

Université de Montréal

**Influence de l'ubiquitylation initiale des substrats SH3
sur leur régulation par la ligase Itch**

par

Malick Gueye

Département de sciences biologiques
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de
l'obtention du grade de Maître ès Sciences
en Sciences biologiques

Avril, 2016

© Malick Gueye, 2016

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Influence de l'ubiquitylation initiale des substrats SH3
sur leur régulation par la ligase Itch**

Présenté par :
Malick Gueye

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean François Pflieger, président-rapporteur

Annie Angers, directrice de recherche

Valérie Legendre-Guillemain, membre du jury

Résumé

Ce projet de recherche explore un nouveau mécanisme de régulation de l'activité du domaine HECT de la ligase Itch. Ce domaine est responsable de la polyubiquitylation des protéines impliquant le plus souvent leur dégradation par le protéasome. Itch est une ligase de l'ubiquitine de la famille CWH contenant un domaine HECT catalytique en C-terminal, quatre domaines WW, et un domaine C2 N-terminal qui est important pour sa localisation cellulaire. Les ligases CWH interagissent par leur domaine WW avec leurs ligands. Un mécanisme proposé pour ces ligases est que la première molécule d'ubiquitine liée au substrat active le domaine HECT de manière à former une chaîne d'ubiquitine sur le substrat. Itch a une particularité dans la famille CWH, car elle possède un domaine riche en proline qui lui permet d'interagir avec plusieurs protéines à domaine SH3. Dans cette étude, nous avons déterminé l'effet de l'ubiquitylation initiale des protéines SH3 sur l'activité du domaine HECT de la ligase Itch, et sur la régulation de ces substrats.

Mots-clés : Itch, ubiquitine, ligand, protéines SH3, PRD, interaction, régulation.

Abstract

The subject of this research is to reveal a new mechanism of regulation of the Itch ubiquitin ligase through its catalytic HECT domain. The HECT domain is in charge of polyubiquitylating proteins, which is often responsible for their degradation by the proteasome. Itch belongs to the CWH subfamily of ubiquitin ligases, characterized by the presence of C-terminal catalytic HECT domain, four WW domains for ligand binding and a N-terminal C2 domain important for the subcellular localization of the ligase. Attachment of a first ubiquitin moieties to the substrates is proposed to stimulate the ligase activity, promoting the creation of a polyubiquitin chain. Itch is the only member of its subfamily that has been shown to interact and promote the ubiquitylation of SH3 domain-containing proteins through a conserved proline-rich region located upstream of the four WW domains. In this work, we have determined the impact of the addition of a single ubiquitin to SH3 domain-containing proteins on the processivity of the ubiquitylation reaction catalysed by Itch and on the regulation of this class of substrates.

Keywords : Itch, ubiquitin, SH3 protein, regulation, ligand, PRD, interaction.

