de générer de la multi-mono-ubiquitination mais pas de la polyubiquitination et que la surexpression de Mdm2 est incapable de déstabiliser p65, indiquant que la modification de p65 par Mdm2 a probablement une **fonction régulatrice** et non dégradative [260].

La régulation de l'activité protéase de MALT1 est un autre exemple de régulation par mono-ubiquitination. La **mono-ubiquitination en C-terminal de MALT1 sur son résidu lysine 644** permettrait une interaction protéine-protéine et favoriserait ainsi la dimérisation et l'activation de la

⁹ Voir partie sur l'ubiquitination dégradative de p65 (page 47)

fonction catalytique de MALT1 requise pour l'activation des lymphocytes T. La dimérisation de MALT1 serait initiée pendant la formation du complexe CBM et stabilisée par sa mono-ubiquitination qui, comme son activité catalytique, est transitoire [261, 262].

La **mono-ubiquitination de MALT1** est précédée par sa polyubiquitination de type K63, ce qui rend son étude complexe. Deux scénarii ont été proposés :

1. MALT1 est d'abord polyubiquitinylé puis mono-ubiquitinylé par des E3 ligases différentes. En effet, deux événements dépendants de la polyubiquitination de MALT1, l'activation d'IKK et la phosphorylation subséquente d'I κ B α sont détectables avant le clivage de MALT1.

2. MALT1 est d'abord polyubiquitinylé et sa mono-ubiquitination résulte du clivage partiel des chaînes de polyubiquitine par une déubiquitinase. Ce mécanisme déjà proposé pour Rpn10 (une sous unité du protéasome) est cohérent avec le fait que la lysine 644 de MALT1 est une des 11 lysines décrites comme importante pour la polyubiquitination de MALT1.

Cependant, bien que la fonction de la mono-ubiquitination de MALT1 soit encore mal définie, son **rôle dans l'activation de NF- κ B dans les lymphocytes T** est indéniable. Un mutant MALT1 K644R résistant à la mono-ubiquitination ne peut plus activer NF- κ B [261, 262].

En ciblant MALT1, IKK β ou encore p65, la mono-ubiquitination participe à la fois à la régulation positive et négative de NF- κ B.

2) NF- κ B danse la polK63 (polyubiquitination K63)

La polyubiquitination de type K63 est au cœur de l'immunité innée et adaptative (Figure 29). Lors de l'engagement du TCR, ce type de chaînes joue un rôle central dans l'activation de NF- κ B à différents niveaux [263, 264].

a. MALT1

Au sein du CBM, MALT1 est modifié par des chaînes de polyubiquitine non dégradatives. Des sites d'ubiquitination de MALT1 ont d'ailleurs été identifiés dans son domaine carboxy-terminal [153, 160]. Capable de catalyser la formation **de chaînes d'ubiquitine de type K63**, l'**E3 ubiquitine ligase TRAF6** cible diverses protéines de la signalisation NF- κ B et joue donc un rôle crucial [265, 266]. Dans le cas du TCR, MALT1 induit l'oligomérisation de TRAF6 et active ainsi son activité d'E3 ubiquitine ligase. Ceci lui permet de catalyser la **polyubiquitination de MALT1** mais aussi de **NEMO (IKK γ)** et de **l'IKK-kinase TAK1** [206, 266]. Les chaînes d'ubiquitine K63 servent alors de plateforme de recrutement pour NEMO et pour TAB2 lié à TAK1, qui phosphoryle et active le complexe IKK [87, 160, 262, 264, 266, 267].

Cependant, l'étude de souris présentant des lymphocytes T déficients pour TRAF6 a révélé son rôle de régulateur négatif de NF- κ B, bien qu'il ne soit que très faiblement exprimé à l'état quiescent. En effet, en absence de TRAF6, les souris présentent des lymphocytes T régulateurs (lymphocytes déterminants pour la tolérance immunitaire en raison de leur capacité à inhiber la prolifération des

lymphocytes effecteurs) fonctionnels mais développent des maladies inflammatoires touchant plusieurs organes. Ceci suggère que dépourvus de TRAF6, les lymphocytes T présentent une hyperactivation de la PI3K (kinase dont l'activité est importante pour CARMA1)¹⁰ et échappent au contrôle des lymphocytes T régulateurs. TRAF6 constitue donc un élément intrinsèque qui rend les lymphocytes sensibles à la régulation [268, 269].

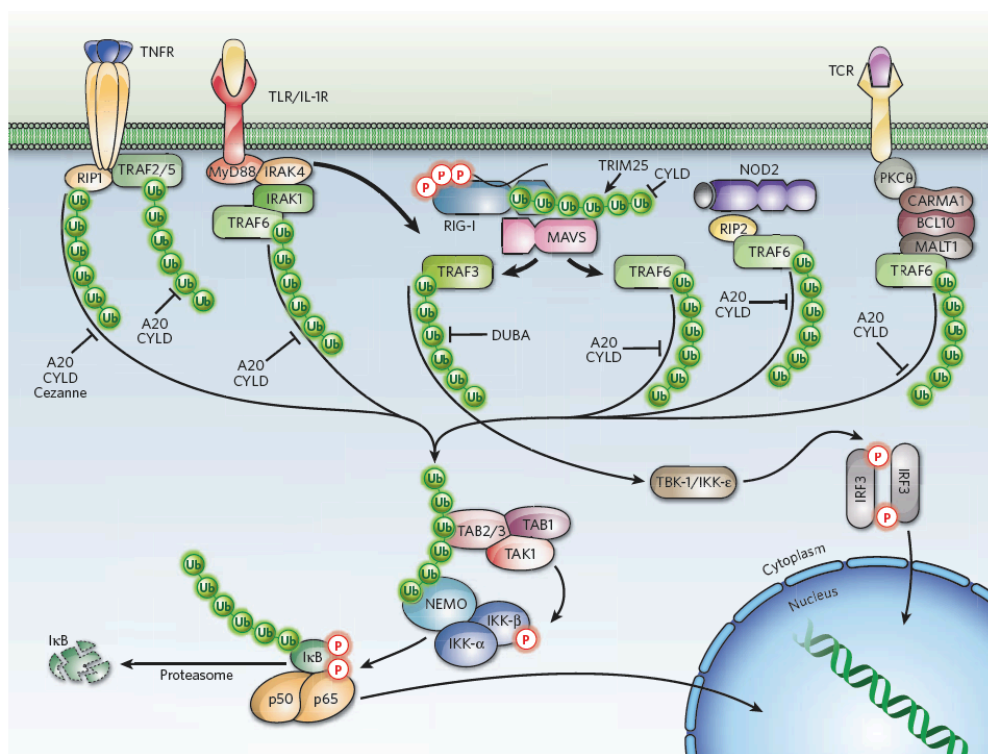


Figure 29. La polyubiquitination Lys63 dans l'immunité innée et adaptative. La polyubiquitination de type K63 joue un rôle clé dans la signalisation associée à divers récepteurs de l'immunité innée et adaptative. Les protéines TRAFs, TRAF6 inclus, fonctionnent comme des ubiquitine ligases qui catalysent la polyubiquitination de type K63, activant ainsi les TAK1 et le complexe IKK. Les chaînes d'ubiquitine K63 formées dans chaque voie de signalisation peuvent être clivées par des DUBs tels que A20, Cezanne, CYLD ou DUBA, ce qui permet un rétrocontrôle négatif des réponses immunes, selon Bhoj et al. [264].

b. BCL10

La nature des chaînes d'ubiquitine associées à BCL10 reste toujours controversée¹¹. Les travaux de Zhou et al. [158] et de Wu et al. [270, 271] définissent la **polyubiquitination K63** comme un **connecteur** entre BCL10 et NEMO et présentent NEMO comme un capteur de chaînes d'ubiquitine K63. Il apparaît en effet que la **polyubiquitination de type K63 de BCL10** induite par l'activation du TCR est requise pour l'activation de NF-κB. Wu et Ashwell identifient également les **résidus lysines 31 et 63** de BCL10 comme les sites majeurs d'ubiquitination de type K63. Plus récemment, Alexia et al. ont montré que les formes ubiquitinées de BCL10 s'accumulent au niveau du réticulum endoplasmique *via* le **senseur des chaînes d'ubiquitine K63 Metadherine (MTDH)**. Cette protéine

¹⁰ Voir Figure 31 (page 46)

¹¹ Voir partie sur l'ubiquitination de type K48 de BCL10 (page 47)

se révèle d'ailleurs importante pour l'activation de NF- κ B en réponse à l'engagement de divers immunorécepteurs (Figure 30) [272].

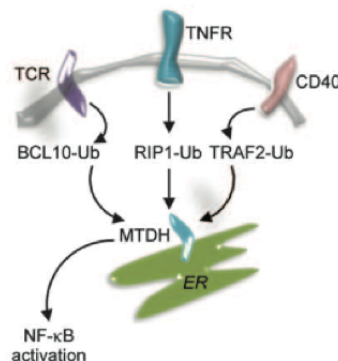


Figure 30. La stimulation d'immunorécepteurs induit l'ubiquitination non dégradative de protéines clés de la signalisation NF- κ B. La Metadherine (MTDH), une protéine du RE, recrute les formes ubiquitinylées des protéines clés de la signalisation NF- κ B et permet leur accumulation à la surface cytosolique du RE (Réticulum Endoplasmique). Cette étape favorise l'activation d'IKK, la dégradation d'I κ B α et l'activation de NF- κ B.

c. NEMO

La **polyubiquitination en K63 de NEMO** est très discutée. Alors que certains affirment qu'elle n'est pas requise pour l'activation de NF- κ B [270], d'autres pensent qu'elle joue un rôle important dans la propagation du signal NF- κ B [158, 191, 273]. Les premiers présentent NEMO comme un senseur capable de reconnaître les formes ubiquitinylées de RIP ou encore de BCL10 et bien qu'il trouvent séduisante la théorie selon laquelle l'ubiquitination de NEMO joue un rôle dans la signalisation induite par le TCR [158, 273], ils objectent que **la mutation du résidu lysine 399 de NEMO qui abolit son ubiquitination n'a qu'un effet modeste sur la signalisation dépendante du TCR**. De plus, des travaux réalisés dans des souris présentant une mutation du résidu lysine 392 (équivalent du résidu lysine 399 chez l'Homme) démontrent que l'ubiquitination de NEMO ne participe pas à l'activation de la voie NF- κ B induite par les récepteurs antigéniques mais à celle induite par les TLRs (Toll-Like Recepteurs) [274].

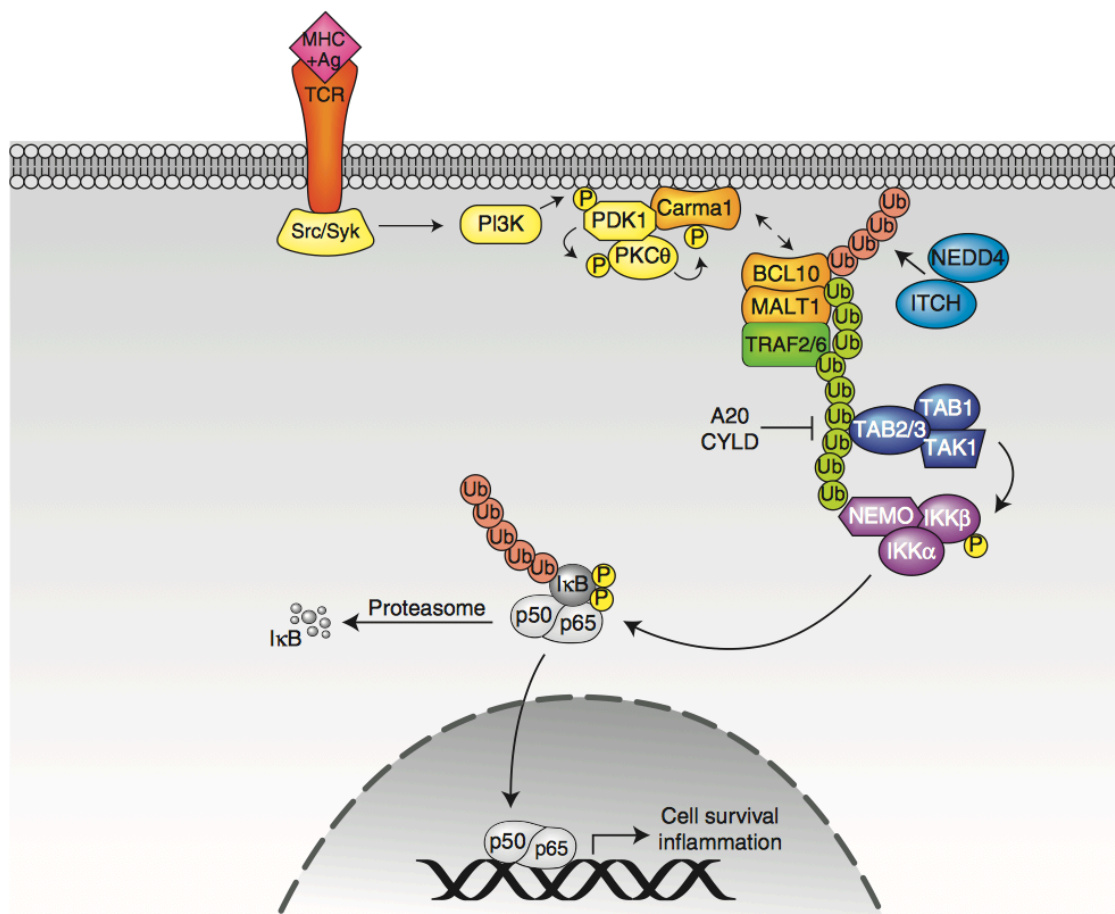


Figure 31. Voie de signalisation associée au TCR. Les chaînes d'ubiquitine de type K48 sont représentées en rouge et celles de type K63 en vert [275].

3) L'ubiquitination de type K48

L'ubiquitination de type K48 est connue pour entraîner des processus dégradatifs. Un exemple classique est la **dégradation par le protéasome de l'inhibiteur de p65 (IκBα)** qui permet l'activation de NF-κB. Mais ce type de modifications cible également des agonistes et participe ainsi au **rétrocontrôle négatif de la signalisation NF-κB**.

a. IκBα

Préalablement phosphorylé par le complexe IKK, **IκBα** est ubiquitinylé par le **complexe d'E3 ligases SCFβTrCP** et cette **ubiquitination de type K48** induit sa dégradation par le protéasome et permet la translocation nucléaire de p65 (Figure 31) [89, 202, 276].

b. CARMA1

L'activation des récepteurs antigéniques autorise la PKCβ/θ à phosphoryler **CARMA1** sur des résidus sérines spécifiques de son domaine linker. Ceci permet l'exposition de son domaine CARD et son oligomérisation avec d'autres protéines impliquées dans la signalisation. Des E3 ligases encore non identifiées sont ensuite recrutées pour induire son ubiquitination de type K48 au niveau de résidus lysines de son domaine MAGUK. L'activation de CARMA1 est non seulement suivie de sa

dégradation par le protéasome mais induirait aussi la **dégradation de BCL10**, participant ainsi au **rétrocontrôle négatif** de la signalisation CBM/IKK [277, 278].

c. BCL10

Diverses publications décrivent la **polyubiquitination dégradative de BCL10** comme nécessaire à la fin de la signalisation NF- κ B. En 2004, Scharschmidt et al. démontrent que la dégradation de BCL10 met fin à la signalisation IKK/NF- κ B en réponse à la stimulation du TCR. Selon ces travaux, les HECT E3 ligases NEDD4 et Itch catalysent l'ubiquitination de BCL10 et sa dégradation subséquente par la voie lysosomale [277, 279]. En 2007, deux publications décrivent un mécanisme de dégradation de BCL10 semblable à celui d'I κ B α . Selon Zeng et al., la phosphorylation du résidu sérine 138 de BCL10 précède son ubiquitination et sa dégradation subséquente par le protéasome, régulant ainsi négativement l'activation de NF- κ B en réponse à l'engagement du TCR [280]. De même, Lobry et al. démontrent que le complexe IKK phosphoryle BCL10 après la stimulation du TCR et que BCL10 est ensuite ubiquitinylé par l'E3 ligase β -TrcP et dégradé par le protéasome (Figure 31) [281]. Néanmoins, il a également été démontré que **l'ubiquitination de BCL10 est de type non dégradative** et participe à la propagation du signal [270] et que sa phosphorylation n'est pas nécessaire [282]. Ainsi, les travaux de Rueda et al. suggèrent que cette phosphorylation est importante pour la polymérisation de l'actine induite par le TCR mais pas pour l'activation de NF- κ B [282].

d. c-Rel et RelA (p65)

Durant l'activation lymphocytaire, les membres **NF- κ B p65 (RelA) et c-Rel** sont les cibles de diverses E3 ligases qui participent à la régulation négative du signal. Ainsi, l'E3 ligase Peli1 régule négativement c-Rel en catalysant son **ubiquitination de type K48** [65]. D'autres E3 ligases COMMD1 (Copper Metabolism (Murr1) containing 1) [283, 284], SOCS1 (Suppressor Of Cytokine Signaling protein 1) [285, 286], Pin1 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1) [287] ou encore PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gamma) [288] ont été décrites comme étant des catalyseurs de **l'ubiquitination dégradative de RelA** [289].

Du CBM aux membres NF- κ B, les polyubiquitinations de type K63 et K48 sont les premiers violons (Figure 31).

4) Les autres types d'ubiquitination

La contribution des autres types d'ubiquitination à la régulation de l'activation de NF- κ B *via* le TCR reste mal caractérisée [290]. Une étude récente a montré qu'*in vitro* **des chaînes K63 libres** peuvent activer TAK1 et TAB2 mais il reste à démontrer leur capacité à participer à une voie de signalisation [202, 207]. De plus, la **polyubiquitination K33** non dégradative régule directement **l'engagement du TCR** [202, 291]. Néanmoins, il apparaît que des protéines-clés de la signalisation NF- κ B associée au TCR sont impliquées dans des processus d'ubiquitination dans d'autres voies de

signalisation. Par exemple, **TRAF6** catalyse l'**ubiquitination K6, K27 et K29** de protéines impliquées dans la maladie de Parkinson et l'**ubiquitination K27 de NEMO** a été décrite au cours de deux types d'interaction hôte-pathogène [202]. Par ailleurs, il a été montré que le **LUBAC (Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex)**, un complexe composé de trois E3 ligases HOIL-1, HOIP et SHARPIN catalyse l'**ubiquitination linéaire de NEMO** et participe ainsi à l'activation de la voie canonique en réponse à divers immunorécepteurs [189, 202, 292-294]. Des travaux menés dans des lymphocytes T et B ont montré que l'**interaction dynamique du LUBAC avec le CBM** régit l'activation de NF- κ B consécutive à la reconnaissance antigénique **indépendamment de l'activité catalytique du LUBAC** [295].

5) Les DUBs

Les déubiquitinases ont des fonctions diverses. En effet, le clivage de protéines précurseurs par les DUB permet de générer des chaînes libres d'ubiquitine, mais elles peuvent aussi empêcher la dégradation de protéines cibles **en clivant des chaînes d'ubiquitine K48** ou moduler la signalisation ou le trafic intracellulaire **en clivant des chaînes d'ubiquitination K63**. De plus, les chaînes clivées peuvent être recyclées pour être réutilisées au cours d'autres processus d'ubiquitination. Les DUB peuvent également **modifier les chaînes d'ubiquitine** en modifiant le nombre de molécules d'ubiquitine ou le type de chaînes (Figure 32). Grâce à toutes ses fonctions, elles jouent un **rôle central dans la régulation de la signalisation NF- κ B**. Les déubiquitinases **A20 et CYLD** ont été très largement décrites pour leur fonction de régulateurs de NF- κ B [255, 296].

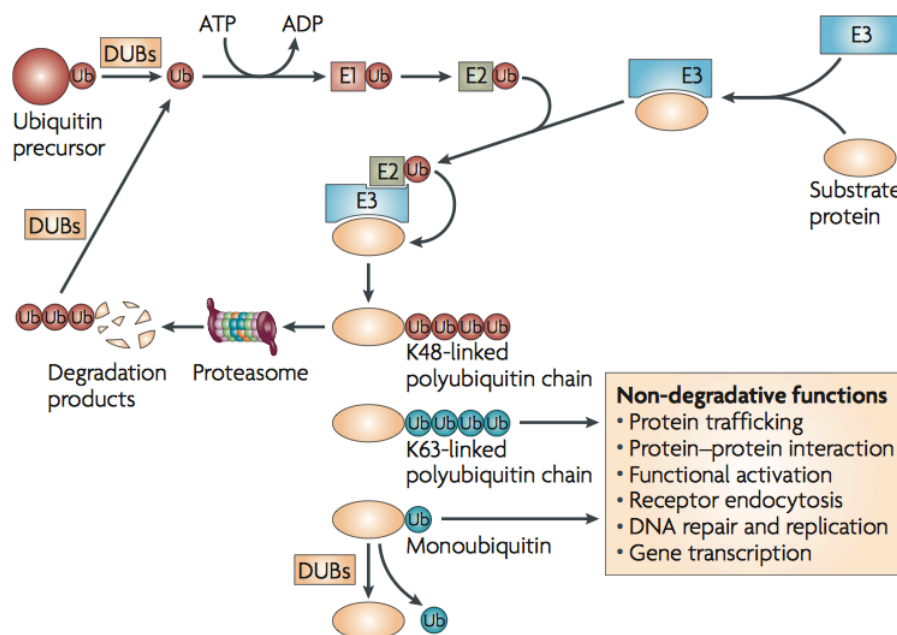


Figure 32. Processus d'Ubiquitination [296].

a. CYLD

Initialement identifiée comme un suppresseur de tumeur, la protéine CYLD, issue du gène cylindromatosis, est une **USP** dont la mutation génère une prédisposition au développement de cylindromes mais aussi d'autres tumeurs cutanées, comme les mélanomes. Il est probable que cette mutation affecte la fonction catalytique de CYLD causant une dérégulation de NF- κ B qui favorise la survie cellulaire et le développement de tumeurs [255, 296].

Il a été clairement établi que CYLD cible des protéines essentielles à la signalisation NF- κ B telles que les **TRAFs**, **NEMO** ou **TAK1** (Figure 33) [297]. L'ubiquitination de type K63 est une caractéristique commune des cibles de CYLD et des études biochimiques ont révélé sa spécificité pour ce type de chaînes d'ubiquitine. Le domaine USP de CYLD présente d'ailleurs une structure unique qui semble posséder des caractéristiques spécifiques qui permettent **le clivage de chaînes de type K63**. Toutefois, *in vitro* mais aussi *in vivo*, CYLD peut cliver **des chaînes d'ubiquitine de type K48** et empêcher la dégradation par le protéasome de certaines protéines. La spécificité de chaînes de CYLD serait donc dépendante des protéines ciblées. De plus, il semblerait que des **protéines adaptatrices** sont requises pour la fonction de CYLD. En effet, la protéine p62 est nécessaire à la **déubiquitination de TRAF6 par CYLD** et modulerait son activité de DUB en induisant sa polyubiquitination [296]. Il est intéressant de noter que MALT1 clive CYLD dans la voie du TCR mais que ce clivage est requis pour l'activation optimale de JNK mais pas pour celle de NF- κ B [255].

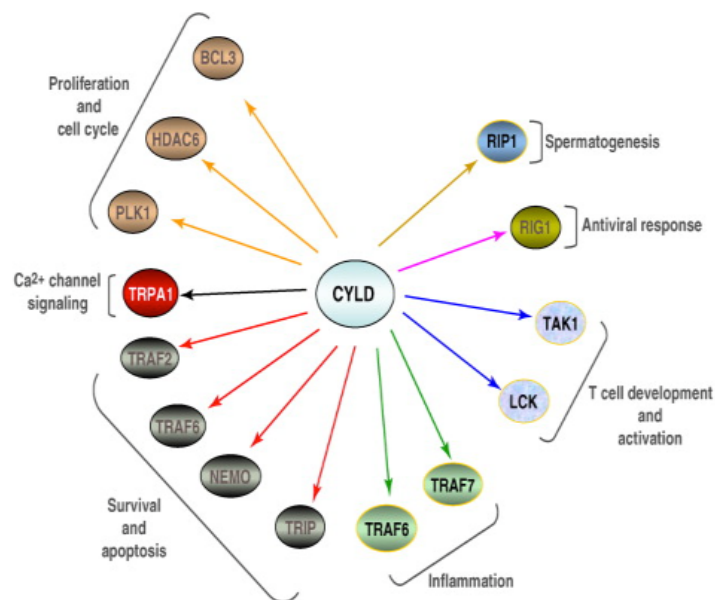


Figure 33. Les cibles de CYLD et leurs fonctions. L'implication de CYLD a été décrite dans de nombreuses fonctions cellulaires, notamment l'activation et le développement des lymphocytes T. Le clivage des chaînes d'ubiquitine K48 de LCK par CYLD bloque la signalisation en aval du TCR. CYLD est également responsable de la déubiquitinylation de TAK1, ce qui empêche son activation spontanée, selon Massoumi et al. [297]

L'étude de souris dont le gène codant pour CYLD est invalidé indique que cette déficience s'accompagnerait d'une augmentation de l'ubiquitination et de la translocation nucléaire d'une

protéine co-activatrice de NF- κ B, BCL-3. Elle a également permis d'établir que CYLD joue un rôle essentiel dans le développement des lymphocytes T. Les souris *Cyld*^{-/-} possèdent moins de thymocytes et donc moins de lymphocytes cytotoxiques et auxiliaires et dans les tissus périphériques en raison **d'un défaut de signalisation proximale du TCR**. En effet, **CYLD clive les chaînes K63 et K48 de la kinase Ick** dont le substrat est ZAP70, une protéine essentielle à l'activation du TCR [298]. Dans les lymphocytes T matures, **CYLD inhibe l'activation d'IKK dépendante du TCR** et par conséquent celle de NF- κ B **en clivant les chaînes d'ubiquitine K63 connectant IKK et TAK1** (Figure 34) [255, 296].

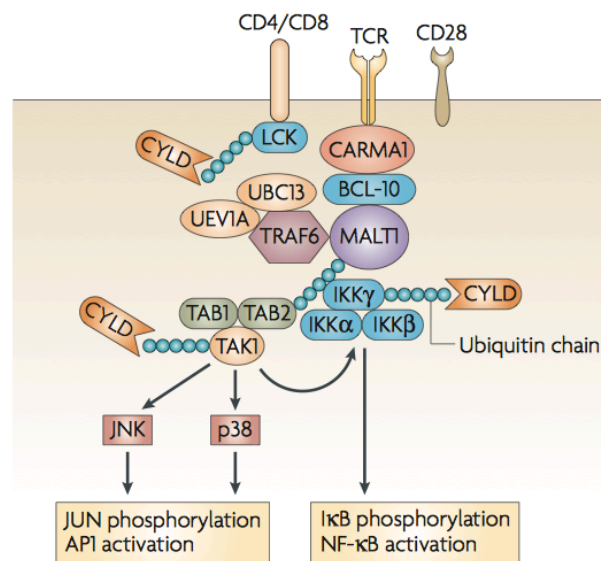


Figure 34. La régulation de la signalisation associée au TCR par CYLD. CYLD est une DUB essentielle qui empêche l'ubiquitination spontanée et l'activation de TAK1. L'absence de CYLD cause l'activation constitutive de TAK1 et de la signalisation en aval (IKK et JNK (JUN N-terminal kinase)). CYLD régule positivement la kinase LCK dans les thymocytes mais on ignore si cette fonction de CYLD est conservée dans les lymphocytes T périphériques, selon Sun et al. [296].

b. A20

Identifié en 1990, A20 ou TNFAIP3 est une zinc-finger protéine requise pour le rétrocontrôle négatif de l'activation de NF- κ B en réponse aux immunorécepteurs de l'immunité innée tels que le TNFR [255, 299]. Cette OTU peut fonctionner comme une E3 ligase ou comme une DUB et son activité catalytique de DUB cible divers facteurs de la signalisation NF- κ B comme **TRAF6 ou IKK γ (NEMO)**.

La spécificité de substrat de A20 est encore mal définie. Alors qu'*in vivo*, A20 clive des chaînes d'ubiquitine K63, *in vitro* le domaine OTU de A20 ou A20 hétérologue **clivent des chaînes K63 ou K48 avec une préférence pour ces dernières**. Ceci suggère qu'*in vivo*, des co-facteurs orientent A20 vers les chaînes de type K63 [255]. Il a d'ailleurs été montré que des protéines adaptatrices pourvues d'un domaine de liaison à l'ubiquitine (UBD) interagissent physiquement avec A20 et permettent son adressage vers sa cible. ABIN1 (A20-binding inhibitor of NF- κ B 1), par exemple, interagit avec A20 et permet son recrutement au niveau de NEMO. Par ailleurs, une étude montre que A20 ne

désassemble pas les chaînes d'ubiquitine mais hydrolyse la liaison entre les chaînes d'ubiquitine K63 et TRAF6, laissant les chaînes d'ubiquitine intactes. Ceci suggère que **l'interaction entre A20 et les protéines ubiquitinylées détermine davantage sa spécificité que son activité catalytique intrinsèque** [296].

Les souris déficientes pour A20 meurent prématurément de cachexie et d'inflammation touchant de multiples organes [255]. Dans la plupart des cellules, A20 est induit par des cytokines pro-inflammatoires ou mitogènes et participe au **rétrocontrôle négatif de NF- κ B**. Cependant, les lymphocytes T présentent à l'état quiescent des niveaux élevés d'expression de A20 qui diminuent en réponse à la stimulation TCR, ce qui suggère une régulation différente de l'expression d'A20 en fonction des tissus due, en partie, à un contrôle post-transcriptionnel par de microARNs. Dans les hépatocytes, le microARN miR-29 est un régulateur négatif de A20. Or, NF- κ B se lie directement au promoteur de mirR-29 et réprime sa transcription, levant ainsi l'inhibition exercée sur l'expression d'A20. De plus, **A20 est régulé au niveau post-traductionnel par IKK β** qui le phosphoryle sur son résidu sérine 381 et cette modification accroît la capacité de A20 à inhiber la signalisation NF- κ B par un mécanisme encore inconnu. Toutefois, il a été établi que **A20 est un régulateur négatif de NF- κ B** au cours de la signalisation en aval du TCR et du BCR. En effet, A20 cible **MALT1** dans ces deux voies et clive ses chaînes d'ubiquitine K63 grâce à son domaine OTU [209, 299]. Cependant, MALT1 annule les effets inhibiteurs de A20 en induisant son clivage après son résidu arginine 439, ce qui le rend inactif. Dans certains lymphomes dérivés de cellules B, le **déséquilibre entre MALT1 et A20** conduit à une **activation constitutive de NF- κ B** et augmente la survie cellulaire [255].

Néanmoins, des travaux menés sur des souris présentant des mutations de A20 suggèrent que l'activité déubiquitinase de A20 n'est pas essentielle à la signalisation NF- κ B. Skaug et al. démontrent que A20 se lie à NEMO *via* ses chaînes de polyubiquitine et que cette liaison suffit à bloquer la phosphorylation d'IKK par la kinase TAK1, indépendamment de l'activité catalytique de A20 [300]. De plus, les souris avec un défaut d'activité déubiquitinase de A20 ne présentent aucun signe d'inflammation et des proportions normales de lymphocytes B et T ainsi que de cellules myéloïdes et dendritiques qui répondent normalement au LPS et au TNF induisant une activation de NF- κ B normale. De et al. suggèrent que **l'activité E3 ligase du domaine ZnF4 de A20** compense partiellement le défaut de déubiquitination *in vivo* [301]. Cependant, en accord avec les travaux de Song et al. [302] qui décrivent A20 comme un **atténuateur de la présentation antigénique**, une autre étude démontre que ni le résidu cystéine 103 de A20 essentiel pour son activité déubiquitinase ni le motif ZnF4 ne sont responsables de façon exclusive de la fonction d'inhibiteur de la signalisation TNF de la protéine A20 [303]. Song et al. démontrent que l'extinction de la protéine A20 dans les cellules dendritiques entraînent leur hyperactivation et induit une augmentation de la réponse immune adaptative liée aux lymphocytes T. **En régulant négativement le potentiel immunostimulateur des cellules dendritiques, A20 régule indirectement l'activation des lymphocytes T** [302].

c. Les autres DUBs

Outre CYLD et A20, d'autres DUB sont impliquées dans la régulation de NF- κ B. La DUB USP9X a récemment été caractérisée comme un régulateur positif de la signalisation NF- κ B induite par le TCR. Les travaux de Park et al. montrent que **USP9X** interagit avec le complexe CBM et clive les chaînes d'ubiquitine liées à BCL10 qui favorisent l'association de CARMA1 avec l'hétérodimère BCL10/MALT1 [304]. L'OTU **Cezanne (Cellular zing finger anti-NF- κ B)** dont la séquence est similaire à A20 est induite par le TNF et inhibe NF- κ B dans le cadre d'une boucle de régulation négative. Une autre OTU, **OTULIN** participe également à la régulation négative de NF- κ B, en ciblant le LUBAC [305]. La liaison d'OTULIN à HOIP (ou RNF31), une sous-unité du LUBAC limite l'activation de NF- κ B [292, 306]. Egalement associés à la voie du TNF récepteur, **USP21 et USP31** sont présentés comme des inhibiteurs de NF- κ B, à l'inverse d'**USP2**. Dans la voie des TLR, en débubiquitinant TRAF6 et NEMO, **USP7** régule négativement NF- κ B. Récemment, **MCPIP1 (MCP-Induced protein 1)** a été identifiée comme une nouvelle DUB ciblant TRAF2 et TRAF6 et essentielle pour la fin de l'activation de JNK et NF- κ B par les voies de signalisations associées à l'inflammation [307]. La plupart des DUB régule NF- κ B en amont d'IKK, cependant certaines DUB ciblent directement IKK ou des protéines en aval comme par exemple, **USP11 et USP15** qui clivent les chaînes d'ubiquitine K48 d'I κ B α [255, 296].

Les processus d'ubiquitination jouent un rôle central dans la régulation du facteur de transcription NF- κ B au cours de l'activation lymphocytaire. Certains des acteurs-clés de ces processus ont été identifiés et caractérisés. Néanmoins il reste encore de nombreuses incertitudes et beaucoup d'inconnues (Figure 35 et Tableau3).

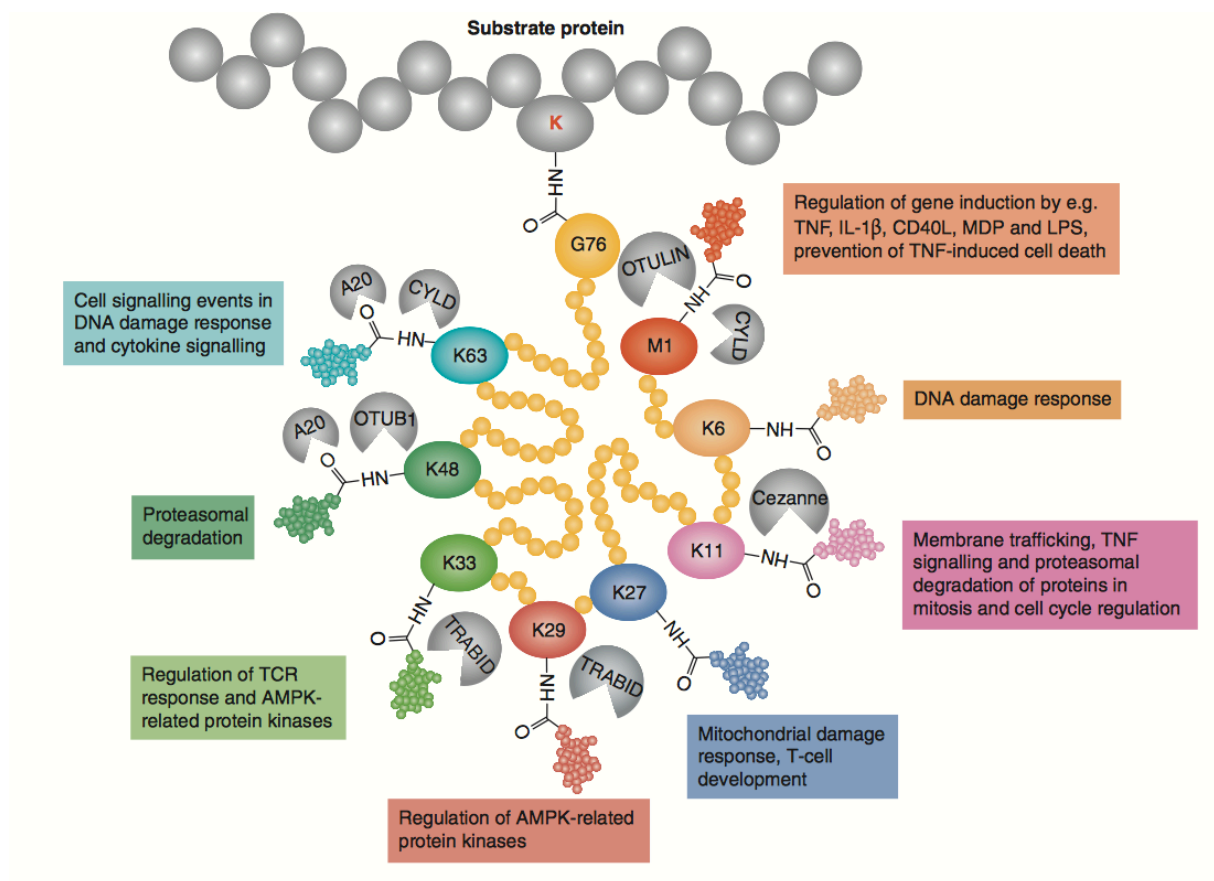


Figure 35. Différents types d'ubiquitination, leurs fonctions dans la signalisation immunitaire et les DUBs associées [189].

Tableau 3. Types d'ubiquitination impliqués dans la régulation de NF-κB, cibles, E3 ligases et DUBs.

Types d'ubiquitination	Cibles	E3 ligases	DUB	Références
Mono-ubiquitination	MALT1	-	-	[261, 262]
	IKKβ	TRIM21 (Ro52)	-	[257, 258]
	RelA/p65	Mdm2	-	[259, 260]
Polyubiquitination de type K63				[158, 160, 206, 255, 264, 266, 267, 296, 297]
	TRAF6, MALT1, NEMO, TAK1	TRAF6	CYLD, A20	[264, 266, 267, 296, 297]
	BCL10	-	-	[158, 270-272]
	Lck	-	CYLD	[298]
Chaînes libres K63	TAK1, TAB2	-		[202]
Polyubiquitination de type K48	BCL10	NEDD4, Itch, βTRCP	-	[279-281]
	IκBα	SCFβTRCP	USP11, USP15	[89, 202, 255, 276, 296]
	RelA/p65	COMMD1, SOCS1, PPARγ...	-	[283-289]
	c-Rel	Peli1	-	[65]
	Lck	-	CYLD	[297]
	CARMA1	-	-	[278]
Polyubiquitination de type K33	TCRζ	-	-	[202, 291]
Polyubiquitination de type K6	-	TRAF6	-	[202]
Polyubiquitination de type K27	NEMO	TRAF6	-	[202]
Polyubiquitination de type K29	-	TRAF6	-	[202]
Linéaire	NEMO	LUBAC	OTULIN	[189, 202, 292-295, 305, 306]

Interlude :

La régulation du facteur de transcription NFAT activé au cours de l'activation lymphocytaire et responsable de la synthèse de la sous-unité NF- κ B c-Rel

Identifié en 1988 comme un facteur inductible se liant au promoteur de l'interleukine 2 (IL-2) dans des extraits nucléaires de cellules T activées [308], **NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells)** est une famille de facteurs de transcription est composée de 5 membres **NFAT1 (NFATc2 ou NFATp)**, **NFAT2 (NFATc1 ou NFATc)**, **NFAT3 (NFATc4)**, **NFAT4 (NFATc3 ou NFATx)** et **NFAT5 (TonEBP, Tonicity Enhancer Binding Protein)** qui possèdent une région régulatrice aussi appelée NHR (NFAT Homology Region) et un domaine RHD (Rel Homology Domain) caractéristiques (Figure 36) [138, 309].



Figure 36. Structure schématique des membres du facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT). Les protéines sont alignées en fonction de leur RHR (REL-homology domain) qui contient le motif de liaison à l'ADN. Le NHR (NFAT-homology domain) est partagé par NFAT1, 2, 3 et 4. Les 3 protéines NFAT 1,2 et 4 régulées par la calcineurine dépendante du calcium sont exprimées par les cellules T et possèdent des isoformes qui sont générés par épissage alternatif ou à partir de promoteurs alternatifs. [138, 309].

Dans le noyau, les protéines NFAT peuvent **interagir avec différents facteurs de transcription**, connectant ainsi la signalisation associée au calcium à beaucoup d'autres voies de signalisation dans les lymphocytes T, ce qui va induire l'expression de gènes spécifiques en réponse à des stimuli variés.

AP1 est le principal partenaire transcriptionnel de NFAT pendant l'activation lymphocytaire. La **coopération entre NFAT et AP1** est responsable de l'expression d'un assortiment de gènes spécifiques, tels que le gène *REL* codant pour c-Rel, qui induisent des changements fonctionnels caractéristiques d'un lymphocyte T activé. Cette coopération résulte de la signalisation associée au

calcium, responsable de l'activation des protéines NFAT et de la voie RAS-MAPK qui induit l'activation de FOS et JUN. En absence d'AP1, NFAT induit la transcription d'un ensemble de gènes différents dont l'expression pourrait aboutir à un résultat fonctionnel totalement différent [309-311].

Les domaines RHR des différentes protéines NFAT sont similaires. Elles ont donc des spécificités de liaison à l'ADN et des partenaires communs, ce qui pourrait expliquer une certaine redondance dans les fonctions régulées par NFAT. Les souris déficientes pour une seule protéine NFAT ne présentent que de légères altérations des fonctions immunes. Seule l'absence de plus d'un membre de la famille NFAT conduit à des changements importants dans les cellules et les fonctions du système immunitaire (Tableau 4).

Dans les lymphocytes T, les protéines NFAT1, 2 et 4 sont co-exprimées et activées en réponse à l'engagement du TCR. Cependant, des mécanismes distincts de régulation ou la capacité d'interaction avec différents co-activateurs *via* leurs domaines moins conservés pourraient expliquer pourquoi différentes fonctions des lymphocytes T sont spécifiquement régulées par différents membres de la famille NFAT [309].

Tableau 4. Phénotype des souris déficientes pour les protéines NFAT, selon Macian et al[309].

NFAT protein	Phenotype in the immune system
NFAT1	Moderate hyperproliferation with splenomegaly. Moderately enhanced B- and T-cell responses, with bias towards T _H 2-cell responses. Prolonged IL-4 expression and decreased IFN- γ production in response to TCR ligation. Delayed thymic involution. Enhanced germinal-centre formation.
NFAT2	In the RAG2-deficient complementation system, reduced proliferative responses by T cells. Impaired repopulation of the thymus and lymphoid organs. Impaired T _H 2-cell responses and IL-4 production.
NFAT1 and NFAT2	In fetal liver chimeras, grossly impaired T-cell effector functions, with profound defects in cytokine production and cytolytic activity. B-cell hyperactivity.
NFAT4	Impaired development of CD4 and CD8 single-positive cells, with increased apoptosis of double-positive thymocytes. Mild hyperactivation of peripheral T cells.
NFAT1 and NFAT4	TCR hyper-reactivity, with profound lymphoproliferative disorder. Notable increase in T _H 2-cell responses. Allergic blepharitis and interstitial pneumonitis.
NFAT5	Impaired T-cell function under hyperosmotic conditions. Decreased cellularity of the thymus and spleen.

D'ailleurs, en accord avec les études effectuées chez les souris déficientes pour NFATc2 ou NFATc1, l'étude de la contribution de NFATc2 (NFAT1) et NFATc1 (NFAT2) dans la transactivation des gènes de cytokines dans les lymphocytes T a permis d'établir que NFAT1, mais pas NFAT2, peut induire la synthèse du TNF α dans les lymphocytes T CD4⁺ et que le domaine TAD2 C-terminal de NFATc2 est crucial pour l'expression des gènes TNF α mais pas pour le gène de l'IL2 [312].

