



Le rôle de l'ubiquitination et des endomembranes dans l'activation du facteur de transcription NF- κ B

Naïma Zemirli

► To cite this version:

Naïma Zemirli. Le rôle de l'ubiquitination et des endomembranes dans l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T068 . tel-01127111

HAL Id: tel-01127111

<https://theses.hal.science/tel-01127111>

Submitted on 7 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.

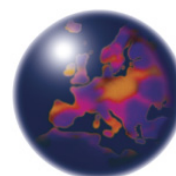


Comprendre le monde,
construire l'avenir®



Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche méd



ÉCOLE DOCTORALE
CANCÉROLOGIE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 418 :
DE CANCÉROLOGIE

Laboratoire : *INSERM U1014*
Régulation de la survie cellulaire et des allogreffes

Thèse sur travaux

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

par

Naïma ZEMIRLI

Rôle de l'ubiquitination et des endomembranes dans
l'activation du facteur de transcription NF- κ B

Date de soutenance : **24/11/2014**

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Damien ARNOULT	CR1-CNRS. Hôpital Paul BROUSSE
Rapporteurs :	Stephen GIRARDIN Pierre-Olivier VIDALAIN	DR-Université de Toronto CR1-CNRS. Institut Pasteur
Examineurs :	Jean-François PEYRON Célio POUPONNOT	DR-INSERM, centre méditerranéen de médecine moléculaire, Nice CR-CNRS. Institut Curie

Tables des matières

Abréviations	6
Résumé.....	9
Introduction.....	10
 I - NF-κB.....	 11
1. Prologue	11
2. NF- κ B en physiologie et physiopathologie	14
3. La famille NF- κ B.....	16
1. Les membres NF- κ B pourvus d'un domaine de transactivation TAD	17
a) p65/RelA.....	17
b) RelB.....	18
c) C-Rel.....	19
2. Les membres NF- κ B dépourvus du domaine de transactivation TAD.....	19
4. Régulation de l'activité des facteurs de transcription NF- κ B.....	21
1. La famille I κ B.....	21
a) Les I κ Bs typiques/professionnels: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ	22
b) Les I κ Bs atypiques : BCL-3, I κ B ζ , I κ BNS	24
c) Les I κ Bs précurseurs p105/NF- κ B1 et p100/NF- κ B2	25
2. Le complexe IKK	26
a) Les sous-unités catalytiques IKK α et IKK β	27
b) La sous-unité régulatrice NEMO	27
5. Les voies d'activation	28
1. La voie classique/ canonique	28
2. La voie alterne/ non canonique.....	29
 II. L' ubiquitination	 30
1. Concept général:	30
2. Mécanisme et enzymes	32
1. L'enzyme d'activation E1.....	33
2. L'enzyme de conjugaison E2.....	34
3. Les ligases E3	34
a) Les HECTs	35
b) Les RINGs.....	35
3. Déubiquitination	36
1. Classification des DUBs.....	36
2. Les fonctions des DUBs	39
4. Ubiquitination et NF- κ B	40
1. Rôle de l'ubiquitination dans la régulation de NF- κ B.....	40
a) Rôle de l'ubiquitination de type K48	40
b) Rôle de l'ubiquitination de type K63	43
c) Rôle de l'ubiquitination linéaire.....	44
d) Autres types d'ubiquitination	46
2. Les DUBs dans la voie NF- κ B	47
a) A20	48

b) CYLD	48
c) Autres Déubiquitinases.....	49
3. Survol de certaines voies de signalisation aboutissant à l'activation de NF- κ B	50
a) Signalisation en aval de la stimulation du TNF-Récepteur	50
b) Autres voies de signalisation.....	55
III. La dynamique mitochondriale	58
1. La mitochondrie: Présentation et caractéristiques générales	58
2. Les phénomènes de fusion et de fission mitochondriale	59
1. Généralités	59
2. Acteurs et mécanistique de la dynamique mitochondriale	61
3. Pertinence fonctionnelle de la dynamique mitochondriale.....	64
IV. Notions de base sur certains organites cités dans ce manuscrit.....	65
1. Appareil de Golgi:	65
2. Réticulum endoplasmique	66
V. Description du projet	68
Résultats.....	70
The E3 ubiquitin ligase RNF121 is a positive regulator of NF- κ B activation	71
Mitochondrial hyperfusion promotes NF- κ B activation via the mitochondrial E3 ligase MULAN	108
Discussion et perspectives	128
I. RNF121 comme régulateur positif de NF- κ B	129
II. L'hyperfusion mitochondriale induit à l'activation de NF- κ B via l'E3 ligase MULAN.....	140
III. Vue d'ensemble sur l'implication des organites dans l'activation de NF- κ B	147
Conclusion	152
Annexes.....	153
Références bibliographiques.....	168

Abréviations

A20	TNFAIP3: Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
ADP	Adénosine diphosphate
AMP	Adénosine monophosphate
APF-1	ATP-dependant Proteolysis Factor 1
ARD	Ankyrin repeat domain
ATAD3A	ATPase family, AAA domain containing 3A
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adénosine Triphosphate
BAFF	B-cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor (TNF) family
BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10
BCR	B-cell receptor
BIR	Baculoviral IAP repeat
CARD	Caspase recruitment domain
CARMA1	CARD and MAGUK scaffold protein 1
CBM	CARMA1-MALT1-BCL10 complex
cIAP	cellular Inhibitor of apoptosis
CYLD	Cylindromatosis
DD	Death Domain
DUB	Deubiquitylase
ER	Endoplasmic reticulum
ERAD	Endoplasmic Reticulum Associated Degradation
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FADD	Fas associated death domain protein
GDAP1	Ganglioside- induced differentiation-associated protein 1
GRR	Glycin-Rich Region
GTP	Guanosine triphosphate
HECT	Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus
HOIL-1L	Heme-oxidized IRP2 ligase-1
HOIP	HOIL-1L interacting protein
IBD	IKK Binding Domain
IBR	In between RING domain
IFN	Interferon
IKK	I κ B kinase
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
IRF	Interferon regulatory transcription factor
I κ B	Inhibitor of NF- κ B
ITCH	Immune Modulatory Protein
JAMM	JAB1/MPN/Mov37 metalloproteases
JNK	JUN N-terminal kinase
KD	Kinase Domain

LPS	Lipopolysaccharide
LUBAC	Linear ubiquitin chain assembly complex
MALT1	Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAVS	Mitochondrial antiviral-signaling protein
MCPIP	Monocyte chemotactic protein-induced protein
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MGC	Mammalian genome Collection
Mgm	Mitochondrial genome maintenance
MJD	Machado-Josephin domain
MOD	Minimal Oligomerisation Domain
MTDH	Metadherin
Mtf	Mitofusine
MULAN	Mitochondrial ubiquitin ligase activating NF- κ B
MYD88	Myeloid differentiation primary response protein 88
NBD	NEMO-Binding Domain
NEMO	NF- κ B essential modulator
NES	Nuclear Export Sequence
NF- κ B	Nuclear factor of immunoglobulin κ -light chain enhancer in activated B-cells
NIH	National Institute of Health
NIK	NF- κ B inducing kinase
NLR	NOD-like receptor
NLS	Nuclear Localisation Sequence
NOD	Nucleotide-binding oligomerisation domain
NRP	NEMO-Related Protein
NZF	NPL4 zinc finger
Optn	Optineurin
OTU	Ovarian tumour domain
PKA	Protein kinase A
PTM	Post-translational modification
RBX1	RING-box protein 1
RRBCK1	RanBP-type and C3HC4-type zinc finger-containing protein 1
RHD	REL-homology domain
RID	Rel inhibitor domain
RING	Really interesting new gene
RIP	Receptor-interacting protein kinase
RKTG	RAF Kinase Trapping to Golgi
RLR	RIG-I-like receptor
RNF	RING-finger protein
ROC1	Regulator of cullins 1
S1P	sphingosine 1-phosphate
SCF	SKP1-CUL1-F-box-protein
SDD	Scaffold/Dimerisation Domain
SIMH	Stress-Induced Mitochondrial Hyperfusion
SKP1	S-phase kinase-associated protein 1
SLP-2	Stromatin-Like Protein 2
SUMO	Small Ubiquitin-like MOdifier
TAB	TAK1-binding protein
TAD	Transactivation Domain
TAK1	TGF β -activated kinase 1
TAX1BP1	TAX1 Binding Protein1
TCR	T-cell receptor
TLR	Toll-like receptor

TNFR	Tumour necrosis factor receptor
TNF α	Tumour necrosis factor α
TRADD	TNFR1-associated death domain protein
TRAF	TNF-receptor-associated factor
TUCAN	Transmetteurs ubiquitinyliées conduisant à l'activation de NF- κ B
UBA	Ubiquitin-associated domain
UBA6	Ubiquitin-like modifier activating enzyme 6
UBAN	Ubiquitin binding in ABIN and NEMO domain
UBC	Ubiquitin Conjugating
UBD	Ubiquitin-binding domain
UBE1	Ubiquitin-activating enzyme 1
UBE1L2	Ubiquitin-activating E1-Like protein 2
UBL	Ubiquitin-like domain
UCH	Ubiquitin C-terminal hydrolases
ULD	Ubiquitin-Like Domain
UPR	Unfolded Protein Response
UPS	Ubiquitin Proteasome System
USP	Ubiquitin-specific protease
β -TrCP	beta-transducing repeat containing E3 ubiquitin protein ligase

Résumé

Le facteur de transcription NF- κ B régule l'expression d'une pléthore de gènes impliqués dans divers processus physiologiques notamment la prolifération et la survie cellulaire, l'inflammation ainsi que les réponses immunes. Il intervient également dans de nombreux processus pathologiques à l'exemple de certains cancers et maladies auto-immunes.

L'activation de NF- κ B suite à l'engagement de différents immunorécepteurs requiert la mise en place de larges signalosomes formés suite au recrutement de différents adaptateurs au niveau des immunorécepteurs engagés. Ces adaptateurs subissent des ubiquitinations non-dégradatives nécessaires pour la transduction du signal. Nous avons démontré dans un précédent travail que ces protéines ubiquitinylées s'accumulent au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) *via* la protéine réticulaire Métadhérine (MTDH). De plus, nos résultats suggèrent que l'ubiquitination est un prérequis nécessaire à l'adressage de ces protéines au RE. Afin d'évaluer la contribution des E3 ubiquitine ligases en charge de relayer NF- κ B au niveau des organites, nous avons effectué le crible d'une banque de siRNAs dirigés contre les 46 E3 ligases transmembranaires en utilisant comme modèle la signalisation du TNF récepteur. Ce crible nous a permis d'identifier l'E3 ligase RNF121 comme régulateur positif de NF- κ B. Bien que le mécanisme d'action de RNF121 ne soit pas complètement élucidé, nos données suggèrent qu'il agirait au niveau de la régulation de l'inhibiteur de NF- κ B « I κ B α ».

Durant la deuxième partie de cette thèse, je me suis intéressée à la dynamique mitochondriale. Les mitochondries sont des organites dynamiques, dont la forme est maintenue grâce à une balance entre deux processus antagonistes appelés : fission et fusion. Il a été rapporté qu'en présence de certains stress modérés, les mitochondries hyperfusent, ce processus est appelé SIMH (Stress-Induced Mitochondrial Hyperfusion). Nous avons pu démontrer que la SIMH s'accompagne de l'activation de la voie canonique du facteur de transcription NF- κ B *via* l'E3 ubiquitine ligase mitochondriale MULAN. Nos résultats suggèrent que durant le SIMH, MULAN forme un complexe avec TRAF2 et module son ubiquitination, suggérant ainsi que TRAF2 serait un TUCAN (Transmetteurs Ubiquitinylé Conduisant à l'Activation de NF- κ B) dans cette voie. Ces résultats suggèrent que la mitochondrie, de part sa dynamique, convertit un signal de stress en un signal de survie *via* l'activation de NF- κ B. Pris dans leur ensemble, nos résultats illustrent la complexité de la régulation de NF- κ B par ubiquitination et attribuent aux organites un nouveau rôle dans la transduction de la signalisation.

Introduction

I - NF-κB

1. Prologue

Dans les cellules eucaryotes, la transcription de nombreux gènes est modulée en réponse à des stimuli extra-cellulaires. Les variations d'expression des gènes transcrits en réponse à divers agents tels que les hormones stéroïdes, les facteurs de croissance et les promoteurs tumoraux, etc. sont dues à l'action de diverses séquences-Cis-régulatrices. Les plus connues sont les "enhancers" qui présentent une grande flexibilité de position par rapport au gène qu'ils contrôlent, et les "promoteurs" qui sont confinés à la région 5' non codante du gène d'intérêt. Ces éléments cis-régulateurs contiennent des séquences spécifiques permettant la fixation des protéines. La présence de ces sites d'interaction ADN-protéine suggère que l'occupation des éléments Cis-régulateurs par des facteurs transactivateurs (protéines) est une étape cruciale pour l'activité transcriptionnelle des gènes qu'ils soient constitutifs ou inducibles.

Il y a vingt huit ans...

Sen et Baltimore, deux chercheurs du « Massachusetts Institute of Technology » cherchaient à identifier les facteurs pouvant se lier aux séquences « enhancers » des immunoglobulines (Ig). Leur intérêt s'est porté sur les séquences « enhancers » des immunoglobulines, car elles ont été les premières à être identifiées comme étant spécifiques d'un tissu donné. En effectuant une expérience de retard sur gel (EMSA), ils définirent trois facteurs présentant une affinité aux enhancers des Immunoglobulines. Le premier appelé NF-A a été retrouvé au niveau de tous les types cellulaires testés, il se lie à une séquence octamérique conservée se trouvant en amont de la région variable de toutes les immunoglobulines mais aussi à la même séquence se trouvant sur l'enhancer des chaînes lourdes μ . Le deuxième facteur, également ubiquitaire, a été retrouvé lié aux enhancers des chaînes lourdes μ et légères κ des immunoglobulines, contrairement au troisième facteur, qui lui présente une forte affinité uniquement à l'enhancer des chaînes légères des immunoglobulines. L'activité de ce dernier est liée à la différenciation de la lignée B car elle n'existe pas au stade pré-B mais apparaît dans les cellules matures B et les plasmocytes. C'est à partir de ces deux observations majeures que ce facteur a été appelé **"Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-κB"** [1].

Au cours de la même année, D. Baltimore et son équipe ont démontré que l'activité transcriptionnelle de NF- κ B est inductible et cela suite à une expérience de retard sur gel effectuée sur des extraits nucléaires issus de cellules murines 70Z/3. Ce sont des cellules phénotypiquement pré-B, car elles ne synthétisent que des chaînes μ cytoplasmiques mais aucune chaîne légère. Cependant, elles contiennent un gène kappa fonctionnellement réarrangé mais non transcrit. La stimulation par le LPS a induit la transcription des gènes Kappa au niveau des cellules 70Z/3. Ces cellules sont ainsi passées de l'état pré-B à l'état B de manière dépendante de NF- κ B. De plus, il a également été établi que NF- κ B peut être induit suite à un traitement aux esters de phorbol (agents pro-tumoraux) au niveau des cellules B et T, mais aussi des cellules non lymphoïdes HeLa [2].

A l'exception des cellules B matures, NF- κ B ne pouvait pas être détecté au niveau des extraits nucléaires des différentes lignées étudiées, à moins que ces dernières soient stimulées avec l'ester de phorbol, notamment le phorbol myristate acétate (PMA). De plus l'induction de NF- κ B ne requiert pas de synthèse protéique. En effet l'utilisation de certains inhibiteurs de la synthèse protéique tels que la cycloheximide, n'empêche pas l'induction de NF- κ B, suggérant ainsi que l'activation de ce facteur implique la conversion d'un précurseur inactif en une forme active suite à des modifications post-traductionnelles [3].

Peu de temps après sa découverte, plusieurs zones d'ombre entourant l'activation de NF- κ B ont été élucidées. En 1988, suite à différentes expériences, il a été clairement établi que NF- κ B se retrouvait sous deux formes. La première, présentant une activité de liaison à l'ADN et se trouvant dans les fractions nucléaires des cellules stimulées à la PMA. La seconde forme a été détectée au niveau des fractions cytosoliques des cellules non stimulées, cependant elle n'est active qu'en présence d'agents dissociants tels que le Deoxycholate de sodium (DOC). La conversion de la forme inactive de NF- κ B en une forme active suite au traitement par la PMA ou le DOC, ainsi que la distribution subcellulaire de ces deux formes, suggèrent que l'activation de NF- κ B se met en place suite à un processus faisant intervenir au moins deux étapes à savoir une dé-répression de l'activité de liaison à l'ADN suivie d'une translocation nucléaire. Grâce à des expériences de retard sur gel, Baeuerle et Baltimore font une autre découverte majeure. En effet, ils identifient une protéine cytosolique comme étant à l'origine de l'inhibition de NF- κ B. Cette protéine initialement décrite d'environ 70 kDa fut appelée I κ B. Ce résultat a permis de déchiffrer une partie du mécanisme moléculaire régissant l'induction de NF- κ B et selon lequel, un complexe cytosolique "facteur de transcription-inhibiteur" serait

dissocié sous l'effet des esters de phorbol (PMA). Le facteur de transcription ainsi libéré transloque dans le noyau [4].

En plus de leur capacité à induire NF- κ B, les esters de phorbol présentent la particularité d'activer la protéine kinase C. Il a donc été supposé que la PKC était impliquée dans le processus d'activation de NF- κ B en inactivant son inhibiteur « I κ B » par phosphorylation. Cette hypothèse a donc permis d'introduire la phosphorylation comme étant un éventuel mécanisme régulant NF- κ B.

En 1989, NF- κ B est décrit comme étant un dimère composé d'une sous-unité de 50 kDa (p50) présentant un domaine de liaison à l'ADN, et d'une deuxième sous-unité de 65 kDa ne se liant pas à l'ADN, mais qui est requise pour la liaison de NF- κ B à son inhibiteur I κ B [5]. Un an plus tard, le clonage de la sous-unité p50 a révélé une forte homologie avec l'oncogène v-rel, son homologue cellulaire c-rel ainsi que le gène de la drosophile dorsal, avec lesquels il partage un domaine N-terminal de 300 acides aminés appelé "Rel homology domain, RHD". De même pour la sous-unité p65 qui a également été décrite comme appartenant à la famille Rel [6]. Les protéines de cette famille possèdent un domaine conservé: Rel Homology Domain (RHD) qui permet leur dimérisation et leur liaison à l'ADN via une séquence de localisation nucléaire NLS [7]. La famille Rel s'est vite agrandie avec la découverte de deux autres sous-unités NF- κ B, p52 et RelB [8, 9].

Ce n'est qu'après dix ans d'intenses recherches, que fut identifié le complexe kinase responsable de la phosphorylation de l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B [10]. Les sous-unités de ce complexe IKK α , IKK β et NEMO ont été décrites simultanément par de nombreux groupes [11-17].

Après plus de 25 ans, jamais un facteur de transcription n'a suscité pareil engouement, avec plus de 40000 publications depuis sa découverte. Aujourd'hui NF- κ B est synonyme d'immunité et inflammation, développement et apoptose, survie et prolifération...(Figure 1) [18]

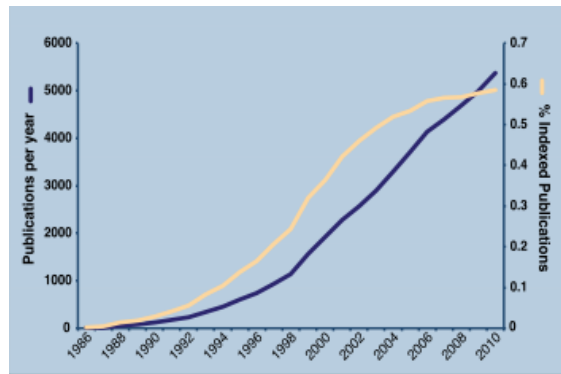


Figure 1. Vingt-cinq ans de littérature sur NF- κ B. Graphe indiquant le nombre total de publications identifiées sur PubMed suite à l'utilisation des mots clé : NF- κ B, Rel ou IKK (axe de gauche). L'axe de droite représente le pourcentage de ces publications par rapport au nombre total de publications indexées sur PubMed [19].

2. NF- κ B en physiologie et physiopathologie

La régulation de l'expression des gènes est un élément central de la physiologie et est la clé de la capacité des organismes multicellulaires à s'adapter aux différents stress environnementaux (mécaniques, chimiques et microbiologiques). Depuis sa découverte, NF- κ B a servi de modèle dans l'étude des facteurs de transcription inductibles. Les nombreux stimuli qui activent NF- κ B et le grand nombre de gènes régulés par celui-ci font de lui un sujet d'intenses recherches.

Beaucoup de nos connaissances actuelles sur NF- κ B découlent des efforts visant la compréhension du fonctionnement et de la régulation des réponses immunitaires [20]. En effet, NF- κ B joue son plus important rôle dans le système immunitaire en régulant l'expression d'inducteurs et d'effecteurs agissant à différents stades de la réponse immune. En plus de son rôle au cours du développement des organes lymphoïdes, de la différenciation et de la maturation des cellules immunitaires, NF- κ B est également impliqué au cours du processus inflammatoire, des réponses aux différents agents microbiens, ainsi que lors de l'activation des récepteurs antigéniques [21]. L'implication de NF- κ B ne se limite pas au système immunitaire, il intervient également dans le contrôle de la transcription de certains gènes impliqués dans divers processus cellulaires fondamentaux tels que la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Figure 2) [22].

Parce que de nombreux processus cellulaires clés sont sous le control de NF- κ B, il n'est pas surprenant qu'une dérégulation de ce facteur de transcription soit à l'origine de multiples maladies. Dans ce contexte, de nombreux travaux ont été dédiés à la compréhension de l'implication de NF- κ B dans le développement des cancers. Suite à ces recherches, il a été clairement établi que ce facteur de transcription jouait un double rôle. D'une part l'activation de NF- κ B est accompagnée d'une importante activité des cellules immunitaires cytotoxiques qui attaquent et éliminent les cellules cancéreuses. D'autre part, une activité constitutive de NF- κ B a été détectée dans de nombreux types de cancer et exerce une variété de fonctions pro-tumorigènes notamment en promouvant une prolifération incontrôlée et en augmentant le potentiel angiogénique et métastatique des tumeurs.

En plus de son rôle dans la cancérogenèse, NF- κ B est également impliqué dans d'autres pathologies telles que des maladies auto-immunes ainsi que certaines maladies neurodégénératives [18, 23-27].

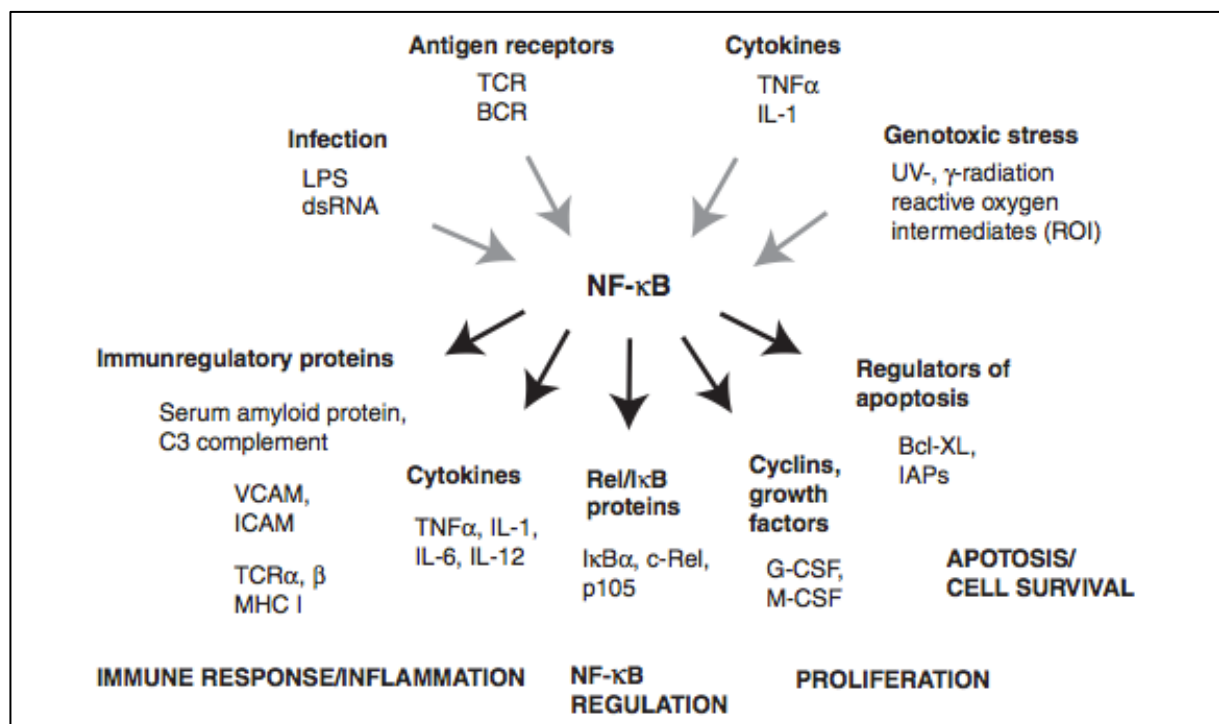


Figure 2. Certains stimuli activant NF- κ B et ses différentes cibles [28].

3. La famille NF- κ B

Chez les mammifères, la famille des facteurs de transcription NF- κ B est constituée de cinq membres: **p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF- κ B1) et p100/52 (NF- κ B2)**. Ces protéines partagent en N-terminal, un domaine conservé de 300 acides aminés appelé « **Rel homology domain** » (**RHD**). Ce domaine contient des séquences nécessaires à la dimérisation, la fixation à l'ADN, l'interaction avec les protéines I κ B (Inhibitors of κ B) ainsi qu'à la translocation nucléaire des protéines NF- κ B grâce à une séquence signal spécifique **NLS (Nuclear Localisation Sequence)**. Les analyses de la structure cristallographique ont révélé que la partie N-terminale du RHD était impliquée dans la liaison à l'ADN, tandis que la partie C-terminale serait importante lors des interactions protéine-protéine (Figure 3) [29].

Les membres de la famille NF- κ B ne sont transcriptionnellement actifs que sous forme d'homo ou d'hétéro-dimères. D'un point de vue statistique, les protéines Rel peuvent former jusqu'à 15 combinaisons possibles. Toutefois l'existence physiologique de tous les dimères possibles n'a pas été démontrée. Le complexe p50/p65 est l'hétérodimère le plus abondant, il est retrouvé au niveau de presque tous les types cellulaires [30].

Les protéines NF- κ B peuvent être divisées en 2 classes, différant par la séquence C-terminale en aval du domaine RHD. Les sous-unités RelA, RelB et c-Rel possèdent un domaine de transactivation « TAD » dont sont dépourvus les isoformes p50 et p52. Cette différence structurale explique pourquoi les hétéro- ou homodimères contenant RelA, RelB et c-Rel sont généralement des activateurs transcriptionnels, tandis que complexes homodimériques p50 et p52 se comportent le plus souvent comme des répresseurs de la transcription des gènes cibles [31].

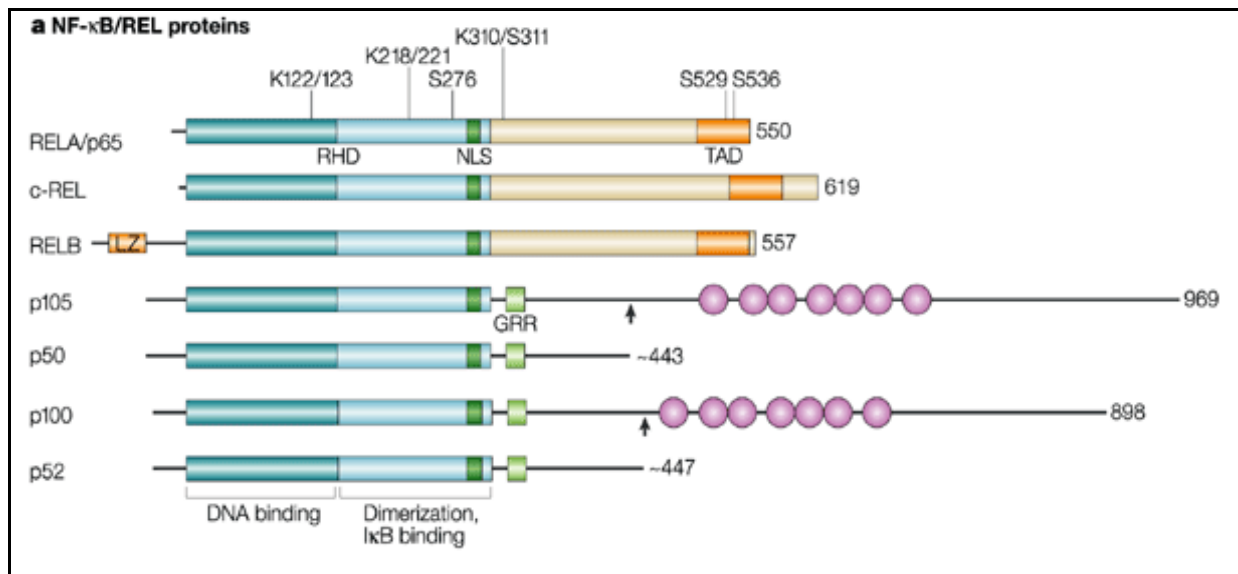


Figure 3. Structure des sous-unités NF- κ B: RelA/p65, c-Rel, RelB, p105, p50, p100 et p52. Les principaux domaines structuraux ainsi que le nombre d'acides aminés pour chaque protéine sont représentés. RHD (Rel Homology Domain); NLS (Nuclear Localisation Sequence); TAD (Transactivation Domain) ; GRR (Glycin-Rich Region); Motifs ankyrine (Cercles rose sur le schéma). Certains résidus de RelA sont la cible de modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation...) essentielles à la régulation de ses fonctions [32].

1. Les membres NF- κ B pourvus d'un domaine de transactivation TAD

a) p65/RelA

RelA est une protéine ubiquitaire, possédant un domaine de transactivation subdivisé en TA1 et TA2 [33, 34]. Elle assure la transcription de gènes impliqués dans diverses fonctions notamment l'inflammation et le cycle cellulaire (Tableau 1) [35]. De plus, la génération de souris RelA^{-/-} a permis de mettre en évidence le rôle anti-apoptotique de NF- κ B. En effet, ces souris meurent à un stade embryonnaire précoce d'une apoptose hépatique massive induite par le TNF- α (Tableau 2) [36, 37]. RelA a également été décrit comme étant capable d'interagir avec les différents composants de la machinerie transcriptionnelle ainsi qu'avec divers coactivateurs et complexes chromatinien. En plus de sa régulation par son inhibiteur « I κ B α », l'activité transcriptionnelle de RelA est modulée par certaines modifications post-traductionnelles qui vont agir sur sa capacité de dimérisation, de liaison à l'ADN et de recrutement des co-facteurs transcriptionnels [38]. En effet, RelA possède plusieurs sites de phosphorylation, notamment la Ser276 ciblée par la PKA, la Ser536 ciblée par les sous-unités

catalytiques IKK [39], et plusieurs sites phosphorylés par la caséine-kinase-2 [40, 41]. Elle contient également plusieurs sites d'ubiquitination et d'acétylation sur de multiples résidus lysine [42].

Table 1 Proposed role of different REL dimers in the action of selected target genes			
Rel proteins	Proposed dimerization partners	Selected target genes	References
RELA	RELA-RELA homodimer	<i>IL8</i> , type-VII collagen, <i>ICAM1</i>	105-107
	RELA-p50	<i>IκBα</i> , <i>IL8</i> , <i>IL6</i> , <i>TNFα</i> , <i>GM-CSF</i> , <i>HIV1</i>	9,105,108-111
	RELA-c-REL	<i>uPA</i> , <i>IL2Rα</i> , <i>MCP1</i>	112-114
RELB	no homodimer		
	RELB-p50	<i>MDC</i>	115
	RELB-p52	<i>SLC</i> , <i>ELC</i> , <i>MDC</i>	115,116
c-REL	c-REL-c-REL homodimer	<i>IL8</i>	105
	c-REL-p50	<i>IL12/p40</i> , <i>IL12/p35</i> , <i>IL2Rα</i>	113,117,118
p50	p50-p50 homodimer	<i>TNFα</i> , <i>IL6</i> , MHCII-associated invariant-chain gene	108,109,119
	p50-BCL3	<i>BCL2</i>	120
p52	p52-p52 homodimer	MHCII-associated invariant-chain gene	119
	p52-BCL3	<i>Cyclin D1</i> , <i>BCL2</i>	120,121

BCL, B-cell leukaemia/lymphoma; ELC, EBV-induced-molecule-1 ligand chemokine; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HIV1, human-immunodeficiency virus-1; ICAM1, intercellular adhesion molecule-1; IL, interleukin; IL-2Rα, interleukin-2 receptor-α; MDC, macrophage-derived chemokine; MHCII, major histocompatibility complex-II; MCP1, monocyte chemoattractant protein-1; SLC, secondary-lymphoid-tissue chemokine; TNFα, tumour necrosis factor-α; uPA, human urokinase.

Tableau 1. Différentes combinaisons des dimères NF-κB et leurs fonctions [32]

b) RelB

Identifié comme membre NF-κB en 1992, RelB est la seule protéine NF-κB à ne former que des hétérodimères *in vivo* [9], RelB s'exprime de manière constitutive au niveau des cellules lymphocytaires et des cellules dendritiques. Son expression dans d'autres cellules de l'immunité (macrophages, neutrophiles, etc) nécessite une stimulation. Contrairement aux souris *RelA*^{-/-}, les souris *RelB*^{-/-} survivent *in utero* mais meurent quelques jours après la naissance suite à de multiples lésions pathologiques caractérisées principalement par des défauts au cours des réponses inflammatoires, du lignage hématopoïétique ainsi que lors de la formation des structures lymphoïdes secondaires (Tableau 2) [43-46].

Seul membre NF-κB à posséder un domaine « Leucine zipper » (LZ) nécessaire à son activité transcriptionnelle [47], RelB n'est pas contrôlé par les inhibiteurs de la famille des IκBs. Une fois exprimée, la protéine RelB est très labile. Sa stabilisation est assurée suite à son interaction avec la sous-unité NF-κB2 [48]. NF-κB2 se présente sous deux isoformes : p100 et p52. En absence de stimulation, RelB se lie principalement à p100 qui assure sa séquestration dans le cytosol et réprime ainsi son activité. A l'inverse, la stimulation des cellules induit le

clivage de p100 en p52, qui associé à RelB, permet la formation d'un hétérodimère transcriptionnellement fonctionnel [48].

De plus, 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. Ce mode de dégradation inductible, comparable à celui des inhibiteurs de NF- κ B introduit RelB comme régulateur négatif de NF- κ B. Ce rôle inhibiteur est également soutenu par les travaux de Marienfeld et ses collaborateurs qui ont montré que RelB peut séquestrer RelA dans des dimères cytosoliques et nucléaires insensibles aux I κ Bs et transcriptionnellement inactifs [49, 50].

c) C-Rel

Initialement décrit comme étant l'homologue cellulaire de v-Rel, un oncogène du rétrovirus aviaire Rev-T, c-Rel est principalement exprimé par les cellules hématopoïétiques. Il a été décrit comme étant impliqué notamment lors de la prolifération et la différenciation des cellules lymphocytaires. Il agit également dans la régulation des gènes codant pour des protéines impliquées lors de la réponse immune notamment l'IL-2 et FOXP3. Ceci explique l'immunodéficiência qui caractérise les souris c-Rel^{-/-} (Tableau 2) [51, 52]. Structurellement proche de RelA avec lequel il partage le même domaine transactivateur divisé en deux sub-domaines TAD1 et TAD2, c-Rel possède en plus un domaine inhibiteur RID (Rel inhibitor domain), localisé entre le domaine amino-terminal RHD et le domaine carboxy-terminal TAD. Une mutation de cette région induit une amélioration de la liaison de c-Rel à l'ADN et augmente ainsi son activité transactivatrice [53]. La protéine c-Rel est retrouvée sous forme d'homo ou d'hétérodimères qu'elle forme préférentiellement avec la sous-unité p50.

2. Les membres NF- κ B dépourvus du domaine de transactivation TAD

a) NF- κ B1/p50 et NF- κ B2/p52

Les sous-unités p50 et p52 dérivent de précurseurs cytoplasmiques, respectivement p105 et p100. Les protéines matures sont générées à partir des précurseurs par un processus protéolytique médié par le protéasome [54]. La synthèse de p50 à partir de son précurseur est

généralement un processus constitutif, à l'inverse, la maturation de p100 est un processus induit par différents signaux extracellulaires [55]. Bien que dépourvus d'un domaine de transactivation, p50 et p52 peuvent réguler positivement la transcription lorsqu'ils sont associés aux protéines NF- κ B possédant un TAD. Toutefois les homodimères p50 et p52 répriment la transcription des gènes, en effet leur liaison à l'ADN empêche la fixation des dimères transcriptionnellement actifs. Les protéines p50 et p52 se distinguent également des autres protéines NF- κ B par la présence à leur extrémité C-terminale de multiples copies de motifs ankyrine, comparables à celles retrouvées au niveau de l'inhibiteur de NF- κ B « I κ B » [56].

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

Tableau 2. Phénotype des souris KO pour les membres de la famille NF- κ B [57]

Les protéines NF- κ B citées précédemment présentent différents variants issus de l'épissage alternatif de leurs pré-ARNm respectifs. Les différentes isoformes générées peuvent jouer des rôles opposés. A titre d'exemple, les variants de RelA « p65 Δ , p65 Δ 2 et p65 Δ 3 » agissent comme des régulateurs négatifs de la voie NF- κ B, tandis que le variant « RelAp43 » jouerait plutôt un rôle activateur. Aussi, contrairement à p105 (NF- κ B1) le variant « p98NF- κ B1 » peut se lier à l'ADN et présente en plus un potentiel transactivateur [58, 59]. La présence de tels variants apporte à la voie de signalisation NF- κ B un niveau supplémentaire de complexité.

4. Régulation de l'activité des facteurs de transcription NF- κ B

L'activation de NF- κ B est déclenchée suite à divers stimuli : (1) Agression extracellulaire aboutissant généralement à la fixation d'un ligand à son récepteur comme par exemple la famille des récepteurs au TNF (auxquels se lient TNF- α , CD40...), les récepteurs des lymphocytes B et T, la famille des récepteurs Toll-like (auxquels se lient des composants microbiens tel le LPS ou les acides nucléiques viraux...); (2) « Stress » intracellulaire tel un dommage à l'ADN ou la production mitochondriale de dérivés actifs de l'oxygène. Chacun de ces stimuli implique le recrutement d'un ensemble de protéines intermédiaires, adaptatrices ou régulatrices spécifiques qui œuvrent pour la libération des dimères NF- κ B de leurs inhibiteurs cytosoliques et permettre ainsi leur translocation nucléaire.

Etant donné sa grande capacité à influencer l'expression de nombreux gènes, l'activation de NF- κ B est finement régulée et cela à de multiples niveaux. D'une part, l'activation de NF- κ B est contrôlée par son interaction avec ses inhibiteurs de la famille des I κ Bs ainsi que par les kinases spécifiques de ces protéines (IKKs). D'une autre part, un certain nombre de modifications post-traductionnelles (phosphorylation, ubiquitination, etc) modulent également cette activité.

1. La famille I κ B

Selon le modèle classique, les dimères NF- κ B potentiellement actifs sont séquestrés dans le cytoplasme suite à leur interaction avec les protéines de la famille I κ B, qui masquent leurs motifs NLS (Nuclear Localization Signals) empêchant ainsi leur translocation nucléaire et leur fixation à l'ADN [60, 61]. Les protéines I κ Bs sont caractérisées par la présence de multiples domaines riches en résidus Ankyrine «Ankyrin repeat domain» (ARD) favorisant les interactions protéine-protéine [61, 62].

L'activation de NF- κ B se met en place une fois les dimères NF- κ B dissociés de leur inhibiteur I κ B. Cela commence par la phosphorylation de l'inhibiteur au niveau de résidus sérine localisés généralement au niveau de régions conservées appelées : motif Degron (-DSGXXS-) [61, 63]. Cette étape permet la reconnaissance des substrats phosphorylés par des ubiquitine ligases spécifiques qui assurent leur ubiquitination. Les protéines ainsi marquées, vont être dirigées vers le protéasome où elles seront dégradées ou partiellement digérées (Figure 4).

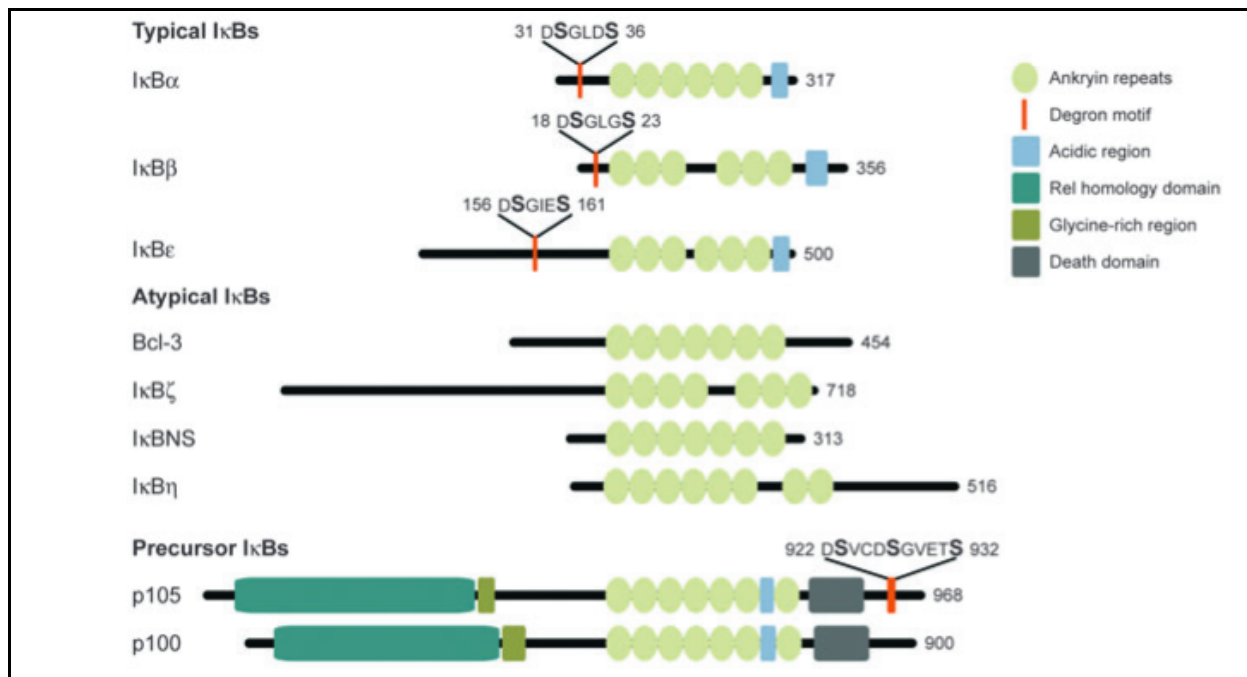


Figure 4. Les protéines de la famille des IκBs. L'organisation des domaines et la structure des motifs trouvés dans les IκBs humains. La base de donnée Uniprot a été utilisée comme référence pour la séquence protéique des membres de la famille IκB [61].

Les protéines IκBs sont classées en trois grandes catégories :

a) Les IκBs typiques/professionnels: IκBα, IκBβ, IκBε

➤ IκBα, le prototype

C'est le membre le plus étudié et le mieux caractérisé de la famille des IκBs. Il s'associe préférentiellement aux dimères p50/p65 à la fois dans le cytoplasme, empêchant ainsi leur translocation nucléaire, mais aussi au niveau du noyau où il assure leur dissociation de l'ADN ainsi que leur export du noyau [64], grâce à une séquence d'export nucléaire (NES) dont il dispose [61, 65]. En effet, il a été démontré que les complexes IκBα/p50/p65 « naviguent » entre le cytoplasme et le noyau, ceci est probablement dû à un masquage incomplet des séquences NLS. Néanmoins, ce caractère dynamique favorise la localisation cytoplasmique à l'état quiescent [66]. De nombreux stimuli dont les ligands de TLRs et les cytokines telles que le TNFα et l'IL-1, mènent à une rapide phosphorylation d'IκBα au niveau des Serines 32 et 36 [16, 67]. Cette phosphorylation, bien que nécessaire, ne suffit pas à la libération des dimères NF-κB [68]. IκBα doit en outre être ubiquitinylé puis dégradé par le protéasome afin de permettre l'activation. En effet, la forme phosphorylée est reconnue par le complexe d'E3

ligase $\text{SCF}^{\beta\text{TRCP}}$ (SKP1-Culin-Roc1/Rbx1/Hrt1-F-box βTrCP) qui va assurer la formation des chaînes de polyubiquitines au niveau de ce substrat [69, 70]. S'ensuit alors la dégradation d'I κ B α par le protéasome permettant ainsi la libération puis la translocation nucléaire des dimères p50/p65. La présence de plusieurs sites κB au niveau du promoteur du gène NFKBIA (codant pour la protéine I κ B α) fait que l'activation de NF- κB entraîne la transcription et la néo-synthèse de son propre inhibiteur, instaurant ainsi une boucle de rétro-contrôle négatif. Cet événement offre la possibilité de mettre fin à l'activité transcriptionnelle et de réguler de près l'intensité de la réponse [32].

➤ I κ B β , le mystérieux

I κ B β partage de nombreuses propriétés fonctionnelles et structurales avec I κ B α à l'instar de sa phosphorylation au niveau de deux résidus Sérines. D'un point de vue cinétique, I κ B β subit une lente dégradation et resynthèse par rapport à I κ B α [61, 71]. I κ B β se caractérise par son rôle complexe dans la régulation de NF- κB . En effet, il présente la capacité d'être à la fois un régulateur positif et négatif de l'activité transcriptionnelle de NF- κB et cela selon sa localisation dans la cellule. D'une part, I κ B β cytosolique agit comme inhibiteur traditionnel de NF- κB , en séquestrant dans ce compartiment les dimères NF- κB (préférentiellement p65/c-Rel). D'autre part, l'induction par certains stimuli, de la dégradation d'I κ B β et par conséquent l'activation du facteur de transcription NF- κB conduit, entre autre, à la synthèse d'I κ B β . Toutefois, ce dernier est synthétisé sous forme hypophosphorylée et transloque dans le noyau où il se fixe sur les dimères NF- κB déjà liés à l'ADN. Ceci a pour conséquence de permettre une activité transcriptionnelle continue. En effet, cette liaison protège les dimères NF- κB d'I κ B α qui a tendance à inhiber cette activité [72-74].

➤ I κ B ϵ , le lent

Il s'agit du membre le moins caractérisé et dont le rôle reste encore mal établi. A l'instar des autres I κ Bs typiques, il contient deux sites de phosphorylation (Sérine 157 et 161) et subit une dégradation dépendante de $\text{SCF}^{\beta\text{TRCP}}$. Tout comme I κ B β , il subit une très lente dégradation après stimulation. De plus I κ B ϵ partage avec I κ B α la capacité de faire des « va-et-vient » entre le cytoplasme et le noyau. Contrairement aux deux autres I κ Bs typiques qui sont principalement ubiquitaires, I κ B ϵ n'est retrouvé qu'au niveau des cellules hématopoïétiques[75, 76].

Différentes souris KO ont été générées dans le but d'étudier le rôle des protéines I κ Bs. Si les

souris KO pour I κ B α meurent quelques jours après la naissance suite à des défauts de développement, celles qui sont déficientes en I κ B β et I κ B ϵ sont viables, mais affichent des défauts subtils dans le système immunitaire tels que l'augmentation de l'expression de certaines cytokines (Tableau 3) [57]. De manière intéressante, la déplétion combinée des trois I κ Bs typiques dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) n'induit qu'une légère augmentation du p65 nucléaire [77]. Ceci peut être expliqué par la compensation de l'activité de séquestration des I κ Bs typiques par d'autres protéines inhibitrices. Cependant, l'activité basale de liaison à l'ADN a été fortement augmentée mais aucune activation n'a été détectée après stimulation en comparaison aux cellules sauvages. Ces observations mènent à conclure que les I κ Bs typiques servent d'une part, à empêcher la formation des complexes NF- κ B /ADN à l'état quiescent, et d'autre part, à permettre la réponse à certains stimuli, étant donné qu'en leur absence, les dimères NF- κ B se fixent sur d'autres facteurs cellulaires qui empêcheraient leur liaison à l'ADN (Tableau 4) [61, 77].

IκB family	
I κ B α	Die postnatally owing to immune deficiency, inflammatory dermatitis and granulocytosis; constitutive NF- κ B activity increased in lymphocytes, but not in MEFs
I κ B α and NF- κ B1	Attenuated phenotype of I κ B α -knockout mice
I κ B β knock-in to I κ B α knockout	Rescues the defects of I κ B α -null mice
I κ B ϵ	No defect in NF- κ B activation; lack severe immune defects
Bcl-3	Disrupted splenic architecture
NF- κ B1 Δ C (p105)	Die postnatally owing to immune deficiency
NF- κ B2 Δ C (p100)	Die postnatally owing to immune deficiency

Tableau 3. Phénotype des souris KO pour les protéines de la famille des I κ Bs [57].

b) Les I κ Bs atypiques : BCL-3, I κ B ζ , I κ BNS

Initialement, les protéines I κ Bs étaient considérées comme de simples inhibiteurs de l'activation de NF- κ B. Mais avec le nombre croissant des I κ Bs atypiques, notre compréhension de ces protéines a évolué vers un modèle plus complexe. Les I κ Bs atypiques, notamment BCL-3, I κ B ζ et I κ BNS sont principalement localisés au niveau du noyau et assurent une large variété de fonctions. Le niveau d'expression de ces protéines est relativement faible dans les cellules au repos, mais augmente considérablement en réponse à certains stimuli, notamment lors de l'engagement des récepteurs antigéniques des cellules B et T. **BCL-3** se distingue des autres protéines I κ Bs par la présence d'un domaine TAD et peut

agir comme répresseur ou activateur transcriptionnel selon sa localisation ainsi que la nature des modifications post-traductionnelles (MPTs) qu'il aura subi. De son côté, **IκBζ** est un activateur transcriptionnel inductible alors que **IκBNS** est un répresseur inductible. Ces protéines, bien que moins étudiées que les IκBs typiques, restent des maillons essentiels dans les mécanismes de contrôle de l'activité transcriptionnelle de NF-κB [61, 78].

c) Les IκBs précurseurs p105/NF-κB1 et p100/NF-κB2

La protéine **p105** codée par le gène NFKB1 est clivée de manière constitutive et partielle par le protéasome à un stade co- ou post-traductionnel, aboutissant ainsi à la libération d'une protéine « mature » appelée p50. Le précurseur p105 dispose à la fois de motifs RHD et ARD. Il contient également une région riche en glycines lui servant de signal stop à la protéolyse, afin de permettre la libération du fragment p50. Ce dernier contient uniquement le motif RHD [79-81]. Le rôle et le destin des protéines synthétisées dépendent principalement du pool des partenaires disponibles dans la cellule à un moment donné. D'une part, p105 peut agir comme un IκB classique en se fixant sur les dimères NF-κB déjà existant. Dans ce cas, le processus de clivage constitutif est inhibé. D'autre part, la présence de sous-unités NF-κB libres, par exemple p65, favorise la formation de dimères p105/p65, qui après clivage donnent naissance aux dimères p50/p65. Il est évident que la polyvalence de p105/p50 ajoute un niveau de régulation supplémentaire à l'ensemble du mécanisme. Dans ce contexte, les expériences de triple déplétion des IκBs typiques ont montré une augmentation de la quantité de p105 dans les cellules, probablement dans le but de s'associer aux dimères NF-κB afin de contrôler leur activation [61, 82].

La protéine **p100** codée par le gène NFKB2 contient également les deux motifs RHD et ARD. Cette propriété lui confère la possibilité d'agir à la fois comme les IκB typiques en maintenant principalement les dimères NF-κB dans le cytosol, ou alors de subir un clivage par le protéasome. Contrairement à p105, ce processus de clivage n'est pas constitutif, et il aboutit à la libération du fragment p52. Ce dernier est capable de se lier à l'ADN grâce au motif RHD dont il dispose [61]. Qu'elle soit sous forme de précurseur (p100) ou mature (p52), cette protéine a la capacité de se lier aux autres sous-unités NF-κB notamment RelB dont elle assure la stabilité [48]. Etant résistant à l'action inhibitrice d'IκBα, le dimère RelB/p52 peut promouvoir une transcription tardive. Cependant, dans certains cas, RelB peut réprimer la transcription des gènes [82].

En conclusion, le destin des protéines p105 et p100 dépend du pool des sous-unités NF- κ B disponibles dans la cellule à un moment donné et selon les circonstances.

Proteins	Induction/ NF- κ B target	Signal-mediated degradation	Binding preferences	Promoter recruitment	Function
I κ B α	++/yes	+++	Heterodimeric NF- κ B DNA-bound NF- κ B	<i>In vitro</i> (NMR)	Sequesters NF- κ B in the cytoplasm; removes DNA-bound NF- κ B, cytoplasmic-nuclear shuttle
I κ B β I (P)* I κ B β I (HP)*	+ (delayed)/no	++ n.d.	Heterodimeric NF- κ B p65:c-Rel	– ChIP	Sequesters NF- κ B in the cytoplasm Coactivator of p65:c-Rel, TNF α $\uparrow$, IL-1 β $\uparrow$
I κ B β 2 [†] I κ B ϵ Bcl-3	+ (delayed)/no + (delayed)/yes ++/yes	–/+ ++ n.d.	Heterodimeric NF- κ B Heterodimeric NF- κ B p50:p50, p52: p52	– – EMSA, DNA- pull-down, ChIP	Sequesters NF- κ B in the cytoplasm Sequesters NF- κ B in the cytoplasm Cyclin D1 $\uparrow$, MDM2 $\uparrow$, cytokine expression $\downarrow$, gene expression profile
I κ B ζ	++/yes	n.d.	p50:p50	ChIP	IL-6 $\uparrow$, TNF α $\downarrow$ gene expression profile
I κ BNS	++/yes	n.d.	p50:p50	DNA-pull-down ChIP	IL-2 $\uparrow$ IL-6 $\downarrow$ gene expression profile
I κ B η p105	– or +/no ++/yes	n.d. ++	p50:p50 NF- κ B monomers and dimers	n.d. –	Cytokines, e.g. IL-1 β , IL-6 $\uparrow$ Sequesters NF- κ B in the cytoplasm
p100	++/yes	–	RelB	–	Sequesters NF- κ B in the cytoplasm

NF- κ B, nuclear factor- κ B; n.d., not determined.
 *I κ B β can occur as phosphorylated (P) or as hypophosphorylated (HP) species.
[†]Human splice variant. $\downarrow$ and $\uparrow$ denote respectively decrease or increase in transcription.

Tableau 4. Fonctions et propriétés des I κ Bs [61]

2. Le complexe IKK

Après la mise en évidence de l'importance de la phosphorylation dans le processus de dégradation des I κ Bs et par conséquent dans l'activation de NF- κ B, il était question d'identifier les kinases à l'origine de ce processus (**les I κ B Kinase**).