Tables des matières

Résumé

Abstract

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Listes des abréviations

Remerciements

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | Introduction | 1 |
| 1.1 | La réaction d'ubiquitylation | 1 |
| 1.1.1 | Les types d'ubiquitylation..... | 1 |
| 1.1.2 | Les domaines de reconnaissance de l'ubiquitine..... | 2 |
| 1.1.3 | Rôles de l'ubiquitylation..... | 4 |
| 1.1.4 | Les ligases de l'ubiquitine..... | 4 |
| 1.2 | Les ligases CWH | 6 |
| 1.2.1 | Rôles physiologiques | 9 |
| 1.2.2 | Régulation..... | 15 |
| 1.3 | Le mécanisme des ligases HECT | 17 |
| 1.3.1 | Interactions entre les enzymes E2 et E3..... | 18 |
| 1.3.2 | Interactions entre l'enzyme E3 et l'ubiquitine..... | 19 |
| 1.3.3 | Le transfert de l'ubiquitine au substrat..... | 21 |
| 1.4 | Objectifs et hypothèses | 22 |
| 2 | Matériel et méthodes | 24 |
| 2.1 | Plasmides et anticorps | 24 |
| 2.2 | Transfection et extraction | 25 |
| 2.3 | Protéines de fusion | 26 |
| 2.4 | Chromatographie d'affinité | 27 |
| 2.5 | Ubiquitylation <i>in vivo</i> | 27 |
| 2.6 | Ubiquitylation <i>in vitro</i> | 28 |
| 2.7 | Western blot | 28 |
| 2.8 | Immunofluorescence | 29 |
| 2.9 | Quantification de la fluorescence et analyses statistiques | 30 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3 | Résultats..... | 31 |
| 3.1 | Ubiquitylation <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> de Grb2 par Itch..... | 31 |
| 3.2 | Ubiquitylation des fusions Grb2-Ub par Itch..... | 34 |
| 3.3 | Ubiquitylation <i>in vitro</i> de Grb2-Ub | 38 |
| 3.4 | Interaction des fusions Grb2-Ub avec la ligase Itch | 39 |
| 3.5 | Localisation cellulaire des fusions SH3-Ub..... | 42 |
| 4 | Discussion | 51 |
| 4.1 | Ubiquitylation de la protéine Grb2 | 51 |
| 4.2 | L'ajout de l'ubiquitine sur Grb2 augmente l'activité de la ligase Itch | 54 |
| 4.3 | La surface intrinsèque de liaison de l'ubiquitine sur le domaine HECT n'influence pas son activité ligase..... | 57 |
| 4.4 | Effet de l'ajout d'ubiquitine sur la localisation du substrat. .. | 59 |
| 5 | Conclusion et perspectives | 66 |
| 6 | Références..... | 68 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1: Mécanisme enzymatique de l'ubiquitylation..... | 3 |
| Figure 2: Structure des ligases CWH..... | 8 |
| Figure 3: Structure de la ligase Itch..... | 8 |
| Figure 4: Structure de UbcH5B~Ub-HECT ^{NEDD4L} | 19 |
| Figure 5: Interactions entre le domaine HECT et l'ubiquitine..... | 22 |
| Figure 6: Ubiquitylation de Grb2 par la ligase Itch..... | 33 |
| Figure 7: Ubiquitylation de la protéine de fusion Grb2-Ub..... | 35 |
| Figure 8: Localisation des constructions Grb2..... | 37 |
| Figure 9: Ubiquitylation de la protéine de fusion Grb2-Ub ^{AA} | 37 |
| Figure 10: Ubiquitylation in vitro de Grb2 et Grb2-Ub..... | 39 |
| Figure 11: Interaction des protéines Grb2 et Grb2-Ub avec Itch..... | 41 |
| Figure 12: Interaction du domaine HECT de Itch avec l'ubiquitine fusionnée à Grb2..... | 42 |
| Figure 13: Localisation cellulaire de Grb2 et les fusions avec l'ubiquitine..... | 44 |
| Figure 14: Effet de l'ajout de l'ubiquitine sur la localisation de Grb2..... | 45 |
| Figure 15: Colocalisation des constructions de Grb2 avec la ligase Itch..... | 46 |
| Figure 16: Effet de la surexpression de Itch sur la localisation de Grb2..... | 48 |
| Figure 17: Itch induit une localisation cytoplasmique de la protéine Grb2..... | 49 |
| Figure 18: Effet de l'ubiquitylation sur la localisation cellulaire d'endophiline..... | 50 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1: Amorces utilisées pour le clonage des différentes constructions de plasmide..... | 25 |
| Tableau 2: Liste des anticorps utilisés pour le western blot..... | 30 |

Liste des abréviations

| | |
|--------------|--|
| AIP4 | Atrophin-1-interacting protein 4 |
| β -PIX | β -p21-activated kinase-interactive exchange factor |
| BCL2 | B-cell lymphoma 2 |
| BID | BH3 domain interacting death agonist |
| BSA | Bovine serum albumin (albumine de sérum bovin) |
| CCS | Cosmic calf serum |
| CK1 α | Caséine kinase 1 α |
| CKIP | Casein kinase-2 interacting protein |
| COS-7 | CV-1 in origin and carrying SV40 genetic material |
| CRM1 | Chromosomal region maintenance 1 |
| CXCR | Chemokine (C-X-C Motif) receptor |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole |
| DD | Death domain |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle medium |
| DUB | Des-ubiquitinating enzyme |
| DVL | Dishevelled |
| E1 | Ubiquitin activating enzyme (enzyme d'activation de l'ubiquitine) |
| E2 | Ubiquitin conjugating enzyme (enzyme de conjugaison de l'ubiquitine) |
| E3 | Ubiquitin ligase (ligase de l'ubiquitine) |
| EGF | Epidermal growth factor (facteur de croissance épidermique) |
| ENaC | Epithelial sodium channel |
| ERK | Extracellular signal-regulated kinase |
| FAM | Fat facet in mouse |