Dans les lymphocytes T, l'activation du TCR s'accompagne d'une augmentation de la concentration calcique intracellulaire qui entraîne la liaison de la calmoduline à la calcineurine. La fonction sérine/thréonine phosphatase de la calcineurine est alors activée. La calcineurine se lie au domaine régulateur des protéines NFAT (Figure 37) et y déphosphoryle de multiples phosphosérines démasquant ainsi la NLS de NFAT qui est alors libre de transloquer dans le noyau [138, 313, 314]. Dans le noyau, NFAT est inactivé par l'action coordonnée de plusieurs kinases, responsables de sa rephosphorylation et de sa relocalisation dans le cytosol où d'autres kinases inhibent sa translocation en maintenant son niveau de phosphorylation à l'état quiescent (Tableau 5 et Figure 37) [138]. Contrôlé par une boucle de régulation positive, NFAT2 fait exception à ce mécanisme. En effet, NFATc1 (NFAT2) s'autorégule en se liant à son promoteur P1 au cours de l'activation des lymphocytes T [138, 315].

Au cours de l'activation lymphocytaire, l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire conduit à la translocation nucléaire et à l'activation du facteur de transcription NFAT dont l'un des gènes-cibles est la sous-unité c-Rel du facteur de transcription NF- κ B.

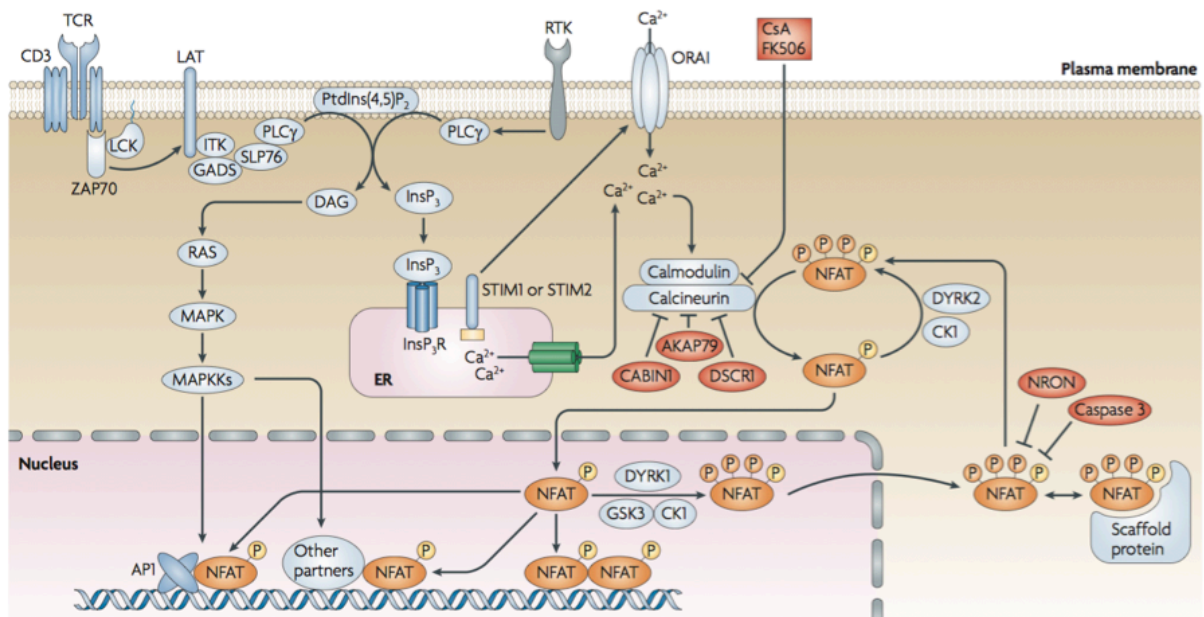


Figure 37. Activation et Régulation de NFAT. Les immunorécepteurs et les récepteurs tyrosine kinases (RTK) se lient à leurs ligands et activent la phospholipase $C\gamma$ ($PLC\gamma$), qui à son tour hydrolyse le phosphatidyl-4,5-bisphosphate ($PtdIns(4,5)P_2$) en diacylglycerol (DAG) et en inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3). IP_3 se lie au récepteur $InsP_3$ (IP_3R) localisé au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et induit un efflux de calcium (Ca^{2+}). Les molécules d'interaction stromales 1 (STIM1) et STIM2 détectent alors la diminution des stocks calciques du RE et forment des groupes qui *via* le CRAC (canal activé par la libération du calcium) ORAI, situé au niveau de la membrane plasmique induit une entrée massive de calcium. Le calcium se lie à la calmoduline (censeur de calcium) qui à son tour active la calcineurine (phosphatase). La calcineurine déphosphoryle et active la famille de facteurs de transcription NFAT qui transloque vers le noyau, où ils peuvent coopérer avec des partenaires multiples de transcription (par exemple, la protéine activatrice 1 (API1)) pour réguler l'expression des gènes. Les protéines NFAT sont rephosphorylées et inactivées par plusieurs kinases, comme la glycogène synthétase kinase 3 (GSK3), CK1 et DYRK1 et DYRK2 (dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase 1 et 2). L'activité de la calcineurine est régulée par plusieurs inhibiteurs endogènes de la calcineurine, tels que CABIN1 (calcineurine-binding protein 1), la protéine d'ancrage AKAP79 (A-kinase de protéine d'ancrage 79) et DSCR1 (Down's Syndrom Critical Region 1). La Cyclosporine A (CsA) et le FK506 sont des inhibiteurs pharmacologiques puissants de la calcineurine. Diverses protéines sont connues pour leur interaction avec les protéines NFAT et leur implication dans la régulation de son activité. NRON (Non – coding repressor of NFAT) et la caspase 3 sont des régulateurs négatifs de l'activité de NFAT. GADS, GRB2-related adaptor protein; ITK, IL-2-inducible T-cell kinase; LAT, linker for activation of T cells; MAPKK, MAPK kinase; SLP76, SH2-domain- containing leukocyte protein of 76 kDa; TCR, T cell receptor; ZAP70, ζ -chain-associated protein kinase of 70 kDa, selon Müller et al. [138]

Description du projet

Le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle essentiel dans le développement, l'homéostasie, la survie du système immunitaire, mais également dans la propagation de certains lymphomes. L'activation optimale de NF- κ B en réponse à l'engagement de nombreux immunorécepteurs repose sur la mise en place de larges signalosomes dans lesquels des adaptateurs spécifiques sont recrutés et polyubiquitylés de façon non-dégradative. En réponse à des cytokines pro-inflammatoires ou à l'activation des récepteurs antigéniques, ces adaptateurs ubiquitylés s'accumulent sur la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique (RE) *via* la protéine du RE metadherine (MTDH) qui assure la propagation du signal NF- κ B. Toutefois, la nature des E3 ligases en charge de relayer NF- κ B au niveau des organites intracellulaires et des DUBs qui en clivant les chaînes d'ubiquitine participent au rétrocontrôle de la signalisation NF- κ B reste méconnue. Etant donné le rôle de l'ubiquitination et du RE dans la signalisation NF- κ B, le projet avait pour objectif de :

1. Comprendre les mécanismes de rétrocontrôle de l'activation de NF- κ B en criblant une librairie de siRNA ciblant la famille des DUBs.
2. Identifier et caractériser des E3 ligases pourvues d'un domaine transmembranaire qui les ancre à la membrane de différents organites intracellulaires associées à l'activation des adaptateurs.

En effet, bien que quelques DUBs et E3 ligases aient été décrites pour leur fonction de régulateur de NF- κ B, certaines participant à la propagation du signal NF- κ B et ciblant des acteurs-clés de cette voie de signalisation n'ont pas encore été identifiées ou ne sont que partiellement caractérisées.

Le crible de deux librairies de siRNA ciblant respectivement les 98 DUBs humaines et les 46 E3 ligases avec un domaine transmembranaire a été réalisé par bioluminescence dans un modèle de lymphocytes T immortalisés Jurkat en réponse à une stimulation antigénique. Il a conduit à l'identification et la caractérisation de la déubiquitinase USP34 comme un régulateur négatif de NF- κ B et a permis de définir l'E3 ligase TRIM13 comme un régulateur positif de l'activation de NF- κ B en réponse à l'engagement du récepteur des lymphocytes T.

Résultats

Article I

Negative regulation of NF- κ B signaling in T lymphocytes by USP34

Poalas K, Hatchi EM, Cordeiro N, Dubois SM, Leclair HM, Leveau C, Alexia C, Gavard J, Vazquez A, Bidère N.

Cell Commun Signal. 2013 Apr 16;11(1):25. doi: 10.1186/1478-811X-11-25.

Afin d'identifier de nouvelles DUBs impliquées dans la régulation de l'activation de NF- κ B associée au TCR, nous avons criblé une librairie de siRNA dirigés contre les 98 DUBs codées par le génome humain sur l'activité transcriptionnelle NF- κ B en réponse à une stimulation antigénique T (TCR, T-cell Receptor). La diminution de l'expression de la déubiquitinase USP34 (Ubiquitin-specific protease 34) par ARN interférence s'est révélée augmenter l'activité NF- κ B en réponse à l'engagement du TCR. L'analyse par RT-PCR des niveaux d'ARN messagers de gènes cibles de NF- κ B (I κ B α , IL-2 et TNF α) et la quantification de la sécrétion d'IL-2 par ELISA ont permis de confirmer le rôle de régulateur négatif de USP34. A contrario, la surexpression du domaine catalytique de USP34 réduit l'activité NF- κ B consécutive à l'activation du TCR. L'impact de USP34 sur différents événements clés de la signalisation NF- κ B a été étudié. Il est apparu que l'assemblage du complexe CBM et l'ubiquitination des adaptateurs BCL10 et MALT1 ne sont pas affectés par la réduction des niveaux d'expression d'USP34. De plus, aucune interaction n'a été détectée entre USP34 et des protéines essentielles à la signalisation NF- κ B. Tandis que la translocation de la sous-unité NF- κ B p65 n'est pas affectée par l'absence de USP34, une analyse par retard sur gel (EMSA) révèle une affinité accrue de p65 pour les sites κ B. De plus, la dégradation de l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B α est plus ample en présence de siRNA ciblant USP34.

Cela nous a conduit à nous interroger sur la sélectivité d'USP34 vis à vis du TCR. Nous avons observé qu'USP34 participe également à l'activation optimale de NF- κ B induite par du TNF α ou par un traitement avec l'inhibiteur de la topoisomérase II VP16 (étoposide). Bien que tous ces stimuli convergent sur le complexe IKK, le profil de phosphorylation d'IKK n'est pas affecté par l'absence d'USP34, probablement en raison de l'existence d'une boucle de rétrocontrôle négatif induite par la sur-activation de NF- κ B.

En conclusion, nos travaux identifient la DUB cytoplasmique USP34 comme un nouveau régulateur négatif de la signalisation NF- κ B en réponse à de multiples stimuli.

SHORT REPORT

Open Access

Negative regulation of NF- κ B signaling in T lymphocytes by the ubiquitin-specific protease USP34

Konstantinos Poalas^{1,2,3}, Emeline M Hatchi^{1,2,3}, Nelia Cordeiro^{1,2,3}, Sonia M Dubois^{1,2,3}, H  lo  se M Leclair^{4,5,6}, Claire Leveau^{1,2,3}, Catherine Alexia^{1,2,3}, Julie Gavard^{4,5,6}, Aim   Vazquez^{1,2,3} and Nicolas Bid  re^{1,2,3*}

Abstract

Background: NF- κ B is a master gene regulator involved in plethora of biological processes, including lymphocyte activation and proliferation. Reversible ubiquitinylation of key adaptors is required to convey the optimal activation of NF- κ B. However the deubiquitylases (DUBs), which catalyze the removal of these post-translational modifications and participate to reset the system to basal level following T-Cell receptor (TCR) engagement continue to be elucidated.

Findings: Here, we performed an unbiased siRNA library screen targeting the DUBs encoded by the human genome to uncover new regulators of TCR-mediated NF- κ B activation. We present evidence that knockdown of Ubiquitin-Specific Protease 34 (USP34) selectively enhanced NF- κ B activation driven by TCR engagement, similarly to siRNA against the well-characterized DUB cylindromatosis (CYLD). From a molecular standpoint, USP34 silencing spared upstream signaling but led to a more pronounced degradation of the NF- κ B inhibitor I κ B α , and culminated with an increased DNA binding activity of the transcription factor.

Conclusions: Collectively, our data unveils USP34 as a new player involved in the fine-tuning of NF- κ B upon TCR stimulation.

Keywords: DUBs, NF- κ B, Ubiquitinylation, T-Cell receptor

Findings

Nuclear factor- κ B (NF- κ B) transcription factors initiate transcription of genes essential for mounting an adequate immune response [1]. Ubiquitously expressed NF- κ B heterodimers of Rel family proteins are normally sequestered in the cytosol of the cells by Inhibitors of NF- κ B (I κ Bs) proteins [2]. In lymphocytes, the ligation of antigen receptors assembles the so-called CBM complex that consists of the scaffold CARMA1 and the heterodimer BCL10/MALT1 [3]. The CBM microenvironment drives oligomerized BCL10 and MALT1 to undergo K63-linked non-degradative ubiquitinylation [4-7]. This authorizes the recruitment and activation of the I κ B kinase (IKK) complex that comprises two catalytic subunits (IKK α and

IKK β) and a regulatory subunit (NEMO, also called IKK γ) [8]. IKK phosphorylation of I κ Bs precipitates their K48-linked ubiquitinylation and proteasomal elimination, and thereby allows NF- κ B to translocate to the nucleus where it binds DNA and initiates transcription [8]. NF- κ B-dependent neosynthesis of I κ Bs subsequently drives NF- κ B to shuttle back to the cytosol [1]. Although reversible ubiquitinylation processes are central for T-cell receptor-(TCR)-mediated NF- κ B activation, the deubiquitylases (DUBs) in charge of trimming these poly-ubiquitin chains to ensure optimal signaling, as well as to reset the system to basal levels remain poorly defined [9]. Thus far, two DUBs, namely cylindromatosis (CYLD) and A20 (also known as TNFAIP3), were demonstrated to negatively regulate antigen receptor signaling [9,10]. Herein, we provide evidence that Ubiquitin-Specific Protease 34 (USP34) also contributes to the fine-tuning of NF- κ B upon TCR engagement.

* Correspondence: nicolas.bidere@inserm.fr

¹INSERM UMR_S 1014, Hôpital Paul Brousse, Villejuif 94800, France

²Universit   Paris-Sud P11, Orsay 91400, France

Full list of author information is available at the end of the article

To identify additional negative regulators of TCR-mediated NF- κ B activation, we conducted a siRNA library screen against 98 DUBs through a gene reporter luciferase assay in Jurkat T cells stimulated with either anti-CD3 and anti-CD28 antibodies or PMA plus ionomycin to mimic TCR engagement (Figure 1A and Additional files 1 and 2). As expected, CYLD silencing led to an enhanced NF- κ B activity upon TCR stimulation (Figure 1A). Furthermore, this screening also uncovered siRNA sequences specific for USP34 that potentiated NF- κ B activation with a similar magnitude to CYLD siRNA (Figure 1A). USP34 encompasses a 404 kDa protein with a central catalytic domain [11]. However, little is known about this DUB, albeit it was previously linked to the Wnt developmental signaling pathway [12]. Subcellular fractionation experiments showed that USP34 was essentially distributed in the cytosol of cells regardless of TCR stimulation, and was notably absent from the nucleus and organelles (Figure 1B and Additional file 3A). We next verified by immunoblot that CYLD and USP34 endogenous levels

were efficiently decreased by their respective siRNA sequences (Figure 1C). Of note, an additional siRNA duplex specific for USP34 was also included to reinforce our initial findings (named sequence 3). Consistent with the primary screening, NF- κ B reporter activity was similarly boosted upon TCR stimulation in USP34- and CYLD-silenced Jurkat when compared to control non-targeting siRNA transfected cells (Figure 1D and E). As a consequence, the levels of the NF- κ B targets NFKBIA (I κ B α), interleukin-2 (IL-2) and TNF α , as measured by RT-PCR were increased in USP34-knocked down cells (Figure 1F). Accordingly, downstream IL-2 secretion was enhanced in supernatants of USP34-silenced cells (Figure 1G). Finally, ectopic expression of a plasmid encoding for the catalytic domain of USP34 (USP34-CD [13]) markedly dampened TCR-mediated NF- κ B activity (Figure 1H). Because USP34-CD is a large segment (383 amino acids), it is possible that in addition to the catalytic domain, it also comprises a domain required for the binding to its partners to regulate NF- κ B in lymphocytes. Collectively,

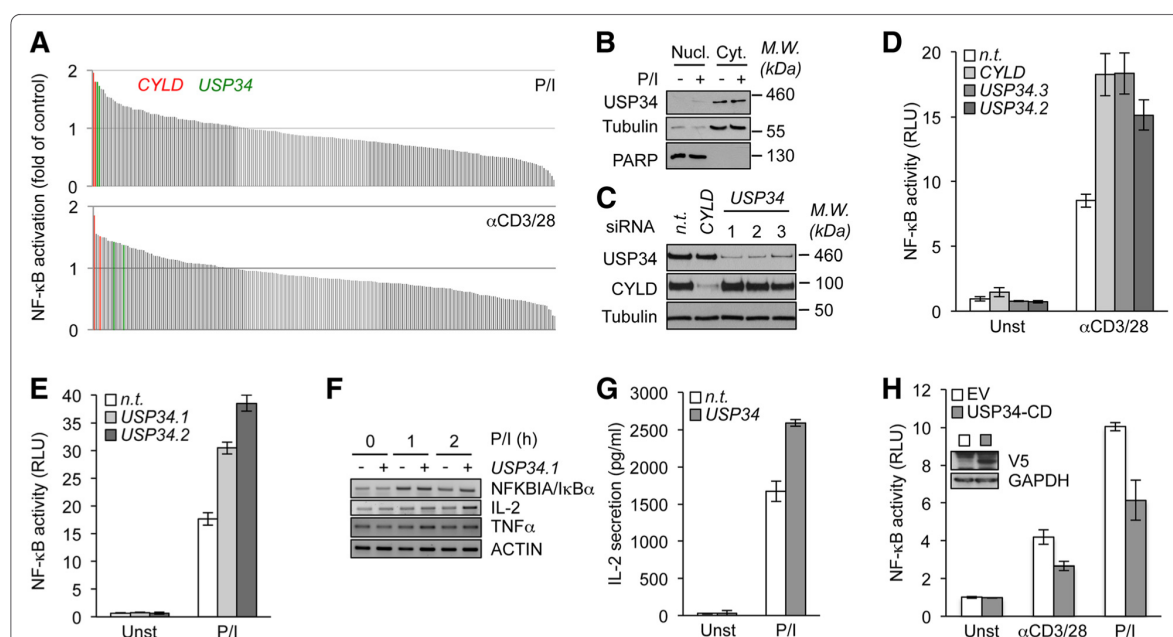


Figure 1 Identification of USP34 as a negative regulator of TCR-mediated NF- κ B activation. (A) NF- κ B reporter luciferase assay screen of a siRNA library targeting 98 DUBs (2 siRNA/target) in Jurkat T lymphocytes stimulated with 20 ng.ml⁻¹ PMA plus 300 ng.ml⁻¹ ionomycin (P/I, top panel), or with 0.5 μ g.ml⁻¹ anti-CD3 and anti-CD28 (bottom panel). Fold activation compared to non-targeting (n.t.) siRNA-treated cells is shown. Green and red histograms indicate siRNA against USP34 and CYLD, respectively. (B) Nuclear (Nucl.) and cytosolic (Cyt.) fractions from Jurkat T cells stimulated with P/I as in (A) for 0 and 15 min were analyzed by immunoblot. PARP and tubulin served as loading and purity controls for nucleus and cytosol, respectively. Molecular weight markers (M.W.) are indicated. (C) Lysates from Jurkat cells transfected for four days with siRNA against CYLD, USP34 (three individual sequences), or with control n.t. siRNA were analyzed by immunoblot as indicated. (D and E) NF- κ B reporter luciferase assay (mean $\pm$ S.D. of triplicate experiments) of n.t., CYLD- or USP34-silenced Jurkat cells stimulated as in (A). RLU, Relative Light Units; Unst, unstimulated cells. (F) Cells as in (C) were stimulated with 20 ng.ml⁻¹ PMA plus 300 ng.ml⁻¹ ionomycin (P/I) for 1 and 2 hours. mRNA levels of NFKBIA (I κ B α), IL-2, TNF α , and ACTIN were measured by RT-PCR. (G) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) of IL-2 secreted in the supernatant of Jurkat treated as in (C) and stimulated with P/I. (H) NF- κ B reporter luciferase assay of Jurkat cells transfected with the catalytic domain of USP34 (V5-tagged USP34-CD) or with a control empty vector (EV) and stimulated as indicated. Histograms represent mean $\pm$ S.D. of triplicate experiments. Inset blot shows USP34-CD expression when overexpressed in HEK293T cells.

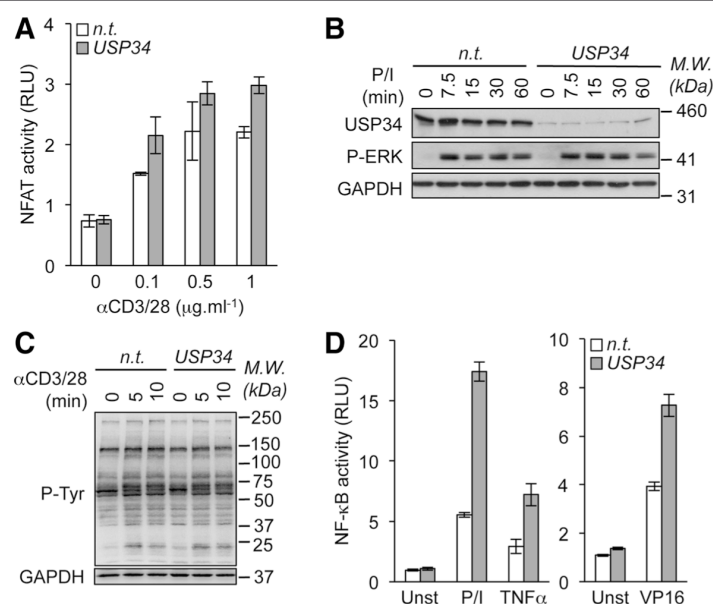


Figure 2 Knockdown of USP34 selectively potentiates NF- κ B activation. (A) NFAT reporter luciferase assay (mean $\pm$ S.D. of triplicate experiments) of Jurkat cells transfected with control non-targeting (n.t.) or USP34 siRNA and stimulated with 0, 0.1, 0.5, and 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ anti-CD3 and anti-CD28 antibodies ($\alpha\text{CD3/28}$). RLU, Relative Light Units. (B) n.t.- and USP34-silenced Jurkat cells were stimulated with 20 ng.mL^{-1} PMA plus 300 ng.mL^{-1} ionomycin (P/I) for 0, 7.5, 15, 30 and 60 min. Cell extracts were prepared and analyzed by immunoblot as indicated. Molecular weight markers (M.W.) are shown. (C) Cells as in (B) were stimulated with 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Cell extracts were prepared and general tyrosine phosphorylation pattern (P-Tyr) was evaluated by immunoblot. GAPDH served as a loading control. (D) NF- κ B reporter luciferase assay of Jurkat cells transfected as in (A) and stimulated with 10 ng.mL^{-1} PMA plus 300 ng.mL^{-1} ionomycin (P/I), with 10 ng.mL^{-1} TNF α , or with 40 μM etoposide (VP16). Shown is the mean $\pm$ S.D. of triplicate experiments. Unst, unstimulated.

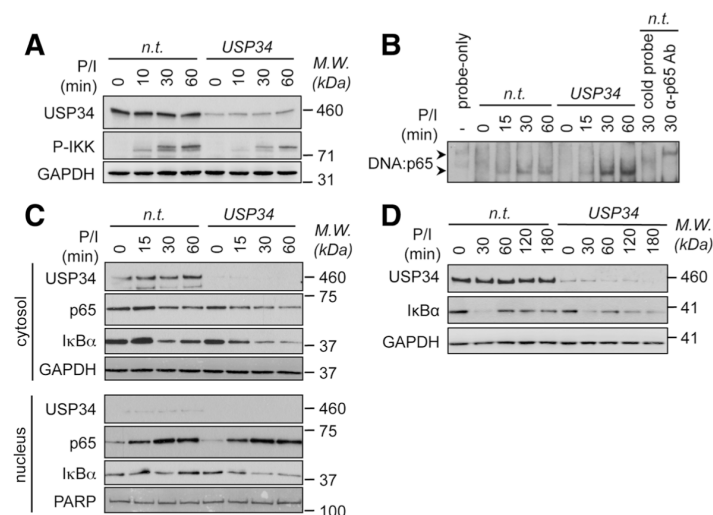


Figure 3 Silencing of USP34 enhances I κ B α degradation and NF- κ B binding to DNA. Jurkat cells were transfected with non-targeting- (n.t.) or USP34-targeting siRNA for 72-96 h. (A) Lysates from cells stimulated with 40 ng.mL^{-1} PMA plus 300 ng.mL^{-1} ionomycin (P/I) for 0, 10, 30 and 60 min were analyzed by immunoblot as indicated. M.W., molecular weight markers. (B) NF- κ B binding to DNA was assessed on nuclear extracts from cells stimulated as in (A) for the indicated time by non-radioactive electrophoretic mobility shift assays (EMSA) using biotin-labeled κ B element DNA sequence. Note that DNA:p65 complexes were chased away with a cold probe, and were shifted when a p65 antibody was added. (C) Nuclear and cytoplasmic extracts from cells stimulated as in (A) were analyzed by immunoblot as indicated. GAPDH and PARP served as loading controls. (D) Lysates from cells stimulated as in (A) were assessed by immunoblot as indicated.

our data suggest that USP34 is a cytosolic protein, which functions as a negative regulator of NF- κ B upon TCR engagement.

In addition to NF- κ B, TCR ligation kindles various signaling pathways including Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) and the Mitogen-activated protein kinase (MAPK) Extracellular signal-regulated kinases (ERK) [14]. Gene reporter assays showed only modest increase in NFAT activation in USP34-silenced when compared to control cells (Figure 2A). Furthermore, ERK phosphorylation occurred normally without USP34 (Figure 2B). Keeping with this, no overt change in the general pattern of tyrosine phosphorylation was observed upon TCR stimulation, further arguing against a general impairment of TCR signaling in the absence of USP34 (Figure 2C). We next investigated whether USP34 also curtailed NF- κ B activity emanating from TCR-autonomous signaling triggers. To this end, USP34-silenced Jurkat cells were stimulated with the cytokine TNF α or with the genotoxic stress agent etoposide that functions via an unconventional ATM/PIASy/Sumoylated-NEMO axis [15]. Paralleling the situation with TCR, knocking down USP34 markedly increased NF- κ B in cells treated with TNF α or etoposide (Figure 2D). Supporting previous studies with CYLD-deficient cells [10,16], CYLD silencing in Jurkat cells also increased TNF α - and etoposide-mediated NF- κ B activation (Additional file 4). Combined, these results indicate that USP34 shares some functional similarities with CYLD and selectively targets the NF- κ B signaling pathway.

To gain insights on the signaling basis for the exacerbated NF- κ B activity in USP34-depleted cells, we first examined BCL10 and MALT1 ubiquitinylation status since it governs the strength of TCR-mediated NF- κ B activation [4-6]. BCL10 ubiquitinylation, which can be assessed in fractions enriched with heavy membranes [17], remained unchanged without USP34 (Additional file 3A). Moreover, pull-down of CK1 α to precipitate the CBM complex [7,17], showed similar amounts of ubiquitinylated MALT1 bound in both control- and USP34-siRNA transfected cells (Additional file 3B). Keeping with this, BCL10 association to CARMA1 occurred normally without USP34 (Additional file 3C). We finally evaluated the impact of USP34 on the phosphorylation of IKK, which reflects its activation [8]. IKK phosphorylation was not exacerbated in those cells, and rather appeared slightly decreased (Figure 3A, and Additional file 3D). Although puzzling, this might result from a feedback loop triggered by enhanced NF- κ B. We next assessed directly NF- κ B DNA binding activity. Consistent with the gene reporter assays, more active NF- κ B-DNA complexes were detected in nuclear extracts from TCR stimulated cells when USP34 was silenced (Figure 3B). Although no obvious difference in NF- κ B subunit p65 translocation into the nucleus was detected, the degradation of the primary NF- κ B inhibitor

I κ B α was more pronounced in cytosolic fractions from USP34-silenced cells when compared to control cells (Figure 3C). Accordingly, I κ B α degradation was also prolonged or more dramatic in lysates from cells transfected with USP34 siRNA even on longer time points up to 3 hours (Figure 3D). Hence, our results suggest that USP34 likely functions downstream of the CBM-IKK nexus to enhance NF- κ B activation.

Almost 100 DUBs were identified in the human genome and yet, only a few have been ascribed a function [11]. As for TCR signaling, the well studied A20 and CYLD thwart NF- κ B at different levels [10]. CYLD targets and inhibits the ubiquitin-dependent IKK β kinase TAK1 and therefore prevents aberrant lymphocyte activation [18,19], while A20 dampens NF- κ B activity by trimming K63-ubiquitin chains attached to MALT1 [20,21]. Our study now unveils USP34 as an additional negative regulator of NF- κ B in lymphocytes. How USP34 tempers NF- κ B activity remains unclear. In contrast to CYLD and A20, which target apical signaling [18,20], USP34 rather seems to function downstream of the IKK complex. Given that USP34 does not bind to the NF- κ B core components (our unpublished results), we favor a model in which USP34 impacts on the activity of a cytosolic co-activator to ensure I κ B α fine-tuning [22,23]. Alternatively, USP34 might also intervene in other checkpoints to control NF- κ B signal outcome and intensity such as post-translational modifications, nuclear shift, or DNA three-dimensional structure [22,24,25]. Nevertheless, our data illustrates how various layers of control cooperate to ensure the fine-tuning of NF- κ B following engagement of the TCR.

Additional files

Additional file 1: Methods description.

Additional file 2: Design of the siRNA library screen.

Additional file 3: BCL10 and MALT1 ubiquitinylation, CBM assembly, and IKK phosphorylation in USP34-silenced cells.

Additional file 4: CYLD and USP34 silencing enhanced etoposide- and TNF α -mediated NF- κ B activation.

Abbreviations

CYLD: Cylindromatosis; DUBs: Deubiquitylases; ERK: Extracellular signal-regulated kinases; I κ Bs: Inhibitors of NF- κ B; IKK: I κ Bs kinase; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; NFAT: Nuclear factor of activated T-cells; NF- κ B: Nuclear factor- κ B; PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate; TCR: T-Cell receptor.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

KP designed and conducted most experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. EMH, NC, SMD, HML, CL, and CA designed and conducted experiments, and analyzed the data. EMH and JG helped drafting the manuscript. JG and AV analyzed the data. NB conceived the project, analyzed the data and wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We thank V. Quesada and C. Lopez-Otin (Universidad de Oviedo, Spain) for providing USP34-CD plasmid, and D. Arnoult (INSERM U1014) for helpful discussions. This work was supported by grants from ANR JCJC, Fondation ARC, Fondation de France, Ligue Nationale contre le Cancer, and by Fondation pour la Recherche Médicale. KP and SMD are supported by fellowships from Université Paris Sud, and EMH by la Ligue contre le Cancer.

Author details

¹INSERM UMR_S 1014, Hôpital Paul Brousse, Villejuif 94800, France. ²Université Paris-Sud P11, Orsay 91400, France. ³Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Villejuif, France. ⁴Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 6 rue de l'Ecole de Médecine, Paris 75006, France. ⁵INSERM, U1016, 22 rue Méchain, Paris 75014, France. ⁶CNRS, UMR8104, 22 rue Méchain, Paris 75014, France.

Received: 8 February 2013 Accepted: 3 April 2013

Published: 16 April 2013

References

- Hayden MS, Ghosh S: Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008, **132**(3):344–362.
- Hinz M, Arslan SC, Scheidereit C: It takes two to tango: IkkappaBs, the multifunctional partners of NF-kappaB. *Immunol Rev* 2012, **246**(1):59–76.
- Thome M, Charton JE, Pelzer C, Haeflinger S: Antigen receptor signaling to NF-kappaB via CARMA1, BCL10, and MALT1. *Cold Spring Harb Persp Biol* 2010, **2**(9):a003004.
- Oeckinghaus A, Wegener E, Welteke V, Ferch U, Arslan SC, Ruland J, Scheidereit C, Krappmann D: Malt1 ubiquitination triggers NF-kappaB signaling upon T-cell activation. *EMBO J* 2007, **26**(22):4634–4645.
- Sun L, Deng L, Ea CK, Xia ZP, Chen ZL: The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell* 2004, **14**(3):289–301.
- Wu CJ, Ashwell JD: NEMO recognition of ubiquitinated Bcl10 is required for T cell receptor-mediated NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(8):3023–3028.
- Bidere N, Ngo VN, Lee J, Collins C, Zheng L, Wan F, Davis RE, Lenz G, Anderson DE, Arnoult D, et al: Casein kinase 1alpha governs antigen-receptor-induced NF-kappaB activation and human lymphoma cell survival. *Nature* 2009, **458**(7234):92–96.
- Israel A: The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010, **2**(3):a000158.
- Skaug B, Jiang X, Chen ZJ: The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu Rev Biochem* 2009, **78**:769–796.
- Harhaj EW, Dixit VM: Regulation of NF-kappaB by deubiquitinases. *Immunol Rev* 2012, **246**(1):107–124.
- 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**(5):773–786.
- Lui TT, Lacroix C, Ahmed SM, Goldenberg SJ, Leach CA, Daulat AM, Angers S: The ubiquitin-specific protease USP34 regulates axin stability and Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol* 2011, **31**(10):2053–2065.
- Quesada V, Diaz-Perales A, Gutierrez-Fernandez A, Garabaya C, Cal S, Lopez-Otin C: Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **314**(1):54–62.
- Samelson LE: Immunoreceptor signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011, **3**(12):a011510.
- McCool KW, Miyamoto S: DNA damage-dependent NF-kappaB activation: NEMO turns nuclear signaling inside out. *Immunol Rev* 2012, **246**(1):311–326.
- Niu J, Shi Y, Iwai K, Wu ZH: LUBAC regulates NF-kappaB activation upon genotoxic stress by promoting linear ubiquitination of NEMO. *EMBO J* 2011, **30**(18):3741–3753.
- Carvalho G, Le Guelle A, Demian C, Vazquez A, Gavard J, Bidere N: Interplay between BCL10, MALT1 and IkkappaBalpha during T-cell-receptor-mediated NFkappaB activation. *J cell sci* 2010, **123**(Pt 14):2375–2380.
- Reiley WW, Jin W, Lee AJ, Wright A, Wu X, Tewalt EF, Leonard TO, Norbury CC, Fitzpatrick L, Zhang M, et al: Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates the ubiquitin-dependent kinase Tak1 and prevents abnormal T cell responses. *J Exp Med* 2007, **204**(6):1475–1485.

- Staal J, Driege Y, Bekaert T, Demeyer A, Muyllaert D, Van Damme P, Gevaert K, Beyaert R: T-cell receptor-induced JNK activation requires proteolytic inactivation of CYLD by MALT1. *EMBO J* 2011, **30**(9):1742–1752.
- Duwel M, Welteke V, Oeckinghaus A, Baens M, Kloos B, Ferch U, Darnay BG, Ruland J, Marynen P, Krappmann D: A20 negatively regulates T cell receptor signaling to NF-kappaB by cleaving Malt1 ubiquitin chains. *J Immunol* 2009, **182**(12):7718–7728.
- Stilo R, Varricchio E, Liguoro D, Leonardi A, Vito P: A20 is a negative regulator of BCL10- and CARMA3-mediated activation of NF-kappaB. *J Cell Sci* 2008, **121**(Pt 8):1165–1171.
- Perkins ND: The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012, **12**(2):121–132.
- Wan F, Lenardo MJ: The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell Res* 2010, **20**(1):24–33.
- Chen LF, Greene WC: Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, **5**(5):392–401.
- Smale ST: Hierarchies of NF-kappaB target-gene regulation. *Nat Immunol* 2011, **12**(8):689–694.

doi:10.1186/1478-811X-11-25

Cite this article as: Poalas et al.: Negative regulation of NF-kB signaling in T lymphocytes by the ubiquitin-specific protease USP34. *Cell Communication and Signaling* 2013 **11**:25.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Additional File 1: Methods description

Cell culture and reagents

Jurkat T lymphocytes (clone E6.1) and human embryonic kidney 293T cells (HEK293T) were obtained from the ATCC. Cells were stimulated with 0.1-1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ of anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (BD Biosciences), or with 10-40 ng.ml^{-1} phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma) plus 300 ng.ml^{-1} ionomycin (Calbiochem). $\text{TNF}\alpha$ (R&D) and etoposide (VP16, Sigma) were also used. Plasmid encoding the catalytic domain of USP34 was kindly provided by V. Quesada and C. Lopez-Otin [1], and was subcloned in a V5-backbone (Invitrogen, Life technologies).

siRNA library and transfections

siRNA library targeting 98 human DUBs (two oligoribonucleotide duplexes per target, based on [2]) was purchased from Sigma (see Additional File 2). Jurkat cells were transfected by electroporation with a BTX ECM 830 apparatus (BTX, Harvard Apparatus). siRNA sequences used were: USP34.1, 5'-GGAUCUAGCAAUGAGGUUA[dT][dT]-3' (Sigma); USP34.2, 5'-GAUCUUAGGGCUGAAGUAA[dT][dT]-3' (Sigma); USP34.3, 5'-GGCAAGACAUUUGGCUGACUGUAUU-3' (Invitrogen); CYLD, 5'-GAACAGAUUCCACUCUUUA[dT][dT]-3' (Sigma). Negative controls were from Sigma and Invitrogen.

Luciferase assays

Firefly luciferase constructs downstream of κB or NFAT-responsive elements were co-transfected with renilla luciferase pRL-TK (Int-) plasmid (Promega). Luciferase activities were analyzed by measuring light emission using the Dual-Luciferase Kit (Promega), with firefly

luminescence units normalized to renilla firefly luciferase luminescence units (BMG microplate reader).

Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Human IL-2 production and release was determined after overnight stimulation, in the culture supernatants by an enzyme-linked immunosorbent assay (R&D).

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reactions (RT-PCR)

RT-PCR were carried out as previously described [3]. Briefly, equal amounts of RNA (Qiagen RNeasy mini kit) were reverse transcribed (Superscript III, Invitrogen), and cDNA were then amplified (RedTaq ready mix, Sigma). Primers used were: NFKBIA, 5'-GCAAAATCCTGACCTGGTGT -3' and 3'- GCTCGTCCTCTGTGAACTCC -5'; TNF α , 5'-TCCTTCAGACACCCTCAACC -3' and 3'- AGGCCCCAGTTTGAATTCTT -5'; IL-2, 5'-ACCTCAACTCCTGCCACAAT -3' and 3'- GCCTTCTTGGGCATGTAAAA -5'; β -actin, 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG -3' and 3'- GGACTTCGAGCAAGAGATGG -5'.

Immunoblots and immunoprecipitation

Stimuli were washed out twice with PBS 1X and cell pellets were lysed at 4°C with 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% Igepal, supplemented with Complete protease inhibitors (Roche). 20 nM calyculin A was added to the lysis buffer when IKK phosphorylation was assessed. Lysates were cleared by centrifugation at 9,000g at 4°C and total protein concentration was determined with a micro BCA kit (Thermo scientific). 5-20 μ g were resolved in 5-8% Tris-Acetate SDS-PAGE gels (Invitrogen) or 5-20% Tris-Glycine gels

according to company's instructions and electrotransferred onto nitrocellulose membranes (Amersham). Antibodies to USP34 were from Bethyl laboratories. Antibodies against BCL10 (A-6), CK1 α (C-19), CYLD (H-6), LAMP2 (H4B4), MALT1 (B-12), NF- κ B p65 (C-20 and F-6), and tubulin (TU-02) were from Santa Cruz Biotechnology. Antibodies against CARMA1 (1D12), I κ B α , phosphorylated-I κ B α (5A5), phosphorylated IKK α β (16A6), and phosphorylated ERK1/2 (E10) were purchased from Cell Signaling Technology. Antibodies against GAPDH and V5 tag (Sigma), phosphorylated tyrosine (4G10, Millipore), and PARP (BD biosciences) were also used. HRP-conjugated secondary antibodies were purchased from Jackson. Immobilon chemiluminescent substrate (Millipore) was used for protein detection with autoradiography films. Immunoprecipitations were carried out as previously described [4]. Briefly, post-centrifugation lysates were precleared with protein G-sepharose (Roche) for 30 min prior to 1-2h incubation with antibodies and fresh protein G-sepharose at 4°C. After four washes, immunocomplexes were denaturated and resolved by SDS-PAGE.

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) and subcellular fractionation

5-10.10⁶ cells were washed with PBS1X and placed for 5 min at 4°C in 187.5 μ l Buffer A (10 mM HEPES pH 7.4, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, and Complete proteases inhibitors). Plasma membranes were solubilized by adding 12.5 μ l of 10% Igepal (Sigma) for 5 min at 4°C. Nuclei were pelleted with a 600g centrifugation and washed twice with buffer A. Nuclear proteins were then extracted with 30 μ l Buffer C (20 mM HEPES pH 7.4, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, and Complete proteases inhibitors) under rocking conditions. Nuclear extracts were cleared by centrifugation at 13,000g. EMSA to detect NF- κ B:DNA complex formation was

performed by using a non-radioactive kit with biotin-labeled or unlabeled DNA sequences (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3') containing κ B element (Affymetrix). Jurkat nuclear extracts were treated according to manufacturers protocol. Biotinylated B nylon membranes (Thermo scientific) were used for the electrotransfer. Subcellular fractionation experiments were performed as previously described [5]. In brief, cells were mechanically permeabilized with 27G^{1/2} syringe (Becton Dickinson) in 20 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 60 mM KCl, and protease inhibitors. Nuclei were eliminated by a 1,000g centrifugation, and supernatants were further spun at 10,000g to yield crude heavy membranes pellets. Cytosolic fractions were obtained after an additional 25,000g centrifugation.

Additional References

1. Quesada V, Diaz-Perales A, Gutierrez-Fernandez A, Garabaya C, Cal S, Lopez-Otin C: **Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **314**(1):54-62.
2. 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**(5):773-786.
3. Dwyer J, Hebda JK, Le Guelte A, Galan-Moya EM, Smith SS, Azzi S, Bidere N, Gavard J: **Glioblastoma cell-secreted interleukin-8 induces brain endothelial cell permeability via CXCR2.** *PLoS One* 2012, **7**(9):e45562.
4. Bidere N, Ngo VN, Lee J, Collins C, Zheng L, Wan F, Davis RE, Lenz G, Anderson DE, Arnoult D *et al*: **Casein kinase 1alpha governs antigen-receptor-induced NF-kappaB activation and human lymphoma cell survival.** *Nature* 2009, **458**(7234):92-96.
5. Carvalho G, Le Guelte A, Demian C, Vazquez A, Gavard J, Bidere N: **Interplay between BCL10, MALT1 and IkappaBalpha during T-cell-receptor-mediated NFkappaB activation.** *Journal of cell science* 2010, **123**(Pt 14):2375-2380.