Initialement, le complexe IKK a été identifié comme une énorme kinase phosphorylant I κ B α et nécessitant une ubiquitination non-dégradative pour son activation [10]. Des études biochimiques ont permis par la suite d'établir que le complexe IKK d'un poids moléculaire d'environ 700 kDa est composé de deux kinases IKK α et IKK β , ainsi que d'une troisième protéine appelée IKK γ ou NEMO (NF- κ B Essential Modulator) (Figure 5). Cependant, le poids de ces trois protéines réunies n'excède pas 220 kDa, ce qui laisse supposer la présence de sous-unités additionnelles et qu'IKK présente une structure oligomérique. Bien que la constitution exacte de ce complexe n'a pas encore été définie, il semble probable qu'il soit constitué d'un hétérodimère IKK α /IKK β associé à un homodimère NEMO/NEMO (IKK α 1:IKK β 1:NEMO2) ainsi que d'autres partenaires pas encore caractérisés [83-85].

L'identification de ce complexe kinase constitue un tournant décisif dans la recherche sur NF- κ B étant donné l'importance de la régulation de l'interaction de NF- κ B avec son inhibiteur.

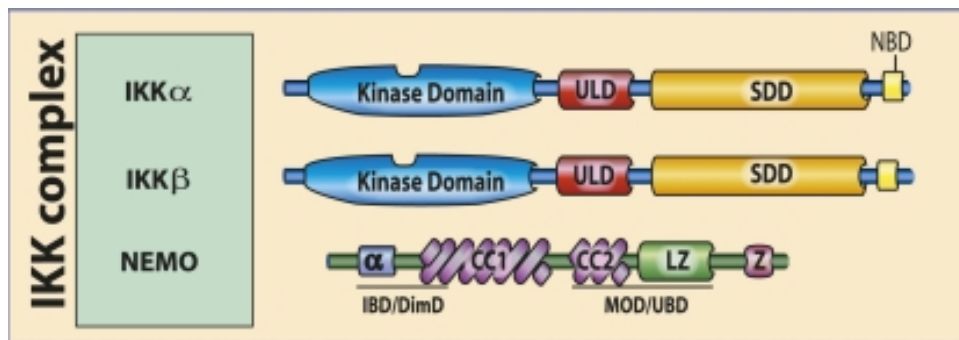


Figure 5. Les protéines du complexe IKK : IKK α (IKK1 ou CHUK), IKK β (IKK2) et NEMO (IKK γ). Les domaines pertinents pour chaque protéine sont indiqués. LZ: Leucine zipper domain, SDD: Scaffolding and dimerisation domain, ULD: Ubiquitin-like domain, Z: zinc finger domain, CC: Coiled-coil domain, NBD: NEMO-binding domain, IBD/DimD: IKK-binding domain/dimerisation domain, MOD/UBD: minimal oligomerisation domain/ubiquitin-binding domain [19].

a) Les sous-unités catalytiques IKK α et IKK β

Ces deux kinases sont fortement homologues et présentent une identité de séquence de plus de 50%. Elles disposent d'un domaine kinase (Kinase Domain, KD) leur conférant leur activité catalytique, d'un domaine de dimérisation (Scaffold/Dimerisation Domain, SDD), d'un domaine ULD (Ubiquitin-Like Domain) crucial pour leur activation catalytique ainsi que d'un domaine de liaison à la sous-unité NEMO (NEMO-Binding Domain, NBD). L'activation de ces sous-unités est tributaire de leur dimérisation ainsi que de la phosphorylation de certains résidus notamment les S176 et S180 pour IKK α , et S177 et S181 pour IKK β [11, 13, 15, 16, 83, 84, 86-88].

b) La sous-unité régulatrice NEMO

NEMO ne possède pas de domaine catalytique et est structuellement différent de ces deux partenaires IKK α et IKK β . NEMO contient un domaine permettant son interaction avec les autres protéines du complexe (IKK Binding Domain, IBD), deux domaines de liaison à l'ubiquitine (Ubiquitin Binding Domain, UBD) nécessaires à l'activation du complexe ainsi qu'un domaine d'oligomérisation (Minimal Oligomerisation Domain, MOD). Des mutations au niveau de ce domaine réduisent considérablement l'activation de NF- κ B, indiquant ainsi

que l'oligomérisation de NEMO est importante pour son activité régulatrice [14, 17, 84, 88-93].

L'organisation structurale du complexe IKK peut fournir les conditions nécessaires afin d'entraîner une trans auto-phosphorylation après stimulation. Aussi, l'agrégation des différentes molécules pourrait augmenter la proximité de ce complexe avec les kinases impliquées dans son activation. Deux kinases d'IKK (IKK-K) sont connues, il s'agit de TGF β -activated kinase 1 (TAK1) ainsi que NF- κ B Inducing Kinase (NIK). Selon le signal déclencheur, ces deux kinases induisent l'activation d'IKK et par conséquent celle de NF- κ B de deux manières distinctes. De plus, des expériences visant à inactiver les gènes codant pour les différentes sous-unités IKK ont révélé que l'activation de NF- κ B est accomplie suivant deux voies mécanistiquement différentes à savoir les voies **canonique et non canonique**.

5. Les voies d'activation

1. La voie classique/ canonique

La voie d'activation de NF- κ B dite classique ou canonique, a été décrite dans la plupart des types cellulaires. Cette voie est stimulée par un large éventail de récepteurs impliqués dans la réponse à divers stimuli tels que les récepteurs des cytokines inflammatoires (TNF α , IL-1 β etc), les récepteurs Toll-like ainsi que les récepteurs antigéniques (TCR et BCR). Cette voie est également enclenchée en réponse aux radiations et à divers stress cellulaires. La voie canonique est rapide et implique un recrutement dépendant de l'ubiquitine de certaines molécules permettant la transduction du signal et aboutissant à l'activation des sous-unités IKK α et IKK β . La sous-unité NEMO ainsi que la kinase TAK1 constituent des éléments clés lors de l'activation de cette voie. Cette voie joue un rôle central dans la régulation du complexe hétérodimérique RelA/p50 et participe au contrôle des homodimères RelA et des complexes RelA/c-Rel (Figure 6) [87, 94-96] .

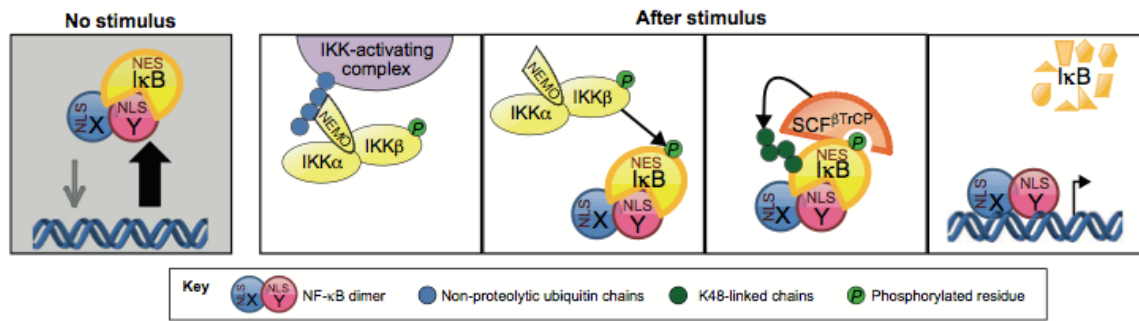


Figure 6. Schéma représentant la voie canonique de NF-κB [94]

2. La voie alterne/ non canonique

Moins fréquemment observée, cette voie est activée suite à un nombre restreint de stimuli, appartenant essentiellement à la famille du TNF tels que : CD40, Lymphotoxine α et β et BAFF (B-cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor (TNF) family). L'activation de cette voie aboutit généralement à l'activation du dimère p52/RelB suite au clivage de p100. NIK (NF-κB Inducing Kinase) constitue un élément clé lors de l'activation de cette voie. En effet, elle assure la phosphorylation et par conséquent l'activation d'IKK α , qui à son tour permet la phosphorylation du précurseur p100 et par conséquent son clivage par le protéasome. Sous des conditions normales, NIK est constamment dégradé suite à une ubiquitination dégradative catalysée par un complexe contenant les E3 ligases TRAF2 (TNF Receptor-Associated Factor 2), TRAF3 ainsi que les cIAP1/2 (Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 and 2). En réponse aux stimuli précédemment cités, NIK se retrouve sous forme stable suite à la dégradation des TRAF2 et 3 par cIAP1/2, permettant ainsi l'activation de la voie non canonique. Aucune des sous-unités IKK β ou NEMO n'est essentielle à son activation. Bien que moins caractérisée que la voie canonique, cette voie joue un rôle crucial dans le développement des organes lymphoïdes responsable de la génération des lymphocytes T et B (Figure 7)[97-99].

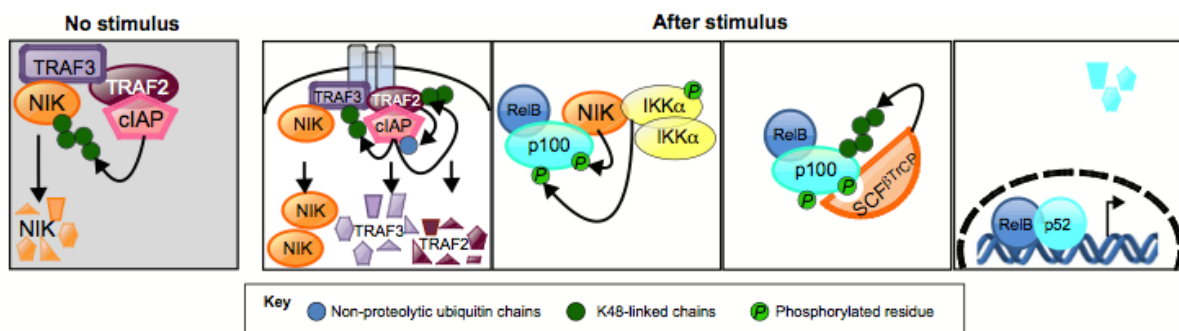


Figure 7. Schéma représentant la voie non canonique [94]

II. L' UBIQUITINATION

1. Concept général:

C'est en voulant comprendre par quels mécanismes l'ATP participe à la dégradation des protéines que Aaron Ciechanover et son équipe caractérise l'ubiquitine, baptisée alors APF-1 (ATP-dépendant Proteolysis Factor 1). La liaison covalente d'APF-1 à une protéine cible conduit à sa dégradation par le protéasome de manière ATP-dépendante [100-103]. Ce mécanisme correspond au système UPS (Ubiquitin Proteasome System) [104]. Depuis, une multitude de travaux a été dédiée à cette petite molécule et à la description de son implication dans les différents processus physiologiques.

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'attachement covalent d'une molécule d'ubiquitine sur une protéine cible. Plus de 80% des protéines cellulaires sont sujettes à ce processus [105]. L'ubiquitine tire son nom de son caractère « ubiquitaire » et présente un degré élevé de conservation au cours de l'évolution.

L'attachement de l'ubiquitine se fait *via* une liaison isopeptidique qui se met en place entre le résidu glycine se trouvant à l'extrémité C-terminale (G76) de la molécule d'ubiquitine et un résidu Lysine de la protéine cible. D'autres acides aminés ont également été décrits comme étant capable de recevoir l'ubiquitine, notamment la thréonine, la cystéine et la sérine. Tout substrat peut être étiqueté avec une seule molécule d'ubiquitine, c'est la mono-ubiquitination, ou par une chaîne d'ubiquitines plus ou moins longue résultant en la poly-ubiquitination du substrat (Figure 8). De plus, la mono-ubiquitination peut avoir lieu sur une seule lysine ou sur différents résidus lysine conduisant à une multiple mono-ubiquitination ou multi-ubiquitination [106-110].

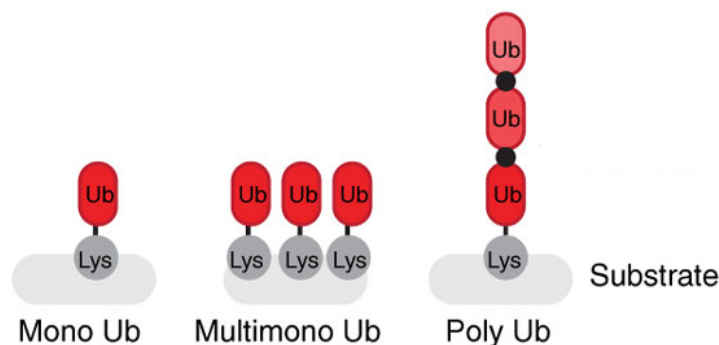


Figure 8. Mono-, multimono- ou poly-ubiquitination [111]

La molécule d'ubiquitine contient sept résidus lysine (Lys ou K), et chacune de ces lysines peut accueillir une molécule d'ubiquitine lors de la formation des chaînes de poly-ubiquitine. De plus, le résidu méthionine (Met ou M) se trouvant à l'extrémité N-terminale peut également recevoir les molécules d'ubiquitines. De ce fait, huit types de chaînes de poly-ubiquitine peuvent être formées correspondant aux huit sites receveurs : K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63 et M1 ; et c'est selon le résidu impliqué dans la formation des chaînes de poly-ubiquitine que sera déterminé le devenir de la protéine cible (Figure 9) [109, 111, 112].

La réaction d'ubiquitination possède de nombreuses conséquences et la manière dont le lien covalent d'ubiquitine est interprété dans la cellule dépend, dans de nombreux cas, de facteurs supplémentaires comme la localisation subcellulaire du substrat ou le nombre et la topologie des ubiquitines conjuguées au substrat. Les ubiquitinations les mieux caractérisées à ce jour sont les chaînes de type K48 et K63, dans lesquelles une molécule d'ubiquitine est liée au niveau de sa G76 à la lysine 48 et 63 de l'ubiquitine suivante, respectivement. Ces différentes ubiquitinations engendrent des processus cellulaires différents. Par exemple, les protéines marquées par des chaînes de poly-ubiquitine impliquant les lysines K48 et K11 sont orientées vers le protéasome en vue d'être dégradées. A l'inverse, les ubiquitinations impliquant les résidus K63 ou M1 sont fortement impliquées dans les régulations non protéolytiques [113-115].

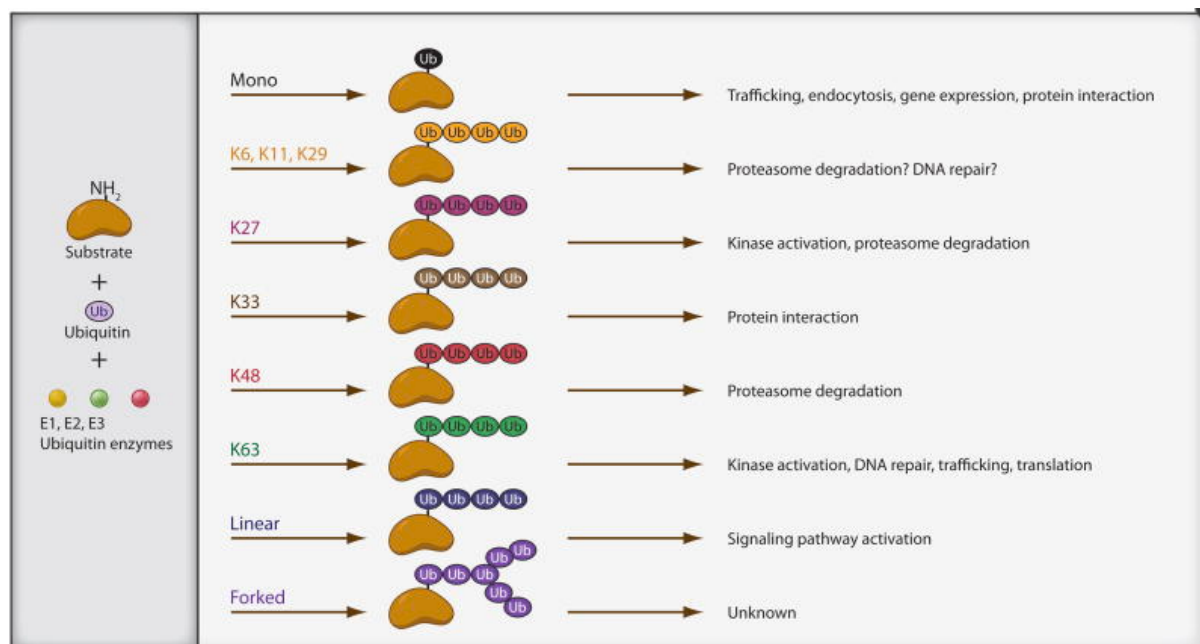


Figure 9. Les types d'ubiquitination et leurs fonctions [116]

Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose ont reçu le prix Nobel de chimie en 2004 pour avoir découvert que les chaînes d'ubiquitine de type K48 induisent la dégradation de la protéine substrat par le protéasome [117, 118]. Cette dégradation fut donc la première fonction attribuée à l'ubiquitination, mais également la mise en évidence d'une dégradation indépendante des lysosomes [97-100]. La dégradation des protéines par le protéasome suite à leur ubiquitination joue un rôle essentiel dans l'élimination des protéines endommagées et dans la régulation de temps de vie des protéines dans de nombreux processus biologiques. La dégradation des protéines ubiquitinylées se fait par une protéinase multicatalytique : le protéasome 26S.

L'ubiquitination des protéines peut également conduire à des procédés indépendants de la dégradation. Par exemple l'ubiquitination peut être à l'origine de la localisation cellulaire d'une protéine substrat, de sa conformation, de ses interactions avec d'autres protéines et de la modulation de son activité. A ce titre, la liaison de chaînes d'ubiquitine de type K63 joue un rôle dans l'activation des protéines, mais également dans la réparation de l'ADN, le remodelage de la chromatine, la signalisation cellulaire, l'endocytose ou encore l'exclusion des protéines du réticulum endoplasmique. Les chaînes de type K27 semblent également impliquées dans la signalisation cellulaire. Enfin, l'ajout de chaînes de type K29 semble conduire à la dégradation lysosomale des protéines substrat [114, 115, 119-124].

2. Mécanisme et enzymes

Le marquage des protéines par l'ubiquitine se fait en plusieurs étapes et implique l'intervention séquentielle de trois enzymes : une enzyme activatrice (E1); une enzyme de conjugaison (E2) et une ligase (E3) (Figure 10) [123, 125].

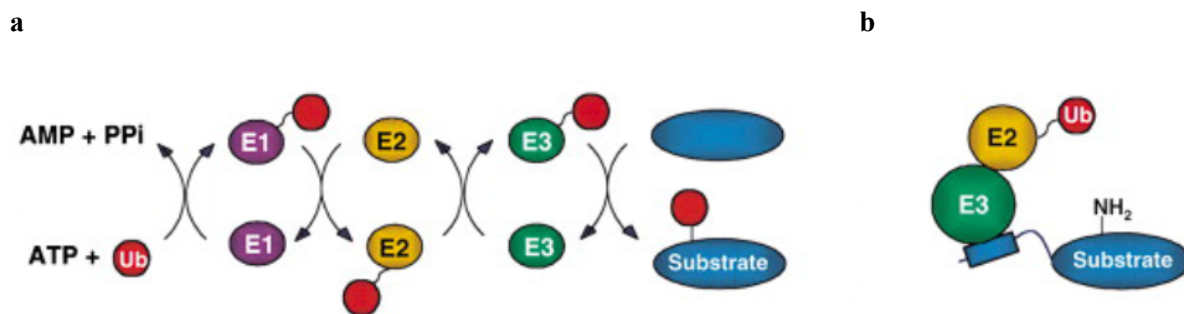


Figure 10. (a) Cascade de liaison de l'ubiquitine. L'ubiquitine est activée par l'E1, puis conjuguée par l'E2 puis transférée sur un résidu lysine d'un substrat par E3 ubiquitine ligases (ici est représenté le mécanisme utilisé par les HECTs). **(b) Spécificité de liaison.** Les E3 se lient au substrat et aux E2 via des sites distincts. Le substrat est souvent reconnu via un signal d'ubiquitination ou « degron » (boîte bleue) [107].

1. L'enzyme d'activation E1

La molécule d'ubiquitine doit être activée de manière à pouvoir former une liaison isopeptidique. Cette activation est réalisée selon une réaction séquentielle qui commence par la liaison d'un ATP sur l'ubiquitine conduisant à la formation d'un intermédiaire ubiquitine-adénylate qui sert de donneur d'ubiquitine à l'enzyme E1. Parallèlement, une molécule d'ATP vient se fixer sur l'enzyme E1, induisant ainsi un changement conformationnel permettant une meilleure affinité de l'enzyme E1 pour l'ubiquitine. La glycine C-terminale de l'ubiquitine est activée de manière ATP-dépendante et subit par la suite une attaque nucléophile par l'atome soufre d'une cystéine se situant sur le site actif de l'enzyme E1. Ceci aboutit à la formation d'une liaison thiol-ester à haute énergie entre la glycine C-terminale de l'ubiquitine et la cystéine de l'enzyme E1 et c'est cette molécule d'ubiquitine qui sera transférée sur le site actif de l'enzyme E2. Chaque enzyme E1 active est capable de porter deux molécules d'ubiquitine, l'une sous forme de thiol ester et l'autre sous forme d'adénylate. Avec chaque ubiquitine activée, un intermédiaire « ubiquitine-adénylate » est alors transféré sur le site thiol afin de subir le même sort [126-128].

Depuis sa découverte, en 1981, l'ubiquitin-activating enzyme 1 (UBE1) a longtemps été considérée comme étant l'unique enzyme responsable de l'activation de l'ubiquitine. Toutefois, de récents travaux ont caractérisé d'autres protéines ayant les mêmes propriétés qu'UBE1, notamment UBA6 (Ubiquitin-like modifier activating enzyme 6) et UBE1L2 (Ubiquitin-activating E1-Like protein 2) [129, 130].

2. L'enzyme de conjugaison E2

A ce jour, une quarantaine d'enzymes E2 (également appelées UBCs- Ubiquitin Conjugating) ont été recensées [131, 132]. Elles partagent toutes un motif catalytique conservé d'environ 150 acides aminés appelé domaine UBC (Ubiquitin Conjugating domain), mais présentent des différences au niveau de leurs extensions N- et C- terminales afin de faciliter certaines interactions spécifiques avec différentes E3 ligases. La liaison des E2 à certains co-facteurs influence aussi leur localisation, leur activité ainsi que leur spécificité [133]. Les molécules d'ubiquitine activées sont recrutées au niveau de la cystéine de leur site actif UBC *via* une liaison thioester covalente [134, 135]. Lorsqu'elles sont liées à certaines E3 ligases, les E2 peuvent catalyser directement le transfert de la molécule d'ubiquitine sur le substrat ou sur les résidus lysine de l'ubiquitine elle-même, permettant ainsi la poly-ubiquitination [109, 132, 136]. Bien que le choix du substrat implique les E3 ligases, ce sont les E2 qui seraient déterminantes lors de la sélection du type d'ubiquitination et qui contrôlent de ce fait le devenir des protéines cibles [132, 137, 138].

3. Les ligases E3

La réaction impliquant les E3 ligases se déroule en deux étapes : l'interaction de l'E3 ligase au substrat suite au signal d'ubiquitination d'une part, et la liaison covalente d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine au substrat, d'autre part. L'E3 ligase est impliquée aussi bien dans la catalyse de la première molécule d'ubiquitine au substrat que dans la liaison des autres molécules d'ubiquitine successives permettant la synthèse d'une chaîne de poly-ubiquitination, lorsque cela est requis. Il existe un très grand nombre d'E3 ligases identifiées (environ 700) et certainement beaucoup d'autres non identifiées [125]. Très tôt, elles ont été décrites comme passerelles entre les E2 et les substrats et divers mécanismes et modifications post-traductionnelles se sont révélés capable de moduler la reconnaissance des substrats par les E3 ligases [139, 140].

Les E3 ligases sont classées selon leur domaine catalytique en deux familles : Les **HECT** (Homologous to the E6-AP Carboxyl) et les **RING** (Really Interesting New Gene).

a) Les HECTs

Cette famille comporte une trentaine de membres, caractérisés par la présence d'un domaine en position N-terminale variable permettant l'interaction avec le substrat, ainsi que d'un domaine HECT carboxy-terminal interagissant à la fois avec l'E2 et la molécule d'ubiquitine. Les protéines de cette famille ont de multiples implications, notamment dans le trafic cellulaire et les réponses immunes (Figure 11) [141-143].

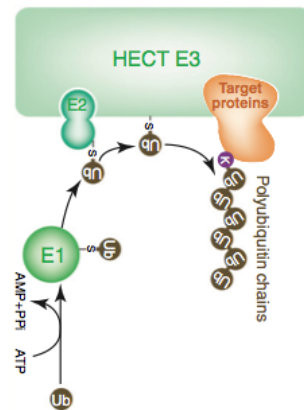


Figure 11. Mécanisme de fonctionnement des HECT E3 ubiquitine ligases : Ces protéines contiennent un résidu cystéine catalytique conservé qui joue le rôle d'accepteur d'ubiquitine. L'ubiquitine est ensuite transférée sur un résidu lysine d'un substrat [144].

b) Les RINGs

Avec plus de 600 membres identifiés à ce jour, cette famille d'E3 ligases est l'une des plus larges familles d'enzymes chez l'homme. Les protéines de cette famille sont impliquées dans la régulation d'une multitude de processus cellulaires et dans la pathogénèse de nombreuses maladies. Ces E3 ligases partagent un domaine catalytique conservé de 40 à 60 résidus qui se distingue par un motif spécifique riche en cystéines, appelé domaine RING (Really Interesting New Gene) (Figure 12a) [140, 143, 145, 146]. Contrairement aux protéines à domaine HECT qui lient d'abord la molécule d'ubiquitine sur leur site actif avant de les transférer sur la protéine cible, les E3 à domaine RING servent uniquement de plateforme et assurent le transfert direct de la molécule d'ubiquitine à partir de l'enzyme de conjugaison E2 vers le substrat (Figure 12b) [147].

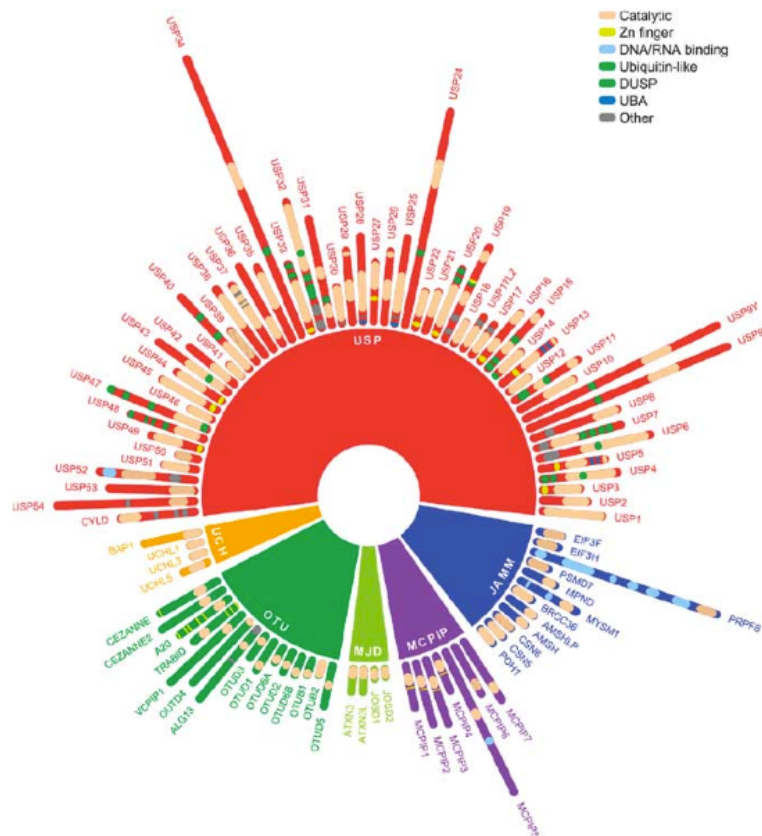


Figure 13. Classification des DUBs humaines. Chez l'humain, les DUBs sont classées en 6 familles: **USPs** (Ubiquitin-specific proteases); **UCHs** (ubiquitin carboxy-terminal hydrolases); **OTUs** (Ovarian-tumor proteases); **MJDs** (Machado-Joseph disease protein domain proteases); **JAMMs** (JAB1/MPN/Mov37 metalloproteases); **MCPIPs** (Monocyte chemotactic protein-induced proteins [151]).

Les familles de DUBs peuvent être classées également, selon leur mécanisme catalytique, en deux classes : les USPs, UCHs, OTUs, MJDs et MCPIPs sont des protéases à cystéine, dont l'activité enzymatique dépend du groupe thiol d'une cystéine de leur site actif. Seule la famille des JAMMs appartient à la classe des métalloprotéases à zinc (Figure 14) [105, 152]

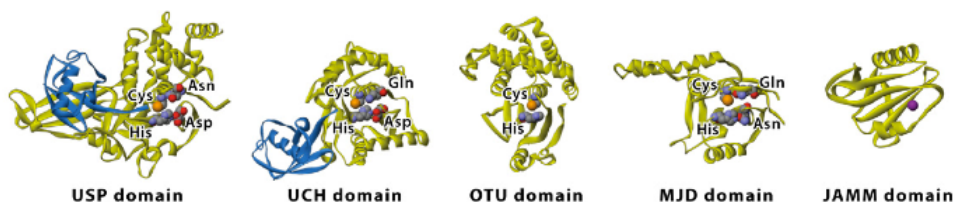


Figure 14. Structure des domaines catalytiques des 5 classes de DUBs [150]

Les USPs constituent la plus grande partie des DUBs, avec environ 60 membres. Elles sont caractérisées par deux motifs courts et conservés, les « boîte histidine » et « boîte cystéine » contenant les résidus impliqués dans la protéolyse de l'ubiquitine. La fixation de l'ubiquitine engendre un changement conformationnel rendant les USPs actives et ce mécanisme est spécifique de l'ubiquitine [153]. Les 4 membres UCHs fonctionnent comme les USPs et semblent plus spécifiques des petites protéines ubiquitinyllées ainsi que du recyclage de l'ubiquitine. Ils sont connus pour être impliqués dans la maladie de « Parkinson » et dans de nombreux cancers. Les OTUs, identifiés par homologie de séquence avec la protéine de la drosophile *otu*, possèdent au sein de leur site catalytique un résidu asparagine, en plus des résidus cystéine et histidine, ce qui leur confère leur spécificité. De plus, le site actif des OTUs est actif, même en l'absence de l'ubiquitine. A ce jour, 14 sont connus chez l'homme [154]. Les MJDs ont été identifiées suite à une étude bioinformatique de l'Ataxin-3, qui a révélé la présence d'un domaine protéolytique à cystéine comparable à celui retrouvé au niveau des DUBs. Peu de temps après, ce constat a été confirmé lorsqu'il a été montré que l'Ataxin-3 est associée à des chaînes de poly-ubiquitine [155]. 3 autres membres de cette famille, ont par la suite été décrits chez l'homme. Cette famille tire son nom d'une maladie neurodégénérative appelée maladie Machado-Joseph, caractérisée par une instabilité d'une répétition nucléotidique CAG (codant la glutamine) au niveau du gène Ataxin-3. Les JAMMs sont caractérisées par leur haute conservation au cours de l'évolution, 12 membres ont été à ce jour identifiés chez l'homme. Ils sont recrutés au cours du trafic vésiculaire et du recyclage des récepteurs. Ils sont également impliqués dans certains cancers [156, 157]. Au sein des DUBs, la famille des MCPiPs est la seule des protéases à cystéine à être dépourvue d'une « boîte histidine » dans son domaine catalytique. Elle présente un domaine riche en prolines au niveau de son extrémité C-terminale. Avec ses 7 membres, elle est décrite comme étant impliquée dans la signalisation de nombreux cancers [151, 158]. Le mécanisme déterminant la spécificité de chaque famille de DUBs à un certain type d'ubiquitination n'a pas encore été élucidé. Toutefois, des analyses fonctionnelles et structurales indiquent que les USPs et les OTUs sont spécifiques des chaînes de poly-ubiquitine impliquant les lysines K48, K63 et K11. De leur part, les MJDs et JAMMs ne reconnaissent que les chaînes en K63 [159].

2. Les fonctions des DUBs

Les DUBs sont essentielles à différentes fonctions cellulaires. D'une part, le processus de déubiquitination participe à la production de molécules d'ubiquitine « matures ». En effet, ces molécules sont synthétisées sous forme de précurseurs associés à des protéines ribosomales, desquelles elles doivent être dissociées afin de devenir fonctionnelles. D'autre part, ce processus est déterminant pour le recyclage de l'ubiquitine ainsi que la préparation des protéines destinées à la protéolyse, qui doivent être libérées de leur étiquette Ub avant d'être dégradées. Par ailleurs, il a été montré que la déubiquitination des protéines possédant un polymère K48 inférieur à quatre molécules d'ubiquitine permettait de les sauver de la dégradation. La déubiquitination est également indispensable au bon fonctionnement du protéasome 26S impliqué dans la protéolyse des protéines ubiquitinylées. En effet, les DUBs permettent de protéger la sous-unité 26S du protéasome des polymères d'ubiquitine libres qui pourraient entrer en compétition avec des protéines ubiquitinylées et inhiber ainsi leur dégradation. Enfin, les DUBs peuvent agir de manière plus spécifique sur des protéines ubiquitinylées en modulant leur activation et être ainsi à l'origine de l'arrêt ou de l'initiation de la transduction de la signalisation (Figure 15) [148, 151, 160, 161].

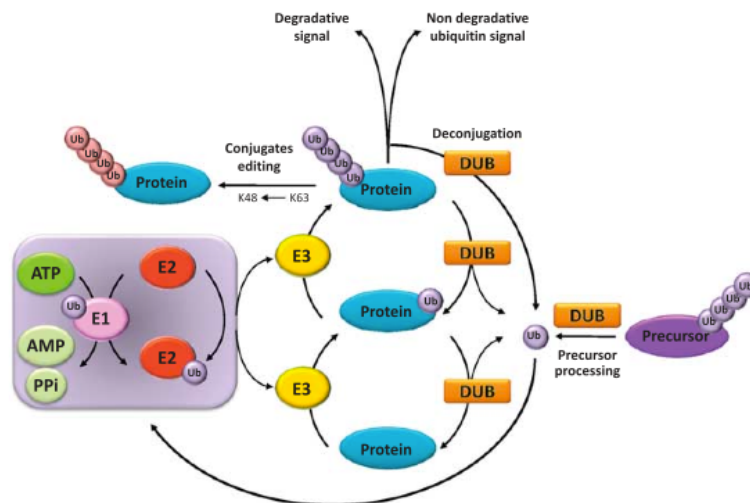


Figure 15. Schéma représentant certaines fonctions cellulaires des DUBs. Les DUBs peuvent générer des chaînes d'ubiquitine libres à partir de précurseurs d'ubiquitine. Assurant ainsi le maintien de l'homéostasie de l'ubiquitine. Certaines DUBs peuvent modifier des chaînes d'ubiquitine et ainsi induire des changements de signalisation. Elles peuvent aussi empêcher la dégradation d'une protéine ou ôter des chaînes d'ubiquitine non dégradatives [151].

A l'instar des autres protéases, la régulation des DUBs est finement contrôlée afin de prévenir le clivage de substrats inappropriés. A ce titre, la majorité des DUBs (USPs et UCHs) sont synthétisées sous forme inactive, et ce n'est qu'après leur association avec une molécule d'ubiquitine qu'elles acquièrent une conformation catalytiquement compétente. Toutefois il existe des régulations supplémentaires, notamment pour les DUBs actives dès leur synthèse. Il peut s'agir de régulations transcriptionnelles ou de modifications post-traductionnelles susceptibles d'affecter l'activation, la localisation ou la demi-vie des DUBs [162, 163].

4. Ubiquitination et NF- κ B

1. Rôle de l'ubiquitination dans la régulation de NF- κ B

Depuis sa découverte, le facteur de transcription NF- κ B a été caractérisé comme crucial dans différents processus biologiques comme l'inflammation, l'immunité et la survie cellulaire. C'est pourquoi ce facteur nécessite une régulation très stricte. NF- κ B est présent sous forme latente dans le cytoplasme des cellules, séquestré par les protéines inhibitrices I κ Bs ou sous forme de précurseurs inactifs. En réponse à divers stimuli, NF- κ B est activé et cela dépendamment de l'ubiquitination.

a) Rôle de l'ubiquitination de type K48

Comme mentionné précédemment, les protéines étiquetées avec des chaînes de poly-ubiquitine impliquant la K48 sont orientées vers le protéasome en vue d'être dégradées [164, 165]. En plus de leur implication majeure dans le système d'élimination des déchets cellulaires, les chaînes K48 jouent un rôle crucial dans la transduction du signal *via* la dégradation d'agonistes et d'antagonistes de ces cascades d'activation.

➤ Dégradation des I κ Bs

Au cours de l'activation de la voie canonique par certains stimuli, les I κ Bs sont phosphorylés par le complexe kinase IKK. Cette phosphorylation génère un motif dégron reconnu par un complexe d'E3 ligase appelé SCF *via* une protéine à motif conservé « F-Box » appelée β TrCP. Le SCF contient également la protéine Cullin 1 (Cul1), une protéine adaptatrice,

SKP1 (S-phase kinase-associated protein 1) ainsi qu'une E3 ligase ROC1 (Regulator of cullins 1). L'E3 ligase ROC1, appelée également RBX1 (RING-box protein 1), appartient à la famille des RING-E3 ligases et est à l'origine du recrutement d'une enzyme E2 pour catalyser la poly-ubiquitination de type K48 d'IκB phosphorylé. Ainsi, IκB phosphorylé et ubiquitinylé est sélectivement dégradé par le protéasome 26S, libérant ainsi le facteur de transcription NF-κB (Figure 16) [70, 116, 166-172].

➤ Dégradation partielle des précurseurs NF-κB

L'activation de la voie alternative de NF-κB, comme dans les cellules B par exemple, implique généralement le traitement protéolytique du précurseur de NF-κB p100 en une sous-unité mature p52. Ce clivage survient suite à l'ubiquitination de type K48 de p100 *via* le complexe d'E3 ligase SCF^{βTrCP}, qui reconnaît son substrat, une fois qu'il ait été phosphorylé par les kinases NIK et IKKα. Contrairement aux IκBs, cette poly-ubiquitination n'engendre pas la totale dégradation de p100 par le protéasome, mais uniquement une dégradation du domaine C-terminal, laissant la région N-terminale de p52 intacte. Cette dernière contient le domaine RHD de liaison aux protéines Rel. Ainsi, p52 peut se dimériser avec son partenaire RelB et induire la transcription de nombreux gènes dans le noyau [28, 98, 173].

D'autre part, suite à certains stimuli, la phosphorylation du précurseur p105 par IKKβ génère un dégron comparable à celui obtenu après la phosphorylation des IκBs. Le précurseur p105 est par la suite pris en charge par le complexe SCF^{βTrCP} qui catalyse son ubiquitination de type K48 et par conséquent sa dégradation complète par le protéasome. Ce processus est favorisé lorsque p105 se retrouve associé à d'autres sous-unités NF-κB et diffère de celui aboutissant au clivage partiel de p105, qui est pour sa part indépendant de l'ubiquitination [81, 174].

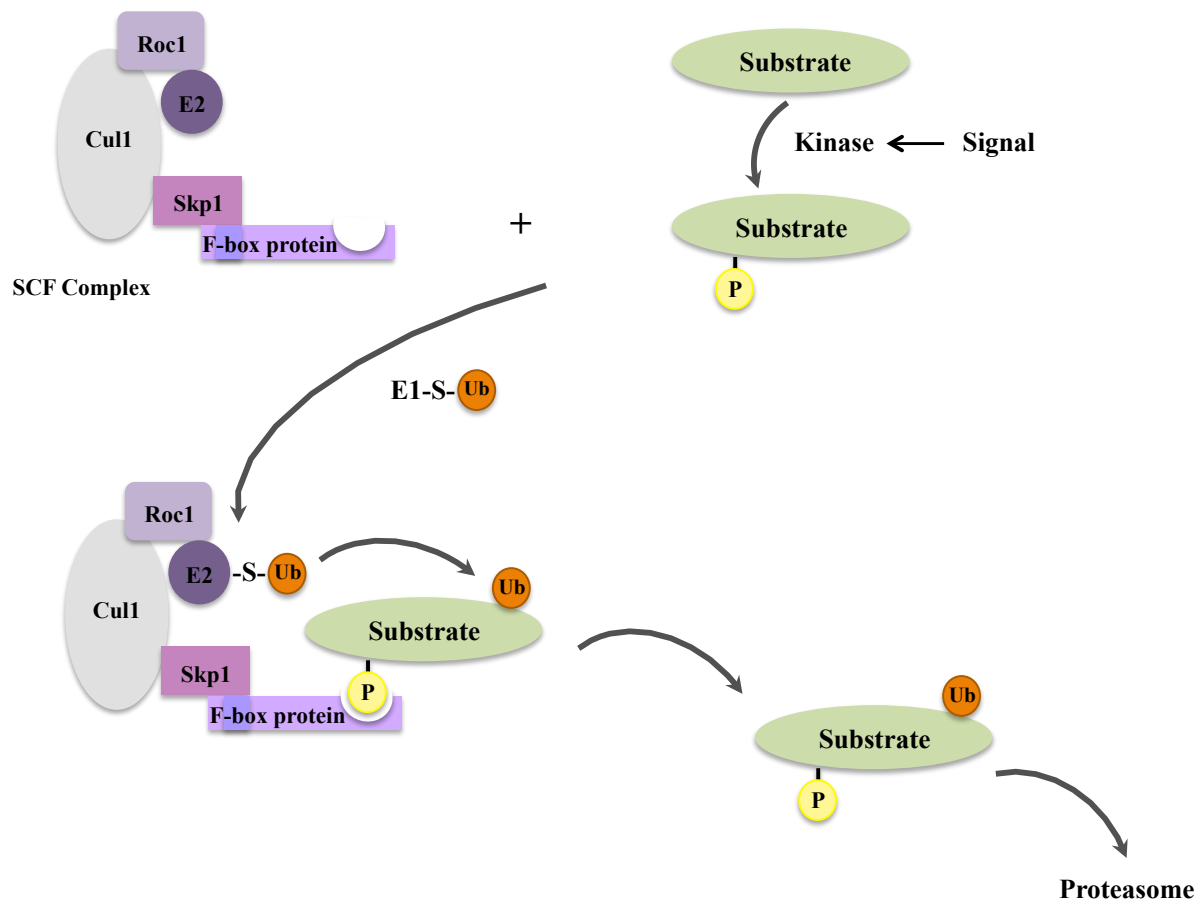


Figure 16. Représentation schématique du complexe SCF et son mécanisme d'action

➤ Régulation de la voie non-canonique

En plus de son rôle dans le clivage de p100, l'ubiquitination de type K48 active la voie non-canonique en induisant la protéolyse de certaines protéines à l'origine de la dégradation de la kinase NIK. C'est le cas des E3 ligases TRAF2 et TRAF3 qui sont dégradées par le protéasome suite à leur ubiquitination de type K48, au cours de la voie d'activation du CD40.

Parallèlement, en absence de stimulation, la kinase NIK constitue une cible pour les chaînes de poly-ubiquitine impliquant la K48 et est par la suite dégradée par le protéasome. Ce processus est mis en place dans le but d'éviter l'activation constitutive de la voie non-canonique [94, 97].

b) Rôle de l'ubiquitination de type K63

Contrairement aux chaînes de type K48, les chaînes de poly-ubiquitination impliquant la lysine K63 n'orientent pas leurs substrats vers la dégradation protéasomale, elles agissent principalement en faveur de l'activation de NF- κ B. Ce type de chaînes d'ubiquitine semble exercer sa fonction régulatrice à différents stades de la signalisation, notamment au niveau de l'assemblage et de la stabilité des complexes de kinases et leur activation [175].

➤ Cas du TNF-R

De nombreux composants du complexe de signalisation du TNF-R (TNF-RSC pour TNF-Receptor Signalling Complex) sont sujets à des ubiquitinations non dégradatives de type K63, parmi lesquels : les E3 ligases TRAF2 et cIAP1/2 ainsi que les kinases RIP1, TAK1 ou encore NEMO [176]. Bien que la voie du TNF-R soit l'une des signalisations les mieux caractérisées, il n'en demeure pas moins que plusieurs zones d'ombre restent à élucider. A ce titre, la/les E3 ligases à l'origine de l'ubiquitination non dégradative de RIP1, protéine clé lors de la transduction du signal en aval du TNF-R, ne sont pas entièrement identifiées. Si Lee et ses collaborateurs indiquent que l'ubiquitination de type K63 de RIP1 est catalysée par TRAF2 [177], l'équipe de Bertrand suggère que TRAF2 jouerait un rôle indirect en permettant le recrutement de deux E3 ligases cIAP1 et cIAP2 qui catalyseraient cette réaction [178-180]. L'ubiquitination de RIP1 joue un rôle crucial dans cette voie de signalisation, en effet, c'est grâce à elle que se fait le recrutement du complexe kinase TAB/TAK1 *via* sa sous-unité régulatrice TAB2 ainsi que le complexe IKK *via* NEMO [181-185]. De plus, l'ubiquitination de type K63 des sous-unités catalytiques TAK1 et NEMO, *via* les E3 ligases TRAF2 et TRAF6 respectivement, a également été rapportée comme nécessaire à l'activation de leurs complexes kinases respectifs [115, 186].

➤ Autres signalisations

Le rôle des chaînes de type K63 dans le recrutement et l'activation des complexes kinases est également essentiel dans d'autres voies de signalisation aboutissant à l'activation de NF- κ B. Toutefois, les protéines ciblées par ses chaînes varient selon la voie induite.

A titre d'exemple, dans la signalisation de l'IL1R et du TLR4, les protéines ubiquitinylées requises pour le recrutement des complexes kinases sont TRAF6 et IRAK1 [187, 188]. Suite à la stimulation du TCR, les protéines BCL10 et MALT1 sont ubiquitinylées de manière non

dégradative [189, 190], quant à la signalisation du senseur cytosolique NOD2 [191, 192], l'ubiquitination de type K63 touche NOD2 lui-même ainsi que RIP2. Ce type d'ubiquitination joue un rôle crucial dans la voie des RIG-I-Like Récepteurs, en effet, les chaînes de poly-ubiquitine catalysées par TRIM25 favorisent l'association du senseur RIG-I avec l'adaptateur mitochondrial MAVS essentiel à la transduction du signal [193, 194].

Bien que l'ubiquitination impliquant la lysine K63 joue son plus grand rôle dans le recrutement et l'activation des complexes kinases, elle sert également de plateforme d'assemblage d'autres régulateurs de la signalisation de NF- κ B tels que le complexe d'E3 ligase LUBAC nécessaire à l'activation de NF- κ B [195, 196].

c) Rôle de l'ubiquitination linéaire

Contrairement aux autres types de chaînes d'ubiquitine qui font intervenir les résidus lysine de l'ubiquitine lors de leur assemblage, les chaînes linéaires sont générées lorsque le résidu méthionine en position 1 de l'ubiquitine (Met1) se lie à la G76 de la molécule d'ubiquitine suivante. Ces chaînes se rapprochent des chaînes de type K63 de part leurs structure et conformation. Actuellement, seul un complexe d'E3 ligase, appelé LUBAC (Linear ubiquitin chain assembly complex), est décrit comme étant capable de catalyser l'ubiquitination linéaire. Le complexe LUBAC d'environ 600 kDa comprend 3 sous-unités : HOIL-1L (Heme-oxidized IRP2 ligase-1) connu également sous le nom de RBCK1 (RanBP-type and C3HC4-type zinc finger-containing protein 1) et HOIP (HOIL-1L interacting protein) appelé également RNF31, toutes deux dotées d'un domaine RING, ainsi que la protéine SHARPIN (Figure 17) [197-200].

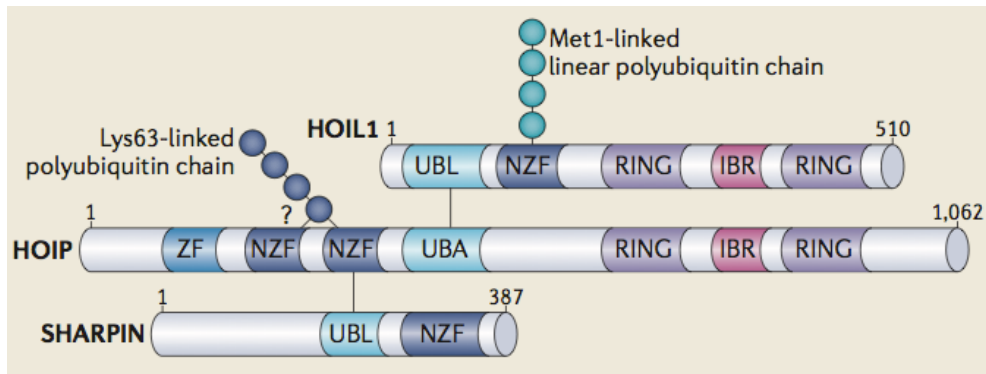


Figure 17. Structure des protéines du complexe LUBAC: HOIL1, HOIP et SHARPIN. Les différents motifs structuraux composant ces protéines sont représentés. UBL (Ubiquitin-like domain); NZF (NPL4 zinc finger); RING (Really interesting new gene); IBR (In between RING domain); UBA (Ubiquitin-associated domain) [201].

L'importance de ce complexe a été montrée dès lors que l'inhibition de l'expression de l'un ou de plusieurs composants du LUBAC par ARN interférence a induit une forte diminution de l'activation de NF- κ B en aval de la stimulation du TNF-R. Aussi, la surexpression du LUBAC induit une forte translocation nucléaire de l'hétérodimère p50/p65, suggérant ainsi que ce complexe serait impliqué dans l'activation de la voie canonique de NF- κ B. De plus, des expériences de biochimie et de spectrométrie ont montré que le LUBAC était associé à la sous-unité régulatrice du complexe IKK « NEMO » après stimulation avec le TNF α . Ces mêmes expériences ont révélé que NEMO est la cible directe des chaînes d'ubiquitine linéaire catalysées par le LUBAC. Cette ubiquitination nécessaire à l'activation du complexe kinase IKK est catalysée au niveau des résidus K285 et K309 de NEMO. D'autre part, NEMO contient un domaine UBAN (Ubiquitin binding in ABIN and NEMO domain) lui permettant de se lier aux chaînes linéaires. Il a été suggéré que le motif UBAN d'une molécule NEMO reconnaît les chaînes linéaires catalysées sur une autre molécule NEMO induisant ainsi une multimérisation du complexe IKK, ceci permet une trans-autophosphorylation et par conséquent une meilleure activation de ce complexe (Figure 18) [195, 196, 202-205].

En plus de leur rôle dans la régulation positive de NF- κ B, les chaînes linéaires seraient impliquées dans l'arrêt de l'activation de ce facteur de transcription en servant de plateforme de recrutement à certains régulateurs négatifs de cette voie. A titre d'exemple, au cours de la signalisation en aval du TNF-R, les protéines ABIN1 et Optineurine ont été décrites comme régulant négativement l'activation de NF- κ B. Ces protéines possèdent un domaine UBAN, comparable à celui retrouvé au niveau de NEMO, qui leur permet d'être recrutées au niveau

des protéines ubiquitinylées. Il a été rapporté que l'optineurine inhiberait l'activation de NF- κ B en concurrençant NEMO lors de son association à RIP1 ubiquitinylé [206]. De plus, l'optineurine agit également en favorisant le recrutement de la DUB CYLD connue pour inhiber l'activation de NF- κ B sous certains stimuli[207]. Ce mode d'action est également retrouvé chez ABIN1 qui favoriserait le recrutement de la DUB A20 au niveau des chaînes linéaires associées à NEMO induisant par conséquent l'arrêt de la signalisation [162, 206].

d) Autres types d'ubiquitination

De plus en plus d'évidences montrent que d'autres événements d'ubiquitination sont nécessaires pour une activation optimale et un meilleur contrôle de NF- κ B. A ce titre, il a été récemment reporté que suite à la stimulation du TNF-R, les E3 ligases cIAPs catalysent la formation de chaînes de poly-ubiquitine de type K11 au niveau de la kinase RIP1 [208]. Ces chaînes participeraient au recrutement de NEMO afin de permettre la transduction du signal. NEMO serait également sujet à d'autres types d'ubiquitination, notamment celle de type K27 suite à la stimulation des TLRs [209].

L'assemblage des molécules d'ubiquitine sous forme de chaînes n'est pas toujours nécessaire. En effet, certaines mono-ubiquitination ou multi-monoubiquitination peuvent être suffisantes à induire un signal. A titre d'exemple, il a été rapporté que le clivage constitutif de p105 en p50 impliquait une mono-ubiquitination de ce précurseur [210, 211].

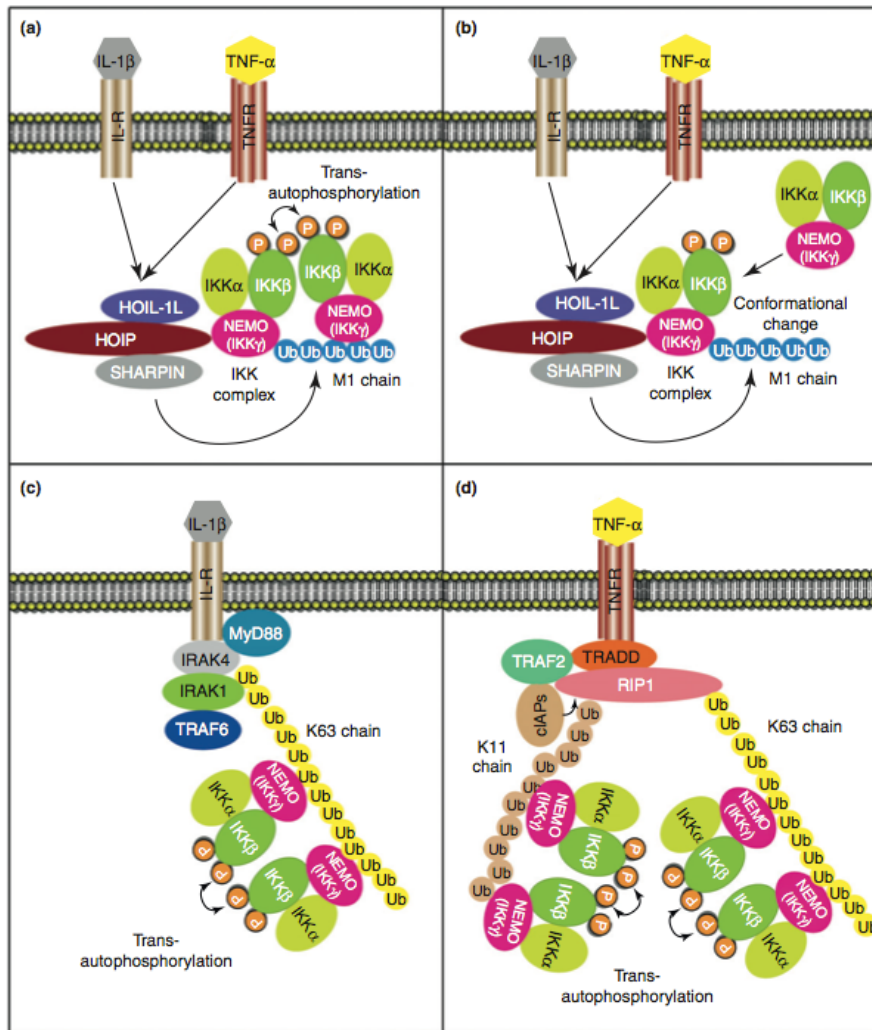


Figure 18. Rôle des différentes chaînes d'ubiquitination dans l'activation du complexe IKK. (a) les chaînes linéaires associées à NEMO sont capables de s'associer à une autre molécule NEMO d'un autre complexe induisant une multimérisation, puis une auto-transphosphorylation d'IKKβ. (b) L'ubiquitination linéaire de NEMO peut induire un changement conformationnel favorisant la phosphorylation d'IKKβ. (c) et (d): De multiples complexes IKK peuvent être recrutés simultanément *via* NEMO au niveau des chaînes de poly-ubiquitine de type K63 et/ou K11 permettant la multimérisation puis l'auto-transphosphorylation d'IKKβ [144].