| | |
|--------------|---|
| FLIP | FLICE-like inhibitory <i>protein</i> |
| FYN | FGR-YES related new gene |
| FZD | Frizzled |
| GFP | Green fluorescent protein |
| GLI | Glioblastoma associated oncogene |
| GRB2 | Growth factor receptor binding protein 2 |
| GSK3 β | Glycogene synthase kinase 3 β |
| GST | Glutathion S-transferase |
| HA | Hemagglutine |
| HECT | Homologous to E6-AP C-terminus |
| HEK-293T | Human embryonic kidney 293T |
| Hh | Hedgehog |
| hnRNP C | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| IFN | Interferon |
| I κ B | Inhibitor of NF κ B |
| IKK | I κ B kinase |
| IL | Interleukin |
| IL-1R | IL1 receptor |
| JNK | JUN N-terminal kinase |
| JUN | de Junana, nombre 17 en japonais |
| LATS1 | Large tumor suppressor 1 |
| LRP | LDL receptor related protein |
| LSB | Loading sample buffer |

| | |
|----------------|--|
| MAP | Mitogen-activated protein |
| MAPK | MAP kinase |
| MDM2 | Murine double-minute p53 binding protein |
| MKK | MAPK-activated protein kinase |
| N4BP1 | NEDD4 binding protein 1 |
| NaCl | Sodium chloride |
| NDFIP | Nedd4 family interacting protein |
| NEDD4 | Neural precursor cell expressed developmentally down regulated protein 4 |
| NEMO | NF- κ B Essential Modulator |
| NES | Nuclear export signal (signal d'export nucléaire) |
| NF- κ B | Nuclear factor kappa B |
| NGS | Normal goat serum |
| NLS | Nuclear localization signal (signal d'import nucléaire) |
| NORE1 | Novel RAS effector 1 |
| NTD | N-terminal domain |
| PAR6 | Protease-activated receptors 6 |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCNA | Proliferating cell nuclear antigen |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PDK1 | 3-phosphoinositide-dependant protein kinase-1 |
| PFA | Paraformaldehyde |
| PKA | Protein kinase A |
| PRD | Prolin rich domain |
| PTCH1 | Patched 1 |

| | |
|----------|--|
| PTEN | Phosphatase and tensin homolog |
| RAS | Rat sarcoma virus |
| RASGAP | Ras GTPase-activating protein |
| RASSF5 | Ras association domain family member 5 |
| RHOA | Ras homolog gene family, member A |
| RING | Really interesting new gene |
| rLUC | renilla luciferase |
| ROBO | Roundabout |
| ROS | Reactive oxygene species |
| RSP5 | Reverse SPT-phenotype protein 5 |
| RTK | Récepteurs tyrosine kinase |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulfat polyacrylamide gel electrophoresis |
| SGK1 | Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 |
| SH2 | SRC homology domain 2 |
| SH3 | SRC homology domain 3 |
| SM | Standard material |
| SMAD | Small (<i>C. elegans</i>) et mad (Mothers against decapentaplegic homolog) |
| SMO | Smoothened homolog |
| SMURF | SMAD ubiquitination regulatory factor 1 homolog |
| SNX | Sorting nexin |
| SOS-1 | Son of sevenless homolog 1 |
| SRC | Sarcoma virus |
| STAM1 | Signal transducing adapter molecule 1 |
| TAB1 | TAK1-binding protein 1 |

| | |
|--------------|--|
| TAK1 | TGF- β -activated kinase 1 |
| t-Bid | truncated Bid |
| TGF- β | Transforming growth factor beta |
| Th | T-helper cells |
| THIEG1 | TGF- β -inducible early growth response protein 1 |
| TIM | TRAF-interacting motif |
| TLR | Toll-like receptor |
| TNF α | Tumor necrosis factor α |
| TNFR | TNF receptor |
| TRADD | TNF-receptor associated death domain protein |
| TRAF6 | TNF receptor-associated factor 6 |
| TRCP | Transducing repeat containing protein |
| TREG | T cell regulatory |
| TRIF | TIR domain containing adaptor inducing interferon β |
| TYK | Tyrosine kinase |
| Ub | Ubiquitine |
| UBA | Ubiquitin associated |
| UBD | Ubiquitin binding domain (domaine de reconnaissance de l'ubiquitine) |
| UIM | Ubiquitin interacting motif |
| Wnt | Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site |
| WW | Tryptophan-tryptophan domain |
| WWP1 | WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 |
| WWP2 | WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2 |

Remerciements

Je tiens à exprimer ma plus grande gratitude à ma directrice de recherche, madame Annie Angers, qui m'a permis de réaliser ma maîtrise dans son laboratoire. Vos conseils, encouragements, disponibilité, encadrement, rigueur scientifique, aide financière, accompagnés d'une qualité humaine et professionnelle m'ont poussé à aller au bout de mes capacités pour réussir ce projet. Je vous témoigne toute ma reconnaissance.