Additional File 2: Design of the siRNA library

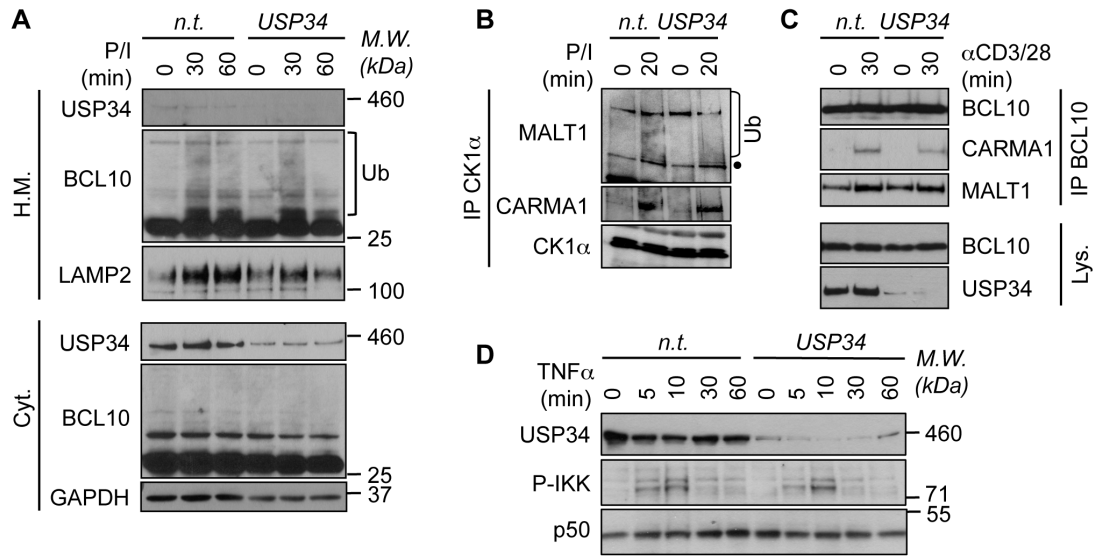
Name	RefSeq ID	siRNA ID or sense siRNA
BAP1	NM_004656	SASI_Hs01_00105395
		SASI_Hs01_00105396
UCH-L1	NM_004181	SASI_Hs01_00178415
		SASI_Hs01_00178416
UCH-L3	NM_006002	SASI_Hs01_00200423
		SASI_Hs01_00200424
UCH-L5, UCH37	NM_015984	SASI_Hs01_00142742
		SASI_Hs01_00142743
USP1	NM_001017415	SASI_Hs01_00157121
		SASI_Hs01_00157122
USP2	NM_171997	SASI_Hs01_00174976
		SASI_Hs02_00367754
USP3	NM_006537	SASI_Hs01_00023593
		SASI_Hs01_00023595
USP4, UNPH	NM_199443	SASI_Hs01_00028215
		SASI_Hs01_00028216
USP5	NM_003481	SASI_Hs01_00184929
		SASI_Hs01_00184930
USP6, TRE-2, TRE17	NM_004505	SASI_Hs02_00337765
		SASI_Hs02_00337766
USP7, HAUSP	NM_003470	SASI_Hs01_00079539
		SASI_Hs01_00079540
USP8, UBPY	NM_005154	SASI_Hs02_00339089
		SASI_Hs01_00136039
USP9X, FAF-X	NM_001039590	SASI_Hs01_00031439
		SASI_Hs02_00308597
USP9Y, FAF-Y	NM_004654	SASI_Hs01_00081909
		SASI_Hs02_00338066
USP10	NM_005153	SASI_Hs01_00213007
		SASI_Hs01_00213008
USP11	NM_004651	SASI_Hs01_00148685
		SASI_Hs01_00148686
USP12, UBH1	NM_182488	SASI_Hs01_00167303
		SASI_Hs01_00167305
USP13, ISOT-3	NM_003940	SASI_Hs01_00108438
		SASI_Hs01_00108439
USP14, ISOT	NM_005151	SASI_Hs01_00016087
		SASI_Hs01_00016089
USP15	NM_006313	SASI_Hs01_00059894
		SASI_Hs01_00059895
USP16, UBPM	NM_001001992	SASI_Hs01_00121496
		SASI_Hs02_00341586
USP17L3	XM_001720764 1 s	CACGUUAACUUUACACACUdTdT
		CUAUCAUUGCGGUCUUUGUdTdT
		GCAAUAUCCUGAGUGCCUUdTdT
		GUUGUCACGACGACAUUAdTdT
		GCAACAAACUUGCCAAGAAAdTdT
		GGAAGAUGUCCAUGAAUUUdTdT
		GACAUUACUUCUCUUAUGUdTdT
		CUCAAGAAGGCCAGUGGUAdTdT
		CACCUUAGACCACUGGAAAdTdT
		GAGAUUCUCCGAUGUCGAdTdT
USP18, UBP43	NM_017414	SASI_Hs01_00221412

		SASI_Hs01_00221413
USP19	NM_006677	SASI_Hs01_00130241
		SASI_Hs01_00130242
USP20, VDU1	NM_001008563	SASI_Hs01_00099343
		SASI_Hs01_00099344
USP21, USP23	NM_001014443	SASI_Hs01_00177787
		SASI_Hs01_00177788
USP22	XM_042698	SASI_Hs01_00276309
		SASI_Hs01_00276310
USP24	XM_934749	SASI_Hs01_00301651
		SASI_Hs01_00301652
USP25	NM_013396	SASI_Hs02_00344762
		SASI_Hs01_00191397
USP26	NM_031907	SASI_Hs01_00043149
		SASI_Hs01_00043150
USP28	NM_020886	SASI_Hs01_00077918
		SASI_Hs01_00077919
USP29	NM_020903	SASI_Hs01_00032719
		SASI_Hs01_00032720
USP30	NM_032663	SASI_Hs01_00155679
		SASI_Hs01_00155680
USP31	NM_020718	SASI_Hs01_00020641
		SASI_Hs01_00020642
USP32	NM_032582	SASI_Hs01_00086230
		SASI_Hs01_00086231
USP33, VDU2	NM_201626	SASI_Hs01_00142382
		SASI_Hs01_00142383
USP34	NM_014709	SASI_Hs01_00089169
		SASI_Hs02_00346129
USP35	XM_935137	SASI_Hs01_00291572
		SASI_Hs01_00291573
USP36	NM_025090	SASI_Hs02_00357787
		SASI_Hs01_00194136
USP37	NM_020935	SASI_Hs01_00018875
		SASI_Hs02_00354323
USP38	NM_032557	SASI_Hs01_00189218
		SASI_Hs02_00360065
USP39, SAD1	NM_006590	SASI_Hs01_00034674
		SASI_Hs01_00034675
USP40	NM_018218	SASI_Hs01_00145783
		SASI_Hs02_00351527
USP41	XM_036729	SASI_Hs02_00482814
		SASI_Hs02_00482815
USP42	XM_932196	SASI_Hs01_00248233
		SASI_Hs01_00248234
USP43	XM_934221	SASI_Hs01_00274671
		SASI_Hs01_00274672
USP44	NM_032147	SASI_Hs02_00359381
		SASI_Hs01_00075742
USP45	XM_931124	SASI_Hs01_00265784
		SASI_Hs01_00265785
USP46	NM_022832	SASI_Hs01_00080807
		SASI_Hs01_00080808
USP47	NM_017944	SASI_Hs01_00112225
		SASI_Hs01_00112227
USP48	NM_032236	SASI_Hs01_00077498
		SASI_Hs01_00077499
USP49	NM_018561	SASI_Hs01_00055585

		SASI_Hs02_00352112
USP50	NM_203494	SASI_Hs02_00373416
		SASI_Hs02_00373417
USP51	NM_201286	SASI_Hs02_00372924
		SASI_Hs02_00372925
USP52	NM_014871	SASI_Hs01_00133440
		SASI_Hs01_00133442
USP54	NM_152586	SASI_Hs02_00366408
		SASI_Hs02_00366409
USPL1	NM_005800	SASI_Hs02_00340306
		SASI_Hs01_00128479
CYLD	NM_015247	SASI_Hs01_00177192
		SASI_Hs01_00177191
DUB-3	NM_201402	SASI_Hs02_00372940
		SASI_Hs02_00372941
Ataxin-3	NM_030660	SASI_Hs02_00358236
		SASI_Hs02_00358237
Ataxin-3-like	XM_045705	SASI_Hs01_00259290
		SASI_Hs01_00259291
Josephin-1	NM_014876	SASI_Hs02_00346483
		SASI_Hs01_00072064
Josephin-2	NM_138334	SASI_Hs01_00128488
		SASI_Hs01_00128489
TAF1D	NM_024116	SASI_Hs01_00119698
		SASI_Hs01_00119700
TNFAIP3, A20	NM_006290	SASI_Hs01_00033556
		SASI_Hs01_00033557
ZA20D1, Cezanne-1	NM_020205	SASI_Hs01_00089029
		SASI_Hs01_00089030
OTUD7i, Cezanne-2	NM_130901	SASI_Hs01_00055782
		SASI_Hs01_00055783
OTUD4, HIN-1	NM_017493	SASI_Hs02_00372731
		SASI_Hs02_00372732
OTUD6A, HIN-6	NM_207320	SASI_Hs01_00018704
		SASI_Hs01_00018705
OTUD2, YOD1	NM_018566	SASI_Hs01_00052848
		SASI_Hs01_00052849
OTUD6B	NM_016023	SASI_Hs01_00222466
		SASI_Hs02_00348712
OTUD5	NM_017602	SASI_Hs01_00052828
		SASI_Hs01_00052829
OTUB1, Otubain-1	NM_017670	SASI_Hs02_00378146
		SASI_Hs02_00378147
OTUB2, Otubain-2	NM_023112	SASI_Hs01_00010701
		SASI_Hs01_00010702
OTUD1	XR_040065	SASI_Hs02_00515603
		SASI_Hs02_00515604
ZRANB1, TRABID	NM_017580	SASI_Hs01_00155779
		SASI_Hs02_00350242
VCPIP1, VCIP135	NM_025054	SASI_Hs02_00357704
		SASI_Hs01_00165636
STAMBP, AMSH	NM_006463	SASI_Hs01_00051759
		SASI_Hs01_00051760
STAMBPL1, AMSH-like	NM_020799	SASI_Hs01_00241436
		SASI_Hs01_00241437
BRCC3i, BRCC36, BRCC3	NM_001018055	SASI_Hs02_00356685
		SASI_Hs01_00193368
COPS5, CSN5, JAB1, SGN5	NM_006837	SASI_Hs02_00342404

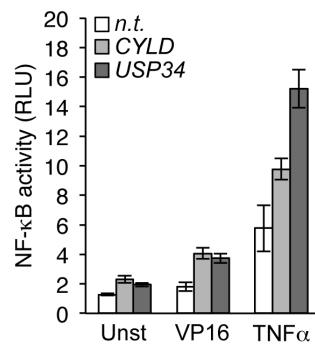
		SASI_Hs01_00209042
COPS6, CSN6, SGN6	NM_006833	SASI_Hs02_00342398 SASI_Hs01_00117938
EIF3S3, eIF-3-gamma	NM_003756	SASI_Hs01_00072290 SASI_Hs01_00072291
EIF3S5, eIF-epsilon	NM_003754	SASI_Hs01_00246686 SASI_Hs02_00336223
MYSM1	XM_055481	SASI_Hs01_00255872 SASI_Hs01_00255873
MPND	NM_032868	SASI_Hs01_00162447 SASI_Hs01_00162448
PSMD14, POH1, RPN11	NM_005805	SASI_Hs02_00340316 SASI_Hs01_00024446
PRPF8, PRP8	NM_006445	SASI_Hs01_00015918 SASI_Hs01_00015919
PSMD7, RPN8	NM_002811	SASI_Hs02_00334491 SASI_Hs02_00334492
USP17L5	XM_001130437	SASI_Hs02_00387302 SASI_Hs02_00387303
USP17L1P	XR_040280	SASI_Hs02_00517496 SASI_Hs02_00517497
IFP38	NG_005632 s	CCGAUGACUUUGAGACCAUdTdT
USP17L3	XM_001720764	CACGUUAACUUUACACACUdTdT CUAUCAUUGCGGUCUUUGUdTdT GCAAUAUCCUGAGUGCCUUdTdT GUUGUCACGACGACGACAUUAdTdT GCAACAAACUUGCCAAGAAAdTdT GGAAGAUGUCCAUGAAUUUdTdT GACAUUACUUCUUAUGUdTdT CUCAAGAAGGCCAGUGGUAdTdT CACCUUAGACCACUGGAAAdTdT GAGAUUCUCCGAUGUCGCAdTdT
USP17L4	XM_001720370	CACGUUAACUUUACACACUdTdT CUAUCAUUGCGGUCUUUGUdTdT GCAAUAUCCUGAGUGCCUUdTdT GUUGUCACGACGGAUUAUAdTdT GCAACAAACUUGCCAAGAAAdTdT CACCUUAGACCACUGGAAAdTdT GGAAGAUGUCCAUGAAUUUdTdT CUCAAGAAGGCCAGUGGUAdTdT GAGAUUCUCCGAUGUCGCAdTdT CGGAUAUUACUUCUUAUdTdT
USP17L6	NR_027279	CUGGACAUCGCCCUGGAUdTdT CCAAGGUCCUCAUCCUUGUdTdT GAGAUUCUCCGAUGUCACAdTdT GCCUAUCAUUGUGGUGUUUdTdT GCUUCCUUGCAGUGCCUGAdTdT GGAAGAUGCCCAUGAAUUUdTdT
USP17L7	XM_001723172	GAGAUUCUCCGAUGUCACAdTdT GCGUAUUGGAGAUUCUCAAAdTdT CACCUUAGACCACUGGAAAdTdT CUCUCAACGUGUCAUCUUdTdT CUCAUUCUUGUAUUGAAGAdTdT CCAAAGAACUCAUUGGAGAdTdT GACGUUAACUUUACCCACUdTdT CAUGAAUUUCUAUGUUUAdTdT CAUGUUCUGUACUAUGCAAdTdT CUCAAGAAGGCCAGUGGUAdTdT

USP17L8	XM_001720762	GAGAUUCUGCGAUGUCACAdTdT GUUGUCACAACGGAUUAUAdTdT CUAUCCUUGCGGUCUUUGUdTdT
DUSP19	AB038770	GAAUUUAUUGAAGAAGCAAdTdT GUUGCAUAUGGAGUUGAAAdTdT CCAACAUCCUGUCUUUUUdTdT GACUUUACAUUAAGAGCAdTdT GCUUCCUCAGUGACUUUAdTdT GACUCAUAUUCUUAUGUUdTdT



Additional File 3: BCL10 and MALT1 ubiquitinylation, CBM assembly, and IKK phosphorylation in USP34-silenced cells.

(A) Non-targeting siRNA- (n.t.) or USP34-silenced Jurkat cells were stimulated with 20 ng.ml⁻¹ PMA plus 300 ng.ml⁻¹ ionomycin (P/I). Cells were mechanically permeabilized, and crude heavy membrane (H.M.) and cytosolic (Cyt.) fractions were prepared. Immunoblots were performed as indicated. LAMP2 and GAPDH are markers for H.M. and Cyt. fractions, respectively. M.W., molecular weight markers. **(B and C)** Cells as in (A) were stimulated with P/I (B) or with 1 μg.ml⁻¹ anti-CD3 and anti-CD28 (C) as indicated. Lysates were prepared and immunoprecipitated (IP) with antibodies against CK1α (B) or BCL10 (C). Immunoblots were performed as indicated. Lys, lysates. **(D)** Lysates from n.t.- or USP34-silenced cells stimulated with 10 ng.ml⁻¹ TNFα were examined as indicated by immunoblot. p50 served as a loading control.



Additional File 4: CYLD and USP34 silencing enhanced etoposide- and TNFα-mediated NF-κB activation.

NF-κB reporter luciferase assay (mean ± S.D.) of non targeting siRNA (n.t.)-, CYLD- or USP34-silenced Jurkat cells stimulated with 40 nM etoposide (VP16), or with 10 ng.ml⁻¹ TNFα. Unst, unstimulated; RLU, relative light units.

Article II

Participation of the E3-ligase TRIM13 in NF- κ B p65 activation and NFAT-dependant activation of c-Rel upon T-cell receptor engagement

Hatchi EM, Poalas K, Cordeiro N, N'Debi M, Gavard J, Bidère N.

Sous presse à International Journal of Biochemistry and Cell Biology (IJBCB)

Afin d'étudier plus précisément les processus d'ubiquitination survenant à la surface des organites intracellulaires, nous avons criblé une librairie de siRNA ciblant les E3 ligases humaines possédant un ou plusieurs domaines transmembranaires (46 cibles).

Ceci a permis l'identification de la protéine TRIM13 (aussi appelée RFP2 ou LEU5) comme un régulateur positif de NF- κ B dans la lignée de lymphocytes T Jurkat. TRIM13 est une protéine de 407 acides aminés avec un domaine RING N-terminal et un domaine transmembraire C-terminal qui l'ancre à la surface du réticulum endoplasmique (RE). TRIM13 est localisé sur une région chromosomique (13q14.3) fréquemment éliminée dans les leucémies chroniques et dans les myélomes multiples. TRIM13 a également été associé à divers processus biologiques tels que la dégradation des protéines associées au RE (ERAD), le stress du RE, ou encore l'immunité innée. Nous montrons que la surexpression de TRIM13, mais pas de mutants délétés des domaines RING ou transmembraire active la transcription de NF- κ B.

La réduction des niveaux d'expression de TRIM13 par interférence à l'ARN diminue sensiblement la translocation initiale de la sous-unité NF- κ B p65 et plus largement son maintien dans le noyau. Toutefois, l'absence de TRIM13 n'affecte pas notablement l'assemblage du CBM, la phosphorylation du complexe IKK ou la phosphorylation et la dégradation subséquente d'I κ B α . En revanche, la translocation de la sous-unité NF- κ B c-Rel est sévèrement réprimée. Contrairement à p65 qui est rapidement activé suite à la dégradation de son inhibiteur I κ B α , l'activation de c-Rel requiert une boucle amplificatrice qui met en jeu le facteur des cellules T activées NFAT. D'ailleurs, l'activité transcriptionnelle de NFAT est diminuée en l'absence de TRIM13. Il en résulte un défaut d'induction de c-Rel. A l'instar de la situation observée pour TRIM13, l'extinction par siRNA de c-Rel affecte également le maintien de p65 dans le noyau à long terme. Nos travaux révèlent donc TRIM13 comme un régulateur positif des voies NF- κ B et NFAT.



Short communication

Participation of the E3-ligase TRIM13 in NF- κ B p65 activation and NFAT-dependent activation of c-Rel upon T-cell receptor engagementEmeline M. Hatchi^{a,b,c}, Konstantinos Poalas^{a,b,c}, Nelia Cordeiro^{a,b,c}, Mélissa N'Debi^{a,b,c}, Julie Gavard^{d,e,f}, Nicolas Bidère^{a,b,c,*}^a INSERM, UMR_S 1014, Hôpital Paul Brousse, Villejuif 94800, France^b Université Paris-Sud P11, Orsay 91400, France^c Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Villejuif, France^d Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 6 rue de l'Ecole de Médecine, Paris 75006, France^e INSERM, U1016, 22 rue Méchain, Paris 75014, France^f CNRS, UMR8104, 22 rue Méchain, Paris 75014, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 April 2014

Received in revised form 28 June 2014

Accepted 16 July 2014

Available online 1 August 2014

Keywords:

NF- κ B

Lymphocytes

Ubiquitylation

Signaling

ABSTRACT

The nuclear factor κ B (NF- κ B) family members p65 and c-Rel chiefly orchestrate lymphocytes activation following T-cell receptor (TCR) engagement. In contrast to p65, which is rapidly mobilized, c-Rel activation occurs subsequently as it involves a nuclear factor of activated T-cells (NFAT)-dependent upregulation step. However, how TCR ligation drives p65 and c-Rel activation is not fully understood. Because several ubiquitylated components of NF- κ B signaling cascade accumulate in close proximity to membranes, we screened a siRNA library against E3-ligases that contain transmembrane domains on TCR-mediated NF- κ B activation. Here, we report the identification of the endoplasmic reticulum resident TRIM13 protein as an enhancer of NF- κ B promoter activity. We found that knocking down TRIM13 by RNA interference reduced the activation of p65, while the translocation of c-Rel into the nucleus was blunted. We further observed that c-Rel induction was diminished without TRIM13, as NFAT activation was compromised. These results unveil that TRIM13 is a selective regulator of p65 and of c-Rel activation.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The nuclear factor κ B (NF- κ B) transcription factor family consists of five members (RelA/p65, p50/p105, c-Rel, RelB, p52/p100), which are constitutively assembled as dimers in the cytosol of cells, and held in check by the inhibitors of NF- κ B (I κ Bs) (Ghosh and Hayden, 2008). The engagement of T-cell receptor (TCR) at the surface of lymphocytes nucleates the formation of a multi-protein complex that contains CARMA1, BCL10, and MALT1 (CBM complex) (Thome et al., 2010). Series of phosphorylations and ubiquitylations within the CBM coordinate the recruitment and the activation of the I κ B kinase (IKK) complex, which phosphorylates I κ Bs and thereby triggers their proteasomal degradation (Thome et al., 2010). Released NF- κ B heterodimers enter into the nucleus and initiate gene transcription (Ghosh and Hayden, 2008). Gene

targeting models established that p65 and c-Rel are essential for the optimal activation of T lymphocytes (Grumont et al., 2004; Kontgen et al., 1995). While p65 is readily mobilized to translocate into the nucleus, c-Rel activation requires a calcineurin- and nuclear factor of activated T-cells- (NFAT) dependent amplification loop and therefore only secondarily reaches the nucleus upon TCR stimulation (Grumont et al., 2004; Tan et al., 1992; Venkataraman et al., 1995, 1996).

How exactly TCR engagement drives p65 and c-Rel activation in T lymphocytes remains elusive. Interestingly, various steps of the TCR signaling pathway occur in close proximity with cellular membranes. For instance, CARMA1 is tethered to the plasma membrane and assembles the CBM in raft microdomains (Gaide et al., 2002). In addition, ubiquitylated species of BCL10 emanating from the CBM accumulate at the cytosolic leaflet of the endoplasmic reticulum (ER), as well as in p62-containing autophagosomes (Alexia et al., 2013; Carvalho et al., 2010; Paul et al., 2012). Here, we screened a siRNA library against the 46 known transmembrane domain containing E3-ligases and identified the ER-resident tripartite motif-containing protein 13 (TRIM13, also called RFP2

* Corresponding author at: INSERM, UMR_S 1014, Hôpital Paul Brousse, Villejuif 94800, France. Tel.: +33 145596032.

E-mail address: nicolas.bidere@inserm.fr (N. Bidère).

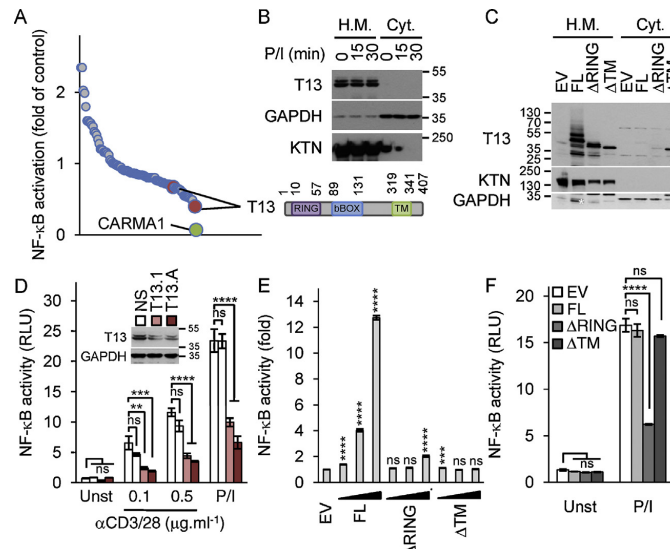


Fig. 1. Participation of TRIM13 in T-cell receptor-mediated NF- κ B activation. (A) NF- κ B reporter luciferase assay screen of a siRNA library targeting 46 transmembrane E3 ligases (2 siRNA/target) in Jurkat T lymphocytes. Cells were stimulated with 20 ng/ml PMA plus 300 ng/ml ionomycin (P/I) and fold activation compared to non-specific (NS) siRNA-treated cells was calculated. Red and green symbol indicate siRNA against TRIM13 (T13) and CARMA1, respectively. (B) Crude heavy membranes (H.M.) and cytosolic (Cyt.) fractions from Jurkat cells stimulated as in (A) were analyzed by immunoblot as indicated. The ER-resident protein kinectin (KTN) and the cytosolic protein GAPDH served as loading and purity controls. The scheme shows TRIM13 main domains. (C) HEK293T cells were transfected with FLAG-tagged plasmids coding for TRIM13 (full-length, FL), TRIM13 mutants lacking the RING domain (Δ RING) or the transmembrane span (Δ TM), or an empty vector (EV). Crude H.M. and Cyt. fractions were obtained as in (B) and immunoblots were performed as indicated. Symbols (*) shows residual TRIM13 staining. (D) NF- κ B reporter luciferase assay in cells transfected with a NS siRNA or with two individual siRNA against TRIM13 (T13.1 and T13.A). Cells were stimulated with anti-CD3 plus anti-CD28 (α CD3/28) or with P/I as in (A). Histograms represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. ** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001 compared to cells transfected with NS siRNA [analysis of variance (ANOVA)]. ns, non significant; RLU, Relative Light Units. (E) NF- κ B reporter luciferase assay in HEK293T cells transfected with increasing concentrations of the indicated expression vectors (0.01, 0.1, and 1 μ g). Shown is the fold activation when compared to an empty vector control (mean $\pm$ SEM of three independent experiments; **** P < 0.0001 by ANOVA). (F) NF- κ B reporter luciferase assay in Jurkat cells transfected with the indicated plasmids and stimulated as in (A). **** P < 0.0001 by ANOVA.

or LEU5) as a new regulator of TCR-mediated NF- κ B activation. We further show that TRIM13 controls c-Rel induction via NFAT, which subsequently maintains p65 in the nucleus following TCR engagement.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and reagents

Jurkat cells and HEK293T were obtained from ATCC. Jurkat were stimulated with 0.1–0.5 μ g/ml of anti-CD3 plus anti-CD28 antibodies (BD Biosciences), or with 20–40 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich) plus 300 ng/ml ionomycin (Calbiochem). Calcium fluxes were assessed with Fluo-4-NW (Life technologies). Cyclosporin A (CsA) was from InvivoGen.

2.2. Plasmids, siRNA, transfections, luciferase assays, and confocal microscopy

FLAG-tagged plasmids coding for TRIM13 full-length (amino acids 1–407), Δ RING (amino acids 61–407), Δ TM (amino acids 1–310), and c-Rel (provided by Thomas Gilmore, Boston University, Boston MA) were transfected with Turbofect (thermo scientific) or with standard calcium phosphate methodology. For luciferase reporter gene assays, cells were transfected at a 25:1 ratio with firefly luciferase plasmids driven by consensus κ B and NFAT sites, together with a pRL-TKInt-renilla luciferase control construct (Promega) (Wan et al., 2007). A siRNA library targeting 46 human E3 ligases (two sequences per target) was purchased from Sigma-Aldrich. Additional

sequences and negative control were from Life technologies and Sigma-Aldrich. Jurkat cells were transfected by electroporation (BTX, Harvard Apparatus). siRNA sequences used were: TRIM13.1, 5'-CCUCAAGACACUGGCACAUUCAUUA-3'; TRIM13.A, 5'-CUGACUAAAGAUUCAGAUUA-3'; c-Rel.1, 5'-CAUUAUAAACCUACCUCA-3'; c-Rel.2, 5'-ACAUGGUAUUUGACGACUGUCUU-3'. Confocal microscopy was performed as previously described (Dubois et al., 2014).

2.3. Cell fractionation, immunoprecipitations and immunoblotting

Stimuli were washed out twice with ice-cold PBS 1 $\times$ and cells pellets were lysed at 4 $^{\circ}$ C with 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% Igepal, supplemented with protease inhibitors. Lysates were then cleared by centrifugation at 9000 $\times$ g at 4 $^{\circ}$ C. 5–20 μ g were resolved on 5–20% Tris-glycine gels or on 3–8% Tris-acetate gels (Life technologies) and transferred onto nitrocellulose membranes (GE healthcare). For the purification of cytosolic and nuclear fractions, cells were placed in 200 μ L of buffer A (10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, and protease inhibitors) and lysed with 12.5 μ L Igepal 10% on ice for 5 min. Nuclei were obtained after a 2500 $\times$ g centrifugation, and lysed with 30 μ L of buffer C (20 mM Hepes pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, and protease inhibitors) and cleared by a 12,000 $\times$ g centrifugation. Immunoprecipitations and subcellular fractionation experiments were performed as previously described (Alexia et al., 2013). Antibodies against BCL10, CK1 α , NFAT2, MALT1, NF- κ B p65, PPAr γ , kinectin and tubulin were from Santa Cruz.

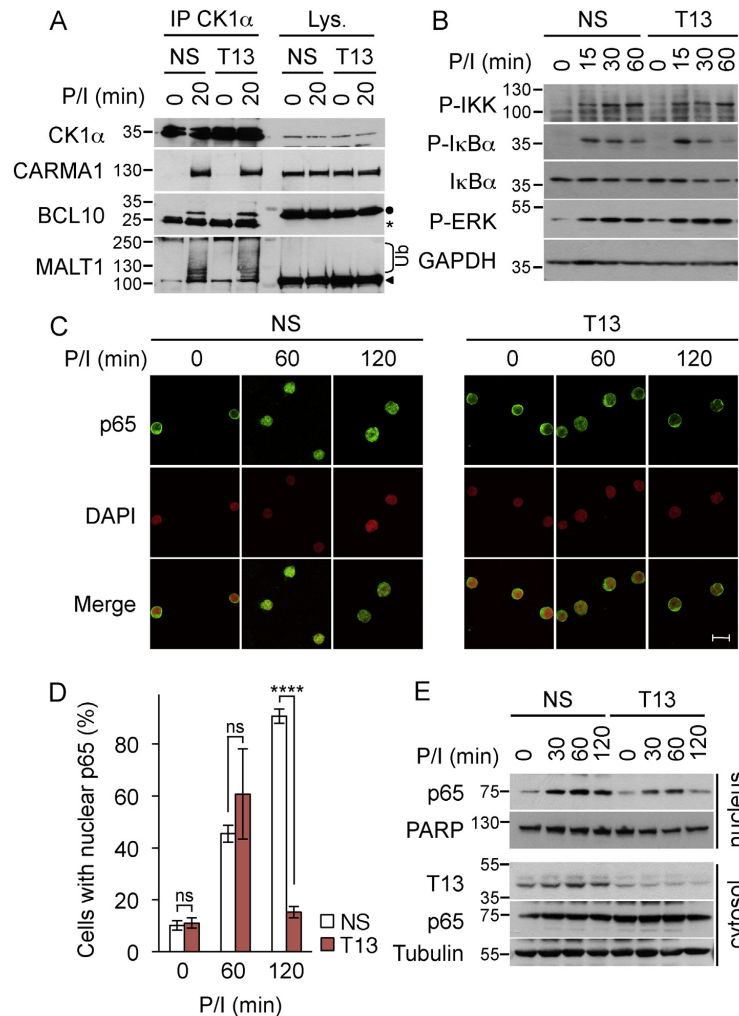


Fig. 2. Normal early signaling and reduced p65 maintenance in the nucleus upon TCR engagement in TRIM13-silenced cells. (A) Jurkat cells were transfected with nonspecific (NS) siRNA or siRNA against TRIM13 (T13). After four days, lysates from cells stimulated with 20 ng/ml PMA plus 300 ng/ml ionomycin (P/I) were prepared and immunoprecipitated (IP) with antibodies against CK1α. Immunoblots were performed as indicated. Closed symbols indicate BCL10 and MALT1. Lys., lysates; Ub, ubiquitinated MALT1; (*), immunoglobulin light chain. (B) Immunoblots of lysates from cells as in (A). (C and D) Confocal microscopy micrographs of p65 (green) in cells as in (A) stimulated with P/I for 0, 60 and 120 min (C). Nuclei were illuminated with DAPI (red). The percentage of cells with p65 in the nucleus was scored in >150 cells. (D). Histograms represent the mean ± SEM from three independent experiments (ns, non significant; **** $P < 0.0001$ by ANOVA). (E) Cells as in (A) were stimulated with P/I. Nuclear (nucleus) and cytosolic (cytosol) fractions were analyzed by immunoblot as indicated.

Antibodies against CARMA1, phosphorylated ERK1/2, phosphorylated IKK, phosphorylated IκBα, IκBα, and NFAT1 were from Cell Signaling Technology. Antibodies against TRIM13 and GAPDH were from Sigma-Aldrich. Antibodies to PARP (BD Biosciences) and to c-Rel (Bethyl) were also used. Secondary HRP-conjugated antibodies were from Jackson ImmunoResearch. Chemiluminescent substrates were from Millipore.

2.4. Statistical analysis

Statistical significance was assessed with ANOVA tests with post hoc Tukey's analysis or with *t*-tests (Prism GraphPad Software), and *P*-values are indicated in the figure legends.

3. Results

To uncover new regulators of TCR-mediated NF-κB activation, we set up a siRNA screen with two oligoribonucleotides against each membrane spanning E3-ligase, and their impact was assessed in a gene reporter assay using the lymphoblastoid T-cell line Jurkat (Poalas et al., 2013). Silencing of the key regulator of TCR-mediated NF-κB CARMA1 served as a control (Fig. 1A). Among the top hits was TRIM13 (Fig. 1A). TRIM13 is part of a chromosomal band (13q14.3) that is frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia (CLL), in CLL precursor monoclonal B-cell lymphocytosis and in multiple myeloma (Garding et al., 2013; Gatt et al., 2013; Klein et al., 2010; Lia et al., 2012). TRIM13 was also previously linked to ER-associated

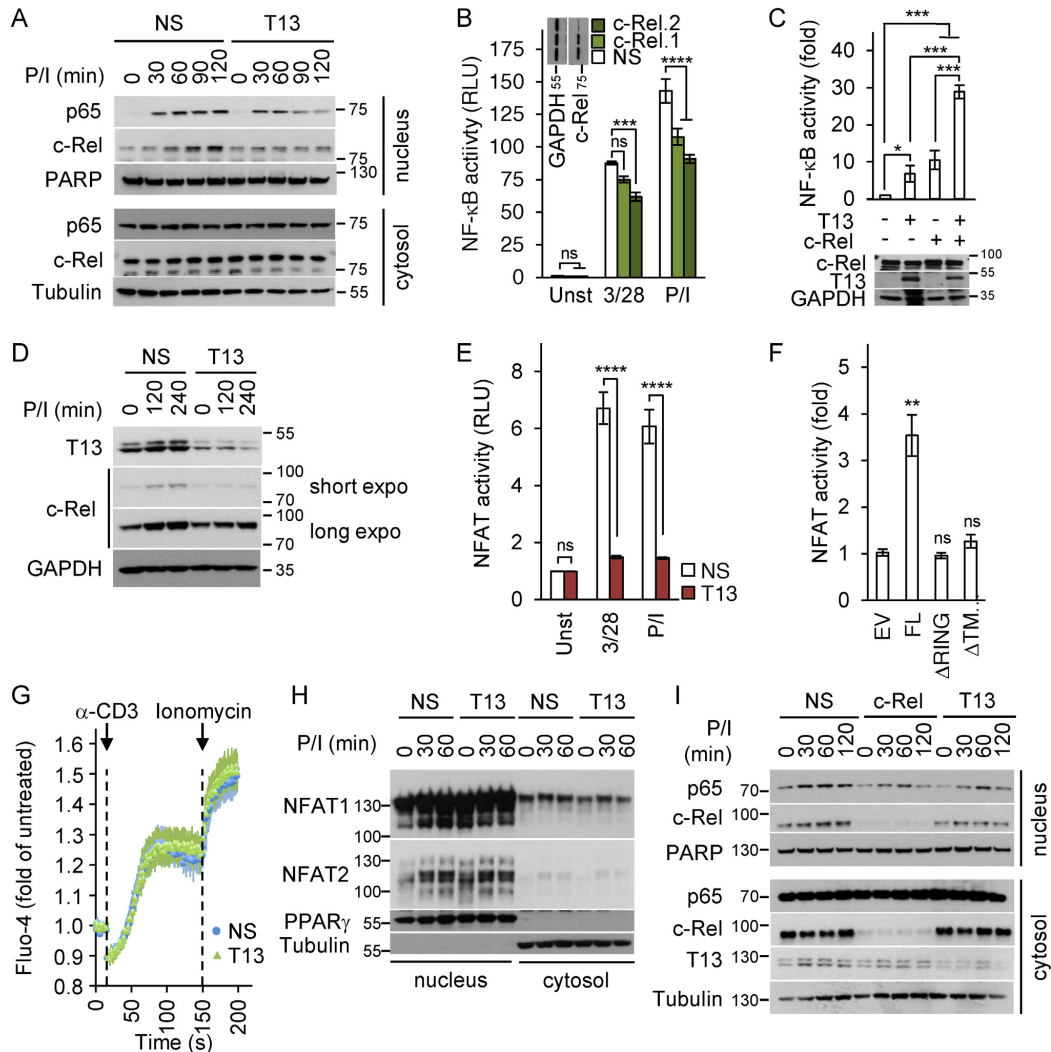


Fig. 3. TRIM13 controls c-Rel via NFAT signaling upon TCR engagement. (A) Jurkat cells were transfected with nonspecific (NS) siRNA or siRNA against TRIM13 (T13). After four days, cells were stimulated with 20 ng/ml PMA plus 300 ng/ml ionomycin (P/I) and nuclear and cytosolic fractions were analyzed by immunoblot as indicated. PARP and tubulin served as loading controls for nucleus and cytosolic fractions, respectively. (B) NF- κ B reporter luciferase assay in Jurkat cells transfected with a NS siRNA or with two individual siRNA against c-Rel and stimulated with 0.5 μ g/ml anti-CD3 plus anti-CD28 (3/28) or with P/I as in (A). Histograms represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. ns, Non-significant; *** P < 0.001; **** P < 0.0001 by ANOVA. Inset blot shows the knockdown efficiency. (C) NF- κ B reporter assay in HEK293T cells transfected with plasmids encoding for c-Rel and TRIM13 as indicated (mean $\pm$ SEM of three independent experiments; ns, non significant; * P < 0.1; *** P < 0.001 by ANOVA). Plasmids expression was assessed by immunoblot. (D) NS- and TRIM13-silenced Jurkat cells were stimulated as in (A). Cell extracts were prepared and analyzed by immunoblot as indicated. (E) NFAT reporter luciferase assay in NS- and TRIM13-silenced Jurkat cells stimulated as in (B). Histograms represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. (F) NFAT reporter luciferase assay in HEK293T cells transfected with FLAG-tagged plasmids coding for full-length TRIM13 (FL), or mutants lacking the NH₂-terminal part (Δ RING) or the COOH-terminal domain (Δ TM). Shown is the fold activation when compared to an empty vector control (mean $\pm$ SEM of three independent experiments. ns, Non-significant; ** P < 0.01 by t -test). (G) Cells as in (A) were loaded with the calcium-sensitive dye Fluo-4. Calcium fluxes in response to 1 μ g/ml anti-CD3 and to 2 μ M ionomycin was assessed over time (mean $\pm$ SEM of three independent experiments). (H and I) NS-, c-Rel-, and TRIM13-silenced cells were treated and analyzed as in (A).

degradation (ERAD) (Lerner et al., 2007), ER stress (Tomar et al., 2012), and innate immunity (Versteeg et al., 2013). Of note, its over-expression was shown to promote NF- κ B activation (Garding et al., 2013; Matsuda et al., 2003). TRIM13 encompasses a 407 amino acids protein with an NH₂-terminal RING domain, and a COOH-terminal transmembrane domain that anchors the protein to the

ER (Fig. 1B) (Baranova et al., 2003; Lerner et al., 2007). Accordingly, both endogenous and ectopically expressed TRIM13 were exclusively detected in fractions enriched with intracellular organelles (Fig. 1B and C). By contrast, a mutant deleted of its transmembrane domain (Δ TM) was also found in the cytosolic fraction (Fig. 1C). The ability of E3-ligases to oligomerize likely accounts for the

remaining Δ TM TRIM13 found in organelles (Joazeiro and Weissman, 2000). Of note, TRIM13 was essentially detected as a doublet, which was identified as the enzyme and its monoubiquitylated specie by Lerner et al. (2007).

We further validated the results from our initial screen with an additional siRNA sequence against TRIM13 (Fig. 1D). Although TRIM13 and its structurally related TRIM59 are the only TRIMs that contain a transmembrane domain among the >70 members described thus far (Versteeg et al., 2013), silencing of TRIM59 had no overt effect on TCR-mediated NF- κ B activation (Fig. S1). Supporting previous reports (Garding et al., 2013; Matsuda et al., 2003; Versteeg et al., 2013), enforced expression of TRIM13 activated NF- κ B (Fig. 1E and S2). This was however not the case when mutants lacking the NH₂-terminal RING part (Δ RING) or the Δ TM were used (Fig. 1E). Further supporting a role for its catalytic domain, TRIM13 Δ RING mutant dominantly interfered with TCR-mediated NF- κ B activation when transfected in Jurkat cells (Fig. 1F). Altogether, our data suggest that TRIM13 is a positive regulator of NF- κ B following TCR engagement.

Because the CBM operates as a central platform for TCR signaling (Thome et al., 2010), we next investigated whether TRIM13 silencing impacts on its assembly. Immunoprecipitations of CK1 α , which binds the active CBM complex (Bidere et al., 2009; Carvalho et al., 2010), revealed that CARMA1, BCL10, as well as ubiquitylated MALT1 were recruited regardless of TRIM13 (Fig. 2A). Knocking down TRIM13 did not alter either the phosphorylation of IKK and I κ B α (Fig. 2B). The same was true for the MAPKs extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) (Fig. 2B). Lastly, p65 relocation into the nucleus was examined by confocal microscopy and in cell fractionation experiments. This essentially showed that p65 nuclear accumulation was partly reduced in the first hour following TCR stimulation, and did not remain in the nucleus over time without TRIM13 (Fig. 2C–E). Hence, our results suggest that TRIM13 silencing slightly affects p65 initial translocation in the nucleus, while decreasing its maintenance on later time points.

In addition to p65, c-Rel is essential for lymphocyte activation, and both factors cooperate to optimally activate NF- κ B (Grumont et al., 2004; Kontgen et al., 1995). We found that TCR-mediated c-Rel redistribution into the nucleus was diminished when TRIM13 was silenced (Fig. 3A). Moreover, c-Rel knockdown hampered TCR-mediated NF- κ B activation (Fig. 3B), as previously described (Grumont et al., 2004; Kontgen et al., 1995). Further connecting c-Rel and TRIM13, their enforced expression in HEK293T cells synergistically enhanced NF- κ B transcriptional activity (Fig. 3C). Combined, these data support the notion that TRIM13 governs c-Rel activation upon TCR engagement.

In T lymphocytes, c-Rel mobilization requires an NFAT-dependent induction step (Grumont et al., 2004; Mattila et al., 1990; Venkataraman et al., 1995). We observed that c-Rel accumulation was reduced without TRIM13 (Fig. 3D). In line with this, gene reporter assays showed that TCR-mediated NFAT activation was compromised when TRIM13 was silenced (Fig. 3E). Conversely, overexpression in HEK293T cells of TRIM13, but not of Δ RING or Δ TM mutants, was sufficient to drive NFAT activation, reinforcing the idea that TRIM13 participates to NFAT signaling (Fig. 3F). Of note, blocking the NFAT/c-Rel nexus with cyclosporine A or with c-Rel siRNA partly reduced TRIM13-mediated NF- κ B in HEK293T cells (Fig. S3). NFAT activation requires the release of intracellular calcium from internal stores (Muller and Rao, 2010). Yet, Ca²⁺ fluxes were indistinguishable between control- and TRIM13-silenced cells upon CD3 ligation (Fig. 3G and S4), suggesting that TRIM13 likely functions downstream of Ca²⁺ mobilization. Furthermore, we did not find overt change in NFAT redistribution in the nucleus without TRIM13 (Fig. 3H). We finally investigated the impact of c-Rel silencing on NF- κ B p65 maintenance in the nucleus of TCR-stimulated Jurkat cells. In a striking parallel with what was

found with TRIM13, p65 accumulation was reduced when c-Rel was knocked down (Fig. 3I and S5). Combined, our results indicate that TRIM13 governs TCR-mediated NFAT activation. This leads to a defect in c-Rel induction and activation, and c-Rel-mediated maintenance of p65 in the nucleus.

4. Discussion

Here, we provide evidence that TRIM13 participates in c-Rel activation via an NFAT-dependent amplification loop following TCR engagement. A role for TRIM13 on NF- κ B was initially uncovered in a screen for genes that activate this transcription factor (Matsuda et al., 2003). When overexpressed, TRIM13 was proposed to promote NF- κ B activity through IKK and p65 (Garding et al., 2013; Matsuda et al., 2003). In line with this, p65 redistribution into the nucleus was reduced at early time-points and more severely compromised at later time-points when endogenous TRIM13 was silenced, although TCR-driven phosphorylation of IKK and I κ B α appeared normal. Nevertheless, our results suggest that TRIM13 also governs TCR-mediated c-Rel activation. Of note, p65 was not retained into the nucleus of TRIM13- or c-Rel-silenced cells after prolonged stimulation periods, and whether p65 shuttles out of the nucleus or is degraded is unclear. In that view, several proteins including COMMD1, PDLIM2 or PPAR γ were linked to p65 degradation in the nucleus and might be involved (Geng et al., 2009; Hou et al., 2012; Tanaka et al., 2007).