2. Les DUBs dans la voie NF-κB

L'activation excessive de NF-κB est fortement liée à certaines pathologies telles que les maladies auto-immunes et les cancers, d'où la nécessité d'une fine régulation. Différentes DUBs agissent comme des régulateurs négatifs permettant le contrôle de l'activation de NF-κB.

a) A20

Il s'agit de l'une des DUBs les plus étudiées et les mieux caractérisées. A20 est une protéine cytoplasmique induite par NF- κ B sur lequel elle exerce un rétrocontrôle négatif. Les cellules déficientes en A20 présentent une activation excessive de NF- κ B et cela suite à différents stimuli : TNF, IL-1 β , ligands de TLRs et de RLRs, indiquant ainsi le rôle crucial que joue cette DUB dans la régulation négative de ce facteur de transcription. De plus, les souris KO pour A20 meurent à un stade précoce dès suite de sévères inflammations touchant divers organes [162]. A20 a la particularité de contenir à la fois un domaine OTU, en position N-terminale, lui conférant son activité de déubiquitineuse, ainsi qu'un domaine en doigts de zinc, à son extrémité C-terminale, lui conférant une activité E3 ligase [212, 213]. Les nombreux travaux qui se sont intéressés au mécanisme d'action de A20 ont révélé que cette protéine assurait son rôle de régulateur négatif de différentes manières ; à titre d'exemple, au cours de l'activation du TNF-R, A20 catalyse la dissociation des chaînes de poly-ubiquitine de type K63 de la kinase RIP1, et cela grâce à son domaine OTU. D'autres part, elle favorise *via* son domaine à doigts de zinc, l'ubiquitination de type K48 de RIP1 induisant sa dégradation par le protéasome. Des études récentes ont également démontré que A20 pourrait également antagoniser les interactions entre certaines E3 ligases essentielles à l'activation de NF- κ B (telles que les TRAFs) et leurs partenaires E2 [214]. Enfin, la formation d'un complexe avec les protéines : TAX1BP1 (TAX1 Binding Protein1), ITCH (Immune Modulatory Protein) et RNF11 est un prérequis nécessaire à l'activité régulatrice de A20 en aval de certains stimuli notamment le TNF α [215-217].

b) CYLD

CYLD est également une DUB largement étudiée, cette protéine ubiquitaire a été initialement identifiée comme le produit d'un gène suppresseur de tumeur impliqué dans une maladie génétique, la cylindromatose [218, 219]. Elle a par la suite été décrite comme étant impliquée dans la régulation de nombreuses voies: NF- κ B, la voie des MAPK, la signalisation antivirale, le cycle cellulaire et la signalisation calcique (Figure 19). Cette protéine comprend un domaine catalytique de type USP qui lui permet de cliver les chaînes de poly-ubiquitine de type K63. L'association directe de CYLD avec NEMO favorise la déubiquitination de ce dernier induisant ainsi à l'abolition de l'activation de NF- κ B. Cette association permet également à CYLD d'utiliser NEMO comme site d'ancrage lui permettant l'accès aux chaînes

de poly-ubiquitine de type K63 liées à certaines protéines clés de la signalisation, telles que TRAF2, TRAF6 et RIP1 dans la voie du TNF-R [220, 221].

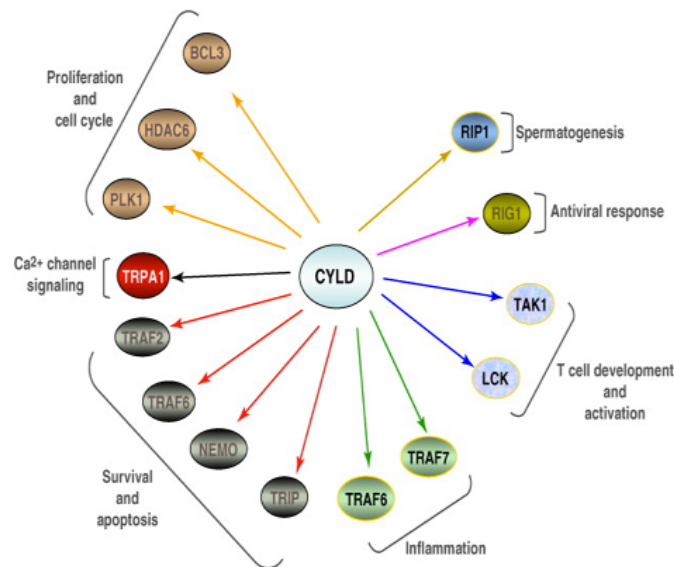


Figure 19. Les cibles de CYLD et leurs fonctions [222]

c) Autres Déubiquitinasés

D'autres déubiquitinasés ont également été indiquées comme régulant la voie NF- κ B à différents niveaux. Il s'agit entre autre de Cezanne (Cellular zinc finger anti-NF- κ B) qui hydrolyserait les chaînes de type K11 liées à RIP1 (Receptor-interacting protein 1) [223], USP15 impliqué dans la dissociation des chaînes de type K48 d'I κ B α [224], Otulin spécifique des chaînes linéaires [225], MCPIP1 qui ciblerait TRAF2, TRAF6 et RIP1 [158], TRABID qui catalyse l'hydrolyse des chaînes atypiques K27 et K33 [226] ou encore USP34 impliqué dans la régulation de NF- κ B en aval de la stimulation du TNF-R et du TCR [227].

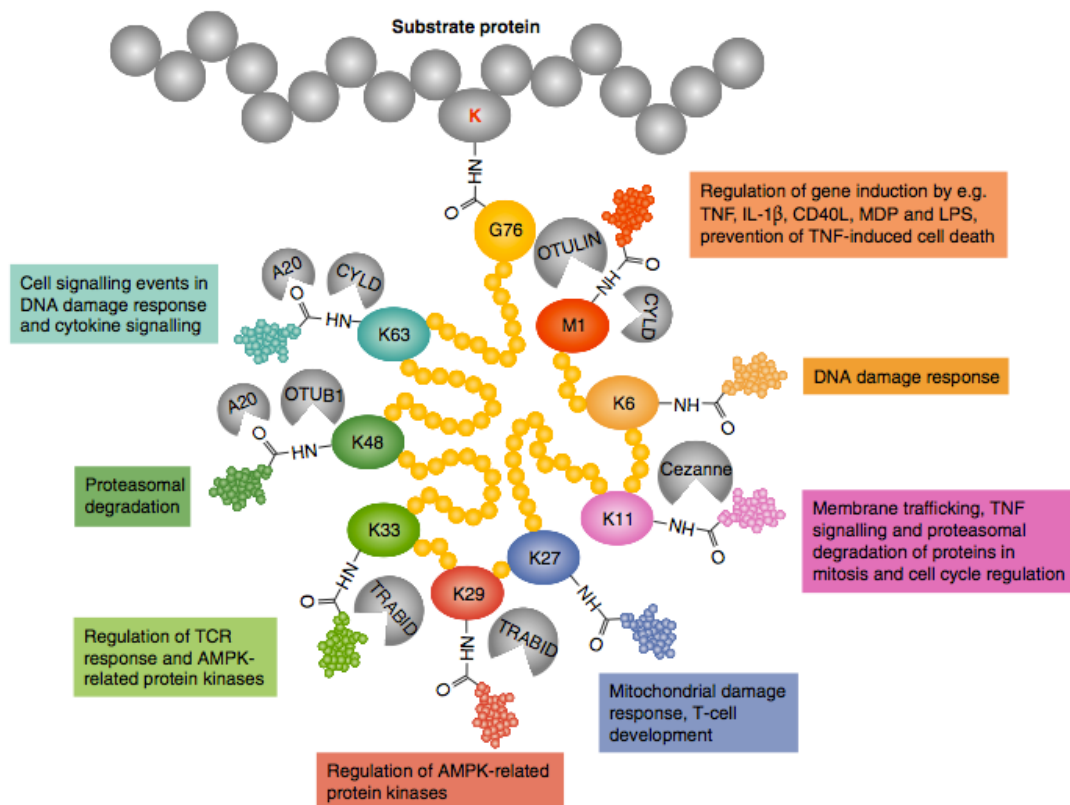


Figure 20. Les différents types d'ubiquitination et leurs fonctions dans la signalisation immunitaire ainsi que les DUBs associées [122].

3. Survol de certaines voies de signalisation aboutissant à l'activation de NF- κ B

a) Signalisation en aval de la stimulation du TNF-Récepteur

La superfamille des TNF récepteurs consiste en 29 récepteurs transmembranaires. Les membres de cette famille sont composés d'un domaine extracellulaire responsable de la reconnaissance et du recrutement de leurs ligands ainsi que d'un domaine intracellulaire permettant l'activation de la voie de signalisation. Les cascades de signalisation déclenchées par la superfamille des TNF-R sont diverses et variées et peuvent induire à la fois l'activation de la voie NF- κ B ou alors l'apoptose et ceci selon la nature du récepteur engagé ainsi que des protéines recrutées au cours de la transduction du signal. Le TNF-R1 est considéré comme le prototype de cette famille de part son ubiquité et de sa pleïotropie, en effet il est le seul membre de cette famille à pouvoir induire à la fois un signal de mort et d'activation, selon le

contexte cellulaire. Le TNF-R1 est stimulé par le TNF α (Tumor Necrosis Factor α), l'une des principales cytokines pro-inflammatoire [228-231].

La reconnaissance du ligand (TNF α) par son récepteur TNF-R1 induit la trimérisation de ce dernier, s'ensuit l'assemblage d'un vaste signalosome consistant en diverses protéines adaptatrices, kinases et E3 ligases nécessaires à la transduction de la signalisation. D'abord, c'est la protéine adaptatrice TRADD (TNFR1-Associated Death Domain protein) qui est recrutée *via* son domaine de mort DD (Death Domain), qui à son tour recrute RIP1 (Receptor-Interacting Protein Kinase 1 également appelée alors RIPK1) et les TRAFs 2/5 (TNF Receptor-Associated Factor 2/5). Ces derniers assurent le recrutement du complexe cIAP1/2 (cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins 1 and 2), qui agit comme E3 ligase et catalyse l'ubiquitination de type K63 de RIP1, TRAF2 ainsi que sa propre ubiquitination. Ces chaînes d'ubiquitine servent de plateforme de recrutement des complexes kinase TAB/TAK1 et IKK qui une fois activés conduisent à la phosphorylation de l'inhibiteur de NF- κ B I κ B α , nécessaire à son ubiquitination dégradative. Les sous-unités NF- κ B sont ainsi libérées et transloquent dans le noyau afin d'activer la transcription des gènes cibles (Figure 21) [232-234].

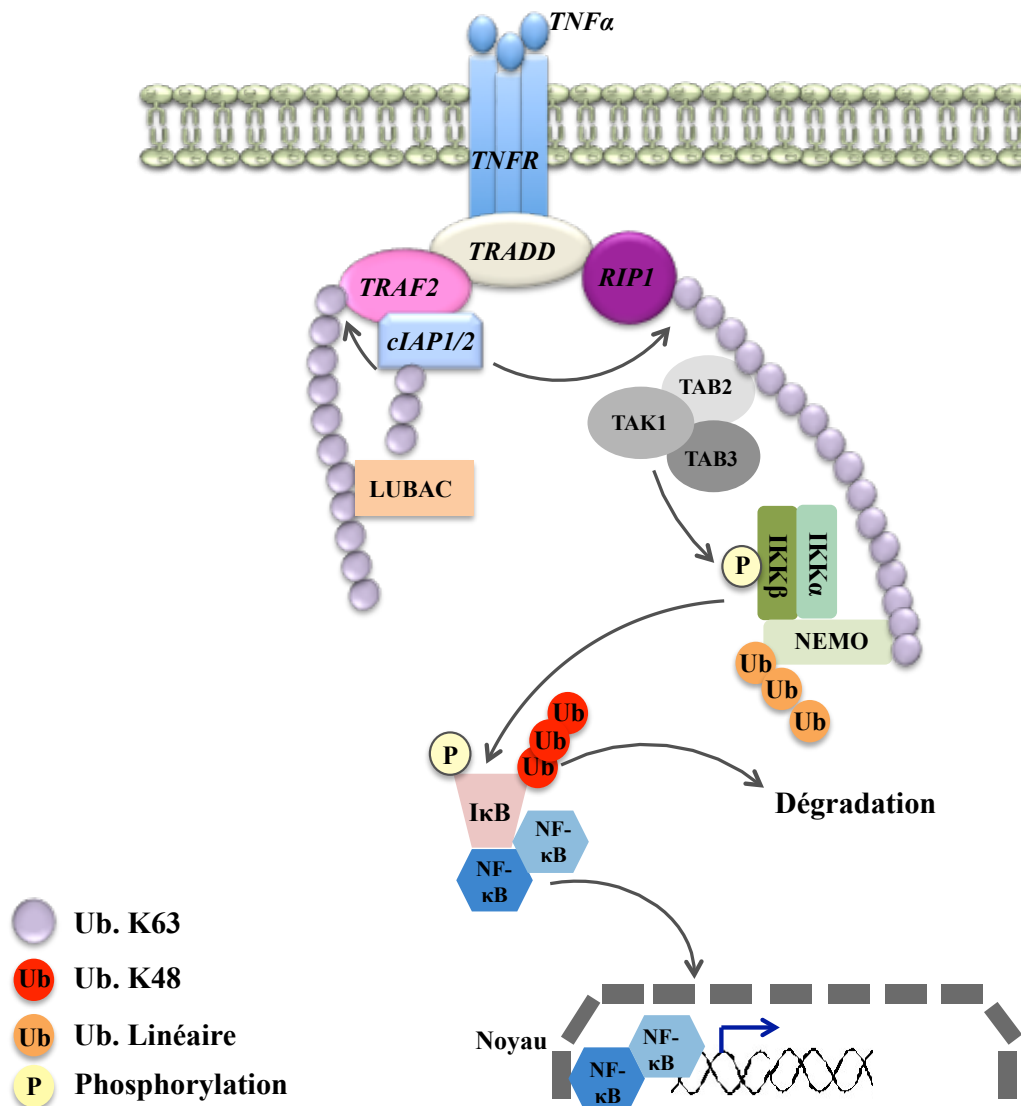


Figure 21. Activation de NF-κB après stimulation du TNF récepteur. La stimulation du TNF-R1 par son ligand TNFα induit sa trimérisation ainsi que le recrutement d'un important signalosome comprenant TRADD, RIP1, ainsi que les E3 ligases TRAF2/5, cIAP1/2 et le complexe LUBAC. Ces E3 ligases vont catalyser la formation de différentes chaînes d'ubiquitine permettant le recrutement des complexes kinases TAB-TAK et IKK dont l'activation permettra la libération des sous-unités NF-κB et par conséquent leur translocation dans le noyau.

➤ Les E3 ligases TRAFs et cIAPs

Les TRAFs sont des E3 ligases très conservées au cours de l'évolution. Elles se retrouvent aussi bien chez les mammifères que chez d'autres organismes dont la drosophile et *C. elegans*. Ces protéines sont impliquées dans la modulation de diverses voies de signalisation, notamment les voies NF-κB, JNKs (c-Jun N-terminal Kinases) ainsi que celle des IRFs (Interferon Regulatory transcription Factor). Sept membres de cette famille ont été identifiés

dans le génome humain, et à l'exception de TRAF1, toutes les protéines TRAFs contiennent un domaine RING au niveau de leur extrémité N-terminale. Parmi ces protéines, les TRAFs 2, 5 et 6 sont impliquées dans l'activation de NF- κ B en aval de la stimulation de divers récepteurs cellulaires tels que : les récepteurs de la superfamille du TNF, le récepteur à l'IL-1 ainsi que les récepteurs Toll-like (TLRs) [235, 236]. Aussi, certains travaux ont révélé le rôle de TRAF3 dans la régulation négative de la voie non-canonique de NF- κ B *via* l'inhibition du clivage du précurseur p100 [237]. De toutes les protéines de cette famille, les TRAF2 et 6 ont été les plus étudiées. TRAF6 nécessaire à l'activation de NF- κ B après de nombreux stimuli notamment l'IL-1R et TLRs, est associée *via* son extrémité N-terminale à l'E2 UBC13, une enzyme de conjugaison spécifique des chaînes d'ubiquitine de type K63. La dimérisation de TRAF6 semble être requise pour son activité E3 ligase [238]. D'autre part, le mécanisme d'action de TRAF2, protéine essentielle à l'activation de NF- κ B après stimulation du TNF-R, est largement discuté. Bertrand et ses coéquipiers, suggèrent que TRAF2 est incapable de se lier à l'E2 UBC13 et joue ainsi un rôle indirect dans cette signalisation en servant uniquement de plateforme de recrutement pour les E3 ligases cIAPs qui catalysent l'ubiquitination de RIP1 [178, 239, 240]. De son côté, l'équipe d'Alvarez propose que l'association de TRAF2 avec le cofacteur S1P (Sphingosine 1-Phosphate) lui permet de catalyser elle-même les chaînes de type K63 sur RIP1 [241].

Les cIAPs 1 et 2 (Cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins) appartiennent à la famille des IAPs, protéines hautement conservées au cours l'évolution et se trouvant aussi bien chez la levure que chez les vertébrés. Les protéines de cette famille sont définies par la présence d'un ou de plusieurs motifs conservés appelés BIR (Baculoviral IAP repeat) essentiels à la régulation de l'apoptose et à la transduction du signal. Les cIAPs contiennent en plus un domaine de recrutement de caspases (CARD) permettant les interactions protéine-protéine. Elles contiennent également au niveau de leur extrémité C-terminale, un domaine conservé RING leur conférant une activité E3 ligase [242]. En plus de leur rôle anti-apoptotique *via* la régulation des caspases (notamment les caspases 3 et 7), les cIAPs 1 et 2 sont essentielles à la transduction du signal lors de l'activation de NF- κ B en aval de la stimulation du TNF-R de par leur forte implication dans l'ubiquitination de type K63 de la kinase RIP1 [178]. Aussi, la coopération des cIAPs avec l'E2 UbcH5 aboutit à la formation de chaînes de poly-ubiquitine de type K11 au niveau de RIP1 ce qui potentialiserait l'activation de NF- κ B [208]. Les cIAP1/2 assurent en plus l'ubiquitination de type K48 de NIK induisant sa dégradation par le protéasome et inhibant ainsi l'activation de la voie non-canonique de NF- κ B. Une

surexpression des cIAPs est enregistrée dans beaucoup de cancers, et cela contribue à la tumorigenèse et à la chimiorésistance [178, 243, 244].

➤ **Receptor-interacting protein: RIP1**

RIP1 est un facteur clé lors de la transduction du signal en aval de la stimulation par le TNF α [245]. Cette protéine hautement conservée chez les vertébrés comprend un domaine kinase (KD), un domaine de mort (DD) ainsi qu'un domaine intermédiaire. A l'état quiescent, RIP1 peut se lier à certaines protéines à domaine de mort telles que FADD ou la caspase-8 et induire de ce fait la mort des cellules [246]. Toutefois, il a été rapporté que les différents types de chaînes d'ubiquitine catalysés sur RIP1, suite à certains stimuli, préviennent cette association et promeuvent ainsi un signal de survie [247]. Bien que l'activité kinase de RIP1 ne soit pas requise pour la transduction de la signalisation aboutissant à l'activation de NF- κ B, elle reste toutefois essentielle dans certaines conditions de mort cellulaire [248]

➤ **Recrutement des complexes kinases TAK et IKK**

Le complexe TAK est constitué des kinases TAK1 (TGF- β -Activated Kinase 1) appartenant à la famille des MAP3K, ainsi que des protéines TAB 1/2/3 (TAK1 Binding 1/2/3). Si la présence de TAB1 est requise pour l'activité kinase de TAK1, celle de TAB2 et/ou TAB3 est essentielle au recrutement de ce complexe au niveau du signalosome et ceci grâce à leur domaine UBD qui reconnaît et se lie spécifiquement aux chaînes de poly-ubiquitine de type K63 [182, 249, 250]. Cet ancrage permet l'activation enzymatique du complexe TAK par autophosphorylation [251]. Parallèlement, un autre complexe kinase IKK est recruté au niveau de ces chaînes d'ubiquitine *via* sa sous-unité NEMO [183]. L'activation de ce complexe nécessite la phosphorylation de sa sous-unité catalytique IKK β par le complexe TAK ou par trans-autophosphorylation. Le complexe IKK ainsi activé peut phosphoryler l'inhibiteur de NF- κ B I κ B α permettant son ubiquitination puis sa dégradation par le protéasome. Les sous-unités NF- κ B sont libérées et transloquent dans le noyau afin d'activer la transcription de leurs gènes cibles [11, 88, 91, 230].

b) Autres voies de signalisation

➤ IL-1R/TLR

La stimulation du récepteur à l'IL-1 et du TLR4 par l'IL-1 et le LPS (Lipopolysaccharide) respectivement, induit le recrutement de la protéine MYD88 qui va servir d'adaptateur à TRAF6 et aux protéines de la famille IRAK (Interleukin-1 Receptor-associated Kinase). Le recrutement d'IRAK-4 induit la phosphorylation et l'activation d'IRAK-1 qui va conduire à l'oligomérisation de TRAF6 aboutissant à l'activation de son activité E3 ligase. TRAF6 va ainsi catalyser la formation de chaînes de poly-ubiquitine de type K63 sur elle-même et sur IRAK1, et c'est au niveau de ces chaînes que se fera le recrutement des complexes kinase TAK et IKK [252-256].

Le TLR3, récepteur spécialisé dans la reconnaissance des ARNs double brin viraux, interagit avec un autre adaptateur appelé TRIF, qui se lie à TRAF6 et RIP1 pour activer la signalisation NF- κ B faisant également intervenir les chaînes de poly-ubiquitination de type K63 produites par TRAF6 aboutissant à l'activation des complexes kinase TAK et IKK [255].

➤ NLRs (NOD-like receptors)

C'est une famille de récepteurs intracellulaires très conservée au cours de l'évolution et impliquée dans la détection du peptidoglycane bactérien et de certaines toxines dans le cytoplasme. L'infection bactérienne induit l'oligomérisation des NODs 1 et 2 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein), leur permettant alors le recrutement de la protéine RIP2 [191, 257]. Tout comme RIP1, RIP2 est impliquée dans l'activation du complexe IKK par un mécanisme dépendant de TAK1 et des chaînes de poly-ubiquitine de type K63. Ces chaînes sont catalysées principalement par les E3 ligase TRAF2 et TRAF6 [258].

➤ RLRs (RIG-I-like receptors)

Les RLRs sont des récepteurs cytosoliques responsables de la reconnaissance des ARNs viraux présents dans les cellules infectées et permettent l'activation des voies NF- κ B et IRF3 (Interferon Regulatory transcription Factor 3) aboutissant à la production de cytokines pro-

inflammatoires et des interférons de type I respectivement. L'ubiquitination joue un rôle déterminant à différents stades de la signalisation [259]. A titre d'exemple, le récepteur RIG-I requiert une ubiquitination de type K63 afin de pouvoir recruter sa protéine adaptatrice MAVS. Cette ubiquitination est catalysée par les E3 ligases TRIM25 et RNF135 [194, 260-262]. MAVS recrute par la suite TRAF6, dont l'auto-ubiquitination permet le recrutement et l'activation des complexes kinases nécessaires à l'activation de NF- κ B [262].

➤ Réponse aux dommages de l'ADN

Les cellules sont continuellement confrontées à des risques de dommages de leur génome par des sources endogènes ainsi que par l'exposition à des agents exogènes. Afin de maintenir l'intégrité de leur matériel génétique, les cellules mettent en place un réseau complexe de cascades de signalisation dont la voie NF- κ B. Bien que le mécanisme par lequel NF- κ B est activé ne soit pas entièrement élucidé, certains événements moléculaires régulant ce processus commencent à être identifiés. Les dommages de l'ADN induisent une SUMOylation (modification post-traductionnelle proche de l'ubiquitination) d'une petite fraction de NEMO, induisant l'accumulation de ce dernier au niveau du noyau. NEMO est par la suite phosphorylé par la kinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) puis ubiquitinylé en K63. Sous cette forme, le complexe NEMO-ATM rentre dans le cytosol où il active les sous-unités catalytiques du complexe IKK de manière dépendante de TRAF6, cIAPs et du complexe TAB-TAK [166, 263, 264].

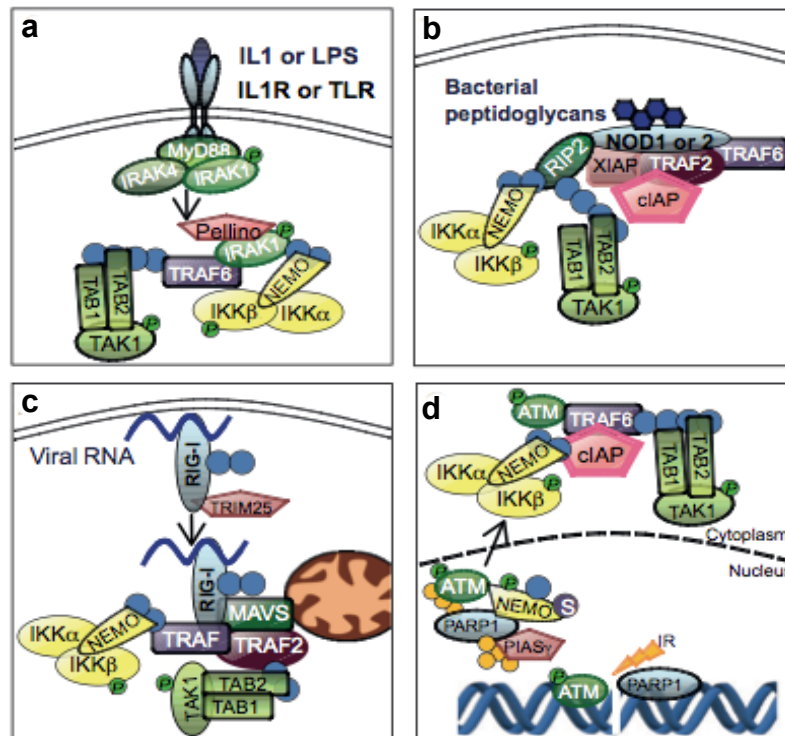


Figure 22. Activation du complexe IKK sous certains stimuli. (a) La stimulation de l'IL-1R ou des TLRs induit le recrutement de MYD88 ainsi que des kinases IRAK. La phosphorylation d'IRAK1 par IRAK4 induit la dissociation d'IRAK1 du récepteur et la formation d'un autre complexe comprenant IRAK1, TRAF6 et Pellino qui vont catalyser la formation de chaînes d'ubiquitine de type K63 au niveau desquelles se fera le recrutement des complexes kinases TAB/TAK et IKK. (b) La reconnaissance des peptidoglycans bactériens conduit à l'assemblage d'un complexe consistant en RIP2, TRAF6, TRAF2, cIAP, XIAP ainsi qu'aux complexes TAB/TAK et IKK. (c) Le senseur cytosolique des ARNs viraux subit une ubiquitination via l'E3 ligase TRIM25, lui permettant son association avec la protéine adaptatrice MAVS, s'ensuit le recrutement des protéines TRAF et des complexes kinase TAB/TAK et IKK. (d) Les cassures d'ADN induites par des irradiations ionisantes sont détectées par la poly (ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1) et la kinase ATM. Ceci induit la formation d'un complexe nucléaire comprenant NEMO qui subit des modifications post-traductionnelles (Sumoylation et ubiquitination) induisant son export du noyau vers le cytoplasme où il coopère avec TRAF6, cIAP et TAB/TAK afin d'activer les sous-unités catalytiques du complexe IKK [94].

III. La dynamique mitochondriale

1. La mitochondrie: Présentation et caractéristiques générales

La mitochondrie est un petit organelle ovoïde de 0,5 à 1 μm situé dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Selon le type et l'état, une seule cellule peut héberger entre 500 et 2000 mitochondries. La mitochondrie possède un ADN propre sur un chromosome circulaire ce qui indique une origine exogène. Il est actuellement admis que la mitochondrie serait apparue par endocytose d'une protéobactérie par une cellule ancestrale (théorie endosymbiotique) [265].

Au début des années 50, des observations en microscopie électronique révèlent la structure de la mitochondrie. Elle est décrite comme composée de deux membranes; **une membrane externe**, où la présence de nombreuses porines permet le passage de petites molécules dont la masse moléculaire ne dépasse pas 10 kDa, ainsi qu'une **membrane interne**, repliée de telle façon à créer de nombreuses invaginations ou crêtes, ce qui a pour conséquence d'augmenter sa surface totale. Cette membrane contient de nombreux transporteurs transmembranaires et de protéines appartenant à la chaîne respiratoire. **Un espace intermembranaire** est délimité de part et d'autre par ces deux membranes, sa composition est proche de celle du cytosol de la cellule et est riche en nombreuses kinases, notamment les adényl-kinases qui catalysent la phosphorylation de l'AMP en ADP. Enfin, **la matrice mitochondriale** consistant en un fluide dense riche en enzymes, notamment celles impliquées dans le processus d'oxydation. Cet espace renferme également de nombreuses copies du génome mitochondrial ainsi que les protéines nécessaires à sa transcription puis à la traduction de l'ARNm en protéines. La protéosynthèse mitochondriale ne concerne cependant qu'un nombre restreint de protéines (13 protéines), la grande majorité des protéines mitochondriales étant importées à partir du cytoplasme [266].

Des études biochimiques sur cet organelle ont mis en évidence son rôle physiologique dans le système énergétique de la cellule essentiel à sa survie. La mitochondrie est impliquée dans le processus de respiration, du recyclage d'ADP en ATP impliqué notamment dans la phosphorylation oxydative, la synthèse des lipides et des stéroïdes, ainsi que de nombreux autres processus cellulaires et métaboliques. Par la suite, des travaux ont également montré le

rôle important de la mitochondrie dans le bon déroulement de la mort des cellules par apoptose. Enfin, la découverte de l'implication de la protéine mitochondriale MAVS dans la signalisation des RLRs a souligné un nouveau rôle de la mitochondrie dans la réponse immunitaire anti-virale [267-270].

En microscopie optique, les mitochondries apparaissent sous forme de granules, de bâtonnets ou de filaments de longueur variable. Leur appellation, introduite en 1898, tirée des mots grec: « mitos » pour filament et « chondros » pour granule reflète donc l'hétérogénéité de leur morphologie. Bien plus tard, l'observation des mitochondries dans des cellules vivantes, révèle le comportement très dynamique du compartiment mitochondrial et montre des événements apparents de fusion et de fission [271].

2. Les phénomènes de fusion et de fission mitochondriale

1. Généralités

Les cellules eucaryotes présentent un réseau mitochondrial filamenteux qui résulte d'un équilibre dynamique entre deux forces antagonistes de fission et de fusion. Dans des conditions normales, l'équilibre fusion/fission s'établit au profit de la fusion et les mitochondries apparaissent filamenteuses. L'inhibition de la composante fusion provoque la fragmentation des mitochondries qui prennent une structure punctiforme isolée. À l'inverse, lorsque la fission est inhibée, le réseau mitochondrial apparaît excessivement filamenteux et interconnecté, ce phénomène est appelé « hyperfusion » (Figure 23). En outre, l'observation des mitochondries par microscopie en temps réel montre clairement que cet équilibre n'est pas figé. En effet, quelque soit leur morphologie, les mitochondries se déplacent, se divisent et fusionnent continuellement [272-275].

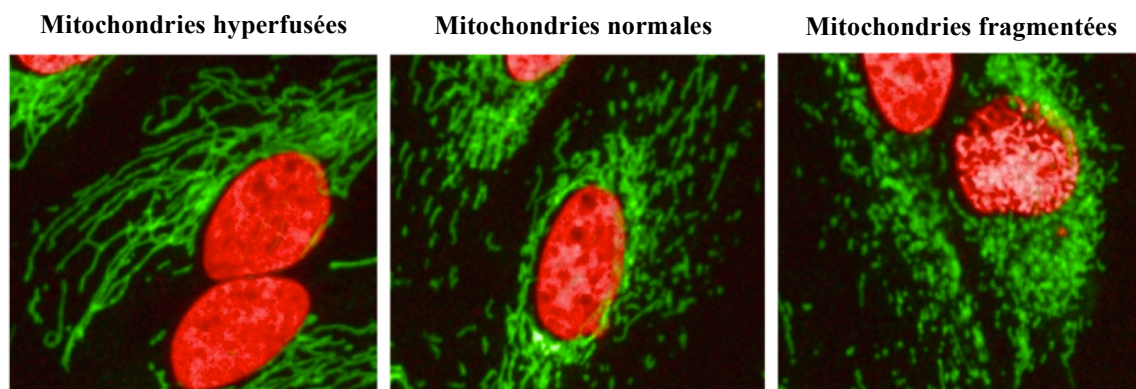


Figure 23 . Visualisation de la dynamique mitochondriale. Aspect des mitochondries dans des cellules HeLa normales ou après induction des phénomènes de fusion (à droite) ou de fission (à gauche). La protéine mitochondriale TOM20 a été marquée en vert et les noyaux en rouge (*image tirée de : <http://mgcheo3.med.uottawa.ca>*)

Ces mouvements permanents sont parfaitement coordonnés avec la physiologie cellulaire, afin de répondre aux besoins en constante évolution de la cellule. A titre d'exemple, au cours du cycle cellulaire, les mitochondries s'allongent durant la phase de transition G1/S et se fragmentent au début de la mitose et lors de l'apoptose. En revanche, elles hyperfusent en cas de privation de nutriments ou de stress oxydatif. Cette restructuration coordonnée est d'autant plus importante que la perturbation de ces processus a pour conséquence des effets négatifs sur le fonctionnement global de la cellule [275-279].

La fusion mitochondriale fait appel à un mécanisme remarquablement conservé de la levure jusqu'à l'homme [280]. Les premiers tests de fusion mitochondriale ont été réalisés chez *S. cerevisiae* [280, 281]. Cette levure existe sous deux formes haploïdes capables de se conjuguer. Le marquage des mitochondries par des fluorophores différents a mis en évidence que les membranes mitochondriales des deux formes de levure fusionnent et permettent ainsi le mélange des composants mitochondriaux [282]. La reconstitution de la fusion *in vitro* a démontré que la fusion des membranes internes et celle des membranes externes sont des événements distincts qui nécessitent tous deux un apport de GTP [283]. La même étude a été par la suite réalisée chez les mammifères. Les mitochondries de deux populations de cellules dont la fusion a été induite, ont été marquées par des molécules fluorescentes. Ces études ont permis d'identifier certaines caractéristiques de ce mécanisme. En effet, il a été démontré que la fusion mitochondriale permet l'échange de protéines, de complexes respiratoires et de nucléotides de manière indépendante du cytosquelette. Toutefois, ce mécanisme est aboli lorsque le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$) est dissipé. Elles ont également dévoilé

que les membranes externes et internes fusionnent en deux réactions séparées et que seule la dernière est sensible à la dissipation du $\Delta\psi_m$ [284]. Deux types de fusion ont été décrits; dans la majorité des cas, la fusion est instable de type « kiss and run », les mitochondries fusionnent leurs membranes, échangent leurs matériels et se séparent aussitôt. Dans une minorité des cas, la fusion est stable et conduit à la formation d'une mitochondrie allongée [285].

L'observation des phénomènes de fusion et fission a fait émerger de nombreuses questions. Quels sont les acteurs impliqués dans la fusion et la fission? Quelle est la pertinence fonctionnelle de la dynamique mitochondriale? Comment est-elle régulée? Bien que de grands progrès ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes régissant ces phénomènes, de nombreuses questions restent, toutefois, en suspend.

2. Acteurs et mécanistique de la dynamique mitochondriale

Dans les années 1990, des cribles génétiques menés chez la levure *S. cerevisiae* ont conduit à l'isolement de mutants dont la morphologie des mitochondries était altérée, permettant ainsi l'identification des premières protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale [280].

Les principales protéines de fission et de fusion mitochondriales appartiennent à la famille des « Dynamines ». La première dynamine mitochondriale, découverte chez la levure, a été nommée Mgm1 (Mitochondrial genome maintenance 1), en conséquence aux défauts de maintenance du génome mitochondrial survenus suite aux mutations du gène *mgm1* [286]. Cette distribution anormale de l'ADN mitochondrial a par la suite été indiquée comme conséquence secondaire de l'abolition du mécanisme de fusion des membranes internes mitochondriales [287]. Un homologue humain de Mgm1 a été découvert grâce à la cartographie génétique d'une maladie neuro-dégénérative oculaire appelée « atrophie optique dominante ». Cet homologue a été appelé **OPA1** [288, 289].

La fusion des membranes externes des mitochondries implique d'autres dynamines. La première protéine a été découverte dans les spermatozoïdes de la drosophile et a été nommée « Fzo1 », pour « Fuzzy onion » en raison de l'apparence en lamelles d'oignon désorganisées qu'ont les mitochondries des mutants pour cette protéine [290]. Deux homologues ont par la

suite été caractérisés chez les mammifères, il s'agit des **Mitofusines 1 et 2** « **Mfn1 et Mfn2** » [291, 292].

La délétion des gènes codant pour les protéines fusogènes entraîne, chez la levure et les mammifères, la fragmentation des mitochondries par inhibition de leur fusion. On pense actuellement que les protéines Fzo1/Mfn s'associent en trans pour induire l'accolement puis la fusion, GTP-dépendante, des membranes externes, et que la fusion des membranes internes est ensuite prise en charge par la dynamine Mgm1/OPA1 (Figure 24) [281, 293].

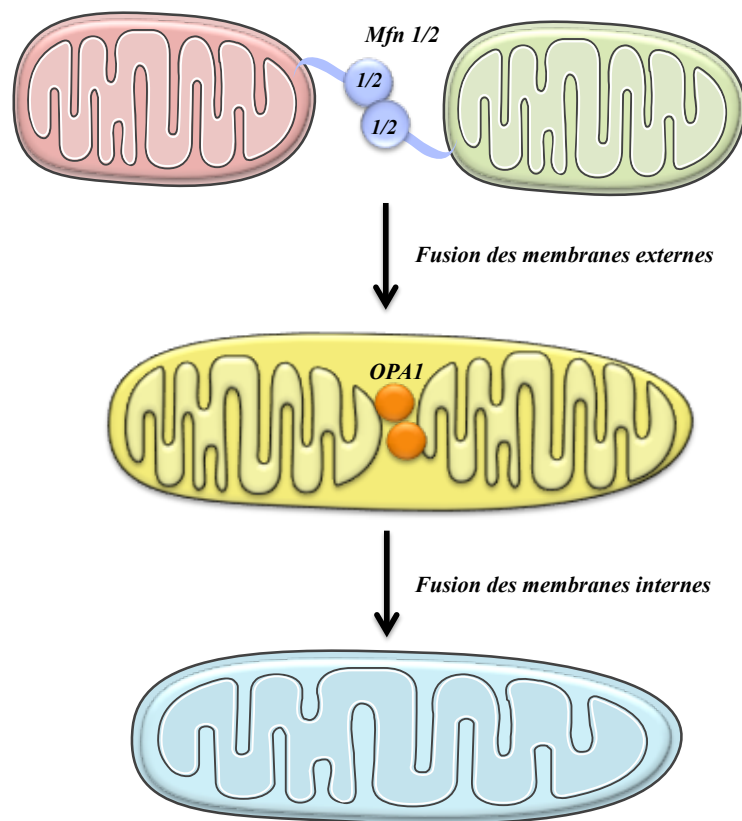


Figure 24. Représentation schématique de la fusion mitochondriale chez les mammifères. Fusion des membranes mitochondriales externes impliquant les protéines Mfn1/2 suivie par la fusion des membranes internes grâce à la protéine Opa1.

Contrairement à la machinerie de fusion impliquant différentes dynamines spécifiques pour chacune des membranes mitochondriales, la machinerie de fission n'utilise qu'un seul type de dynamine. Cette protéine appelée Dnm1 chez la levure et **Drp1** chez l'homme, est majoritairement cytosolique. La délétion ou la mutation de Dnm1/Drp1, augmente la longueur et la connectivité des mitochondries et empêche leur fragmentation [294-296].

Chez les mammifères, Drp1 est recrutée à la membrane mitochondriale externe au niveau des futurs sites de fission. Ce recrutement requiert les protéines Fis1, MiD49, MiD51 et Mff, se

situant sur la membrane externe des mitochondries et qui servent de « récepteurs » à cette dynamine [297-300]. Une fois recrutée à la membrane externe, Drp1 s'oligomérisé et forme une spirale dont le changement de structure, induit par l'hydrolyse du GTP, provoque la fission des mitochondries (Figure 25) [299, 301].

À côté des composants principaux des machineries de fusion et fission précédemment décrits, d'autres acteurs ont également été identifiés. A titre d'exemple, la protéine de fission GDAP1 (ganglioside- induced differentiation-associated protein 1) responsable d'une neuropathie chez l'homme (maladie de Charcot-Marie-Tooth) et la protéine ATAD3A (ATPase family, AAA domain containing 3A) impliquée dans la régulation des interaction entre les membranes interne et externe [302, 303].

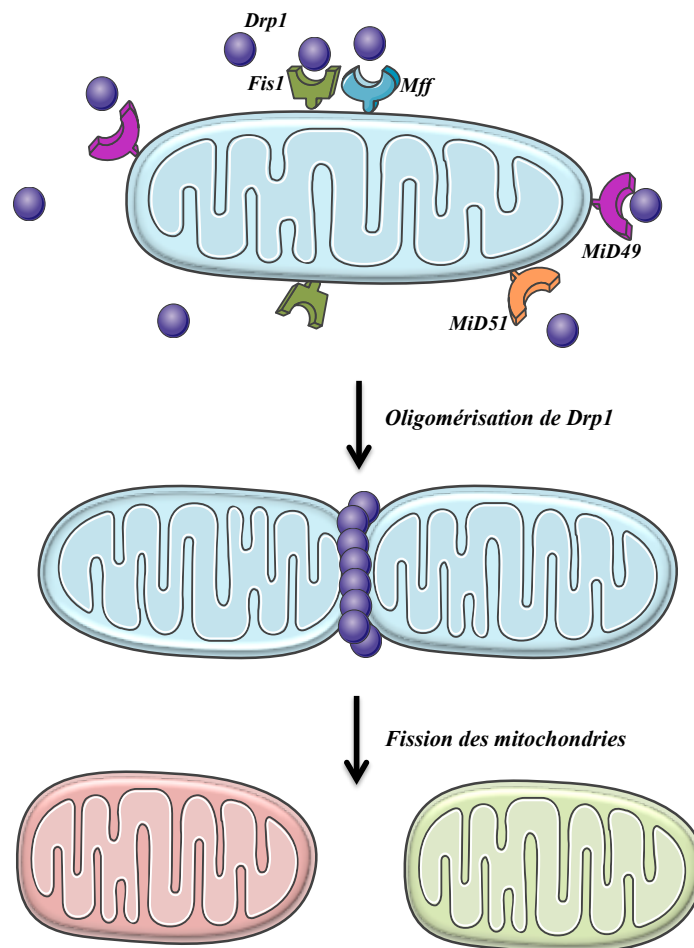


Figure 25. Représentation schématique de la fission mitochondriale chez les mammifères. La dynamine cytosolique Drp1 est recrutée au niveau de la membrane externe de la mitochondrie *via* les protéines mitochondriales Fis1, Mff, MiD49 et MiD51. Drp1 s'oligomérisé et forme une spirale provoquant la fission des mitochondries.

3. Pertinence fonctionnelle de la dynamique mitochondriale

Les deux phénomènes antagonistes de fission et de fusion sont requis pour le maintien de la forme et des fonctions de la mitochondrie. Alors que la fusion permet l'échange moléculaire et la complémentation fonctionnelle entre mitochondries, la fission favorise leur transport, notamment dans les neurones, leur répartition équitable au cours de la mitose ainsi que leur élimination par autophagie [299, 304].

Les nombreuses conséquences de l'inactivation des acteurs de la dynamique mitochondriale illustrent sa pertinence aussi bien sur le plan de l'organite et la cellule que de l'organisme. D'un point de vue moléculaire, le fonctionnement de la chaîne respiratoire, la signalisation calcique, la différenciation musculaire, la plasticité et le fonctionnement des neurones, le processus de sénescence, la cascade apoptotique ainsi que d'autres processus, sont altérés par des modifications de l'expression des différentes protéines impliquées dans les processus de fusion et de fission [301, 305, 306]. Par ailleurs, sur le plan physiologique, l'importance de la dynamique mitochondriale est attestée par les sévères phénotypes observés dans les organismes où les cellules sont déficientes dans l'une des protéines nécessaires à cette dynamique; stérilité masculine (Fzo chez la drosophile), arrêt précoce du développement embryonnaire (Mfns chez la souris), cécité provoquée par une atrophie du nerf optique (OPA1 chez l'humain) et implication dans diverses maladies neuro-dégénératives [292, 307-310].

Vu les retombées que peuvent avoir de tels phénomènes sur l'organisme, il est à présent indispensable de clarifier les fondements moléculaires qui les régissent afin de mieux comprendre les nombreux processus qui en dépendent, que ce soit dans un contexte normal ou pathologique.

IV. Notions de base sur certains organites cités dans ce manuscrit

1. Appareil de Golgi:

L'appareil ou le complexe de Golgi est un organite central dans le système endomembranaire. Malgré son origine ancestrale et la conservation de la plupart des protéines qui y sont associées, sa structure présente toutefois des disparités selon les différents organismes. Dans la majorité des cellules, l'appareil de Golgi est conçu comme un empilement de structures membranaires aplaties, appelées « citernes ou saccules » organisées de manière polarisée (Figure 26). Chaque pile de saccules est appelée « dictyosome ». Les cellules de mammifères possèdent un seul dictyosome organisé sous forme de ruban membranaire, cependant, au niveau des invertébrés, champignons et végétaux, plusieurs dizaines de dictyosomes isolés sont à dénombrer. Chaque dictyosome comporte 5 à 8 saccules et est constitué de deux faces; une face « Cis » en rapport avec le réticulum endoplasmique, et une face « Trans » en liaison avec la membrane plasmique, les saccules situées au niveau de cette face donnent naissance par bourgeonnement à des grains de sécrétion. Cette polarité morphologique des dictyosomes traduit une polarité fonctionnelle de l'appareil de Golgi.

L'appareil de Golgi exerce de nombreuses fonctions essentielles au bon fonctionnement de la cellule, il s'agit notamment de la modification par glycosylation des protéines provenant du réticulum endoplasmique ainsi que leur transport et orientation vers leurs compartiments respectifs. L'appareil de Golgi catalyse également la protéolyse de certaines protéines sous forme inactive afin d'induire leur activation et est également considéré comme principal site pour la biosynthèse de la partie glucidique de certains glycolipides abondants au niveau de la membrane plasmique. De plus en plus d'évidences suggèrent l'important rôle de cet organite dans la transduction de la signalisation.



Figure 26. L'appareil de Golgi en microscopie électronique (image tirée de: <http://www.sciencephoto.com>)

2. Réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organelle eucaryote considéré comme le théâtre d'une multitude de processus cellulaires.

Le RE est un ensemble de cavités closes communicantes entre elles. La forme de ces cavités est très variable (cisternes aplaties, vésicules globuleuses et tubes contournés). Il se présente en microscopie électronique sous deux formes différentes, correspondant à 2 aspects fonctionnels, le réticulum endoplasmique rugueux (RER), couvert de ribosomes, en continuité avec l'enveloppe nucléaire et le réticulum endoplasmique lisse (REL). En règle générale, le RER intervient dans la synthèse et la glycosylation de certaines protéines notamment les protéines sécrétoires, lysosomiales et celles intégrées aux biomembranes. Le REL est quant à lui impliqué dans la synthèse de différents types de stéroïdes et de lipides selon le type cellulaire, ainsi que dans la détoxification des cellules et le stockage du calcium. Le réticulum endoplasmique joue également un rôle majeur dans le contrôle de qualité des protéines. En effet, il s'assure de l'acquisition de la structure tertiaire de celles-ci. Ce repliement est en grande partie dû à la formation de ponts disulfures (Cys-S-S-Cys) et est contrôlé par des protéines chaperones telles que BiP ainsi que par la calnexine et la calréticuline qui sont insérées dans la membrane du RER. Si les protéines sont incorrectement ou non repliées, elles vont être exportées vers le cytosol où elles seront dégradées par le protéasome, ce processus s'appelle ERAD (Endoplasmic-reticulum Associated Degradation).

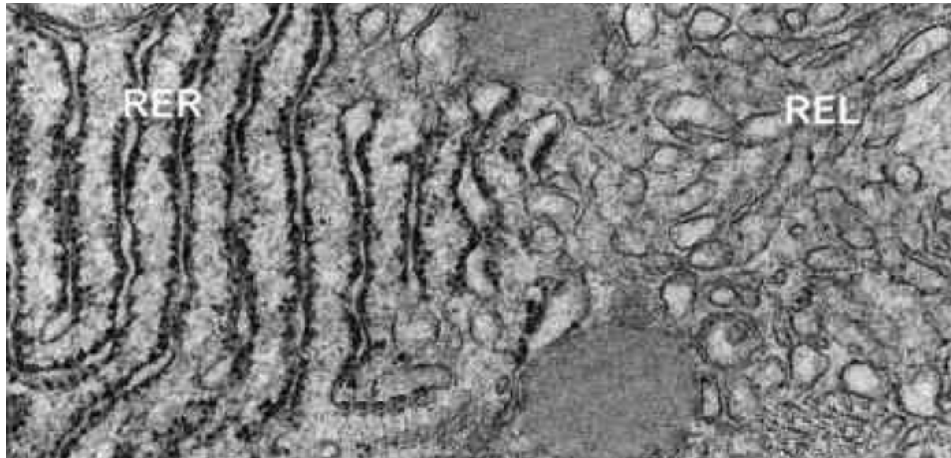


Figure 27. Réticulum endoplasmique rugueux (RER) et lisse (REL) en microscopie électronique
(Image tirée de <http://www.ebiologie.fr>)

V. Description du projet

Le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle essentiel dans le développement, l'homéostasie ainsi que lors des réponses immunitaires, et toute dérégulation de ce facteur peut avoir des conséquences désastreuses pour l'organisme.

L'activation de NF- κ B suite à l'engagement de différents immunorécepteurs requiert la mise en place de larges signalosomes formés suite au recrutement de différents adaptateurs au niveau des immunorécepteurs engagés. Ces adaptateurs subissent des ubiquitinations non-dégradatives au niveau desquelles se fera le recrutement de complexes nécessaires pour la transduction du signal. Nous avons démontré dans un précédent travail que ces protéines ubiquitinylées s'accumulent au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) *via* la protéine réticulaire Métadhérine (MTDH) qui assure la propagation du signal. Grâce à des expériences de mutagenèse dirigée, nous avons démontré que l'ubiquitination est un prérequis nécessaire à l'adressage de ces protéines au RE.

La première partie de ma thèse a pour objectif l'évaluation de la contribution des E3 ubiquitines ligases possédant au moins un domaine transmembranaire, permettant leur ancrage à la membrane d'un organite, au cours de l'activation de NF- κ B. Pour se faire, un crible d'une banque de siRNAs dirigés contre les 46 E3 ubiquitine ligases transmembranaires a été réalisé par bioluminescence en utilisant comme modèle la signalisation du TNF récepteur dans des cellules HEK293.

La deuxième partie de mon travail de thèse va porter sur l'étude de la dynamique mitochondriale. Les mitochondries sont des organites dynamiques, qui se déplacent, se divisent et fusionnent continuellement. Leur forme est maintenue grâce à une balance entre deux processus antagonistes de fission et fusion. Ces mouvements permanents sont parfaitement coordonnés avec la physiologie cellulaire et toute perturbation de ces processus a pour conséquence des effets négatifs sur le fonctionnement global de la cellule. Si la fission mitochondriale est requise lors de l'apoptose, peu de choses sont connues à propos du processus de fusion, si ce n'est son implication dans le maintien de l'ADN mitochondrial. Il a toutefois été rapporté qu'en réponses à certains stress modérés, les mitochondries hyperfusent, ce processus appelé SIMH (Stress-Induced Mitochondrial Hyperfusion) est considéré comme une réponse adaptative au stress.

Partant de l'observation majeure, au niveau de notre laboratoire, que la voie NF- κ B est activée suite au SIMH, la deuxième partie de ma thèse a pour objectif de déterminer le mécanisme par lequel NF- κ B est activé et d'élucider, dans la mesure du possible, l'intérêt d'un tel processus pour la cellule.

Résultats

Article I

THE E3 UBIQUITIN LIGASE RNF121 IS A POSITIVE REGULATOR OF NF- κ B ACTIVATION

Zemirli N, Pourcelot M, Dogan N, Vazquez A, Arnoult D.

In press à Cell communication and signaling

Le facteur de transcription NF- κ B est impliqué dans différents processus physiologiques notamment les réponses immunitaires, la croissance cellulaire ainsi que l'inflammation et l'apoptose. Il joue également un rôle dans certains processus pathologiques comme l'auto-immunité et la tumorigénèse.

De récents travaux dans notre laboratoire suggèrent un rôle crucial des membranes d'organites dans l'activation de NF- κ B, c'est pourquoi nous avons voulu évaluer la contribution des E3 ligases transmembranaires dans l'activation de ce facteur de transcription. Pour ce faire, nous avons criblé une banque de siRNAs dirigés contre les 46 E3 ubiquitine ligases possédant au moins un domaine transmembranaire en utilisant la stimulation du TNFR comme modèle.

Ceci a permis l'identification de la protéine RNF121 comme régulateur positif de NF- κ B et cela en aval de la stimulation de différents récepteurs de l'immunité innée.

Les différentes expériences de bioluminescence, biochimie, immunofluorescence et absorbance réalisées dans différents modèles d'activation ont montré qu'en absence de RNF121, l'activation de NF- κ B était fortement inhibée. A l'inverse, la surexpression de cette protéine, mais pas de sa forme mutée pour le domaine RING, induit une plus forte activation de NF- κ B par rapport au contrôle. Afin de situer à quel niveau de la signalisation agit RNF121, nous avons exploré le profil d'activation des différentes protéines de la voie NF- κ B en aval de la stimulation du TNF récepteur, en présence ou en absence de RNF121. Si l'ubiquitination de RIP1 et l'activation du complexe IKK ne semblent pas être affectées par l'absence de RNF121, toutefois, nous avons relevé un retard au niveau de la dégradation de l'inhibiteur de NF- κ B « I κ B α » ainsi qu'une accumulation de la forme phosphorylée de celui-ci. Ces observations majeures nous ont permis de supposer que RNF121 agit entre les processus de phosphorylation et d'ubiquitination d'I κ B α . Or, il est clairement établi qu'entre ces deux mécanismes, se trouve celui de l'ubiquitination dégradative d'I κ B α . Bien que RNF121 et I κ B α se retrouvent dans un même complexe, elles ne semblent pas interagir directement entre elles, comme l'attestent les expériences d'immunoprécipitation réalisées. Ceci suggère que RNF121 agit de manière indirecte au niveau de l'ubiquitination d'I κ B α . Comme le complexe d'E3 ligases SCF^{TrCP} catalyse l'ubiquitination dégradative d'I κ B α , nous supposons que RNF121 agirait au niveau de l'activation, régulation ou recrutement de ce complexe. Nos résultats préliminaires ainsi que certaines données bibliographiques confortent notre hypothèse.