Je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté cette tâche, prenant un moment de leur temps pour corriger et évaluer mon travail.

Je remercie mes collègues de laboratoire, Guillaume, Keivan et Riham, pour votre soutien et camaraderie, créant un environnement de travail stimulant. J'ai apprécié travailler avec vous.

Je remercie sincèrement mes parents qui ont fait beaucoup de sacrifices pour ma réussite, et tous les membres de ma famille pour leur accompagnement et leurs encouragements, particulièrement dans les moments difficiles.

Je remercie également mes cousins Soukeyna et MarFall pour leur accueil, soutien et aide. Vous avez beaucoup contribué à mon adaptation à Montréal et à la réussite de ce projet.

Je remercie mon cousin et ami Saer pour ses conseils, et son aide morale.

Finalement, je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin à l'occasion de la réalisation de ce projet.

*Je dédie ce mémoire à mon père, Moctar Gueye,
qui est pour moi une référence.*

1 Introduction

1.1 La réaction d'ubiquitylation

L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés présente dans tous les tissus des organismes eucaryotes. L'ubiquitylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'établissement d'une liaison peptidique entre l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine et l'amine de la chaîne latérale d'une lysine du substrat. Ce «branchement» de la chaîne d'acides aminés modifie profondément la structure de la protéine cible. Le mécanisme d'ubiquitylation est médiée par la coordination d'une enzyme d'activation de l'ubiquitine E1, une enzyme de conjugaison E2 et une ligase de l'ubiquitine E3 (Figure 1A) (Hershko and Ciechanover, 1998). La ligase E3 détermine la spécificité de la réaction car elle interagit avec les substrats. L'ubiquitylation régule ainsi plusieurs processus biologiques en modifiant l'activité des protéines ciblées.

1.1.1 Les types d'ubiquitylation

En plus de l'ajout d'une molécule (monoubiquitylation), ou plusieurs molécules d'ubiquitine sur différentes lysines (multiubiquitylation), une chaîne d'ubiquitine (polyubiquitylation) peut se former sur une protéine. La polyubiquitylation consiste en une liaison entre le groupe carboxyl Gly76 d'une ubiquitine et un résidu du groupe amine Met1 ou une des 7 lysines de l'ubiquitine déjà liée au substrat (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 et Lys63) (Ikeda and Dikic, 2008) (Figure 1B).

La monoubiquitylation et la multiubiquitylation sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires, tels la réparation de l'ADN, le transport de récepteurs et le bourgeonnement viral (Hicke, 2001). L'ubiquitylation avec une chaîne d'ubiquitine formée via la Lys48 est dominante et cause la dégradation protéasomale, tandis qu'une ubiquitylation via la Lys29 favorise la dégradation lysosomale des substrats (Chastanger et al., 2006). La chaîne d'ubiquitine Lys11 est

connue pour réguler la progression du cycle cellulaire en dégradant des protéines qui y sont associées (Xu et al., 2009). Les chaînes d'ubiquitine Lys29 et Lys33 s'associent à des ligases de la famille U-box qui régulent la réponse au stress (Hatakeyama et al., 2001). La chaîne d'ubiquitine formée par Lys63 n'est pas protéolytique et joue un rôle dans la réparation de l'ADN, la réponse inflammatoire et l'endocytose (Pickart and Fushman, 2004). En plus des lysines, une chaîne d'ubiquitine est spécifique au résidu Met1, formant une chaîne linéaire, et joue un rôle dans la voie de signalisation du NF- κ B (Iwai, 2011; Kirisako et al., 2006). La chaîne de polyubiquitine Lys63 est linéaire alors que la chaîne Lys48 est dite fermée avec des interactions intra-chaînes entre les molécules d'ubiquitine (Varadan et al., 2002). La nature de l'embranchement a un impact sur la conformation de la chaîne d'ubiquitine qui sera reconnue selon cette spécificité par des protéines ayant un domaine de reconnaissance de l'ubiquitine.