How TRIM13 operates to propagate NFAT signaling remains obscure. We found that TRIM13 overexpression was sufficient to activate NFAT and that TRIM13 catalytic activity and anchorage to the ER were both required. Although TRIM13 promotes the ERAD-mediated degradation of Cav1.2 channels (Altier et al., 2011), we did not observe overt change in TCR-mediated Ca²⁺ release from internal stores without TRIM13 in Jurkat cells. In addition, a defect in the downstream activation of the Ca²⁺-sensitive phosphatase calcineurin sounds rather unlikely. Indeed, in contrast to TRIM13 silencing, the calcineurin inhibitor cyclosporine A severely inhibited the CBM formation (Acevedo et al., 2014; Palkowitsch et al., 2011). Because TRIM13 silencing did not reduce the redistribution of NFAT in the nucleus, it is tempting to speculate that TRIM13 regulates the activity of an essential cofactor or alters the post-translational modifications of NFAT. An interesting candidate could be PPAR γ , which was proposed to dampen both NFAT and p65 activities (Hou et al., 2012; Yang et al., 2000). Hence, future works will be required to delineate the molecular framework employed by TRIM13 following TCR ligation to control the NF- κ B as well as the NFAT/c-Rel axis.

Conflict of interest

None.

Acknowledgements

We thank Thomas D. Gilmore for providing the FLAG-tagged c-Rel plasmid, Mikael Lerner for his advices, Veronica Acevedo and H  lo  se Leclair for helpful assistance. This work was supported by grants from the French National Research Agency (ANR-10-JCJC-1306), Fondation ARC, Ligue Nationale contre le Cancer, Fondation pour la Recherche Médicale, and Institut National du Cancer (INCA.6508). E.M.H. is supported by a fellowship from the Ligue Nationale contre le Cancer.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2014.07.012>.

References

- Acevedo VC, Hatchi EM, Bidere N. Unpublished results; 2014.
- Alexia C, Poalas K, Carvalho G, Zemirli N, Dwyer J, Dubois SM, et al. The endoplasmic reticulum acts as a platform for ubiquitinated components of nuclear factor kappaB signaling. *Sci Signal* 2013;6:ra79.
- Altier C, Garcia-Caballero A, Simms B, You H, Chen L, Walcher J, et al. The Cavbeta subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nature Neurosci* 2011;14:173–80.
- Baranova A, Hammarsund M, Ivanov D, Skoblov M, Sangfelt O, Corcoran M, et al. Distinct organization of the candidate tumor suppressor gene RFP2 in human and mouse: multiple mRNA isoforms in both species- and human-specific antisense transcript RFP2OS. *Gene* 2003;321:103–12.
- Bidere N, Ngo VN, Lee J, Collins C, Zheng L, Wan F, et al. Casein kinase 1alpha governs antigen-receptor-induced NF-kappaB activation and human lymphoma cell survival. *Nature* 2009;458:92–6.
- Carvalho G, Le Guelle A, Demian C, Vazquez A, Gavard J, Bidere N. Interplay between BCL10, MALT1 and IkappaBalpha during T-cell-receptor-mediated NFkappaB activation. *J Cell Sci* 2010;123:2375–80.
- Dubois SM, Alexia C, Wu Y, Leclair HM, Leveau C, Schol E, et al. A catalytic-independent role for the LUBAC in NF-kappaB activation upon antigen receptor engagement and in lymphoma cells. *Blood* 2014;123:2199–203.
- Gaide O, Favier B, Legler DF, Bonnet D, Brissoni B, Valitutti S, et al. CARMA1 is a critical lipid raft-associated regulator of TCR-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 2002;3:836–43.
- Garding A, Bhattacharya N, Claus R, Ruppel M, Tschuch C, Filarsky K, et al. Epigenetic upregulation of lncRNAs at 13q14.3 in leukemia is linked to the In Cis downregulation of a gene cluster that targets NF-kB. *PLoS Genet* 2003;9:e1003373.
- Gatt ME, Takada K, Mani M, Lerner M, Pick M, Hideshima T, et al. TRIM13 (RFP2) downregulation decreases tumour cell growth in multiple myeloma through inhibition of NF Kappa B pathway and proteasome activity. *Br J Haematol* 2013;162:210–20.
- Geng H, Wittwer T, Dittich-Breiholz O, Kracht M, Schmitz ML. Phosphorylation of NF-kappaB p65 at Ser468 controls its COMMD1-dependent ubiquitination and target gene-specific proteasomal elimination. *EMBO Rep* 2009;10:381–6.
- Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2008.
- Grumont R, Lock P, Mollinari M, Shannon FM, Moore A, Gerondakis S. The mitogen-induced increase in T cell size involves PKC and NFAT activation of Rel/NF-kappaB-dependent c-myc expression. *Immunity* 2004;21:19–30.
- Hou Y, Moreau F, Chadee K. PPARgamma is an E3 ligase that induces the degradation of NFkappaB/p65. *Nature Commun* 2012;3:1300.
- Joazeiro CA, Weissman AM. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 2000;102:549–52.
- Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2010;17:28–40.
- Kontgen F, Grumont RJ, Strasser A, Metcalf D, Li R, Tarlinton D, et al. Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev* 1995;9:1965–77.
- Lerner M, Corcoran M, Cepeda D, Nielsen ML, Zubarev R, Ponten F, et al. The RBCC gene RFP2 (Leu5) encodes a novel transmembrane E3 ubiquitin ligase involved in ERAD. *Mol Biol Cell* 2007;18:1670–82.
- Lia M, Carrette A, Tang H, Shen Q, Mo T, Bhagat G, et al. Functional dissection of the chromosome 13q14 tumor-suppressor locus using transgenic mouse lines. *Blood* 2012;119:2981–90.
- Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, Muramatsu S, Matsuzaki O, Nagano Y, et al. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* 2003;22:3307–18.
- Mattila PS, Ullman KS, Fiering S, Emmel EA, McCutcheon M, Crabtree GR, et al. The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *EMBO J* 1990;9:4425–33.
- Muller MR, Rao A. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol* 2010;10:645–56.
- Palkowitsch L, Marienfeld U, Brunner C, Eitelhuber A, Krappmann D, Marienfeld RB. The Ca2+-dependent phosphatase calcineurin controls the formation of the CARMA1-Bcl10-MALT1 complex during T cell receptor-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 2011;286:7522–34.
- Paul S, Kashyap AK, Jia W, He YW, Schaefer BC. Selective autophagy of the adaptor protein Bcl10 modulates T cell receptor activation of NF-kappaB. *Immunity* 2012;36:947–58.
- Poalas K, Hatchi EM, Cordeiro N, Dubois SM, Leclair HM, Leveau C, et al. Negative regulation of NF-kappaB signaling in T lymphocytes by the ubiquitin-specific protease USP34. *Cell Commun Signal CCS* 2013;11:25.
- Tan TH, Huang GP, Sica A, Ghosh P, Young HA, Longo DL, et al. Kappa B site-dependent activation of the interleukin-2 receptor alpha-chain gene promoter by human c-Rel. *Mol Cell Biol* 1992;12:4067–75.
- 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.
- Thome M, Charton JE, Pelzer C, Hailfinger S. Antigen receptor signaling to NF-kappaB via CARMA1, BCL10, and MALT1. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a003004.
- Tomar D, Singh R, Singh AK, Pandya CD, Singh R. TRIM13 regulates ER stress induced autophagy and clonogenic ability of the cells. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823:316–26.
- Venkataraman L, Burakoff SJ, Sen R. FK506 inhibits antigen receptor-mediated induction of c-rel in B and T lymphoid cells. *J Exp Med* 1995;181:1091–9.
- Venkataraman L, Wang W, Sen R. Differential regulation of c-Rel translocation in activated B and T cells. *J Immunol* 1996;157:1149–55.
- Versteeg GA, Rajsbaum R, Sanchez-Aparicio MT, Maestre AM, Valdiviezo J, Shi M, et al. The E3-ligase TRIM family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors. *Immunity* 2013;38:384–98.
- Wan F, Anderson DE, Barnitz RA, Snow A, Bidere N, Zheng L, et al. Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-kappaB complexes that mediates selective gene regulation. *Cell* 2007;131:927–39.
- Yang XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, DaSilva L, et al. Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem* 2000;275:4541–4.

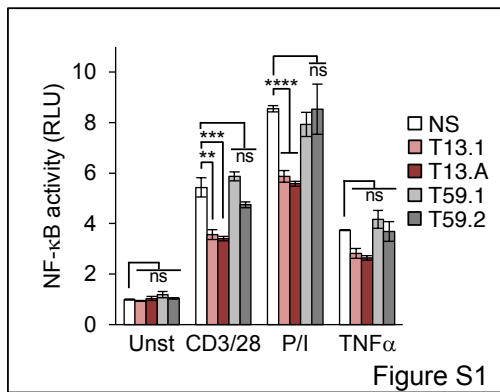


Figure S1. Impact of TRIM13 and TRIM59 silencing on TCR-mediated NF-κB activation. NF-κB reporter luciferase assay in Jurkat cells transfected with a control nonspecific (NS) siRNA or with siRNA against TRIM13 (T13) and TRIM59 (T59). Cells were stimulated with 0.5 μg/ml anti-CD3 plus anti-CD28 (CD3/28) or with 20 ng/ml PMA plus 300 ng/ml ionomycin (P/I), or with 10 ng/ml TNFα. Histograms represent the mean ± SEM of three independent experiments. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ compared to cells transfected with NS siRNA by ANOVA). ns, non significant; RLU, Relative Light Units.

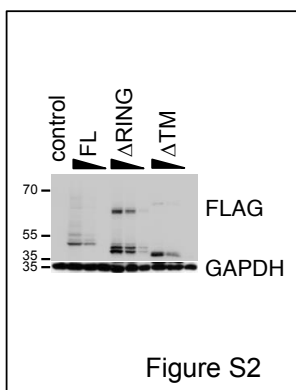


Figure S2. Expression levels of TRIM13, relative to Fig. 1E. HEK293T cells were transfected with 0.01, 0.1, and 1 μg of the indicated FLAG-tagged TRIM13 constructs. 1 mg of an empty vector served as a control. Cell extracts were prepared and analysed by immunoblot as indicated. Numbers indicate molecular mass markers.

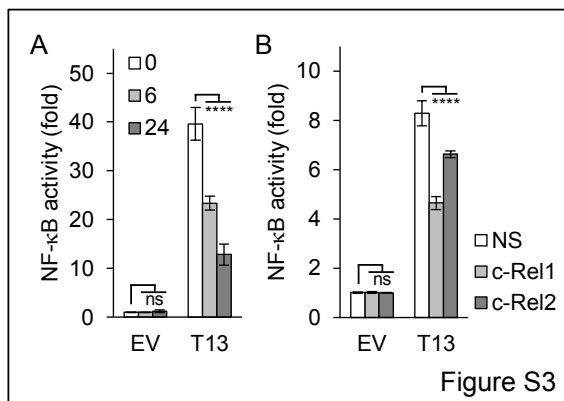


Figure S3. Role of NFAT and c-Rel on TRIM13-mediated NF-κB activation. **A and B**, NF-κB reporter assay in HEK293T cells transfected with plasmids encoding for TRIM13 or a control empty vector (EV). Cells were treated with 10 μM Cyclosporin A (CsA) for 6 or 24 h as indicated (mean ± SEM of three independent experiments; ns, non significant; **** $P < 0.0001$ by ANOVA). In (B), cells were first transfected with two siRNA sequences against c-Rel. After three days, cells were transfected as in (A).

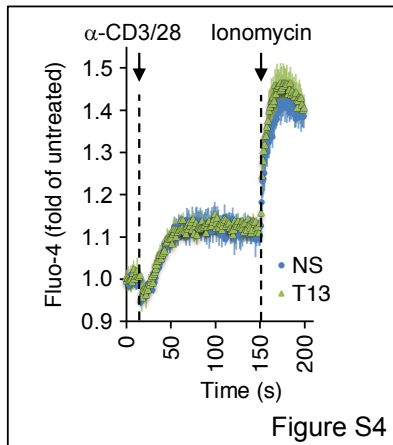


Figure S4. Normal calcium fluxes in TRIM13-silenced cells. Jurkat cells were transfected with nonspecific (NS) siRNA or siRNA against TRIM13 (T13). After four days, cells were loaded with the calcium-sensitive dye Fluo-4. Calcium fluxes in response to 1 μ g/ml anti-CD3 plus 1 μ g/ml anti-CD28 and to 2 μ M ionomycin was assessed over time (mean $\pm$ SEM of three independent experiments).

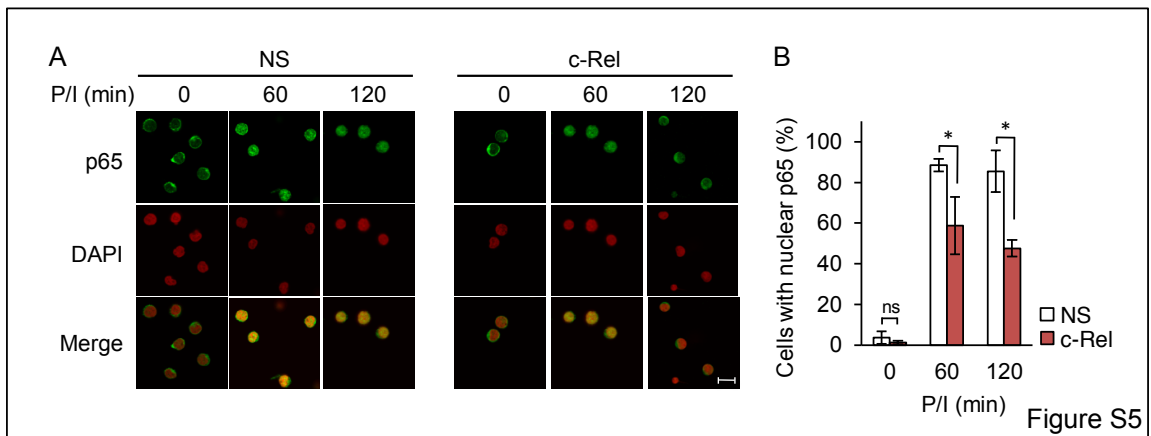


Figure S5. p65 translocation into the nucleus upon TCR engagement in c-Rel-silenced cells. (A, B) Confocal microscopy micrographs of p65 (green) in cells stimulated with 20 ng/ml PMA plus 300 ng/ml ionomycin (P/I) for 0, 60 and 120 min. Nuclei were stained with DAPI (red). The percentage of cells with p65 in the nucleus was scored in > 150 cells. Histograms represent the mean $\pm$ SEM from three independent experiments (ns, non significant; * $P < 0.1$ by ANOVA). Scale bar: 10 μ m.

Discussion

I. USP34, une enzyme méconnue aux multiples fonctions

Identification et caractérisation

USP34 (Ubiquitin-Specific Protease) a été découverte et caractérisée comme une déubiquitinase en 2004 lors d'un crible génomique visant à identifier de nouvelles USPs. Le **domaine catalytique Ubiquitin Specific Protease (USP)** de la famille des protéases à cystéine C1 reste la seule région caractérisée de USP34 et la classe dans la famille des USP. Cette immense protéine de **404 kDa** est la plus grande de cette famille mais aussi des DUBs en général. Le clonage et l'expression ectopique de du domaine catalytique de USP34 ont permis d'établir que son activité enzymatique est fonctionnelle [316]. Enfin, il est intéressant de noter que USP34 est une **protéine très conservée** de l'Homme à la drosophile en passant par la souris. Ce haut niveau de conservation parmi des espèces variées suggère **un rôle critique** de cette enzyme. Bien que peu de travaux aient été consacrés à USP34, différentes fonctions lui ont été attribuées.

USP34 et la voie des Wnt

Un crible par spectrométrie de masse de nouveaux partenaires des protéines axines a identifié USP34. Les axines participent à la voie de signalisation des Wnt impliquée dans le développement embryonnaire et dans l'homéostasie tissulaire chez l'adulte [317, 318]. En l'absence de ligand Wnt, les axines forment un complexe avec les kinases CK1 α et GSK3 β qui permet la phosphorylation du facteur de transcription β -caténine. A l'instar des I κ Bs, la forme phosphorylée de β -caténine est rapidement ubiquitinylée et éliminée par le protéasome [319]. L'extinction de USP34 entraîne la dégradation d'AXIN1 et de la transcription médiée par la β -caténine. Il semble donc qu'en se liant à l'AXIN1, USP34 régule ses fonctions [320]. En accord avec ces données, nos expériences de co-immunoprécipitation dans des lymphocytes T Jurkat ont révélé que USP34 s'associe massivement à CK1 α . Or, CK1 α est un acteur-clé de l'activation de NF- κ B en réponse à l'engagement des récepteurs antigéniques. Ainsi, CK1 α est dynamiquement recruté au niveau du complexe CBM (CARMA1-BCL10-MALT1), où il autorise la phosphorylation et l'activation du complexe IKK. S'il lie CK1 α , il semble peu probable que USP34 participe au CBM. Tout d'abord, nous n'avons jamais détecté d'interaction avec les différents éléments qui composent ou participent au CBM (CARMA1, BCL10, MALT1, TAK1, IKK β , le LUBAC, TRAF2 ou TRAF6). D'autre part, l'assemblage du CBM n'est pas affecté par l'extinction de USP34 [321]. Il est donc tentant de spéculer que la fraction de CK1 α qui interagit avec USP34 ne régule pas le CBM.

USP34 et le cycle cellulaire

USP34 aurait également un rôle de régulateur du point de contrôle G1 du cycle cellulaire dans le noyau. En effet, Mu et al. décrivent sa phosphorylation par les kinases ATM (Ataxia Telangiectasia-Mutated) et ATR (ATM-Rad3-related) liées aux points de contrôle qui régulent la réponse aux dommages de l'ADN [322]. Il semble toutefois difficile d'imaginer que tel est le cas dans les

lymphocytes. En effet, nos expériences de fractionnement subcellulaire indiquent que USP34 réside exclusivement dans le cytosol des cellules et semble notamment absent du noyau.

USP34 et les voies de signalisation TGF β /BMP

Avec USP9X, USP34 contrôle le niveau d'ubiquitination et d'expression de la protéine R-Smad (Regulatory-Smad), un médiateur central des voies de signalisation TGF β /BMP (Transforming Growth Factor Bêta/ Bone Morphogenetic Protein) [323]. Fait intéressant, la DUB USP9X a récemment été associée au rétro-contrôle de la voie NF- κ B *via* son action sur BCL10[304]. Toutefois, il semble peu probable que USP34 et USP9X coopère, car l'absence de USP34 n'a pas d'incidence sur les niveaux d'ubiquitination de BCL10 (résultats non présentés).

USP34, NF- κ B et le TCR

Selon nos travaux [324] (Article I), USP34 jouerait un rôle dans la **régulation négative de NF- κ B**. Dans des lymphocytes T, la réduction des niveaux d'expression de la DUB USP34 par ARN interférence augmente la liaison à l'ADN de NF- κ B, son activité transcriptionnelle ainsi que la sécrétion de cytokines NF- κ B-dépendantes.

Où et comment USP34 fonctionne dans la voie de signalisation en aval du TCR reste largement énigmatique. Les DUB CYLD, A20 ou USP9X ont été décrites pour leur fonction de régulateur des niveaux d'ubiquitination de NEMO, MALT1 et BCL10, respectivement [297, 299, 304]. En l'absence de USP34, l'assemblage du CBM, l'activation du complexe IKK et l'ubiquitination de BCL10 se déroulent normalement. De plus, USP34 ne semble pas participer au CBM et ne s'associe pas non plus à différents acteurs de la voie NF- κ B tels que RelA ou I κ B α . Il semble donc envisageable que USP34 agisse parallèlement ou en aval du complexe CBM. Dans ce sens, la cinétique de dégradation/resynthèse de l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B α , est plus ample lorsque les niveaux de USP34 sont réduits. Fait intéressant, la sous-unité NF- κ B RelA transloque dans le noyau dans des cinétiques inchangées, mais son **affinité pour l'ADN et la transcription de ses cibles sont augmentées**. Des travaux futurs devront élucider ces apparentes contradictions. Dans cette optique, des expériences de spectrométrie de masse sont en cours au laboratoire.

USP34, NF- κ B et les autres immunorécepteurs

Le fait que USP34 fonctionne en aval du complexe CBM soulève la possibilité que son action ne soit pas restreinte au seul TCR. L'étude de l'action de la DUB USP34 sur l'activité NF- κ B en réponse à la stimulation par le TNF α ou le VP16 (étoposide), un inhibiteur de la topoisomérase II induisant un stress génotoxique a été réalisée par bioluminescence. Tout comme la signalisation initiée par le TCR activé, ces deux voies d'activation de NF- κ B convergent vers le complexe IKK (Figure 38).

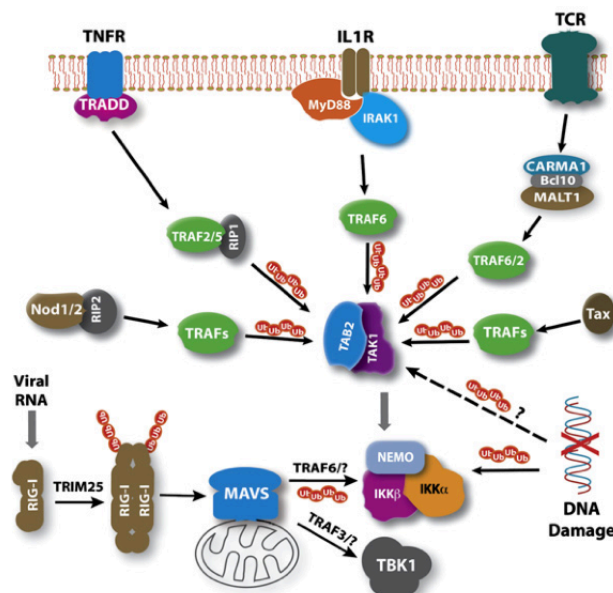


Figure 38. Convergence de différentes voies d'activation de NF-κB vers IKK, selon Chen et al. [191].

L'absence de USP34 dans des cellules activées par ces deux stimuli entraîne une augmentation de l'activité NF-κB. A l'instar de la situation observée en réponse au TCR, la dégradation de IκBα est également plus ample dans des cellules exposées à du TNFα. Il semble donc que USP34 régule l'activité NF-κB selon un **mécanisme partagé par les voies de signalisations induites par les dommages à l'ADN, le TCR et le TNFR**. USP34 est exclusivement cytoplasmique, ce qui implique que l'action d'USP34 est certes en aval d'IKK mais en amont de la translocation nucléaire de NF-κB. De multiples cofacteurs de NF-κB ont été caractérisés et l'impact de USP34 sur leur fonction constitue une piste à suivre pour le futur.

Activité DUB de USP34 et NF-κB

En raison de la taille élevée de USP34, seul son domaine catalytique a été cloné dans un vecteur d'expression eucaryote. La **surexpression du domaine catalytique de USP34** s'est révélée capable de **diminuer l'activation de NF-κB** dans des lymphocytes T activés. Le domaine catalytique de USP34 (long de 346 acides aminés) est donc fonctionnel seul et capable d'interagir avec son potentiel substrat et de réguler ainsi la signalisation NF-κB. Néanmoins, il reste à savoir si cette diminution est directement liée à la surexpression du domaine catalytique de USP34 ou à l'absence d'un domaine modulateur de l'activité intrinsèque d'USP34 exerçant sa régulation *via* une modification post-traductionnelle ou encore si elle requiert l'intervention d'une molécule intermédiaire.

USP34, NF-κB et lymphomes

En accord avec nos travaux [324], une étude récente visant à définir de nouveaux mécanismes génétiques impliquées dans la transformation du lymphome folliculaire (LF) en lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL) a identifié une fréquence plus élevée **d'un gain observé au niveau du locus englobant USP34 et d'autres gènes impliquées dans la voie NF-κB (c-Rel et COMMD1)** dans les DLBCL transformés à partir de LF (tDLBCL) que dans les DLBCL *de novo* (dnDLBCL). De

plus, une amplification élevée au niveau de ce même locus a été détectée au cours de l'étape précédant la transformation, indiquant son importance au cours de la transformation. Des expériences de PCR quantitative en temps réel ont montré **une amplification élevée des ces gènes**, ce qui indique que les gènes qui modulent la voie NF- κ B sont probablement **impliqués dans la transformation** [325].

Modèle et perspectives

En prolongeant la liaison à l'ADN de NF- κ B et en modulant la synthèse et/ou la dégradation d'I κ B α , USP34 exerce sa régulation en deux temps (Figure 39).

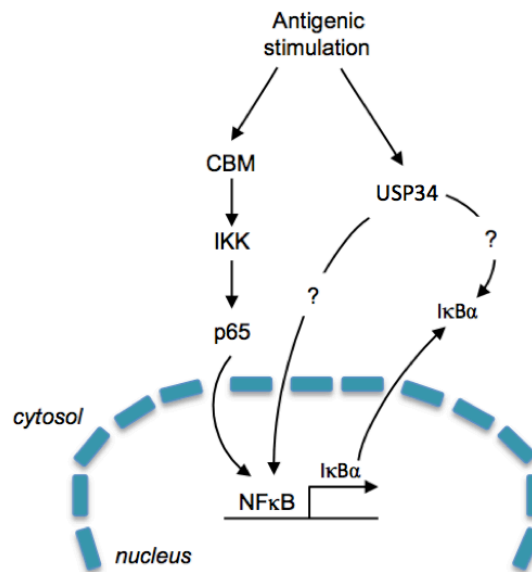


Figure 39. Modèle

Comment USP34 module la liaison à l'ADN de p65 depuis le cytosol ?

La régulation de la liaison à l'ADN de NF- κ B est complexe et elle met en jeu diverses protéines et modifications post-traductionnelles (Figure 40) [27, 326, 327]. Il est donc possible de réguler la liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle de NF- κ B en ciblant un de ses partenaires transcriptionnels ou une des enzymes catalysant les modifications post-traductionnelles impliquées. Sans oublier que la nature même des dimères NF- κ B influence la transcription des gènes-cibles (Figure 3, Tableau 1) [26].

Les DUBs et les E3 ligases sont souvent couplées et se régulent réciproquement [210, 252]. USP34 pourrait moduler l'activité ou l'expression d'une ou plusieurs E3 ligases impliquées dans les interactions entre p65 et ses partenaires transcriptionnels ou dans les modifications post-traductionnelles qui ciblent NF- κ B et ainsi influencer la liaison à l'ADN de p65 et la transcription de ses gènes cibles. I κ B α est également la cible de diverses modifications post-traductionnelles qui peuvent jouer sur sa stabilité, les enzymes catalysant ces modifications constituent des cibles potentielles pour USP34 [326, 328]. Il est aussi tout simplement probable qu'USP34 cible directement p65 ou I κ B α ou *via* un intermédiaire, lorsqu'ils sont localisés au niveau du cytosol.

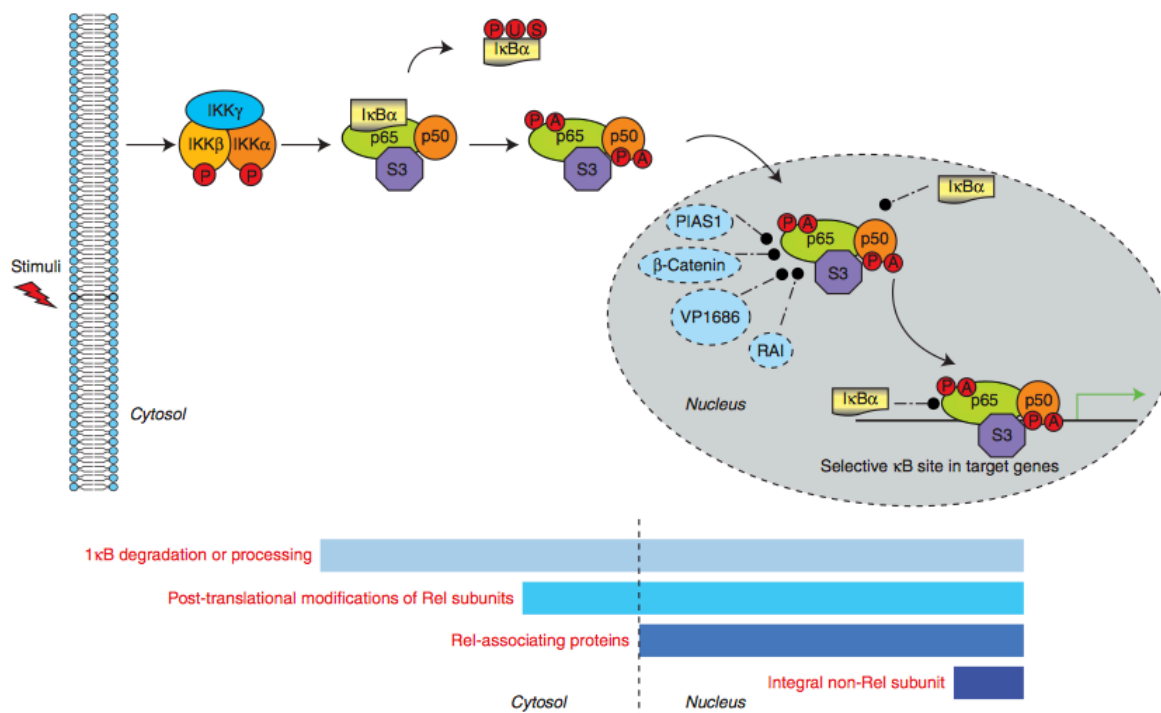


Figure 40. Régulation de la liaison à l'ADN du dimère NF-κB p65/p50. La liaison à l'ADN de NF-κB est contrôlée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau à différents niveaux : impliquant la modification et la dégradation des inhibiteurs IκB, des modifications post-traductionnelles des sous-unités NF-κB, l'intervention de protéines associées aux sous-unités NF-κB qui modulent leur potentiel de liaison de l'ADN et la protéine RPS3 (Ribosomal Protein S3) qui est requise pour la sélection des gènes-cibles transcrits par NF-κB basée sur une augmentation de l'affinité pour l'ADN. Les barres bleues représentent la localisation des différentes étapes de la régulation [326].

Comment l'activité DUB de USP34 module la liaison à l'ADN de p65 et la stabilité d'IκBα?

La surexpression du domaine catalytique de USP34 s'accompagne d'une diminution de l'activité NF-κB dans les lymphocytes T activés, bien qu'on ignore si elle est directement liée à la surexpression du domaine catalytique de USP34. Dans le cas où cette diminution résulte directement de l'activité catalytique de USP34, on peut imaginer que USP34, comme CYLD [297], clive des chaînes de polyubiquitine K63 ou encore d'autres types de chaînes non dégradatives liée à p65 qui modulent sa liaison à l'ADN ou sa capacité à interagir avec certains co-facteurs qui modulent son affinité pour l'ADN. USP34 pourrait également cibler des chaînes de polyubiquitine non dégradatives liées à des co-facteurs de p65 et empêcher ainsi leur interaction avec p65 ou moduler leur activité. Par ailleurs, il est aussi possible qu'en clivant des chaînes d'ubiquitine de nature dégradative USP34 protège de la dégradation certaines protéines impliquées dans l'affinité à l'ADN de p65.

USP34 pourrait également catalyser le clivage des chaînes d'ubiquitine dégradatives liées à IκBα et protéger ainsi IκBα néosynthétisé de la dégradation. USP34 pourrait aussi participer à la régulation de l'activité de la βTrCP, E3 ligase responsable de l'ubiquitination de type K48 d'IκBα et de sa dégradation subséquente. Des expériences *in vitro* visant à déterminer quels types de chaînes de polyubiquitine sont clivées de façon préférentielle par USP34 pourraient nous éclairer sur le mécanisme d'action de USP34.

Au-delà de son activité DUB, de par sa taille, USP34 peut constituer une immense plateforme de recrutement pour une pléiade de protéines, notamment des E3 ligases et favoriser diverses interactions.

Quelles sont les cibles potentielles de USP34?

Virtuellement, p65 et IκBα quand ils sont dans le cytosol ainsi que **toutes les protéines capables de transiter du cytosol au noyau et ayant la capacité de moduler l'affinité à l'ADN de p65 et la dégradation d'IκBα sont des cibles potentielles de USP34**. En raison de leur capacité à interagir avec les DUBs et de leur fonction de régulateur de la stabilité protéique et de générateur de chaînes de polyubiquitine impliquées dans les interactions protéiques, **les E3 ligases** sont des cibles de premier choix. Des expériences de spectrométrie de masse sont d'ailleurs en cours au laboratoire.

Une E3 ligase ciblant la protéine **RPS3 (Ribosomal Protein S3)** serait une cible intéressante. En effet, RPS3 transite du cytosol au noyau et joue un rôle crucial dans la sélection des gènes-cibles en augmentant l'affinité à l'ADN de p65. La modification de l'expression ou l'activité de RPS3 par USP34 au niveau cytosolique pourrait influencer l'action de RPS3 sur p65 au niveau nucléaire. De plus, il a récemment été démontré que IκBα interagit avec RPS3 et le séquestre au niveau cytosolique. L'augmentation de liaison à l'ADN de p65 observée en absence d'USP34 résulterait d'une dérégulation de RPS3 qui pourrait aussi être la cause de la synthèse retardée d'IκBα. RPS3 qui participe à la sélection des gènes transcrits par NF-κB pourrait retarder la synthèse d'IκBα ou augmenter la synthèse d'un antagoniste d'IκBα, RPS3 et p65 seraient alors libres d'interagir au niveau nucléaire et l'activité transcriptionnelle serait augmentée [329, 330].

II. TRIM13, une E3 ligase énigmatique

Identification et caractérisation

TRIM13 (Tripartite Motif-containing protein 13) a été identifiée pour la première fois en 1998 sous le nom de LEU5 (Leukemia-associated protein 5), comme un potentiel gène suppresseur de tumeur dans les leucémies lymphocytaires chroniques des cellules B, B-CLL (B-cell chronic lymphocytic leukemia), souvent associées à une délétion dans le chromosome 13 [331, 332]. S'en suivra une série d'articles confirmant le lien entre TRIM13 et les tumeurs d'origine hématopoïétique [332-341].

Connu également sous les noms de RFP2 (Ret Finger Protein 2) et RNF77 (RING finger protein 77), cette **E3 ligase** de 47 kDa est pourvue d'un domaine TRIM/RBCC (Tripartite Motif/ Ring B-box Coiled-Coil) amino-terminal. Sur les plus de 70 membres qui composent la famille des TRIMs, seules TRIM13 et TRIM59 possèdent un **domaine transmembranaire**. Ce domaine transmembranaire carboxy-terminal l'ancre à la membrane du **réticulum endoplasmique (RE)** (Figure 41) [243, 342]. Elle a d'ailleurs été décrite pour son implication dans des fonctions associées au réticulum endoplasmique [342-346] mais aussi dans la réponse immunitaire et la régulation de NF- κ B et de façon plus anecdotique dans l'autophagie ou dans l'apoptose.



Figure 41. Domaines remarquables de TRIM13 et TRIM59, R; Domaine RING, B2; B-box2, CC ; Coiled-Coil, TM; Domaine transmembranaire selon Hatakeyama et al [243].

TRIM13 et le réticulum endoplasmique (RE)

En 2007, Lerner et al. démontrent que TRIM13 (RFP2) est une RING E3 ubiquitine ligase instable, capable de **s'auto-ubiquitinyler** *in vivo* et *in vitro*. Par des expériences d'immunopurification et de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), les auteurs identifient la protéine VCP (Valosin-containing protein) comme un partenaire de TRIM13. A l'instar de VCP, TRIM13 pourrait participer à la dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD). Leur étude révèle également que TRIM13 possède un domaine carboxy-terminal transmembranaire nécessaire à sa **localisation au RE** et que cette protéine co-localise avec diverses protéines résidentes du RE [342]. Plus récemment, Bianchini et al. ont montré que TRIM13 et HRD1 (HMG-CoA reductase degradation protein 1) une autre E3 ligase du RE constituent des **cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement de la sarcoglycanopathie**, une dystrophie musculaire. En effet, TRIM13 et HRD1 sont impliquées dans la génération par l'**ERAD** du deuxième mutant le plus fréquemment observé dans cette pathologie, le mutant V247M α -sarcoglycan [345, 347]. Par ailleurs, il a été démontré que TRIM13 induit la dégradation des canaux Cav1.2 par l'ERAD. En effet, en l'absence de la sous-unité auxiliaire Cav β qui régule la densité des canaux calciques à la membrane

plasmique, les **canaux calciques Cav1.2** sont ubiquitinylés par TRIM13, interagissent avec des **protéines du complexe ERAD** et sont ensuite dégradés par le protéasome. Réciproquement, la co-expression de Cav β affecte l'ubiquitination et la dégradation de ces canaux [346].

TRIM13, autophagie et apoptose

En 2012, les travaux de Tomar et al. démontrent que le stress du RE induit une stabilisation de TRIM13 qui régule **l'initiation de l'autophagie** et diminue la **clonogénicité** (capacité d'une cellule à établir un nouveau clone de cellules tumorales et de régénérer la tumeur) des cellules. En effet, l'expression ectopique de TRIM13 dans les cellules HEK293 induit un phénotype autophagique qui dépend de son domaine coiled-coil. D'un point de vue mécanistique, TRIM13 stabilisée interagit avec **p62/SQSTM1** (Sequestosome1) et co-localise avec DFCP1 (Double FYVE-containing protein 1), deux protéines impliquées dans les processus d'autophagie [343, 348]. Dans une seconde étude, Tomar et al. proposent que l'autophagie TRIM13-induite entraîne l'activation de la caspase 8 et la mort cellulaire. Ainsi, **TRIM13 catalyse l'ubiquitination de type K63 de la caspase 8** et favorise sa stabilisation, sa translocation vers l'autophagosome et sa fusion avec le lysosome au cours du stress du RE [344]. Un autre lien entre TRIM13 et mort cellulaire provient d'une étude réalisée en 2011 par Joo et al. Ces travaux suggèrent que TRIM13 régule l'apoptose radio-induite en stabilisant p53 (un régulateur de l'apoptose) et en réduisant l'activité d'Akt (un autre régulateur de l'apoptose). Les radiations ionisantes entraînent une augmentation de l'expression de TRIM13 qui forme des complexes avec **Mdm2**, responsable de la dégradation de p53 et avec **Akt** pour induire leur ubiquitination et leur dégradation par le protéasome [349].

TRIM13 et tumeurs

Initialement identifié dans les B-CLL (**B-cell chronic lymphocytic leukemia**) [331], l'implication de TRIM13 dans le développement tumoral a été plusieurs fois confirmée dans les CLL [336, 338, 350] mais aussi caractérisée dans les myélomes multiples [333, 351] et les tumeurs stromales gastro-intestinales (GISTs) [334]. Les **myélomes multiples (MM)** se caractérisent par une déplétion complète ou partielle de la région chromosomique codant pour TRIM13 observée dans plus de 50% des cas diagnostiqués. Gatt et al. ont entrepris l'analyse fonctionnelle de TRIM13 et ont ainsi observé que la diminution de l'expression de TRIM13 réduit la survie des cellules tumorales ainsi que la progression et la prolifération des cellules MM suggérant que TRIM13 est une potentielle cible thérapeutique. Ils démontrent également le rôle de TRIM13 dans la régulation négative de NF- κ B et de l'activité du protéasome 20S [333].

TRIM13 et immunité

L'étude du rôle des différentes protéines TRIM révèle que près de la moitié de celles-ci, TRIM13 inclus, participent à la réponse immune en intervenant à différents niveaux des voies de signalisation. De plus, il apparaît que leur fonction de régulateur est modulée à des niveaux pré- et post-transcriptionnels. Par exemple, la localisation et le niveau de transcription des TRIM sont modifiés au cours de l'infection virale. Ces travaux introduisent la famille d'E3 ligases TRIM comme des

protagonistes des réponses liées à l'immunité innée. Ils décrivent notamment la translocation nucléaire de TRIM13 du cytosol au noyau en réponse à une infection virale [352]. Les travaux de Rajsbaum qui, eux, ne mentionnent pas TRIM13, confirment le rôle des TRIM dans la réponse immunitaire antivirale et décrivent comment des chaînes libres de polyubiquitination de type K48 synthétisées par TRIM6 stimulent la réponse antivirale dépendant de l'I κ B kinase ϵ , IKK ϵ [242, 353].

TRIM13 et NF- κ B

Le lien entre TRIM13 et NF- κ B est établi pour la première fois par Matsuda et al. dans le cadre d'un crible à grande échelle qui visait à identifier et à caractériser des gènes humains capables d'activer les voies de signalisation NF- κ B et MAPK. Parmi les 299 candidats capables d'activer NF- κ B, TRIM13 est l'un des 28 gènes « non caractérisés » capable d'activer NF- κ B [24]. En accord avec ces travaux, Garding et al. suggèrent que TRIM13 et d'autres gènes situés sur la même région chromosomique ciblés par les mêmes mécanismes épigénétiques forment un cluster fonctionnel qui module la signalisation NF- κ B [354]. Gatt et al. réalisent une analyse fonctionnelle de TRIM13 afin de comprendre les effets de la délétion partielle ou complète de la région chromosomique contenant TRIM13 observée chez plus de 50% des patients atteints de myélomes multiples (MM). Ils démontrent que la réduction des niveaux d'expression de TRIM13 inhibe la signalisation NF- κ B et l'activité de la sous-unité 20S du protéasome associée à une diminution de la survie des cellules MM. Bien que ces observations s'opposent au rôle de gène suppresseur de tumeur de TRIM13 déjà décrit, elles confirment son implication dans la survie et la prolifération des MM [333].

Nos travaux confirment non seulement le rôle de régulateur de NF- κ B de TRIM13 mais introduisent également l'idée que TRIM13 régule NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) [355] (Article II).

Modèle et perspectives

Nos travaux démontrent qu'au cours de l'activation lymphocytaire, l'action de l'E3 ligase TRIM13 a des répercussions en aval de la translocation de NFAT et que si TRIM13 affecte modestement la translocation initiale de p65, le maintien de p65 au niveau nucléaire est très fortement réduit en l'absence de l'E3 ligase (Figure 42).

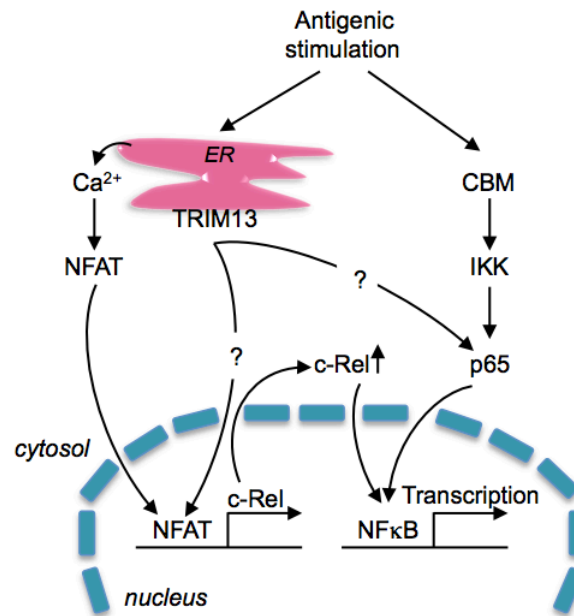


Figure 42. Modèle

Mais comment donc fonctionne TRIM13, sous ses airs d'homme-orchestre ?

Quelle est l'importance de la localisation de TRIM13 au niveau du RE ?