SHORT REPORT

Open Access

The E3 ubiquitin ligase RNF121 is a positive regulator of NF- κ B activation

Naima Zemirli^{1,2,3}, Marie Pourcelot^{1,2,3}, Neslihan Dogan^{1,2,3}, Aimé Vazquez^{1,2,3} and Damien Arnoult^{1,2,3*}

Abstract

Background: The nuclear factor κ B (NF- κ B) family members regulate several biological processes as cell proliferation and differentiation, inflammation, immunity and tumor progression. Ubiquitination plays a key role in NF- κ B activation and the ubiquitylated transmitters of the NF- κ B signaling cascade accumulate in close proximity to endomembranes.

Findings: We performed an unbiased siRNA library screen targeting the 46 E3 ubiquitin ligases bearing transmembrane domains to uncover new modulators of NF- κ B activation, using tumor necrosis factor- α (TNF- α) receptor (TNFR) stimulation as a model. We report here the identification of a new Golgi Apparatus-resident protein, RNF121, as an enhancer of NF- κ B promoter activity through the catalytic function of its RING domain. From a molecular standpoint, while knocking down RNF121 did not alter RIP1 ubiquitination and IKK activation, the proteasomal degradation of I κ B α was impaired suggesting that this E3 ubiquitin ligase regulates this process. However, RNF121 did not directly ubiquitinate I κ B α . While they were found in the same complex. Finally, we discovered that RNF121 acts as a broad regulator of NF- κ B signaling since its silencing also dampens NF- κ B activation following stimulation of Toll-Like Receptors (TLRs), Nod-Like Receptors (NLRs), RIG-I-Like Receptors (RLRs) or after DNA damages.

Conclusions: These results unveil an unexpected role of Golgi Apparatus and reveal RNF121 as a new player involved in the signaling leading to NF- κ B activation.

Keywords: NF- κ B, Ubiquitination, E3 ubiquitin ligase, Golgi apparatus, Innate immunity

Findings

The transcription factor NF- κ B plays pivotal roles in the regulation of a plethora biological processes, including cell proliferation and differentiation, innate and adaptive immunity, inflammation and tumor progression [1,2]. NF- κ B is a homo or heterodimer constituted with subunits belonging to the Rel family and the NF- κ B dimers are sequestered in the cytosol by a member of the Inhibitor of κ B (I κ B) family [2,3].

NF- κ B is activated by many inducers. Each inducer is recognized by a receptor at the cell surface or within the cell, and its binding triggers a specific signaling pathway leading to NF- κ B activation [2,3]. Each pathway involves the organization of signaling protein complexes, the formation of polyubiquitin chains acting as binding agents on specific transmitters and the action of kinases [4,5]. Nevertheless, all these complexes have a point in common:

they recruit and activate, through specific ubiquitylated transmitters, 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) [6]. IKK then phosphorylates the inhibitory I κ B proteins, promoting their Lys⁴⁸ (K⁴⁸)-linked ubiquitination and proteasomal degradation [7]. NF- κ B dimers subsequently enter the nucleus, where they initiate the transcription of their target genes, including genes encoding pro-inflammatory cytokines or anti-apoptotic proteins [1].

As we recently reported an accumulation of the ubiquitylated transmitters leading to NF- κ B activation to the endomembrane fraction [8], we set up a siRNA screen with two oligoribonucleotides against each of the 46 membrane spanning E3 ubiquitin ligases [9] (Additional file 1) to uncover new regulators of NF- κ B activation, using tumor necrosis factor- α (TNF- α) receptor (TNFR) stimulation as a model. Indeed, engagement of TNFR promotes a rapid NF- κ B activation through the recruitment to the receptor of the adaptor protein TRADD together with the E3 ubiquitin ligases c-IAPs and TRAF2, which

* Correspondence: damien.arnoult@inserm.fr

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

²Université Paris-Sud P11, Orsay 91400, France

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

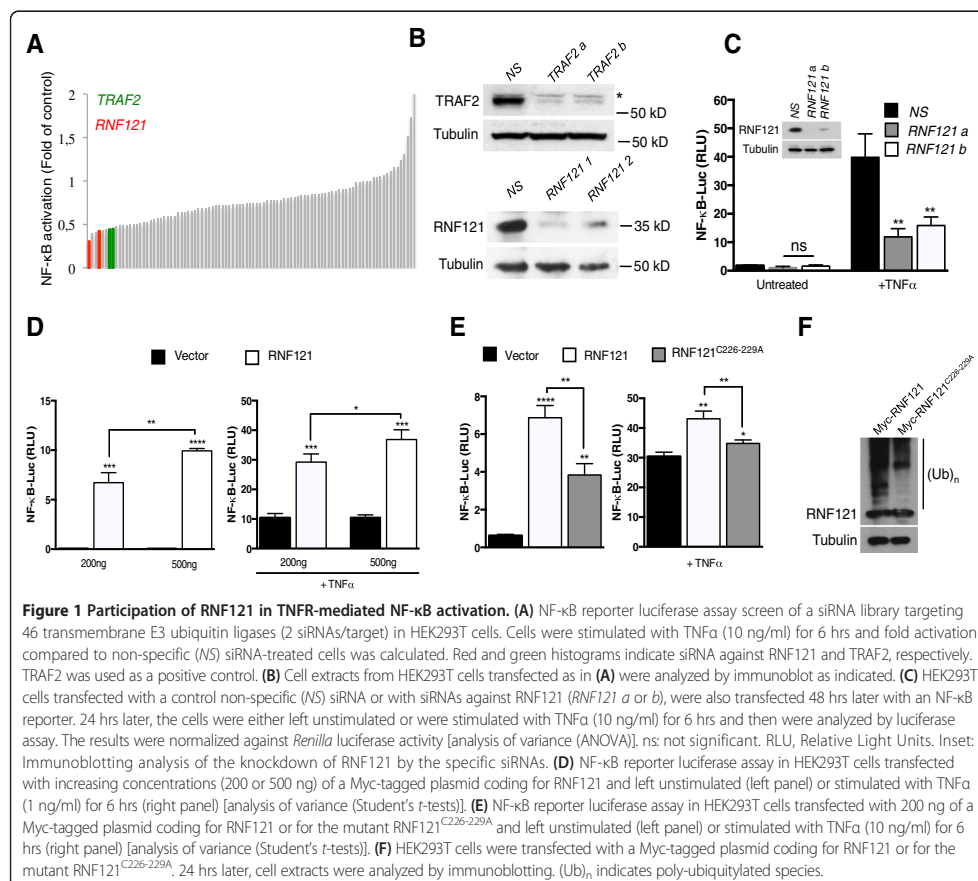


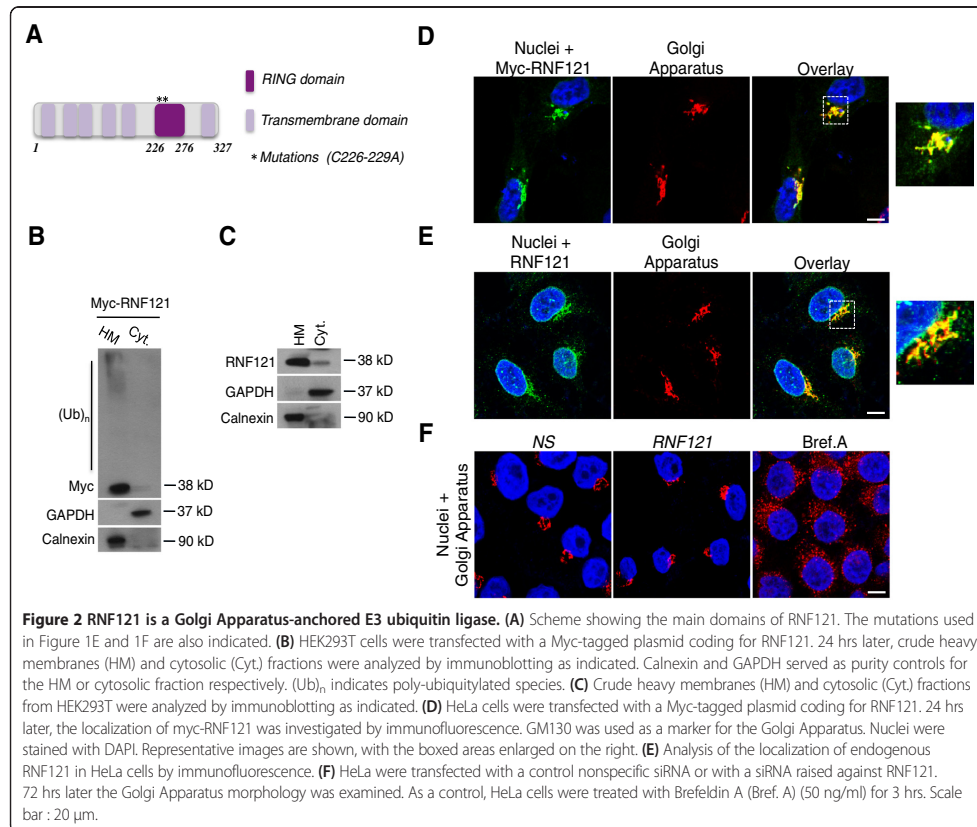
© 2014 Zemirli et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

are responsible for catalyzing the polyubiquitination of the kinase RIP1 that acts as a specific ubiquitylated transmitter for this pathway [10]. The impact of the knock down of the 46 membrane spanning E3 ubiquitin ligases was assessed in a gene reported assay and silencing of the key regulator of TNFR-mediated NF- κ B TRAF2 was used as a control (Figure 1A, B; see Additional file 2 for detailed Methods description). Among the top hits was RNF121 (Figure 1A). RNF121 is part of a chromosomal band (11q13) that may contain a high penetrance gene for breast cancer [11]. We then used two additional siRNA sequences against RNF121 and confirmed that TNFR-mediated NF- κ B activation was decreased, further validating the results from our initial screen (Figure 1C). Interestingly, the enforced expression of RNF121 activated NF- κ B and NF- κ B activation following TNFR stimulation was potentiated in a dose dependent-manner (Figure 1D). RNF121 specifically triggered NF- κ B activation because it did not stimulate the expression of IFN β -, ISRE-, NFAT-,

API- or p53-dependent reporter genes (data not shown). The ability of RNF121 to activate NF- κ B was dependent on the catalytic activity of its RING domain, because the RNF121^{C226-229A} mutant gave significantly lower levels of NF- κ B activation (Figure 1E). Based on the available RING finger protein structure [12,13], the replacement of the cys-226 and 229 residues with an alanine was predicted to prevent Zn²⁺ coordination, thereby impeding the overall function of the RING domain as assessed by the level of auto-ubiquitination (Figure 1F).

RNF121 is a 327 amino acids protein with a RING domain, and six transmembrane domains that have reported to anchor the protein at the endoplasmic reticulum (ER) in the nematode [14] (Figure 2A). Accordingly, both ectopically expressed and endogenous RNF121 were detected in fractions enriched with intracellular organelles (Figure 2B and C). Next, analysis of the cellular localization of RNF121 by immunofluorescence showed that Myc-tagged or endogenous RNF121 specifically co-localized

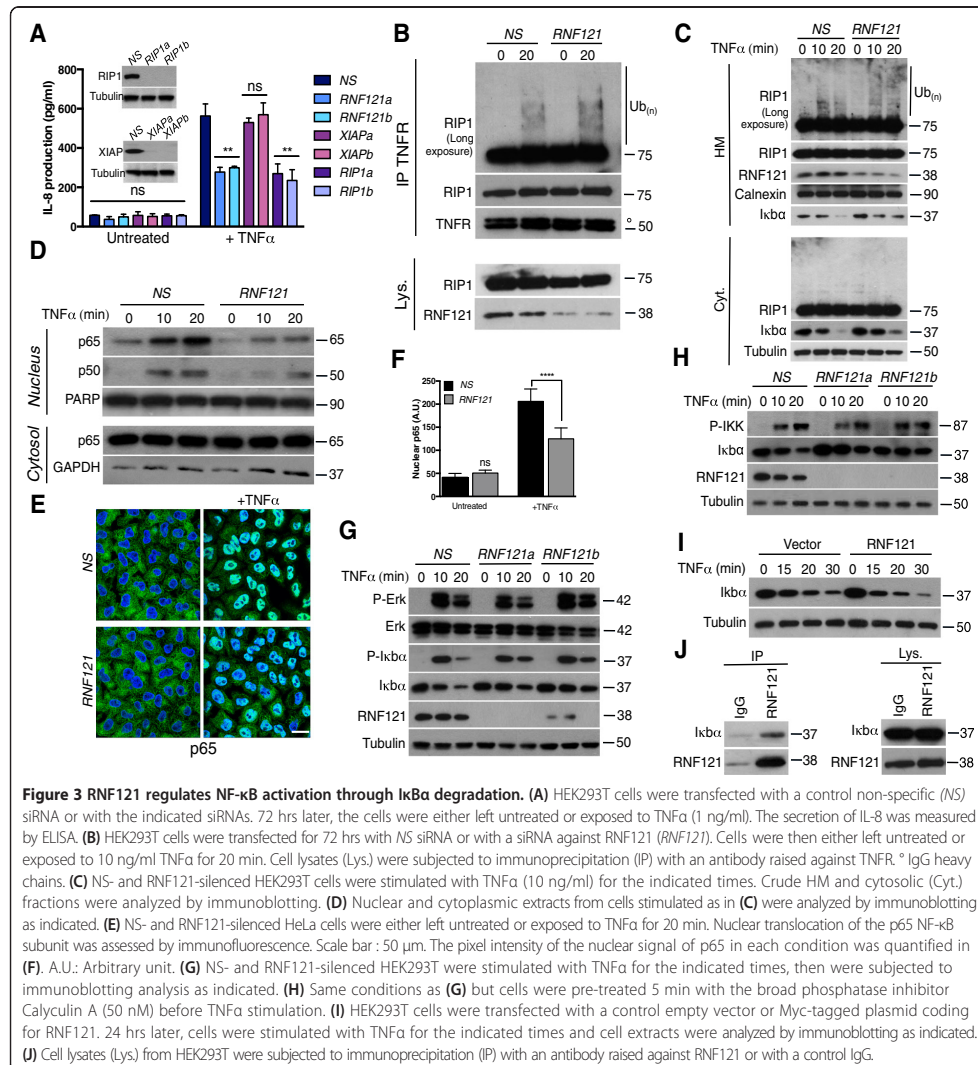




with the Golgi Apparatus (Figure 2D and E). Finally, while RNF121 appeared to be anchored in the Golgi Apparatus, silencing of this protein did not seem to affect the morphology of this organelle unlike a Brefeldin A treatment (Figure 2F), and the cell viability was not significantly modified (data not shown).

While RNF121 and RNF175 are close homologs (Additional file 3A), silencing of RNF175 had no overt effect on TNFR-mediated NF- κ B activation (Additional file 3B) suggesting a specificity of RNF121 in this pathway. Next, as for RIP1, RNF121 silencing impaired the secretion of the cytokine IL-8, a target gene of NF- κ B [1], further confirming the participation of RNF121 in TNFR-mediated NF- κ B activation (Figure 3A). RNF121 silencing also sensitized cells to TNF α -mediated cell death (Additional file 4) confirming again the involvement of RNF121 in NF- κ B activation as NF- κ B protects from TNF α -mediated cell death through the expression of anti-apoptotic proteins [1]. Because ubiquitination of RIP1 is the central event in TNFR signaling [4,5,10], we next investigated whether RNF121

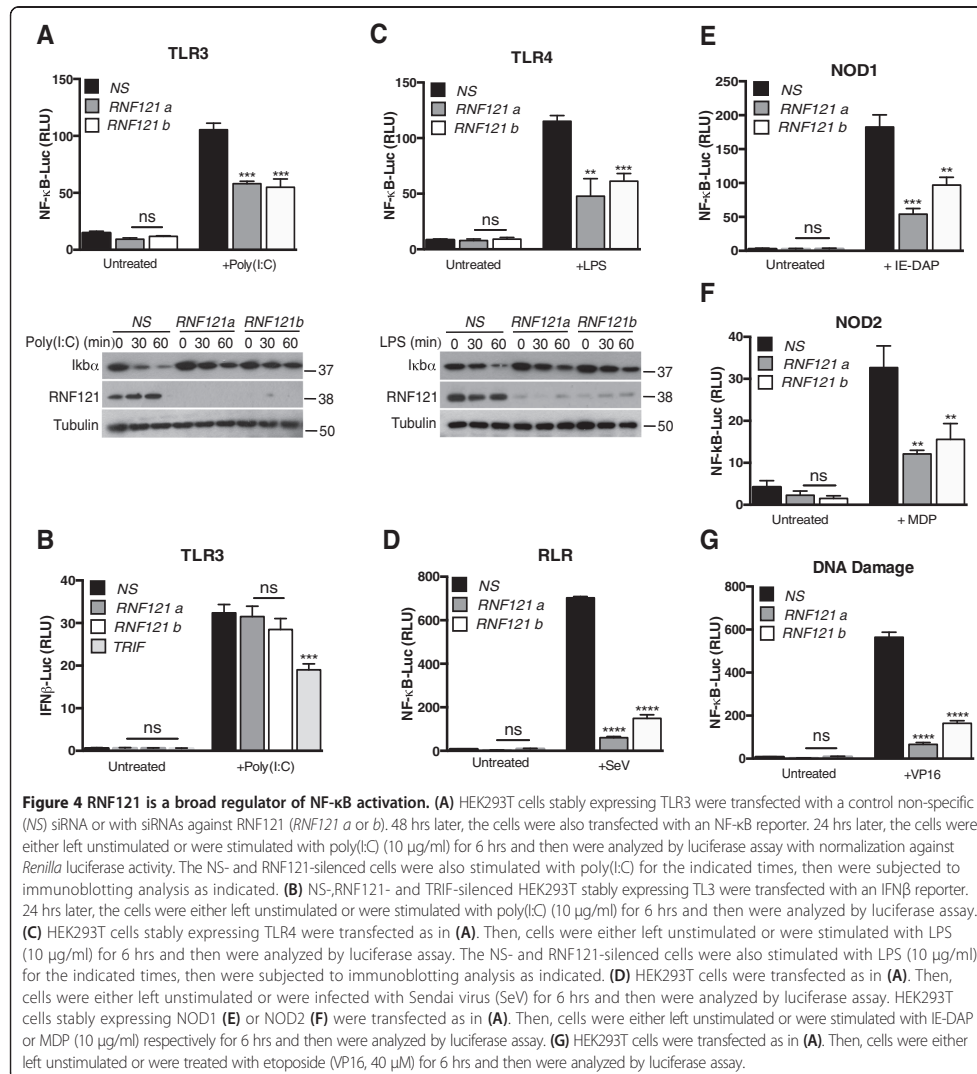
silencing impacts this process. Immunoprecipitation of the TNFR indicated that RIP1 ubiquitination is not altered when RNF121 was knocked down (Figure 3B) and the accumulation of ubiquitylated RIP1 in the heavy membrane fraction was not impeded [8] (Figure 3C). Unexpectedly, RIP1 deubiquitination in RNF121-silenced cells seemed to be delayed (Figure 3C). Nevertheless and as expected, cell fractionation experiments showed reduced p65/p50 NF- κ B dimer levels in nuclear fractions from RNF121-silenced cells (Figure 3D) and the decreased relocation of p65 into the nuclei was confirmed by confocal microscopy (Figure 3E and F). These observations were in agreement with the finding that the proteasomal degradation of I κ B α was hampered (Figure 3C, G, H and Additional file 5). Nevertheless, as for the MAPKs extracellular signal-regulated kinase (ERK), I κ B α phosphorylation was not inhibited when RNF121 was knocked down (Figure 3G) in accord with the observation that activation of the IKK complex was not reduced either (Figure 3H). Together, these results suggested that RNF121 is likely implicated in the control of the proteasomal degradation of



IκBα. Accordingly, ectopic expression of RNF121 accelerated IκBα degradation following TNFα exposure (Figure 3I). Immunoprecipitation of endogenous RNF121 demonstrated that both proteins are in the same complex (Figure 3J) and a pool of IκBα co-localized with RNF121 (Additional file 6). However, RNF121 did not seem to induce the ubiquitination of IκBα (Additional file 7A and B) likely because both proteins did not directly interact (Additional file 7A and C).

As RNF121 seemed to regulate IκBα degradation, a general feature in the process of NF-κB activation [3,7], we then investigated whether RNF121 silencing affects

NF-κB activation upon stimulation of innate immunity receptors [15]. We observed that RNF121 silencing also inhibited IκBα degradation and ensuing NF-κB activation following Toll-Like-Receptor 3 (TLR3) stimulation with poly (I:C) (Figure 4A) while it had no effect on the stimulation of the IFNβ promoter (Figure 4B) confirming the specificity of RNF121 in the NF-κB pathway. Similarly, RNF121 knock down impaired NF-κB activation after stimulation of Toll-Like-Receptor 4 (TLR4), retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I), nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 (NOD1)



and NOD2 with lipopolysaccharide (LPS), viral RNAs, γ -D-Glu-mDAP from peptidoglycan (IE-DAP) or muramyl dipeptide (MDP) respectively (Figure 4C, D, E and F). Finally, in cells exposed to the DNA-damaging agent etoposide, which relies on NEMO SUMOylation and phosphorylation to convey NF-κB activity [16], the transcription factor activation was reduced again (Figure 4G), suggesting that RNF121 acts as a broad regulator of NF-κB signaling.

In summary, we provide evidence that RNF121, a Golgi apparatus-anchored E3 ubiquitin ligase, participates in

NF-κB activation. When overexpressed, RNF121 promotes NF-κB activity. While ubiquitination of specific key transmitters is required for the NF-κB signaling [2-5], our data indicate that ubiquitination of RIP1 (Figure 3B and C), IRAK1 or RIP2 (data not shown) following the stimulation of TNFR, TLR4 or NOD1 respectively, was not affected when RNF121 was silenced. Moreover, although the phosphorylation of both IKK and its target IκBα was normal in RNF121 siRNA-transfected cells, IκBα degradation and the resulting p65/p50 NF-κB dimers redistribution were impaired.

These observations suggest that RNF121 is involved in the proteasomal degradation of I κ B α [7].

Further works are required to delineate the molecular framework employed by RNF121 to regulate I κ B α degradation. I κ B α degradation involves a K⁴⁸-linked ubiquitination [7] that is mediated by a specific E3 ubiquitin ligase SCF ^{β -TrCP} [17-19]. The F-box component of this E3, β -TrCP, recognizes the I κ B α degron formed following phosphorylation by IKK and thus couples I κ B α phosphorylation to ubiquitination [7]. While endogenous RNF121 and I κ B α were found in the same immuno-complex (Figure 3J), RNF121 did not appear to directly ubiquitinate I κ B α (Additional file 7A). We then hypothesize that RNF121 controls SCF ^{β -TrCP} function on I κ B α in a complex through ubiquitination and this aspect merits future exploration. Indeed, the Nedd8 ubiquitin-like molecule regulates the assembly and catalytic activity of the SCF complex [20]. Interestingly, a significant pool of β -TrCP co-localized with the Golgi Apparatus where is anchored RNF121 (Additional file 8) and in preliminary experiments, endogenous RNF121 and β -TrCP were detected in the same complex (data not shown). However, we do not rule out the hypothesis that RNF121 also modulates the ubiquitination of other proteins of the SCF complex as Skp1, Cull1 or Rbx1/Roc1 [7].

In conclusion, over and above its previously known roles, Golgi Apparatus seems to be also involved in NF- κ B activation via the E3 ubiquitin ligase RNF121.

Additional files

Additional file 1: Design of the siRNA library.

Additional file 2: Methods description.

Additional file 3: RNF175, a close homolog of RNF121, does not regulate NF- κ B activation.

Additional file 4: RNF121 silencing sensitizes cells to TNF α -mediated apoptosis.

Additional file 5: RNF121 silencing delays I κ B α degradation.

Additional file 6: A pool of I κ B α co-localizes with RNF121.

Additional file 7: RNF121 does not directly ubiquitinate I κ B α . (PI Δ 597 κ B)

Additional file 8: Intracellular localization of β -TrCP.

Abbreviations

AP-1: Activator protein 1; ERK: Extracellular signal-regulated Kinases; IFN: Interferon; I κ Bs: Inhibitors of NF- κ B; IKK: I κ Bs kinase; ISRE: IFN stimulated response element; MAPK: Mitogen-activated protein Kinase; NFAT: Nuclear factor of activated T-cells; NEMO: NF- κ B essential modulator; NF- κ B: Nuclear factor- κ B; NLR: NOD-Like Receptor; NOD: Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein; RIG-I: Retinoic acid-inducible gene I; RIP1: Receptor interacting protein 1; RLR: RIG-I-like receptor; RNF121: Ring finger protein 121; TLR: Toll-like receptor; TNF α : Tumor necrosis factor α ; TRADD: TNF Receptor type 1-associated death domain protein; TRAF: TNF receptor-associated factor.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

NZ designed and conducted most experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. MP, ND conducted experiments and analyzed the data. AV analyzed the data. DA conceived the project, conducted experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We thank N. Bidère, E. Hatchi, K. Poalas and G. Ambroise for helpful discussions. This work was supported by grants from Fondation ARC, Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée) and ANRS. NZ and MP are supported by fellowships from Université Paris Sud.

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 94800, France.

Received: 13 May 2014 Accepted: 21 October 2014

Published online: 12 November 2014

References

- Ben-Neriah Y, Karin M: Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nat Immunol* 2011, **12**:715-723.
- Hayden MS, Ghosh S: NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 2012, **26**:203-234.
- Napetschnig J, Wu H: Molecular basis of NF- κ B signaling. *Annu Rev Biophys* 2013, **42**:443-468.
- Bhoj VG, Chen ZJ: Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* 2009, **458**:430-437.
- Skaug B, Jiang X, Chen ZJ: The role of ubiquitin in NF- κ B regulatory pathways. *Annu Rev Biochem* 2009, **78**:769-796.
- Israel A: The IKK complex, a central regulator of NF- κ B activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010, **2**:a000158.
- Kanarek N, Ben-Neriah Y: Regulation of NF- κ B by ubiquitination and degradation of the I κ Bs. *Immunol Rev* 2012, **246**:77-94.
- Alexia C, Poalas K, Carvalho G, Zemirli N, Dwyer J, Dubois SM, Hatchi EM, Cordeiro N, Smith SS, Castanier C, Le Guelle A, Wan L, Kang Y, Vazquez A, Gavard J, Arnould D, Bidere N: The Endoplasmic Reticulum Acts as a Platform for Ubiquitylated Components of Nuclear Factor κ B Signaling. *Sci Signal* 2013, **6**:ra79.
- Li W, Bengtson MH, Ulbrich A, Matsuda A, Reddy VA, Orth A, Chanda SK, Batalov S, Joazeiro CA: Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* 2008, **3**:e1487.
- Walczak H: TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunol Rev* 2011, **244**:9-28.
- Rosa-Rosa JM, Pita G, Gonzalez-Neira A, Milne RL, Fernandez V, Ruivenkamp C, van Asperen CJ, Devilee P, Benitez J: A 7 Mb region within 11q13 may contain a high penetrance gene for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009, **118**:151-159.
- Bottomley MJ, Stier G, Pennacchini D, Legube G, Simon B, Akhtar A, Sattler M, Musco G: NMR structure of the first PHD finger of autoimmune regulator protein (AIRE1). Insights into autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) disease. *J Biol Chem* 2005, **280**:11505-11512.
- Katoh S, Hong C, Tsunoda Y, Murata K, Takai R, Minami E, Yamazaki T, Katoh E: High precision NMR structure and function of the RING-H2 finger domain of ELS, a rice protein whose expression is increased upon exposure to pathogen-derived oligosaccharides. *J Biol Chem* 2003, **278**:15341-15348.
- Darom A, Bening-Abu-Shach U, Broday L: RNF-121 is an endoplasmic reticulum-membrane E3 ubiquitin ligase involved in the regulation of beta-integrin. *Mol Biol Cell* 2010, **21**:1788-1798.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006, **124**:783-801.
- McCool KW, Miyamoto S: DNA damage-dependent NF- κ B activation: NEMO turns nuclear signaling inside out. *Immunol Rev* 2012, **246**:311-326.
- Spencer E, Jiang J, Chen ZJ: Signal-induced ubiquitination of I κ B α by the F-box protein Slimb/ β -TrCP. *Genes Dev* 1999, **13**:284-294.
- Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ, Harper JW: The SCF β -TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with

Additional File 1: Methods description

Cell culture and reagents

HEK293T and HeLa cells were provided from the American Type Culture Collection (ATCC). HEK293T cell lines stably expressing NOD1, NOD2, TLR3, or TLR4-MD2-CD14 complex were obtained from InvivoGen (San Diego, CA). All cells were cultured in standard conditions. Depending on the cell line, different ligands were used: TNF α (R&D) was used at 10 ng.ml⁻¹, TLR3 agonist poly (I:C), TLR4 agonist LPS and NODs agonists iE-DAP and Muramyl dipeptide (MDP) were obtained from Invivogen and used at final concentration of 10 μ g.ml⁻¹. Sendai virus (SeV) used to stimulate the RLRs was kindly provided by Dr D. Garcin. Etoposide (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used at the concentration of 40 μ M.

siRNA and transfections

siRNA library targeting the 46 E3 ubiquitin ligases (two oligonucleotides per target) with at least a transmembrane domain [1] was purchased from Sigma (Additional File 2). Additional siRNA sequences used were also purchased from Sigma and were:

RNF121a 5'-CCUUCUCAUCUCUGGCCGA[dT][dT]-3'

RNF121b 5'-GCAACUGCUGGACUGGCUU[dT][dT]-3'

RNF175a 5'-GAGAUCUGCUCAGACUACA[dT][dT]-3'

RNF175b 5'-GUUACUUGGCGAUGAUUU[dT][dT]-3'

RIP1a 5'-CCACUAGUCUGACGGAUAA[dT][dT]-3'

RIP1b 5'-GCAAAGACCUUACGAGAAU[dT][dT]-3'

XIAPa 5'-GGACCAAGACAAGAUUGAA[dT][dT]-3'

XIAPb 5'-CGAGGGCAUAUAUGAAGAA[dT][dT]-3'

HEK293T cells were transfected using the phosphate Calcium precipitation method, whereas HeLa cells transfections were performed using Oligofectamine (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) according to the manufacturer's instructions. siRNA were used at a final concentration of 20 nM.

DNA transfection

Transfection of HEK293T cells was performed using the calcium phosphate precipitation method. Transfection of HeLa cells by DNA was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Life Technologies,). The plasmid encoding myc-tagged RNF121 was purchased from Origen Technologies.

Luciferase assay

Cells were co-transfected with 50 ng of firefly luciferase constructs under the control of the NF- κ B or the IFN- β promoter and 10 ng of the renilla luciferase pRL-TK plasmid (Promega). The transfections were performed using Fugene 6 (Promega) according to the manufacturer's instructions. The next day, cells were stimulated or not with the indicated ligand for six hours. Transfected cells were collected and luciferase activity was assessed using the Dual-luciferase reporter assay (Promega) on a Fluorostar Optima (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Each

experiment was carried out in triplicates. For each sample, to obtain relative fluorescence units (RLU), firefly luciferase fluorescence units were normalized to renilla luciferase fluorescence units.

Protein extraction and immunoblot analysis

Cells were lysed in lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 2 mM sodium pyrophosphate, 10% glycerol, 25 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate) supplemented with Complete protease inhibitor mixture (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France). 10 nM of calyculin A was added to the lysis buffer when IKK phosphorylation was assessed. After incubation on ice for 10 minutes, lysates were cleared by centrifugation at 10,000 g at 4°C and total protein concentration was determined with a micro BCA kit (Thermo scientific). 10 μ g of each lysate were denatured by boiling for 5 minutes in SDS sample Buffer (Novex, CA, USA) plus 10% of β -mercaptoethanol (Sigma) and resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Immunoblot analysis was performed with specific antibodies and the Ag-Ab complexes were visualized by chemiluminescence (Immobilon Western, Merck Millipore, Billerica, MA, USA).

Subcellular fractionations

Cells were collected and lysed mechanically with a 27 1/2-gauge syringe (BD Biosciences) in lysis buffer H60 (20 mM Hepes (pH 7.9), 1.5 mM $MgCl_2$, 60 mM KCl, with protease inhibitors). Samples were centrifuged 5 minutes at 1000 g to remove nuclei and unbroken cells. Heavy membranes (HM) were obtained after a centrifugation at 10,000 g for 10 minutes and cytosolic fractions were collected after centrifugation at 25,000 g for 20 minutes.

Immunofluorescence

Cells were fixed in a solution of 4% paraformaldehyde for 10 minutes, and then permeabilized with 0,15% Triton X-100 in PBS for 15 minutes. Non specific sites were blocked by incubating cells in a solution of 2% BSA in PBS for one hour, then cells were incubated for one hour with the primary antibodies. Three washes for 5 minutes in PBS were performed followed by an incubation for one hour with the specific Alexa Fluor secondary antibodies (InvitroGen). Nuclei were stained with DAPI (InvitroGen) and cells were again washed three times with PBS. Images were acquired with a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a 63x oil immersion fluorescence objective.

Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Cells previously transfected with siRNA were stimulated overnight with TNF α at 1 ng.ml⁻¹, then the culture supernatants were collected and IL-8 production was assessed by ELISA assay following the manufacturer's protocol (Quantikine ELISA, human IL-8, R&D Systems).

Immunoprecipitation

Cells were lysed in lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 2 mM sodium pyrophosphate, 10% glycerol, 25 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate) supplemented with Complete protease inhibitor mixture (Roche

Molecular Biochemicals, Meylan, France) for 20 minutes at 4°C. After a centrifugation at 10,000 g for 10 minutes, the lysates were precleared with protein G-sepharose beads (Roche Molecular Biochemicals) for 30 minutes, and then incubated with antibody and fresh protein G-sepharose beads for 2 hours at 4°C. The beads were washed four times and immunocomplexes were denaturated and resolved by SDS-PAGE.

Subcellular fractionation for immunoblot analysis of the nuclear translocation of p65

5-10 x 10⁶ cells were washed with 1 x PBS and incubated for 5 min at 4°C in 200 µl 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 protease inhibitor cocktail). Plasma membranes were solubilized by incubation with 12.5 µl of 10% Igepal (Sigma) for 5 min at 4°C. Nuclei were collected by centrifugation at 600 g and washed twice with buffer A. Nuclear proteins were then extracted by incubation with 30 µl Buffer B (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 protease inhibitor cocktail), with shaking. Nuclear extracts were cleared by centrifugation at 13,000 g and analyzed by immunoblotting.

Antibodies

The primary antibodies used for immunoblotting were as follows: Mouse monoclonal anti-TRAF2 (Santa Cruz Biotechnology, clone F-2; 1:2000 dilution), mouse monoclonal anti-Tubulin (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA, clone 10D8; 1:5000), rabbit polyclonal anti-RNF121 (Sigma, HPA046041; 1:2000), mouse monoclonal anti-Myc (Cell Signaling Technology, clone 9B11; 1:2000 dilution), rabbit polyclonal anti-Calnexin (BD Biosciences; 1:5000), Rabbit polyclonal anti-GAPDH (Sigma; 1:20000), rabbit polyclonal anti-p65 (Santa

Cruz Biotechnology, C-20; 1:5000), Mouse monoclonal anti-p50 (Santa Cruz Biotechnology; 1:2000), mouse monoclonal anti-PARP (BD Biosciences, clone C2-10; 1:4000), rabbit polyclonal anti-ERK1/2 (Cell Signaling Technology, clone 9102; 1:5000), rabbit polyclonal anti-phosphorylated ERK1/2 (Cell Signaling Technology, clone E10; 1:5000), mouse monoclonal anti-phosphorylated-I κ B α (Cell Signaling Technology, clone 5A5; 1:2000), rabbit polyclonal anti-I κ B α (Cell Signaling Technology; 1:5000), mouse monoclonal anti-I κ B α (Santa Cruz Biotechnology, clone H4; 1:2000), rabbit polyclonal anti-phosphorylated IKK α / β (Cell Signaling Technology, clone 16A6; 1:1000), mouse monoclonal anti-RIP1 (BD Biosciences, clone 38/RIP; 1:4000), mouse monoclonal anti-TNFR1 (Santa Cruz Biotechnology, clone H-5; 1:2000) and rabbit polyclonal anti- β -TRCP/HOS (Santa Cruz Biotechnology, H-300; 1:1000). The primary antibodies used for immunofluorescence microscopy were: Mouse monoclonal anti-Myc (Cell Signaling Technology, clone 9B11; 1:400), mouse monoclonal anti-GM130 (BD Biosciences, 1:400), rabbit polyclonal anti-RNF121 (Sigma, HPA046041; 1:400), rabbit polyclonal anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology, C-20; 1:500), rabbit polyclonal anti- β -TRCP/HOS (Santa Cruz Biotechnology, H-300; 1:200) and mouse monoclonal anti-I κ B α (Cell Signaling Technology; clone L35A5; 1:200). The primary antibodies used for immunoprecipitation were a mouse monoclonal TNFR1 (Santa Cruz Biotechnology, clone H-5), and a rabbit polyclonal anti-RNF121 obtained after a rabbit immunization with the following peptide (CKEKVDLKRMFSPWERPHV) and followed by a purification (Biotem, France).

Statistical analysis

Two-way ANOVA tests with *post hoc* Tukey's analysis were used to assess the statistical significance of differences (Prism GraphPad Software), and *P* values are indicated in the figure legends. In some cases, as indicated, data were also compared in Student's *t*-tests.

Differences were considered to be significant if $P < 0.05$. **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $0.001 < P < 0.01$, * $0.01 < P < 0.05$. ns, not significant.

Additional Reference

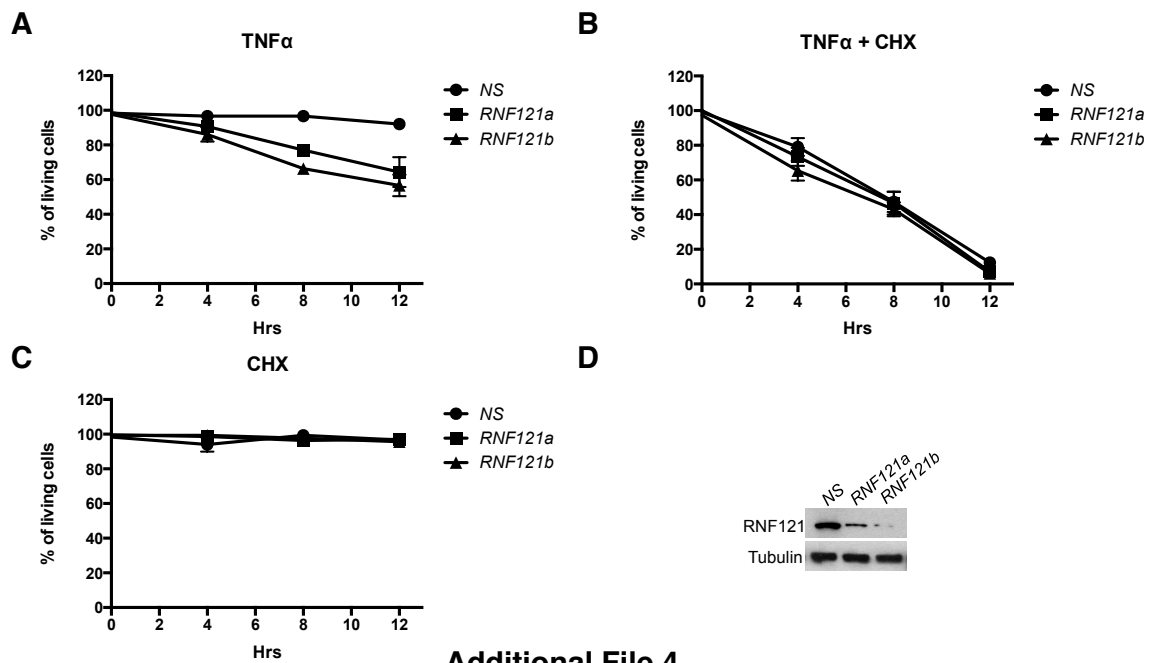
1. Li W, Bengtson MH, Ulbrich A, Matsuda A, Reddy VA, Orth A, Chanda SK, Batalov S, Joazeiro CA: **Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling.** *PLoS One* 2008, **3**:e1487.

Additional File 2: Design of the siRNA library

<u>Name</u>	<u>REF SEQ ID</u>	<u>siRNA ID</u>	<u>APPROX siRNA START</u>
AMFR	NM_001144	SASI_Hs01_00208564	634
	NM_001144	SASI_Hs01_00208565	978
BFAR	NM_016561	SASI_Hs01_00139892	1166
	NM_016561	SASI_Hs01_00139893	1013
BFP or RNF112	NM_007148	SASI_Hs01_00098198	2250
	NM_007148	SASI_Hs02_00343048	1618
MULAN or MUL1	NM_024544	SASI_Hs01_00083230	1477
	NM_024544	SASI_Hs01_00083231	1162
DCST1	NM_152494	SASI_Hs01_00238575	316
	NM_152494	SASI_Hs01_00238576	1025
IBRDC3 or RNF19B	NM_001127361	SASI_Hs02_00329214	1110
	NM_001127361	SASI_Hs02_00329215	1487
PTD016 or RNFT1	NM_016125	SASI_Hs02_00348904	1204
	NM_016125	SASI_Hs02_00348905	1194
GOLIATH or RNF130	NM_018434	SASI_Hs01_00042502	982
	NM_018434	SASI_Hs01_00042503	1373
RNF103	NM_005667	SASI_Hs01_00162766	1399
	NM_005667	SASI_Hs01_00162769	1979
RNF121	NM_018320	SASI_Hs01_00240270	1463
	NM_018320	SASI_Hs01_00240271	1458
RNF122	NM_024787	SASI_Hs01_00062299	944
	NM_024787	SASI_Hs01_00062301	831
RNF128	NM_024539	SASI_Hs01_00043490	1464
	NM_024539	SASI_Hs01_00043491	1109
RNF13	NM_007282	SASI_Hs01_00227561	1885
	NM_007282	SASI_Hs02_00343342	1239
RNF133	M_139175	SASI_Hs02_00364209	446
	M_139175	SASI_Hs01_00100521	340
RNF139	NM_007218	SASI_Hs01_00104303	1554
	NM_007218	SASI_Hs01_00104304	1673
RNF145	NM_144726	SASI_Hs01_00126544	1915
	NM_144726	SASI_Hs01_00126545	692
RNF148	NM_198085	SASI_Hs01_00063576	403
	NM_198085	SASI_Hs01_00063577	983
RNF149	NM_173647	SASI_Hs01_00028016	1037
	NM_173647	SASI_Hs01_00028017	557
RNF150	NM_020724	SASI_Hs01_00033289	1200
	NM_020724	SASI_Hs02_00353777	1875
RNF152	NM_173557	SASI_Hs01_00036186	1227
	NM_173557	SASI_Hs01_00036187	1077
RNF167	NM_015528	SASI_Hs01_00201491	784

	NM_015528	SASI_Hs01_00201492	1135
RNF170	NM_030954	SASI_Hs01_00158524	970
	NM_030954	SASI_Hs01_00158525	601
RNF175	NM_173662	SASI_Hs01_00059396	967
	NM_173662	SASI_Hs02_00368581	832
RNF180	NM_001113561	SASI_Hs02_00326081	236
	NM_001113561	SASI_Hs02_00326082	867
RNF182	NM_152737	SASI_Hs01_00091635	1249
	NM_152737	SASI_Hs01_00091636	477
RNF183	NM_145051	SASI_Hs01_00131347	208
	NM_145051	SASI_Hs01_00131348	392
RNF185	NM_152267	SASI_Hs01_00104432	323
	NM_152267	SASI_Hs01_00104433	591
RNF186	NM_019062	SASI_Hs02_00352648	255
	NM_019062	SASI_Hs01_00018154	699
RNF19 or RNF19A	NM_015435	SASI_Hs01_00195233	1455
	NM_015435	SASI_Hs01_00195235	2453
RNF26	NM_032015	SASI_Hs01_00160403	2028
	NM_032015	SASI_Hs01_00160405	2062
RNF5	NM_006913	SASI_Hs01_00132064	857
	NM_006913	SASI_Hs01_00132065	845
ZFPL1	NM_006782	SASI_Hs01_00160504	217
	NM_006782	SASI_Hs01_00160505	752
LL441061/MARCH11	NM_001102562	SASI_Hs02_00323233	1092
	NM_001102562	SASI_Hs02_00323234	1119
ZNRF4	NM_181710	SASI_Hs01_00158764	859
	NM_181710	SASI_Hs02_00370315	207
TRIM59	NM_173084	SASI_Hs01_00166264	1316
	NM_173084	SASI_Hs01_00166265	421
SYVN1	NM_032431	SASI_Hs01_00064900	763
	NM_032431	SASI_Hs01_00064901	774
MIRMyip	NM_013262	SASI_Hs01_00172371	1411
	NM_013262	SASI_Hs01_00172372	478
MARCH1	NM_017923	SASI_Hs01_00052298	818
	NM_017923	SASI_Hs02_00350920	755
MARCH2	NM_001005415	SASI_Hs01_00163385	1054
	NM_001005415	SASI_Hs01_00163387	585
MARCH3	NM_178450	SASI_Hs01_00241751	344
	NM_178450	SASI_Hs01_00241752	922
MARCH4	NM_020814	SASI_Hs02_00354009	2445
	NM_020814	SASI_Hs01_00235206	2880
MARCH5	NM_017824	SASI_Hs01_00042052	1187
	NM_017824	SASI_Hs01_00042054	823
MARCH6	NM_005885	SASI_Hs01_00105237	2225
	NM_005885	SASI_Hs01_00105238	2708

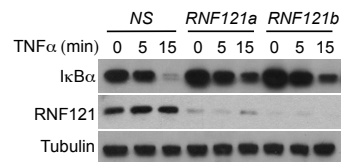
MARCH8	NM_001002265	SASI_Hs01_00064950	1705
	NM_001002265	SASI_Hs01_00064951	1710
MARCH9	NM_138396	SASI_Hs01_00208183	1187
	NM_138396	SASI_Hs01_00208184	1855
RFP2 or TRIM13	NM_001007278	SASI_Hs01_00206004	947
	NM_001007278	SASI_Hs02_00305300	1335



Additional File 4

Additional file 4. RNF121 silencing sensitizes cells to TNF α -mediated apoptosis.

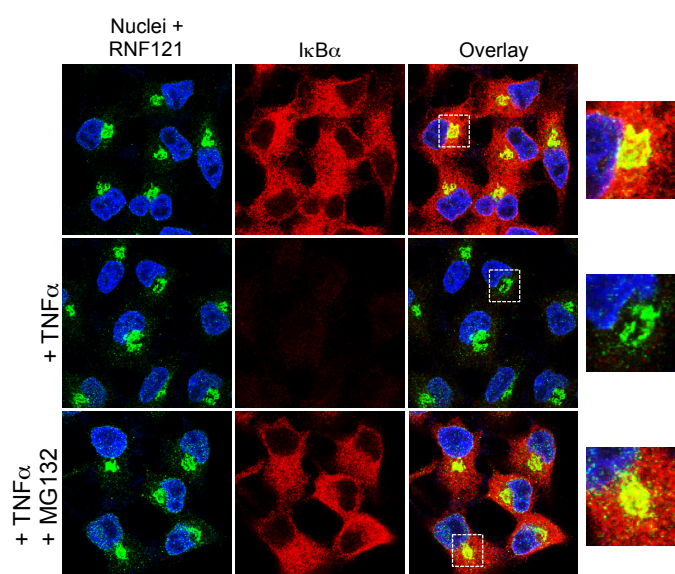
HeLa cells were transfected with a control non-specific (NS) siRNA or with siRNAs against RNF121 (*RNF121a* or *b*). 72 hrs later, cells were exposed to either TNF α (25 ng/ml) in the absence (**A**) or the presence of CHX (10 μ g/ml) (**B**), or CHX alone (**C**) for the indicated periods of time. The percentage of living cells was measured by trypan blue exclusion. The data shown are the means $\pm$ SD from three independent experiments, with 300 cells per condition. The knock down of RNF121 is shown in (**D**).



Additional File 5

Additional file 5. RNF121 silencing delays I κ B α degradation.

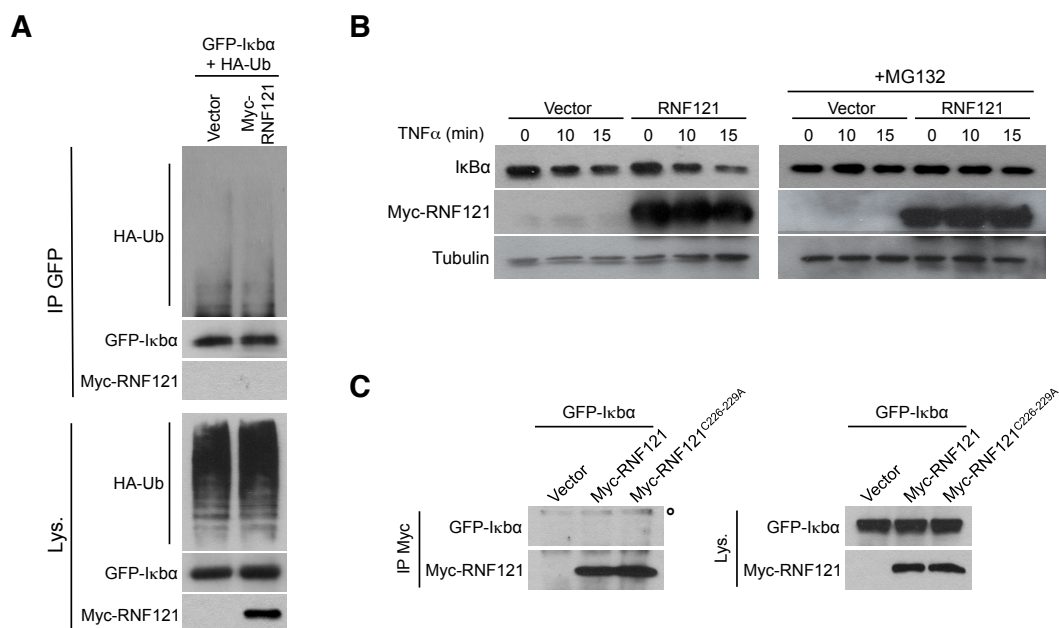
HeLa cells transfected with a *NS* siRNA or *RNF121*-specific siRNAs were stimulated 72 hrs later with TNF α (10 ng/ml) for the indicated times. Cell extracts were then analyzed by Western blotting with antibodies specific for the indicated proteins.



Additional File 6

Additional file 6. A pool of IκBα co-localizes with RNF121

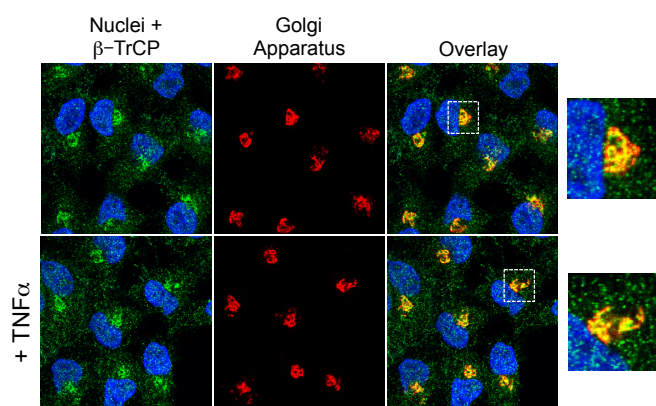
(A) HeLa cells were treated or not with TNFα (10 ng/ml) for 15 min in the absence or the presence of the proteasome inhibitor MG132 (10 μM), then the localization of RNF121 and IκBα were investigated by immuno-fluorescence. Nuclei were stained with DAPI. Representative images are shown, with the boxed areas enlarged on the right.



Additional File 7

Additional file 7. RNF121 does not directly ubiquitinate IκBα.

(A) HEK293 cells were transfected with a plasmid encoding myc-tagged RNF121 or with an empty vector as a control and with plasmids encoding GFP-tagged IκBα and HA-tagged ubiquitin (Ub). Twenty-four hours after transfection, IκBα was immunoprecipitated with an anti-GFP and its ubiquitination was assessed with an anti-HA (upper panel). Expression of the proteins was examined by immunoblotting with the indicated antibodies in the lysate (Lys.) (lower panel). (B) HEK293 cells were transfected with a plasmid encoding myc-tagged RNF121 or with an empty vector as a control. 24 hrs later, cells were stimulated with TNFα (10 ng/ml) for the indicated times in the presence or the absence of the proteasome inhibitor MG132 (10 μM) and cell extracts were analyzed by immunoblotting as indicated. (C) HEK293 cells were transfected with a plasmid encoding myc-tagged RNF121 or with an empty vector as a control and with a plasmid encoding GFP-tagged IκBα. Twenty-four hours after transfection, myc-RNF121 was immunoprecipitated with an anti-myc antibody. Samples were then analyzed by immunoblotting. ° indicates a non specific band.



Additional File 8

Additional file 8. Intracellular localization of β -TrCP.

HeLa cells were treated or not with $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml) for 15 min, then β -TrCP localization was investigated by immuno-fluorescence. GM130 was used as a marker for the Golgi Apparatus. Nuclei were stained with DAPI. Representative images are shown, with the boxed areas enlarged on the right.

Article II

MITOCHONDRIAL HYPERFUSION PROMOTES NF- κ B ACTIVATION VIA THE MITOCHONDRIAL E3 LIGASE MULAN

Naima Zemirli*, Marie Pourcelot*, Gorbachev Ambroise, Emeline Hatchi, Aime Vazquez and Damien Arnoult (*These authors contributed equally to this work)

Le réseau mitochondrial est dynamique et sa structure est déterminée par la balance entre deux forces antagonistes de fusion et de fission. Ces processus hautement régulés, sont coordonnés avec la physiologie cellulaire afin de répondre aux besoins en constante évolution de la cellule et toute perturbation de ces processus peut avoir des conséquences graves sur l'organisme. Ainsi, l'inhibition de la composante fusion provoque la fragmentation des mitochondries qui prennent une structure punctiforme isolée. À l'inverse, lorsque la fission est inhibée, le réseau mitochondrial apparaît excessivement filamenteux et interconnecté, ce phénomène est appelé « hyperfusion ». Si la fission est généralement associée au processus apoptotique, la fusion est nécessaire pour le maintien de l'ADN mitochondrial. Il a également été rapporté que dans certaines conditions de stress modérés (Ex : Inhibition de la synthèse protéique), la mitochondrie adopte un profil hyperfusé. Ce processus appelé SIMH (Stress-Induced Mitochondrial Hyperfusion) est considéré comme une réponse au stress.