1.1.2 Les domaines de reconnaissance de l'ubiquitine

L'ubiquitine liée à un substrat est reconnue par des protéines possédant des domaines de reconnaissance de l'ubiquitine (*Ubiquitin binding domain* ou UBD). Le premier domaine de liaison de l'ubiquitine UIM (*ubiquitin interacting motif*) a été identifié dans la protéine S5a/Rpn10, une sous unité du protéasome (Young et al., 1998). Environ 20 familles d'UBD ont été identifiées, classées en fonction de leur mode de reconnaissance de l'ubiquitine et leur structure. La plupart des UBD utilisent une structure en hélice α pour interagir avec le feuillet- β hydrophobe de l'ubiquitine autour du résidu Ile44, tandis que d'autres reconnaissent des surfaces différentes (Hicke et al., 2005). Bien que les UBD reconnaissent la monoubiquitylation, certains ciblent des types spécifiques de chaînes d'ubiquitine. Le domaine UBA (*ubiquitin associated*) de la protéine Rad23, impliquée dans l'adressage des substrats au protéasome pour leur dégradation, reconnaît préférentiellement les chaînes d'ubiquitine Lys48 (Raasi et al., 2004). Alors que le domaine UIM de la protéine Rap80, impliquée dans la réparation des dommages de l'ADN, a une

affinité de liaison des chaînes d'ubiquitine Lys63 (Sims and Cohen, 2009). Les propriétés structurales et biochimiques des protéines contenant les UBD sont en lien avec la spécificité de reconnaissance des substrats ubiquitylés. Une des caractéristiques des UBD, est l'interaction faible avec l'ubiquitine (Kd de l'ordre des micromolaires), ce qui est compatible avec une interaction transitoire (Fisher et al., 2003). Les UBD sont considérés comme des adaptateurs qui participent à la reconnaissance d'un substrat ubiquitylé et à la transduction du signal biologique déclenchée par cette ubiquitylation (Harper and Schulman, 2006).

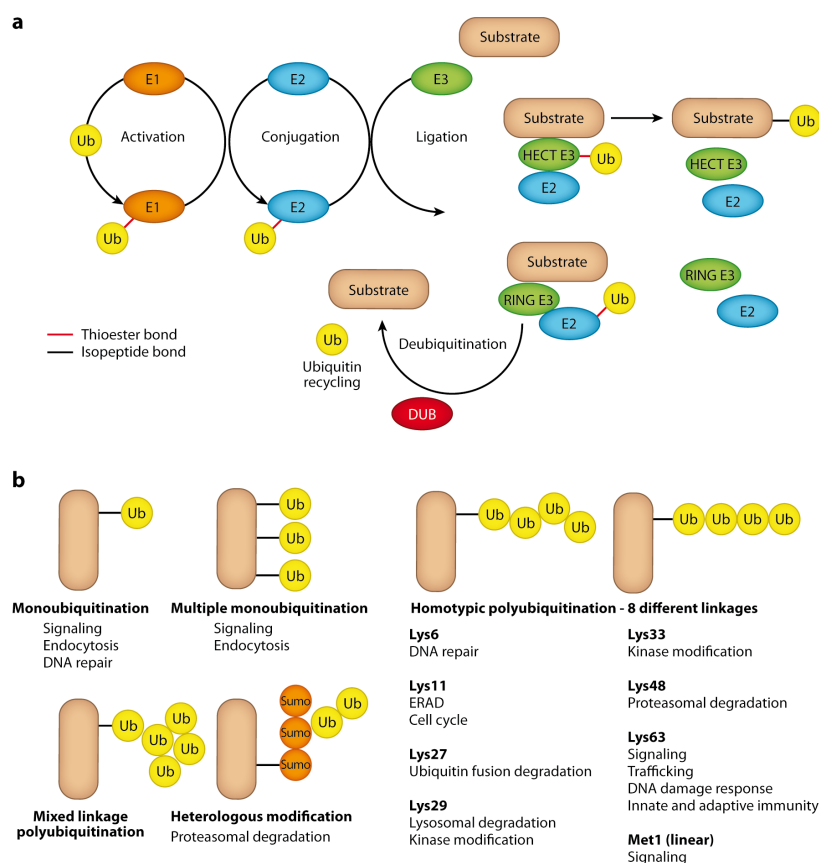


Figure 1: Mécanisme enzymatique de l'ubiquitylation. (a) La coordination de l'activité de l'enzyme d'activation E1, l'enzyme de conjugaison E2, et la ligase de l'ubiquitine E3 est requis pour l'ubiquitylation d'un substrat. On distingue l'activité des 2 types de ligases E3, les RING et les HECT. L'ubiquitylation est réversible par les enzymes de desubiquitylation. (b) Quelques rôles des types de chaînes d'ubiquitine (Husnjak and Dikic, 2012).