TRIM13 est une protéine ancrée à la surface du RE *via* un domaine transmembranaire carboxy-terminal. S'il est concevable que TRIM13 doive être au RE pour participer à la dégradation de protéines *via* l'ERAD, l'impact de sa localisation sur NF- κ B ou NFAT n'était pas établi. Nos données indiquent qu'un mutant de TRIM13 débarrassé de son domaine transmembranaire (Δ TM) n'est plus en mesure d'activer ces facteurs de transcription. Ainsi, **le positionnement de TRIM13 au RE est nécessaire à sa fonction de régulateur des voies NF- κ B et NFAT**. Une piste intéressante pourrait être que TRIM13 régule les flux calciques au niveau du RE qui permettent l'activation de la phosphatase calcineurine. Celle-ci est responsable de la déphosphorylation et de la translocation subséquente de NFAT et participe également au complexe CBM menant à l'activation de NF- κ B [64, 169]. D'ailleurs, TRIM13 participe à la régulation de l'expression des canaux calciques Cav1.2 dans un modèle de neurones [346]. De plus, de nombreuses protéines impliquées dans les flux calciques sont localisées au niveau du RE telles que STIM1 (Stromal interaction molecule 1) ou CRAC (Calcium Release-Activated Channels) [356]. Toutefois, l'absence de TRIM13 n'affecte pas la mobilisation du calcium en réponse à une stimulation antigénique. Ceci est conforté par le fait que la translocation nucléaire de NFAT est normale sans TRIM13. Nos expériences futures devront déterminer quelles protéines du RE permettent à TRIM13 de relayer les signaux émanant du TCR. Il est intéressant de noter que le RE peut fonctionner comme un véritable centre névralgique pour relayer la signalisation NF- κ B en réponse à l'engagement de multiples immunorécepteurs ou en réponse à un stress du RE [272] (en

annexe) [357]. L'organisation structurale du RE le positionne à proximité de la plupart des membranes des divers organites intracellulaires, notamment du noyau. ***La localisation de TRIM13 lui permet donc d'avoir des échanges privilégiés avec d'autres protéines du RE mais aussi avec des protéines qui transloquent vers le noyau à proximité du RE.***

Quelles sont les chaînes d'ubiquitine catalysées par TRIM13 ?

L'absence du domaine catalytique RING de TRIM13 abolit sa capacité à activer NFAT et NF- κ B. Il semble donc que la fonction d'E3 ubiquitine ligase de TRIM13 joue un rôle déterminant dans l'activation de ces facteurs de transcription. TRIM13 est une E3 ligase fonctionnelle qui s'auto-ubiquitinye lorsqu'elle est surexprimée dans des cellules HEK293T. Toutefois, le type d'ubiquitination catalysée par TRIM13 reste à élucider. Lerner et al rapportent que le traitement par l'inhibiteur du protéasome MG132 entraîne l'accumulation de TRIM13 et que sa dégradation requiert la présence d'un domaine RING intact [342]. En accord avec ces observations, Joo et al. démontrent que Mdm2 et Akt sont ubiquitinylées de façon dégradative par TRIM13 [349]. Il est donc probable que TRIM13 catalyse la formation de chaînes d'ubiquitine de type K48 ou un autre type d'ubiquitination de type dégradative encore non caractérisé. Ceci est néanmoins nuancé par Tomar et al. qui décrivent une ubiquitination de type K63 de la caspase 8 par TRIM13 [344]. ***On peut donc envisager que les chaînes d'ubiquitine non dégradatives liées à TRIM13 servent de plateforme de recrutement pour d'éventuels partenaires ou qu'à l'inverse TRIM13 catalyserait l'ubiquitination dégradative d'un inhibiteur des facteurs de transcription NFAT et NF- κ B.***

TRIM13 est elle-même modifiée par mono-ubiquitination et cette décoration est le fruit de l'activité d'une autre E3 ligase puisqu'elle survient également avec un mutant Δ RING [342]. La relevance de cette modification post-traductionnelle est inconnue. La protéine MALT1 est ciblée par une poly-ubiquitination suivie d'une mono-ubiquitination qui permet de libérer son activité enzymatique lors de l'activation lymphocytaire. Toutefois, nous n'observons pas de changement dans le ratio non ubiquitinylé / mono-ubiquitinylé de TRIM13.

Quelles sont les cibles potentielles de TRIM13 ?

Diverses protéines ont été identifiées comme étant des partenaires de TRIM13. Parmi elles, l'adaptateur **p62/SQSTM1** connu pour son implication dans la formation des autophagosomes [358] mais aussi pour son rôle dans la signalisation NF- κ B. Ainsi, p62 module l'activité DUB de CYLD et participe ainsi à la déubiquitination de TRAF6 [296]. De plus, la formation de complexes cytosoliques p62-BCL10-MALT1-IKK est requise pour l'activation de NF- κ B en réponse à l'engagement du TCR dans les cellules effectrices [359]. Notre observation que TRIM13 fonctionne en aval de l'axe CBM-IKK semble exclure une implication de p62.

Au cours de l'apoptose radio-induite, TRIM13 forme des complexes avec **Akt** [349]. Cette sérine-thréonine kinase active NF- κ B dans un certain nombre de cancers par un mécanisme encore méconnu [360]. Cependant, plusieurs théories convergent vers l'hypothèse selon laquelle Akt ciblerait IKK pour exercer sa fonction d'activateur de NF- κ B [361-363]. La dégradation d'Akt par TRIM13 et le fait

qu'Akt cible IKK pour activer NF- κ B sont des arguments en défaveur d'un modèle où TRIM13 et IKK collaborent pour réguler NF- κ B.

Une interaction entre TRIM13 et l'E3 ligase **Mdm2** (Murine double minute 2) a aussi été caractérisée par Joo et al. [349]. Celle-ci conduirait à la stabilisation de p53 résultant de l'inhibition de sa dégradation par Mdm2. A l'inverse, il a été montré que cette E3 ligase est responsable de la mono-ubiquitination non dégradative de p65 [260]. Sous le contrôle de TRIM13, Mdm2 qui transite en permanence entre le cytoplasme et le noyau [364] pourrait moduler la capacité transcriptionnelle de p65 en catalysant sa mono-ubiquitination.

A l'instar de Mdm2, diverses E3 ligases sont connues pour leur implication dans la régulation de p65. Parmi elles, l'E3 ligase nucléaire **PDLIM2** (PDZ and LIM domain2) qui ubiquitinye la sous-unité NF- κ B p65 et favorise son adressage et sa séquestration dans des structures intranucléaires qui fonctionnent comme des centres protéolytiques. Ainsi l'ubiquitination de p65 par PDLIM2 induit sa dégradation par le protéasome et met ainsi fin à la signalisation NF- κ B [365]. De même, le facteur de transcription **PPAR γ** (Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gamma) fonctionne comme une E3 ligase et catalyse l'ubiquitination K48 de p65 et induit sa dégradation par le protéasome [288]. Par ailleurs, il a été démontré que **SOCS1** (Suppressor Of Cytokines Signaling protein 1) régule l'activation de NF- κ B en diminuant la stabilité de p65 [286] en accord avec les travaux de Ryo et al. [366] et de Maine et al. [284]. Alors que Maine et al. présentent l'E3 ligase **COMMD1** (Copper Metabolism (Murr1) domain containing 1) comme un adaptateur, Ryo et al. introduisent Pin1 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1) comme un régulateur de SOCS1. Sous le contrôle de **Pin1**, SOCS1 s'associe à p65 et module son ubiquitination et sa dégradation. Ils démontrent en effet que l'interaction de Pin1 avec p65 inhibe sa liaison à I κ B α et catalyse son ubiquitination induisant ainsi une augmentation de sa redistribution nucléaire et de sa stabilité. Ils observent également que les sites de liaison de Pin1 et SOCS-1 à p65 sont proches et que la co-expression de Pin1 abolit complètement la dégradation de p65 induite par SOCS, tandis que COMMD1 renforce la liaison de p65 avec SOCS1 et favorise ainsi son ubiquitination. Le rôle de régulateur négatif de COMMD1 est confirmé par les travaux de Geng et al. [283] qui démontrent que la phosphorylation de p65 sur son résidu 468 est un pré-requis à son ubiquitination et à sa dégradation induite par COMMD1. [285, 367, 368].

L'activité E3 ubiquitine ligase de TRIM13 joue un rôle central dans sa fonction de régulateur de NFAT et de NF- κ B. En modulant la stabilité d'autres E3 ligases impliquées dans la régulation de p65 ou en favorisant leur interaction, TRIM13 modulerait le maintien nucléaire de p65. Mais qu'en est-il de NFAT ?

La phosphorylation et la translocation nucléaire subséquente des protéines NFAT1 et NFAT2 ne semble pas perturbée par l'absence de TRIM13. Il est donc fort probable que TRIM13 affecte un des

co-facteurs transcriptionnels de NFAT. Divers partenaires transcriptionnels de NFAT ont été caractérisés (Tableau 5) [309].

Tableau 5. Partenaires transcriptionnels de NFAT

Transcription partner	Interaction site	Effect
AP1 (FOS, JUN)	Many cytokine-gene promoters	Positive synergy
C/EBP	PPAR- γ promoter	Positive synergy
MAF	<i>Il-4</i> promoter	Positive synergy
EGR1 and EGR4	<i>Tnf</i> promoter	Positive synergy
GATA3	<i>Il-4</i> 3' enhancer	Positive synergy
ICER	Many cytokine-gene promoters	Inhibition of NFAT activity
IRF4	<i>Il-4</i> promoter	Positive synergy
MEF2	<i>NUR77</i> promoter	Positive synergy
OCT	<i>IL-3</i> enhancer	Positive synergy
p21 ^{SNFT}	<i>IL-2</i> promoter	Inhibition of NFAT activity
PPAR- γ	<i>IL-2</i> promoter	Inhibition of NFAT activity
T-bet	<i>lfn-γ5'</i> enhancer	Positive synergy

Parmi eux, le facteur de transcription **PPAR γ** qui *via* sa fonction d'E3 ligase régule négativement l'activation de p65. En utilisant des ligands de PPAR γ , Yang et al. démontrent qu'une fois activé, PPAR γ s'associe physiquement avec NFAT pour inhiber sa liaison à l'ADN et son activité transcriptionnelle [369]. En accord avec les travaux de Hou et al., ces résultats confirment le rôle d'immunomodulateur de PPAR γ dans les lymphocytes T.

Au vu de ces résultats, l'hypothèse selon laquelle TRIM13 ciblerait PPAR γ afin de réguler positivement NF- κ B semble plausible. Nos travaux n'ont montré aucune modification quantitative de PPAR γ en absence de TRIM13. Néanmoins il serait intéressant d'étudier l'impact de la surexpression ou de la diminution d'expression de TRIM13 sur l'activation et la fonction d'E3 ligase de PPAR γ .

Dans quelle mesure la régulation de l'activation de c-Rel via NFAT par TRIM13 intervient dans la régulation de NF- κ B ?

L'activation de c-Rel en réponse à l'engagement des récepteurs antigéniques est dichotomique dans les lymphocytes B et T. Dans les lymphocytes B, c-Rel est abondant et rapidement libéré de son inhibiteur suite à la stimulation du BCR [57]. En revanche, le signal émanant du TCR ne suffit pas à activer c-Rel qui reste dans le cytosol. Une boucle amplificatrice qui repose sur l'activation de NFAT est requise pour l'induction et la translocation nucléaire de c-Rel [57, 64]. En régulant l'induction de c-Rel *via* NFAT, TRIM13 contrôle sa translocation [64]. Comment l'axe NFAT/c-Rel assure le maintien nucléaire de p65 est à ce jour inconnu. Nos données laissent penser que TRIM13 ne devrait avoir qu'un rôle mineur sur c-Rel dans les lymphocytes B, dont l'activation est largement indépendante de NFAT. Il sera toutefois important d'évaluer dans ce modèle le rôle de TRIM13 sur la translocation initiale de p65.

Outro

Pris dans leur ensemble, nos travaux illustrent le niveau de complexité de la régulation de NF- κ B. La déubiquitinase USP34 et l'E3 ligase TRIM13, respectivement régulateur négatif et positif de NF- κ B, placent les processus d'ubiquitination au cœur de la régulation de NF- κ B.

Portés par la Metadherine et l'E3 ligase TRIM13, le réticulum endoplasmique entre en scène et se positionne comme un protagoniste important de la signalisation associée au facteur de transcription NF- κ B, qui est par ailleurs modulé par d'autres facteurs de transcriptions tels que NFAT.

Et si finalement NF- κ B le chef d'orchestre n'était qu'un simple musicien?

Annexes

Annexe I

The endoplasmic reticulum acts as a platform for ubiquitylated components of nuclear factor κ B signaling.

Alexia C, Poalas K, Carvalho G, Zemirli N, Dwyer J, Dubois SM, Hatchi EM, Cordeiro N, Smith SS, Castanier C, Le Guelte A, Wan L, Kang Y, Vazquez A, Gavard J, Arnoult D, Bidère N.

Sci Signal. 2013 Sep 3;6(291):ra79. doi: 10.1126/scisignal.2004496.

The Endoplasmic Reticulum Acts as a Platform for Ubiquitylated Components of Nuclear Factor κ B Signaling

Catherine Alexia,^{1,2,3} Konstantinos Poalas,^{1,2,3} Gabrielle Carvalho,^{1,2,3} Naima Zemirli,^{1,2,3} Julie Dwyer,^{4,5,6} Sonia M. Dubois,^{1,2,3} Emeline M. Hatchi,^{1,2,3} Nelia Cordeiro,^{1,2,3} Sherri S. Smith,^{4,5,6} Céline Castanier,^{1,2,3} Armelle Le Guelle,^{4,5,6} Liling Wan,⁷ Yibin Kang,⁷ Aimé Vazquez,^{1,2,3} Julie Gavard,^{4,5,6} Damien Arnoult,^{1,2,3*} Nicolas Bidère^{1,2,3*}

The innate and adaptive immune responses involve the stimulation of nuclear factor κ B (NF- κ B) transcription factors through the Lys⁶³ (K⁶³)-linked ubiquitylation of specific components of NF- κ B signaling pathways. We found that ubiquitylated components of the NF- κ B pathway accumulated on the cytosolic leaflet of the endoplasmic reticulum (ER) membrane after the engagement of cell-surface, proinflammatory cytokine receptors or antigen receptors. Through mass spectrometric analysis, we found that the ER-anchored protein metadherin (MTDH) was a partner for these ubiquitylated activators of NF- κ B and that it directly bound to K⁶³-linked polyubiquitin chains. Knockdown of MTDH inhibited the accumulation of ubiquitylated NF- κ B signaling components at the ER, reduced the extent of NF- κ B activation, and decreased the amount of proinflammatory cytokines produced. Our observations highlight an unexpected facet of the ER as a key subcellular gateway for NF- κ B activation.

INTRODUCTION

Although both the innate and adaptive arms of immunity use distinct proximal adaptor molecules to activate the transcription factor nuclear factor κ B (NF- κ B), a few intertwined principles stand out (1). First, both types of immune response result in the assembly of large signaling complexes (signalosomes) that are anchored close to the signal initiation site, that is, at membrane immunoreceptors, at the cytosol, or at the cytosolic face of intracellular organelles, which operate as platforms for triggering the Lys⁶³ (K⁶³)-linked, reversible ubiquitylation of key NF- κ B signaling components (1, 2). These ubiquitylated factors are subsequently released into the cytosol to recruit and activate the inhibitor of NF- κ B (I κ B) kinase (IKK) complex, which consists of two catalytic kinases, IKK α and IKK β , and the regulatory subunit NEMO (also known as IKK γ). IKK then phosphorylates the inhibitory I κ B proteins and thereby promotes their Lys⁴⁸ (K⁴⁸)-linked ubiquitination and proteasomal degradation (3). NF- κ B dimers subsequently enter the nucleus, where they initiate the transcription of their target genes. For example, engagement of tumor necrosis factor- α (TNF- α) receptor 1 (TNFR1) promotes the rapid recruitment to the receptor of the adaptor protein TNFR1-associated death domain (TRADD) together with the E3 ubiquitin ligases c-IAP (cytosolic inhibitor of apoptosis) and TNFR-associated factor 2 (TRAF2), which are responsible for catalyzing the polyubiquitylation of the kinase RIP1 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1) (4–6). TRAF2 also functions in B cells to propagate signaling by NF- κ B, c-Jun N-terminal kinase (JNK), mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase kinase 1 (MEKK1), and the p38 MAPK upon engagement of the TNFR family member CD40 by CD40 ligand (CD40L)

(7). In the case of the T cell receptor (TCR), ligand binding leads to the dynamic assembly of a complex containing CARD-containing MAGUK protein 1 (CARMA1), B cell lymphoma/leukemia 10 (BCL10), and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1 (MALT1) (the CBM complex) that stimulates the ubiquitylation of BCL10 and MALT1 and the activation of NF- κ B (8, 9). Other examples of ubiquitylated mediators of NF- κ B signaling include RIP2, RIP1, and interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase 1 (IRAK1) in cells stimulated through the innate immune receptors nucleotide-binding and oligomerization domain 1 (NOD1) and NOD2, Toll-like receptor 3 (TLR3), and TLR4, respectively (1).

The mechanism by which apical signalosomes mediate the activation of NF- κ B in the cytosol continues to be elucidated. Some models suggest a two-step mechanism that involves the assembly of an initial signaling complex that is subsequently released into the cytosol where it accesses IKK and NF- κ B (7). However, how these signaling structures are released from their epicenter to mature, and where secondary complexes accumulate, remains ill-defined. Here, we report the accumulation of ubiquitylated NF- κ B signaling components on the cytosolic face of the endoplasmic reticulum (ER) after the engagement of immunoreceptors. An unbiased mass spectrometry screen further identified the ER-anchored protein metadherin (MTDH) as a previously uncharacterized binding partner shared between ubiquitylated NF- κ B signaling components that determined their accumulation and the subsequent activation of NF- κ B.

RESULTS

Ubiquitylated NF- κ B signaling components are localized at the cytosolic face of the ER

Because some signaling hubs coalesce at the surfaces of organelles (2), we prepared crude heavy membrane (HM) fractions, which essentially contained lysosomes, ER, and mitochondria, from cells stimulated through independent receptors, including the TNFR, CD40, and the TCR (fig. S1A). Although RIP1 was detected in both the cytosolic and the HM fractions of

¹INSERM, UMR_S 1014, Hôpital Paul Brousse, Villejuif 94800, France. ²Université Paris-Sud P11, Orsay 91400, France. ³Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Villejuif 94800, France. ⁴Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 6 rue de l'Ecole de Médecine, Paris 75006, France. ⁵INSERM, U1016, 22 rue Méchain, Paris 75014, France. ⁶CNRS, UMR8104, 22 rue Méchain, Paris 75014, France. ⁷Department of Molecular Biology, Princeton University, Princeton, NJ 08544, USA. *Corresponding author. E-mail: damien.arnoult@inserm.fr (D.A.); nicolas.bidere@inserm.fr (N.B.)

unstimulated human embryonic kidney (HEK) 293T cells, we detected ubiquitylated RIP1 essentially only within the HM fraction of cells stimulated with TNF- α (Fig. 1A). In addition, we found that c-IAP1, I κ B α , and IKK remained mostly cytosolic in TNF- α -stimulated cells, arguing against the presence of TNFR1-associated complexes in HM fractions. Similarly, stimulation of Burkitt's lymphoma BL41 B cells through CD40 with recombinant CD40L triggered the accumulation of ubiquitylated TRAF2 in the HM fraction (Fig. 1B). In Jurkat cells (a human T cell leukemia cell line), treatment with a mixture of the phorbol ester PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) and ionomycin to mimic TCR engagement stimulated the ubiquitylation of BCL10, which was restricted to the HM fraction (Fig. 1C). Ubiquitylation of BCL10 in the HM fraction was inhibited in cells in which CARMA1 and MAL1 were knocked down, but not in cells in which NEMO was knocked down, suggesting that this event occurred downstream of the CBM and upstream of IKK in the signaling pathway (fig. S1, B and C). Consistent with this finding, transfection of HEK 293T cells with plasmid encoding BCL10 to increase its abundance resulted in the accumulation of ubiquitylated BCL10 in the HM fraction and the activation of NF- κ B signaling (fig. S1, D and E). This response was lost in cells expressing a mutant BCL10, in which the key ubiquitin acceptor lysine residues were mutated to arginines (fig. S1, D and E) (9), suggesting that the ubiquitylation of NF- κ B signaling components such as BCL10 is a prerequisite for their accumulation in HM fractions. We reasoned that this might also apply to signaling by unrelated immunoreceptors. Accordingly, we found that RIP2, RIP1, and IRAK1 were ubiquitylated and localized to the HM fractions of HEK 293T cell lines stimulated through NOD2, TLR3, and TLR4, respectively (fig. S2). Together, these data suggest that ubiquitylated NF- κ B signaling components selectively accumulate in HM fractions during both innate and adaptive immune responses.

To tackle the question of the subcellular localization of ubiquitylated NF- κ B signaling components, we first added additional centrifugation steps to our original purification protocol (fig. S3A). This enabled us to prepare organelle-enriched fractions that contained residual contamination with plasma membrane (PM) components, as evaluated by Western blotting analysis of BL41 B cells with antibodies specific for the PM resident proteins CD40 and GLUT1 (fig. S3B). Ubiquitylated TRAF2 selectively accumulated

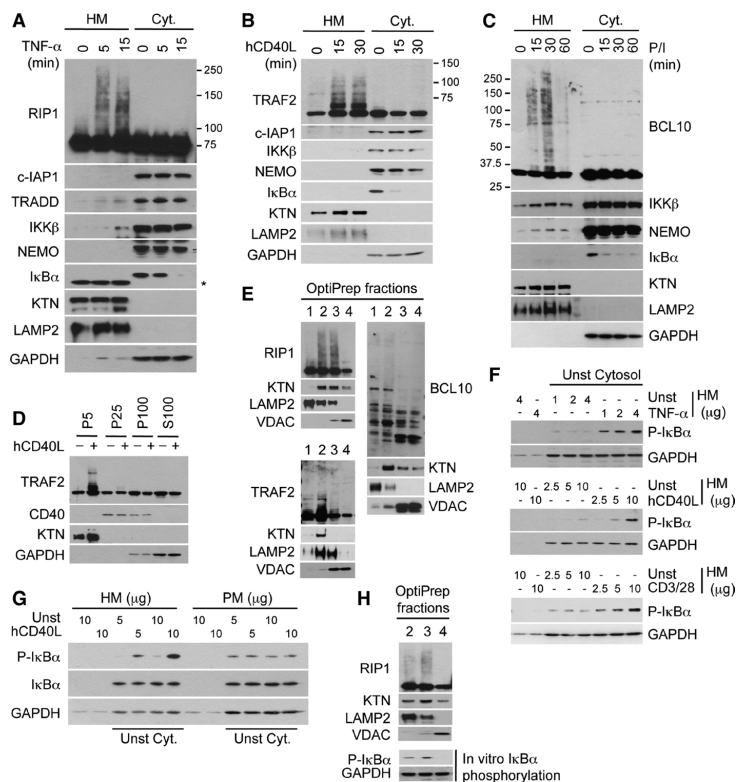


Fig. 1. Ubiquitylated NF- κ B signaling components accumulate at the ER. (A) Crude HM and cytosolic (Cyt.) fractions from unstimulated HEK 293T cells and HEK 293T cells stimulated with TNF- α (10 ng/ml) for the indicated times were analyzed by Western blotting with antibodies specific for the indicated proteins. The ER-resident protein kinectin (KTN), the lysosomal protein LAMP2, and the cytosolic protein GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) served as loading and purity controls. The asterisk indicates a nonspecific band. Numbers to the right of the RIP1 blot indicate molecular mass markers. (B) BL41 B cells were left untreated or were treated with CD40L (10 ng/ml) for the indicated times before being fractionated and analyzed by Western blotting as described in (A). (C) Jurkat T cells were left untreated or were stimulated with PMA (20 ng/ml) and ionomycin (300 ng/ml) (P/I) for the indicated times before being fractionated and analyzed by Western blotting as described in (A). (D) BL41 B cells were stimulated with recombinant hCD40L (20 ng/ml) for 15 min. Subcellular fractionation of the cells was performed as described in fig. S3A to generate pellets (P) and supernatants (S), and samples were analyzed by Western blotting with antibodies against the indicated proteins. (E) Crude HM fractions from TNF- α -, CD40L-, or P/I-stimulated HEK 293T, BL41, and Jurkat cells, respectively, were fractionated on OptiPrep density gradients (fractions range from 1 at the top to 4 at the bottom) and then analyzed by Western blotting with antibodies against the indicated proteins. (F) Crude HM fractions from unstimulated (Unst) cells or TNF- α -, CD40L-, or anti-CD3 and anti-CD28 (CD3/28)-stimulated cells were incubated with cytosolic fractions from unstimulated cells (Unst Cytosol) in the presence of ATP. The extent of I κ B α phosphorylation in the cytosolic fractions was determined by Western blotting analysis. GAPDH was used as a loading control for samples containing cytosolic fractions. (G) Organelle-enriched (HM) and PM-enriched (PM) fractions from unstimulated or CD40L-stimulated BL41 B cells were incubated with cytosolic fractions from unstimulated cells (Unst Cyt.) in the presence of ATP. The extent of I κ B α phosphorylation in the cytosolic fractions was determined by Western blotting analysis. Western blots in (A) to (F) are representative of three or more independent experiments. (H) OptiPrep gradient fractions from TNF- α -stimulated HEK 293T cells were incubated with cytosolic fractions from unstimulated cells in the presence of ATP. The extent of I κ B α phosphorylation in the cytosolic fractions was determined by Western blotting analysis. Western blots are representative of two independent experiments.

in organelle-enriched fractions in CD40L-stimulated cells (Fig. 1D). We obtained similar results for RIP1 and BCL10 in Jurkat cells exposed to TNF- α or PMA and ionomycin, respectively (fig. S3, C and D). Next, we further separated HM fractions from activated cells on discontinuous OptiPrep gradients to yield fractions enriched in lysosomes, ER, or mitochondria (10). Although unmodified RIP1, TRAF2, and BCL10 were detected in multiple fractions, ubiquitylated proteins essentially coalesced into those fractions enriched with the ER transmembrane protein kinectin (Fig. 1E). Finally, treatment of HM fractions with trypsin to remove proteins associated with the surfaces of organelles eliminated most ubiquitylated species of RIP1, TRAF2, and BCL10, without affecting internal and transmembrane proteins (fig. S3, E to G). Collectively, our results suggest that ubiquitylated NF- κ B signaling components predominantly accumulated at the cytosolic leaflet of the ER membrane.

Components of HMs in a cell-free system cause signal-dependent activation of NF- κ B

We next posited that HM fractions from activated cells might contain sufficient molecular components to activate IKK in cytosolic fractions from unstimulated cells. We therefore set up a cell-free experimental system in which we incubated HM fractions from unstimulated or stimulated cells with cytosolic extracts from non-activated cells supplemented with adenosine triphosphate (ATP) (11). We then examined the phosphorylation of I κ B α as a proxy for IKK activity. In contrast to HM fractions from resting cells, which triggered minimal activity of IKK, HM fractions from TNF- α -, CD40-, or TCR-stimulated cells led to I κ B α phosphorylation in a dose- and IKK-dependent manner (Fig. 1F and fig. S4A). Similar results were obtained with organelle-enriched preparations (Fig. 1G). Although PM-enriched fractions increased the basal extent of I κ B α phosphorylation in cytosolic extracts, this was not further augmented when PM-enriched fractions from activated cells were used (Fig. 1G). In addition, HM fraction-dependent phosphorylation of I κ B α was lost when samples were pretreated with trypsin, reinforcing the idea that extra-organellar components are required for this reaction (fig. S4B). Finally, ER-enriched fractions from TNF- α -stimulated cells also stimulated the phosphorylation of I κ B α protein in vitro (Fig. 1H). Hence, our data suggest that the ER anchors signalosomes that contain the molecular machinery required to activate IKK and therefore propagate NF- κ B signaling.

The ER-resident protein MTDH is a partner for ubiquitylated NF- κ B signaling components

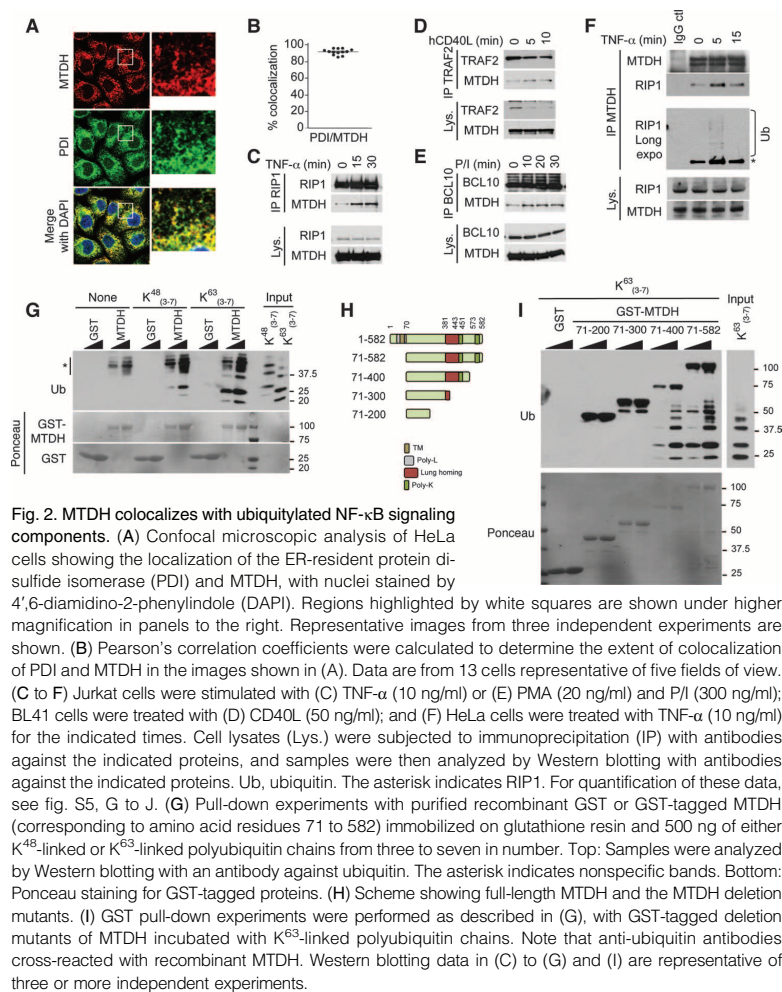
To search for potential ER-specific partners for ubiquitylated NF- κ B signaling components, we immunoprecipitated RIP1 from TNFR1-stimulated HEK 293T cells and BCL10 from TCR-stimulated Jurkat cells. Mass spectrometry-based proteomic analysis of proteins bound to both RIP1 and BCL10 identified the ER-resident protein MTDH (also known as AEG-1, LYRIC, 3D3) (fig. S5, A and B). MTDH has 582 amino acid residues with a single N-terminal transmembrane span, and it is linked to various cellular processes, including cancer, autophagy, and metabolism when overexpressed (12). In addition to being localized in the ER, exogenous MTDH has been observed in the nucleus and on the surface of cells (13–15). Ectopic MTDH binds to the NF- κ B subunit p65 and translocates to the nucleus in response to TNF- α (16). However, our examination of endogenous MTDH by confocal microscopy showed that it was essentially localized at the ER even in TNF- α -stimulated cells (Fig. 2, A and B, and fig. S5, C to F). Coimmunoprecipitation experiments showed that MTDH bound, albeit modestly, to RIP1, TRAF2, or BCL10 upon stimulation of cells through the TNFR, CD40, or TCR, respectively (Fig. 2, C to E, and fig. S5, G to I). Conversely, we found that MTDH coimmunoprecipitated with a complex containing ubiquitylated and non-ubiquitylated RIP1 in TNF- α -stimulated HeLa cells (Fig. 2F and fig. S5J).

To more thoroughly examine the role of MTDH in interacting with ubiquitylated NF- κ B signaling components, we generated glutathione *S*-transferase (GST)-tagged recombinant MTDH proteins and performed GST pull-down assays to test its ability to directly associate with K⁴⁸- or K⁶³-linked polyubiquitin chains in vitro. We found that the extent of binding of MTDH to K⁶³-linked chains was substantially greater than that to K⁴⁸-linked chains (Fig. 2G). Analysis of GST-tagged deletion mutants of MTDH further identified a region including amino acid residues 300 to 400 as being essential for the association between MTDH and K⁶³-linked polyubiquitin (Fig. 2, H and I). Together, our data suggest that the ER-resident protein MTDH associates with ubiquitylated NF- κ B signaling components in response to cytokines and to stimulation of the TCR, possibly by binding to K⁶³-linked polyubiquitin chains.

MTDH selectively controls NF- κ B activation downstream of multiple signaling pathways

We next investigated whether RNA interference (RNAi)-mediated knockdown of MTDH had an effect on signaling by TNFR or CD40. First, we found that HEK 293T cells transfected with two individual small interfering RNAs (siRNAs) specific for MTDH exhibited markedly decreased TNF- α -dependent activity of an NF- κ B-dependent luciferase reporter, IL-8 secretion, and nuclear localization of NF- κ B p65 similarly to cells in which RIP1 or TRAF2 was knocked down (Fig. 3, A and B, and fig. S6, A and B). Knockdown of MTDH reduced the extent of the TNF- α -dependent phosphorylation and degradation of I κ B α , whereas the extent of activation of the MAPKs ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) was unaffected (Fig. 3C and fig. S6C). HeLa clones stably expressing short hairpin RNA (shRNA) specific for MTDH recapitulated impairment of the TNF- α -dependent activation of NF- κ B (Fig. 3D and fig. S6, D to F). This defect was partly restored by transfecting cells stably expressing shRNA specific for a noncoding region of MTDH mRNA with plasmid encoding MTDH (fig. S6G). Consistent with these data, knockdown of MTDH in BL41 B cells led to diminished NF- κ B-dependent luciferase activity, I κ B α phosphorylation, and nuclear translocation of p65 in response to CD40L (Fig. 3, E and F, and fig. S6H). Consistent with a role for MTDH in TRAF2-mediated signaling (7), we found that the extent of phosphorylation of JNK was markedly reduced in cells deficient in MTDH (fig. S6H). In addition to activating canonical NF- κ B signaling, CD40 also stimulates the degradation of TRAF2 and TRAF3, as well as the processing of the p100 NF- κ B subunit into p52 as part of the noncanonical NF- κ B pathway (17). However, loss of MTDH in BL41 B cells had no effect on either p100 processing or degradation of TRAF2 and TRAF3 (fig. S6I).

In TCR-stimulated Jurkat cells, loss in MTDH led to decreased NF- κ B-dependent reporter activity, a reduction in the extent of I κ B α phosphorylation and degradation, and diminished nuclear translocation of p65 (Fig. 3, G and H, and fig. S7A). In contrast, other early TCR signaling events, such as general tyrosine phosphorylation, ERK1/2 activation, and intracellular calcium mobilization, were unaffected by knockdown of MTDH (Fig. 3H and fig. S7, B and C), reinforcing the idea that MTDH selectively governs NF- κ B activation. Furthermore, knockdown of the ER stress effector protein serine/threonine-protein kinase/endonuclease IRE1 (IRE1 α), which mediates the activation of JNK and NF- κ B during the unfolded protein response (UPR) (18), did not substantially alter TCR- or TNF- α -dependent NF- κ B activation (fig. S7D). This was also true for other ER-resident proteins, such as autocrine motility factor receptor (AMFR), bifunctional apoptosis regulator (BFAR), and RING finger protein 5 (RNF5) (fig. S7E). Consistent with these findings, we did not detect any overt changes in the overall morphology of the ER in MTDH-deficient cells that were observed by confocal microscopy, further militating against a general dysfunction of the ER (fig. S7F). Finally, knockdown of MTDH resulted in the reduced



TCR-stimulated secretion of IL-2 by primary human T cells, as well as a diminished increase in the cell-surface abundance of the activation marker CD25, and reduced cell proliferation (Fig. 3, I and J). Thus, our data suggest that MTDH plays an important role in cytokine- and TCR-dependent NF-κB activation.

We also examined whether MTDH contributed to the innate immune response. TLRs, NOD-like receptors (NLRs), and RIG-I-like receptors (RLRs) sense bacterial or viral components to coordinate activation of the IRF [interferon (IFN) regulatory factor] transcription factors and NF-κB, which culminates in the production of type I IFNs and proinflammatory cytokines (19). Knockdown of MTDH in HEK 293T cells with siRNA reduced the extent of NF-κB-dependent reporter activity in response to stimulation of NOD2, TLR3, TLR4, and RLR (Fig. 3K). In contrast, IFN-β-dependent gene expression was not markedly affected by loss of

MTDH (fig. S7G). In cells exposed to the DNA-damaging agent etoposide, which relies on NEMO SUMOylation and phosphorylation to convey NF-κB signaling (20), the transcription factor activation occurred independently of MTDH (Fig. 3K). Thus, MTDH appears to act as a broad regulator of NF-κB signaling.

MTDH governs the accumulation of ubiquitinated NF-κB signaling components in HM fractions

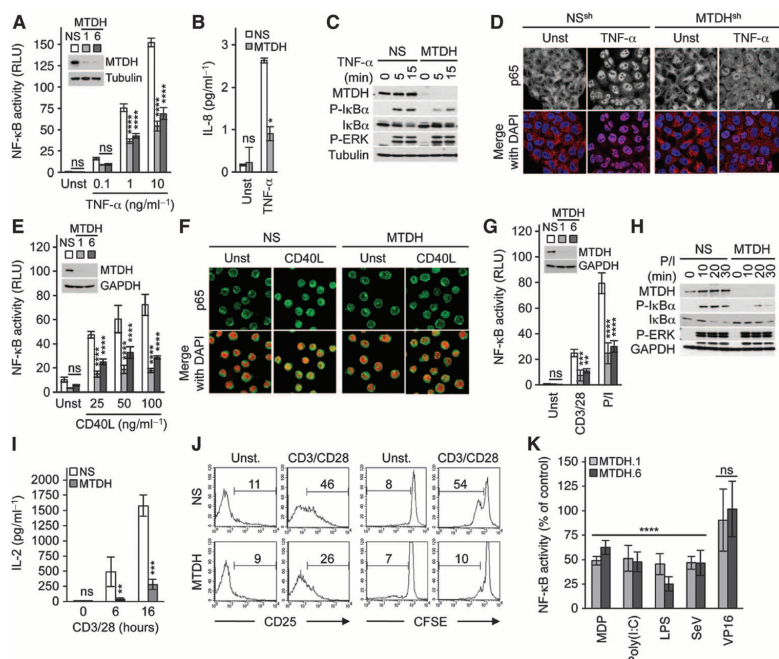
To evaluate the contribution of MTDH to ER-dependent NF-κB activation, we revisited our cell-free system with HM fractions derived from cells in which MTDH was knocked down. We found that HM fractions from MTDH-deficient cells that were stimulated through TNFR, CD40, or TCR failed to optimally stimulate IκBα phosphorylation in vitro (Fig. 4A). Furthermore, ubiquitinated RIP1 did not accumulate in the HM fractions of TNF-α-treated HEK 293T cells, although it did associate with the TNFR under similar conditions (Fig. 4, B and C). Consistent with this finding, we detected less ubiquitinated TRAF2 and BCL10 proteins in HM fractions from MTDH-deficient cells stimulated through CD40 or TCR compared to that in HM fractions from treated cells transfected with nonspecific siRNA (Fig. 4, D and E). As before, the extent of ubiquitination of BCL10 was not altered in MTDH-deficient Jurkat cells compared to that in Jurkat cells transfected with nonspecific siRNA (Fig. 4F). Collectively, our data suggest that instead of participating in their ubiquitination, MTDH functions as a sensor of ubiquitinated NF-κB signaling components.

DISCUSSION

Here, we provide evidence that ubiquitinated NF-κB signaling components coalesce at the surface of the ER with MTDH after engagement of multiple immunoreceptors by

their ligands (Fig. 4G). MTDH amounts are increased in hepatocellular carcinoma (21), in non-small cell lung cancer (22), as well as in some malignant gliomas (23). Furthermore, the increased abundance of MTDH is linked to poor clinical outcome in a subset of breast cancers because it promotes metastasis, chemoresistance, and NF-κB-dependent invasiveness (13, 24, 25). Overexpression of MTDH in transfected cells activates multiple signaling pathways, including those mediated by NF-κB, ERK, p38, and PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)–Akt, as well as the autophagic machinery (21, 26, 27). We showed that endogenous MTDH also participated in the innate and adaptive branches of the immune response by promoting the activation of NF-κB. Knockdown of MTDH reduced the extent of JNK phosphorylation after stimulation of CD40, supporting a role for MTDH in TRAF2-dependent signaling (7). It remains to be seen whether the function that we ascribed to MTDH through experiments with RNAi-based

Fig. 3. Knockdown of MTDH alters NF- κ B activation in response to various stimuli. (A) HEK 293T cells expressing an NF- κ B reporter plasmid transfected with a nonspecific (NS) siRNA or with two individual MTDH-specific siRNAs (MTDH.1 and MTDH.6) were left unstimulated or were stimulated with the indicated concentrations of TNF- α for 5 hours, and then were analyzed by luciferase assay. Data are means $\pm$ SD from three independent experiments. **** P < 0.0001 compared to cells transfected with NS siRNA [analysis of variance (ANOVA)]. ns, nonsignificant; RLU, relative light units. Inset: Western blotting analysis of the knockdown of MTDH by the specific siRNAs. (B) HEK 293T cells transfected with NS siRNA or MTDH-specific siRNA (MTDH.1) were stimulated with TNF- α (10 ng/ml) and then were analyzed by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) to determine the amount of IL-8 secreted into the culture medium. Data are means $\pm$ SD of three independent experiments. * P < 0.05 (ANOVA). (C) HEK 293T cells were transfected and treated as described in (B) and then were subjected to Western blotting analysis with antibodies specific for the indicated proteins. Data are representative of three independent experiments. (D) HeLa cells stably expressing nonspecific shRNA (NS) or an MTDH-specific shRNA (MTDH^{sh}) were stimulated with TNF- α (1 ng/ml) for 15 min and then were analyzed by confocal microscopy to determine the extent of nuclear translocation of the NF- κ B subunit p65. Representative images from three independent experiments are shown. (E) BL41 B cells were transfected, treated, and analyzed as described in (A), except that the cells were stimulated with the indicated concentrations of CD40L. Data are means $\pm$ SD of three independent experiments. **** P < 0.0001 (ANOVA). (F) BL41 B cells were left unstimulated or were stimulated with CD40L (50 ng/ml) for 15 min before being analyzed by immunofluorescence microscopy for p65 (green) and DAPI (red). Images are representative of two independent experiments. (G) Jurkat cells were transfected, treated, and analyzed as described in (A), except that they were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (each at 500 ng/ml) or with PMA (20 ng/ml) and P/I (300 ng/ml). Data are means $\pm$ SD of three independent experiments. ** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001 (ANOVA). (H) Jurkat cells transfected with NS siRNA or MTDH-specific siRNA were left untreated or were stimulated with P/I for the indicated times and then were analyzed by Western blotting



with antibodies specific for the indicated proteins. Data are representative of three independent experiments. (I and J) Primary human T cells transfected with NS siRNA or MTDH-specific siRNA and loaded with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (see Materials and Methods) were left untreated or were activated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (each at 100 ng/ml) for the indicated times. (I) IL-2 secretion was analyzed by ELISA. Data are means $\pm$ SD of three independent experiments. ** P < 0.01; *** P < 0.001 (ANOVA). (J) The cell-surface abundance of CD25 and the dilution of CFSE were determined by flow cytometric analysis. The percentages of CD25⁺ cells and of dividing cells (CFSE^{low}) are shown. Data are representative of two experiments. (K) HEK 293T control cells or HEK 293T cells that stably expressed NOD2, TLR3, or TLR4 were transfected with MTDH-specific siRNA and an NF- κ B-dependent reporter, were stimulated with muramyl dipeptide (MDP) (10 μ g/ml), poly(I:C) (10 μ g/ml), LPS (lipopolysaccharide) (10 μ g/ml), Sendai virus (SeV), or 40 μ M etoposide (VP16), and then were subjected to luciferase assay. Data are means $\pm$ SD of three independent experiments. **** P < 0.0001 when compared to NS siRNA-transfected cells (ANOVA).

approaches also applies in vivo or whether compensatory mechanisms exist. Nevertheless, the pleiotropic action of MTDH might complicate the design of therapeutics that target it in cancer cells.

How might this ER-MTDH nexus operate? The proximity of the interconnected network of membranes of the ER to most of the organelles and the PM leads to the formation of local junctions that are propitious for intracellular signaling (28). For example, the foci formed between the ER-resident Ca²⁺ sensor stromal interaction molecule 1 (STIM1) and the PM CRAC channel component Orai1 govern Ca²⁺ signaling in T lymphocytes (29). It would be interesting to evaluate whether ubiquitinated NF- κ B signaling components accumulate at specific ER sites to increase their local

concentration and therefore act as a switch to propagate signaling. Although it does not contain known ubiquitin-binding domains (30), we found that MTDH directly bound to K⁶³-linked polyubiquitinated chains, and we favor a model in which it operates as a scaffold to collect ubiquitinated NUTs. Future work will aim at precisely understanding how the ER integrates signalosomes emanating from immunoreceptors to propagate NF- κ B activation.