Nous avons remarqué, de manière intéressante, que l'hyperfusion des mitochondries survenus suite à l'expression de dominants négatifs des protéines de fission (Drp1 et MARCH5) était accompagnée par l'activation du facteur de transcription NF- κ B. L'indispensabilité de toutes les unités du complexe kinasique IKK indique que NF- κ B est activé via la voie canonique. Comme l'ubiquitination constitue un processus clé lors de la transduction de la signalisation NF- κ B, nous avons donc supposé qu'au moins une des quatre E3 ligases mitochondriales était impliquée dans cette activation. Nos résultats ont confirmé cette hypothèse, en effet, l'extinction de MULAN par ARN interférence a inhibé l'activation de NF- κ B, faisant de cette E3 ligase mitochondriale un élément clé lors de la transduction du signal NF- κ B. Nos résultats suggèrent également que MULAN catalyse l'ubiquitination de TRAF2, ce qui fait de ce dernier le TUCAN (Transmetteur Ubiquitinylé Conduisant à l'Activation de NF- κ B) dans cette voie d'activation. La réalisation de ces mêmes expériences dans des conditions plus physiologiques, avec l'induction du SIMH par l'arrêt de la synthèse protéique (à l'aide de cycloheximide, actinomycine D ou rayonnements UV) a abouti aux mêmes conclusions.

Dans l'ensemble, ces résultats mettent en évidence la capacité de la mitochondrie à transformer un signal de stress en un signal de survie via l'activation de NF- κ B.

Mitochondrial hyperfusion promotes NF- κ B activation via the mitochondrial E3 ligase MULAN

Naima Zemirli^{1,2,3,*}, Marie Pourcelot^{1,2,3,*}, Gorbachev Ambroise^{1,2,3}, Emeline Hatchi^{1,2,3}, Aimé Vazquez^{1,2,3} and Damien Arnoult^{1,2,3}

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

² Université Paris-Sud P11, Orsay, France

³ Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Villejuif, France

Keywords

mitochondrial dynamics; MULAN; NF- κ B; SIMH; TRAF2

Correspondence

D. Arnoult, INSERM, UMR_S 1014, Hôpital Paul Brousse, Villejuif 94800, France
Fax: + 33 (0)1 45 59 53 43
Tel: + 33 (0)1 45 59 60 38
E-mail: damien.arnoult@inserm.fr

*These authors contributed equally to this work

(Received 28 March 2014, revised 25 April 2014, accepted 13 May 2014)

doi:10.1111/febs.12846

Mitochondria are dynamic organelles with a morphology resulting from the balance between two opposing processes: fusion and fission. Little is known about the function of mitochondrial fusion, beside its role in the maintenance of mitochondrial DNA. We report here that enforced mitochondrial hyperfusion, due to the expression of a dominant-negative mutant of Drp1 or of MARCH5, promotes NF- κ B activation in a TAK1- and IKK-dependent manner, through the mitochondrial E3 ubiquitin ligase MULAN. The capability of MULAN to activate NF- κ B depends on its RING domain and on the E3 ubiquitin ligase TRAF2. Under physiological conditions, stress-induced mitochondrial hyperfusion (SIMH) is also accompanied by NF- κ B activation, and the prevention of SIMH or the knockdown of MULAN impairs NF- κ B activation. During SIMH, MULAN forms a complex with TRAF2 and modulates its ubiquitylation, signifying that TRAF2 may serve as an ubiquitylated transmitter of NF- κ B signaling in this pathway. Our results suggest that mitochondria, through their dynamics, convert stress signals into a cell response leading to NF- κ B activation.

Structured digital abstract

- [TRAF2](#) physically interacts with [MULAN](#) by [anti bait coip](#) ([View interaction](#))

Introduction

Mitochondria are dynamic organelles that continually move, fuse and divide [1]. Mammalian cells maintain the shape of their mitochondria through a balance between the opposing processes of mitochondrial fusion and fission. This dynamic behavior is essential for normal mitochondrial function and contributes to fundamental processes, such as development, cell death and aging [2]. The protein machinery regulating mitochondrial fission and fusion is now well characterized [1]. In mammalian cells, dynamin-related protein 1

(Drp1), hFis, mitochondrial fission factor, MiD49 and MiD51 are required for mitochondrial fission [3–6]. Mitofusin 1 (MFN1), mitofusin 2 (MFN2) and optic atrophy 1 (OPA1) are essential for the fusion of mitochondria [7,8]. Drp1, MFN1, MFN2 and OPA1 are dynamin-related GTPases [1].

Mitochondrial fission and fusion seem to be essential for mouse development and for neuronal survival and function in mice and humans, but little is known about the physiological role of mitochondrial

Abbreviations

ActD, actinomycin D; CHX, cycloheximide; Drp1, dynamin-related protein 1; IFN, interferon; IKK, inhibitor of NF- κ B kinase; I κ B, inhibitor of NF- κ B; MEF, mouse embryonic fibroblast; MFN1, mitofusin 1; MFN2, mitofusin 2; mtDNA, mitochondrial DNA; OPA1, optic atrophy 1; SIMH, stress-induced mitochondrial hyperfusion; siRNA, short interfering RNA; TNF, tumor necrosis factor.

dynamics in cell function and survival [1,2]. Mitochondrial fission is required for the selective elimination of depolarized mitochondria [9] and it occurs during apoptosis [10]. Fission of the mitochondrial network due to impaired mitochondrial fusion is often associated with bioenergetic defects due to a loss of mitochondrial DNA (mtDNA) [2]. Mitochondrial fusion is therefore required for mtDNA maintenance, probably because it allows mtDNA exchange between mitochondria. It has also been reported that mitochondria hyperfuse in cells exposed to stresses inhibiting protein synthesis, and this stress-induced mitochondrial hyperfusion (SIMH) has been proposed to constitute an adaptive response to stress [11].

The transcription factor NF- κ B is activated by many inducers, including moderate stresses [12,13]. Each inducer is recognized by a receptor at the cell surface or within the cell, and its binding triggers a specific signaling pathway leading to NF- κ B activation. Each pathway involves the organization of signaling protein complexes, the formation of polyubiquitin chains acting as binding agents on specific transmitters and the action of kinases [12–14]. Nevertheless, all these complexes have a point in common: they recruit and activate, through specific ubiquitylated transmitters, 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, promoting their Lys48 (K48)-linked ubiquitylation and proteasomal degradation [12–14]. NF- κ B dimers subsequently enter the nucleus, where they initiate the transcription of their target genes, including genes encoding antiapoptotic proteins or proinflammatory cytokines.

Here, we report that hyperfusion of the mitochondrial network (e.g. due to the expression of a dominant-negative form of Drp1 or of MARCH5, or stresses inhibiting protein synthesis) promotes NF- κ B activation through the mitochondrial E3 ubiquitin ligase MULAN. Thus, mitochondrial dynamics convert stress signals into a prosurvival response via NF- κ B activation.

Results

Enforced mitochondrial hyperfusion promotes NF- κ B activation

We searched for new signals emanating from the mitochondrion and leading to NF- κ B activation. We unexpectedly found that the expression of a dominant-negative form of Drp1 (Drp1^{K38A}), a mediator of

mitochondrial fission [2], not only promoted a highly interconnected mitochondrial network (referred to here as mitochondrial hyperfusion), as reported in previous studies [15,16], but also triggered NF- κ B activation, as shown by assessing NF- κ B-driven luciferase reporter activity (Fig. 1A). By contrast, Drp1 expression had no effect on mitochondrial morphology or NF- κ B. For confirmation that mitochondrial hyperfusion did indeed lead to NF- κ B activation, we also expressed a mutant form of the mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 (MARCH5^{H43W}), which has also been reported to promote mitochondrial hyperfusion by altering the subcellular trafficking of Drp1 [17]. MARCH5 overexpression had no effect on the overall organization of the mitochondrial network, but the cells expressing MARCH5^{H43W} had a highly interconnected mitochondrial network and displayed NF- κ B activation (Fig. 1A). Mitochondrial hyperfusion seems to promote NF- κ B activation selectively, because the expression of Drp1^{K38A} or MARCH5^{H43W} did not stimulate the expression of interferon (IFN) β -, interferon-stimulated response element-, NFAT-, API- or p53-dependent reporter genes (Fig. 1A and data not shown). As a control, expression of the mitochondrial adaptor MAVS, which is involved in antiviral innate immunity [18], promoted both NF- κ B activation and IFN β promoter activity (Fig. 1A) although it triggered aggregation of the mitochondrial network (data not shown) [19]. Finally, confirming the activation of NF- κ B in response to mitochondrial hyperfusion, nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit was observed in cells with a highly interconnected mitochondrial network after their transfection with constructs encoding Drp1^{K38A} or MARCH5^{H43W} (Fig. 1B).

We then explored the signaling pathway involved in NF- κ B activation in response to mitochondrial hyperfusion, by knocking down the expression of several key proteins of the NF- κ B pathway with specific short interfering RNAs (siRNAs) (Fig. 2). Knocking down the expression of different members of the IKK complex (the catalytic kinases IKK α and IKK β and the regulatory subunit NEMO [20]) inhibited mitochondrial hyperfusion-induced NF- κ B activation (Fig. 1C). The IKK complex is activated by phosphorylation of the IKK β subunit by the kinase TAK1 [14]. Thus, in the absence of TAK1, but not of RIP1, NIK, IKK ϵ or TBK1, other kinases reportedly involved in some NF- κ B signaling pathways [13], NF- κ B activation was hampered following transfection with constructs encoding mutant forms of Drp1 and MARCH5 (Fig. 1D).

NF- κ B activation requires the nondegradative K63-linked polyubiquitylation of key transmitters. These

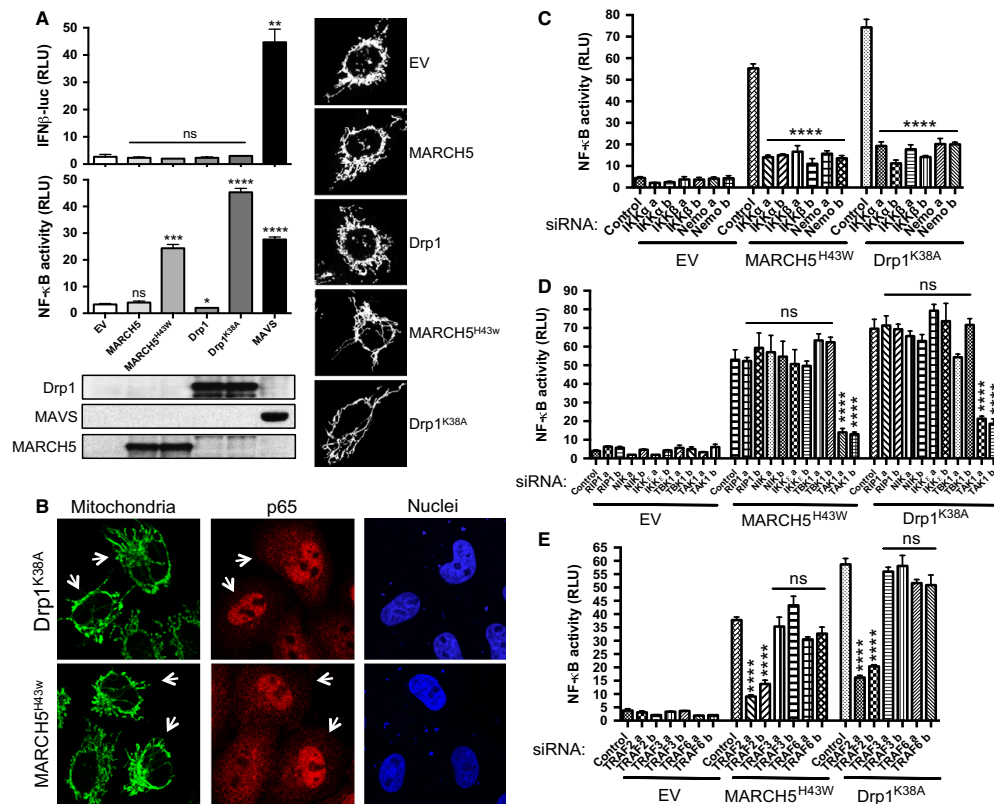


Fig. 1. NF- κ B activation triggered by mitochondrial hyperfusion. (A) HEK 293T cells were transfected with either an IFN β promoter reporter or with an NF- κ B reporter, together with the *Renilla* luciferase gene as an internal control. The cells were also transfected with an empty vector (EV) or with a plasmid encoding MARCH5, MARCH5^{H43W}, Drp1, Drp1^{K38A} or MAVS. Luciferase assays were performed 24 h after transfection and the results were normalized against *Renilla* luciferase activity. The data shown are means $\pm$ SD from three independent experiments (analysis of variance by Student's *t*-tests). ns, not significant; RLU, relative luminescence units. Mitochondrial morphology is shown, together with the levels of the protein encoded by the genes used for transfection. (B) HeLa cells were transfected with a plasmid encoding Drp1^{K38A} or MARCH5^{H43W}. Mitochondrial morphology and the nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit were assessed by immunofluorescence methods, 16 h later. Arrows indicate the transfected cells. (C–E) HEK 293T cells transfected with a control nonspecific siRNA or with the indicated siRNAs, were also transfected 48 h later with an NF- κ B reporter and with an empty vector (EV) or with a plasmid encoding MARCH5^{H43W} or Drp1^{K38A}, to promote mitochondrial hyperfusion. Luciferase assays were performed 24 h after the second transfection and the results were normalized against *Renilla* luciferase activity. The data shown are the means $\pm$ SD from three independent experiments. *****P* < 0.0001 with respect to cells transfected with the control siRNA (ANOVA). ns: not significant.

stimulus-specific ubiquitylated transmitters of NF- κ B signaling serve as a platform for the recruitment and activation of the IKK complex [13,14]. Several E3 ubiquitin ligases are involved in their ubiquitylation. In several pathways leading to NF- κ B activation, TRAF2, TRAF3 or TRAF6 is responsible for catalyzing the polyubiquitylation of the transmitters of NF- κ B signaling [13,14]. In our model, we found that

TRAF2 was mainly required for a proper mitochondrial hyperfusion-induced NF- κ B activation (Fig. 1E).

We recently reported that a relay through metadherin, an endoplasmic reticulum-anchored protein, was required for an optimal NF- κ B activation during innate and adaptive immunity [21]. Interestingly, this endoplasmic reticulum relay also seems to be involved in mitochondrial hyperfusion-induced NF- κ B activation,

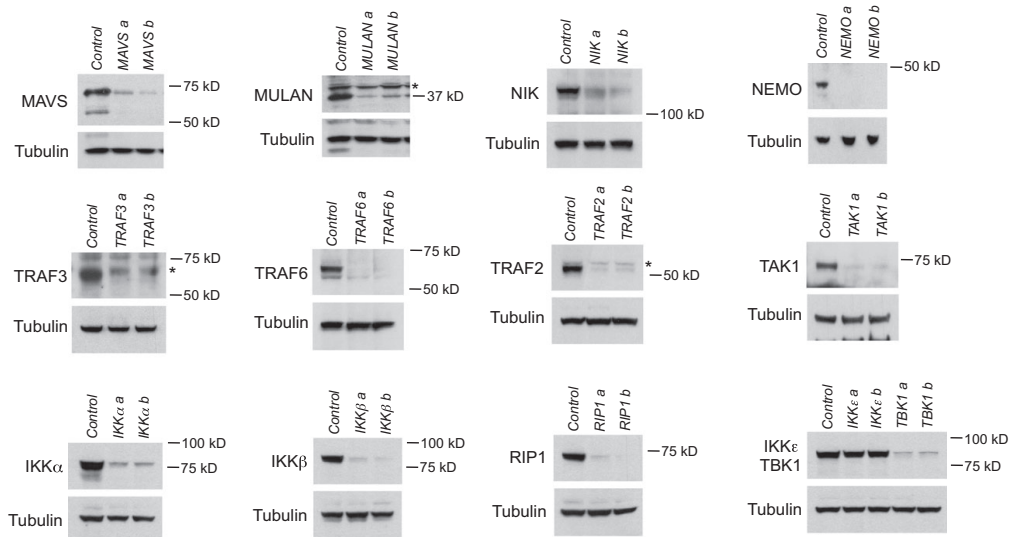


Fig. 2. Efficiency of the used siRNAs. HEK 293T cells were transfected with a control nonspecific siRNA or with the indicated siRNAs. Knockdown of the targeted protein was assessed 72 h later, by immunoblotting cell extracts. Tubulin was used as a loading control.

because metadherin knockdown hampered NF- κ B activation after the transfection of cells with constructs encoding the mutant forms of Drp1 and MARCH5 (data not shown).

Mitochondrial hyperfusion-induced NF- κ B activation is dependent on MULAN

As mentioned above, some E3 ubiquitin ligases are involved in the polyubiquitylation of the transmitters of NF- κ B signaling, transducing the information leading to NF- κ B activation. We therefore hypothesized that mitochondrial dynamics might be linked to NF- κ B via the involvement of a mitochondrial E3 ubiquitin ligase in this process. There are 46 genes encoding for E3 ubiquitin ligases with at least one transmembrane domain in the human genome [22], but only four of these enzymes are localized at the mitochondria in normal conditions: MARCH5, TRIM59, MULAN and RNF144b [23]. We assessed whether knocking down the expression of any of these E3 ligases inhibited NF- κ B activation after the induction of mitochondrial hyperfusion. Only the absence of MULAN decreased NF- κ B activation in response to the expression of Drp1^{K38A} or MARCH5^{H43W} (Fig. 3A and data not shown), suggesting that this E3 ubiquitin ligase is involved in

mitochondrial hyperfusion-induced NF- κ B activation. Interestingly, MULAN (mitochondrial ubiquitin ligase activating NF- κ B, also called MAPL [24]) has been reported to promote NF- κ B activation after transfection [22,25]. MULAN consists of two predicted transmembrane domains and a C-terminal RING finger domain exposed to the cytosol, which is critical for ubiquitin transfer activity [22]. It has been suggested that MULAN regulates mitochondrial dynamics [22], but, in our hands, the loss of MULAN resulted in no obvious changes to the morphology of the mitochondrial network (Fig. 4). The RING domain of MULAN resembles those of c-IAPs [26], and c-IAPs are known to participate in the polyubiquitylation of the transmitter RIP1, to propagate NF- κ B activation following TNFR1 stimulation [27,28]. As previously reported [22,25], MULAN specifically triggered NF- κ B activation (Fig. 3B) and the ability of MULAN to activate this transcription factor was dependent on the catalytic activity of its RING domain, because the MULAN^{C339A} mutant gave significantly lower levels of NF- κ B activation (Fig. 3B). Indeed, based on the available RING finger protein structure [29,30], replacement of the Cys339 residue with an alanine was predicted to prevent Zn²⁺ coordination, thereby impeding the overall function of the RING domain.

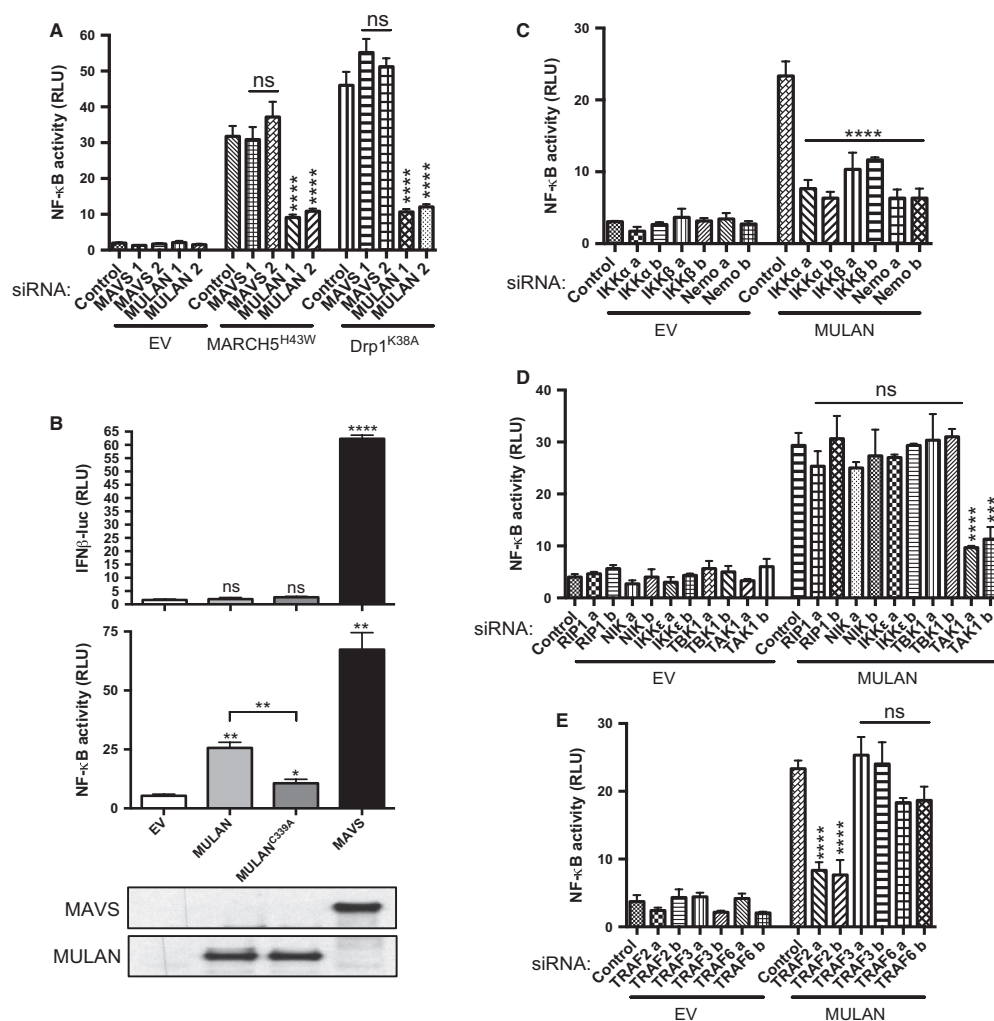


Fig. 3. Involvement of MULAN in mitochondrial hyperfusion-induced NF- κ B activation. (A) HEK 293T cells were transfected with a control nonspecific siRNA or with siRNAs against MAVS or MULAN. The cells were then transfected, 48 h later, with a NF- κ B reporter and with the *Renilla* luciferase gene as an internal control, and with either an empty vector (EV) or with a plasmid encoding MARCH5^{H43W} or Drp1^{K38A} to promote mitochondrial hyperfusion. Luciferase assays were performed 24 h after transfection and the results were normalized against *Renilla* luciferase activity. The data shown are means $\pm$ SD from three independent experiments. RLU, relative luminescence units. **** P < 0.0001 versus cells transfected with the control siRNA (ANOVA). ns, not significant. (B) HEK 293T cells were transfected with either an IFN β promoter reporter or with an NF- κ B reporter, together with the *Renilla* luciferase gene as an internal control. The cells were also transfected with either an empty vector (EV) or with a plasmid encoding MULAN or MULAN^{C39A}. Luciferase assays were performed 24 h after transfection and the results were normalized against *Renilla* luciferase activity. The data shown are means $\pm$ SD from three independent experiments (Student's *t*-test). (C–E) HEK 293T cells transfected with a control nonspecific siRNA or with the indicated siRNAs were also transfected 48 h later with an NF- κ B reporter and with an empty vector (EV) or with a plasmid encoding MULAN. Luciferase assays were performed 24 h after the second transfection and the results were normalized against *Renilla* luciferase activity. The data shown are means $\pm$ SD from three independent experiments. **** P < 0.0001, *** P < 0.001 versus cells transfected with the control siRNA (ANOVA). ns, not significant.

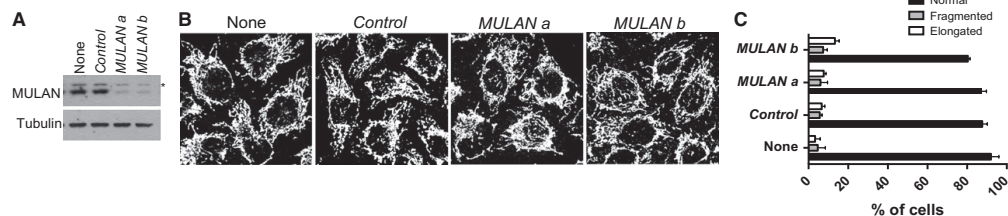


Fig. 4. The knockdown of MULAN does not affect mitochondrial morphology. (A) HeLa cells were transfected with a control nonspecific siRNA or with siRNAs raised against MULAN. MULAN knockdown was assessed 72 h later, by immunoblotting cell extracts. (B, C) mitochondrial morphology was then evaluated on the basis of immunofluorescence.

We explored the signaling involved in the NF- κ B activation triggered by MULAN, by knocking down the expression of genes encoding several proteins of the NF- κ B pathway with specific siRNAs. MULAN appeared to require the E3 ubiquitin ligase TRAF2, TAK1 and IKK to induce NF- κ B activation (Fig. 3C–E), as observed after expression of the Drp1^{K38A} or MARCH5^{H43W} mutant to promote mitochondrial hyperfusion (Fig. 1C–E). Together, our results suggest that enforced mitochondrial hyperfusion triggers NF- κ B activation through the E3 ubiquitin ligases MULAN and TRAF2, and through the canonical pathway involving the TAK1–IKK axis [13].

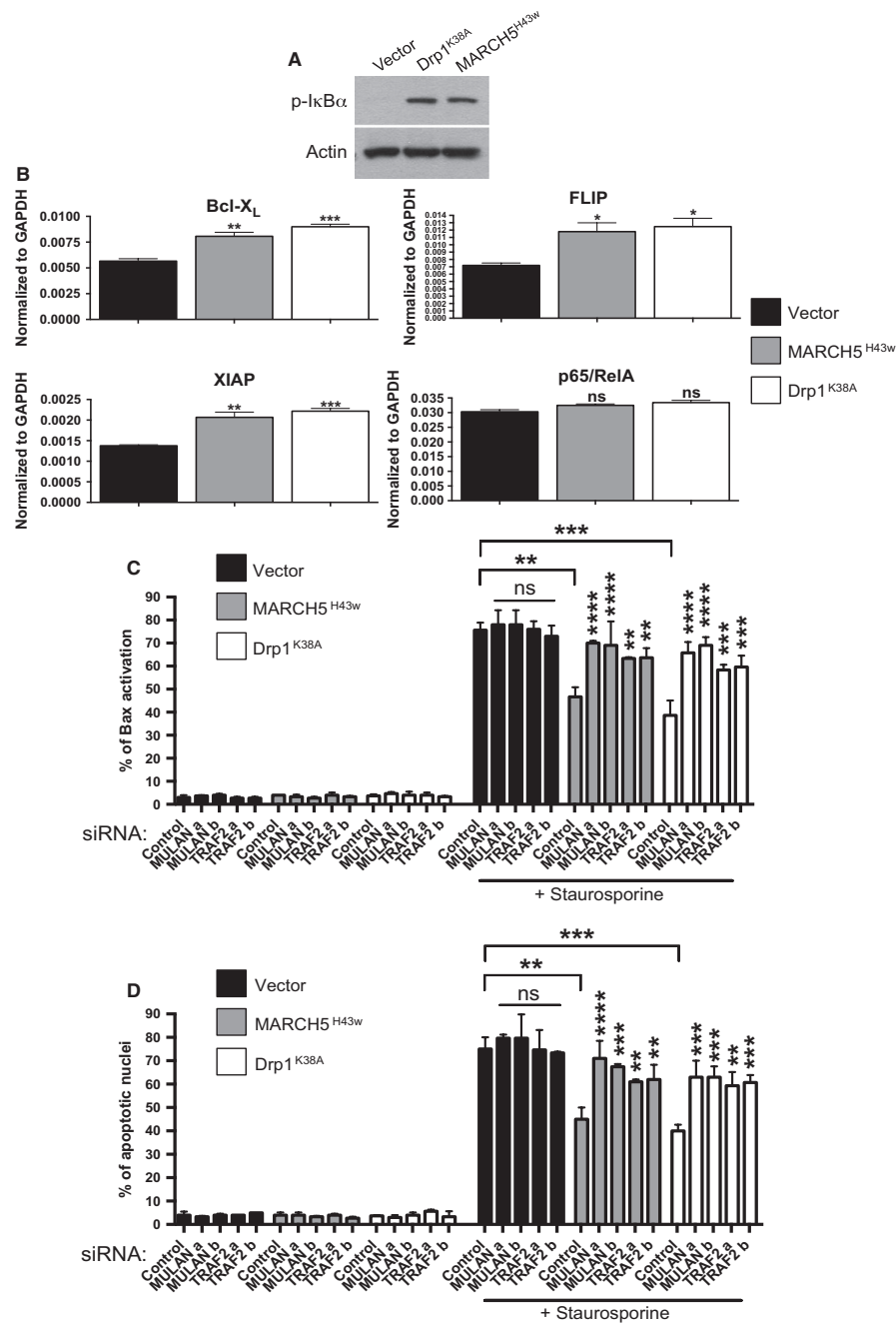
MULAN and TRAF2 are required for the antiapoptotic function of Drp1^{K38A} and MARCH5^{H43W}

The expression of Drp1^{K38A} or MARCH5^{H43W} prevents mitochondrial fission after an apoptotic signal, but it also inhibits cytochrome *c* release and cell death [15,31]. Although it is hotly debated [32], it has been proposed that mitochondrial fission is essential for mitochondrial outer membrane permeabilization and downstream cytochrome *c* release [10,15]. Moreover,

expression of the dominant-negative form of Drp1 has been reported to prevent Bax activation in response to nitric oxide in neurons [33]. Importantly, the expression of Drp1^{K38A} or MARCH5^{H43W} promoted NF- κ B activation (Figs 1 and 5A), and this transcription factor induces the expression of antiapoptotic genes such as those encoding Bcl-X_L, XIAP or FLIP (Fig. 5B) [34]. This suggests that Drp1^{K38A} and MARCH5^{H43W} may prevent apoptosis through NF- κ B activation and the downstream expression of antiapoptotic genes.

We then assessed the antiapoptotic activity of Drp1^{K38A} or MARCH5^{H43W} in control nonspecific, MULAN- or TRAF2-specific siRNA-transfected cells, because the knockdown of MULAN or TRAF2 expression prevents NF- κ B activation after transfection with the mutant constructs (Figs 1E and 3A). In Drp1^{K38A}- or MARCH5^{H43W}-transfected cells, the inhibition of Bax activation and the apoptosis following treatment with staurosporine were significantly impaired when the expression of MULAN or TRAF2 was knocked down (Fig. 5C,D). These observations suggest that the capability of Drp1^{K38A} and MARCH5^{H43W} to prevent apoptosis is linked at least partly to their roles in activating NF- κ B due to the mitochondrial hyperfusion that they induce.

Fig. 5. The knockdown of MULAN or TRAF2 expression prevents the anti-apoptotic effects of Drp1^{K38A} and MARCH5^{H43W}. (A) HeLa cells were transfected with vector encoding YFP or with a plasmid encoding YFP-tagged MARCH5^{H43W} or YFP-tagged Drp1^{K38A} to promote mitochondrial hyperfusion. Twenty-four hours later, NF- κ B activation was assessed with the detection of p-I κ B α by immunoblotting cell extracts. Actin was used as a loading control. (B) HeLa were transfected as in (A). Twenty-four hours later, the expressions of Bcl-X_L, FLIP, XIAP and p65/RelA were assessed by RT-qPCR and normalized to GAPDH. The data shown are means $\pm$ SD from three independent experiments. *** P < 0.001, **0.001 < P < 0.01, *0.01 < P < 0.05 versus cells transfected with the empty vector (Student's *t*-test). ns, not significant. (C) HeLa cells were transfected with a control nonspecific siRNA or with siRNAs against MULAN or TRAF2. The cells were transfected 48 h later, with a vector encoding YFP or with a plasmid encoding YFP-tagged MARCH5^{H43W} or YFP-tagged Drp1^{K38A}. Then, 24 h later, cells were left untreated or were treated with staurosporine (2 μ M) for 8 h in the presence of zVAD-fmk to prevent apoptosis. The percentage of the YFP-positive cells displaying Bax activation was then assessed on the basis of immunofluorescence using a Bax antibody (clone 6A7) that only recognizes the active form of Bax [42]. The data shown are the means $\pm$ SD from three independent experiments, with 300 cells per condition. **** P < 0.0001, *** P < 0.001, **0.001 < P < 0.01 versus cells transfected with the control siRNA (ANOVA). ns, not significant. (D) As in (C) but with the percentage of apoptotic nuclei in the YFP-positive cells determined by Hoechst staining.



NF- κ B activation is associated with stress-induced mitochondrial hyperfusion

It has been reported that mitochondria hyperfuse and form a highly interconnected network in cells exposed to a number of stress stimuli preventing protein synthesis, such as cycloheximide (CHX), actinomycin D (ActD) and UV irradiation (UV-C); this process was named 'stress-induced mitochondrial hyperfusion' (SIMH) [11]. We investigated whether this SIMH was accompanied by NF- κ B activation. UV-C is known to promote NF- κ B activation [35]. We investigated whether treatment with ActD or CHX could promote both SIMH and NF- κ B activation. As initially reported [11], treatment with ActD or CHX induced SIMH, and this mitochondrial hyperfusion was also associated with NF- κ B activation, as indicated by the nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit (Fig. 6A). As previously described [11], morphological changes in the mitochondria were first detected 2–3 h after the induction of stress, and this process became stronger with time, peaking at 6–9 h with the formation of highly interconnected mitochondria (Fig. 6B). The nuclear translocation of p65 occurred concomitantly with mitochondrial hyperfusion (Fig. 6B). Similar results were obtained for cells treated with ActD (data not shown). The occurrence of mitochondrial hyperfusion in the absence of protein synthesis (CHX is a reversible inhibitor of translation, whereas ActD prevents transcription) ruled out the possibility of the highly interconnected mitochondrial network being formed as a consequence of the transcriptional activity of NF- κ B. Finally, the slow degradation of the NF- κ B inhibitor I κ B α after treatment with CHX confirmed that mitochondrial hyperfusion was associated with NF- κ B activation (Fig. 6C).

We then investigated the possible role of SIMH in the observed activation of NF- κ B. For this purpose, we investigated NF- κ B activation in OPA1-deficient cells, comparing the results obtained with those for wild-type cells, because OPA1 has been shown to be required for SIMH [11]. As previously described [11], SIMH did not occur in OPA1 $^{-/-}$ mouse embryonic fibroblasts (MEFs) after treatment with CHX for few hours (Fig. 7A), but nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit was also found to be partially inhibited, as demonstrated by comparison with wild-type MEFs (Fig. 7A,B). Moreover, the slower degradation of I κ B α in OPA1 $^{-/-}$ than in wild-type MEFs confirmed the requirement of SIMH for an optimal NF- κ B activation (Fig. 7C). The lack of OPA1 had no effect on the rapid activation of NF- κ B after tumor necrosis factor (TNF) α treatment (Fig. 8), suggesting

that the molecular machinery responsible for NF- κ B activation was not affected in these cells. Finally, confirming that NF- κ B activation was decreased in SIMH incompetent cells after CHX treatment, the expression of Bcl-X_L, the resistance to staurosporine-induced apoptosis (after a period of recovery to get rid of the inhibitory effect of CHX on the protein synthesis) and the secretion of the NF- κ B target gene TNF α were reduced in the OPA1 $^{-/-}$ MEFs in comparison with wild-type MEFs (Fig. 7D–F).

MULAN is involved in NF- κ B activation during SIMH

Because mitochondrial hyperfusion-induced NF- κ B activation is dependent on MULAN (Fig. 3), we hypothesized that this E3 ubiquitin ligase might be required for the NF- κ B activation detected during SIMH (Fig. 6). The antibody directed against MULAN that we obtained did not cross-react with murine MULAN. We therefore knocked down MULAN levels by transfecting HEK 293T cells with specific siRNAs. We then assessed the impact of MULAN loss on NF- κ B activation following CHX treatment. As in MEFs, CHX treatment in HEK 293T cells promoted a slow activation of NF- κ B, as demonstrated by monitoring the degradation of I κ B α (Fig. 9A). This degradation was delayed in MULAN siRNA-transfected cells (Fig. 9B). The impact of MULAN silencing on NF- κ B activation was also assessed by investigating the nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit. MULAN siRNA-transfected cells displayed lower levels of nuclear translocation for p65 than control cells (Fig. 9C–E). SIMH took place after CHX treatment in cells displaying MULAN knockdown, whereas NF- κ B activation was impaired (Fig. 9C,D), suggesting that MULAN plays a role downstream from SIMH in NF- κ B activation. Finally, to confirm a role of MULAN in NF- κ B activation during SIMH, we observed that the expression of Bcl-X_L, the resistance to staurosporine-induced apoptosis and the secretion of TNF α were diminished in MULAN siRNA-transfected cells after CHX treatment (Fig. 9F–H).

Because TRAF2 was found to be required for the activation of NF- κ B by MULAN (Fig. 3E), we hypothesized that these two E3 ubiquitin ligases are part of the same complex, promoting NF- κ B activation, during SIMH. We then immunoprecipitated TRAF2 and demonstrated a time-dependent recruitment of MULAN after the induction of SIMH (Fig. 10A) suggesting that these two proteins integrate the same complex after SIMH induction. When OPA1 expression was knocked down to suppress SIMH, the

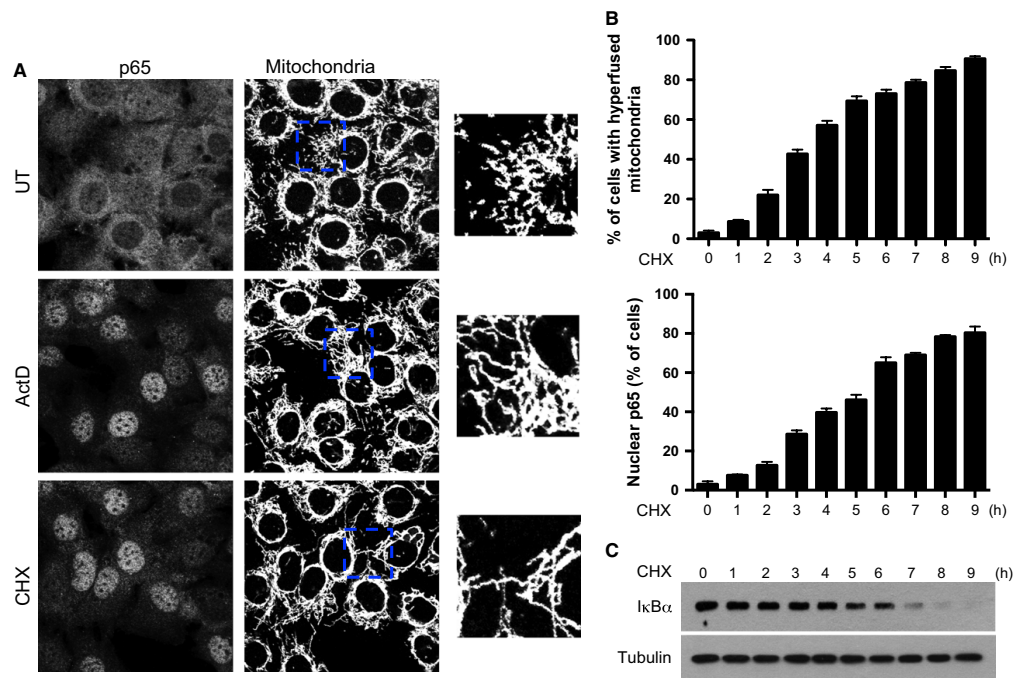


Fig. 6. Stress-induced mitochondrial hyperfusion is accompanied by an activation of NF- κ B. (A) Wild-type MEFs were either left untreated (UT) or were exposed to 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ actinomycin D (ActD) or 10 μM cycloheximide (CHX) for 9 h. The nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit and mitochondrial morphology [mitochondria stained with anti-(cytochrome c)] were assessed by immunofluorescence. Representative images are shown, with the boxed areas enlarged on the right. (B) Quantification, over time, of MEFs exposed to 10 μM CHX and with very long, connected, tubular (hyperfused) mitochondria (upper histogram) or with nuclear p65 (lower histogram). (C) Wild-type MEFs were exposed to 10 μM CHX. Cell extracts were then analyzed by immunoblotting, to assess the degradation of I κ B α at various time points. Tubulin was used as a loading control.

association between TRAF2 and MULAN was impaired (Fig. 10B), indicating a requirement for mitochondrial network fusion for the formation of a TRAF2-MULAN complex to ensure NF- κ B activation. Finally, the level of ubiquitylation of TRAF2 was investigated during SIMH, in the presence and the absence of MULAN. In cells transfected with MULAN siRNA, TRAF2 was significantly less ubiquitylated than in control cells after the induction of SIMH, suggesting a role for MULAN in the polyubiquitylation of TRAF2 in this pathway (Fig. 10C).

Discussion

The activation of pro-apoptotic Bcl-2 members, such as Bax or Bak, in response to strong stress signals promotes mitochondrial outer membrane permeabilization. This leads to the release into the cytosol of

mitochondrial apoptogenic factors, such as cytochrome *c*, which triggers caspase activation, leading to apoptosis [36]. By contrast, following moderate stress responses of various types, leading to protein synthesis inhibition, cells undergo SIMH and become more resistant to apoptosis [11]. It has been suggested that the increase in mitochondrial ATP production that accompanies SIMH constitutes an adaptive prosurvival response to stress [11], but our findings suggest that SIMH also stimulates an antiapoptotic pathway involving NF- κ B activation, because this transcription factor induces the expression of antiapoptotic genes, such as those encoding Bcl-X_L, XIAP or FLIP [34]. Indeed, we found that SIMH was associated with NF- κ B activation, and that mitochondrial dynamics and NF- κ B were linked via the mitochondrial E3 ubiquitin ligase MULAN, for which a knockdown of expression was shown to inhibit SIMH-induced NF- κ B activation.

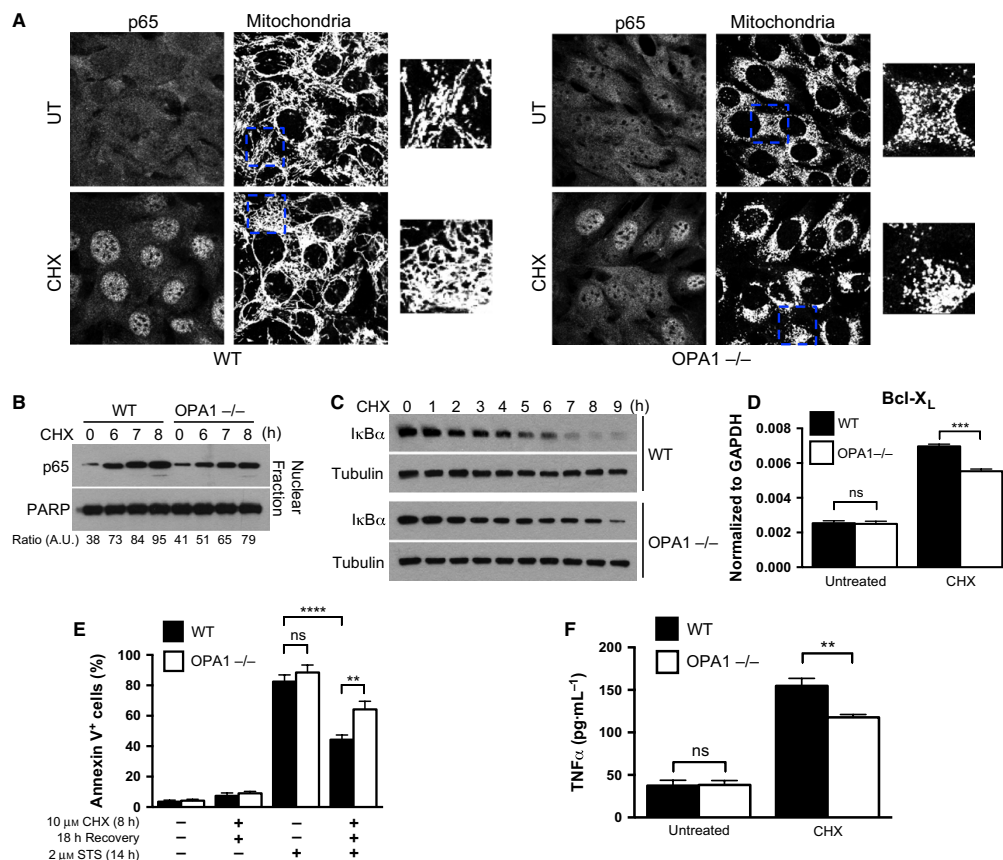
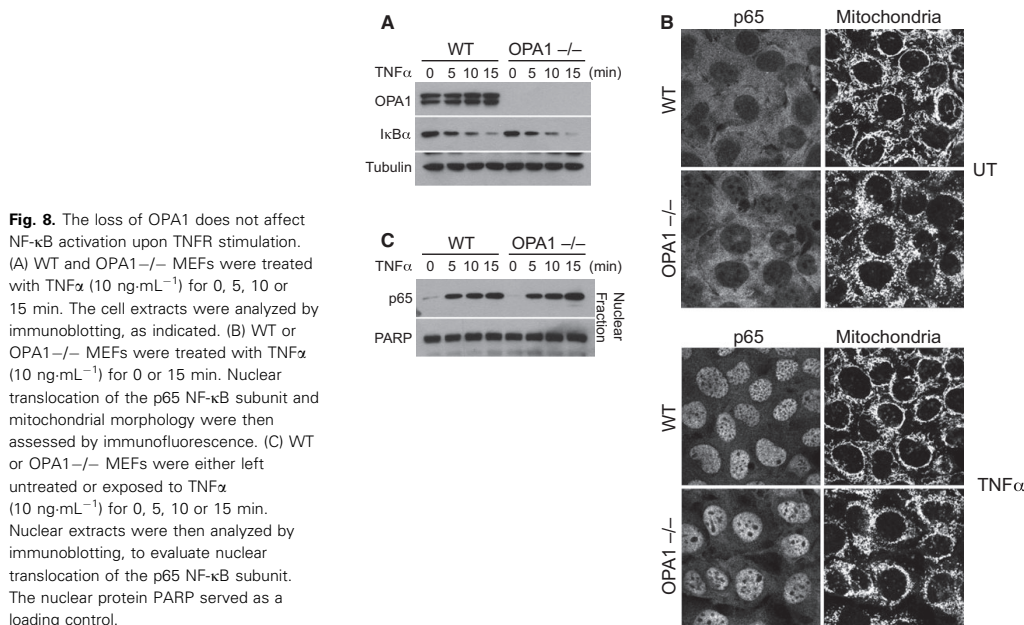


Fig. 7. The inhibition of SIMH impairs NF- κ B activation. (A) WT or OPA1^{-/-} MEFs were either left untreated (UT) or were exposed to 10 μ M CHX for 9 h. Nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit and mitochondrial morphology were assessed by immunofluorescence. Representative images are shown, with the boxed areas enlarged on the right. (B) WT or OPA1^{-/-} MEFs were either left untreated or exposed to 10 μ M CHX for 6, 7 or 8 h. Nuclear extracts were then analyzed by immunoblotting, to evaluate nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit. The nuclear protein PARP served as a loading control. The pixel intensity of each band was quantified using IMAGEJ software and the ratio p65/PARP was calculated and represented in arbitrary units (AU). (C) WT or OPA1^{-/-} MEFs were exposed to 10 μ M CHX. The degradation of I κ B α was then assessed in cell extracts, by immunoblotting at different time points. Tubulin was used as a loading control. (D) WT or OPA1^{-/-} MEFs were either left untreated or exposed to 10 μ M CHX for 9 h. Bcl-X_L expression was then measured by RT-qPCR and normalized to GAPDH. The data shown are means $\pm$ SD from three independent experiments. *** P < 0.001 versus the WT cells (Student's t -test). ns, not significant. (E) WT or OPA1^{-/-} MEFs were either left untreated or exposed to 10 μ M CHX for 8 h. The cells were then washed with NaCl/P_i and incubated in fresh medium for a 18 h period of recovery. Next, cells were treated with 2 μ M staurosporine (STS) for 14 h. In all cases, the cells were harvested and stained with annexin V FITC for flow cytometric analysis. The data shown are means $\pm$ SD from three independent experiments. **** P < 0.0001, **0.001 < P < 0.01 versus WT cells (Student's t -test). ns, not significant. (F) WT or OPA1^{-/-} MEFs were either left untreated or exposed to 10 μ M CHX for 9 h. The cells were then washed with NaCl/P_i and incubated in new medium. The secretion of TNF α was measured by ELISA 18 h later. The data shown are means $\pm$ SD from three independent experiments. **0.001 < P < 0.01 versus WT cells (Student's t -test). ns, not significant.

Nevertheless, although we have determined that NF- κ B activation is linked to SIMH, the overall NF- κ B activation as a consequence of stress stimuli preventing

protein synthesis is likely not only dependent of the SIMH. For instance, UV treatment has been reported to promote SIMH [11] and NF- κ B activation in part



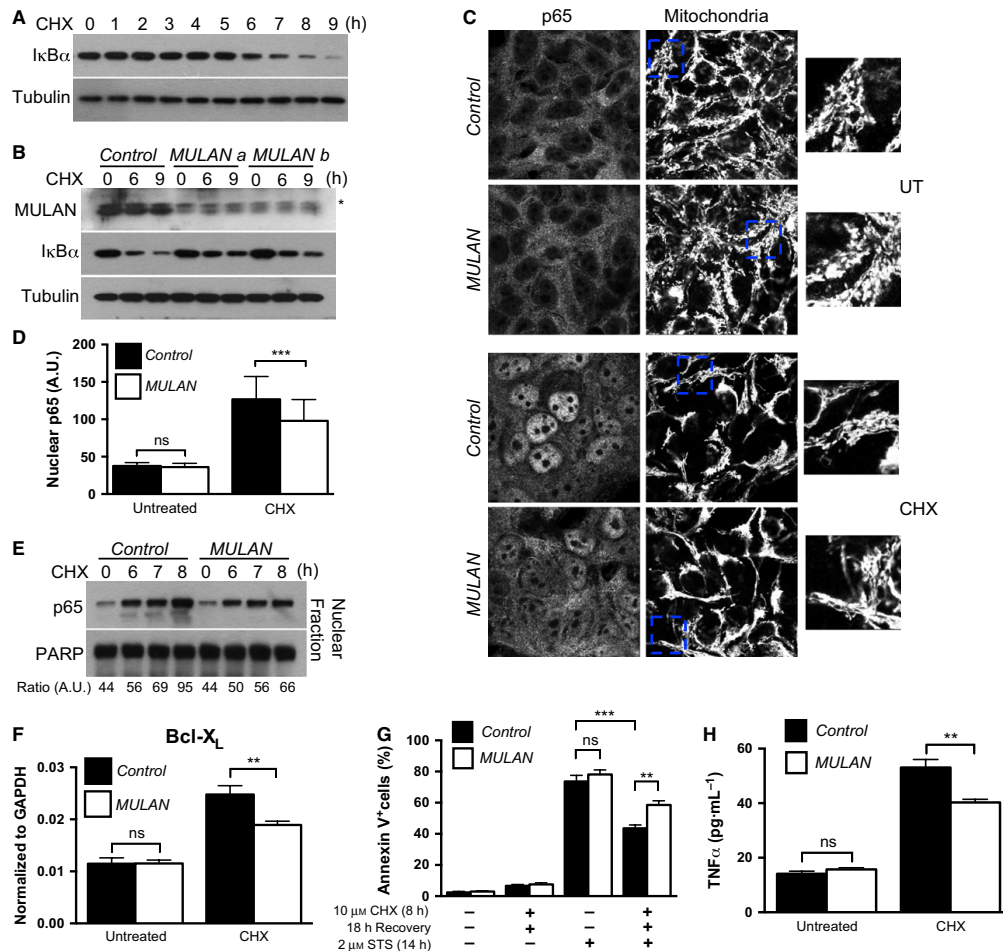
through MULAN (our unpublished data), but DNA damage is also well known to promote NF- κ B activation through ATM and a post-translational modification of NEMO [37]. Similarly, ActD or CHX treatment that triggers SIMH probably also promotes NF- κ B activation independently of the mitochondrial dynamics and MULAN, explaining therefore the fact that, in OPA1^{-/-} cells or after MULAN knockdown, the modulation in NF- κ B activation is modest.

MULAN is anchored in the mitochondrial outer membrane [22,26] and has been reported to promote NF- κ B activation when overexpressed [22,25]. We show here that the ability of this protein to promote NF- κ B activation is dependent on its RING domain. Because the RING domain of MULAN resembles those of IAPs [26] and c-IAPs are important effectors of NF- κ B activation through the promotion of polyubiquitylation for the transmitters of the NF- κ B pathway [27,28], MULAN probably regulates the activation of this transcription factor in a similar way. Following TNFR1 activation, c-IAPs and TRAF2/5 induce the polyubiquitylation of RIP1, and the ubiquitin chains linked to RIP1 play a key role in IKK activation by the kinase TAK1 [13,14]. In our hands, MULAN required TRAF2 to activate NF- κ B in a TAK1- and IKK-dependent manner. However, whereas TRAF2 co-immunoprecipitated with MU-

LAN during SIMH, it remains unclear whether MULAN binds directly to TRAF2 or whether MULAN and TRAF2 form a complex with a transmitter of the NF- κ B pathway, as for the RIP1/c-IAPs/TRAF2 complex, following TNFR1 stimulation [13,14].

SIMH and the ensuing activation of NF- κ B result from stress signals inhibiting protein synthesis (UV-C, CHX, ActD, etc.). The transcriptional activity of NF- κ B is thus impaired in these conditions. Nevertheless, cells exposed to this stress signal for prolonged periods eventually die by apoptosis (indeed, UV-C, CHX and ActD are known to be good inducers of apoptosis). This implies that the prosurvival effect of SIMH, due to increases in ATP production [11] or NF- κ B activation (this study), is effective only for brief periods of stress. More prolonged periods of exposure to stress instead result in apoptosis. Finally, one interesting question that remains unanswered concerns the way in which the inhibition of protein synthesis is 'sensed' within the mitochondria to promote SIMH.

Based on our results, we propose the following working model (Fig. 10D). After a moderate stress leading to protein synthesis inhibition (UV, CHX, ActD, etc.), SIMH takes place, promoting MULAN activation. The resulting hyperfusion of the mitochondrial network involves OPA1 and the mitochondrial inner membrane protein SLP-2, a member of the



SPFH family (prohibitin/stomatin/flotillin/Hflk) of putative scaffolding proteins, as previously reported [11]. It remains unclear how SIMH activates MULAN, and this aspect merits further exploration. MULAN then triggers the polyubiquitylation of a transmitter of the NF- κ B pathway. The TAK1/TABs and IKK complexes are recruited to the polyubiquitin chains. TAK1 phosphorylates IKK β , which in turn, promotes NF- κ B activation by inducing the phosphorylation and proteasome degradation of I κ B α . Free NF- κ B dimers then migrate into the nucleus to exert their transcriptional effects. The ubiquitylated transmitter of this NF- κ B signaling pathway may be TRAF2, which we found to interact with MULAN and to be less ubiquitylated in

the absence of MULAN during SIMH. TRAF2 functions as a polyubiquitylated transmitter of the NF- κ B pathway in B cells, following engagement of the TNFR family member CD40 [38], providing support for the idea that TRAF2 may act as a polyubiquitylated transmitter during SIMH.