1.1.3 Rôles de l'ubiquitylation

La diversité des types d'ubiquitylation est liée à la diversité de leurs effets sur les protéines qu'elles modifient (Weissman, 2001). Ainsi l'ubiquitylation est impliquée dans plusieurs processus tels l'endocytose, la réparation du cycle cellulaire et la réaction inflammatoire. Plusieurs protéines membranaires chez la levure telles Ste2p, Gap1p et Fur4p sont monoubiquitylées par la ligase Rsp5p, ce qui induit leur internalisation. Gap1p et Fur4p seront ensuite polyubiquitylé en Lys63, qui permet leur fusion avec la vacuole pour y être dégradés (Galan et al., 1996; Springael et al., 1999).

Au niveau de la réplication, l'ubiquitylation agit sur le PCNA (proliferating cell nuclear antigen), une protéine qui augmente la processivité de l'ADN polymérase. Suite à un dommage de l'ADN lors de la réplication, la monoubiquitylation de PCNA induit une forme répliquative de la polymérase qui prône une erreur, alors que la polyubiquitylation rectifie le signal d'erreur et répare l'ADN (Zhang et al., 2011).

L'ubiquitylation joue un rôle important dans la voie du facteur de transcription NF- κ B. Lors de l'activation de cette voie, le récepteur d'interleukine 1 (IL-1R) cause le recrutement de la protéine TRAF6 qui est une ligase E3 de l'ubiquitine. L'autoubiquitylation en Lys63 de TRAF6 recrute des sous-unités régulatrices TAB2 et NEMO qui lient respectivement les protéines TAK1 et IKK. TAK1 active par phosphorylation IKK, ce qui conduit à la polyubiquitylation en Lys48 et la dégradation de l'inhibiteur I κ B. NF- κ B migre dans le noyau et induit la transcription (Skaug et al., 2009).

1.1.4 Les ligases de l'ubiquitine

L'enzyme d'activation E1 forme une liaison thioester, ATP dépendante, entre une cystéine à son site actif et l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine. L'ubiquitine ainsi activée est liée par transthioylation à une cystéine de l'enzyme E2. Dans la troisième étape, l'enzyme E3 lie

E2~Ub (~ liaison thiol) ainsi que le substrat, et catalyse la formation d'une liaison isopeptidique entre l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine et le groupe amine d'une lysine du substrat. Les enzymes E3 déterminent la spécificité de la réaction puisqu'elles lient le substrat. On distingue principalement 2 groupes d'enzymes E3 : les enzymes E3 de type RING (Really interesting new gene), et les enzymes E3 de type HECT (Homologous to E6-associated protein C-Terminus).

Les enzymes E3 de type RING lient l'enzyme E2 pour faciliter le transfert de l'ubiquitine au substrat en utilisant un mécanisme qui implique le transfert direct de l'ubiquitine à partir de l'enzyme E2 à la protéine cible. Le domaine RING est caractérisé par la présence d'un motif riche en cystéine et en histidine CX₂CX(9-39)CX(1-3)HX(2-3)C/HX₂CX(4-48)CX₂C dont l'espacement entre ces résidus permet l'incorporation de deux atomes de zinc et c'est cette structure en « doigt de zinc » qui va permettre la liaison avec E2~Ub et le transfert de l'ubiquitine sur le substrat (Joazeiro and Weissman, 2000). Les enzymes RING servent d'adaptateur lors du transfert de l'ubiquitine au substrat.

La première ligase de l'ubiquitine clonée contenait un domaine de type HECT. Contrairement aux RING, les enzymes HECT lient de façon transitoire l'ubiquitine avant son transfert au substrat, et catalysent elles-mêmes la réaction d'ubiquitylation. La caractéristique commune des E3 HECT est leur domaine catalytique en C-terminal. Isolé, le domaine HECT est capable de se lier à E2~Ub, formant une liaison E3~Ub intermédiaire, pour ensuite catalyser la liaison de l'ubiquitine au substrat ou à une ubiquitine distale lors de l'élongation d'une chaîne d'ubiquitine (Huibregtse et al., 1995).

Ce sujet de recherche portera principalement sur le mécanisme et la régulation de Itch, une ligase E3 de la famille des HECT.