Finally, our results complement an underappreciated function of the ER in relaying outside-in signaling. Indeed, the cytosolic face of the ER anchors complexes that control the stress-mediated UPR, ER-associated protein degradation (ERAD), as well as type I IFN production in response to

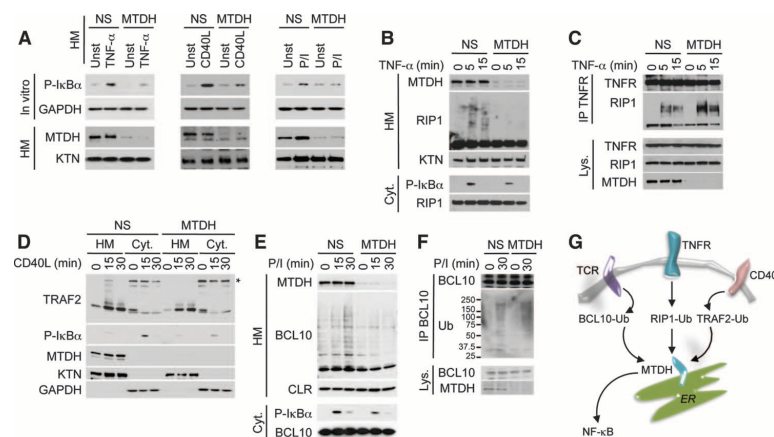


Fig. 4. MTDH enables the accumulation of ubiquitylated NF- κ B signaling components at the ER to mediate NF- κ B activation. (A) HEK 293T cells, BL41 B cells, and Jurkat cells were transfected with nonspecific siRNA (NS) or MTDH-specific siRNA (MTDH). Crude HM fractions from unstimulated or TNF- α , CD40L-, or P/I-stimulated HEK 293T, BL41, and Jurkat cells, respectively, were incubated with the cytosolic fractions of unstimulated cells in the presence of ATP. The extent of I κ B α phosphorylation was determined by Western blotting analysis with antibodies against the indicated proteins. (B and C) NS- and MTDH-silenced HEK 293T cells transfected with NS siRNA or MTDH-specific siRNA were stimulated with TNF- α (10 ng/ml) for the indicated times. (B) Crude HM and cytosolic (Cyt.) fractions were analyzed by Western blotting with antibodies specific for the indicated proteins. (C) Cells were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-TNFR antibody and then were analyzed by Western blotting with antibodies against the indicated proteins. Total cell lysates (Lys.) were also analyzed by Western blotting. (D) BL41 B cells were transfected, treated, and analyzed as described in (B), except that they were stimulated with CD40L (1 ng/ml) for the indicated times. The asterisk indicates a nonspecific band. (E and F) Jurkat cells transfected with NS siRNA or MTDH-specific siRNA were stimulated with PMA (20 ng/ml) and P/I (300 ng/ml) for the indicated times. (E) Western blotting analysis of BCL10 in HM and cytosolic fractions was performed as described in (B). (F) Cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-BCL10 antibody and were analyzed by Western blotting with antibodies against the indicated targets. Data are representative of two (B and F) or three (A, C, D, and E) independent experiments. (G) Working model: Stimulation of immunoreceptors promotes the nondegradative ubiquitination of key NF- κ B signaling components. The ER-resident protein MTDH aggregates ubiquitylated NF- κ B signaling components and thus favors their accumulation at the cytosolic side of the ER. This step facilitates IKK activation, I κ B α degradation, and full activation of NF- κ B.

pathogen-derived, cytosolic nucleic acids (31, 32). In that view, our findings draw a parallel with the ER stress effector IRE1 α , which organizes UPR-mediated activation of JNK and NF- κ B signaling (18), and with the ER-resident, multipass protein stimulator of IFN genes (STING), which controls DNA-mediated inflammation (31). However, MTDH likely works autonomously because its knockdown blocked NF- κ B activation independently of IRE1 α and without affecting the production of type I IFN. Together, MTDH, IRE1 α , and STING might thus be considered as a distinct class of ER proteins that are not involved in classical ER functions, but rather in collecting and converting apical signals into biological responses.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and reagents

Jurkat E6.1, HEK 293T, and HeLa cells were purchased from the American Type Culture Collection. BL41 cells were provided by S. Sharma (Brown Uni-

versity). HEK 293T cell lines stably expressing NOD2, TLR3, or the TLR4-MD2-CD14 complex were obtained from InvivoGen. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors (Etablissement Français du Sang) were purified as previously described (33). PMA, CFSE, and etoposide were purchased from Sigma. MDP, LPS, and poly(I:C) were obtained from InvivoGen. Anti-CD3 and anti-CD28 antibodies were from BD Biosciences, ionomycin was from Calbiochem, hCD40L was obtained from Immunotools, TNF- α was purchased from R&D Systems, and Fluo-4 was obtained from Invitrogen. Sendai virus H4 strain was provided by D. Garcin (University of Geneva School of Medicine, Switzerland).

siRNAs, transfections, and luciferase assays

The following siRNA sequences (obtained from Invitrogen, Ambion, and Sigma) were used. MTDH.1: GGUAGACGAAGAAA-GAGCUUACACUU; MTDH.6: GGAU-GUUAGCCGUAUCAA; CARMA1: UGUCCCCGUUGACACAUACACAAA; MALT1: GGAACAGAAUUAUUCUG-CUGAAUCU; NEMO: GAGUCGUU-GGAGGUGCCACUAAAG; RIP1.1: CCACUAGUCUGACCGAUA; RIP1.2: GCAAGACCUUACGAGAAU; TRAF2.1: GGACCAAGACAAGAUUGAA; TRAF2.2: CGAGGGCAUAUUGAAGAA; ERN1.1: CCCUGCAAGAGUAUGUG-GAGCAGAA; ERN1.2: CCCUACCUA-CACGGUGGACAUCUUU; ERN1.3: GACCUGCGUAAAUUCAGGACCUAAU; AMFR.1: GUAUGUGGUGCCUCUGGU; AMFR.2: CAGACUUUGUCAUGGAGCU; BFAR.1: CAUACCGCUGAUUGCUGAtt; BFAR.2: CUGUUGACUACACCGACAtt; RNFS.1: CUCACUCAGUACGUGUAtt; RNFS.2: CUGCUCAGAGGCUACUCAtt.

Control and MTDH-targeting pGIPZ-expressing shRNAs (Open Biosystems) were as follows: MTDH.NC: ACAAGACGATCTTAATT; MTDH.722: CTGTTGGTTCCAAGAAGAA. Jurkat cells were transfected by electroporation (Harvard Apparatus), and PBMCs and BL41 cells were transfected by nucleofector (Amaxa). HEK 293T and HeLa cells were transfected with the standard calcium phosphate protocol and Lipofectamine (Invitrogen), respectively. Luciferase assays were performed as previously described (34).

Subcellular fractionations and in vitro I κ B α phosphorylation assays

Cells were mechanically permeabilized with a 27 $\frac{1}{2}$ -gauge syringe (BD Biosciences) in 20 mM Hepes (pH 7.9), 1.5 mM MgCl₂, 60 mM KCl, with protease inhibitors. Samples were centrifuged at 1000g to remove nuclei and unbroken cells. HM fractions sedimented after centrifugation at 10,000g for 15 min and cytosolic fractions were collected after an additional centrifugation step at 25,000g for 60 min. In some experiments, additional centrifugation steps at 5000g, 25,000g, and 100,000g were included in

our sequential centrifugation protocol. Treatment with trypsin was performed as previously described (35). Discontinuous OptiPrep gradients were performed as previously described (10). For in vitro assays to determine I κ B α phosphorylation, cells were broken in hypotonic buffer [10 mM tris-HCl (pH 7.5), 10 mM KCl, 0.5 mM EGTA, 1.5 mM MgCl₂, with protease inhibitors]. HM fraction (1 to 10 μ g) in resuspension buffer [20 mM Hepes-KOH (pH 7.4), 10% glycerol, 0.5 mM EGTA, and protease inhibitors] was mixed with 10 μ g of cytosolic fraction together with reaction buffer [20 mM Hepes-KOH (pH 7.0), 2 mM ATP, 5 mM MgCl₂, and protease inhibitors] at 30°C. HM fractions were cleared by centrifugation, and the remaining cytosolic fractions were analyzed by Western blotting.

Western blotting, immunoprecipitations, and mass spectrometry analysis

Cell lysates were prepared as previously described (33). Samples were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Immunoprecipitations were performed with protein G-agarose (Roche) as described previously (33). Protein ubiquitylation was analyzed as described previously (36), with 25 mM Hepes (pH 7.4), 100 mM NaCl, 0.2% IGEPAL, 10% glycerol, 8 mM β -glycerophosphate, 1 mM dithiothreitol, 30 nM *N*-ethylmaleimide, and protease inhibitors (Roche). Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry analysis was performed by NextGen Science. Band intensities from Western blots were quantified with ImageJ software (National Institutes of Health) and normalized for a loading control. Three independent experiments were used to determine statistical significance (Prism GraphPad Software).

GST pull-downs and cell-free ubiquitin-binding assays

BL21 bacteria transformed with the plasmid pGEX-2T encoding human MTDH constructs (amino acid residues 71 to 582, 71 to 400, 71 to 300, and 71 to 200) were grown overnight in isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside-containing lysogeny broth medium (Invitrogen). Bacterial pellets were lysed in phosphate-buffered saline-Triton 1% with protease inhibitor, which was followed by three thaw-freeze cycles and ultrasonication, and then samples were cleared by centrifugation. Supernatants were incubated for 2 hours with glutathione beads (Invitrogen) and washed four times. Glutathione agarose beads bound to GST-MTDH proteins were incubated with 500 ng of K⁴⁸- or K⁶³-linked polyubiquitin chains (Boston Biochem) for 1 hour at 4°C in ubiquitin-binding buffer [25 mM Hepes (pH X), 150 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100, 1 mM EGTA, and bovine serum albumin (1 mg/ml)], followed by serial washes with binding buffer and then precipitation of the glutathione agarose beads by centrifugation.

Antibodies used for Western blotting and immunoprecipitations

Antibodies specific for the following proteins were obtained from Santa Cruz Biotechnology: AIF, BCL10, CD40, CK1 α , I κ B α , kinectin, LAMP2, MALT1, NF- κ B p65, TNFR, TRADD, TRAF2, TRAF3, tubulin, and ubiquitin. Antibodies specific for phosphorylated forms of I κ B α , ERK, and p38, and antibodies against CARMA1, IRAK1, ERK, and NF- κ B2 were purchased from Cell Signaling Technology. Antibodies against MTDH were from Millipore and Sigma-Aldrich. Antibodies specific for c-IAP1, IKK α , IKK β , NEMO, RIP1, RIP2, TRAF2, and calreticulin were obtained from BD Biosciences. Antibody against phosphorylated tyrosine residues and anti-GLUT1 antibody were from Millipore, anti-TRAF2 antibody was from MBL, anti-VDAC antibody was obtained from Calbiochem, anti-NOD2 antibody was from ProSci, and anti-GAPDH antibody was from Sigma. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were from SouthernBiotech. The Immobilon chemiluminescent substrates were purchased from Millipore.

Confocal microscopy and flow cytometry

For confocal microscopy, cells were treated as previously described (34, 35). We used primary antibodies against PDI (Abcam), MTDH (Sigma), and the NF- κ B subunit p65 (Santa Cruz Biotechnology). Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) and Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse IgG antibodies (Invitrogen) were used as secondary antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI (Invitrogen). Samples were analyzed with a Leica confocal microscope SP5. For flow cytometric analysis, fluorescein isothiocyanate-conjugated antibodies against CD25 (ImmunoTools) and the respective isotype controls were used. Cells were analyzed with a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

Statistical analysis

Two-way ANOVA tests with post hoc Tukey's analysis were used to assess statistical significance (Prism GraphPad Software), and *P* values are indicated in the figure legends.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

www.sciencesignaling.org/cgi/content/full/6/291/ra79/DC1

Fig. S1. Characterization of the ubiquitylation of NF- κ B signaling components.

Fig. S2. Ubiquitylated NF- κ B signaling components accumulate in HM fractions in response to NOD2, TLR3, and TLR4 stimulation.

Fig. S3. Ubiquitylated NF- κ B signaling components are found in HM fractions with minimal PM contamination.

Fig. S4. Activation of NF- κ B in vitro by organelle-enriched cellular fractions.

Fig. S5. Identification of MTDH by mass spectrometry and analysis of its subcellular distribution.

Fig. S6. Participation of MTDH in cytokine-mediated activation of NF- κ B.

Fig. S7. Effect of knockdown of MTDH on TCR-mediated early signaling and on IFN- β activity.

REFERENCES AND NOTES

- B. Skaug, X. Jiang, Z. J. Chen, The role of ubiquitin in NF- κ B regulatory pathways. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 769–796 (2009).
- A. P. West, G. S. Shadel, S. Ghosh, Mitochondria in innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 389–402 (2011).
- M. S. Hayden, S. Ghosh, Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* **132**, 344–362 (2008).
- M. J. Bertrand, S. Milutinovic, K. M. Dickson, W. C. Ho, A. Boudreaux, J. Durkin, J. W. Gillard, J. B. Jaquith, S. J. Morris, P. A. Barker, cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol. Cell* **30**, 689–700 (2008).
- C. K. Ea, L. Deng, Z. P. Xia, G. Pineda, Z. J. Chen, Activation of IKK by TNF α requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol. Cell* **22**, 245–257 (2006).
- E. Varfolomeev, T. Goncharov, A. V. Fedorova, J. N. Dynek, K. Zobel, K. Deshayes, W. J. Fairbrother, D. Vucic, c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor α (TNF α)-induced NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* **283**, 24295–24299 (2008).
- A. Matsuzawa, P. H. Tseng, S. Vallabhapurapu, J. L. Luo, W. Zhang, H. Wang, D. A. Vignali, E. Gallagher, M. Karin, Essential cytoplasmic translocation of a cytokine receptor-assembled signaling complex. *Science* **321**, 663–668 (2008).
- L. Sun, L. Deng, C. K. Ea, Z. P. Xia, Z. J. Chen, The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol. Cell* **14**, 289–301 (2004).
- C. J. Wu, J. D. Ashwell, NEMO recognition of ubiquitinated Bcl10 is required for T cell receptor-mediated NF- κ B activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 3023–3028 (2008).
- H. Schmidt, C. Gelhaus, R. Lucius, M. Nebendahl, M. Leippe, O. Janssen, Enrichment and analysis of secretory lysosomes from lymphocyte populations. *BMC Immunol.* **10**, 41 (2009).
- L. Deng, C. Wang, E. Spencer, L. Yang, A. Braun, J. You, C. Slaughter, C. Pickart, Z. J. Chen, Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**, 351–361 (2000).
- G. Hu, Y. Wei, Y. Kang, The multifaceted role of MTDH/AEG-1 in cancer progression. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5615–5620 (2009).
- D. M. Brown, E. Ruoslahti, Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis. *Cancer Cell* **5**, 365–374 (2004).

RESEARCH ARTICLE

14. H. G. Sutherland, Y. W. Lam, S. Briers, A. I. Lamond, W. A. Bickmore, 3D3/lyric: A novel transmembrane protein of the endoplasmic reticulum and nuclear envelope, which is also present in the nucleolus. *Exp. Cell Res.* **294**, 94–105 (2004).
15. D. C. Kang, Z. Z. Su, D. Sarkar, L. Emdad, D. J. Volsky, P. B. Fisher, Cloning and characterization of HIV-1-inducible astrocyte elevated gene-1, AEG-1. *Gene* **353**, 8–15 (2005).
16. L. Emdad, D. Sarkar, Z. Z. Su, A. Randolph, H. Boukerche, K. Valerie, P. B. Fisher, Activation of the nuclear factor κ B pathway by astrocyte elevated gene-1: Implications for tumor progression and metastasis. *Cancer Res.* **66**, 1509–1516 (2006).
17. H. Häcker, P. H. Tseng, M. Karin, Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 457–468 (2011).
18. G. S. Hotamisligil, Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* **140**, 900–917 (2010).
19. O. Takeuchi, S. Akira, Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
20. A. M. Mabb, S. M. Wuerzberger-Davis, S. Miyamoto, PIASy mediates NEMO sumoylation and NF- κ B activation in response to genotoxic stress. *Nat. Cell Biol.* **8**, 986–993 (2006).
21. B. K. Yoo, L. Emdad, Z. Z. Su, A. Villanueva, D. Y. Chiang, N. D. Mukhopadhyay, A. S. Mills, S. Waxman, R. A. Fisher, J. M. Llovet, P. B. Fisher, D. Sarkar, Astrocyte elevated gene-1 regulates hepatocellular carcinoma development and progression. *J. Clin. Invest.* **119**, 465–477 (2009).
22. L. Song, W. Li, H. Zhang, W. Liao, T. Dai, C. Yu, X. Ding, L. Zhang, J. Li, Over-expression of AEG-1 significantly associates with tumour aggressiveness and poor prognosis in human non-small cell lung cancer. *J. Pathol.* **219**, 317–326 (2009).
23. L. Emdad, D. Sarkar, S. G. Lee, Z. Z. Su, B. K. Yoo, R. Dash, A. Yacoub, C. E. Fuller, K. Shah, P. Dent, J. N. Bruce, P. B. Fisher, Astrocyte elevated gene-1: A novel target for human glioma therapy. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 79–88 (2010).
24. G. Hu, R. A. Chong, Q. Yang, Y. Wei, M. A. Blanco, F. Li, M. Reiss, J. L. Au, B. G. Haffty, Y. Kang, *MTDH* activation by 8q22 genomic gain promotes chemoresistance and metastasis of poor-prognosis breast cancer. *Cancer Cell* **15**, 9–20 (2009).
25. X. Li, X. Kong, Q. Huo, H. Guo, S. Yan, C. Yuan, M. S. Moran, C. Shao, Q. Yang, Metadherin enhances the invasiveness of breast cancer cells by inducing epithelial to mesenchymal transition. *Cancer Sci.* **102**, 1151–1157 (2011).
26. S. K. Bhutia, T. P. Kegelman, S. K. Das, B. Azab, Z. Z. Su, S. G. Lee, D. Sarkar, P. B. Fisher, Astrocyte elevated gene-1 induces protective autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 22243–22248 (2010).
27. L. Emdad, S. G. Lee, Z. Z. Su, H. Y. Jeon, H. Boukerche, D. Sarkar, P. B. Fisher, Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) functions as an oncogene and regulates angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 21300–21305 (2009).
28. S. Carrasco, T. Meyer, STIM proteins and the endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 973–1000 (2011).
29. R. M. Luik, B. Wang, M. Prakriya, M. M. Wu, R. S. Lewis, Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature* **454**, 538–542 (2008).
30. K. Husnjak, I. Dikic, Ubiquitin-binding proteins: Decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 291–322 (2012).
31. D. L. Burdette, R. E. Vance, STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat. Immunol.* **14**, 19–26 (2013).
32. S. S. Vembar, J. L. Brodsky, One step at a time: Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 944–957 (2008).
33. N. Bidère, V. N. Ngo, J. Lee, C. Collins, L. Zheng, F. Wan, R. E. Davis, G. Lenz, D. E. Anderson, D. Arnoult, A. Vazquez, K. Sakai, J. Zhang, Z. Meng, T. D. Veenstra, L. M. Staudt, M. J. Lenardo, Casein kinase 1 α governs antigen-receptor-induced NF- κ B activation and human lymphoma cell survival. *Nature* **458**, 92–96 (2009).
34. G. Carvalho, A. Le Guelle, C. Demian, A. Vazquez, J. Gavard, N. Bidère, Interplay between BCL10, MALT1 and I κ B α during T-cell-receptor-mediated NF- κ B activation. *J. Cell Sci.* **123**, 2375–2380 (2010).
35. D. Arnoult, F. Soares, I. Tattoli, C. Castanier, D. J. Philpott, S. E. Girardin, An N-terminal addressing sequence targets NLRX1 to the mitochondrial matrix. *J. Cell Sci.* **122**, 3161–3168 (2009).
36. A. Oeckinghaus, E. Wegener, V. Welteke, U. Ferch, S. C. Arslan, J. Ruland, C. Scheidereit, D. Krappmann, Malt1 ubiquitination triggers NF- κ B signaling upon T-cell activation. *EMBO J.* **26**, 4634–4645 (2007).

Acknowledgments: We thank C. Demian, F. Dumetz, and A. Brisson for technical assistance. **Funding:** This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche Jeunes Chercheuses Jeunes Chercheurs, Fondation de France, Association pour la Recherche contre le Cancer, and Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée) and by a Marie Curie Grant. G.C. and E.M.H. are supported by fellowships from la Ligue contre le Cancer, and J.D. is supported by the Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales. **Author contributions:** C.A., K.P., G.C., N.Z., J.D., S.M.D., E.M.H., N.C., S.S.S., C.C., A.L.G., L.W., Y.K., A.V., D.A., and N.B. designed and performed the experiments and analyzed the data; D.A. and N.B. wrote the manuscript with input from J.G.; and all authors discussed the results. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests.

Submitted 8 July 2013
Accepted 16 August 2013
Final Publication 3 September 2013
10.1126/scisignal.2004496

Citation: C. Alexia, K. Poalas, G. Carvalho, N. Zemirli, J. Dwyer, S. M. Dubois, E. M. Hatchi, N. Cordeiro, S. S. Smith, C. Castanier, A. Le Guelle, L. Wan, Y. Kang, A. Vazquez, J. Gavard, D. Arnoult, N. Bidère, The endoplasmic reticulum acts as a platform for ubiquitylated components of nuclear factor κ B signaling. *Sci. Signal.* **6**, ra79 (2013).

Annexe II

Participation of the cell polarity protein PALS1 to T-cell receptor-mediated NF- κ B activation

Carvalho G, Poalas K, Demian C, Hatchi E, Vazquez A, Bidère N.

PLoS One. 2011 Mar 30;6(3):e18159. doi: 10.1371/journal.pone.0018159.

Participation of the Cell Polarity Protein PALS1 to T-Cell Receptor-Mediated NF- κ B Activation

Gabrielle Carvalho^{1,2}, Konstantinos Poalas^{1,2}, Catherine Demian^{1,2}, Emeline Hatchi^{1,2}, Aimé Vazquez^{1,2}, Nicolas Bidère^{1,2*}

¹ INSERM, UMR_S 1014, Hôpital Paul Brousse, Villejuif 94800, France, ² Université Paris-Sud P11, Orsay 91400, France

Abstract

Background: Beside their established function in shaping cell architecture, some cell polarity proteins were proposed to participate to lymphocyte migration, homing, scanning, as well as activation following antigen receptor stimulation. Although PALS1 is a central component of the cell polarity network, its expression and function in lymphocytes remains unknown. Here we investigated whether PALS1 is present in T cells and whether it contributes to T Cell-Receptor (TCR)-mediated activation.

Methodology/Principal Findings: By combining RT-PCR and immunoblot assays, we found that PALS1 is constitutively expressed in human T lymphocytes as well as in Jurkat T cells. siRNA-based knockdown of PALS1 hampered TCR-induced activation and optimal proliferation of lymphocyte. We further provide evidence that PALS1 depletion selectively hindered TCR-driven activation of the transcription factor NF- κ B.

Conclusions: The cell polarity protein PALS1 is expressed in T lymphocytes and participates to the optimal activation of NF- κ B following TCR stimulation.

Citation: Carvalho G, Poalas K, Demian C, Hatchi E, Vazquez A, et al. (2011) Participation of the Cell Polarity Protein PALS1 to T-Cell Receptor-Mediated NF- κ B Activation. PLoS ONE 6(3): e18159. doi:10.1371/journal.pone.0018159

Editor: Jean Kanellopoulos, University Paris Sud, France

Received: December 17, 2010; **Accepted:** February 21, 2011; **Published:** March 30, 2011

Copyright: © 2011 Carvalho et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from ANR, Fondation de France, Association pour la Recherche contre le Cancer, Université Paris Sud, and Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée). GC is supported by a post-doctoral fellowship from la Ligue contre le Cancer. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: nicolas.bidere@inserm.fr

Introduction

Establishment and maintenance of cell polarity is chiefly orchestrated by a tightly regulated interplay between three multi-protein complexes: i) Scribble (SCRIB)/Discs Large (Dlg1)/Lethal giant larvae (Lgl) complex, ii) partitioning-defective (PAR) 3 and PAR6/ atypical protein kinase C (aPKC) complex, and iii) Crumbs (CRB)/ Protein Associated with Lin Seven 1 (PALS1)/ PALS1-associated tight junction protein (PATJ) complex [1,2]. However, each complex is not exclusive, as PAR6 links PALS1 to PAR3/PAR6/aPKC [3]. In T lymphocytes, cell polarity proteins were shown to partition the leading edge from the uropod at the cell rear, and therefore participate to cell migration, homing, and scanning [4,5,6]. In addition, SCRIB and Dlg1 are transiently recruited to the nascent immunological synapse formed with an antigen-presenting-cell (APC) [4]. Their depletion in lymphocytes has been associated with an alteration of antigen receptor-mediated activation [7,8,9,10].

The adaptor PALS1 is crucial for cellular architecture as it maintains the apico-basal polarity in epithelial cells and authorizes indirect interactions between CRB and PATJ [11,12]. Interestingly, Dlg1 and PALS1 share a COOH-terminal part composed of a PSD-95/Dlg/ZO-1 (PDZ) domain followed by an SH3 domain adjacent to an inactive Guanylate kinase (GK) homology region [2]. This unique sequence of PDZ/SH3/GK defines the so-called

membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) proteins family, a group of molecules that serve as scaffolds to organize multi-protein signalosomes through their protein-protein interaction domains [13]. For example, the MAGUK-containing CARMA1 emerges as a central regulator of lymphocytes activation and proliferation downstream of antigen receptor stimulation [14]. Indeed, CARMA1 operates as scaffold to recruit the heterodimer BCL10/MALT1 (CBM complex), a key step for conveying NF- κ B signaling [14,15,16]. In addition to its established role in polarity, Dlg1 was shown to modulate lymphocyte proliferation upon T-cell receptor ligation, possibly through p38 recruitment or via the transcription factor NF-AT [9,10,17,18].

Although the MAGUK PALS1 plays a central role in the establishment of cell polarity, its contribution to lymphocyte activation remains elusive [8]. Here we show that PALS1 mRNA and protein is expressed in human lymphocytes. Furthermore, knocking down of PALS1 with small interfering RNAs (siRNAs) led to a decreased proliferation of human T lymphocytes, resulting from a reduced activation of the transcription factor NF- κ B.

Results and Discussion

PALS1 expression in T lymphocytes

Although several cell polarity proteins have been characterized in lymphocytes [4,5], PALS1 expression in T cells remains to be

determined [8]. To address this question, we first performed RT-PCR analysis on resting human CD3⁺ T cells and Jurkat lymphocytes extracts, and detected mRNA for PALS1 (Figure 1A). These mRNA were efficiently translated into protein, as antibodies against PALS1 detected a band, which was absent from PALS1-siRNA transfected primary T lymphocytes lysates (Figure 1B). Similar results were obtained with Jurkat T cells (Figure 1B). Of note, PALS1 levels remained unchanged in cells stimulated with antibodies to CD3 and CD28, or with PMA and ionomycin (Figure 1C). We next investigated PALS1 subcellular location by confocal microscopy. In contrast to epithelial cells where it accumulates to tight junctions [12], PALS1 did not reach membrane domains and remains essentially cytosolic with punctuate structures. Additional staining revealed

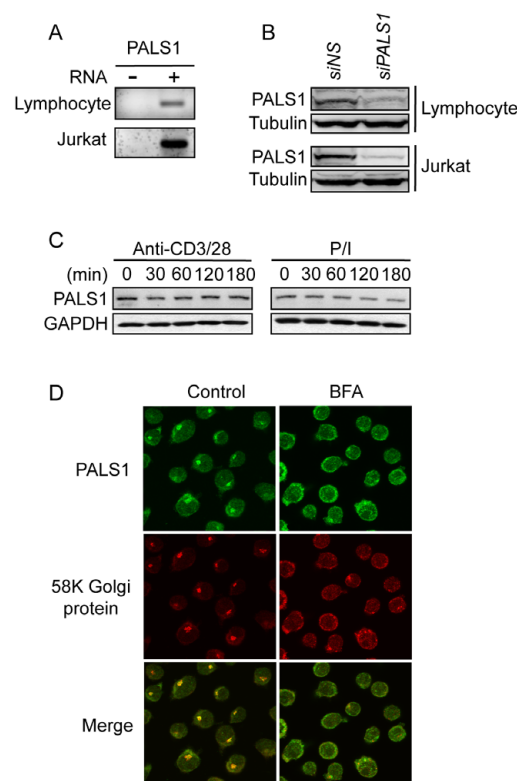


Figure 1. Expression of the cell polarity protein PALS1 in human T lymphocytes. **A**, Analysis of PALS1 mRNA in primary human T lymphocytes, and Jurkat cell line by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). **B**, Immunoblot analysis of PALS1 in cell lysates from human T lymphocytes and from Jurkat cells. The specificity of PALS1 antibodies was validated with lysates from cells transfected with siRNA against PALS1. Tubulin was used as a loading control. **C**, Immunoblot analysis of cell extracts from Jurkat cells stimulated as indicated with 1 μ g/ml⁻¹ anti-CD3 and anti-CD28, or with 40 ng/ml⁻¹ PMA together with 300 ng/ml⁻¹ ionomycin (P/I). GAPDH served as a loading control. **D**, Confocal microscopy pictures of PALS1 and 58K Golgi protein in Jurkat T lymphocytes either untreated or incubated with 10 μ g/ml⁻¹ Brefeldin A (BFA). doi:10.1371/journal.pone.0018159.g001

that these structures coalesced with the Golgi apparatus (Figure 1D and Figure S1). Accordingly, Brefeldin A-triggered disassembly of the Golgi apparatus also disrupted PALS1 punctuate structures (Figure 1D). This is reminiscent of PALS1 relocation to the Golgi apparatus in cells infected with SARS coronavirus [19]. Last, we observed that TCR-mediated stimulation only promoted a discrete redistribution of PALS1 within the cytosol of Jurkat cells (Figure S1). Altogether, our results suggest that similarly to Dlg1, SCRIB, CRB3, and PKC ζ [4,5], the cell polarity protein PALS1 is expressed in lymphocytes at both mRNA and protein level.

Requirement of PALS1 for optimal T cell activation and proliferation

Because SCRIB and Dlg1 were proposed to modulate lymphocyte proliferation [7,8,9,10], we evaluated whether PALS1 might also participate to T cell activation. To this end, peripheral blood lymphocytes (PBL) were purified on Ficoll-isopaque gradients. Primary human T cells were nucleofected for three days with siRNA targeting PALS1, prior stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. PALS1 knockdown led to a significant decrease in TCR-mediated induction of the activation markers CD69 and CD25 on cell surface (Figure 2A, B). This was accompanied by a reduction in Carboxyfluorescein Succinimide Ester (CFSE) dilution, which reflects cell proliferation (Figure 2C). Collectively, these data suggest that PALS1 participates to the optimal lymphocyte activation and subsequent proliferation upon TCR stimulation.

Role of PALS1 in TCR-mediated signaling

To further explore how PALS1 impacts on lymphocyte proliferation, early signaling pathways emanating from the TCR were examined in Jurkat cells transfected with PALS1 siRNA. We did not detect major alteration in the general pattern of tyrosine phosphorylation, or mitogen-activated protein kinase (MAPK) extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 phosphorylation upon TCR stimulation (Figure 3A). Only a slight but consistent increase in TCR-mediated phosphorylation of p38 was noted (Figure 3A). Moreover, CD3-induced calcium mobilization was largely normal in PALS1-knockdown Jurkat cells (Figure 3B).

We next analyzed TCR-mediated activation of NF-AT and NF- κ B transcription factors. siRNA-treated Jurkat T cells were co-transfected with firefly luciferase constructs driven by NF-AT or NF- κ B binding sequences and with a renilla luciferase control. PALS1 knockdown had only a marginal effect on NF-AT activity following stimulation with PMA and ionomycin, or with antibodies to CD3 and CD28 (Figure 3C and Figure S2). In sharp contrast, NF- κ B activity was significantly reduced without PALS1 (Figure 3D). Interestingly, tumor necrosis factor- α (TNF α)-induced NF- κ B activation remained essentially unaffected, underscoring the selective involvement of PALS1 in the TCR-NF- κ B pathway (Figure S3). Altogether, our data unveiled an unexpected role for PALS1 in TCR-mediated NF- κ B activation.

PALS1 participates to the optimal activation of NF- κ B upon TCR stimulation

To gain insights on how PALS1 modulate NF- κ B, we first investigated the transcription factor binding ability by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Less NF- κ B bound to its specific probe in nuclei extracts from PALS1-siRNA transfected cells following TCR stimulation (Figure 4A). As expected, Oct-1 binding remained unchanged without PALS1. Consistent with a diminished NF- κ B activity, both the phosphorylation and

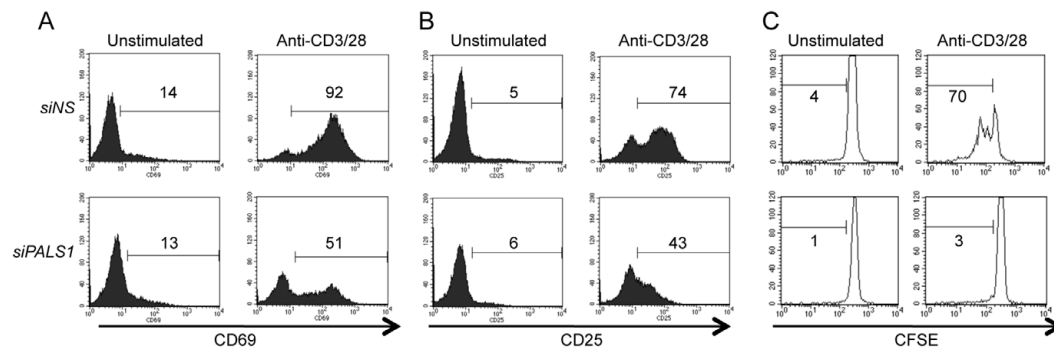


Figure 2. PALS1 requirement for optimal activation and proliferation in lymphocytes. **A** and **B**, Human peripheral blood T lymphocytes were transfected with siRNA for *PALS1* or nonspecific (*NS*) siRNA. Three days later, cells were stimulated with $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ anti-CD3 and anti-CD28. CD69 and CD25 induction at the cell surface were examined 6 hours and 16 hours post-stimulation, respectively. **C**, Cells as in (**A**) were loaded with Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE), and stimulated with $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ anti-CD3 and anti-CD28 for 72 hours. The percentage of CD69- and CD25-positive cells, and of dividing cells, is shown. These data are representative of four independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0018159.g002

subsequent proteasomal degradation of NF- κ B inhibitor, I κ B α , were severely decreased in the absence of PALS1 (Figure 4B). Because TCR-induced NF- κ B activation relies on the assembly of the CBM complex [15], BCL10 was immunoprecipitated from nonspecific (*NS*-) and *PALS1*-siRNA transfected Jurkat cells. MALT1, which forms a heterodimer with BCL10, coprecipitated with BCL10 regardless of stimulation. Although PALS1 was not found bound to BCL10, its absence diminished CARMA1 recruitment (Figure 4C, and data not shown). Hence, our data suggest that PALS1 participates to the optimal translocation and activation of NF- κ B upon TCR stimulation, possibly by favoring the CBM assembly.

Role of PALS1-associated proteins during TCR-mediated NF- κ B

Since PALS1 nucleates a ternary complex containing CRB3 and PATJ, and further binds PAR6 to maintain cell polarity [3,20,21], their contribution to TCR-mediated NF- κ B was evaluated. Similarly to PALS1, mRNA for PATJ, CRB3, PAR6, were efficiently detected by RT-PCR (Figure 5A). The same hold true for the unrelated cell polarity protein SCRIB (Figure 5A). siRNA-based knockdown of PALS1 and CRB3 significantly decreased NF- κ B activation in cells treated by antibodies against CD3 and CD28, or with a mixture of PMA and ionomycin. Although less dramatic, similar results were observed with PAR6 or PATJ knockdown. By contrast, NF- κ B was normally activated in the absence of SCRIB (Figure 5B). In agreement, I κ B α phosphorylation was diminished in lysates from CRB3-depleted cells, and to a lesser extent from PATJ- or PAR6-siRNA transfected cells, and not from SCRIB-depleted cells. Again, ERK phosphorylation occurred normally (Figure 5C, D, E, and F). Altogether, our data suggest that PALS1 implication in the TCR-NF- κ B pathway is inextricably linked to its cell polarity partners.

In summary, our data show that the cell polarity protein PALS1 is expressed in lymphocytes and contributes to their optimal activation. Although Dlg1 and SCRIB were proposed to modulate NF-AT or p38 [9,10,17,18] and NF-AT [7] respectively, a distinct scenario likely occurs for PALS1. Our results support a model in which PALS1 participates to NF- κ B activation, upstream of I κ B α phosphorylation and degradation. However, how precisely PALS1 modulates NF- κ B remains unclear. Because MAGUK function as scaffold units to organize and integrate multi-molecular

signaling complexes [13], it is tempting to speculate that PALS1 nucleates its own signalosome. For example, CARMA1 anchors a >900 kDa complex including the heterodimer BCL10/MALT1 [22], and Dlg1 was reported to bind to Lck, Zap70, Wasp [17], and p38 [10]. In our hands, PALS1 did not integrate the CBM, but its absence reduced CARMA1 binding to BCL10. It will therefore be interesting to identify PALS1 partners in the context of lymphocyte activation. In line with this, CRB3, PATJ and PAR6, which all bound PALS1 to maintain cell polarity [2], also participate to NF- κ B signaling upon TCR ligation in lymphocytes, and might therefore complex with PALS1 in lymphocytes. Altogether, our results strengthen the unexpected function of cell polarity proteins in lymphocyte proliferation [7,8,9,10], and unveil an original role for PALS1 during TCR-mediated NF- κ B activation.

Materials and Methods

Cell culture and reagents

Jurkat T cells E6.1 were purchased from ATCC. CD3⁺ human T lymphocytes from healthy donors (Etablissement Francais du Sang) were isolated with the MidiMac system (Miltenyi Biotec). Cells were activated with a mixture of soluble anti-CD3 ϵ (HIT3a, BD Biosciences) and anti-CD28 (BD Biosciences), or with 20–40 ng $\cdot\text{ml}^{-1}$ phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma) and 300 ng $\cdot\text{ml}^{-1}$ ionomycin (Calbiochem). Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) and Brefeldin A were purchased from Sigma, and the calcium-sensitive dye Fluo-4 was from Invitrogen.

Cell lysates preparation, immunoprecipitations, and immunoblots

Cells were washed twice with PBS 1X and lysed with 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Igepal, 2 mM EDTA, supplemented with complete protease inhibitors (Roche). Lysates were cleared by a centrifugation at 10,000g at 4°C, and protein concentration determined (micro BCA kit, Pierce). Samples were resolved on 5–20% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham). For immunoprecipitations, samples were precleared with protein G-sepharose beads (Roche) for 30 min prior to overnight incubation with antibodies and additional protein G-sepharose beads at 4°C, as previously

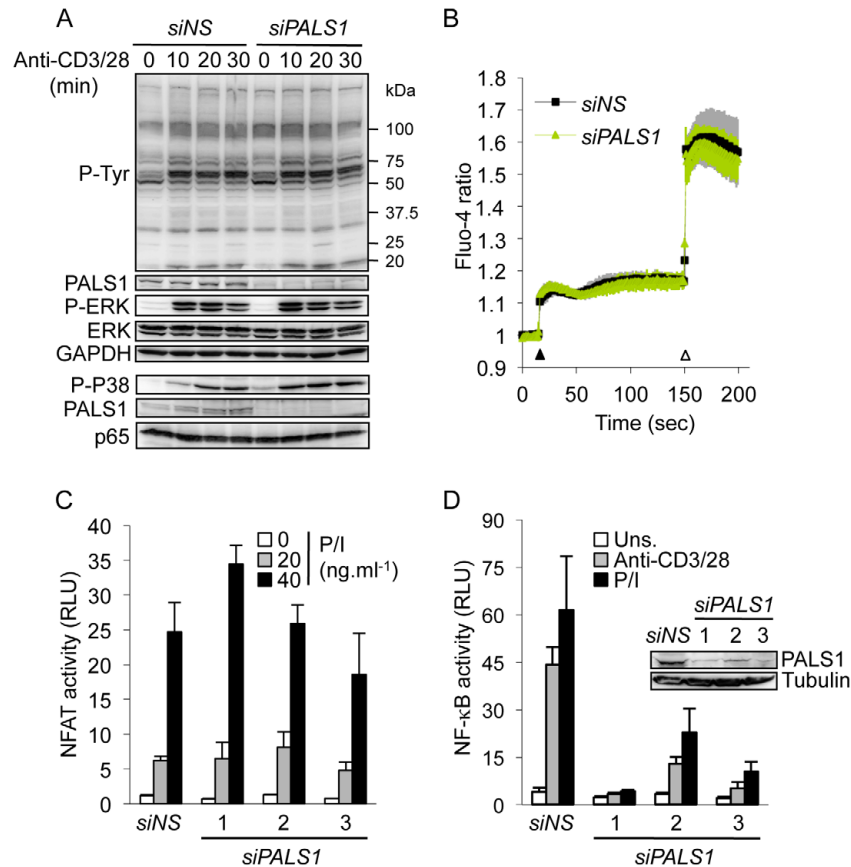


Figure 3. Role of PALS1 on early TCR-mediated signaling. **A**, Jurkat cells were transfected with nonspecific (NS)- and PALS1-siRNA, and left three days prior stimulation with $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ anti-CD3 and anti-CD28 for 0, 10, 20, and 30 min. Cell lysates were prepared and immunoblots were performed as indicated. GAPDH, and p65 served as loading controls. Five other experiments provided same results. **B**, NS- and PALS1-siRNA transfected Jurkat cells were loaded with the calcium-sensitive dye Fluo-4 and stimulated with $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ anti-CD3 (closed symbol), or with $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ionomycin (open symbol). Shown is the mean $\pm$ s.d. of triplicate measurements (one out of two independent experiments). **C**, **D**, Jurkat lymphocytes were transfected with NS- or with three individual siRNA sequences targeting PALS1. After three days, cells were co-transfected with siRNA and with NFAT or NF- κ B firefly luciferase reporter gene together with a control Renilla plasmid for an additional 24 hours. Cells were then stimulated with 20 or 40 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ PMA and 300 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ionomycin (P/I), or $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ anti-CD3 and anti-CD28. Histograms represent the mean $\pm$ s.d. of triplicate experiments. RLU, relative light units. The inset immunoblot shows the level of PALS1 knockdown. Data shown are representative of at least five independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0018159.g003

described [23]. Antibodies to BCL10 (A-6), I κ B α (C-21), MALT1 (B-12), Tubulin (TU-02), PALS1 (H-250), SCRIB (C-6), PAR6 (G-9) and p65 (C-20) were purchased from Santa Cruz. Phospho-specific antibodies against I κ B α , ERK, p38, and antibodies to CARMA1 and to ERK were from Cell Signaling Technologies. Anti-phosphorylated Tyrosine (4G10, Millipore), anti-GAPDH (Sigma), and Immobilon (Millipore) chemiluminescent substrates were also used.