It was recently shown that, during autophagy, mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability [39]. The reported mitochondrial elongation during autophagy seems to be similar to the mitochondrial hyperfusion observed when protein synthesis is blocked, suggesting that MULAN may be activated during autophagy. Interestingly, there seems to be a link between the NF- κ B signaling pathway and

Fig. 9. Involvement of MULAN in NF- κ B activation during SIMH. (A) HEK 293T cells were exposed to 10 μ M CHX. The degradation of I κ B α was then assessed in cell extracts by immunoblotting at different time points. Tubulin was used as a loading control. (B) HEK 293T cells were transfected with a control nonspecific siRNA or with siRNAs raised against MULAN. Then, 72 h later, the cells were either left untreated or treated with 10 μ M CHX for 6 or 9 h. Cell extracts were then analyzed by immunoblotting, as indicated. Tubulin was used as a loading control. * indicates a probable nonspecific band. (C) HEK 293T cells were transfected with a control non specific siRNA or with a siRNA against MULAN. Then, 72 h later, the cells were either left untreated (UT) or exposed to 10 μ M CHX for 9 h. Mitochondrial morphology and nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit were assessed by immunofluorescence. Representative images are shown, with the boxed areas enlarged on the right. The pixel intensity of the nuclear signal of p65 in 50 cells in each condition was quantified using IMAGEJ software in (D). *** P < 0.001, versus cells transfected with the control siRNA. ns, not significant; AU, arbitrary unit. (E) HEK 293T cells were transfected for 72 h with a control non specific siRNA or with a siRNA against MULAN. Nuclear extracts were then analyzed by immunoblotting, to evaluate nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit after exposure to 10 μ M CHX for 6, 7 and 8 h. The nuclear protein PARP served as a loading control. The pixel intensity of each band was quantified using IMAGEJ software and the ratio p65/PARP was calculated and represented in arbitrary units (AU). (F) HEK 293T cells were transfected with a control non specific siRNA or with a siRNA against MULAN. Seventy-two hour later, the cells were either left untreated or exposed to 10 μ M CHX for 9 h. Bcl-X_L expression was then measured by RT-qPCR and normalized to GAPDH. The data shown are means $\pm$ SD from three independent experiments. **0.001 < P < 0.01 versus cells transfected with the control siRNA (Student's t -test). ns, not significant. (G) HEK 293T cells were transfected with a control non specific siRNA or with a siRNA against MULAN. Then, 72 h later, the cells were either left untreated or exposed to 10 μ M CHX for 8 h. Then the cells were washed with NaCl/P_i and incubated in fresh medium for a 18 h period of recovery. Next, cells were treated with 2 μ M staurosporine (STS) for 14 h. In all cases, the cells were harvested and stained with annexin V FITC for flow-cytometric analysis. The data shown are means $\pm$ SD from three independent experiments. *** P < 0.001, **0.001 < P < 0.01 versus cells transfected with the control siRNA (Student's t -test). ns: not significant. (H) HEK 293T cells were transfected with a control non specific siRNA or with a siRNA against MULAN. Then, 72 h later, the cells were either left untreated or exposed to 10 μ M CHX for 9 h. The cells were then washed with NaCl/P_i and incubated in new medium. The secretion of TNF α was measured by ELISA 18 h later. The data shown are means $\pm$ SD from three independent experiments. **0.001 < P < 0.01 versus cells transfected with the control siRNA (Student's t -test). ns, not significant.

the induction of autophagy, because constitutively active IKK subunits have been shown to stimulate autophagy and to transduce multiple signals operating in starvation-induced autophagy, including the phosphorylation of AMPK and JNK [40]. The involvement of MULAN in autophagy, through its capability to activate NF- κ B, should thus be explored further.

In conclusion, our results shed light on a new function of mitochondria in the activation of the transcription factor NF- κ B, as a result of SIMH, via the E3 ubiquitin ligase MULAN. Our findings demonstrate that, over and above their role in bioenergetics and cell death, mitochondria are also organelles responsible for the sensing of stress signals and their conversion into biological responses.

Experimental procedures

Cell culture and reagents

MEFs and HEK 293T cells were cultured in standard conditions. HEK 293T cells were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). OPA1^{−/−} and the corresponding wild-type MEFs [41] were provided by D.C. Chan (Division of Biology, California Institute of Technology, Pasadena, CA, USA). CHX, ActD and staurosporine were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Protein extraction and immunoblot analysis

Cells were lysed in lysis buffer (20 mM Tris/HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 2 mM sodium pyrophosphate, 10% glycerol, 25 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate) supplemented with Complete protease inhibitor mixture (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France). After incubation on ice for 10 min, a soluble extract was obtained by centrifugation at 11 000 g for 10 min at 4 °C. The lysate (20 μ g) was boiled in SDS sample buffer and resolved by SDS/PAGE. Immunoblot analysis was performed with specific antibodies and the antigen–antibody complexes were visualized by chemiluminescence (Immobilon Western, Merck Millipore, Billerica, MA, USA).

Subcellular fractionation

For immunoblot analysis of the nuclear translocation of p65, 5–10 $\times 10^6$ cells were washed with 1 $\times$ NaCl/P_i and incubated for 5 min at 4 °C in 200 μ L buffer A (10 mM Hepes pH 7.4, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF and Complete protease inhibitor cocktail). Plasma membranes were solubilized by incubation with 12.5 μ L of 10% Igepal (Sigma) for 5 min at 4 °C. Nuclei were collected by centrifugation at 600 g and washed twice with buffer A. Nuclear proteins were then extracted by incubation with 30 μ L buffer B (20 mM Hepes pH 7.4, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM

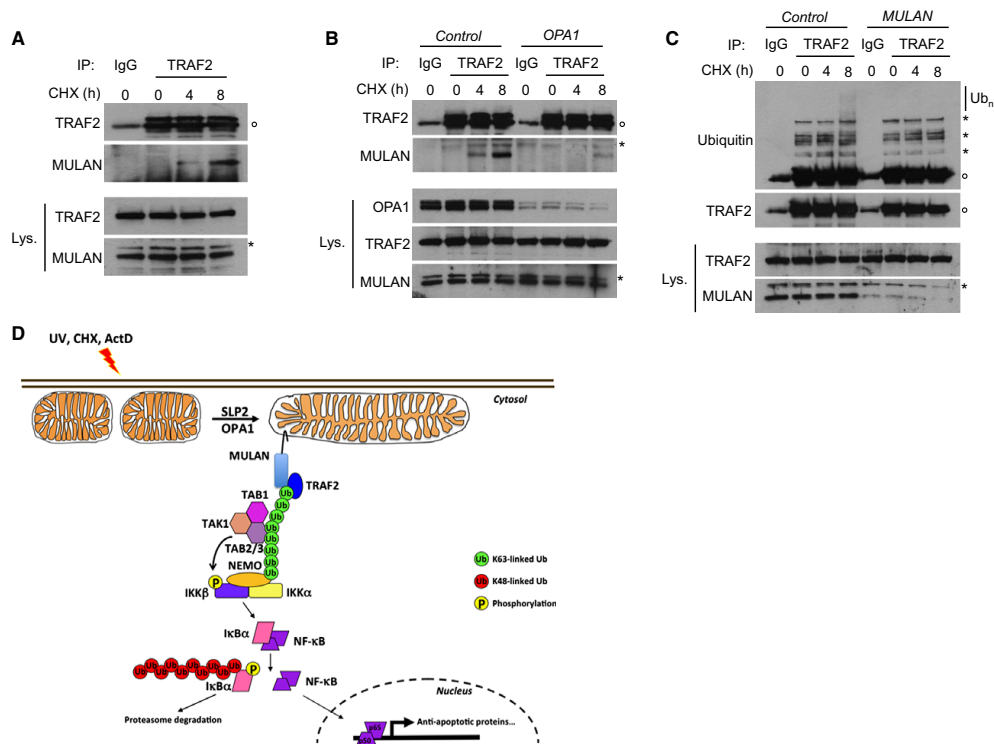


Fig. 10. MULAN and TRAF2 integrate the same complex during SIMH. (A) HEK 293T cells were either left untreated or exposed to 10 μ M CHX for 4 or 8 h. Cell lysates (Lys) were subjected to immunoprecipitation (IP) with an antibody raised against TRAF2 or with a control IgG. Samples were then analyzed by immunoblotting with antibodies against the indicated proteins. ° IgG heavy chains. * probable non specific band. (B) HEK 293T cells were transfected for 72 h with a control non specific siRNA or with a siRNA against OPA1. Cells were then treated as in (A). ° IgG heavy chains. * probable non specific band. (C) HEK 293T cells were transfected for 72 h with a control non specific siRNA or with a siRNA against MULAN, then treated and analyzed as in (A). ° IgG heavy chains. * probable non specific band. Ub_n, polyubiquitylation; D, working model, see discussion for description.

NaF, and Complete protease inhibitor cocktail), with shaking. Nuclear extracts were cleared by centrifugation at 13 000 *g* and analyzed by immunoblotting.

Antibodies

The primary antibodies used for immunoblotting were as follows: mouse monoclonal anti-(Drp1/Dlp1) (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA, clone 8; 1 : 4000 dilution), mouse monoclonal anti-(Cardif/MAVS) (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA, clone Adri-1; 1 : 5000), rabbit polyclonal anti-(MULAN/MAPL) (kindly provided by Dr H.M. McBride, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Canada; 1 : 5000), rabbit polyclonal anti-MARCH5 (kindly provided by Dr R.J. Youle, NIH/

NINDS, Bethesda, MD, USA; 1 : 2000), mouse monoclonal anti-tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, clone 10D8; 1 : 5000), rabbit polyclonal anti-IκBα (Cell Signaling Technology, Danvers, USA; 1 : 5000), rabbit polyclonal anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology, C-20; 1 : 5000), mouse monoclonal anti-PARP (BD Biosciences, clone C2-10; 1 : 4000), mouse monoclonal anti-TRAF2 (Santa Cruz Biotechnology, clone F-2; 1 : 5000), mouse monoclonal anti-OPA1 (BD Biosciences, clone 18; 1 : 5000), mouse monoclonal anti-ubiquitin (Santa Cruz Biotechnology, clone P4D1; 1 : 1000), rabbit polyclonal anti-NIK (Santa Cruz Biotechnology, H-248; 1 : 1000), mouse monoclonal anti-(IKKγ/NEMO) (BD Biosciences, clone C73-764; 1 : 2000), rabbit polyclonal anti-TRAF3 (Santa Cruz Biotechnology, H-122; 1 : 1000),

mouse monoclonal anti-TRAF6 (Santa Cruz Biotechnology, clone D—10; 1 : 5000), rabbit polyclonal anti-TAK1 (Cell Signaling Technology; 1 : 2000), mouse monoclonal anti-IKK α (BD Biosciences, clone B78-1; 1 : 2000), mouse monoclonal anti-IKK β (BD Biosciences, clone F18-1875; 1 : 2000), mouse monoclonal anti-RIP1 (BD Biosciences, clone 38/RIP; 1 : 4000). The antibody used for the immunoprecipitation of endogenous TRAF2 was a mouse monoclonal anti-TRAF2 Ig (Santa Cruz Biotechnology, clone F-2). The primary antibodies used for immunofluorescence microscopy were rabbit polyclonal anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology, C-20; 1 : 500), mouse monoclonal anti-cytochrome *c* (BD Biosciences, clone 6H2.B4; 1 : 800) and mouse monoclonal anti-Bax (clone 6A7; 1 : 200; Sigma-Aldrich).

Transfections and plasmids

HEK 293T and HeLa cells were transfected using Eugene 6 (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The various plasmids used, encoding Drp1, Drp1^{K38A}, MARCH5, MARCH5^{H43W}, MULAN or MULAN^{C339A}, were kindly provided by R.J. Youle.

Luciferase assays

Cells were plated in 24-well plates. On the second day, cells were cotransfected with 200 ng of the plasmid of interest and 50 ng of a construct encoding firefly luciferase under the control of the IFN β promoter or driven by three copies of an NF- κ B enhancer, and 10 ng of the *Renilla* luciferase pRL-TK plasmid (Promega). Transfected cells were collected and luciferase activity was assessed in the Dual-luciferase reporter assay (Promega), on a Fluorostar Optima machine (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Each experiment was carried out in triplicate. For each sample, the number of firefly luciferase luminescence units was divided by the number of *Renilla* luciferase luminescence units to obtain the number of relative luminescence units (RLU).

Immunoprecipitation

Cell lysates were prepared in lysis buffer C (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5% glycerol, 1% Triton X-100, and 1% Nonidet P-40) supplemented with Complete protease inhibitor cocktail and incubated on ice for 20 min. Soluble proteins were subjected to immunoprecipitation with an anti-TRAF2 (2 μ g·mL⁻¹), or mouse anti-IgG serum as a control. An aliquot of the total lysate was included as a control. After incubation for 1 h, 20 μ L of equilibrated protein G-agarose beads (Roche Molecular Biochemicals) were added. The mixture was incubated for 1 h to allow immunoprecipitation to occur. The beads were then washed three times with buffer C. Immune complexes were resolved by SDS/PAGE and immunoblotted.

Immunofluorescence microscopy

Cells grown in LabTek (Fisher Scientific, Illkirch, France) chambers were fixed by incubation for 10 min in 4% paraformaldehyde, and then permeabilized by incubation with 0.15% Triton X-100 in NaCl/P_i for 15 min. The cells were then incubated for 1 h in blocking buffer (2% BSA in NaCl/P_i) and then with the primary antibodies. The cells were washed three times, for 10 min each, in NaCl/P_i, then incubated for 1 h with Alexa Fluor secondary antibodies. Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Images were acquired with a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a $\times$ 63 oil immersion fluorescence objective.

Small interfering RNA (siRNA)

For the downregulation of proteins, we transfected HEK 293T cells for 72 h, with siRNA oligomers at a final concentration of 20 nM, by the calcium phosphate precipitation method. HeLa cells were transfected with siRNAs (20 nM) using oligofectamine (Life Technologies). We purchased the specific siRNAs and the control nonspecific siRNA from Sigma Aldrich. The references of the siRNA oligomers used are as follows: MULAN a (SASI_Hs01_00083230), MULAN b (SASI_Hs01_00083231), MAVS a (SASI_Hs01_00128708), MAVS b (SASI_Hs01_00128711), NIK a (SASI_Hs01_00141408), NIK b (SASI_Hs01_00141410), IKK γ /NEMO a (SASI_Hs02_00321554), IKK γ /NEMO b (SASI_Hs02_00321555), IKK α a (SASI_Hs01_00206922), IKK α b (SASI_Hs01_00206923), IKK β a (SASI_Hs01_00156170), IKK β b (SASI_Hs01_00156172), TRAF2 a (SASI_Hs01_00095954), TRAF2 b (SASI_Hs01_00095956), TRAF3 a (SASI_Hs02_00335396), TRAF3 b (SASI_Hs02_00335397), TRAF6 a (SASI_Hs01_00116390), TRAF6 b (SASI_Hs01_00116391), RIP1 a (SASI_Hs01_00071803), RIP1 b (SASI_Hs01_00071805), TAK1 a (SASI_Hs01_00234777), TAK1 b (SASI_Hs01_00234778), IKK ϵ a (SASI_Hs01_00107520), IKK ϵ b (SASI_Hs01_00107521), TBK1 a (SASI_Hs01_00062066), TBK1 b (SASI_Hs01_00062067) and OPA1 (SASI_Hs01_00152069).

Real-time quantitative PCR

RNA was extracted from cells using RLT lysis buffer and purified using a QIAGEN RNeasy Mini kit according to the manufacturer's protocol. RNA quality was checked by measuring the ratio of optical densities at 260 and 280 nm. A total of 1 μ g of total RNA was used for cDNA synthesis using a Revert Aid H minus First Strand DNA Synthesis kit (Fermentas, Villebon-sur-Yvette, France). cDNA was amplified by PCR with a LightCycler 480 (Roche Diagnostics) using SYBR Green (Fast Start DNA Master SYBR-Green I; Roche Applied Science, Roche Diagnostics).

Specific primers were used for Bcl-X_L, XIAP, FLIP, p65/RelA, or the mean value GAPDH as housekeeping gene, under the following conditions: 95 °C for 15 min, 40 cycles at 94 °C for 15 s and at 55 °C for 30 s, then 72 °C for 30 s. Specific primers were designed by Universal Probe Library System (Roche Applied Science). The sequences of the primers used are as follows: hBcl-X_L (Forward: AG CCTTGGATCCAGGAGAA, reverse: AGCGGTTGAA GCGTTCCT); mBcl-X_L (CTGGCTAGGAGCCCTTCAG, AGGGATGAGACAGGCCAAG); hFLIP (TCCTGAA CAGTACTATTTCTGTGA, AGCATGAGATATAAAA TGAAAAGAAGG); hXIAP (TTTGGGACATGGATA TACTCAGTT, AGCACTTACTTTATCACCTTCACC), p65/RelA (TCATGAAGAAGAGTCCTTTCAGC, GGAT GACGTAAAGGGATAGGG); hGAPDH (AGCCACATC GCTCAGACAC, AATACGACCAAATCCGTTGACT); mGAPDH (AGCTTGTCATCAACGGGAAG, TTTGAT GTTAGTGGGGTCTCG).

Results were expressed as $2^{-\Delta C_p}$, where C_p is the cycle threshold number. Dissociation curves were analyzed after each run for each amplicon to assess the specificity of the quantification when using SYBR Green.

Assessment of apoptosis by flow cytometry

Phosphatidylserine exposure was detected using Annexin V FITC kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. After apoptosis induction, Annexin V labeling was measured using an Accuri flow cytometer.

ELISA

Cells were plated in 24-well plates at a cell density of 2×10^5 cells per well. Eighteen hours after CHX treatment, supernatants of cells were collected and ELISA assay was performed following the manufacturer's protocol (Quantikine ELISA, mouse or human TNF α , R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Statistical analysis

Two-way ANOVA tests with *post hoc* Tukey's analysis were used to assess the statistical significance of differences (GRAPHPAD PRISM software), and *P*-values are indicated in the figure legends. In some cases, as indicated data were compared in Student's *t*-tests. Differences were considered to be significant if $P < 0.05$. **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $0.001 < P < 0.01$, * $0.01 < P < 0.05$. ns, not significant.

Acknowledgements

We would like to thank Drs R.J. Youle and H.M. McBride for kindly providing plasmids and antibodies. We also thank Dr N. Bidere for his advices and

comments on our manuscript. We are also very grateful to Lola Lecru for her assistance in RT-qPCR. This work was supported by grants from La Ligue contre le cancer (Equipe Labellisée), l'association pour la recherche contre le cancer (ARC) and Université Paris Sud XI.

Author contributions

Planned the experiments: NZ, MP, DA. Performed the experiments: NZ, MP, GA, EH, DA. Analyzed data: AV, DA. Wrote the paper: DA.

References

- McBride H & Scorrano L (2013) Mitochondrial dynamics and physiology. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 148–149.
- Chan DC (2006) Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* **125**, 1241–1252.
- James DI, Parone PA, Mattenberger Y & Martinou JC (2003) hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* **278**, 36373–36379.
- Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ & Mihara K (2010) Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol* **191**, 1141–1158.
- Palmer CS, Osellame LD, Laine D, Koutsopoulos OS, Frazier AE & Ryan MT (2011) MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep* **12**, 565–573.
- Smirnova E, Griparic L, Shurland DL & van der Bliek AM (2001) Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **12**, 2245–2256.
- Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B & Scorrano L (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 15927–15932.
- Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM & Chan DC (2004) Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* **305**, 858–862.
- Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G *et al.* (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* **27**, 433–446.
- Martinou JC & Youle RJ (2011) Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell* **21**, 92–101.
- Tondera D, Grandemange S, Jourdain A, Karbowski M, Mattenberger Y, Herzig S, Da Cruz S, Clerc P,

- Raschke I, Merkwirth C *et al.* (2009) SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J* **28**, 1589–1600.
- 12 Baltimore D (2011) NF-kappaB is 25. *Nat Immunol* **12**, 683–685.
- 13 Napetschnig J & Wu H (2013) Molecular basis of NF-kappaB signaling. *Annu Rev Biophys* **42**, 443–468.
- 14 Skaug B, Jiang X & Chen ZJ (2009) The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu Rev Biochem* **78**, 769–796.
- 15 Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL & Youle RJ (2001) The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* **1**, 515–525.
- 16 Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN & van der Bliek AM (1998) A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol* **143**, 351–358.
- 17 Karbowski M, Neutznier A & Youle RJ (2007) The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J Cell Biol* **178**, 71–84.
- 18 Seth RB, Sun L, Ea CK & Chen ZJ (2005) Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**, 669–682.
- 19 Castanier C, Garcin D, Vazquez A & Arnoult D (2010) Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway. *EMBO Rep* **11**, 133–138.
- 20 Israel A (2010) The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000158.
- 21 Alexia C, Poalas K, Carvalho G, Zemirli N, Dwyer J, Dubois SM, Hatchi EM, Cordeiro N, Smith SS, Castanier C *et al.* (2013) The endoplasmic reticulum acts as a platform for ubiquitylated components of nuclear factor kappaB signaling. *Sci Signal* **6**, ra79.
- 22 Li W, Bengtson MH, Ulbrich A, Matsuda A, Reddy VA, Orth A, Chanda SK, Batalov S & Joazeiro CA (2008) Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* **3**, e1487.
- 23 Neutznier A, Benard G, Youle RJ & Karbowski M (2008) Role of the ubiquitin conjugation system in the maintenance of mitochondrial homeostasis. *Ann NY Acad Sci* **1147**, 242–253.
- 24 Neuspiel M, Schauss AC, Braschi E, Zunino R, Rippstein P, Rachubinski RA, Andrade-Navarro MA & McBride HM (2008) Cargo-selected transport from the mitochondria to peroxisomes is mediated by vesicular carriers. *Curr Biol* **18**, 102–108.
- 25 Bae S, Kim SY, Jung JH, Yoon Y, Cha HJ, Lee H, Kim K, Kim J, An IS, Um HD *et al.* (2012) Akt is negatively regulated by the MULAN E3 ligase. *Cell Res* **22**, 873–885.
- 26 Zhang B, Huang J, Li HL, Liu T, Wang YY, Waterman P, Mao AP, Xu LG, Zhai Z, Liu D *et al.* (2008) GIDE is a mitochondrial E3 ubiquitin ligase that induces apoptosis and slows growth. *Cell Res* **18**, 900–910.
- 27 Bertrand MJ, Milutinovic S, Dickson KM, Ho WC, Boudreault A, Durkin J, Gillard JW, Jaquith JB, Morris SJ & Barker PA (2008) cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell* **30**, 689–700.
- 28 Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G & Chen ZJ (2006) Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* **22**, 245–257.
- 29 Bottomley MJ, Stier G, Pennacchini D, Legube G, Simon B, Akhtar A, Sattler M & Musco G (2005) NMR structure of the first PHD finger of autoimmune regulator protein (AIRE1). Insights into autoimmune polyendocrinopathy–candidiasis–ectodermal dystrophy (APECED) disease. *J Biol Chem* **280**, 11505–11512.
- 30 Katoh S, Hong C, Tsunoda Y, Murata K, Takai R, Minami E, Yamazaki T & Katoh E (2003) High precision NMR structure and function of the RING-H2 finger domain of EL5, a rice protein whose expression is increased upon exposure to pathogen-derived oligosaccharides. *J Biol Chem* **278**, 15341–15348.
- 31 Fang L, Hemion C, Goldblum D, Meyer P, Orgul S, Frank S, Flammer J & Neutznier A (2012) Inactivation of MARCH5 prevents mitochondrial fragmentation and interferes with cell death in a neuronal cell model. *PLoS One* **7**, e52637.
- 32 Sheridan C & Martin SJ (2010) Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion* **10**, 640–648.
- 33 Yuan H, Gerencser AA, Liot G, Lipton SA, Ellisman M, Perkins GA & Bossy-Wetzel E (2007) Mitochondrial fission is an upstream and required event for bax foci formation in response to nitric oxide in cortical neurons. *Cell Death Differ* **14**, 462–471.
- 34 Ben-Neriah Y & Karin M (2011) Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. *Nat Immunol* **12**, 715–723.
- 35 Devary Y, Rosette C, DiDonato JA & Karin M (1993) NF-kappa B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. *Science* **261**, 1442–1445.
- 36 Youle RJ & Strasser A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 47–59.
- 37 McCool KW & Miyamoto S (2012) DNA damage-dependent NF-kappaB activation: NEMO turns nuclear signaling inside out. *Immunol Rev* **246**, 311–326.

- 38 Matsuzawa A, Tseng PH, Vallabhapurapu S, Luo JL, Zhang W, Wang H, Vignali DA, Gallagher E & Karin M (2008) Essential cytoplasmic translocation of a cytokine receptor-assembled signaling complex. *Science* **321**, 663–668.
- 39 Gomes LC, Di Benedetto G & Scorrano L (2011) During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* **13**, 589–598.
- 40 Criollo A, Senovilla L, Authier H, Maiuri MC, Morselli E, Vitale I, Kepp O, Tasdemir E, Galluzzi L, Shen S *et al.* (2010) The IKK complex contributes to the induction of autophagy. *EMBO J* **29**, 619–631.
- 41 Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C & Chan DC (2007) OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol* **178**, 749–755.
- 42 Hsu YT & Youle RJ (1997) Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* **272**, 13829–13834.

Discussion et perspectives

I. RNF121 comme régulateur positif de NF-κB

Durant la première partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de nouveaux régulateurs de la voie NF-κB. Pour se faire, nous avons criblé une banque de siRNAs dirigés contre les 46 E3 ligases transmembranaires. Les résultats de ce crible nous ont permis d'identifier RNF121 comme nouveau régulateur de NF-κB sous certains stimuli.

➤ RNF121, une protéine conservée

Le gène humain RNF121 (Ring Finger Protein 121) est situé au niveau du segment 69kb du chromosome 11q13.4. Ce gène produit un pré-ARNm qui subit un épissage au niveau de 9 exons afin de former un ARNm mature de 2623bp traduit en une protéine de 327 acides aminés. Cette protéine d'environ 37 kDa est pourvue d'un domaine RING très conservé de type C3H2C3 ainsi que six domaines transmembranaires permettant son ancrage à la membrane d'un organe. RNF121 est très conservée de l'homme à la drosophile (*National Center for Biotechnology Information- www.ncbi.nlm.nih.gov*). Ce haut niveau de conservation parmi les espèces suggère un rôle crucial de cette protéine. Bien que très peu de travaux ont été dédiés à l'étude de cette protéine, d'importantes fonctions lui ont toutefois été attribuées.

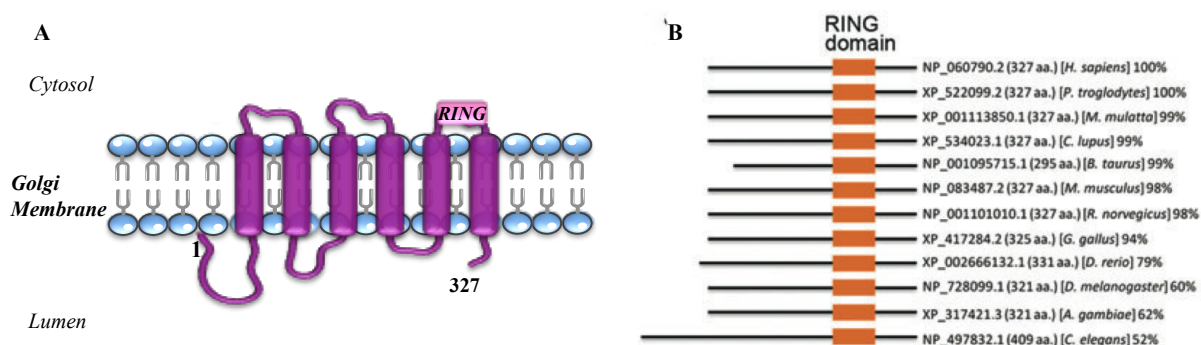


Figure 28. (A) Topologie de la distribution des domaines de RNF121. (B) Représentation schématique de RNF121 dans différentes espèces [311]

RNF121 a été caractérisée pour la première fois chez *C.elegans* en 2010. Cette protéine a été décrite comme étant localisée au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) où elle serait impliquée dans la régulation du stress lié au RE. Le stress du RE survient suite à certaines conditions externes ou internes (développement, différenciation, etc), il est une conséquence au mauvais repliement des protéines qui s'accumulent par la suite au niveau de la lumière de cet organe. Face à cette accumulation, la cellule adopte un comportement appelé « Réponse aux protéines mal repliées ou UPR (Unfolded Protein Response) » qui induit entre autre la baisse de la synthèse protéique ainsi que l'augmentation de la capacité de dégradation *via* une machinerie appelée l'« ERAD » (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation). Le processus de dégradation ERAD est réalisé suivant trois étapes; le substrat est d'abord reconnu au niveau du RE, il subit par la suite une rétrotranslocation vers le cytoplasme où il est ubiquitinylé puis dirigé vers le protéasome en vue d'être dégradé [312].

A. Darom et ses coéquipiers ont montré qu'une mutation au niveau du gène RNF121 chez *C. elegans* était à l'origine d'une plus grande sensibilité de ces vers au stress du RE. En effet, dans des conditions de stress du RE, le développement de plus des 2/3 des larves mutantes pour RNF121 s'arrête au plus tard au stade 3 larvaire contre 1/5 pour les larves sauvages. Des expériences de mutagenèse dirigée contre le domaine RING de RNF121, ont montré que cette propriété était liée à l'activité E3 ligase de cette protéine. Suite à différentes expériences de microscopie et de biochimie, les auteurs proposent que RNF121 ferait partie des protéines de la machinerie de dégradation ERAD en assurant l'ubiquitination dégradative d'une β -intégrine (PAT-3) nécessaire lors du développement musculaire et gonadique chez *C.elegans* [312].

➤ RNF121 chez l'homme :

C'est en 2002, que le cDNA de RNF121 a été séquencé pour la première fois chez les mammifères. Ce séquençage a été réalisé au niveau du NIH (National Institute of Health) dans le cadre du programme MGC (mammalian genome Collection) qui a permis la description de plus de 15000 gènes de mammifères [313].

Plus tard, l'équipe de Javier Benitez a évoqué un potentiel rôle de RNF121 dans certaines formes du cancer du sein familial. 5 à 10% du cancer du sein ont une origine héréditaire caractérisée principalement par des mutations au niveau de deux gènes à haute pénétrance :

BRCA1 et BRCA2. Bien que plusieurs régions candidates susceptibles de contenir des gènes de prédisposition au cancer du sein ont été identifiées, aucun gène à haute pénétrance n'a été décrit depuis la découverte des BRCAs. La région 11q13 située sur le chromosome 11 est décrite comme étant importante dans le développement des tumeurs et notamment dans la progression du cancer du sein. J. Bernitez et ses collaborateurs ont pu déterminer au sein de cette région de 28Mb une plus petite fraction de 7Mb susceptible de contenir le locus de la maladie. Parmi les 200 gènes se trouvant au niveau de cette fraction, se trouve RNF121. Toutefois, un crible des régions codantes de certains gènes cibles de cette région, dont RNF121, n'a révélé aucune mutation délétère au niveau des cas étudiés. Etant donné que le séquençage a été limité aux régions codantes uniquement, ce résultat n'exclut toutefois pas la possibilité qu'une mutation affecte la régulation de ces gènes (par exemple dans la région du promoteur) ou leur réarrangement. Ainsi, une mutation du promoteur pourrait augmenter son niveau d'expression et donc augmenter l'activation de NF- κ B [314].

La très récente étude de Zhao et ses collaborateurs (2014) est la première à attribuer à RNF121 une fonction chez l'homme. Ces auteurs décrivent cette protéine comme étant impliquée dans la régulation de l'apoptose. L'apoptose est une mort cellulaire programmée, elle est considérée comme un facteur crucial dans la maintenance de l'homéostasie cellulaire, et tout dérèglement de cette machinerie peut avoir des conséquences désastreuses sur l'organisme. Les auteurs ont d'abord montré que l'extinction de RNF121 par ARN interférence inhibe la croissance cellulaire *via* un processus apoptotique. L'utilisation d'un inhibiteur de caspases (z-VAD-fmk) prévient l'induction de l'apoptose au niveau des cellules ayant été déplétées en RNF121, indiquant ainsi que le processus apoptotique déclenché serait dépendant des caspases. Des expériences de complémentation de cellules déplétées en RNF121 soit avec un ADNc RNF121 sauvage ou un ADNc RNF121 présentant une mutation ou une délétion du domaine RING a permis d'évaluer l'importance du domaine catalytique de RNF121 dans sa fonction de régulateur de l'apoptose [311].

Les travaux réalisés au niveau de notre laboratoire sont venus enrichir les données concernant les fonctions de RNF121 chez l'homme. En effet, nos résultats suggèrent que cette E3 ligase exerce une régulation positive lors de l'activation du facteur de transcription NF- κ B en aval de la stimulation de différents récepteurs de l'immunité innée. Il est clairement établi que NF-

κ B induit un signal de survie *via* la régulation de la transcription de gènes anti-apoptotiques tels que Bcl-X_L, XIAP et FLIP, suggérant ainsi que nos résultats vont dans le sens des travaux de l'équipe de Y. Zhao quant à l'implication de RNF121 dans la régulation négative de l'apoptose.

➤ Type d'ubiquitination catalysée par RNF121

La mutation du domaine catalytique RING de RNF121 abroge sa capacité à induire l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Cela sous-entend que l'activité E3 ligase de cette protéine est nécessaire à sa fonction. Nos résultats ont montré que RNF121 s'autoubiquitinye lorsqu'elle est surexprimée dans des cellules HEK293. Toutefois le type d'ubiquitination catalysée par cette protéine n'a pas encore été complètement déterminé. A ce titre, des expériences d'ubiquitination *in vitro* ont été réalisées par A. Darom et ses collaborateurs et ont permis de suggérer que la β -integrine « PAK-3 » serait la cible de chaînes d'ubiquitine de type dégradatif catalysées par RNF121 chez *C. elegans* [312]. Nos travaux suggèrent que RNF121 jouerait un rôle dans le processus d'ubiquitination d'I κ B α . Or, l'absence d'interaction directe entre ces deux protéines nous laisse supposer que l'E3 ligase RNF121 ne catalyse pas directement l'ubiquitination dégradative d'I κ B α , mais plutôt un autre type d'ubiquitination (par exemple K63) qui permettrait le recrutement ou l'activation d'autres E3 ligases (à l'exemple du complexe SCF ^{β TrCP}) qui vont assurer la formation des chaînes de type K48 sur I κ B α .

➤ A quel niveau de la signalisation agit RNF121

La nécessité de l'activité E3 ligase de RNF121 pour sa fonction porte à croire que cette E3 ligase régule l'activation de NF- κ B *via* le processus d'ubiquitination. Dans un premier temps, nous avons supposé que cette protéine agissait au niveau de l'ubiquitination de RIP1, protéine dont l'ubiquitination non dégradative est essentielle lors de la transduction du signal en aval de la stimulation du TNF récepteur. Toutefois, les expériences de fractionnement et d'immunoprécipitation que nous avons réalisé ont montré que le profil d'ubiquitination de cette protéine n'était pas affecté selon la présence ou l'absence de RNF121. Afin de déterminer à quelle étape de la signalisation agit RNF121, nous avons tenté d'explorer le

profil d'activation de quelques protéines de la voie étudiée. Nos résultats ont permis de souligner que RNF121 interviendrait en aval de l'activation du complexe kinase IKK. En effet, la phosphorylation de ce dernier reste inchangée au niveau des cellules déplétées en RNF121 par rapport aux cellules contrôles.

Nos résultats ont toutefois permis de relever que la diminution de l'activation de NF- κ B en absence de RNF121 est traduite par un retard significatif de la dégradation de son inhibiteur I κ B α . La phosphorylation d'I κ B α étant un prérequis nécessaire à sa dégradation, nous nous attendions à ce que le retard de dégradation d'I κ B α soit corrélé avec une diminution de sa forme phosphorylée. Toutefois nous avons constaté contre toute attente une accumulation de cette forme phosphorylée au niveau des cellules déplétées en RNF121. Cette observation majeure suggère que RNF121 agit en aval de la phosphorylation d'I κ B α et en amont de sa dégradation. Or, il est clairement établi qu'entre ces deux processus, se trouve celui de l'ubiquitination dégradative de l'inhibiteur de NF- κ B « I κ B α ».

Dans le but de confirmer notre hypothèse quant à l'implication de RNF121 dans le processus d'ubiquitination dégradative d'I κ B α , nous avons évalué, par co-immunoprécipitation, le niveau d'ubiquitination d'I κ B α après surexpression de RNF121. Les résultats obtenus n'ont montré aucune différence dans le profil d'ubiquitination de l'inhibiteur de NF- κ B suggérant ainsi un rôle indirect de RNF121 dans ce processus. D'autres expériences d'immunoprécipitation ont appuyé cette hypothèse. En effet, nous avons démontré que les formes endogènes d'I κ B α et RNF121 se retrouvent dans le même complexe. Toutefois, ces deux protéines n'interagissent pas directement lorsqu'elles sont surexprimées dans la cellule. Ceci peut être expliqué par la présence d'un intermédiaire permettant à RNF121 et I κ B α de se retrouver dans un même complexe mais dont l'absence empêcherait l'interaction directe de ces deux protéines dans des conditions de surexpression.

L'ubiquitination dégradative d'I κ B α est largement assurée par un complexe d'E3 ligases appelé SCF ^{β TrCP} (Skp1, Cullin1, protéine F-Box et Roc1) *via* la protéine F-box « β TrCP » qui reconnaît la forme phosphorylée d'I κ B α [315]. Nous supposons donc que RNF121 pourrait intervenir au niveau de l'activation, la régulation ou le recrutement de ce complexe (Figure 29). Nos résultats préliminaires semblent montrer la présence de RNF121 et β TrCP dans un même complexe après immunoprécipitation. Ces résultats ne sont toutefois pas exploitables, car l'utilisation d'anticorps de même isotopes lors de l'immunoprécipitation et de la détection de ces deux protéines a rendu la visualisation de la β TrCP difficile à cause des chaînes lourdes

des anticorps. Il serait donc intéressant de confirmer cette observation en utilisant des anticorps d'origines différentes. Aussi, il serait judicieux de vérifier une éventuelle interaction entre RNF121 et les autres sous-unités formant le complexe SCF.

En plus de son implication dans l'ubiquitination d'IkBa, le complexe SCF^{βTrCP} intervient également dans la régulation d'autres protéines impliquées entre autre dans la transduction du signal et la régulation du cycle cellulaire. Dans la littérature, deux formes de βTrCP ont été décrites chez l'homme; une nucléaire, assurant l'ubiquitination de substrats nucléaires à l'exemple de la protéine Emi1, impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, et une autre forme cytosolique qui catalyse la formation de chaînes d'ubiquitine sur des substrats cytosoliques comme IkBa [315]. Toutefois, les expériences d'immunofluorescence que nous avons réalisé montrent qu'un pool significatif de βTrCP colocalise avec l'appareil de Golgi au niveau duquel se trouve RNF121.

Le complexe SCF est un élément crucial lors de la transduction de nombreuses signalisations clés, et tout dérèglement peut avoir des conséquences désastreuses sur l'organisme. Ainsi, la régulation de ce complexe constitue un point essentiel pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. A ce propos, plusieurs paradigmes ont vu le jour, notamment la régulation du complexe SCF par neddylation. Ce processus analogue à l'ubiquitination consiste, dans ce cas, en l'accrochage d'une protéine proche de l'ubiquitine (Ubiquitin like protein) appelée Nedd8 à la sous-unité « Cullin » de ce complexe [316]. Ceci a pour conséquence d'augmenter l'activité catalytique de ce complexe. Le complexe SCF est également régulé à d'autres niveaux et il ne serait pas surprenant que d'autres processus contrôlant son activité soient mis en évidence prochainement.

De plus, comme cité précédemment, l'équipe de Darom suggère que RNF121 serait impliqué dans l'ubiquitination dégradative de la β-intégrine PAT3 chez *C. elegans*. Or, Yoshida et ses collaborateurs ont montré auparavant que la dégradation des β-intégrines était assurée par le complexe SCF^{Fbs} (Fbs étant une protéine F-box reconnaissant les glycoprotéines) [317], ce qui laisse supposer que RNF121 coopère avec ce complexe lors du processus d'ubiquitination de la β-intégrine [312]. Cette étude, bien que réalisée dans un autre contexte cellulaire et en utilisant un modèle expérimental différent de celui que l'on a utilisé lors de nos travaux vient tout de même appuyer notre hypothèse quant à l'éventuelle coopération entre RNF121 et le complexe SCF lors du processus d'ubiquitination.

Toutes ces données portent à croire que l'action de RNF121 serait liée au complexe SCF^{βTrCP}. Toutefois, il demeure tout à fait envisageable que RNF121 effectue sa fonction indépendamment de ce complexe. Dans ce sens, RNF121 pourrait à titre d'exemple être impliquée dans l'ubiquitination dégradative d'une déubiquitinase, elle-même responsable de la libération d'IκBα des chaînes d'ubiquitine de type K48.

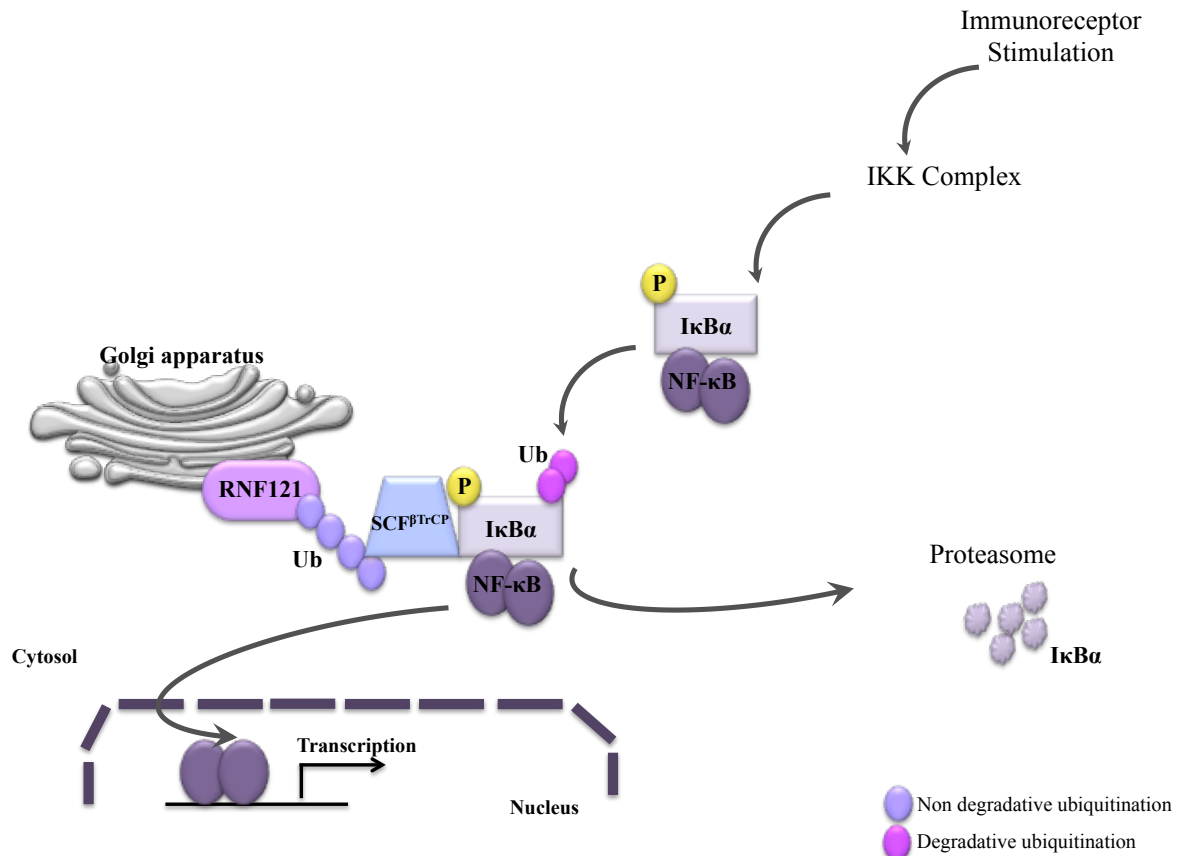


Figure 29. Modèle de l'éventuel mécanisme d'action de RNF121

➤ RNF121, NF-κB et immunorécepteurs:

Le fait que RNF121 agisse au niveau de la régulation d'IκBα sous-entend que son action n'est pas restreinte au seul TNFR, mais serait probablement étendue à toutes les signalisations aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF-κB. Afin de confirmer cette hypothèse, des expériences de bioluminescence et de biochimie ont été réalisées après stimulation de différents récepteurs de l'immunité innée et adaptative. La stimulation des

TLR-3 et -4, NOD-1 et -2 et RLRs par leurs ligands respectifs ainsi que l'induction d'un stress génotoxique par l'étoposide (VP16) dans des cellules déplétées en RNF121 montre une diminution de l'activation de NF- κ B par rapport aux cellules contrôles en bioluminescence. De même, la dégradation d'I κ B α a également été significativement retardée en absence de RNF121. De manière intéressante, l'extinction de RNF121 dans des cellules lymphocytaires T Jurkat n'a pas eu d'effet considérable sur l'activation du facteur de transcription NF- κ B après stimulation du TCR avec un mélange de PMA et Ionomycine ou en utilisant un anti CD3/CD28. Ceci peut être expliqué par une plus faible expression de RNF121 au niveau des cellules lymphocytaires (Figure 30). L'activation des récepteurs antigéniques doit probablement obéir à un système de régulation n'impliquant pas RNF121.

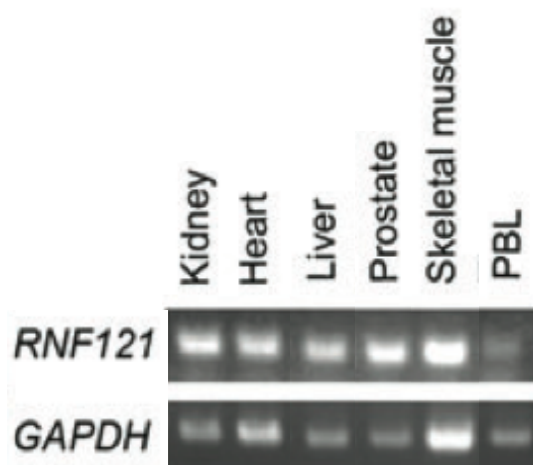


Figure 30. Niveau d'expression de RNF121 dans divers types cellulaires [311]

La stimulation des récepteurs précédemment cités conduit, en plus de l'activation de NF- κ B, à celle d'autres voies de signalisation. Afin d'évaluer l'impact de RNF121 sur ces différentes voies, leur profil d'activation a été observé en présence ou en absence de RNF121. Ainsi, l'activation du facteur de transcription AP-1 ne semble pas être affectée au niveau des cellules n'exprimant pas RNF121, comme l'atteste la phosphorylation des kinases ERK1/2 après stimulation du TNFR. Le même constat a été réalisé concernant l'activation du facteur de transcription IRF3. En effet, l'activité transcriptionnelle du promoteur des interférons de type I (IFN I) demeure inchangée après stimulation du TLR3 et cela en présence ou en absence de

RNF121. Ces résultats suggèrent la spécificité d'action de RNF121 à la voie NF- κ B et cela en aval de la stimulation de divers récepteurs de l'immunité innée.

➤ RNF121 et viabilité cellulaire:

Comme mentionné plus haut, Zhao et ses collaborateurs suggèrent un rôle de RNF121 dans la régulation de l'apoptose. En effet, les auteurs montrent que l'extinction de RNF121 par ARN interférence conduit les cellules vers un processus de mort apoptotique dépendant des caspases [311]. Toutefois, entre nos mains, nous n'avons détecté aucune forme de mort cellulaire au niveau de nos cellules non stimulées. Nos cellules présentaient une intégrité structurelle (image de microscopie confocale) et fonctionnelle (activation des différents facteurs de transcription) et cela même après 72 heures de transfection du siRNA. Par ailleurs, les cellules déplétées en RNF121 et exposées au TNF α , présentent une plus grande sensibilité à l'apoptose en présence de CHX. Ceci est expliqué par le défaut d'activation de NF- κ B dans ces cellules, et qui a tendance à les protéger de la mort induite par le TNF α *via* la régulation de la transcription des gènes anti-apoptotiques. Une exploration des raisons à l'origine de cette disparité mérite cependant d'être effectuée. Il est toutefois à signaler, que l'utilisation d'un seul siRNA dirigé contre RNF121 par Zhao et ses collaborateurs pourrait remettre en question la crédibilité du résultat (Figure 31). En effet, il est tout à fait envisageable que ce siRNA cible, en plus de RNF121, l'ARNm d'un autre gène important pour la survie cellulaire (off-target).

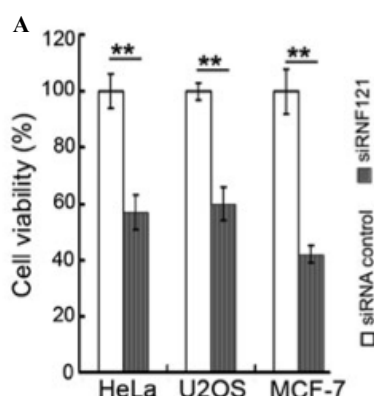


Figure 31. Viabilité cellulaire en présence ou en absence de RNF121, selon Zhao *et al* [311].

➤ Intérêt de la localisation golgienne de RNF121:

RNF121 a été décrit pour la première fois chez *c.elegans* comme localisé au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) [312]. Toutefois, entre nos mains, toutes les expériences d'immunofluorescence réalisées dans le but de confirmer ce résultat dans des cellules humaines ont été vaines. Le caractère punctiforme du marquage ainsi que sa localisation adjacente au noyau nous a laissé supposer que notre protéine d'intérêt se trouvait au niveau de l'appareil de Golgi. L'utilisation d'un anticorps permettant le marquage de cet organite a confirmé notre hypothèse et montré une parfaite colocalisation de l'appareil de Golgi avec RNF121, et cela que ce soit sous des conditions endogène ou de surexpression. Alors que nous étions en période de révisions pour notre étude sur RNF121, Zhao et ses collaborateurs ont publié leur travail sur le rôle de RNF121 dans la régulation de l'apoptose et la décrivent comme étant localisée au niveau de l'appareil de Golgi, confirmant ainsi nos résultats à ce propos.

L'absence de RNF121 dans des cellules HEK293 et HeLa induit une diminution de l'activation de NF- κ B. Afin de vérifier si l'effet constaté n'est pas du à une désorganisation au niveau de l'appareil de Golgi suite à l'extinction de RNF121, nous avons observé l'organisation structurale de cet organite par immunofluorescence et cela en présence ou en absence de la protéine d'intérêt. Des cellules traitées à la Bréfeldine A, drogue causant la désorganisation et la fragmentation de l'appareil de Golgi en inhibant le transport des protéines du RE au Golgi, nous ont servi de contrôle. Les images obtenues après microscopie confocale montrent que l'aspect de cet organite reste intact au niveau des cellules déplétées en RNF121, contrairement aux cellules ayant subi un traitement à la bréfeldine A et qui présentent un organite à l'aspect diffus et granuleux. Ceci nous permet de relever que l'impact de RNF121 sur l'activation de NF- κ B n'est pas du à un «effet secondaire» découlant de son extinction par ARN interférence mais bien à son activité. Par ailleurs, il serait intéressant de vérifier si la localisation golgienne de RNF121 est nécessaire à son activité. Ceci serait difficilement réalisable en raison des nombreux domaines transmembranaires qui assurent l'ancrage de RNF121 à la membrane de cet organite et qui sont au nombre de six.

Nos résultats suggèrent que RNF121 agit au niveau de la régulation d'I κ B α . La localisation de RNF121 au niveau de l'appareil de Golgi, limitrophe du noyau, pourrait constituer un atout pour la signalisation. En effet, la dégradation d'I κ B α suite à son ubiquitination libère les sous-unités NF- κ B qui pourront transloquer directement dans le noyau. La réalisation d'un tel

processus loin du noyau, augmenterait les chances de rencontre des sous-unités NF- κ B fraîchement libérées avec leur inhibiteur I κ B α néosynthétisé, ce qui retarderait la signalisation.

Nos résultats ont donc permis de mettre en évidence l'implication de l'E3 ubiquitine ligase RNF121 au cours de l'activation de NF- κ B et cela en aval de la stimulation de différents récepteurs de l'immunité innée. Nous supposons que RNF121 agit au niveau de la régulation, du recrutement ou de l'activation du complexe SCF ^{β TrCP} et cela d'une manière dépendante de l'ubiquitination. Nos résultats décrivent également un nouveau rôle de l'appareil de Golgi dans la transduction de la signalisation.

II. L'hyperfusion mitochondriale induit à l'activation de NF- κ B via l'E3 ligase MULAN

Afin de maintenir leur homéostasie, les cellules sont équipées de systèmes spécifiques qui leur permettent de déclencher des réponses appropriées aux différents stress qu'elles subissent. En plus de leur rôle comme principal fournisseur d'énergie aux cellules, les mitochondries sont également impliquées dans la réponse à différents stress cellulaires tels que les voies de mort ainsi que l'immunité antivirale.

Les mitochondries sont des organites dynamiques, leur morphologie résulte de l'équilibre entre deux processus opposés que sont la fusion et la fission. Ce caractère dynamique est nécessaire au maintien de la forme, de la taille, du nombre ainsi que des fonctions physiologiques de cet organite [305]. Bien que l'observation de ce phénomène remonte à plus d'un siècle, ce n'est qu'au cours des années 1990, que les principaux acteurs impliqués ont été caractérisés. Parmi ces protéines, se trouvent essentiellement OPA1 et Mfn1/2 qui sont impliquées au cours de la fusion des mitochondries alors que Drp1 assure le processus de fission [295, 318].

Dès lors, une question s'imposait. Ces perpétuels mouvements mitochondriaux, servent-ils uniquement au contrôle de la morphologie et de la distribution des mitochondries, ou jouent-ils un rôle bien plus important dans la cellule? Les nombreux travaux dédiés à la compréhension du rôle physiologique de ces processus ont apporté les preuves quant à l'importance de ces mécanismes, à l'instar de la létalité engendrée par l'absence de Drp1 dans des embryons précoces chez *C. elegans* et la souris [319], ou alors le ralentissement de la croissance cellulaire ainsi que la diminution de l'activité des complexes respiratoires au niveau des cellules déficientes en OPA1 ou Mfn1/2 [307].

➤ Dynamique mitochondriale et réponse au stress :

De plus en plus d'évidence dans la littérature indique que la plasticité de la morphologie mitochondriale fournit à cet organite la capacité à répondre aux différentes conditions environnementales [320]. En règle générale, lorsque les cellules sont sujettes à une variété de stress intenses, elles tendent vers un processus apoptotique. Durant l'apoptose, les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, Bax et Bak conduisent à la perméabilisation de la

membrane mitochondriale externe permettant ainsi le relargage du cytochrome *c*, habituellement séquestré au niveau de l'espace intermembranaire, dans le cytosol. La libération de ce facteur apoptogène est un événement clé, car il permet l'activation des caspases. Il a toutefois été rapporté que la fragmentation des mitochondries est également un prérequis nécessaire pour le bon déroulement du processus apoptotique. En effet, certains travaux évoquent que l'inhibition de l'expression de Drp1 et par conséquent de la fission mitochondriale, inhibe la libération du cytochrome *c* ce qui peut ainsi retarder ou réduire l'étendue de la mort cellulaire [307, 321], ce constat reste toutefois très controversé [322].