1.2 Les ligases CWH

Les ligases CWH (C2-WW-HECT) constituent une sous famille dans les E3 HECT, et sont les plus étudiées grâce à leur architecture modulaire permettant des interactions intermoléculaires et un recrutement dans des endroits subcellulaires (Shearwin-Whyatt et al., 2006). Nedd4 (Neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated 4) fut la première ligase de type CWH identifiée. Sa séquence fut isolée d'une banque d'ADNc d'embryons de souris lors d'un criblage cherchant à identifier des gènes dont l'expression était modifiée au cours du développement du système nerveux central (Kumar et al., 1992). La sous-famille compte neuf membres chez les mammifères. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, un seul membre connu, Rsp5p, régule un certain nombre de processus cellulaires tels l'héritage mitochondrial, l'internalisation des récepteurs de surface cellulaire, et la transcription. Chez la drosophile, Nedd4 est impliqué dans le guidage axonal par l'inhibition de la signalisation par le récepteur Robo, Smurf est un antagoniste du facteur de croissance TGF- β tandis que le suppresseur de deltex (Su(dx)) régule négativement la signalisation par le récepteur Notch (Ingham et al., 2004). La famille CWH s'est développée chez les mammifères, et il existe plusieurs formes d'épissage de ces ligases, montrant leur complexité, ce qui mène à des fonctions redondantes et spécialisées (Figure 2).

Les ligases CWH ont un domaine C2 à leur extrémité N-terminale. Ce domaine a été identifié dans la protéine kinase C et est un domaine de liaison aux phospholipides membranaires (Rizo and Sudhof, 1998). En effet, le domaine C2 se trouve dans de nombreuses protéines qui fonctionnent en association avec des phospholipides membranaires comme RasGAP, Synaptotagmin et plusieurs phospholipases (Ponting and Parker, 1996). Il est d'environ 120 acides aminés et structurellement, partage un pli global comprenant huit feuilletts β anti-parallèles assemblés dans une architecture en β sandwich avec des boucles souples sur le haut et le bas. Le

domaine C2 permet aux ligases CWH de s'associer aux membranes en liant les phospholipides. Chez la levure, le domaine C2 de la ligase Rsp5p interagit avec les phosphoinositides de la membrane des endosomes et permet à la ligase de réguler le trafic vésiculaire (Dunn et al., 2004). Le domaine C2 de la ligase Nedd4 s'associe à la membrane plasmique par interaction avec les phospholipides dépendante du calcium (Plant et al., 1997). Le domaine C2 de la ligase Smurf1 est indispensable à son association avec la membrane plasmique (Suzuki et al., 2002).

Les ligases CWH sont caractérisées par un ou plusieurs domaines WW centraux. Le domaine WW est un petit module composé d'environ 35 acides aminés et doit son nom à la présence de deux résidus tryptophane conservés espacés de 20 à 22 acides aminés. La structure du domaine WW montre trois feuillets β anti-parallèles qui forment une surface de liaison au ligand, avec une poche de liaison conservée qui est générée par la juxtaposition des deux résidus tryptophane. Les domaines WW sont présents dans une grande variété de protéines et lient principalement les motifs riches en proline, comme le motif PPxY (Pro, Pro, x, Tyr), le motif PPLP (Pro, Pro, Leu, Pro), le motif PR (Pro, Arg) et le motif phosphosérine/thréonine (pS/T) (Bedford et al., 1997; Bedford et al., 1998; Chen and Sudol, 1995; Yaffe et al., 1997). Les domaines WW de la famille des CWH reconnaissent principalement les motifs PPxY mais peuvent aussi lier les résidus pS/T et interagir avec d'autres ligands (Murillas et al., 2002).

La ligase Itch de cette famille possède un domaine supplémentaire riche en proline nommé PRD (*proline riche domain*) localisé entre les domaines C2 et WW, une région de reconnaissance du domaine SH3 des protéines (Pawson, 1995), (Figure 3). Grâce aux domaines WW et PRD, Itch est capable d'interagir avec diverses protéines dans la cellule.