Luciferase assays

Firefly luciferase constructs downstream of promoters for NF- κ B or NF-AT were co-transfected with renilla luciferase pRL-TK (Int⁺) plasmid (Promega). Luciferase activities were analyzed using the Dual-Luciferase Kit (Promega), with firefly fluorescence units

normalized to renilla luciferase fluorescence units (BMG microplate reader).

siRNA and transfections

All siRNA used were from Invitrogen (Stealth). PALS1.1, 5'-CCAAGGAAACAGUAAUCCAUUGUAAA-3'; PALS1.2, 5'-GAGGAGAUUCUUAACCUAUGAGGAAA-3'; PALS1.3, 5'-CAG-AACAAUGGCCACUACUUUGAUA-3'; CRB3, 5'-CCAUCACUGCUAUCACUGGUGUCU-3'; PATJ, 5'-GCAUGAAU-UUCUGACUCCUAGAUUG-3'; SCRIB, 5'-UGGGAGGCAA-CGAUCUGGAAGUGCU-3'; PAR6 5'-GAGCGGGUCCAG-GAAUCUUCUUCU-3'. Jurkat cells were transfected by electroporation with a BTX ECM 830 apparatus (BTX, Harvard Apparatus), as previously described [16]. For primary cells, PBL

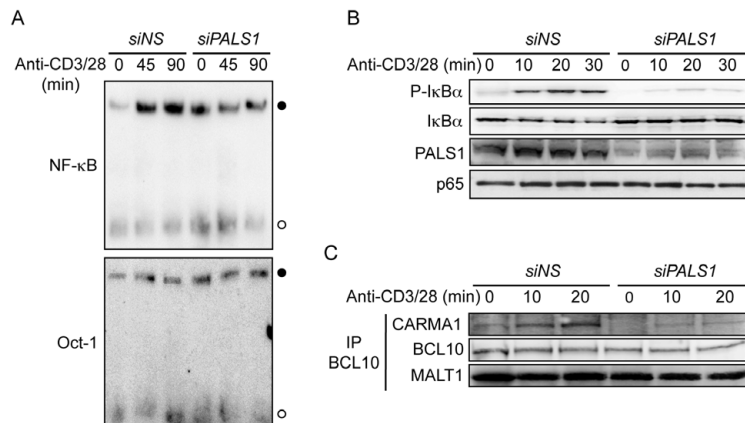


Figure 4. Involvement of PALS1 in TCR-mediated activation of NF- κ B. **A**, Jurkat cells were transfected with nonspecific (NS)- and PALS1-siRNA. Three days later, cells were stimulated with $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ anti-CD3 and anti-CD28 for 0, 45, and 90 min. Nuclear extracts were prepared to analyze the binding of NF- κ B and Oct-1 by electrophoretic mobility shift assays (EMSA) with specific probes (closed circles). Free probe is also indicated (open circles). **B**, Cells as in (A) were stimulated with $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ anti-CD3 and anti-CD28 for 0, 10, 20, and 30 min. Cell extracts were prepared and immunoblots were performed as indicated. **C**, Cells as in (A) were stimulated with $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ anti-CD3 and anti-CD28 for 0, 10, 20 min. BCL10 was immunoprecipitated (IP) from cell lysates, and the binding of CARMA1, and MALT1 was assessed by immunoblot. Data shown are representative of at least three independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0018159.g004

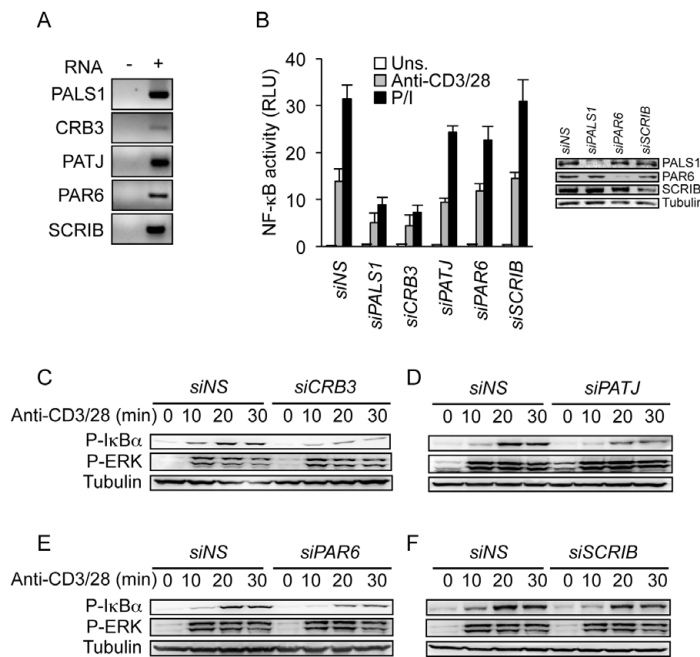


Figure 5. Role of PALS1 cell polarity partners in NF- κ B signaling. **A**, Expression of cell polarity proteins PALS1, CRB3, PATJ, PAR6, and SCRIB by RT-PCR in Jurkat T lymphocytes. **B**, Jurkat were transfected with nonspecific (NS)-, CRB3-, PAR6-, PATJ- and SCRIB-siRNA. After three days, cells were then co-transfected with siRNA and with NF- κ B firefly luciferase reporter gene together with a control Renilla plasmid. 24 hours later, cells were stimulated with $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ anti-CD3/CD28 or with $20 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ PMA and $300 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ionomycin (P/I). Shown is the mean $\pm$ s.d. of triplicate experiments. RLU, relative light units. **C–F**, Immunoblots as indicated of NS-, CRB3-, PAR6-, PATJ- and SCRIB-siRNA transfected Jurkat cells stimulated with $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ anti-CD3 and anti-CD28 for 0, 10, 20, and 30 min. Data shown are representative of three independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0018159.g005

were purified from blood on Ficoll-isopaque gradients. PBL were nucleofected with the Nucleofactor system and T cell solution (Ammax, program U14), and left for three days in culture medium prior treatment.

Nuclear protein extraction and electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

4 μ g of nuclear extracts from Jurkat cells were examined for NF- κ B- and Oct1-binding activity by electromobility shift assay (Panomics kit). Samples were resolved on a 6% native polyacrylamide DNA retardation gel in 0.5X TBE buffer and analyzed using a FUJI LA4000 system.

Reverse transcriptase PCR

2 μ g of total RNA from purified human blood T cells or Jurkat were used for the RT-PCR reactions (RNeasy and OneStep kits, Qiagen). Primers were designed as follows: PALS1: Forward (F), 5'-CTCCTTCATGCAACAGACCA-3' and Backward (B), 5'-CACTTTTACTGGCCACGAT-3'; CRB3: F, 5'-CACCT-GCTCCTCGCTACTG-3' and B, 5'-CACTGTTTGGCCTT-CATCCA-3'; PATJ: F, 5'-CAACGAGCATCCTGACTGAA-3' and B, 5'-GGCGTGGTTGTGAGGACTAT-3'; PAR6: F, 5'-GTTGCCAACAGCCATAACCT-3' and B, 5'-CAGGT-CACTGCTGTCATCGT-3'; SCRIB: F, 5'-CGCAAGGACA-CACCTCACTA-3' and B, 5'-CCTCCTCCTGAGGAC-TACCC-3'.

Confocal microscopy

Cells were left for 10 min on poly-lysine coated slides (Thermo Scientific) prior fixation with PBS1X containing 4% paraformaldehyde. For TCR crosslinking experiments, cells were incubated with 5 μ g.ml⁻¹ anti-CD3 at 4°C for 15 min. After two washes, cells were incubated with 5 μ g.ml⁻¹ of goat anti-mouse (Jackson) for 20 min either at 4°C or 37°C. To disassemble Golgi apparatus, cells were treated with 10 μ g.ml⁻¹ Brefeldin A for 60 min. Samples were permeabilized with 0.05% Triton-X100 in PBS1X for 5 min, and non-specific sites blocked with 10% FCS in PBS1X. Antibodies used were: PALS1 (Millipore), 58K Golgi (Abcam), Alexa-488 conjugated goat anti-rabbit IgG or Alexa-594 conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen). Samples were analyzed using a Leica confocal microscope SP6.

Cell surface staining

Cells were incubated for 30 min at 4°C with FITC- and PE-conjugated antibodies against CD25 and CD69 (ImmunoTools)

References

1. Iden S, Collard JG (2008) Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 846–859.
2. Assemet E, Bazellieres E, Palesi-Pocachard E, Le Bivic A, Massey-Harroche D (2008) Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta* 1778: 614–630.
3. Hurd TW, Gao L, Roh MH, Macara IG, Margolis B (2003) Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol* 5: 137–142.
4. Ludford-Menting MJ, Oliaro J, Sacirbegovic F, Cheah ET, Pedersen N, et al. (2005) A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation. *Immunity* 22: 737–748.
5. Real E, Faure S, Donnadieu E, Delon J (2007) Cutting edge: Atypical PKCs regulate T lymphocyte polarity and scanning behavior. *J Immunol* 179: 5649–5652.
6. Hawkins ED, Russell SM (2008) Upsides and downsides to polarity and asymmetric cell division in leukemia. *Oncogene* 27: 7003–7017.
7. Arpin-Andre C, Mesnard JM (2007) The PDZ domain-binding motif of the human T cell leukemia virus type 1 tax protein induces mislocalization of the tumor suppressor hScrib in T cells. *J Biol Chem* 282: 33132–33141.

and the respective isotype controls in PBS containing 0.5% BSA. After one wash with ice-cold PBS-BSA, cells were analyzed by flow cytometry with a FACSCalibur (BD Biosciences).

Supporting Information

Figure S1 Impact of stimulation on PALS1 subcellular location. A, Jurkat were stimulated 30 min with 40 ng.ml⁻¹ PMA and 300 ng.ml⁻¹ ionomycin. Shown are confocal microscopy pictures of PALS1 and 58K golgi protein. B, CD3 was crosslinked at the plasma membrane of Jurkat cells either at 4 or 37°C for 20 min. Micrographs show double staining for CD3 and PALS1. (EPS)

Figure S2 PALS1 is dispensable for TCR-mediated NF-AT activation. Jurkat lymphocytes were transfected with NS- or with PALS1-siRNA. After three days, cells were co-transfected with siRNA and with NF-AT firefly luciferase reporter gene together with a control Renilla plasmid for an additional 24 hours. Cells were then stimulated with 20 ng.ml⁻¹ PMA and 300 ng.ml⁻¹ ionomycin (P/I), or with 1 μ g.ml⁻¹ anti-CD3 and anti-CD28. Histograms represent the mean $\pm$ s.d. of triplicate experiments. RLU, relative light units. (EPS)

Figure S3 Role of PALS1 cell polarity partners on TNF α -induced NF- κ B activation. A, Jurkat were transfected with nonspecific (NS)-, PALS1-, CRB3-, PAR6-, and PATJ-siRNA for three days. Cells were then co-transfected with siRNA and with NF- κ B firefly luciferase reporter gene together with a control Renilla plasmid. 24 hours later, cells were stimulated with 10 ng.ml⁻¹ TNF α for 6 hours. Shown is the mean $\pm$ s.d. of triplicate experiments. RLU, relative light units. (EPS)

Acknowledgments

We thank D. Arnoult and J. Gavard for helpful discussions and critical reading of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GC NB. Performed the experiments: GC CD KP EH NB. Analyzed the data: GC CD KP EH AV NB. Wrote the paper: GC NB.

15. Thome M, Charton JE, Pelzer C, Hailfinger S (2010) Antigen receptor signaling to NF- κ B via CARMA1, BCL10, and MALT1. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a003004.
16. Carvalho G, Le Guelte A, Demian C, Vazquez A, Gavard J, et al. (2010) Interplay between BCL10, MALT1 and IkappaBalpha during T-cell-receptor-mediated NFkappaB activation. *J Cell Sci* 123: 2375–2380.
17. Round JL, Tomassian T, Zhang M, Patel V, Schoenberger SP, et al. (2005) Dlg1 coordinates actin polymerization, synaptic T cell receptor and lipid raft aggregation, and effector function in T cells. *J Exp Med* 201: 419–430.
18. Xavier R, Rabizadeh S, Ishiguro K, Andre N, Ortiz JB, et al. (2004) Discs large (Dlg1) complexes in lymphocyte activation. *J Cell Biol* 166: 173–178.
19. Teoh KT, Siu YL, Chan WL, Schluter MA, Liu CJ, et al. (2010) The SARS coronavirus E protein interacts with PALS1 and alters tight junction formation and epithelial morphogenesis. *Mol Biol Cell* 21: 3838–3852.
20. Shin K, Straight S, Margolis B (2005) PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Biol* 168: 705–711.
21. Roh MH, Fan S, Liu CJ, Margolis B (2003) The Crumbs3-Pals1 complex participates in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Sci* 116: 2895–2906.
22. Oeckinghaus A, Wegener E, Welteke V, Ferch U, Arslan SC, et al. (2007) Malt1 ubiquitination triggers NF- κ B signaling upon T-cell activation. *EMBO J* 26: 4634–4645.
23. Bidere N, Ngo VN, Lee J, Collins C, Zheng L, et al. (2009) Casein kinase 1alpha governs antigen-receptor-induced NF- κ B activation and human lymphoma cell survival. *Nature* 458: 92–96.

Bibliographie

1. Sen, R. and Baltimore, D., *Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences*. Cell, 1986. **46**(5): p. 705-16.
2. Sen, R. and Baltimore, D., *Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism*, in Cell. 1986. p. 921-8.
3. Baeuerle, P.A., Lenardo, M., Pierce, J.W. and Baltimore, D., *Phorbol-ester-induced activation of the NF-kappa B transcription factor involves dissociation of an apparently cytoplasmic NF-kappa B/inhibitor complex*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1988. **53 Pt 2**: p. 789-98.
4. Baeuerle, P.A. and Baltimore, D., *NF-kappa B: ten years after*. Cell, 1996. **87**(1): p. 13-20.
5. Baeuerle, P.A. and Baltimore, D., *Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor*. Cell, 1988. **53**(2): p. 211-7.
6. Baeuerle, P.A. and Baltimore, D., *I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor*. Science, 1988. **242**(4878): p. 540-6.
7. Baeuerle, P.A. and Baltimore, D., *A 65-kappaD subunit of active NF-kappaB is required for inhibition of NF-kappaB by I kappaB*. Genes Dev, 1989. **3**(11): p. 1689-98.
8. Ghosh, S., Gifford, A.M., Riviere, L.R., Tempst, P., Nolan, G.P. and Baltimore, D., *Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF-kappa B: homology to rel and dorsal*. Cell, 1990. **62**(5): p. 1019-29.
9. Bose, H.R., Jr., *The Rel family: models for transcriptional regulation and oncogenic transformation*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1114**(1): p. 1-17.
10. Schmid, R.M., Perkins, N.D., Duckett, C.S., Andrews, P.C. and Nabel, G.J., *Cloning of an NF-kappa B subunit which stimulates HIV transcription in synergy with p65*. Nature, 1991. **352**(6337): p. 733-6.
11. Ryseck, R.P., Bull, P., Takamiya, M., Bours, V., Siebenlist, U., Dobrzanski, P. and Bravo, R., *RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF-kappa B*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(2): p. 674-84.
12. Northrop, J.P., Ho, S.N., Chen, L., Thomas, D.J., Timmerman, L.A., Nolan, G.P., Admon, A. and Crabtree, G.R., *NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation*. Nature, 1994. **369**(6480): p. 497-502.
13. Nolan, G.P., *NF-AT-AP-1 and Rel-bZIP: hybrid vigor and binding under the influence*. Cell, 1994. **77**(6): p. 795-8.
14. Hayden, M.S. and Ghosh, S., *NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions*. Genes Dev, 2012. **26**(3): p. 203-34.
15. Hayden, M.S. and Ghosh, S., *Shared principles in NF-kappaB signaling*. Cell, 2008. **132**(3): p. 344-62.
16. Kaileh, M. and Sen, R., *NF-kappaB function in B lymphocytes*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 254-71.
17. Staudt, L.M., *Oncogenic activation of NF-kappaB*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(6): p. a000109.
18. Courtois, G. and Gilmore, T.D., *Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6831-43.
19. Sun, S.C. and Liu, Z.G., *A special issue on NF-kappaB signaling and function*. Cell Res, 2011. **21**(1): p. 1-2.
20. Perkins, N.D. and Gilmore, T.D., *Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 759-72.
21. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6853-66.
22. Karin, M., *Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 431-6.
23. Baltimore, D., *NF-kappaB is 25*. Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 683-5.
24. Matsuda, A., Suzuki, Y., Honda, G., Muramatsu, S., Matsuzaki, O., Nagano, Y., Doi, T., Shimotohno, K., Harada, T., Nishida, E., Hayashi, H. and Sugano, S., *Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways*. Oncogene, 2003. **22**(21): p. 3307-18.

25. Hoffmann, A. and Baltimore, D., *Circuitry of nuclear factor kappaB signaling*. Immunol Rev, 2006. **210**: p. 171-86.
26. Perkins, N.D., *The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(2): p. 121-32.
27. Chen, L.F. and Greene, W.C., *Shaping the nuclear action of NF-kappaB*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(5): p. 392-401.
28. Schmitz, M.L., Stelzer, G., Altmann, H., Meisterernst, M. and Baeuerle, P.A., *Interaction of the COOH-terminal transactivation domain of p65 NF-kappa B with TATA-binding protein, transcription factor IIB, and coactivators*. J Biol Chem, 1995. **270**(13): p. 7219-26.
29. Perkins, N.D., Felzien, L.K., Betts, J.C., Leung, K., Beach, D.H. and Nabel, G.J., *Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator*. Science, 1997. **275**(5299): p. 523-7.
30. O'Shea, J.M. and Perkins, N.D., *Regulation of the RelA (p65) transactivation domain*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 4): p. 603-8.
31. Schmitz, M.L. and Baeuerle, P.A., *The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B*. EMBO J, 1991. **10**(12): p. 3805-17.
32. Grossmann, M., Nakamura, Y., Grumont, R. and Gerondakis, S., *New insights into the roles of Rel/NF-kappa B transcription factors in immune function, hemopoiesis and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(10): p. 1209-19.
33. Beg, A.A. and Baltimore, D., *An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death*. Science, 1996. **274**(5288): p. 782-4.
34. Chen, X., Kandasamy, K. and Srivastava, R.K., *Differential roles of RelA (p65) and c-Rel subunits of nuclear factor kappa B in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling*. Cancer Res, 2003. **63**(5): p. 1059-66.
35. Gapuzan, M.E., Schmeh, O., Pollock, A.D., Hoffmann, A. and Gilmore, T.D., *Immortalized fibroblasts from NF-kappaB RelA knockout mice show phenotypic heterogeneity and maintain increased sensitivity to tumor necrosis factor alpha after transformation by v-Ras*. Oncogene, 2005. **24**(43): p. 6574-83.
36. Prendes, M., Zheng, Y. and Beg, A.A., *Regulation of developing B cell survival by RelA-containing NF-kappa B complexes*. J Immunol, 2003. **171**(8): p. 3963-9.
37. Campbell, K.J. and Perkins, N.D., *Reprogramming RelA*. Cell Cycle, 2004. **3**(7): p. 869-72.
38. Chen, F.E., Huang, D.B., Chen, Y.Q. and Ghosh, G., *Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA*. Nature, 1998. **391**(6665): p. 410-3.
39. Gilmore, T.D. and Gerondakis, S., *The c-Rel Transcription Factor in Development and Disease*. Genes Cancer, 2011. **2**(7): p. 695-711.
40. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
41. Leeman, J.R., Weniger, M.A., Barth, T.F. and Gilmore, T.D., *Deletion analysis and alternative splicing define a transactivation inhibitory domain in human oncoprotein REL*. Oncogene, 2008. **27**(53): p. 6770-81.
42. Kunsch, C., Ruben, S.M. and Rosen, C.A., *Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(10): p. 4412-21.
43. Sanjabi, S., Williams, K.J., Saccani, S., Zhou, L., Hoffmann, A., Ghosh, G., Gerondakis, S., Natoli, G. and Smale, S.T., *A c-Rel subdomain responsible for enhanced DNA-binding affinity and selective gene activation*. Genes Dev, 2005. **19**(18): p. 2138-51.
44. Gilmore, T.D., *Malignant transformation by mutant Rel proteins*. Trends Genet, 1991. **7**(10): p. 318-22.
45. Visekruna, A., Volkov, A. and Steinhoff, U., *A key role for NF-kappaB transcription factor c-Rel in T-lymphocyte-differentiation and effector functions*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 239368.
46. Kontgen, F., Grumont, R.J., Strasser, A., Metcalf, D., Li, R., Tarlinton, D. and Gerondakis, S., *Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression*. Genes Dev, 1995. **9**(16): p. 1965-77.

47. Tan, T.H., Huang, G.P., Sica, A., Ghosh, P., Young, H.A., Longo, D.L. and Rice, N.R., *Kappa B site-dependent activation of the interleukin-2 receptor alpha-chain gene promoter by human c-Rel*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(9): p. 4067-75.
48. Liou, H.C., Jin, Z., Tumang, J., Andjelic, S., Smith, K.A. and Liou, M.L., *c-Rel is crucial for lymphocyte proliferation but dispensable for T cell effector function*. Int Immunol, 1999. **11**(3): p. 361-71.
49. Gerondakis, S. and Siebenlist, U., *Roles of the NF-kappaB pathway in lymphocyte development and function*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(5): p. a000182.
50. Hori, S., *c-Rel: a pioneer in directing regulatory T-cell lineage commitment?* Eur J Immunol, 2010. **40**(3): p. 664-7.
51. Long, M., Park, S.G., Strickland, I., Hayden, M.S. and Ghosh, S., *Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor*. Immunity, 2009. **31**(6): p. 921-31.
52. Rao, S., Gerondakis, S., Woltring, D. and Shannon, M.F., *c-Rel is required for chromatin remodeling across the IL-2 gene promoter*. J Immunol, 2003. **170**(7): p. 3724-31.
53. Curry, C.V., Ewton, A.A., Olsen, R.J., Logan, B.R., Preti, H.A., Liu, Y.C., Perkins, S.L. and Chang, C.C., *Prognostic impact of C-REL expression in diffuse large B-cell lymphoma*. J Hematop, 2009. **2**(1): p. 20-6.
54. Tian, W. and Liou, H.C., *RNAi-mediated c-Rel silencing leads to apoptosis of B cell tumor cells and suppresses antigenic immune response in vivo*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5028.
55. Xiao, Q., Shen, N., Hedvat, C.V., Moskowitz, C.H., Sussman, L.K., Filippa, D.A., Zelenetz, A.D., Houldsworth, J., Chaganti, R.S. and Teruya-Feldstein, J., *Differential expression patterns of c-REL protein in classic and nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2004. **12**(3): p. 211-5.
56. Jin, W., Chang, M. and Sun, S.C., *Peli: a family of signal-responsive E3 ubiquitin ligases mediating TLR signaling and T-cell tolerance*. Cell Mol Immunol, 2012. **9**(2): p. 113-22.
57. Venkataraman, L., Wang, W. and Sen, R., *Differential regulation of c-Rel translocation in activated B and T cells*. J Immunol, 1996. **157**(3): p. 1149-55.
58. Thompson, J.E., Phillips, R.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Ghosh, S., *I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B*. Cell, 1995. **80**(4): p. 573-82.
59. Flanagan, W.M., Corthesy, B., Bram, R.J. and Crabtree, G.R., *Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A*. Nature, 1991. **352**(6338): p. 803-7.
60. Vallabhapurapu, S. and Karin, M., *Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 693-733.
61. Maggirwar, S.B., Harhaj, E.W. and Sun, S.C., *Regulation of the interleukin-2 CD28-responsive element by NF-ATp and various NF-kappaB/Rel transcription factors*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(5): p. 2605-14.
62. Sen, R. and Smale, S.T., *Selectivity of the NF-{kappa}B response*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(4): p. a000257.
63. Mattila, P.S., Ullman, K.S., Fiering, S., Emmel, E.A., McCutcheon, M., Crabtree, G.R. and Herzenberg, L.A., *The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes*. EMBO J, 1990. **9**(13): p. 4425-33.
64. Venkataraman, L., Burakoff, S.J. and Sen, R., *FK506 inhibits antigen receptor-mediated induction of c-rel in B and T lymphoid cells*. J Exp Med, 1995. **181**(3): p. 1091-9.
65. Chang, M., Jin, W., Chang, J.H., Xiao, Y., Brittain, G.C., Yu, J., Zhou, X., Wang, Y.H., Cheng, X., Li, P., Rabinovich, B.A., Hwu, P. and Sun, S.C., *The ubiquitin ligase Peli1 negatively regulates T cell activation and prevents autoimmunity*. Nat Immunol, 2011. **12**(10): p. 1002-9.
66. Fusco, A.J., Savinova, O.V., Talwar, R., Kearns, J.D., Hoffmann, A. and Ghosh, G., *Stabilization of RelB requires multidomain interactions with p100/p52*. J Biol Chem, 2008. **283**(18): p. 12324-32.
67. Vu, D., Huang, D.B., Vemu, A. and Ghosh, G., *A structural basis for selective dimerization by NF-kappaB RelB*. J Mol Biol, 2013. **425**(11): p. 1934-45.

68. Dobrzanski, P., Ryseck, R.P. and Bravo, R., *Both N- and C-terminal domains of RelB are required for full transactivation: role of the N-terminal leucine zipper-like motif*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(3): p. 1572-82.
69. Marienfeld, R., Berberich-Siebelt, F., Berberich, I., Denk, A., Serfling, E. and Neumann, M., *Signal-specific and phosphorylation-dependent RelB degradation: a potential mechanism of NF-kappaB control*. Oncogene, 2001. **20**(56): p. 8142-7.
70. Hailfinger, S., Nogai, H., Pelzer, C., Jaworski, M., Cabalzar, K., Charton, J.E., Guzzardi, M., Decaillet, C., Grau, M., Dorken, B., Lenz, P., Lenz, G. and Thome, M., *Malt1-dependent RelB cleavage promotes canonical NF-kappaB activation in lymphocytes and lymphoma cell lines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(35): p. 14596-601.
71. Weih, D.S., Yilmaz, Z.B. and Weih, F., *Essential role of RelB in germinal center and marginal zone formation and proper expression of homing chemokines*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 1909-19.
72. Barton, D., HogenEsch, H. and Weih, F., *Mice lacking the transcription factor RelB develop T cell-dependent skin lesions similar to human atopic dermatitis*. Eur J Immunol, 2000. **30**(8): p. 2323-32.
73. Burkly, L., Hession, C., Ogata, L., Reilly, C., Marconi, L.A., Olson, D., Tizard, R., Cate, R. and Lo, D., *Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells*. Nature, 1995. **373**(6514): p. 531-6.
74. Marienfeld, R., May, M.J., Berberich, I., Serfling, E., Ghosh, S. and Neumann, M., *RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65*. J Biol Chem, 2003. **278**(22): p. 19852-60.
75. Saccani, S., Pantano, S. and Natoli, G., *Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers*. Mol Cell, 2003. **11**(6): p. 1563-74.
76. Ruben, S.M., Klement, J.F., Coleman, T.A., Maher, M., Chen, C.H. and Rosen, C.A., *I-Rel: a novel rel-related protein that inhibits NF-kappa B transcriptional activity*. Genes Dev, 1992. **6**(5): p. 745-60.
77. Jacque, E., Tchenio, T., Piton, G., Romeo, P.H. and Baud, V., *RelA repression of RelB activity induces selective gene activation downstream of TNF receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(41): p. 14635-40.
78. Cormier, F., Monjanel, H., Fabre, C., Billot, K., Sapharikas, E., Chereau, F., Bordereaux, D., Molina, T.J., Avet-Loiseau, H. and Baud, V., *Frequent engagement of RelB activation is critical for cell survival in multiple myeloma*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e59127.
79. Li, Q. and Verma, I.M., *NF-kappaB regulation in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 725-34.
80. Karin, M. and Ben-Neriah, Y., *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 621-63.
81. Perkins, N.D., *Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 49-62.
82. Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D. and Miyamoto, S., *Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation*. Genes Dev, 1995. **9**(22): p. 2723-35.
83. Ghosh, S. and Baltimore, D., *Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B*. Nature, 1990. **344**(6267): p. 678-82.
84. Hinz, M., Arslan, S.C. and Scheidereit, C., *It takes two to tango: IkappaBs, the multifunctional partners of NF-kappaB*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 59-76.
85. Ghosh, G., Wang, V.Y., Huang, D.B. and Fusco, A., *NF-kappaB regulation: lessons from structures*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 36-58.
86. Schuster, M., Annemann, M., Plaza-Sirvent, C. and Schmitz, I., *Atypical IkappaB proteins - nuclear modulators of NF-kappaB signaling*. Cell Commun Signal, 2013. **11**(1): p. 23.
87. Hinz, M. and Scheidereit, C., *The IkappaB kinase complex in NF-kappaB regulation and beyond*. EMBO Rep, 2014. **15**(1): p. 46-61.
88. Spencer, E., Jiang, J. and Chen, Z.J., *Signal-induced ubiquitination of IkappaBalpha by the F-box protein Slimb/beta-TrCP*. Genes Dev, 1999. **13**(3): p. 284-94.

89. Suzuki, H., Chiba, T., Kobayashi, M., Takeuchi, M., Suzuki, T., Ichiyama, A., Ikenoue, T., Omata, M., Furuichi, K. and Tanaka, K., *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, 1999. **256**(1): p. 127-32.
90. Tergaonkar, V., Correa, R.G., Ikawa, M. and Verma, I.M., *Distinct roles of IkappaB proteins in regulating constitutive NF-kappaB activity*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(9): p. 921-3.
91. Zabel, U. and Baeuerle, P.A., *Purified human I kappa B can rapidly dissociate the complex of the NF-kappa B transcription factor with its cognate DNA*. Cell, 1990. **61**(2): p. 255-65.
92. Henkel, T., Machleidt, T., Alkalay, I., Kronke, M., Ben-Neriah, Y. and Baeuerle, P.A., *Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B*. Nature, 1993. **365**(6442): p. 182-5.
93. Ghosh, S. and Karin, M., *Missing pieces in the NF-kappaB puzzle*. Cell, 2002. **109** Suppl: p. S81-96.
94. Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G. and Siebenlist, U., *Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1485-8.
95. Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V.J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D. and Maniatis, T., *Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway*. Genes Dev, 1995. **9**(13): p. 1586-97.
96. Lin, Y.C., Brown, K. and Siebenlist, U., *Activation of NF-kappa B requires proteolysis of the inhibitor I kappa B-alpha: signal-induced phosphorylation of I kappa B-alpha alone does not release active NF-kappa B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(2): p. 552-6.
97. Traenckner, E.B., Wilk, S. and Baeuerle, P.A., *A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B*. EMBO J, 1994. **13**(22): p. 5433-41.
98. Rao, P., Hayden, M.S., Long, M., Scott, M.L., West, A.P., Zhang, D., Oeckinghaus, A., Lynch, C., Hoffmann, A., Baltimore, D. and Ghosh, S., *IkappaBbeta acts to inhibit and activate gene expression during the inflammatory response*. Nature, 2010. **466**(7310): p. 1115-9.
99. Weil, R., Laurent-Winter, C. and Israel, A., *Regulation of IkappaBbeta degradation. Similarities to and differences from IkappaBalpha*. J Biol Chem, 1997. **272**(15): p. 9942-9.
100. Suyang, H., Phillips, R., Douglas, I. and Ghosh, S., *Role of unphosphorylated, newly synthesized I kappa B beta in persistent activation of NF-kappa B*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(10): p. 5444-9.
101. Malek, S., Chen, Y., Huxford, T. and Ghosh, G., *IkappaBbeta, but not IkappaBalpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 45225-35.
102. Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M.L. and Baltimore, D., *The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation*. Science, 2002. **298**(5596): p. 1241-5.
103. Alves, B.N., Tsui, R., Almaden, J., Shokhirev, M.N., Davis-Turak, J., Fujimoto, J., Birnbaum, H., Ponomarenko, J. and Hoffmann, A., *IkappaB{varepsilon} Is a Key Regulator of B Cell Expansion by Providing Negative Feedback on cRel and RelA in a Stimulus-Specific Manner*. J Immunol, 2014. **192**(7): p. 3121-32.
104. Clark, J.M., Aleksiyadis, K., Martin, A., McNamee, K., Tharmalingam, T., Williams, R.O., Memet, S. and Cope, A.P., *Inhibitor of kappa B epsilon (IkappaBepsilon) is a non-redundant regulator of c-Rel-dependent gene expression in murine T and B cells*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24504.
105. Kearns, J.D., Basak, S., Werner, S.L., Huang, C.S. and Hoffmann, A., *IkappaBepsilon provides negative feedback to control NF-kappaB oscillations, signaling dynamics, and inflammatory gene expression*. J Cell Biol, 2006. **173**(5): p. 659-64.
106. Wulczyn, F.G., Naumann, M. and Scheidereit, C., *Candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a subunit-specific inhibitor of transcription factor NF-kappa B*. Nature, 1992. **358**(6387): p. 597-9.

107. Hatada, E.N., Nieters, A., Wulczyn, F.G., Naumann, M., Meyer, R., Nucifora, G., McKeithan, T.W. and Scheidereit, C., *The ankyrin repeat domains of the NF-kappa B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF-kappa B DNA binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(6): p. 2489-93.
108. Franzoso, G., Bours, V., Park, S., Tomita-Yamaguchi, M., Kelly, K. and Siebenlist, U., *The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-kappa B-mediated inhibition*. Nature, 1992. **359**(6393): p. 339-42.
109. Ghosh, S. and Hayden, M.S., *New regulators of NF-kappaB in inflammation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(11): p. 837-48.
110. Savinova, O.V., Hoffmann, A. and Ghosh, G., *The Nfkb1 and Nfkb2 proteins p105 and p100 function as the core of high-molecular-weight heterogeneous complexes*. Mol Cell, 2009. **34**(5): p. 591-602.
111. Chen, Z.J., Parent, L. and Maniatis, T., *Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity*. Cell, 1996. **84**(6): p. 853-62.
112. Hacker, H. and Karin, M., *Regulation and function of IKK and IKK-related kinases*. Sci STKE, 2006. **2006**(357): p. re13.
113. Chen, G., Cao, P. and Goeddel, D.V., *TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90*. Mol Cell, 2002. **9**(2): p. 401-10.
114. Ducut Sigala, J.L., Bottero, V., Young, D.B., Shevchenko, A., Mercurio, F. and Verma, I.M., *Activation of transcription factor NF-kappaB requires ELKS, an IkappaB kinase regulatory subunit*. Science, 2004. **304**(5679): p. 1963-7.
115. Oeckinghaus, A., Hayden, M.S. and Ghosh, S., *Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways*. Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 695-708.
116. DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E. and Karin, M., *A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB*. Nature, 1997. **388**(6642): p. 548-54.
117. Israel, A., *The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(3): p. a000158.
118. Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Li, J., Young, D.B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A. and Rao, A., *IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation*. Science, 1997. **278**(5339): p. 860-6.
119. Regnier, C.H., Song, H.Y., Gao, X., Goeddel, D.V., Cao, Z. and Rothe, M., *Identification and characterization of an IkappaB kinase*. Cell, 1997. **90**(2): p. 373-83.
120. Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G. and Karin, M., *IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex*. Nature, 1998. **395**(6699): p. 297-300.
121. Woronicz, J.D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M. and Goeddel, D.V., *IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK*. Science, 1997. **278**(5339): p. 866-9.
122. Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S.T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H.E., Kay, R.J. and Israel, A., *Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation*. Cell, 1998. **93**(7): p. 1231-40.
123. Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M. and Karin, M., *The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation*. Cell, 1997. **91**(2): p. 243-52.
124. Zandi, E., Chen, Y. and Karin, M., *Direct phosphorylation of IkappaB by IKKalpha and IKKbeta: discrimination between free and NF-kappaB-bound substrate*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1360-3.
125. Miller, B.S. and Zandi, E., *Complete reconstitution of human IkappaB kinase (IKK) complex in yeast. Assessment of its stoichiometry and the role of IKKgamma on the complex activity in the absence of stimulation*. J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36320-6.
126. Agou, F., Ye, F., Goffinont, S., Courtois, G., Yamaoka, S., Israel, A. and Veron, M., *NEMO trimerizes through its coiled-coil C-terminal domain*. J Biol Chem, 2002. **277**(20): p. 17464-75.

127. Tegethoff, S., Behlke, J. and Scheidereit, C., *Tetrameric oligomerization of IkappaB kinase gamma (IKKgamma) is obligatory for IKK complex activity and NF-kappaB activation*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(6): p. 2029-41.
128. Solt, L.A. and May, M.J., *The IkappaB kinase complex: master regulator of NF-kappaB signaling*. Immunol Res, 2008. **42**(1-3): p. 3-18.
129. Solt, L.A., Madge, L.A. and May, M.J., *NEMO-binding domains of both IKKalpha and IKKbeta regulate IkappaB kinase complex assembly and classical NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 2009. **284**(40): p. 27596-608.
130. Liu, F., Xia, Y., Parker, A.S. and Verma, I.M., *IKK biology*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 239-53.
131. Sun, S.C., *The noncanonical NF-kappaB pathway*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 125-40.
132. Kollias, G. and Kontoyiannis, D., *Role of TNF/TNFR in autoimmunity: specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(4-5): p. 315-21.
133. Lenschow, D.J., Walunas, T.L. and Bluestone, J.A., *CD28/B7 system of T cell costimulation*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 233-58.
134. Rauer, H., Wicovsky, A., Muller, N., Siegmund, D., Spindler, V., Waschke, J., Kneitz, C. and Wajant, H., *Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2)*. J Biol Chem, 2010. **285**(10): p. 7394-404.
135. Watts, T.H., *TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 23-68.
136. Harris, N.L. and Ronchese, F., *The role of B7 costimulation in T-cell immunity*. Immunol Cell Biol, 1999. **77**(4): p. 304-11.
137. van der Merwe, P.A. and Dushek, O., *Mechanisms for T cell receptor triggering*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(1): p. 47-55.
138. Muller, M.R. and Rao, A., *NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(9): p. 645-56.
139. Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J. and Rao, A., *Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT*. Genes Dev, 2003. **17**(18): p. 2205-32.
140. Gallo, E.M., Cante-Barrett, K. and Crabtree, G.R., *Lymphocyte calcium signaling from membrane to nucleus*. Nat Immunol, 2006. **7**(1): p. 25-32.
141. Ghosh, P., Tan, T.H., Rice, N.R., Sica, A. and Young, H.A., *The interleukin 2 CD28-responsive complex contains at least three members of the NF kappa B family: c-Rel, p50, and p65*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 1696-700.
142. Lai, J.H., Horvath, G., Subleski, J., Bruder, J., Ghosh, P. and Tan, T.H., *RelA is a potent transcriptional activator of the CD28 response element within the interleukin 2 promoter*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(8): p. 4260-71.
143. Samelson, L.E., *Immunoreceptor signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(12).
144. Gerondakis, S., Fulford, T.S., Messina, N.L. and Grumont, R.J., *NF-kappaB control of T cell development*. Nat Immunol, 2014. **15**(1): p. 15-25.
145. Thome, M., Charton, J.E., Pelzer, C. and Hailfinger, S., *Antigen receptor signaling to NF-kappaB via CARMA1, BCL10, and MALTI*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(9): p. a003004.
146. Wang, D., You, Y., Case, S.M., McAllister-Lucas, L.M., Wang, L., DiStefano, P.S., Nunez, G., Bertin, J. and Lin, X., *A requirement for CARMA1 in TCR-induced NF-kappa B activation*. Nat Immunol, 2002. **3**(9): p. 830-5.
147. Pomerantz, J.L., Denny, E.M. and Baltimore, D., *CARD11 mediates factor-specific activation of NF-kappaB by the T cell receptor complex*. EMBO J, 2002. **21**(19): p. 5184-94.
148. Newton, K. and Dixit, V.M., *Mice lacking the CARD of CARMA1 exhibit defective B lymphocyte development and impaired proliferation of their B and T lymphocytes*. Curr Biol, 2003. **13**(14): p. 1247-51.
149. Hara, H., Wada, T., Bakal, C., Kozieradzki, I., Suzuki, S., Suzuki, N., Nghiem, M., Griffiths, E.K., Krawczyk, C., Bauer, B., D'Acquisto, F., Ghosh, S., Yeh, W.C., Baier, G., Rottapel, R. and Penninger, J.M., *The MAGUK family protein CARD11 is essential for lymphocyte activation*. Immunity, 2003. **18**(6): p. 763-75.

150. Gaide, O., Favier, B., Legler, D.F., Bonnet, D., Brissoni, B., Valitutti, S., Bron, C., Tschopp, J. and Thome, M., *CARMA1 is a critical lipid raft-associated regulator of TCR-induced NF-kappa B activation*. Nat Immunol, 2002. **3**(9): p. 836-43.
151. Willis, T.G., Jadayel, D.M., Du, M.Q., Peng, H., Perry, A.R., Abdul-Rauf, M., Price, H., Karran, L., Majekodunmi, O., Wlodarska, I., Pan, L., Crook, T., Hamoudi, R., Isaacson, P.G. and Dyer, M.J., *Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types*. Cell, 1999. **96**(1): p. 35-45.
152. Ruland, J., Duncan, G.S., Elia, A., del Barco Barrantes, I., Nguyen, L., Plyte, S., Millar, D.G., Bouchard, D., Wakeham, A., Ohashi, P.S. and Mak, T.W., *Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure*. Cell, 2001. **104**(1): p. 33-42.
153. Carvalho, G., Le Guelte, A., Demian, C., Vazquez, A., Gavard, J. and Bidere, N., *Interplay between BCL10, MALT1 and IkappaBalpha during T-cell-receptor-mediated NFkappaB activation*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 14): p. 2375-80.
154. Langel, F.D., Jain, N.A., Rossman, J.S., Kingeter, L.M., Kashyap, A.K. and Schaefer, B.C., *Multiple protein domains mediate interaction between Bcl10 and MALT1*. J Biol Chem, 2008. **283**(47): p. 32419-31.
155. Lucas, P.C., Yonezumi, M., Inohara, N., McAllister-Lucas, L.M., Abazeed, M.E., Chen, F.F., Yamaoka, S., Seto, M. and Nunez, G., *Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF-kappa B signaling pathway*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 19012-9.
156. Thome, M., *Multifunctional roles for MALT1 in T-cell activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 495-500.
157. Che, T., You, Y., Wang, D., Tanner, M.J., Dixit, V.M. and Lin, X., *MALT1/paracaspase is a signaling component downstream of CARMA1 and mediates T cell receptor-induced NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 2004. **279**(16): p. 15870-6.
158. Zhou, H., Wertz, I., O'Rourke, K., Ultsch, M., Seshagiri, S., Eby, M., Xiao, W. and Dixit, V.M., *Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO*. Nature, 2004. **427**(6970): p. 167-71.
159. Rosebeck, S., Rehman, A.O., Lucas, P.C. and McAllister-Lucas, L.M., *From MALT lymphoma to the CBM signalosome: three decades of discovery*. Cell Cycle, 2011. **10**(15): p. 2485-96.
160. Oeckinghaus, A., Wegener, E., Welteke, V., Ferch, U., Arslan, S.C., Ruland, J., Scheidereit, C. and Krappmann, D., *Malt1 ubiquitination triggers NF-kappaB signaling upon T-cell activation*. EMBO J, 2007. **26**(22): p. 4634-45.
161. Ferch, U., zum Buschenfelde, C.M., Gewies, A., Wegener, E., Rauser, S., Peschel, C., Krappmann, D. and Ruland, J., *MALT1 directs B cell receptor-induced canonical nuclear factor-kappaB signaling selectively to the c-Rel subunit*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 984-91.
162. McAllister-Lucas, L.M. and Lucas, P.C., *Finally, MALT1 is a protease!* Nat Immunol, 2008. **9**(3): p. 231-3.
163. Kirchhofer, D. and Vucic, D., *Protease activity of MALT1: a mystery unravelled*. Biochem J, 2012. **444**(2): p. e3-5.
164. Ferch, U., Kloo, B., Gewies, A., Pfander, V., Duwel, M., Peschel, C., Krappmann, D. and Ruland, J., *Inhibition of MALT1 protease activity is selectively toxic for activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells*. J Exp Med, 2009. **206**(11): p. 2313-20.
165. Rebeaud, F., Hailfinger, S., Posevitz-Fejfar, A., Tapernoux, M., Moser, R., Rueda, D., Gaide, O., Guzzardi, M., Iancu, E.M., Rufer, N., Fasel, N. and Thome, M., *The proteolytic activity of the paracaspase MALT1 is key in T cell activation*. Nat Immunol, 2008. **9**(3): p. 272-81.
166. Vereecke, L., Beyaert, R. and van Loo, G., *The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology*. Trends Immunol, 2009. **30**(8): p. 383-91.
167. Hachmann, J., Snipas, S.J., van Raam, B.J., Cancino, E.M., Houlihan, E.J., Poreba, M., Kasperkiewicz, P., Drag, M. and Salvesen, G.S., *Mechanism and specificity of the human paracaspase MALT1*. Biochem J, 2012. **443**(1): p. 287-95.
168. Uehata, T., Iwasaki, H., Vandenbon, A., Matsushita, K., Hernandez-Cuellar, E., Kuniyoshi, K., Satoh, T., Mino, T., Suzuki, Y., Standley, D.M., Tsujimura, T., Rakugi, H., Isaka, Y.,

- Takeuchi, O. and Akira, S., *Malt1-induced cleavage of regnase-1 in CD4(+) helper T cells regulates immune activation*. Cell, 2013. **153**(5): p. 1036-49.
169. Palkowitsch, L., Marienfeld, U., Brunner, C., Eitelhuber, A., Krappmann, D. and Marienfeld, R.B., *The Ca²⁺-dependent phosphatase calcineurin controls the formation of the Carma1-Bcl10-Malt1 complex during T cell receptor-induced NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 2011. **286**(9): p. 7522-34.
 170. Matsumoto, R., Wang, D., Blonska, M., Li, H., Kobayashi, M., Pappu, B., Chen, Y., Wang, D. and Lin, X., *Phosphorylation of CARMA1 plays a critical role in T Cell receptor-mediated NF-kappaB activation*. Immunity, 2005. **23**(6): p. 575-85.
 171. Stilo, R., Liguoro, D., Di Jeso, B., Formisano, S., Consiglio, E., Leonardi, A. and Vito, P., *Physical and functional interaction of CARMA1 and CARMA3 with Ikappa kinase gamma-NFkappaB essential modulator*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34323-31.
 172. Rueda, D. and Thome, M., *Phosphorylation of CARMA1: the link(er) to NF-kappaB activation*. Immunity, 2005. **23**(6): p. 551-3.
 173. Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y. and Karin, M., *Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation*. Science, 1999. **284**(5412): p. 309-13.
 174. Li, Z.W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R. and Karin, M., *The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis*. J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1839-45.
 175. Tsuchiya, Y., Asano, T., Nakayama, K., Kato, T., Jr., Karin, M. and Kamata, H., *Nuclear IKKbeta is an adaptor protein for IkappaBalpha ubiquitination and degradation in UV-induced NF-kappaB activation*. Mol Cell, 2010. **39**(4): p. 570-82.
 176. Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D.H., Niall, H.D. and Boyse, E.A., *Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(1): p. 11-5.
 177. Liu, Y.C., Penninger, J. and Karin, M., *Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(12): p. 941-52.
 178. Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H., Ferber, S. and Hershko, A., *Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes*. J Biol Chem, 1980. **255**(16): p. 7525-8.
 179. Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A.L. and Hershko, A., *ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(3): p. 1365-8.
 180. Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L. and 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, 1980. **77**(4): p. 1783-6.
 181. Hershko, A., Ciechanover, A. and Rose, I.A., *Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(7): p. 3107-10.
 182. Seufert, W. and Jentsch, S., *In vivo function of the proteasome in the ubiquitin pathway*. EMBO J, 1992. **11**(8): p. 3077-80.
 183. Wilkinson, K.D., *Ubiquitin: a Nobel protein*. Cell, 2004. **119**(6): p. 741-5.
 184. Giles, J., *Chemistry Nobel for trio who revealed molecular death-tag*. Nature, 2004. **431**(7010): p. 729.
 185. Wilkinson, K.D., *The discovery of ubiquitin-dependent proteolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15280-2.
 186. Pickart, C.M., *Back to the future with ubiquitin*. Cell, 2004. **116**(2): p. 181-90.
 187. Finley, D., Ciechanover, A. and Varshavsky, A., *Ubiquitin as a central cellular regulator*. Cell, 2004. **116**(2 Suppl): p. S29-32, 2 p following S32.
 188. Ulrich, H.D., *Two-way communications between ubiquitin-like modifiers and DNA*. Nat Struct Mol Biol, 2014. **21**(4): p. 317-24.
 189. Zinngrebe, J., Montinaro, A., Peltzer, N. and Walczak, H., *Ubiquitin in the immune system*. EMBO Rep, 2014. **15**(1): p. 28-45.
 190. Marx, J., *Cell biology. Ubiquitin lives up to its name*. Science, 2002. **297**(5588): p. 1792-4.