En revanche, l'exposition des cellules à des stress modérés tels que ceux induisant l'arrêt de la synthèse protéique ou lors des radiations UV, les rend moins susceptibles à l'apoptose. Dans de tels contextes, les mitochondries présentent un profil allongé et forment un réseau hyperconnecté. Cet événement est appelé SIMH (Stress-Induced Mitochondrial Hyperfusion) [323].

Bien que l'on pourrait croire que la SIMH n'est autre qu'un accroissement de l'activité de la machinerie de fusion conventionnelle, certaines différences sont toutefois à relever entre ces deux processus. Il s'agit d'une part du recrutement des Mfns, en effet, si la fusion conventionnelle requiert la présence des Mfn1 et 2, seule la Mfn1 est nécessaire lors de la SIMH. L'autre différence majeure concerne la protéine de fusion OPA1. En absence de stress, certaines isoformes d'OPA1 sont clivées par la protéase YME1L, aboutissant ainsi à la génération d'une forme courte (S-OPA1), les isoformes n'ayant pas été clivées par YME1L sont dites longue (L-OPA1) [324]. Les deux formes d'OPA1 sont essentielles lors du processus de fusion conventionnelle, toutefois, seule la forme longue (L-OPA1) est requise lors de la SIMH. Enfin, contrairement à la fusion conventionnelle, la SIMH nécessite la présence de la protéine SLP-2 (Stromatin-Like Protein 2) afin de prévenir la dégradation de L-OPA1 sous certaines conditions de stress [323, 325].

Bien que les mécanismes par lesquels ces signaux de stress induisent la SIMH ne sont pas encore connus, il est clairement établi que ce processus prévient l'apoptose et oriente la cellule vers la survie [323, 325]. Dans ce sens, nos travaux viennent confirmer les données de la littérature quant à la relation entre SIMH et survie. En effet, nos résultats suggèrent que la SIMH survenue suite à l'expression de dominants négatifs des protéines de fission, ou alors en conséquence de certains stress modérés, stimule les voies anti-apoptotiques *via* l'activation du facteur de transcription NF- κ B responsable de l'activation de la transcription d'une armada

de gènes anti-apoptotiques tels que ceux codant les protéines Bcl-X_L, XIAP et FLIP. Aussi, nos résultats suggèrent que NF- κ B est activé *via* la voie canonique impliquant les complexes kinases TAB/TAK et IKK, et ont également permis de mettre en évidence le rôle de l'E3 ubiquitine ligase mitochondriale MULAN dans l'activation de ce facteur de transcription en réponse aux stress modérés.

➤ L'E3 ubiquitine ligase MULAN

MULAN (Mitochondrial ubiquitin ligase activating NF- κ B) également appelée MUL1, C1orf166, GIDE, MAPL ou alors RNF218, est codée par un gène situé sur le chromosome 1. L'épissage du pré-ARNm aboutit à l'obtention d'un ARNm mature de 8733bp traduit en une protéine de 352 acides aminés. Cette protéine d'environ 40kDa possède deux domaines transmembranaires permettant son ancrage à la membrane de la mitochondrie ainsi qu'un domaine RING de type C3HC4 (Figure 32). La surexpression de MULAN dans des cellules HEK293 induit à son auto-ubiquitination suggérant que son domaine RING est fonctionnel et lui confère ainsi une activité E3 ubiquitine ligase. De plus, MULAN est très conservée par l'évolution avec des orthologues identifiés dans différentes espèces allant de la drosophile aux vertébrés. Cette conservation suggère ainsi un rôle crucial de cette protéine dans l'organisme.

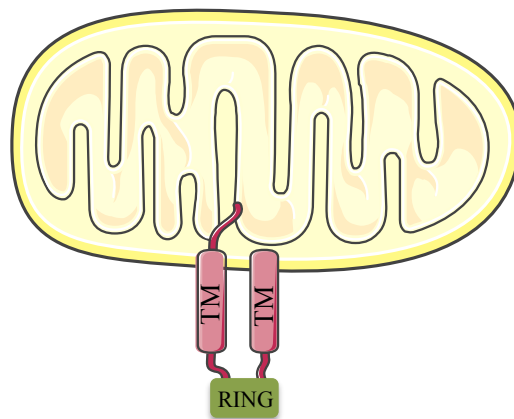


Figure 32. Représentation schématique de la protéine MULAN. Elle contient deux domaines transmembranaires (TM) assurant son ancrage à la membrane mitochondriale externe, et un domaine RING orienté vers le côté cytosolique afin d'avoir accès aux autres composants de la machinerie d'ubiquitination.

MULAN a été caractérisée pour la première fois en 2003, lorsque Akio Matsuda et ses collaborateurs ont effectué un crible à grande échelle d'une banque d'environ 150000 ADNc, visant à identifier les gènes humains impliqués dans la régulation des voies NF- κ B et MAPK. Ainsi, la surexpression de MULAN, alors inconnue, a induit une potentialisation de l'activation de NF- κ B faisant de lui un régulateur positif de cette voie [326]. Depuis, plusieurs laboratoires se sont intéressés à cette protéine, à qui ils ont attribué une multitude de fonctions dans la cellule.

Nos résultats suggèrent que MULAN est essentielle à l'activation de NF- κ B suite à la SIMH. En effet, il a été clairement montré que l'extinction de cette E3 ligase abolit l'activation de NF- κ B suite à l'exposition à des stress modérés. Toutefois, sous d'autres conditions, MULAN est largement décrite comme étant impliquée dans des processus complètement opposés à ceux évoqués dans nos travaux, mettant ainsi en évidence la plasticité fonctionnelle de cette E3 ligase selon les conditions dans lesquelles se trouve la cellule.

La relation entre MULAN et la dynamique mitochondriale a été évoquée pour la première fois en 2008 dans le cadre du crible d'une banque d'ADNc d'E3 ligases réalisé par Wei Li et ses collaborateurs en vue d'identifier de nouveaux régulateurs de la dynamique mitochondriale [327]. Ainsi, d'après les résultats de cette étude, les cellules HeLa surexprimant MULAN présentent des mitochondries fragmentées, indiquant que MULAN jouerait un rôle dans la régulation positive du processus de fission mitochondriale. Dans ce même travail, les auteurs décrivent un état de fusion des mitochondries dans des cellules déplétées en MULAN, toutefois, entre mains, l'extinction de cet E3 ligase par ARN interférence n'induit pas de changements significatifs au niveau de la morphologie des mitochondries. Comme cité précédemment, la fission des mitochondries est un prérequis nécessaire au bon déroulement de l'apoptose. La même année, les travaux de Wei Li et ses collaborateurs ont été appuyés par l'étude de B. Zhang et ses associés qui décrit MULAN comme induisant le processus apoptotique et cela *via* l'activation de la voie JNK [328]. MULAN semble également jouer en faveur de l'apoptose via la régulation négative d'Akt [329]. Akt est une kinase impliquée dans les voies de survie en réponse à certains stimuli cellulaire comme les facteurs de croissance et l'insuline. Dans ce contexte, MULAN induirait la dégradation ubiquitine-dépendante de cette kinase ce qui a pour conséquence l'augmentation de l'activité pro-apoptotique via notamment, GSK-3 β et TSC2 [329].

Nous suggérons que la SIMH conduit à l'activation de NF- κ B via l'E3 ligase MULAN. La liaison entre dynamique mitochondriale, NF- κ B et ubiquitination a auparavant été évoquée par Müller-Rischart et ses collaborateurs, qui ont décrit l'activité neuroprotective de l'E3 ligase Parkin suite à différents stress, comme étant liée à l'activation de NF- κ B. En effet, selon ces auteurs, sous certaines conditions de stress, Parkin est recruté au niveau du complexe d'E3 ligase « LUBAC » et participe à l'ubiquitination linéaire de la sous-unité régulatrice du complexe IKK « NEMO » potentialisant ainsi l'activation de NF- κ B. Cette activation est accompagnée par une augmentation de l'expression de la protéine OPA1 qui serait ainsi éventuellement codée par un gène cible de NF- κ B. OPA1 favorise la fusion des mitochondries et les protège ainsi de l'apoptose [330]. Les auteurs proposent donc un modèle dans lequel le facteur de transcription NF- κ B orienterait les mitochondries vers un profil de fusion, contrairement à nos résultats qui suggèrent plutôt que l'activation de NF- κ B soit une conséquence, et non pas une cause, de l'hyperfusion mitochondriale.

La cellule peut également répondre aux stress par l'autophagie. L'autophagie est une voie catabolique induisant la dégradation lysosomale des composants cytosoliques incluant les organites. Ce processus assure le recyclage des molécules endommagées et non fonctionnelles et est considéré comme un mécanisme cytoprotecteur en réponse à un large éventail de conditions de stress telles que la carence en nutriments, l'hypoxie ainsi que la présence de xénobiotiques toxiques. L'autophagie est impliquée dans divers processus physiologiques mais aussi pathologiques tels que le vieillissements, les maladies dégénératives et les cancers [331]. La relation entre les mitochondries et l'autophagie peut prendre deux formes : d'une part, les mitochondries peuvent être la cible de ce processus et être ainsi dégradées, on parle dans ce cas de « mitophagie ». D'autre part, les mitochondries peuvent être épargnées par la machinerie d'autophagie afin d'assurer l'apport énergétique nécessaire à la cellule lors de la réponse au stress [331, 332]. Dans ce sens, l'équipe de Luca Scorrano a montré que durant l'autophagie, les mitochondries s'allongent, échappent à la dégradation et maintiennent la survie cellulaire [278]. L'aspect allongé observé chez ces mitochondries rappelle celui de l'hyperfusion survenue lors de l'arrêt de synthèse protéique suggérant alors une éventuelle activation de MULAN lors de l'autophagie. Ceci est d'autant plus possible qu'un lien a été auparavant fait entre autophagie et NF- κ B *via* notamment l'activation du complexe IKK [333]. L'implication de MULAN dans ce processus mérite d'être explorée.

La transduction de la signalisation lors de l'activation de NF- κ B requiert entre autre,

l'ubiquitination non dégradative de certains transmetteurs que l'on a décidé d'appeler TUCAN (Transmetteurs ubiquitinylés conduisant à l'activation de NF- κ B). Il s'agit à titre d'exemple de RIP1 dans la signalisation du TNFR et du TLR3, Bcl-10 dans la signalisation du TCR et TRAF2 dans celle du CD40. Les chaînes d'ubiquitine catalysées sur ces TUCAN permettent par la suite le recrutement des complexes kinases dont l'activation aboutit à la dégradation de l'inhibiteur de NF- κ B « I κ B α » et par conséquent la libération des sous-unités NF- κ B [334]. Dans le cas de la signalisation de NF- κ B induite par la SIMH, nos résultats suggèrent que, comme pour la signalisation du CD40, le TUCAN mis en jeu serait TRAF2 dont l'ubiquitination serait catalysée par MULAN (Figure 33).

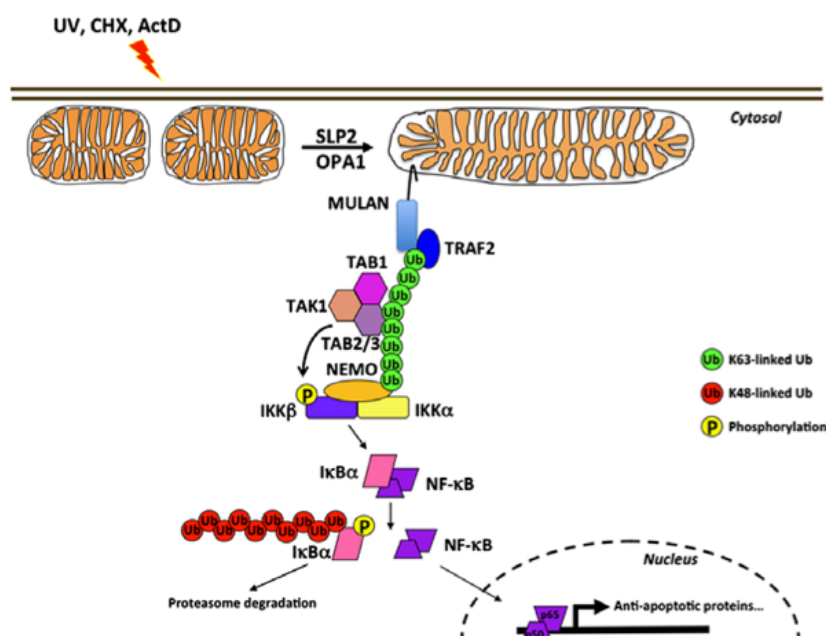


Figure 33. Modèle indiquant l'éventuel mécanisme d'action de MULAN en réponse à la SIMH.

A partir de nos résultats, nous proposons le modèle suivant; suite à un stress modéré induisant l'arrêt de la synthèse protéique (UV, CHX, ActD, etc.), le processus de SIMH se met en place. Cette hyperfusion implique l'intervention des deux protéines mitochondriales OPA1 et SLP-2 et aboutit à l'activation de l'E3 ubiquitine ligase MULAN, par un mécanisme encore mal connu. MULAN catalyse la polyubiquitination non dégradative de TRAF2, qu'on suppose être le TUCAN (Transmetteur Ubiquitinylé Conduisant à l'Activation de NF- κ B) lors de l'activation de cette voie. Les chaînes d'ubiquitine ainsi formées vont servir au recrutement des complexes kinases TAK1/TAB et IKK dont l'activation permet la libération des dimères NF- κ B de leur inhibiteur I κ B α . Ainsi, les sous-unités NF- κ B transloquent dans le noyau où elles initient la transcription des gènes cibles.

Il a été rapporté que le domaine RING de MULAN était similaire à celui des cIAPs ce qui pourrait engendrer une similarité fonctionnelle entre ces E3 ligases [328]. En plus de catalyser

l'ubiquitination de RIP1 en aval de la stimulation du TNFR, l'implication des cIAP-1 et -2 dans l'ubiquitination de TRAF2 a également été évoquée [335]. Ceci permet d'appuyer nos résultats quant à l'implication de MULAN dans l'ubiquitination de TRAF2.

De nombreux travaux évoquent le rôle de MULAN dans l'ubiquitination dégradative de ses cibles à l'instar d'Akt et Mfn2 [329, 336]. Il a également été rapporté que MULAN était impliqué dans la stabilisation de la protéine Drp1 *via* la SUMOylation, ce processus consiste en l'attachement d'une molécule SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) sur une protéine cible suivant un mécanisme proche de celui de l'ubiquitination [336]. Ainsi, nos travaux mettent en évidence pour la première fois la capacité de MULAN à catalyser des chaînes d'ubiquitine non dégradatives.

En véritable sentinelle, la mitochondrie surveille en permanence les conditions de la cellule afin d'y adapter finement son activité métabolique, y accorder les réponses adaptatives au stress et décider par la suite de son sort. A la lumière de ce travail, nous avons démontré comment les mitochondries transforment un signal de stress en un signal de survie. La recherche et la caractérisation d'éventuels « récepteurs », qui permettraient aux mitochondries d'exercer leur rôle de senseurs de signaux de stress, mériteraient d'être explorées. Nos résultats montrent que les mitochondries, bien que souvent associées au processus apoptotique, peuvent également induire un signal de survie.

III. Vue d'ensemble sur l'implication des organites dans l'activation de NF- κ B

Mon travail de thèse a permis de mettre en lumière l'implication de deux organites, *via* des protéines transmembranaires, et dépendamment du processus d'ubiquitination, dans l'activation du facteur de transcription NF- κ B.

L'implication des différents organites dans l'activation de NF- κ B n'est plus à démontrer, vu le nombre de travaux traitant cette question. A titre d'exemple, une simple recherche sur PubMed utilisant les mots clé : « NF- κ B + Endoplasmic Reticulum ou NF- κ B + Mitochondria ou NF- κ B + Golgi apparatus » aboutit au total à plus de 1700 publications.

De tous les organites, le rôle de la **mitochondrie** semble être le plus étudié et le mieux caractérisé. L'importance de la mitochondrie dans l'activation de NF- κ B est principalement liée à son implication dans l'immunité innée anti-virale. Dans ce contexte, la protéine mitochondriale MAVS agit comme adaptateur entre les senseurs d'ARNs double brins cytosoliques RIG-I et MDA5, et les protéines effectrices appartenant à la famille des TRAFs nécessaires à l'activation de NF- κ B et IRF3 aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires et interférons de type I (IFN I) respectivement, afin de lutter efficacement contre l'infection.

L'activité de MAVS est tributaire de sa localisation au niveau de la mitochondrie, de plus, il a été montré qu'après stimulation, MAVS effectue un mouvement latéral et se place dans un micro-domaine mitochondrial résistant aux détergents, ce qui pourrait potentialiser la transduction du signal [269]. De plus, il a été rapporté que l'activité antivirale induite par MAVS est régulée positivement par les protéines mitochondriales Mfn1 et TOM70, tandis que cette activité est inhibée par Mfn2. Ceci, explique en partie, l'intérêt de la mitochondrie comme plateforme servant à la propagation de la signalisation dépendante de MAVS [337, 338].

Les données concernant la relation mitochondrie-NF- κ B viennent d'être étoffées grâce à nos travaux, qui suggèrent que dans certaines conditions de stress modérés, les mitochondries, de par leur dynamique, orientent les cellules vers un signal de survie *via* l'activation de NF- κ B.

Le réticulum endoplasmique semble également servir lors de l'activation de NF- κ B. D'abord, dans le contexte de l'immunité innée, la protéine réticulaire STING a été évoquée comme activant le facteur de transcription NF- κ B. STING joue un rôle crucial dans la production des IFN de type I via l'activation du facteur de transcription IRF3 et 7 et cela suite à la reconnaissance de l'ADN double brin des pathogènes par les senseurs cytosoliques (IFI16, cGAMP synthase et DDX41) [339]. Bien que plusieurs questions restent en suspens concernant le mécanisme d'action exacte de STING, on suppose qu'il agit comme adaptateur moléculaire favorisant l'interaction entre TBK1 et ses cibles IRF3/7 optimisant ainsi leur activation et par conséquent la production des IFN-I. Certains travaux évoquent le rôle de STING dans l'activation de NF- κ B sous ces mêmes stimuli, toutefois son mécanisme d'action reste pour le moment méconnu [340].

En plus des travaux présentés précédemment dans ce manuscrit, l'intérêt que nous portons au sein de notre laboratoire à l'évaluation du rôle des organites lors de l'activation de NF- κ B a permis de mettre en lumière le rôle crucial que joue le réticulum endoplasmique dans la transduction du signal aboutissant à l'activation de ce facteur de transcription.

Suite à la stimulation des différents immuno-récepteurs, différentes protéines adaptatrices, régulatrices et effectrices sont recrutées et forment ce qu'on appelle un « signalosome » au niveau du récepteur engagé. Bien que l'importance de ce signalosome soit évidente lors de la transduction du signal, le mécanisme par lequel il permet l'activation de NF- κ B demeure méconnu. A ce titre, un modèle stipule que le signalosome, une fois recruté et assemblé au niveau du récepteur, subit une maturation suivie d'une libération dans le cytosol où il a accès aux complexes IKK et I κ B/NF- κ B. Nos travaux introduisent le réticulum endoplasmique (RE) comme plateforme de recrutement de certains composants ubiquitinylés que l'on a décidé d'appeler TUCANs (Transmetteurs Ubiquitinylés Conduisant à l'Activation de NF- κ B) lors de la signalisation aboutissant à l'activation de NF- κ B. En effet, la réalisation de fractionnements subcellulaires visant à séparer les fractions membranaire et cytosolique a montré une accumulation des formes ubiquitinylées de RIP1, TRAF2 et Bcl-10 au niveau des membranes lourdes et cela après stimulation du TNFR, CD40 et TCR respectivement. La mutation des résidus lysines impliqués dans l'ubiquitination non dégradative de Bcl-10 abolit cette accumulation, suggérant ainsi que l'ubiquitination est un prérequis nécessaire à l'accumulation des TUCANs au niveau des membranes lourdes. La réalisation de fractionnements plus affinés nous a permis d'identifier avec précision que l'organite mis en

jeu est le réticulum endoplasmique. Nous avons par la suite identifié par spectrométrie de masse, la protéine réticulaire Métadhérine (MTDH), qui servirait de point d'ancrage ubiquitine-dépendant des TUCANs au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Des travaux supplémentaires sont nécessaires afin de caractériser le mécanisme d'action de la MTDH.

Quel serait le bénéfice d'un tel relais membranaire? Pourquoi la signalisation adopte-t-elle ce détour avec tout ce que cela implique en dépense temporelle et énergétique pour la cellule? Beaucoup de questions entourant cette découverte méritent d'être explorées.

L'intérêt du réticulum endoplasmique dans la signalisation a déjà été relevé. Ainsi, il a été rapporté que la proximité de cet organite aux divers autres compartiments cellulaires favorise la formation de jonctions propices à la transduction intracellulaire du signal, comme c'est le cas lors de la régulation du flux calcique chez les lymphocytes T, et qui nécessite un contact entre la protéine réticulaire STIM1 et la protéine Orai1 située au niveau de la membrane plasmique [341].

Dans le cas de la signalisation NF- κ B, nous supposons d'une part, que l'accumulation des TUCANs au niveau de cet organite permettrait la concentration du signal et potentialiserait donc son intensité et sa propagation. D'autre part, ce relais pourrait constituer un niveau supplémentaire de régulation. En effet, parmi la cinquantaine d'E3 ligases possédant un domaine transmembranaire, certaines seraient probablement impliquées dans la régulation de ce facteur de transcription. Qui plus est, l'existence de DUBs à domaines transmembranaires, susceptibles de contrôler cette activation, n'est également pas à écarter [334].

Des trois organites évoqués dans ce travail, **l'appareil de Golgi** est celui dont le rôle a été le moins évoqué dans l'activation de NF- κ B. En plus de son rôle dans les processus d'exocytose, de transport vésiculaire et de glycosylation, de plus en plus d'évidences suggèrent que l'appareil de Golgi est l'un des compartiments subcellulaires clés lors de la transduction du signal. A ce titre, les petites GTPases Rho, Rac et Cdc42, considérées comme des régulateurs essentiels lors de la migration cellulaire et de la réorganisation du cytosquelette, sont situées au niveau de l'appareil de Golgi [342]. Aussi, certains travaux ont relevé le rôle de l'appareil de Golgi dans la signalisation aboutissant à l'activation de la voie des MAPK « ERK1/2 ». Ces kinases sont activées suite à divers stimuli impliqués dans une pléthore de processus

cellulaires notamment la prolifération, la différenciation ainsi que la migration cellulaire. L'activation des ERK1/2 nécessitent l'activation en amont des GTPases RAS, que certains travaux décrivent comme étant localisées, entre autre, au niveau de l'appareil de Golgi [343]. L'implication de l'appareil de Golgi au cours de l'activation de cette voie ne se résume pas uniquement à cela, en effet, il a été montré que la protéine golgienne RKTG (RAF Kinase Trapping to Golgi) inhibe l'activation des ERKs en séquestrant la kinase RAF responsable de la phosphorylation et par conséquent l'activation des ERKs [344].

De plus, des travaux en cours dans notre laboratoire suggèrent un rôle critique de l'appareil de Golgi au cours de l'activation de l'immunité innée antivirale. En effet, nous avons remarqué que suite à l'activation du TLR3 ou des RLRs, la forme active, c'est à dire phosphorylée et ubiquitinylée, de la kinase TBK1 se retrouve au niveau d'une fraction enrichie en appareil de Golgi. Ce résultat a également été confirmé par immunofluorescence grâce à laquelle nous avons démontré une relocalisation de TBK1 au niveau de cet organe après stimulation. Des expériences sont en cours afin de déterminer avec précision le mécanisme moléculaire régissant ce recrutement. A son terme, ce projet devrait démontrer l'implication de l'appareil de Golgi comme relais membranaire au cours de l'activation de l'immunité innée antivirale.

Peu de choses sont connues quant au rôle que joue l'appareil de Golgi dans la transduction du signal lors de l'activation de NF- κ B, si ce n'est les travaux portant sur l'étude des fonctions d'une protéine appelée Optineurine (Optn). Cette protéine également appelée NRP (NEMO-Related Protein) en raison de sa forte homologie avec la sous-unité régulatrice du complexe IKK « NEMO » est localisée en partie au niveau de l'appareil de Golgi [345]. Zhu et ses collaborateurs proposent qu'en aval de la stimulation du TNFR, Optn inhibe l'activation de NF- κ B en rentrant en compétition avec NEMO pour la liaison aux chaînes d'ubiquitine de type K63 catalysées sur RIP1 [206]. De même, Optn régule négativement NF- κ B également *via* son interaction avec les DUBs. En effet, il a été rapporté que Optn sert d'adaptateur permettant la liaison de CYLD et A20 à leurs substrats ubiquitinylés afin d'inhiber l'activation de NF- κ B en aval de la stimulation du TNFR [346].

Nos résultats attribuent à l'appareil de Golgi une autre fonction dans la régulation du facteur de transcription NF- κ B *via* l'E3 ligase RNF121. Toutefois, certaines interrogations restent en suspens notamment celles relatives à la nécessité de l'appareil de Golgi pour la fonctionnalité de RNF121.

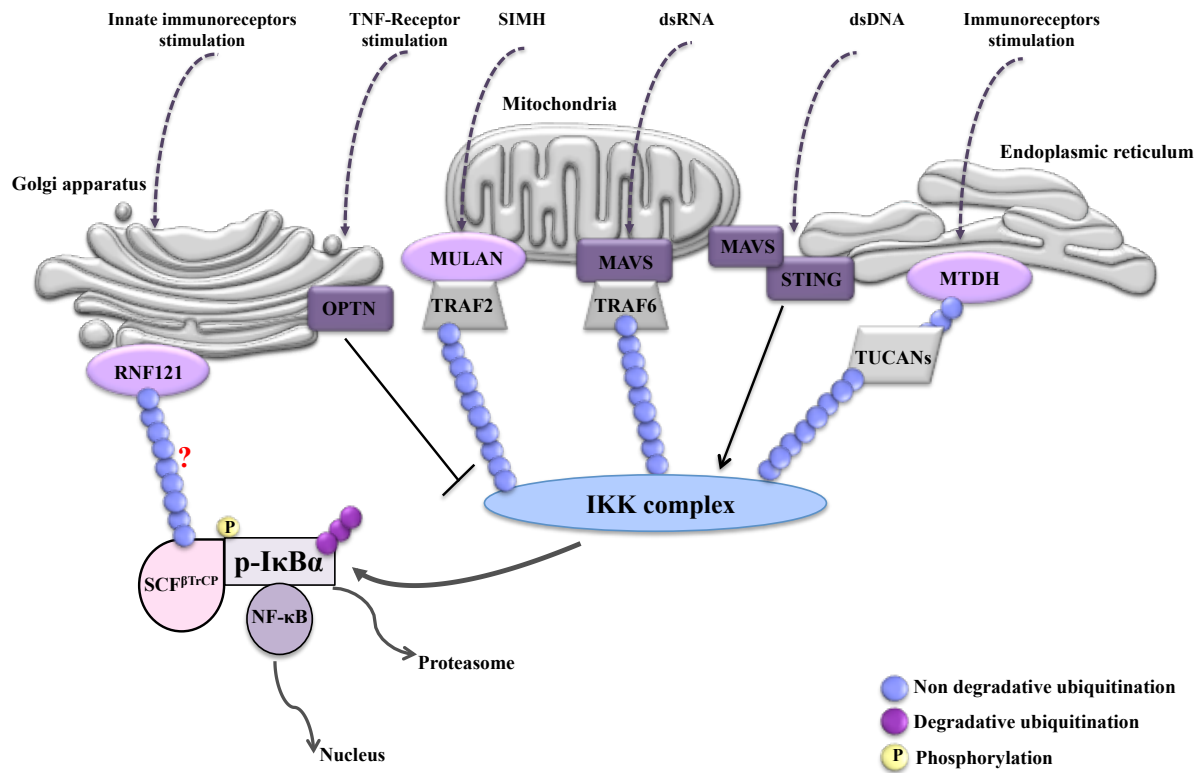


Figure 34. Schéma récapitulatif représentant l'implication de l'ubiquitination et des endomembranes dans la transduction de la signalisation au cours de l'activation de NF-κB

Conclusion

Pris dans leur ensemble, nos résultats apportent de nouvelles évidences quant à l'implication des organites dans la transduction de la signalisation, et illustrent également la complexité de la régulation du facteur de transcription NF- κ B notamment via le processus d'ubiquitination.

Nos travaux sur l'E3 ligase RNF121 ont permis de mieux caractériser cette protéine, jusqu'à maintenant très peu étudiée, et l'intègrent comme protagoniste important de la signalisation associée au facteur de transcription NF- κ B.

D'autre part, la relation que l'on a pu établir entre l'hyperfusion mitochondriale induite par certains stress modérés et le facteur de transcription NF- κ B met en lumière la capacité des cellules à transformer un signal de stress en un signal de survie via la dynamique mitochondriale.

Annexes

Annexe 1

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 ubiquitylation 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.)

RESEARCH ARTICLE

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

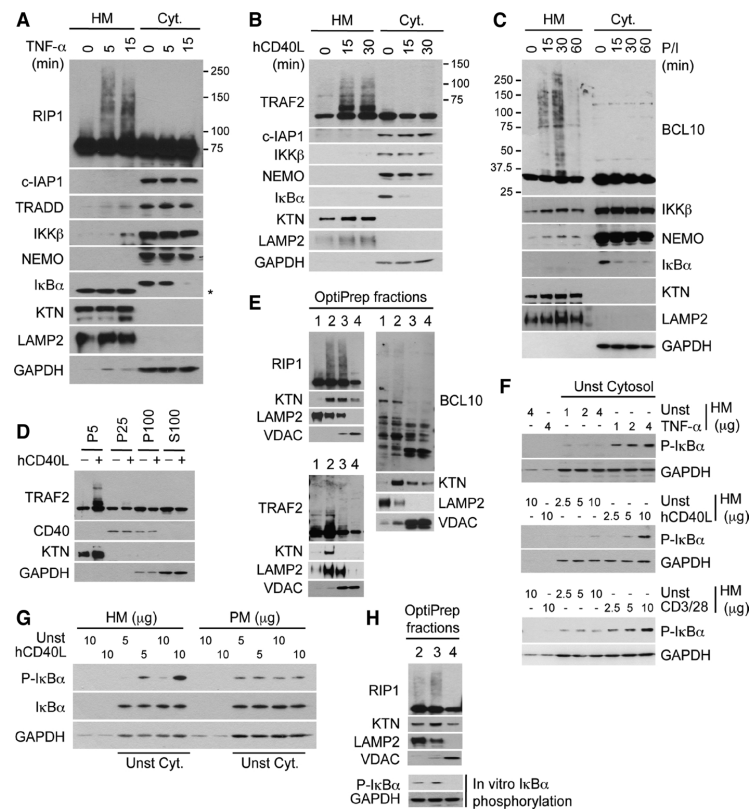


Fig. 1. Ubiquitylated NF- κ B signaling components accumulate at the ER. (A) Crude HM and cytosolic (Cyt.) fractions from unstimulated HEK 293T cells and HEK 293T cells stimulated with TNF- α (10 ng/ml) for the indicated times were analyzed by Western blotting with antibodies specific for the indicated 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.

RESEARCH ARTICLE

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 (RNFS) (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

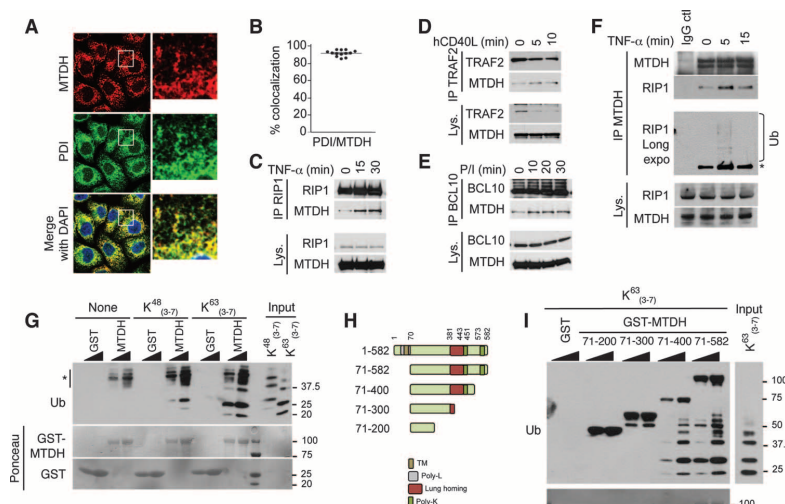


Fig. 2. MTDH colocalizes with ubiquitylated NF- κ B signaling components. (A) Confocal microscopic analysis of HeLa cells showing the localization of the ER-resident protein disulfide isomerase (PDI) and MTDH, with nuclei stained by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Regions highlighted by white squares are shown under higher magnification in panels to the right. Representative images from three independent experiments are shown. (B) Pearson's correlation coefficients were calculated to determine the extent of colocalization of PDI and MTDH in the images shown in (A). Data are from 13 cells representative of five fields of view. (C to F) Jurkat cells were stimulated with (C) TNF- α (10 ng/ml) or (E) PMA (20 ng/ml) and P/I (300 ng/ml); BL41 cells were treated with (D) CD40L (50 ng/ml); and (F) HeLa cells were treated with TNF- α (10 ng/ml) for the indicated times. Cell lysates (Lys.) were subjected to immunoprecipitation (IP) with antibodies against the indicated proteins, and samples were then analyzed by Western blotting with antibodies against the indicated proteins. Ub, ubiquitin. The asterisk indicates RIP1. For quantification of these data, see fig. S5, G to J. (G) Pull-down experiments with purified recombinant GST or GST-tagged MTDH (corresponding to amino acid residues 71 to 582) immobilized on glutathione resin and 500 ng of either K⁴⁸-linked or K⁶³-linked polyubiquitin chains from three to seven in number. Top: Samples were analyzed by Western blotting with an antibody against ubiquitin. The asterisk indicates nonspecific bands. Bottom: Ponceau staining for GST-tagged proteins. (H) Scheme showing full-length MTDH and the MTDH deletion mutants. (I) GST pull-down experiments were performed as described in (G), with GST-tagged deletion mutants of MTDH incubated with K⁶³-linked polyubiquitin chains. Note that anti-ubiquitin antibodies cross-reacted with recombinant MTDH. Western blotting data in (C) to (G) and (I) are representative of three or more independent experiments.

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- κ B 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- κ B, 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- κ B-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- κ B signaling (20), the transcription factor activation occurred independently of MTDH (Fig. 3K). Thus, MTDH appears to act as a broad regulator of NF- κ B signaling.

MTDH governs the accumulation of ubiquitylated NF- κ B signaling components in HM fractions

To evaluate the contribution of MTDH to ER-dependent NF- κ B 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 I κ B α phosphorylation in vitro (Fig. 4A). Furthermore, ubiquitylated 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 ubiquitylated 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 ubiquitylation 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 ubiquitylation, MTDH functions as a sensor of ubiquitylated NF- κ B signaling components.

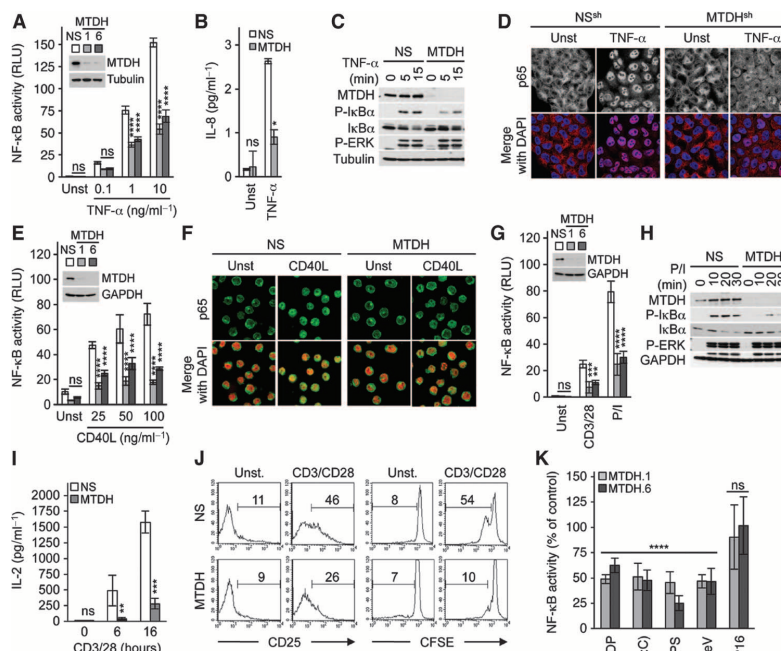
DISCUSSION

Here, we provide evidence that ubiquitylated NF- κ B 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- κ B-dependent invasiveness (13, 24, 25). Overexpression of MTDH in transfected cells activates multiple signaling pathways, including those mediated by NF- κ B, 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- κ B. 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 Ca^{2+} sensor stromal interaction molecule 1 (STIM1) and the PM CRAC channel component Orai1 govern Ca^{2+} signaling in T lymphocytes (29). It would be interesting to evaluate whether ubiquitylated 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 K^{63} -linked polyubiquitylated chains, and we favor a model in which it operates as a scaffold to collect ubiquitylated 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

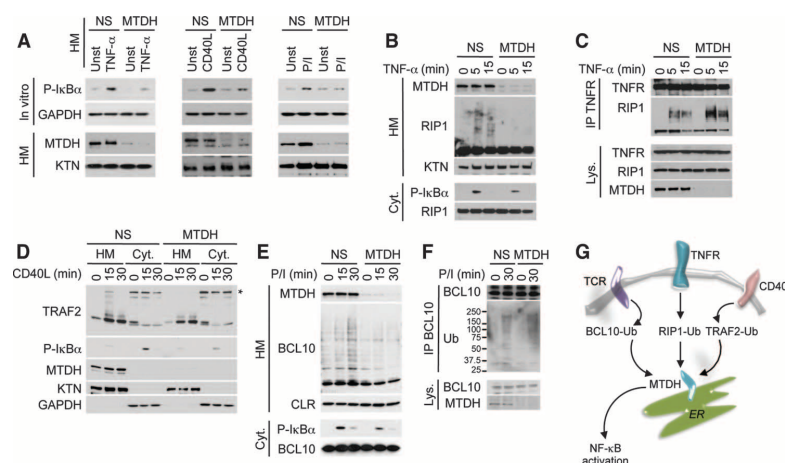


Fig. 4. MTDH enables the accumulation of ubiquitylated NF- κ B signaling components at the ER to mediate NF- κ B activation. (A) HEK 293T cells, BL41 B cells, and Jurkat cells were transfected with nonspecific siRNA (NS) or MTDH-specific siRNA (MTDH). Crude HM fractions from unstimulated or TNF- α , 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-GAGCUUCACUU; MTDH.6: GGAU-GUUGCCGUAUCAA; CARM1: UGUCCCGUUGGACACAUGACCAAAA; MALT1: GGAACAGAAUAUUCUG-CUGAAUCU; NEMO: GAGUCGUU-GGAGGCGGCCACUAAG; RIP1.1: CCACUAGUCUGACGGAUAA; RIP1.2: G C A A G A C C U U A C G A G A A U; TRAF2.1: GGACCAAGACAAGAUUGAA; TRAF2.2: CGAGGGCAUAUAUGAAGAA; ERN1.1: CCCUGCAAGAGUAUGUG-GAGCAGAA; ERN1.2: CCCUACCUA-CACGGUGGACAUCUUU; ERN1.3: GACCUGCGUAAAUUCAGGACCUAAU; AMFR.1: GUCAUGUGGUGCCUCUGGUt; AMFR.2: CAGACUUUGUCAUGGAGCUt; BFAR.1: CAUACCAGCUGAUUGCUGAt; BFAR.2: CUGUUUGACUACCCGACAt; RNF5.1: CUCACUCAGUAACGUUGUIt; RNF5.2: CUGCUCAGAGGCUACACUAt.

Control and MTDH-targeting pGIPZ-expressing shRNAs (Open Biosystems) were as follows: MTDH.NC: ACAAGAACGATCTTAATTT; 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

1. B. Skaug, X. Jiang, Z. J. Chen, The role of ubiquitin in NF- κ B regulatory pathways. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 769–796 (2009).
2. A. P. West, G. S. Shadel, S. Ghosh, Mitochondria in innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 389–402 (2011).
3. M. S. Hayden, S. Ghosh, Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* **132**, 344–362 (2008).
4. M. J. Bertrand, S. Milutinovic, K. M. Dickson, W. C. Ho, A. Boudreau, 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).
5. 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).
6. 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).
7. 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).
8. 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).
9. 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).
10. 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).
11. 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).
12. G. Hu, Y. Wei, Y. Kang, The multifaceted role of MTDH/AEG-1 in cancer progression. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5615–5620 (2009).
13. D. M. Brown, E. Ruoslahti, Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis. *Cancer Cell* **5**, 365–374 (2004).

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, Overexpression 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. Welleke, 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 ubiquitinated components of nuclear factor κ B signaling. *Sci. Signal.* **6**, ra79 (2013).

Annexe 2

Mitochondrial anti-viral immunity.

Zemirli N, Arnoult D.

The international journal of biochemistry & cell cell biology 44(2012) 1473-1476.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biocy



Organelles in focus

Mitochondrial anti-viral immunity

Naima Zemirli^{a,b}, Damien Arnoult^{a,b,*}

^a INSERM UMR.S 1014, Hôpital Paul Brousse, Bâtiment Lavoisier, 14 Avenue Paul Vaillant Couturier, 94807 Villejuif Cedex, France

^b Université Paris-Sud P11, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 February 2012

Received in revised form 23 May 2012

Accepted 24 May 2012

Available online 1 June 2012

Keywords:

Mitochondria

Anti-viral immunity

RIG-I like receptors

MAVS

Ubiquitin

ABSTRACT

In the cytosol, the sensing of RNA viruses by the RIG-I-like receptors (RLRs) triggers a complex signaling cascade where the mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) plays a crucial role in orchestrating the innate host response through the induction of antiviral and inflammatory responses. Hence, in addition to their known roles in the metabolic processes and the control of programmed cell death, mitochondria are now emerging as a fundamental hub for innate anti-viral immunity. This review summarizes the findings related to the MAVS adaptor and mitochondria in the innate immune response to RNA viruses.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Organelle facts

- Mitochondria are dynamic organelles, the morphology of which results from an equilibrium between two opposing processes, fusion and fission.
- In addition to supplying cellular energy, mitochondria are involved in a range of other processes such as cellular differentiation, cell death as well as the control of the cell cycle and growth.
- A direct link between mitochondria and innate anti-viral immunity was highlighted with the identification of MAVS – a crucial adaptor for RIG-I-like receptor signaling – as a mitochondria-anchored protein.
- Mitochondrial dynamics and $\Delta\Psi_m$ both regulate MAVS-mediated signaling.
- Mitochondria emerge as a fundamental hub for innate immune signaling.

1. Introduction

Elimination of infected cells through apoptosis is one of the most ancestral defense mechanisms against viral infections. Because of

their critical role in apoptosis (Tait and Green, 2010), mitochondria are therefore important actors in the anti-viral immunity. Recently, the involvement of mitochondria in antiviral immunity was strongly increased after the discovery of the RIG-I-like receptors (RLRs) that are RNA-sensing cytosolic receptors requiring the mitochondrial adaptor MAVS to initiate the production of type I interferons (IFN) and pro-inflammatory cytokines (Kawai and Akira, 2008). Like Toll-like receptors (TLRs), RLRs are a class of germline-encoded pattern-recognition receptors (PRRs) and they directly activate immune cells (Akira et al., 2006).

2. Cell physiology

Viral RNA that is synthesized in the cytoplasm of the cell or that is present in viral genomes already released into the cells is not accessible to TLR3, TLR7 or TLR8 because these TLRs, like other TLRs, are found almost exclusively in intracellular compartments such as endosomes (Akira and Takeda, 2004). However, RNA viruses can still be sensed in the cytosol through the RLRs. This family of cytosolic PRRs is composed of 3 molecules: Retinoic acid Inducible Gene-I (RIG-I), Melanoma Differentiation-Associated gene-5 (MDA-5) and Laboratory of Genetics and Physiology 2 (LGP2). RIG-I and MDA-5 are both prototypical PRRs whereas LGP2 is currently thought to function as a regulator of RIG-I and MDA5 signaling (Loo and Gale, 2011).

ssRNA was initially the known ligand for RIG-I and MDA-5 until 2 independent studies have demonstrated that the *in vitro* transcribed uncapped 5'-triphosphate end of RNA is the ligand for RIG-I (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006). In addition to 5'-triphosphate RNA, dsRNA is also known to be a ligand of RIG-I

* Corresponding author at: INSERM UMR.S 1014, Hôpital Paul Brousse, Bâtiment Lavoisier, 14 Avenue Paul Vaillant Couturier, 94807 Villejuif Cedex, France. Tel.: +33 01 45 59 60 38; fax: +33 01 45 59 53 43. E-mail address: damien.arnoult@inserm.fr (D. Arnoult).

and MDA-5 (Kato et al., 2006; Loo and Gale, 2011). Kato et al. have also elucidated the nature of the dsRNA that activates RIG-I vs MDA5 and they have reported that long poly(I:C) molecules (poly I:C are analogs of dsRNA) activate MDA-5 but not RIG-I. Nevertheless, shortening the length of dsRNA converts MDA5 ligand to a RIG-I ligand (Kato et al., 2008). RIG-I can also sense RNA polymers generated by the RNA polymerase III (pol III) from DNA templates, thus permitting RIG-I to indirectly detect dsDNA from intracellular pathogens (Chiu et al., 2009).

RIG-I and MDA-5 are both cytosolic helicases with ATPase activity and they contain a C-terminal regulatory domain required for the binding to viral RNA. Importantly, the N-termini of RIG-I and MDA-5, but not LGP2, contain 2 tandem CARD domains (Loo and Gale, 2011). The ATPase activity of both helicases as a result of binding to their ligands may be critical not only for translocation along dsRNA (Myong et al., 2009), but also for conformational changes that lead to the exposure of the CARDS masked by the C-terminal regulatory domain. In addition to the recognition of specific RNA motifs, conformational changes that relieve the repression induced by the C-terminal regulatory domain are also required to initiate the downstream signaling. Indeed, in uninfected cells, intramolecular interactions between the CARD and the C-terminal regulatory domain (Loo and Gale, 2011) maintain RIG-I in a closed, inactive conformation. After recognition of specific 5'-triphosphate panhandle RNA structures, the E3 ubiquitin ligases TRIM25 and RIPLET promote lysine 63-linked poly-ubiquitination of RIG-I (Gack et al., 2007; Oshiumi et al., 2010), next CARDS are released from the regulatory domain repression (Fig. 1). This conformational change is required for a putative interaction between the 2 CARD domains of RIG-I or MDA-5 with the CARD domain of mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS; also known as CARDIF, IPS-1 or VISA) (Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005; Seth et al., 2005; Xu et al., 2005), a protein inserted in the mitochondrial outer membrane through a transmembrane domain in its C-terminal region (Seth et al., 2005). Although this interaction results in the propagation of downstream signaling leading to either anti-viral or inflammatory responses, the mechanism by which MAVS plays a central role in regulating the complex events is the signal transduction remains poorly elucidated. Nevertheless, the failure of MAVS-deficient mice to mount a proper IFN response to poly(I:C) stimulation and their severely compromised immune defense against infections with RNA viruses are evidence for the essential role of MAVS in antiviral innate immunity (Kumar et al., 2006; Sun et al., 2006).

It was recently reported that MAVS forms functional prion-like aggregates after viral infection and that these aggregates are required for the production of type I IFN consequently to the activation of the transcription factor IRF3 in the cytoplasm (Hou et al., 2011). Moreover, RIG-I or MDA5 interaction with MAVS initiates the recruitment of an intricate interactome to transduce the signaling since, up to now, close to 30 interacting partners have been described to interact with MAVS (Belgnaoui et al., 2011). MAVS interacting proteins can therefore be classified into different categories but they either positively or negatively regulate various pathways and processes. So there are proteins involved in anti-viral (TRAF3, TRAF5, IKK α , NEMO, DDX3, WDR5, IRF3, IRF7, STING) or inflammatory responses (NLR α 5, NLRX1, TRAF2, TRAF5, TRAF6, TAK1, IKK α / β), but MAVS has also been reported to interact with mitochondrial proteins (Mfn1/2, Tom70, VDAC1) and proteins involved in cell death (TRADD, FADD, RIP1) or autophagy (Atg5-Atg12) as well as with kinases (IKK α , PLK1, c-Abl, c-Src) or E3 ubiquitin ligases (PCBP2/AIP4, RNF5 and RNF125) that promotes MAVS post-translational modifications (Belgnaoui et al., 2011).

Although the physiological importance of many of these protein interactions remains to be determined, several key proteins are involved in the canonical RLR pathway and it is supposed that after

its activation, MAVS forms a signaling platform where the recruitment of TNF-receptor-associated factor (TRAF) 3 results to the IFN antiviral response whereas the recruitment of TRAF6 leads to the inflammatory response (Akira et al., 2006).

Hence, following the MAVS/RIG-I or MAVS/MDA-5 association, MAVS was reported to associate with TRAF3, an E3 ubiquitin ligase assembling lysine 63-linked polyubiquitin chains, through its C-terminal TRAF domain (Saha et al., 2006). Importantly TRAF3 $^{-/-}$ cells show severely impaired production of type I IFNs in response to virus infection (Oganesyan et al., 2006). TRAF3 in complex with NF- κ B modulator (NEMO) (Zhao et al., 2007), TRAF family member associated NF- κ B activator (TANK) (Guo and Cheng, 2007) and NAK-associated protein 1 (NAP1) (Sasai et al., 2006) controls the activity of two "noncanonical" IKK-related kinases, designated TANK-binding kinase 1 (TBK1) and inducible I κ B kinase (IKK-i), which phosphorylate the transcription factors IRF-3 and IRF-7 (Fig. 1). Phosphorylation of IRF-3 and IRF-7 by these kinases induces the formation of homodimers and/or heterodimers, which translocate into the nucleus and bind to IFN-stimulated response elements (ISREs), thereby resulting in the expression of type I IFN genes and a set of IFN-inducible genes.

A recent interesting study has unveiled a key role of ubiquitin chains in IRF3 activation downstream of MAVS (Zeng et al., 2009). Indeed, the authors described that the ubiquitin-binding domains of NEMO are required for IRF3 activation by MAVS, with NEMO functioning as a sensor of Lysine 63 polyubiquitin chains to activate TBK1. In this model, an important question that remains to be resolved is the identity of the E3 ubiquitin ligase(s) that mediates IRF3 activation by MAVS. A candidate is TRAF3, because this E3 ubiquitin ligase has been shown to be important for type I IFN production by RLRs (Oganesyan et al., 2006; Saha et al., 2006), but in some conditions the loss of TRAF3 did not impair the activation of the IRF3, suggesting that other E3 ubiquitin ligases can compensate the loss of TRAF3 (Zeng et al., 2009).

In co-immunoprecipitation experiments, MAVS has also been reported to interact with TRAF6 (Seth et al., 2005; Xu et al., 2005), another E3 ubiquitin ligase assembling lysine 63-linked polyubiquitin chains on which a complex formed by Transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1) and TAK1-binding protein 2 and 3 (TAB2 and TAB3) leads to NF- κ B activation after the recruitment and activation of the IKK complex (Inoue et al., 2007) (Fig. 1). In addition, FAS-associated death domain-containing protein (FADD) was found in a complex with MAVS (Kawai et al., 2005) and a FADD/caspase-8-dependent pathway has been proposed to be required for the activation of NF- κ B downstream of MAVS (Takahashi et al., 2006) in particular since FADD $^{-/-}$ cells are defective in cytokine production (Balachandran et al., 2004). Furthermore, a recent study has revealed a role for TRADD in the RLR pathway (Michallet et al., 2008). Indeed, it was shown that TRADD, a crucial adaptor of tumor necrosis factor receptor (TNFR1), is recruited to MAVS and orchestrated a complex formation with TRAF3, TANK and with FADD and RIP1, leading to the activation of IRF3 and NF- κ B. Accordingly, TRADD $^{-/-}$ cells show a reduced production of type I IFNs in response to RNA viruses (Michallet et al., 2008). However, recent studies have indicated that the requirement for caspase-8 (and likely also FADD) in immune cell proliferation is defined by suppression of Receptor-Interacting Protein kinase 3 (RIP3), a kinase that triggers an alternative form of cell death called programmed necrosis, so that the involvement of caspase-8, FADD, TRADD and RIP1 in the MAVS-mediated signaling is therefore challenged (Oberst and Green, 2011). Finally while RIG-I-mediated activation of NF- κ B requires MAVS (Fig. 1) but also probably a complex of the adaptors CARD9 and Bcl-10 (Poeck et al., 2010), RIG-I also binds to the adaptor ASC to trigger caspase-1-dependent inflammatory activation by a mechanism independent of MAVS, CARD9 and the Nod-like receptor (NLR) protein NLRP3 suggesting that RIG-I is

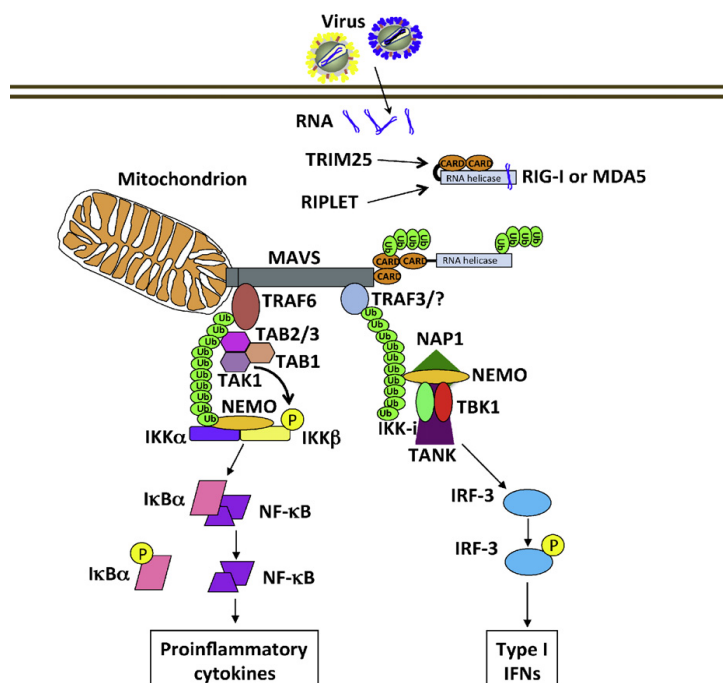


Fig. 1. Overview of the RIG-I-like receptor pathway and the involvement of ubiquitination. In the cytosol, viral RNAs are recognized by the helicases RIG-I or MDA-5. Then, the helicases undergo conformational changes and the E3 ubiquitin ligases TRIM25 and RIPLET promote their K63 ubiquitination. Next, the N-termini of RIG-I and MDA-5 contain 2 CARD domain that interact with the CARD domain of the mitochondrial adaptor MAVS. After the recruitment of the transactivator TRAF6 and its K63 polyubiquitination, the fixation of the TABs/TAK1 complex on the ubiquitin chains allows the activation of ubiquitin-associated IKK after the TAK1-mediated phosphorylation of IKK β . Activated IKK then phosphorylates I κ B α leading to its proteasomal-mediated degradation and the release of NF- κ B leading to the expression of pro-inflammatory cytokines. In parallel, the recruitment of TRAF3 or an unidentified E3 ubiquitin ligase, allows the recruitment on the K63 polyubiquitin chains of a complex composed at least of the kinase TBK1 or IKKi, TANK, NAP1 and NEMO, with NEMO functioning as a sensor of Lys 63 polyubiquitin chains for the activation of TBK1 or IKKi, which in turn promote the phosphorylation next dimerization of the transcription factor IRF3 for the expression of type I IFNs.

also a sensor capable of activating the inflammasome in response to certain RNA viruses (Poeck et al., 2010).

3. Organelle function

As mentioned previously, MAVS is localized in the mitochondrial outer membrane and must be localized at the mitochondria to exert its function (Seth et al., 2005) suggesting that the mitochondrial environment is required for signal transduction. In line with this, two independent studies have reported that Mfn1, an effector of the mitochondrial fusion machinery (Chan, 2006), positively regulates MAVS-mediated innate antiviral responses (Castanier et al., 2010; Onoguchi et al., 2010). In both cases, MAVS has been reported to interact with Mfn1, then following RLR activation, the complex Mfn1/MAVS regulates either MAVS redistribution along mitochondria (Onoguchi et al., 2010) or an elongation of the mitochondrial network (Castanier et al., 2010). Surprisingly, while Mfn1 appears as a positive regulator in the RLR pathway, a study has shown that its close homolog, Mfn2 is in contrast a direct inhibitor of MAVS, a function that is likely distinct from its role in mitochondrial dynamics (Yasukawa et al., 2009). So, although the homologous proteins Mfn1 and Mfn2 have a similar function in mitochondrial fusion (Chan, 2006), it seems that they have opposite roles in viral innate immunity.

MAVS-mediated antiviral signaling is not only regulated by mitochondrial dynamics. Indeed, a very recent study has reported

that mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) is critical for this pathway (Koshiba et al., 2011). The authors observe that cells in which the $\Delta\Psi$ was dissipated, such as in cells treated with the protonophore CCCP or lacking both Mfn1 and Mfn2, are defective in antiviral innate immune response following RLR but not TLR3 activation. While the precise role of $\Delta\Psi$ in MAVS-mediated signaling remains to be determined, it was suggested that loss of $\Delta\Psi$ might prevent the structural rearrangement of the MAVS complex, which may exist as a readily available pool on the mitochondrial membrane to provide a quicker response upon viral infection (Koshiba et al., 2011). Importantly, another conclusion of this study is that inhibiting ATP synthesis, the most prominent functional role of mitochondria, does not impair MAVS-mediated signaling ruling out the hypothesis that the presence of MAVS at the mitochondrial surface is not due to an energetic requirement to transduce the signal.

4. Organelle pathology

Dysregulation of the antiviral immune response may contribute to autoimmune diseases. So, altered expression or function of MAVS may impair antiviral cell signaling and thereby influence the risk for systemic lupus erythematosus (SLE), the prototype autoimmune disease. A recent work by the Si-Tahar's group has identified one critical loss-of-function variant (C79F, rs11905552) by using molecular techniques to screen non-synonymous single

nucleotide polymorphisms (SNPs) in the MAVS gene for functional significance in human cell lines (Pothlichet et al., 2011). This SNP substantially reduced expression of type I IFN and other proinflammatory cytokines and was found almost exclusively in the African-American population. Importantly, in African-American SLE patients, the C79F allele was associated with low type I IFN production and absence of anti-RNA-binding protein autoantibodies. These serologic associations were not related to a distinct, functionally neutral, MAVS SNP Q198K. Hence, this study demonstrates that an uncommon genetic variant in the MAVS gene has a functional impact upon the anti-viral IFN pathway *in vivo* in humans and is associated with a novel sub-phenotype in SLE (Pothlichet et al., 2011). Furthermore, this study demonstrates the utility of functional data in selecting rare variants for genetic association studies, allowing for fewer comparisons requiring statistical correction and for alternate lines of evidence implicating the particular variant in disease.

5. Future outlook

With the current knowledge, the mitochondrion appears as a recruitment platform involved in the RLR antiviral pathway but we still do not explain precisely why MAVS has to be anchored to the mitochondrial outer membrane to exert its function and what is the precise role of $\Delta\psi_m$ in MAVS-mediated signaling. Moreover, it is not known whether other mitochondrial factors are required for RLR signaling. It also remains to explore to what extent mitochondrial metabolic functions has an impact on the innate immune pathways that require this organelle as a signaling hub and what is the role of mitochondrial in innate immunity in other organisms such as *Drosophila*.

Finally, may the mitochondria serve as a relay to transduce other innate anti-viral immunity signaling? Indeed, unidentified mitochondrial protein(s) may, like MAVS, function as a signaling platform for a proper IFN antiviral response and/or inflammatory response following TLR activation for instance. Future studies should provide answers to some of these fascinating questions.

Acknowledgements

Supported by grants from ANR JCJC, Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée), INSERM et Université Paris XI. NZ received a fellowship from Université Paris XI.

References

- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* 2004;4:499–511.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783–801.
- Balachandran S, Thomas E, Barber GN. A FADD-dependent innate immune mechanism in mammalian cells. *Nature* 2004;432:401–5.
- Belgnaoui SM, Paz S, Hiscott J. Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter. *Current Opinion in Immunology* 2011;23:564–72.
- Castanier C, Garcin D, Vazquez A, Arnoult D. Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway. *EMBO Reports* 2010;11:133–8.
- Chan DC. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 2006;125:1241–52.
- Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 2009;138:576–91.
- Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 2007;446:916–20.
- Guo B, Cheng G. Modulation of the interferon antiviral response by the TBK1/IKK γ adaptor protein TANK. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282:11817–26.
- Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006;314:994–7.
- Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang QX, Chen ZJ. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* 2011;146:448–61.
- Inoue J, Gohda J, Akiyama T. Characteristics and biological functions of TRAF6. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2007;597:72–9.
- Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Sato E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *Journal of Experimental Medicine* 2008;205:1601–10.
- Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006;441:101–5.
- Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008;1143:1–20.
- Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nature Immunology* 2005;6:981–8.
- Koshiba T, Yasukawa K, Yanagi Y, Kawabata S. Mitochondrial membrane potential is required for MAVS-mediated antiviral signaling. *Science Signaling* 2011;4:ra7.
- Kumar H, Kawai T, Kato H, Sato S, Takahashi K, Coban C, et al. Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *Journal of Experimental Medicine* 2006;203:1795–803.
- Loo YM, Gale Jr M. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 2011;34:680–92.
- Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005;437:1167–72.
- Michallet MC, Meylan E, Ermolaeva MA, Vazquez J, Rebsamen M, Curran J, et al. TRADD protein is an essential component of the RIG-I-like helicase antiviral pathway. *Immunity* 2008;28:651–61.
- Myong S, Cui S, Cornish PV, Kirchhofer A, Gack MU, Jung JU, et al. Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'-triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA. *Science* 2009;323:1070–4.
- Oberst A, Green DR. It cuts both ways: reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2011;12:757–63.
- Oganesyan G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, et al. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 2006;439:208–11.
- Onoguchi K, Onomoto K, Takamatsu S, Jogi M, Takemura A, Morimoto S, et al. Virus-infection or 5'ppp-RNA activates antiviral signal through redistribution of IPS-1 mediated by MFN1. *PLoS Pathogenesis* 2010;6:e1001012.
- Oshiumi H, Miyashita M, Inoue N, Okabe M, Matsumoto M, Seya T. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell Host & Microbe* 2010;8:496–509.
- Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 2006;314:997–1001.
- Poock H, Bscheider M, Gross O, Finger K, Roth S, Rebsamen M, et al. Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. *Nature Immunology* 2010;11:63–9.
- Pothlichet J, Niewold TB, Vitour D, Solhonne B, Crow MK, Si-Tahar M. A loss-of-function variant of the antiviral molecule MAVS is associated with a subset of systemic lupus patients. *EMBO Molecular Medicine* 2011;3:142–52.
- Saha SK, Pietras EM, He JQ, Kang JR, Liu SY, Oganesyan G, et al. Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO Journal* 2006;25:3257–63.
- Sasai M, Shingai M, Funami K, Yoneyama M, Fujita T, Matsumoto M, et al. NAK-associated protein 1 participates in both the TLR3 and the cytoplasmic pathways in type I IFN induction. *Journal of Immunology* 2006;177:8676–83.
- Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 2005;122:669–82.
- Sun Q, Sun L, Liu HH, Chen X, Seth RB, Forman J, et al. The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity* 2006;24:633–42.
- Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010;11:621–32.
- Takahashi K, Kawai T, Kumar H, Sato S, Yonehara S, Akira S. Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. *Journal of Immunology* 2006;176:4520–4.
- Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Molecular Cell* 2005;19:727–40.
- Yasukawa K, Oshiumi H, Takeda M, Ishihara N, Yanagi Y, Seya T, et al. Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. *Science Signaling* 2009;2:ra47.
- Zeng W, Xu M, Liu S, Sun L, Chen ZJ. Key role of Ubc5 and lysine-63 polyubiquitination in viral activation of IRF3. *Molecular Cell* 2009;36:315–25.
- Zhao T, Yang L, Sun Q, Arguello M, Ballard DW, Hiscott J, et al. The NEMO adaptor bridges the nuclear factor-kappaB and interferon regulatory factor signaling pathways. *Nature Immunology* 2007;8:592–600.

Références bibliographiques

Uncategorized References

1. Sen, R. and D. Baltimore, *Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences*. Cell, 1986. **46**(5): p. 705-16.
2. Baeuerle, P.A., et al., *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.
3. Sen, R. and D. Baltimore, *Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism*. Cell, 1986. **47**(6): p. 921-8.
4. Baeuerle, P.A. and D. Baltimore, *I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor*. Science, 1988. **242**(4878): p. 540-6.
5. Baeuerle, P.A. and D. Baltimore, *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.
6. Ghosh, S., et al., *Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF-kappa B: homology to rel and dorsal*. Cell, 1990. **62**(5): p. 1019-29.
7. Bose, H.R., Jr., *The Rel family: models for transcriptional regulation and oncogenic transformation*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1114**(1): p. 1-17.
8. Schmid, R.M., et al., *Cloning of an NF-kappa B subunit which stimulates HIV transcription in synergy with p65*. Nature, 1991. **352**(6337): p. 733-6.
9. Ryseck, R.P., et al., *RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF-kappa B*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(2): p. 674-84.
10. Chen, Z.J., L. Parent, and T. Maniatis, *Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity*. Cell, 1996. **84**(6): p. 853-62.
11. Regnier, C.H., et al., *Identification and characterization of an IkappaB kinase*. Cell, 1997. **90**(2): p. 373-83.
12. DiDonato, J.A., et al., *A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB*. Nature, 1997. **388**(6642): p. 548-54.
13. Woronicz, J.D., et al., *IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK*. Science, 1997. **278**(5339): p. 866-9.
14. Yamaoka, S., et al., *Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation*. Cell, 1998. **93**(7): p. 1231-40.
15. Zandi, E., et al., *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.
16. Mercurio, F., et al., *IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation*. Science, 1997. **278**(5339): p. 860-6.
17. Rothwarf, D.M., et al., *IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex*. Nature, 1998. **395**(6699): p. 297-300.
18. Baltimore, D., *NF-kappaB is 25*. Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 683-5.
19. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions*. Genes Dev, 2012. **26**(3): p. 203-34.
20. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Shared principles in NF-kappaB signaling*. Cell, 2008. **132**(3): p. 344-62.
21. Kaileh, M. and R. Sen, *NF-kappaB function in B lymphocytes*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 254-71.
22. Baeuerle, P.A. and D. Baltimore, *NF-kappa B: ten years after*. Cell, 1996. **87**(1): p. 13-20.
23. Courtois, G. and T.D. Gilmore, *Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6831-43.
24. Karin, M., *Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 431-6.
25. Perkins, N.D. and T.D. Gilmore, *Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 759-72.
26. Staudt, L.M., *Oncogenic activation of NF-kappaB*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(6): p. a000109.

27. Sun, S.C. and Z.G. Liu, *A special issue on NF-kappaB signaling and function*. Cell Res, 2011. **21**(1): p. 1-2.
28. Oeckinghaus, A. and S. Ghosh, *The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(4): p. a000034.
29. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 225-60.
30. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB*. Genes Dev, 2004. **18**(18): p. 2195-224.
31. Plaksin, D., P.A. Baeuerle, and L. Eisenbach, *KBFI (p50 NF-kappa B homodimer) acts as a repressor of H-2Kb gene expression in metastatic tumor cells*. J Exp Med, 1993. **177**(6): p. 1651-62.
32. Chen, L.F. and W.C. Greene, *Shaping the nuclear action of NF-kappaB*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(5): p. 392-401.
33. Schmitz, M.L., M.A. dos Santos Silva, and P.A. Baeuerle, *Transactivation domain 2 (TA2) of p65 NF-kappa B. Similarity to TA1 and phorbol ester-stimulated activity and phosphorylation in intact cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(26): p. 15576-84.
34. O'Shea, J.M. and N.D. Perkins, *Regulation of the RelA (p65) transactivation domain*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 4): p. 603-8.
35. Grossmann, M., et al., *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.
36. Beg, A.A. and D. Baltimore, *An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death*. Science, 1996. **274**(5288): p. 782-4.
37. Chen, X., K. Kandasamy, and R.K. Srivastava, *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.
38. Schmitz, M.L., et al., *NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels*. Chembiochem, 2004. **5**(10): p. 1348-58.
39. Mattioli, I., et al., *Transient and selective NF-kappa B p65 serine 536 phosphorylation induced by T cell costimulation is mediated by I kappa B kinase beta and controls the kinetics of p65 nuclear import*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 6336-44.
40. Wang, D., et al., *Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II*. J Biol Chem, 2000. **275**(42): p. 32592-7.
41. Kweon, S.M., et al., *Synergistic activation of NF-kappaB by nontypeable H. influenzae and S. pneumoniae is mediated by CK2, IKKbeta-IkappaBalpha, and p38 MAPK*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **351**(2): p. 368-75.
42. Ishinaga, H., et al., *TGF-beta induces p65 acetylation to enhance bacteria-induced NF-kappaB activation*. EMBO J, 2007. **26**(4): p. 1150-62.
43. Millet, P., C. McCall, and B. Yoza, *RelB: an outlier in leukocyte biology*. J Leukoc Biol, 2013. **94**(5): p. 941-51.
44. Gerondakis, S., et al., *Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6888-95.
45. Weih, F., et al., *Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family*. Cell, 1995. **80**(2): p. 331-40.
46. Gerondakis, S., et al., *Rel-deficient T cells exhibit defects in production of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(8): p. 3405-9.
47. Dobrzanski, P., R.P. Ryseck, and R. Bravo, *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.
48. Fusco, A.J., et al., *Stabilization of RelB requires multidomain interactions with p100/p52*. J Biol Chem, 2008. **283**(18): p. 12324-32.
49. Marienfeld, R., et al., *RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65*. J Biol Chem, 2003. **278**(22): p. 19852-60.

50. Saccani, S., S. Pantano, and G. Natoli, *Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers*. Mol Cell, 2003. **11**(6): p. 1563-74.
51. Gilmore, T.D. and S. Gerondakis, *The c-Rel Transcription Factor in Development and Disease*. Genes Cancer, 2011. **2**(7): p. 695-711.
52. Kontgen, F., et al., *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.
53. Sanjabi, S., et al., *A c-Rel subdomain responsible for enhanced DNA-binding affinity and selective gene activation*. Genes Dev, 2005. **19**(18): p. 2138-51.
54. Lin, L. and S. Ghosh, *A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(5): p. 2248-54.
55. Mercurio, F., et al., *p105 and p98 precursor proteins play an active role in NF-kappa B-mediated signal transduction*. Genes Dev, 1993. **7**(4): p. 705-18.
56. Karin, M. and Y. Ben-Neriah, *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 621-63.
57. Li, Q. and I.M. Verma, *NF-kappaB regulation in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 725-34.
58. Leeman, J.R. and T.D. Gilmore, *Alternative splicing in the NF-kappaB signaling pathway*. Gene, 2008. **423**(2): p. 97-107.
59. Luco, S., et al., *RelAp43, a member of the NF-kappaB family involved in innate immune response against Lyssavirus infection*. PLoS Pathog, 2012. **8**(12): p. e1003060.
60. Verma, I.M., et al., *Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation*. Genes Dev, 1995. **9**(22): p. 2723-35.
61. Hinz, M., S.C. Arslan, and C. Scheidereit, *It takes two to tango: IkappaBs, the multifunctional partners of NF-kappaB*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 59-76.
62. Ghosh, G., et al., *NF-kappaB regulation: lessons from structures*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 36-58.
63. Ghosh, S. and D. Baltimore, *Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B*. Nature, 1990. **344**(6267): p. 678-82.
64. Arenzana-Seisdedos, F., et al., *Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(5): p. 2689-96.
65. Johnson, C., D. Van Antwerp, and T.J. Hope, *An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaBalp*. EMBO J, 1999. **18**(23): p. 6682-93.
66. Dobrzanski, P., R.P. Ryseck, and R. Bravo, *Differential interactions of Rel-NF-kappa B complexes with I kappa B alpha determine pools of constitutive and inducible NF-kappa B activity*. EMBO J, 1994. **13**(19): p. 4608-16.
67. Brown, K., et al., *Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1485-8.
68. Lin, Y.C., K. Brown, and U. Siebenlist, *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.
69. Spencer, E., J. Jiang, and Z.J. Chen, *Signal-induced ubiquitination of IkappaBalp* by the F-box protein Slimb/beta-TrCP. Genes Dev, 1999. **13**(3): p. 284-94.
70. Suzuki, H., et al., *IkappaBalp 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.
71. Weil, R., C. Laurent-Winter, and A. Israel, *Regulation of IkappaBbeta degradation. Similarities to and differences from IkappaBalp*. J Biol Chem, 1997. **272**(15): p. 9942-9.
72. Rao, P., et al., *IkappaBbeta acts to inhibit and activate gene expression during the inflammatory response*. Nature, 2010. **466**(7310): p. 1115-9.
73. Suyang, H., et al., *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.
74. Hoffmann, A., et al., *The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation*. Science, 2002. **298**(5596): p. 1241-5.

75. Kearns, J.D., et al., *IkappaBepsilon provides negative feedback to control NF-kappaB oscillations, signaling dynamics, and inflammatory gene expression*. J Cell Biol, 2006. **173**(5): p. 659-64.
76. Alves, B.N., et al., *IkappaBepsilon 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.
77. Tergaonkar, V., et al., *Distinct roles of IkappaB proteins in regulating constitutive NF-kappaB activity*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(9): p. 921-3.
78. Ghosh, S. and M.S. Hayden, *New regulators of NF-kappaB in inflammation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(11): p. 837-48.
79. Orian, A., et al., *SCF(beta)-TrCP ubiquitin ligase-mediated processing of NF-kappaB p105 requires phosphorylation of its C-terminus by IkappaB kinase*. EMBO J, 2000. **19**(11): p. 2580-91.
80. Heissmeyer, V., et al., *Shared pathways of IkappaB kinase-induced SCF(betaTrCP)-mediated ubiquitination and degradation for the NF-kappaB precursor p105 and IkappaBalpha*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(4): p. 1024-35.
81. Cohen, S., H. Achbert-Weiner, and A. Ciechanover, *Dual effects of IkappaB kinase beta-mediated phosphorylation on p105 Fate: SCF(beta-TrCP)-dependent degradation and SCF(beta-TrCP)-independent processing*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(1): p. 475-86.
82. Savinova, O.V., A. Hoffmann, and G. Ghosh, *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.
83. Hacker, H. and M. Karin, *Regulation and function of IKK and IKK-related kinases*. Sci STKE, 2006. **2006**(357): p. re13.
84. Liu, F., et al., *IKK biology*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 239-53.
85. Hinz, M. and C. Scheidereit, *The IkappaB kinase complex in NF-kappaB regulation and beyond*. EMBO Rep, 2014. **15**(1): p. 46-61.
86. Israel, A., *The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(3): p. a000158.
87. Perkins, N.D., *Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 49-62.
88. Solt, L.A. and M.J. May, *The IkappaB kinase complex: master regulator of NF-kappaB signaling*. Immunol Res, 2008. **42**(1-3): p. 3-18.
89. Agou, F., et al., *NEMO trimerizes through its coiled-coil C-terminal domain*. J Biol Chem, 2002. **277**(20): p. 17464-75.
90. Solt, L.A., L.A. Madge, and M.J. May, *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.
91. Rushe, M., et al., *Structure of a NEMO/IKK-associating domain reveals architecture of the interaction site*. Structure, 2008. **16**(5): p. 798-808.
92. Cordier, F., et al., *The zinc finger of NEMO is a functional ubiquitin-binding domain*. J Biol Chem, 2009. **284**(5): p. 2902-7.
93. Tegethoff, S., J. Behlke, and C. Scheidereit, *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.
94. Schmukle, A.C. and H. Walczak, *No one can whistle a symphony alone - how different ubiquitin linkages cooperate to orchestrate NF-kappaB activity*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 3): p. 549-59.
95. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
96. Chen, G. and D.V. Goeddel, *TNF-R1 signaling: a beautiful pathway*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1634-5.
97. Sun, S.C., *Non-canonical NF-kappaB signaling pathway*. Cell Res, 2011. **21**(1): p. 71-85.
98. Liang, C., M. Zhang, and S.C. Sun, *beta-TrCP binding and processing of NF-kappaB2/p100 involve its phosphorylation at serines 866 and 870*. Cell Signal, 2006. **18**(8): p. 1309-17.

99. Razani, B., A.D. Reichardt, and G. Cheng, *Non-canonical NF-kappaB signaling activation and regulation: principles and perspectives*. Immunol Rev, 2011. **244**(1): p. 44-54.
100. Ciechanover, A., et al., *Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes*. J Biol Chem, 1980. **255**(16): p. 7525-8.
101. Ciechanover, A., et al., *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.
102. Hershko, A., et al., *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.
103. Hershko, A., A. Ciechanover, and I.A. Rose, *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.
104. Seufert, W. and S. Jentsch, *In vivo function of the proteasome in the ubiquitin pathway*. EMBO J, 1992. **11**(8): p. 3077-80.
105. Husnjak, K. and I. Dikic, *Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 291-322.
106. Hicke, L., *Protein regulation by monoubiquitin*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(3): p. 195-201.
107. Pickart, C.M., *Ubiquitin enters the new millennium*. Mol Cell, 2001. **8**(3): p. 499-504.
108. Pickart, C.M., *Mechanisms underlying ubiquitination*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 503-33.
109. Hochstrasser, M., *Lingering mysteries of ubiquitin-chain assembly*. Cell, 2006. **124**(1): p. 27-34.
110. Sadowski, M., et al., *Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes*. IUBMB Life, 2012. **64**(2): p. 136-42.
111. Behrends, C. and J.W. Harper, *Constructing and decoding unconventional ubiquitin chains*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(5): p. 520-8.
112. Liu, Y.C., J. Penninger, and M. Karin, *Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(12): p. 941-52.
113. Martinez-Forero, I., et al., *Lysine 63 polyubiquitination in immunotherapy and in cancer-promoting inflammation*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(22): p. 6751-7.
114. Varadan, R., et al., *Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling*. J Biol Chem, 2004. **279**(8): p. 7055-63.
115. Chen, Z.J. and L.J. Sun, *Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling*. Mol Cell, 2009. **33**(3): p. 275-86.
116. Malynn, B.A. and A. Ma, *Ubiquitin makes its mark on immune regulation*. Immunity, 2010. **33**(6): p. 843-52.
117. Wilkinson, K.D., *Ubiquitin: a Nobel protein*. Cell, 2004. **119**(6): p. 741-5.
118. Giles, J., *Chemistry Nobel for trio who revealed molecular death-tag*. Nature, 2004. **431**(7010): p. 729.
119. Pickart, C.M., *Back to the future with ubiquitin*. Cell, 2004. **116**(2): p. 181-90.
120. Finley, D., A. Ciechanover, and A. Varshavsky, *Ubiquitin as a central cellular regulator*. Cell, 2004. **116**(2 Suppl): p. S29-32, 2 p following S32.
121. Ulrich, H.D., *Two-way communications between ubiquitin-like modifiers and DNA*. Nat Struct Mol Biol, 2014. **21**(4): p. 317-24.
122. Zinngrebe, J., et al., *Ubiquitin in the immune system*. EMBO Rep, 2014. **15**(1): p. 28-45.
123. Pickart, C.M. and M.J. Eddins, *Ubiquitin: structures, functions, mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1695**(1-3): p. 55-72.
124. Shi, D. and S.R. Grossman, *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.
125. Hershko, A. and A. Ciechanover, *The ubiquitin system*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 425-79.

126. Scheffner, M., U. Nuber, and J.M. Huibregtse, *Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade*. Nature, 1995. **373**(6509): p. 81-3.
127. Haas, A.L., et al., *Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation*. J Biol Chem, 1982. **257**(5): p. 2543-8.
128. Jin, J., et al., *Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging*. Nature, 2007. **447**(7148): p. 1135-8.
129. Pelzer, C., et al., *UBE1L2, a novel E1 enzyme specific for ubiquitin*. J Biol Chem, 2007. **282**(32): p. 23010-4.
130. Groettrup, M., et al., *Activating the ubiquitin family: UBA6 challenges the field*. Trends Biochem Sci, 2008. **33**(5): p. 230-7.
131. Michelle, C., et al., *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.
132. Ye, Y. and M. Rape, *Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(11): p. 755-64.
133. Plafker, S.M., et al., *Ubiquitin charging of human class III ubiquitin-conjugating enzymes triggers their nuclear import*. J Cell Biol, 2004. **167**(4): p. 649-59.
134. Ravid, T. and M. Hochstrasser, *Autoregulation of an E2 enzyme by ubiquitin-chain assembly on its catalytic residue*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(4): p. 422-7.
135. Markson, G., et al., *Analysis of the human E2 ubiquitin conjugating enzyme protein interaction network*. Genome Res, 2009. **19**(10): p. 1905-11.
136. Windheim, M., M. Peggie, and P. Cohen, *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.
137. Christensen, D.E., P.S. Brzovic, and R.E. Klevit, *E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(10): p. 941-8.
138. Hofmann, R.M. and C.M. Pickart, *Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair*. Cell, 1999. **96**(5): p. 645-53.
139. Hershko, A., et al., *Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown*. J Biol Chem, 1983. **258**(13): p. 8206-14.
140. Deshaies, R.J. and C.A. Joazeiro, *RING domain E3 ubiquitin ligases*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 399-434.
141. Rotin, D. and S. Kumar, *Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(6): p. 398-409.
142. Scheffner, M. and S. Kumar, *Mammalian HECT ubiquitin-protein ligases: biological and pathophysiological aspects*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(1): p. 61-74.
143. Metzger, M.B., V.A. Hristova, and A.M. Weissman, *HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 3): p. 531-7.
144. Iwai, K., *Diverse ubiquitin signaling in NF-kappaB activation*. Trends Cell Biol, 2012. **22**(7): p. 355-64.
145. Freemont, P.S., I.M. Hanson, and J. Trowsdale, *A novel cysteine-rich sequence motif*. Cell, 1991. **64**(3): p. 483-4.
146. Metzger, M.B., et al., *RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(1): p. 47-60.
147. Budhidarmo, R., Y. Nakatani, and C.L. Day, *RINGs hold the key to ubiquitin transfer*. Trends Biochem Sci, 2012. **37**(2): p. 58-65.
148. Reyes-Turcu, F.E., K.H. Ventii, and K.D. Wilkinson, *Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 363-97.
149. Komander, D., M.J. Clague, and S. Urbe, *Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(8): p. 550-63.
150. Nijman, S.M., et al., *A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes*. Cell, 2005. **123**(5): p. 773-86.
151. Fraile, J.M., et al., *Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options*. Oncogene, 2012. **31**(19): p. 2373-88.

152. Reyes-Turcu, F.E. and K.D. Wilkinson, *Polyubiquitin binding and disassembly by deubiquitinating enzymes*. Chem Rev, 2009. **109**(4): p. 1495-508.
153. Ye, Y., et al., *Dissection of USP catalytic domains reveals five common insertion points*. Mol Biosyst, 2009. **5**(12): p. 1797-808.
154. Balakirev, M.Y., et al., *Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway*. EMBO Rep, 2003. **4**(5): p. 517-22.
155. Winborn, B.J., et al., *The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys63 linkages in mixed linkage ubiquitin chains*. J Biol Chem, 2008. **283**(39): p. 26436-43.
156. Tran, H.J., et al., *Structure of the Jab1/MPN domain and its implications for proteasome function*. Biochemistry, 2003. **42**(39): p. 11460-5.
157. Ambroggio, X.I., D.C. Rees, and R.J. Deshaies, *JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome*. PLoS Biol, 2004. **2**(1): p. E2.
158. Liang, J., et al., *MCP-induced protein 1 deubiquitinates TRAF proteins and negatively regulates JNK and NF-kappaB signaling*. J Exp Med, 2010. **207**(13): p. 2959-73.
159. Harhaj, E.W. and V.M. Dixit, *Regulation of NF-kappaB by deubiquitinases*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 107-24.
160. Clague, M.J., J.M. Coulson, and S. Urbe, *Cellular functions of the DUBs*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 2): p. 277-86.
161. Amerik, A.Y. and M. Hochstrasser, *Mechanism and function of deubiquitinating enzymes*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1695**(1-3): p. 189-207.
162. Harhaj, E.W. and V.M. Dixit, *Deubiquitinases in the regulation of NF-kappaB signaling*. Cell Res, 2011. **21**(1): p. 22-39.
163. Eletr, Z.M. and K.D. Wilkinson, *Regulation of proteolysis by human deubiquitinating enzymes*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(1): p. 114-28.
164. Pickart, C.M., *Targeting of substrates to the 26S proteasome*. FASEB J, 1997. **11**(13): p. 1055-66.
165. van Nocker, S. and R.D. Vierstra, *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.
166. Skaug, B., X. Jiang, and Z.J. Chen, *The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 769-96.
167. Kanarek, N. and Y. Ben-Neriah, *Regulation of NF-kappaB by ubiquitination and degradation of the IkappaBs*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 77-94.
168. Banerjee, S., et al., *Modulation of SCF beta-TrCP-dependent I kappaB alpha ubiquitination by hydrogen peroxide*. J Biol Chem, 2010. **285**(4): p. 2665-75.
169. Xu, S., et al., *In vitro SCFbeta-Trcp1-mediated IkappaBalpha ubiquitination assay for high-throughput screen*. Methods Enzymol, 2005. **399**: p. 729-40.
170. Nakayama, K., et al., *Impaired degradation of inhibitory subunit of NF-kappa B (I kappa B) and beta-catenin as a result of targeted disruption of the beta-TrCP1 gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(15): p. 8752-7.
171. Tanaka, K., et al., *Control of IkappaBalpha proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway*. Biochimie, 2001. **83**(3-4): p. 351-6.
172. Kroll, M., et al., *Inducible degradation of IkappaBalpha by the proteasome requires interaction with the F-box protein h-betaTrCP*. J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 7941-5.
173. Amir, R.E., et al., *Mechanism of processing of the NF-kappa B2 p100 precursor: identification of the specific polyubiquitin chain-anchoring lysine residue and analysis of the role of NEDD8-modification on the SCF(beta-TrCP) ubiquitin ligase*. Oncogene, 2004. **23**(14): p. 2540-7.
174. Moorthy, A.K., et al., *The 20S proteasome processes NF-kappaB1 p105 into p50 in a translation-independent manner*. EMBO J, 2006. **25**(9): p. 1945-56.
175. Bhoj, V.G. and Z.J. Chen, *Ubiquitylation in innate and adaptive immunity*. Nature, 2009. **458**(7237): p. 430-7.
176. Wajant, H. and P. Scheurich, *TNFR1-induced activation of the classical NF-kappaB pathway*. FEBS J, 2011. **278**(6): p. 862-76.

177. Lee, T.H., et al., *The kinase activity of Rip1 is not required for tumor necrosis factor-alpha-induced IkkappaB kinase or p38 MAP kinase activation or for the ubiquitination of Rip1 by Traf2*. J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33185-91.
178. Bertrand, M.J., et al., *cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination*. Mol Cell, 2008. **30**(6): p. 689-700.
179. Park, S.M., J.B. Yoon, and T.H. Lee, *Receptor interacting protein is ubiquitinated by cellular inhibitor of apoptosis proteins (c-IAP1 and c-IAP2) in vitro*. FEBS Lett, 2004. **566**(1-3): p. 151-6.
180. Vince, J.E., et al., *TRAF2 must bind to cellular inhibitors of apoptosis for tumor necrosis factor (tnf) to efficiently activate nf-kappaB and to prevent tnf-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2009. **284**(51): p. 35906-15.
181. Ea, C.K., et al., *Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO*. Mol Cell, 2006. **22**(2): p. 245-57.
182. Kanayama, A., et al., *TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains*. Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 535-48.
183. Wu, C.J., et al., *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.
184. Kulathu, Y., et al., *Two-sided ubiquitin binding explains specificity of the TAB2 NZF domain*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(12): p. 1328-30.
185. Laplantine, E., et al., *NEMO specifically recognizes K63-linked poly-ubiquitin chains through a new bipartite ubiquitin-binding domain*. EMBO J, 2009. **28**(19): p. 2885-95.
186. Gautheron, J. and G. Courtois, *"Without Ub I am nothing": NEMO as a multifunctional player in ubiquitin-mediated control of NF-kappaB activation*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(18): p. 3101-13.
187. Conze, D.B., et al., *Lys63-linked polyubiquitination of IRAK-1 is required for interleukin-1 receptor- and toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(10): p. 3538-47.
188. Kishida, S., et al., *TAK1-binding protein 2 facilitates ubiquitination of TRAF6 and assembly of TRAF6 with IKK in the IL-1 signaling pathway*. Genes Cells, 2005. **10**(5): p. 447-54.
189. Oeckinghaus, A., et al., *Malt1 ubiquitination triggers NF-kappaB signaling upon T-cell activation*. EMBO J, 2007. **26**(22): p. 4634-45.
190. Wu, C.J. and J.D. Ashwell, *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.
191. Abbott, D.W., et al., *Coordinated regulation of Toll-like receptor and NOD2 signaling by K63-linked polyubiquitin chains*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(17): p. 6012-25.
192. Bertrand, M.J., et al., *Cellular inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 are required for innate immunity signaling by the pattern recognition receptors NOD1 and NOD2*. Immunity, 2009. **30**(6): p. 789-801.
193. Damgaard, R.B. and M. Gyrd-Hansen, *Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins in regulation of inflammation and innate immunity*. Discov Med, 2011. **11**(58): p. 221-31.
194. Gack, M.U., et al., *TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity*. Nature, 2007. **446**(7138): p. 916-920.
195. Gerlach, B., et al., *Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling*. Nature, 2011. **471**(7340): p. 591-6.
196. Haas, T.L., et al., *Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction*. Mol Cell, 2009. **36**(5): p. 831-44.
197. Komander, D., et al., *Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains*. EMBO Rep, 2009. **10**(5): p. 466-73.
198. Verhelst, K., et al., *Linear ubiquitination in NF-kappaB signaling and inflammation: What we do understand and what we do not*. Biochem Pharmacol, 2011. **82**(9): p. 1057-65.
199. Ikeda, F., et al., *SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF-kappaB activity and apoptosis*. Nature, 2011. **471**(7340): p. 637-41.
200. Tokunaga, F., et al., *SHARPIN is a component of the NF-kappaB-activating linear ubiquitin chain assembly complex*. Nature, 2011. **471**(7340): p. 633-6.

201. Clark, K., S. Nanda, and P. Cohen, *Molecular control of the NEMO family of ubiquitin-binding proteins*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(10): p. 673-85.
202. Tokunaga, F., et al., *Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(2): p. 123-32.
203. Tokunaga, F. and K. Iwai, *Linear ubiquitination: a novel NF-kappaB regulatory mechanism for inflammatory and immune responses by the LUBAC ubiquitin ligase complex*. Endocr J, 2012. **59**(8): p. 641-52.
204. Hadian, K., et al., *NF-kappaB essential modulator (NEMO) interaction with linear and lys-63 ubiquitin chains contributes to NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 2011. **286**(29): p. 26107-17.
205. Rahighi, S., et al., *Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation*. Cell, 2009. **136**(6): p. 1098-109.
206. Zhu, G., et al., *Optineurin negatively regulates TNFalpha- induced NF-kappaB activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP*. Curr Biol, 2007. **17**(16): p. 1438-43.
207. Nagabhushana, A., M. Bansal, and G. Swarup, *Optineurin is required for CYLD-dependent inhibition of TNFalpha-induced NF-kappaB activation*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17477.
208. Dynek, J.N., et al., *c-IAP1 and UbcH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling*. EMBO J, 2010. **29**(24): p. 4198-209.
209. Arimoto, K., et al., *Polyubiquitin conjugation to NEMO by tripartite motif protein 23 (TRIM23) is critical in antiviral defense*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(36): p. 15856-61.
210. Perkins, N.D., *Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6717-30.
211. Hoeller, D., et al., *Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(2): p. 163-9.
212. Ma, A. and B.A. Malynn, *A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(11): p. 774-85.
213. Opipari, A.W., Jr., M.S. Boguski, and V.M. Dixit, *The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein*. J Biol Chem, 1990. **265**(25): p. 14705-8.
214. Wertz, I.E., et al., *De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling*. Nature, 2004. **430**(7000): p. 694-9.
215. Verstrepen, L., et al., *Expression, biological activities and mechanisms of action of A20 (TNFAIP3)*. Biochem Pharmacol, 2010. **80**(12): p. 2009-20.
216. Shembade, N., et al., *The E3 ligase Itch negatively regulates inflammatory signaling pathways by controlling the function of the ubiquitin-editing enzyme A20*. Nat Immunol, 2008. **9**(3): p. 254-62.
217. Shembade, N., et al., *The ubiquitin-editing enzyme A20 requires RNF11 to downregulate NF-kappaB signalling*. EMBO J, 2009. **28**(5): p. 513-22.
218. Biggs, P.J., et al., *Familial cylindromatosis (turban tumour syndrome) gene localised to chromosome 16q12-q13: evidence for its role as a tumour suppressor gene*. Nat Genet, 1995. **11**(4): p. 441-3.
219. Biggs, P.J., et al., *The cylindromatosis gene (cyld1) on chromosome 16q may be the only tumour suppressor gene involved in the development of cylindromas*. Oncogene, 1996. **12**(6): p. 1375-7.
220. Trompouki, E., et al., *CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members*. Nature, 2003. **424**(6950): p. 793-6.
221. Reiley, W.W., et al., *Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates the ubiquitin-dependent kinase Tak1 and prevents abnormal T cell responses*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1475-85.
222. Massoumi, R., *Ubiquitin chain cleavage: CYLD at work*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(7): p. 392-9.
223. Enesa, K., et al., *NF-kappaB suppression by the deubiquitinating enzyme Cezanne: a novel negative feedback loop in pro-inflammatory signaling*. J Biol Chem, 2008. **283**(11): p. 7036-45.

224. Schweitzer, K., et al., *CSN controls NF-kappaB by deubiquitylation of IkappaBalpha*. EMBO J, 2007. **26**(6): p. 1532-41.
225. Schaeffer, V., et al., *Binding of OTULIN to the PUB domain of HOIP controls NF-kappaB signaling*. Mol Cell, 2014. **54**(3): p. 349-61.
226. Licchesi, J.D., et al., *An ankyrin-repeat ubiquitin-binding domain determines TRABID's specificity for atypical ubiquitin chains*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(1): p. 62-71.
227. Poalas, K., et al., *Negative regulation of NF-kappaB signaling in T lymphocytes by the ubiquitin-specific protease USP34*. Cell Commun Signal, 2013. **11**(1): p. 25.
228. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 745-56.
229. Bodmer, J.L., P. Schneider, and J. Tschopp, *The molecular architecture of the TNF superfamily*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(1): p. 19-26.
230. Schrefelbauer, B. and A. Hoffmann, *How do pleiotropic kinase hubs mediate specific signaling by TNFR superfamily members?* Immunol Rev, 2011. **244**(1): p. 29-43.
231. Hsu, H., et al., *TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways*. Cell, 1996. **84**(2): p. 299-308.
232. Workman, L.M. and H. Habelhah, *TNFR1 signaling kinetics: spatiotemporal control of three phases of IKK activation by posttranslational modification*. Cell Signal, 2013. **25**(8): p. 1654-64.
233. Li, J., Q. Yin, and H. Wu, *Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily*. Adv Immunol, 2013. **119**: p. 135-53.
234. Bianchi, K. and P. Meier, *A tangled web of ubiquitin chains: breaking news in TNF-R1 signaling*. Mol Cell, 2009. **36**(5): p. 736-42.
235. Wang, Y., et al., *TRAF-mediated regulation of immune and inflammatory responses*. Sci China Life Sci, 2010. **53**(2): p. 159-68.
236. Ha, H., D. Han, and Y. Choi, *TRAF-mediated TNFR-family signaling*. Curr Protoc Immunol, 2009. **Chapter 11**: p. Unit11 9D.
237. Hacker, H., P.H. Tseng, and M. Karin, *Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(7): p. 457-68.
238. Yin, Q., et al., *E2 interaction and dimerization in the crystal structure of TRAF6*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(6): p. 658-66.
239. Mace, P.D., et al., *Asymmetric recruitment of cIAPs by TRAF2*. J Mol Biol, 2010. **400**(1): p. 8-15.
240. Yin, Q., et al., *Structural basis for the lack of E2 interaction in the RING domain of TRAF2*. Biochemistry, 2009. **48**(44): p. 10558-67.
241. Alvarez, S.E., et al., *Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2*. Nature, 2010. **465**(7301): p. 1084-8.
242. Beug, S.T., et al., *Modulation of immune signalling by inhibitors of apoptosis*. Trends Immunol, 2012. **33**(11): p. 535-45.
243. Mace, P.D., S. Shirley, and C.L. Day, *Assembling the building blocks: structure and function of inhibitor of apoptosis proteins*. Cell Death Differ, 2010. **17**(1): p. 46-53.
244. Mahoney, D.J., et al., *Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNFalpha-mediated NF-kappaB activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(33): p. 11778-83.
245. Hsu, H., et al., *TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex*. Immunity, 1996. **4**(4): p. 387-96.
246. Lin, Y., et al., *Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**(19): p. 2514-26.
247. Feoktistova, M., et al., *cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms*. Mol Cell, 2011. **43**(3): p. 449-63.
248. Christofferson, D.E., Y. Li, and J. Yuan, *Control of life-or-death decisions by RIP1 kinase*. Annu Rev Physiol, 2014. **76**: p. 129-50.
249. Ono, K., et al., *An evolutionarily conserved motif in the TAB1 C-terminal region is necessary for interaction with and activation of TAK1 MAPKKK*. J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 24396-400.

250. Sakurai, H., et al., *Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1*. FEBS Lett, 2000. **474**(2-3): p. 141-5.
251. Kishimoto, K., K. Matsumoto, and J. Ninomiya-Tsuji, *TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop*. J Biol Chem, 2000. **275**(10): p. 7359-64.
252. Landstrom, M., *The TAK1-TRAF6 signalling pathway*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(5): p. 585-9.
253. Li, S., et al., *IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(8): p. 5567-72.
254. Lin, S.C., Y.C. Lo, and H. Wu, *Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling*. Nature, 2010. **465**(7300): p. 885-90.
255. Liu, L., et al., *Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA*. Science, 2008. **320**(5874): p. 379-81.
256. Xu, Y., et al., *Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 111-5.
257. Barbe, F., T. Douglas, and M. Saleh, *Advances in Nod-like receptors (NLR) biology*. Cytokine Growth Factor Rev, 2014.
258. Abbott, D.W., et al., *The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitinylation of a novel site on NEMO*. Curr Biol, 2004. **14**(24): p. 2217-27.
259. Bruns, A.M. and C.M. Horvath, *Activation of RIG-I-like receptor signal transduction*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2012. **47**(2): p. 194-206.
260. Gack, M.U., et al., *Roles of RIG-I N-terminal tandem CARD and splice variant in TRIM25-mediated antiviral signal transduction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(43): p. 16743-8.
261. Oshiumi, H., et al., *Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection*. J Biol Chem, 2009. **284**(2): p. 807-17.
262. Krappmann, D. and C. Scheidereit, *A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of IkappaB kinase pathways*. EMBO Rep, 2005. **6**(4): p. 321-6.
263. McCool, K.W. and S. Miyamoto, *DNA damage-dependent NF-kappaB activation: NEMO turns nuclear signaling inside out*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 311-26.
264. Janssens, S. and J. Tschopp, *Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 773-84.
265. Gray, M.W., G. Burger, and B.F. Lang, *Mitochondrial evolution*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1476-81.
266. Frey, T.G. and C.A. Mannella, *The internal structure of mitochondria*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(7): p. 319-24.
267. McBride, H.M., M. Neuspiel, and S. Wasiak, *Mitochondria: more than just a powerhouse*. Curr Biol, 2006. **16**(14): p. R551-60.
268. Orrenius, S., *Mitochondrial regulation of apoptotic cell death*. Toxicol Lett, 2004. **149**(1-3): p. 19-23.
269. Seth, R.B., et al., *Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3*. Cell, 2005. **122**(5): p. 669-82.
270. Xu, L.G., et al., *VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling*. Mol Cell, 2005. **19**(6): p. 727-40.
271. Boldogh, I.R. and L.A. Pon, *Mitochondria on the move*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(10): p. 502-10.
272. Johnson, L.V., et al., *Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy*. J Cell Biol, 1981. **88**(3): p. 526-35.
273. Bereiter-Hahn, J., *Behavior of mitochondria in the living cell*. Int Rev Cytol, 1990. **122**: p. 1-63.
274. Bereiter-Hahn, J. and M. Voth, *Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria*. Microsc Res Tech, 1994. **27**(3): p. 198-219.
275. Sauvanet, C., et al., *[Mitochondrial morphology and dynamics: actors, mechanisms and functions]*. Med Sci (Paris), 2010. **26**(10): p. 823-9.

276. Mitra, K., et al., *A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(29): p. 11960-5.
277. Taguchi, N., et al., *Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission*. J Biol Chem, 2007. **282**(15): p. 11521-9.
278. Gomes, L.C., G. Di Benedetto, and L. Scorrano, *During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(5): p. 589-98.
279. Rambold, A.S., et al., *Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(25): p. 10190-5.
280. Okamoto, K. and J.M. Shaw, *Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes*. Annu Rev Genet, 2005. **39**: p. 503-36.
281. Hoppins, S., L. Lackner, and J. Nunnari, *The machines that divide and fuse mitochondria*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 751-80.
282. Nunnari, J., et al., *Mitochondrial transmission during mating in Saccharomyces cerevisiae is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA*. Mol Biol Cell, 1997. **8**(7): p. 1233-42.
283. Malka, F., et al., *Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes*. EMBO Rep, 2005. **6**(9): p. 853-9.
284. Legros, F., et al., *Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(12): p. 4343-54.
285. Liu, X., et al., *Mitochondrial 'kiss-and-run': interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics*. EMBO J, 2009. **28**(20): p. 3074-89.
286. Jones, B.A. and W.L. Fangman, *Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin*. Genes Dev, 1992. **6**(3): p. 380-9.
287. Wong, E.D., et al., *The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria*. J Cell Biol, 2000. **151**(2): p. 341-52.
288. Alexander, C., et al., *OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28*. Nat Genet, 2000. **26**(2): p. 211-5.
289. Delettre, C., et al., *Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy*. Nat Genet, 2000. **26**(2): p. 207-10.
290. Hales, K.G. and M.T. Fuller, *Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase*. Cell, 1997. **90**(1): p. 121-9.
291. Santel, A. and M.T. Fuller, *Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 5): p. 867-74.
292. Chen, H., et al., *Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development*. J Cell Biol, 2003. **160**(2): p. 189-200.
293. van der Bliek, A.M., Q. Shen, and S. Kawajiri, *Mechanisms of mitochondrial fission and fusion*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(6).
294. Bleazard, W., et al., *The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(5): p. 298-304.
295. Smirnova, E., et al., *Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(8): p. 2245-56.
296. Labrousse, A.M., et al., *C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane*. Mol Cell, 1999. **4**(5): p. 815-26.
297. Mozdy, A.D., J.M. McCaffery, and J.M. Shaw, *Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p*. J Cell Biol, 2000. **151**(2): p. 367-80.
298. Yoon, Y., et al., *The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(15): p. 5409-20.
299. Lackner, L.L. and J.M. Nunnari, *The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1792**(12): p. 1138-44.
300. Loson, O.C., et al., *Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission*. Mol Biol Cell, 2013. **24**(5): p. 659-67.

301. Liesa, M., M. Palacin, and A. Zorzano, *Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease*. *Physiol Rev*, 2009. **89**(3): p. 799-845.
302. Gilquin, B., et al., *The AAA+ ATPase ATAD3A controls mitochondrial dynamics at the interface of the inner and outer membranes*. *Mol Cell Biol*, 2010. **30**(8): p. 1984-96.
303. Lopez Del Amo, V., et al., *Mitochondrial defects and neuromuscular degeneration caused by altered expression of Drosophila Gdap1: implications for the Charcot-Marie-Tooth neuropathy*. *Hum Mol Genet*, 2014.
304. Chen, H. and D.C. Chan, *Physiological functions of mitochondrial fusion*. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. **1201**: p. 21-5.
305. Castanier, C. and D. Arnoult, *[Mitochondrial dynamics during apoptosis]*. *Med Sci (Paris)*, 2010. **26**(10): p. 830-5.
306. Chen, H. and D.C. Chan, *Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics*. *Curr Opin Cell Biol*, 2006. **18**(4): p. 453-9.
307. Chan, D.C., *Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development*. *Cell*, 2006. **125**(7): p. 1241-52.
308. Chen, H. and D.C. Chan, *Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases*. *Hum Mol Genet*, 2009. **18**(R2): p. R169-76.
309. Lenaers, G., et al., *[From yeast to neurodegenerative diseases: ten years of exploration of mitochondrial dynamic disorders]*. *Med Sci (Paris)*, 2010. **26**(10): p. 836-41.
310. Green, D.R. and G. Kroemer, *The pathophysiology of mitochondrial cell death*. *Science*, 2004. **305**(5684): p. 626-9.
311. Zhao, Y., et al., *Really interesting new gene finger protein 121 is a novel Golgi-localized membrane protein that regulates apoptosis*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2014.
312. Darom, A., U. Bening-Abu-Shach, and L. Broday, *RNF-121 is an endoplasmic reticulum-membrane E3 ubiquitin ligase involved in the regulation of beta-integrin*. *Mol Biol Cell*, 2010. **21**(11): p. 1788-98.
313. Strausberg, R.L., et al., *Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(26): p. 16899-903.
314. Rosa-Rosa, J.M., et al., *A 7 Mb region within 11q13 may contain a high penetrance gene for breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2009. **118**(1): p. 151-9.
315. Fuchs, S.Y., V.S. Spiegelman, and K.G. Kumar, *The many faces of beta-TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer*. *Oncogene*, 2004. **23**(11): p. 2028-36.
316. Read, M.A., et al., *Nedd8 modification of cul-1 activates SCF(beta-TrCP)-dependent ubiquitination of IkappaBalpha*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(7): p. 2326-33.
317. Yoshida, Y., et al., *Glycoprotein-specific ubiquitin ligases recognize N-glycans in unfolded substrates*. *EMBO Rep*, 2005. **6**(3): p. 239-44.
318. Cipolat, S., et al., *OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(45): p. 15927-32.
319. Ishihara, N., et al., *Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice*. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(8): p. 958-66.
320. Friedman, J.R. and J. Nunnari, *Mitochondrial form and function*. *Nature*, 2014. **505**(7483): p. 335-43.
321. Sheridan, C. and S.J. Martin, *Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis*. *Mitochondrion*, 2010. **10**(6): p. 640-8.
322. Martinou, J.C. and R.J. Youle, *Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics*. *Dev Cell*, 2011. **21**(1): p. 92-101.
323. Tondera, D., et al., *SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion*. *EMBO J*, 2009. **28**(11): p. 1589-600.
324. Guillery, O., et al., *Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential*. *Biol Cell*, 2008. **100**(5): p. 315-25.
325. van der Blik, A.M., *Fussy mitochondria fuse in response to stress*. *EMBO J*, 2009. **28**(11): p. 1533-4.
326. Matsuda, A., et al., *Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways*. *Oncogene*, 2003. **22**(21): p. 3307-18.

327. Li, W., et al., *Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling*. PLoS One, 2008. **3**(1): p. e1487.
328. Zhang, B., et al., *GIDE is a mitochondrial E3 ubiquitin ligase that induces apoptosis and slows growth*. Cell Res, 2008. **18**(9): p. 900-10.
329. Bae, S., et al., *Akt is negatively regulated by the MULAN E3 ligase*. Cell Res, 2012. **22**(5): p. 873-85.
330. Muller-Rischart, A.K., et al., *The E3 ligase parkin maintains mitochondrial integrity by increasing linear ubiquitination of NEMO*. Mol Cell, 2013. **49**(5): p. 908-21.
331. Ryter, S.W. and A.M. Choi, *Autophagy: An Integral Component of the Mammalian Stress Response*. J Biochem Pharmacol Res, 2013. **1**(3): p. 176-188.
332. Shutt, T.E. and H.M. McBride, *Staying cool in difficult times: mitochondrial dynamics, quality control and the stress response*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(2): p. 417-24.
333. Criollo, A., et al., *The IKK complex contributes to the induction of autophagy*. EMBO J, 2010. **29**(3): p. 619-31.
334. Alexia, C., et al., *The endoplasmic reticulum acts as a platform for ubiquitylated components of nuclear factor kappaB signaling*. Sci Signal, 2013. **6**(291): p. ra79.
335. Samuel, T., et al., *Distinct BIR domains of cIAP1 mediate binding to and ubiquitination of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 and second mitochondrial activator of caspases*. J Biol Chem, 2006. **281**(2): p. 1080-90.
336. Ling, Q. and P. Jarvis, *Dynamic regulation of endosymbiotic organelles by ubiquitination*. Trends Cell Biol, 2013. **23**(8): p. 399-408.
337. Zemirli, N. and D. Arnoult, *Mitochondrial anti-viral immunity*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(9): p. 1473-6.
338. Cloonan, S.M. and A.M. Choi, *Mitochondria: sensors and mediators of innate immune receptor signaling*. Curr Opin Microbiol, 2013. **16**(3): p. 327-38.
339. Ishikawa, H. and G.N. Barber, *STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling*. Nature, 2008. **455**(7213): p. 674-8.
340. Barber, G.N., *Cytoplasmic DNA innate immune pathways*. Immunol Rev, 2011. **243**(1): p. 99-108.
341. Peinelt, C., et al., *Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1)*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(7): p. 771-3.
342. Millarte, V. and H. Farhan, *The Golgi in cell migration: regulation by signal transduction and its implications for cancer cell metastasis*. ScientificWorldJournal, 2012. **2012**: p. 498278.
343. Robbins, D.J., et al., *Evidence for a Ras-dependent extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(15): p. 6924-8.
344. Farhan, H., et al., *MAPK signaling to the early secretory pathway revealed by kinase/phosphatase functional screening*. J Cell Biol, 2010. **189**(6): p. 997-1011.
345. Ying, H. and B.Y. Yue, *Cellular and molecular biology of optineurin*. Int Rev Cell Mol Biol, 2012. **294**: p. 223-58.
346. Kachaner, D., et al., *Toward an integrative view of Optineurin functions*. Cell Cycle, 2012. **11**(15): p. 2808-18.