191. Chen, Z.J. and Sun, L.J., *Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling*. Mol Cell, 2009. **33**(3): p. 275-86.
192. Hochstrasser, M., *Lingering mysteries of ubiquitin-chain assembly*. Cell, 2006. **124**(1): p. 27-34.
193. Behrends, C. and Harper, J.W., *Constructing and decoding unconventional ubiquitin chains*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(5): p. 520-8.
194. Pickart, C.M. and Eddins, M.J., *Ubiquitin: structures, functions, mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1695**(1-3): p. 55-72.
195. Shi, D. and Grossman, S.R., *Ubiquitin becomes ubiquitous in cancer: emerging roles of ubiquitin ligases and deubiquitinases in tumorigenesis and as therapeutic targets*. Cancer Biol Ther, 2010. **10**(8): p. 737-47.
196. Hicke, L., *Protein regulation by monoubiquitin*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(3): p. 195-201.
197. Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K. and Varshavsky, A., *A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein*. Science, 1989. **243**(4898): p. 1576-83.
198. Pickart, C.M., *Ubiquitin enters the new millennium*. Mol Cell, 2001. **8**(3): p. 499-504.
199. Heride, C., Urbe, S. and Clague, M.J., *Ubiquitin code assembly and disassembly*. Curr Biol, 2014. **24**(6): p. R215-20.
200. Pickart, C.M., *Mechanisms underlying ubiquitination*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 503-33.
201. Ye, Y. and Rape, M., *Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(11): p. 755-64.
202. Malynn, B.A. and Ma, A., *Ubiquitin makes its mark on immune regulation*. Immunity, 2010. **33**(6): p. 843-52.
203. Sadowski, M., Suryadinata, R., Tan, A.R., Roesley, S.N. and Sarcevic, B., *Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes*. IUBMB Life, 2012. **64**(2): p. 136-42.
204. van Nocker, S. and Vierstra, R.D., *Multiubiquitin chains linked through lysine 48 are abundant in vivo and are competent intermediates in the ubiquitin proteolytic pathway*. J Biol Chem, 1993. **268**(33): p. 24766-73.
205. Chen, K.Q. and Rubenstein, I., *Characterization of the structure and transcription of an ubiquitin fusion gene from maize*. Gene, 1991. **107**(2): p. 205-12.
206. Chen, Z.J., *Ubiquitination in signaling to and activation of IKK*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 95-106.
207. Xia, Z.P., Sun, L., Chen, X., Pineda, G., Jiang, X., Adhikari, A., Zeng, W. and Chen, Z.J., *Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains*. Nature, 2009. **461**(7260): p. 114-9.
208. Hershko, A. and Ciechanover, A., *The ubiquitin system*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 425-79.
209. Harhaj, E.W. and Dixit, V.M., *Deubiquitinases in the regulation of NF-kappaB signaling*. Cell Res, 2011. **21**(1): p. 22-39.
210. Nijman, S.M., Luna-Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma, T.K. and Bernards, R., *A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes*. Cell, 2005. **123**(5): p. 773-86.
211. Komander, D., Clague, M.J. and Urbe, S., *Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(8): p. 550-63.
212. Pelzer, C., Kassner, I., Matentzoglou, K., Singh, R.K., Wollscheid, H.P., Scheffner, M., Schmidtke, G. and Groettrup, M., *UBE1L2, a novel E1 enzyme specific for ubiquitin*. J Biol Chem, 2007. **282**(32): p. 23010-4.
213. Jin, J., Li, X., Gygi, S.P. and Harper, J.W., *Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging*. Nature, 2007. **447**(7148): p. 1135-8.
214. Ikeda, F. and Dikic, I., *Atypical ubiquitin chains: new molecular signals*. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. EMBO Rep, 2008. **9**(6): p. 536-42.

215. Scheffner, M., Nuber, U. and Huibregtse, J.M., *Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade*. Nature, 1995. **373**(6509): p. 81-3.
216. Michelle, C., Vourc'h, P., Mignon, L. and Andres, C.R., *What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor?* J Mol Evol, 2009. **68**(6): p. 616-28.
217. Plafker, S.M., Plafker, K.S., Weissman, A.M. and Macara, I.G., *Ubiquitin charging of human class III ubiquitin-conjugating enzymes triggers their nuclear import*. J Cell Biol, 2004. **167**(4): p. 649-59.
218. Eletr, Z.M., Huang, D.T., Duda, D.M., Schulman, B.A. and Kuhlman, B., *E2 conjugating enzymes must disengage from their E1 enzymes before E3-dependent ubiquitin and ubiquitin-like transfer*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(10): p. 933-4.
219. Windheim, M., Pegg, M. and Cohen, P., *Two different classes of E2 ubiquitin-conjugating enzymes are required for the mono-ubiquitination of proteins and elongation by polyubiquitin chains with a specific topology*. Biochem J, 2008. **409**(3): p. 723-9.
220. Rape, M., Reddy, S.K. and Kirschner, M.W., *The processivity of multiubiquitination by the APC determines the order of substrate degradation*. Cell, 2006. **124**(1): p. 89-103.
221. Christensen, D.E., Brzovic, P.S. and Klevit, R.E., *E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(10): p. 941-8.
222. Hershko, A., Heller, H., Elias, S. and Ciechanover, A., *Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown*. J Biol Chem, 1983. **258**(13): p. 8206-14.
223. Deshaies, R.J. and Joazeiro, C.A., *RING domain E3 ubiquitin ligases*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 399-434.
224. Pintard, L., Willems, A. and Peter, M., *Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family*. EMBO J, 2004. **23**(8): p. 1681-7.
225. Spratt, D.E., Walden, H. and Shaw, G.S., *RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions*. Biochem J, 2014. **458**(3): p. 421-37.
226. Patterson, C., *A new gun in town: the U box is a ubiquitin ligase domain*. Sci STKE, 2002. **2002**(116): p. pe4.
227. de Bie, P. and Ciechanover, A., *Ubiquitination of E3 ligases: self-regulation of the ubiquitin system via proteolytic and non-proteolytic mechanisms*. Cell Death Differ, 2011. **18**(9): p. 1393-402.
228. Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S. and Howley, P.M., *A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 5249.
229. Rotin, D. and Kumar, S., *Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(6): p. 398-409.
230. Scheffner, M. and Kumar, S., *Mammalian HECT ubiquitin-protein ligases: biological and pathophysiological aspects*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(1): p. 61-74.
231. Metzger, M.B., Hristova, V.A. and Weissman, A.M., *HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 3): p. 531-7.
232. Kim, H.C. and Huibregtse, J.M., *Polyubiquitination by HECT E3s and the determinants of chain type specificity*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(12): p. 3307-18.
233. Metzger, M.B., Pruneda, J.N., Klevit, R.E. and Weissman, A.M., *RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(1): p. 47-60.
234. Freemont, P.S., Hanson, I.M. and Trowsdale, J., *A novel cysteine-rich sequence motif*. Cell, 1991. **64**(3): p. 483-4.
235. Budhidarmo, R., Nakatani, Y. and Day, C.L., *RINGs hold the key to ubiquitin transfer*. Trends Biochem Sci, 2012. **37**(2): p. 58-65.
236. Pruneda, J.N., Littlefield, P.J., Soss, S.E., Nordquist, K.A., Chazin, W.J., Brzovic, P.S. and Klevit, R.E., *Structure of an E3:E2~Ub complex reveals an allosteric mechanism shared among RING/U-box ligases*. Mol Cell, 2012. **47**(6): p. 933-42.

237. Borden, K.L., *RING fingers and B-boxes: zinc-binding protein-protein interaction domains*. Biochem Cell Biol, 1998. **76**(2-3): p. 351-8.
238. Reddy, B.A., Etkin, L.D. and Freemont, P.S., *A novel zinc finger coiled-coil domain in a family of nuclear proteins*. Trends Biochem Sci, 1992. **17**(9): p. 344-5.
239. Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., Guffanti, A., Minucci, S., Pelicci, P.G. and Ballabio, A., *The tripartite motif family identifies cell compartments*. EMBO J, 2001. **20**(9): p. 2140-51.
240. Meroni, G. and Diez-Roux, G., *TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases*. Bioessays, 2005. **27**(11): p. 1147-57.
241. Boudinot, P., van der Aa, L.M., Jouneau, L., Du Pasquier, L., Pontarotti, P., Briolat, V., Benmansour, A. and Levraud, J.P., *Origin and evolution of TRIM proteins: new insights from the complete TRIM repertoire of zebrafish and pufferfish*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22022.
242. Rajsbaum, R., Garcia-Sastre, A. and Versteeg, G.A., *TRIMmunity: the roles of the TRIM E3-ubiquitin ligase family in innate antiviral immunity*. J Mol Biol, 2014. **426**(6): p. 1265-84.
243. Hatakeyama, S., *TRIM proteins and cancer*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(11): p. 792-804.
244. Han, X., Du, H. and Massiah, M.A., *Detection and characterization of the in vitro e3 ligase activity of the human MID1 protein*. J Mol Biol, 2011. **407**(4): p. 505-20.
245. Li, Y., Wu, H., Wu, W., Zhuo, W., Liu, W., Zhang, Y., Cheng, M., Chen, Y.G., Gao, N., Yu, H., Wang, L., Li, W. and Yang, M., *Structural insights into the TRIM family of ubiquitin E3 ligases*. Cell Res, 2014.
246. Napolitano, L.M. and Meroni, G., *TRIM family: Pleiotropy and diversification through homomultimer and heteromultimer formation*. IUBMB Life, 2012. **64**(1): p. 64-71.
247. Marin, I., *Origin and diversification of TRIM ubiquitin ligases*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50030.
248. Papa, F.R. and Hochstrasser, M., *The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene*. Nature, 1993. **366**(6453): p. 313-9.
249. Baker, R.T., Tobias, J.W. and Varshavsky, A., *Ubiquitin-specific proteases of Saccharomyces cerevisiae. Cloning of UBP2 and UBP3, and functional analysis of the UBP gene family*. J Biol Chem, 1992. **267**(32): p. 23364-75.
250. Fujiwara, T., Saito, A., Suzuki, M., Shinomiya, H., Suzuki, T., Takahashi, E., Tanigami, A., Ichiyama, A., Chung, C.H., Nakamura, Y. and Tanaka, K., *Identification and chromosomal assignment of USP1, a novel gene encoding a human ubiquitin-specific protease*. Genomics, 1998. **54**(1): p. 155-8.
251. Husnjak, K. and Dikic, I., *Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 291-322.
252. Fraile, J.M., Quesada, V., Rodriguez, D., Freije, J.M. and Lopez-Otin, C., *Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options*. Oncogene, 2012. **31**(19): p. 2373-88.
253. Clague, M.J., Liu, H. and Urbe, S., *Governance of endocytic trafficking and signaling by reversible ubiquitylation*. Dev Cell, 2012. **23**(3): p. 457-67.
254. Amerik, A.Y. and Hochstrasser, M., *Mechanism and function of deubiquitinating enzymes*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1695**(1-3): p. 189-207.
255. Harhaj, E.W. and Dixit, V.M., *Regulation of NF-kappaB by deubiquitinases*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 107-24.
256. Okamura, H. and Rao, A., *Transcriptional regulation in lymphocytes*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(2): p. 239-43.
257. Carter, R.S., Pennington, K.N., Arrate, P., Oltz, E.M. and Ballard, D.W., *Site-specific monoubiquitination of IkappaB kinase IKKbeta regulates its phosphorylation and persistent activation*. J Biol Chem, 2005. **280**(52): p. 43272-9.
258. Wada, K., Niida, M., Tanaka, M. and Kamitani, T., *Ro52-mediated monoubiquitination of IKK{beta} down-regulates NF-{kappa}B signalling*. J Biochem, 2009. **146**(6): p. 821-32.
259. Hochrainer, K., Racchumi, G., Zhang, S., Iadecola, C. and Anrather, J., *Monoubiquitination of nuclear RelA negatively regulates NF-kappaB activity independent of proteasomal degradation*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(12): p. 2057-73.

260. Heyne, K., Winter, C., Gerten, F., Schmidt, C. and Roemer, K., *A novel mechanism of crosstalk between the p53 and NF-kappaB pathways: MDM2 binds and inhibits p65RelA*. Cell Cycle, 2013. **12**(15): p. 2479-92.
261. Cabalzar, K., Pelzer, C., Wolf, A., Lenz, G., Iwaszkiewicz, J., Zoete, V., Hailfinger, S. and Thome, M., *Monoubiquitination and activity of the paracaspase MALT1 requires glutamate 549 in the dimerization interface*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72051.
262. Pelzer, C., Cabalzar, K., Wolf, A., Gonzalez, M., Lenz, G. and Thome, M., *The protease activity of the paracaspase MALT1 is controlled by monoubiquitination*. Nat Immunol, 2013. **14**(4): p. 337-45.
263. Malynn, B.A. and Ma, A., *A20 takes on tumors: tumor suppression by an ubiquitin-editing enzyme*. J Exp Med, 2009. **206**(5): p. 977-80.
264. Bhoj, V.G. and Chen, Z.J., *Ubiquitylation in innate and adaptive immunity*. Nature, 2009. **458**(7237): p. 430-7.
265. Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C. and Chen, Z.J., *Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain*. Cell, 2000. **103**(2): p. 351-61.
266. Sun, L., Deng, L., Ea, C.K., Xia, Z.P. and Chen, Z.J., *The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes*. Mol Cell, 2004. **14**(3): p. 289-301.
267. Adhikari, A., Xu, M. and Chen, Z.J., *Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3214-26.
268. King, C.G., Kobayashi, T., Cejas, P.J., Kim, T., Yoon, K., Kim, G.K., Chiffoleau, E., Hickman, S.P., Walsh, P.T., Turka, L.A. and Choi, Y., *TRAF6 is a T cell-intrinsic negative regulator required for the maintenance of immune homeostasis*. Nat Med, 2006. **12**(9): p. 1088-92.
269. King, C.G., Buckler, J.L., Kobayashi, T., Hannah, J.R., Bassett, G., Kim, T., Pearce, E.L., Kim, G.G., Turka, L.A. and Choi, Y., *Cutting edge: requirement for TRAF6 in the induction of T cell anergy*. J Immunol, 2008. **180**(1): p. 34-8.
270. Wu, C.J. and Ashwell, J.D., *NEMO recognition of ubiquitinated Bcl10 is required for T cell receptor-mediated NF-kappaB activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 3023-8.
271. Wu, C.J., Conze, D.B., Li, T., Srinivasula, S.M. and Ashwell, J.D., *Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(4): p. 398-406.
272. Alexia, C., Poalas, K., Carvalho, G., Zemirli, N., Dwyer, J., Dubois, S.M., Hatchi, E.M., Cordeiro, N., Smith, S.S., Castanier, C., Le Guelte, A., Wan, L., Kang, Y., Vazquez, A., Gavard, J., Arnoult, D. and Bidere, N., *The endoplasmic reticulum acts as a platform for ubiquitylated components of nuclear factor kappaB signaling*. Sci Signal, 2013. **6**(291): p. ra79.
273. Zhou, H., Du, M.Q. and Dixit, V.M., *Constitutive NF-kappaB activation by the t(11;18)(q21;q21) product in MALT lymphoma is linked to deregulated ubiquitin ligase activity*. Cancer Cell, 2005. **7**(5): p. 425-31.
274. Ni, C.Y., Wu, Z.H., Florence, W.C., Parekh, V.V., Arrate, M.P., Pierce, S., Schweitzer, B., Van Kaer, L., Joyce, S., Miyamoto, S., Ballard, D.W. and Oltz, E.M., *Cutting edge: K63-linked polyubiquitination of NEMO modulates TLR signaling and inflammation in vivo*. J Immunol, 2008. **180**(11): p. 7107-11.
275. Wertz, I.E. and Dixit, V.M., *Signaling to NF-kappaB: regulation by ubiquitination*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(3): p. a003350.
276. Skaug, B., Jiang, X. and Chen, Z.J., *The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 769-96.
277. Thome, M. and Weil, R., *Post-translational modifications regulate distinct functions of CARMA1 and BCL10*. Trends Immunol, 2007. **28**(6): p. 281-8.
278. Moreno-Garcia, M.E., Sommer, K., Shinohara, H., Bandaranayake, A.D., Kurosaki, T. and Rawlings, D.J., *MAGUK-controlled ubiquitination of CARMA1 modulates lymphocyte NF-kappaB activity*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(4): p. 922-34.

279. Scharschmidt, E., Wegener, E., Heissmeyer, V., Rao, A. and Krappmann, D., *Degradation of Bcl10 induced by T-cell activation negatively regulates NF-kappa B signaling*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(9): p. 3860-73.
280. Zeng, H., Di, L., Fu, G., Chen, Y., Gao, X., Xu, L., Lin, X. and Wen, R., *Phosphorylation of Bcl10 negatively regulates T-cell receptor-mediated NF-kappaB activation*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(14): p. 5235-45.
281. Lobry, C., Lopez, T., Israel, A. and Weil, R., *Negative feedback loop in T cell activation through IkappaB kinase-induced phosphorylation and degradation of Bcl10*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 908-13.
282. Rueda, D., Gaide, O., Ho, L., Lewkowicz, E., Niedergang, F., Hailfinger, S., Rebeaud, F., Guzzardi, M., Conne, B., Thelen, M., Delon, J., Ferch, U., Mak, T.W., Ruland, J., Schwaller, J. and Thome, M., *Bcl10 controls TCR- and FcgammaR-induced actin polymerization*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4373-84.
283. Geng, H., Wittwer, T., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M. and Schmitz, M.L., *Phosphorylation of NF-kappaB p65 at Ser468 controls its COMMD1-dependent ubiquitination and target gene-specific proteasomal elimination*. EMBO Rep, 2009. **10**(4): p. 381-6.
284. Maine, G.N. and Burstein, E., *COMMD proteins and the control of the NF kappa B pathway*. Cell Cycle, 2007. **6**(6): p. 672-6.
285. Saccani, S., Marazzi, I., Beg, A.A. and Natoli, G., *Degradation of promoter-bound p65/RelA is essential for the prompt termination of the nuclear factor kappaB response*. J Exp Med, 2004. **200**(1): p. 107-13.
286. Strebovsky, J., Walker, P., Lang, R. and Dalpke, A.H., *Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) limits NFkappaB signaling by decreasing p65 stability within the cell nucleus*. FASEB J, 2011. **25**(3): p. 863-74.
287. Ryo, A., Suizu, F., Yoshida, Y., Perrem, K., Liou, Y.C., Wulf, G., Rottapel, R., Yamaoka, S. and Lu, K.P., *Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA*. Mol Cell, 2003. **12**(6): p. 1413-26.
288. Hou, Y., Moreau, F. and Chadee, K., *PPARgamma is an E3 ligase that induces the degradation of NFkappaB/p65*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 1300.
289. Huang, B., Yang, X.D., Lamb, A. and Chen, L.F., *Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway*. Cell Signal, 2010. **22**(9): p. 1282-90.
290. Chen, Z.J., *Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(8): p. 758-65.
291. Huang, H., Jeon, M.S., Liao, L., Yang, C., Elly, C., Yates, J.R., 3rd and Liu, Y.C., *K33-linked polyubiquitination of T cell receptor-zeta regulates proteolysis-independent T cell signaling*. Immunity, 2010. **33**(1): p. 60-70.
292. Tokunaga, F., *Linear ubiquitination-mediated NF-kappaB regulation and its related disorders*. J Biochem, 2013. **154**(4): p. 313-23.
293. Emmerich, C.H., Schmukle, A.C. and Walczak, H., *The emerging role of linear ubiquitination in cell signaling*. Sci Signal, 2011. **4**(204): p. re5.
294. Chen, J. and Chen, Z.J., *Regulation of NF-kappaB by ubiquitination*. Curr Opin Immunol, 2013. **25**(1): p. 4-12.
295. Dubois, S.M., Alexia, C., Wu, Y., Leclair, H.M., Leveau, C., Schol, E., Fest, T., Tarte, K., Chen, Z.J., Gavard, J. and Bidere, N., *A catalytic-independent role for the LUBAC in NF-kappaB activation upon antigen receptor engagement and in lymphoma cells*. Blood, 2014. **123**(14): p. 2199-203.
296. Sun, S.C., *Deubiquitylation and regulation of the immune response*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 501-11.
297. Massoumi, R., *Ubiquitin chain cleavage: CYLD at work*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(7): p. 392-9.
298. Wang, H., Kadlecsek, T.A., Au-Yeung, B.B., Goodfellow, H.E., Hsu, L.Y., Freedman, T.S. and Weiss, A., *ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(5): p. a002279.

299. Ma, A. and Malynn, B.A., *A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(11): p. 774-85.
300. Skaug, B., Chen, J., Du, F., He, J., Ma, A. and Chen, Z.J., *Direct, noncatalytic mechanism of IKK inhibition by A20*. Mol Cell, 2011. **44**(4): p. 559-71.
301. De, A., Dainichi, T., Rathinam, C.V. and Ghosh, S., *The deubiquitinase activity of A20 is dispensable for NF-kappaB signaling*. EMBO Rep, 2014.
302. Song, X.T., Evel-Kabler, K., Shen, L., Rollins, L., Huang, X.F. and Chen, S.Y., *A20 is an antigen presentation attenuator, and its inhibition overcomes regulatory T cell-mediated suppression*. Nat Med, 2008. **14**(3): p. 258-65.
303. Lu, T.T., Onizawa, M., Hammer, G.E., Turer, E.E., Yin, Q., Damko, E., Agelidis, A., Shifrin, N., Advincula, R., Barrera, J., Malynn, B.A., Wu, H. and Ma, A., *Dimerization and ubiquitin mediated recruitment of A20, a complex deubiquitinating enzyme*. Immunity, 2013. **38**(5): p. 896-905.
304. Park, Y., Jin, H.S. and Liu, Y.C., *Regulation of T cell function by the ubiquitin-specific protease USP9X via modulating the Carm1-Bcl10-Malt1 complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(23): p. 9433-8.
305. Keusekotten, K., Elliott, P.R., Glockner, L., Fiil, B.K., Damgaard, R.B., Kulathu, Y., Wauer, T., Hospenthal, M.K., Gyrd-Hansen, M., Krappmann, D., Hofmann, K. and Komander, D., *OTULIN antagonizes LUBAC signaling by specifically hydrolyzing Met1-linked polyubiquitin*. Cell, 2013. **153**(6): p. 1312-26.
306. Schaeffer, V., Akutsu, M., Olma, M.H., Gomes, L.C., Kawasaki, M. and Dikic, I., *Binding of OTULIN to the PUB domain of HOIP controls NF-kappaB signaling*. Mol Cell, 2014. **54**(3): p. 349-61.
307. Liang, J., Saad, Y., Lei, T., Wang, J., Qi, D., Yang, Q., Kolattukudy, P.E. and Fu, M., *MCP-induced protein 1 deubiquitinates TRAF proteins and negatively regulates JNK and NF-kappaB signaling*. J Exp Med, 2010. **207**(13): p. 2959-73.
308. Shaw, J.P., Utz, P.J., Durand, D.B., Toole, J.J., Emmel, E.A. and Crabtree, G.R., *Identification of a putative regulator of early T cell activation genes*. Science, 1988. **241**(4862): p. 202-5.
309. Macian, F., *NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(6): p. 472-84.
310. Jain, J., McCaffrey, P.G., Miner, Z., Kerppola, T.K., Lambert, J.N., Verdine, G.L., Curran, T. and Rao, A., *The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun*. Nature, 1993. **365**(6444): p. 352-5.
311. Jain, J., McCaffrey, P.G., Valge-Archer, V.E. and Rao, A., *Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun*. Nature, 1992. **356**(6372): p. 801-4.
312. Kaminuma, O., Kitamura, F., Kitamura, N., Hiroi, T., Miyoshi, H., Miyawaki, A. and Miyatake, S., *Differential contribution of NFATc2 and NFATc1 to TNF-alpha gene expression in T cells*. J Immunol, 2008. **180**(1): p. 319-26.
313. Serfling, E., Berberich-Siebelt, F. and Avots, A., *NFAT in lymphocytes: a factor for all events?* Sci STKE, 2007. **2007**(398): p. pe42.
314. Oh-hora, M. and Rao, A., *Calcium signaling in lymphocytes*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(3): p. 250-8.
315. Chuvpilo, S., Jankevics, E., Tyrsin, D., Akimzhanov, A., Moroz, D., Jha, M.K., Schulze-Luehrmann, J., Santner-Nanan, B., Feoktistova, E., Konig, T., Avots, A., Schmitt, E., Berberich-Siebelt, F., Schimpl, A. and Serfling, E., *Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis*. Immunity, 2002. **16**(6): p. 881-95.
316. Quesada, V., Diaz-Perales, A., Gutierrez-Fernandez, A., Garabaya, C., Cal, S. and Lopez-Otin, C., *Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **314**(1): p. 54-62.
317. Kleber, M. and Sommer, L., *Wnt signaling and the regulation of stem cell function*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(6): p. 681-7.
318. Cadigan, K.M. and Nusse, R., *Wnt signaling: a common theme in animal development*. Genes Dev, 1997. **11**(24): p. 3286-305.

319. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. and Kemler, R., *beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway*. EMBO J, 1997. **16**(13): p. 3797-804.
320. Lui, T.T., Lacroix, C., Ahmed, S.M., Goldenberg, S.J., Leach, C.A., Daulat, A.M. and Angers, S., *The ubiquitin-specific protease USP34 regulates axin stability and Wnt/beta-catenin signaling*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(10): p. 2053-65.
321. Bidere, N., Ngo, V.N., Lee, J., Collins, C., Zheng, L., Wan, F., Davis, R.E., Lenz, G., Anderson, D.E., Arnoult, D., Vazquez, A., Sakai, K., Zhang, J., Meng, Z., Veenstra, T.D., Staudt, L.M. and Lenardo, M.J., *Casein kinase 1alpha governs antigen-receptor-induced NF-kappaB activation and human lymphoma cell survival*. Nature, 2009. **458**(7234): p. 92-6.
322. Mu, J.J., Wang, Y., Luo, H., Leng, M., Zhang, J., Yang, T., Besusso, D., Jung, S.Y. and Qin, J., *A proteomic analysis of ataxia telangiectasia-mutated (ATM)/ATM-Rad3-related (ATR) substrates identifies the ubiquitin-proteasome system as a regulator for DNA damage checkpoints*. J Biol Chem, 2007. **282**(24): p. 17330-4.
323. Cheng, X., Alborzinia, H., Merz, K.H., Steinbeisser, H., Mrowka, R., Scholl, C., Kitanovic, I., Eisenbrand, G. and Wolfl, S., *Indirubin derivatives modulate TGFbeta/BMP signaling at different levels and trigger ubiquitin-mediated depletion of nonactivated R-Smads*. Chem Biol, 2012. **19**(11): p. 1423-36.
324. Poalas, K., Hatchi, E.M., Cordeiro, N., Dubois, S.M., Leclair, H.M., Leveau, C., Alexia, C., Gavard, J., Vazquez, A. and Bidere, N., *Negative regulation of NF-kappaB signaling in T lymphocytes by the ubiquitin-specific protease USP34*. Cell Commun Signal, 2013. **11**(1): p. 25.
325. Kwiecinska, A., Ichimura, K., Berglund, M., Dinets, A., Sulaiman, L., Collins, V.P., Larsson, C., Porwit, A. and Lagercrantz, S.B., *Amplification of 2p as a genomic marker for transformation in lymphoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2014.
326. Wan, F. and Lenardo, M.J., *Specification of DNA binding activity of NF-kappaB proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(4): p. a000067.
327. Wan, F. and Lenardo, M.J., *The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives*. Cell Res, 2010. **20**(1): p. 24-33.
328. Hayden, M.S. and Ghosh, S., *Signaling to NF-kappaB*. Genes Dev, 2004. **18**(18): p. 2195-224.
329. Stanborough, T., Niederhauser, J., Koch, B., Bergler, H. and Pertschy, B., *Ribosomal protein S3 interacts with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha*. FEBS Lett, 2014. **588**(5): p. 659-64.
330. Wan, F., Anderson, D.E., Barnitz, R.A., Snow, A., Bidere, N., Zheng, L., Hegde, V., Lam, L.T., Staudt, L.M., Levens, D., Deutsch, W.A. and Lenardo, M.J., *Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-kappaB complexes that mediates selective gene regulation*. Cell, 2007. **131**(5): p. 927-39.
331. Kapanadze, B., Kashuba, V., Baranova, A., Rasool, O., van Everdink, W., Liu, Y., Syomov, A., Corcoran, M., Poltarau, A., Brodyansky, V., Syomova, N., Kazakov, A., Ibbotson, R., van den Berg, A., Gizatullin, R., Fedorova, L., Sulimova, G., Zelenin, A., Deaven, L., Lehrach, H., Grander, D., Buys, C., Oscier, D., Zabarovsky, E.R., Einhorn, S. and Yankovsky, N., *A cosmid and cDNA fine physical map of a human chromosome 13q14 region frequently lost in B-cell chronic lymphocytic leukemia and identification of a new putative tumor suppressor gene, Leu5*. FEBS Lett, 1998. **426**(2): p. 266-70.
332. Corcoran, M.M., Hammarsund, M., Zhu, C., Lerner, M., Kapanadze, B., Wilson, B., Larsson, C., Forsberg, L., Ibbotson, R.E., Einhorn, S., Oscier, D.G., Grander, D. and Sangfelt, O., *DLEU2 encodes an antisense RNA for the putative bicistronic RFP2/LEU5 gene in humans and mouse*. Genes Chromosomes Cancer, 2004. **40**(4): p. 285-97.
333. Gatt, M.E., Takada, K., Mani, M., Lerner, M., Pick, M., Hideshima, T., Carrasco, D.E., Protopopov, A., Ivanova, E., Sangfelt, O., Grander, D., Barlogie, B., Shaughnessy, J.D., Jr., Anderson, K.C. and Carrasco, D.R., *TRIM13 (RFP2) downregulation decreases tumour cell growth in multiple myeloma through inhibition of NF Kappa B pathway and proteasome activity*. Br J Haematol, 2013. **162**(2): p. 210-20.
334. Zhou, W., Zeng, X. and Liu, T., *Aberrations of chromosome 13q in gastrointestinal stromal tumors: analysis of 91 cases by fluorescence in situ hybridization (FISH)*. Diagn Mol Pathol, 2009. **18**(2): p. 72-80.

335. Skoblov, M., Shakhbazov, K., Oshchepkov, D., Ivanov, D., Guskova, A., Ivanov, D., Rubtsov, P., Prasolov, V., Yankovsky, N. and Baranova, A., *Human RFP2 gene promoter: unique structure and unusual strength*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **342**(3): p. 859-66.
336. van Everdink, W.J., Baranova, A., Lummen, C., Tyazhelova, T., Looman, M.W., Ivanov, D., Verlind, E., Pestova, A., Faber, H., van der Veen, A.Y., Yankovsky, N., Vellenga, E. and Buys, C.H., *RFP2, c13ORF1, and FAM10A4 are the most likely tumor suppressor gene candidates for B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Cancer Genet Cytogenet, 2003. **146**(1): p. 48-57.
337. Bullrich, F., Fujii, H., Calin, G., Mabuchi, H., Negrini, M., Pekarsky, Y., Rassenti, L., Alder, H., Reed, J.C., Keating, M.J., Kipps, T.J. and Croce, C.M., *Characterization of the 13q14 tumor suppressor locus in CLL: identification of ALT1, an alternative splice variant of the LEU2 gene*. Cancer Res, 2001. **61**(18): p. 6640-8.
338. Mertens, D., Wolf, S., Schroeter, P., Schaffner, C., Dohner, H., Stilgenbauer, S. and Lichter, P., *Down-regulation of candidate tumor suppressor genes within chromosome band 13q14.3 is independent of the DNA methylation pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2002. **99**(11): p. 4116-21.
339. Elnenaei, M.O., Hamoudi, R.A., Swansbury, J., Gruszka-Westwood, A.M., Brito-Babapulle, V., Matutes, E. and Catovsky, D., *Delineation of the minimal region of loss at 13q14 in multiple myeloma*. Genes Chromosomes Cancer, 2003. **36**(1): p. 99-106.
340. Klein, U., Lia, M., Crespo, M., Siegel, R., Shen, Q., Mo, T., Ambesi-Impiombato, A., Califano, A., Migliazza, A., Bhagat, G. and Dalla-Favera, R., *The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia*. Cancer Cell, 2010. **17**(1): p. 28-40.
341. Lia, M., Carette, A., Tang, H., Shen, Q., Mo, T., Bhagat, G., Dalla-Favera, R. and Klein, U., *Functional dissection of the chromosome 13q14 tumor-suppressor locus using transgenic mouse lines*. Blood, 2012. **119**(13): p. 2981-90.
342. Lerner, M., Corcoran, M., Cepeda, D., Nielsen, M.L., Zubarev, R., Ponten, F., Uhlen, M., Hober, S., Grandér, D. and Sangfelt, O., *The RBCC gene RFP2 (Leu5) encodes a novel transmembrane E3 ubiquitin ligase involved in ERAD*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(5): p. 1670-82.
343. Tomar, D., Singh, R., Singh, A.K., Pandya, C.D. and Singh, R., *TRIM13 regulates ER stress induced autophagy and clonogenic ability of the cells*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(2): p. 316-26.
344. Tomar, D., Prajapati, P., Sripada, L., Singh, K., Singh, R., Singh, A.K. and Singh, R., *TRIM13 regulates caspase-8 ubiquitination, translocation to autophagosomes and activation during ER stress induced cell death*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(12): p. 3134-44.
345. Bianchini, E., Fanin, M., Mamchaoui, K., Betto, R. and Sandona, D., *Unveiling the degradative route of the V247M alpha-sarcoglycan mutant responsible for LGMD-2D*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(14): p. 3746-58.
346. Altier, C., Garcia-Caballero, A., Simms, B., You, H., Chen, L., Walcher, J., Tedford, H.W., Hermosilla, T. and Zamponi, G.W., *The Cavbeta subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels*. Nat Neurosci, 2011. **14**(2): p. 173-80.
347. Bernasconi, R., Galli, C., Calanca, V., Nakajima, T. and Molinari, M., *Stringent requirement for HRD1, SEL1L, and OS-9/XTP3-B for disposal of ERAD-LS substrates*. J Cell Biol, 2010. **188**(2): p. 223-35.
348. Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G. and Ktistakis, N.T., *Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum*. J Cell Biol, 2008. **182**(4): p. 685-701.
349. Joo, H.M., Kim, J.Y., Jeong, J.B., Seong, K.M., Nam, S.Y., Yang, K.H., Kim, C.S., Kim, H.S., Jeong, M., An, S. and Jin, Y.W., *Ret finger protein 2 enhances ionizing radiation-induced apoptosis via degradation of AKT and MDM2*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(5): p. 420-31.

350. Kapanadze, B., Makeeva, N., Corcoran, M., Jareborg, N., Hammarsund, M., Baranova, A., Zabarovsky, E., Vorontsova, O., Merup, M., Gahrton, G., Jansson, M., Yankovsky, N., Einhorn, S., Oscier, D., Grander, D. and Sangfelt, O., *Comparative sequence analysis of a region on human chromosome 13q14, frequently deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia, and its homologous region on mouse chromosome 14*. Genomics, 2000. **70**(3): p. 327-34.
351. Baranova, A., Hammarsund, M., Ivanov, D., Skoblov, M., Sangfelt, O., Corcoran, M., Borodina, T., Makeeva, N., Pestova, A., Tyazhelova, T., Nazarenko, S., Gorreta, F., Alsheddi, T., Schlauch, K., Nikitin, E., Kapanadze, B., Shagin, D., Poltarau, A., Ivanovich Vorobiev, A., Zabarovsky, E., Lukianov, S., Chandhoke, V., Ibbotson, R., Oscier, D., Einhorn, S., Grander, D. and Yankovsky, N., *Distinct organization of the candidate tumor suppressor gene RFP2 in human and mouse: multiple mRNA isoforms in both species- and human-specific antisense transcript RFP2OS*. Gene, 2003. **321**: p. 103-12.
352. Versteeg, G.A., Rajsbaum, R., Sanchez-Aparicio, M.T., Maestre, A.M., Valdiviezo, J., Shi, M., Inn, K.S., Fernandez-Sesma, A., Jung, J. and Garcia-Sastre, A., *The E3-ligase TRIM family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors*. Immunity, 2013. **38**(2): p. 384-98.
353. Rajsbaum, R., Versteeg, G.A., Schmid, S., Maestre, A.M., Belicha-Villanueva, A., Martinez-Romero, C., Patel, J.R., Morrison, J., Pisanelli, G., Miorin, L., Laurent-Rolle, M., Moulton, H.M., Stein, D.A., Fernandez-Sesma, A., tenOever, B.R. and Garcia-Sastre, A., *Unanchored K48-Linked Polyubiquitin Synthesized by the E3-Ubiquitin Ligase TRIM6 Stimulates the Interferon-IKKEpsilon Kinase-Mediated Antiviral Response*. Immunity, 2014. **40**(6): p. 880-95.
354. Garding, A., Bhattacharya, N., Claus, R., Ruppel, M., Tschuch, C., Filarsky, K., Idler, I., Zucknick, M., Caudron-Herger, M., Oakes, C., Fleig, V., Keklikoglou, I., Allegra, D., Serra, L., Thakurela, S., Tiwari, V., Weichenhan, D., Benner, A., Radlwimmer, B., Zentgraf, H., Wiemann, S., Rippe, K., Plass, C., Dohner, H., Lichter, P., Stilgenbauer, S. and Mertens, D., *Epigenetic upregulation of lncRNAs at 13q14.3 in leukemia is linked to the In Cis downregulation of a gene cluster that targets NF-kB*. PLoS Genet, 2013. **9**(4): p. e1003373.
355. Hatchi, E.M., Poalas, K., Cordeiro, N., N'Debi, M., Gavard, J. and Bidere, N., *Participation of the E3-ligase TRIM13 in NF-kappaB p65 activation and NFAT-dependent activation of c-Rel upon T-cell receptor engagement*. Int J Biochem Cell Biol, 2014. **54C**: p. 217-222.
356. Luik, R.M., Wang, B., Prakriya, M., Wu, M.M. and Lewis, R.S., *Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 538-42.
357. Hotamisligil, G.S., *Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease*. Cell, 2010. **140**(6): p. 900-17.
358. Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H. and Johansen, T., *p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death*. J Cell Biol, 2005. **171**(4): p. 603-14.
359. Paul, S., Traver, M.K., Kashyap, A.K., Washington, M.A., Latoche, J.R. and Schaefer, B.C., *T cell receptor signals to NF-kappaB are transmitted by a cytosolic p62-Bcl10-Malt1-IKK signalosome*. Sci Signal, 2014. **7**(325): p. ra45.
360. Hay, N., *The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer*. Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 179-83.
361. Dan, H.C., Cooper, M.J., Cogswell, P.C., Duncan, J.A., Ting, J.P. and Baldwin, A.S., *Akt-dependent regulation of NF-kappaB is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK*. Genes Dev, 2008. **22**(11): p. 1490-500.
362. Madrid, L.V., Mayo, M.W., Reuther, J.Y. and Baldwin, A.S., Jr., *Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 18934-40.
363. Sizemore, N., Lerner, N., Dombrowski, N., Sakurai, H. and Stark, G.R., *Distinct roles of the Ikappa B kinase alpha and beta subunits in liberating nuclear factor kappa B (NF-kappa B) from Ikappa B and in phosphorylating the p65 subunit of NF-kappa B*. J Biol Chem, 2002. **277**(6): p. 3863-9.

364. Alarcon-Vargas, D. and Ronai, Z., *p53-Mdm2--the affair that never ends*. Carcinogenesis, 2002. **23**(4): p. 541-7.
365. Tanaka, T., Grusby, M.J. and Kaisho, T., *PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF-kappaB activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit*. Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 584-91.
366. Ryo, A., Liou, Y.C., Lu, K.P. and Wulf, G., *Prolyl isomerase Pin1: a catalyst for oncogenesis and a potential therapeutic target in cancer*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 5): p. 773-83.
367. Muratani, M. and Tansey, W.P., *How the ubiquitin-proteasome system controls transcription*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(3): p. 192-201.
368. Conaway, R.C., Brower, C.S. and Conaway, J.W., *Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation*. Science, 2002. **296**(5571): p. 1254-8.
369. Yang, X.Y., Wang, L.H., Chen, T., Hodge, D.R., Resau, J.H., DaSilva, L. and Farrar, W.L., *Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT*. J Biol Chem, 2000. **275**(7): p. 4541-4.
370. Konstantinos Poalas, "*Ubiquitinylation and deubiquitinylation in the regulation of the transcription factor NF-κB activation*", Thèse de doctorat en Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire, sous la direction de Nicolas Bidère et Aimé Vazquez, Villejuif, Université Paris Sud, 2013. 149 p.