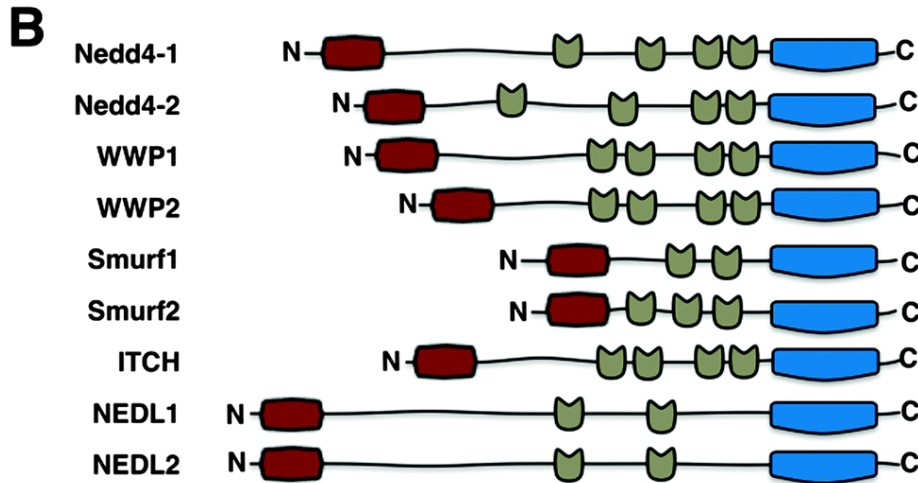
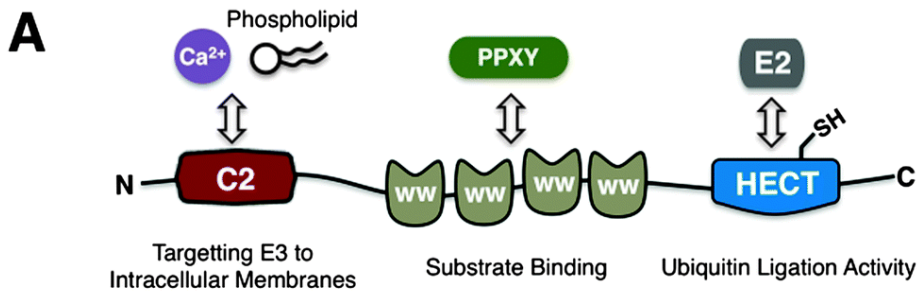


Figure 2: Structure des ligases CWH. (A) Les ligases CWH sont constituées d'un domaine C2 N-terminal, 2 à 4 domaines WW dans la région centrale et d'un domaine HECT C-terminal. (B) Structure des différentes ligases CWH humaines. (An et al., 2014).

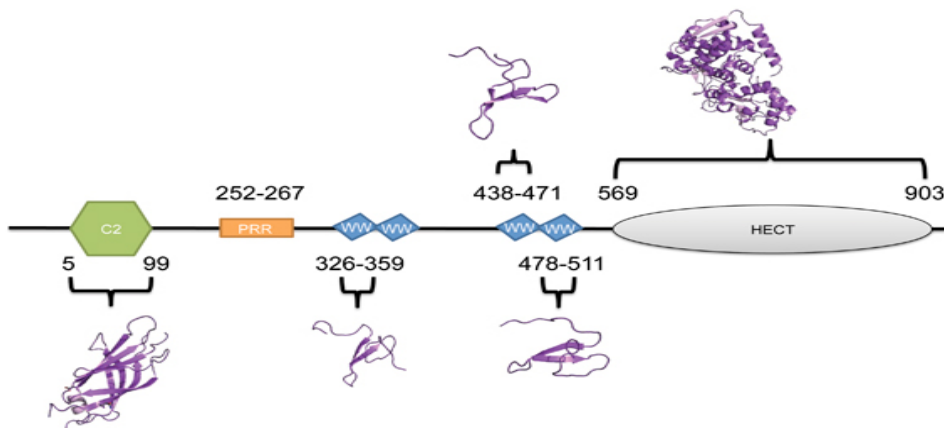


Figure 3: Structure de la ligase Itch. Itch est composé d'un domaine C2 qui lui permet de s'associer aux membranes, un domaine PRR ou PRD reconnu par les motifs SH3, les domaines WW reconnaissent les motifs PPXY et un domaine HECT responsable de son activité ligase. (Venuprasad et al., 2015).

1.2.1 Rôles physiologiques

En modifiant l'activité des protéines, les ligases CWH sont impliquées dans une panoplie de processus physiologiques. Elles participent dans les voies qui régulent la prolifération cellulaire, la différenciation, l'immunité et l'apoptose. Les rôles physiologiques les mieux compris concernent les ligases Itch, WWP2, et Smurf-2. Les travaux de notre laboratoire concernent principalement la ligase Itch.

Voies de signalisation cellulaire

Plusieurs voies de signalisation sont régulées par l'activité ligase de Itch et d'autres ligases de la famille CWH. La voie Wnt ou voie de la β -caténine est une voie de signalisation importante dans le développement des vertébrés et des invertébrés. Elle est impliquée dans l'embryogenèse et la morphogenèse et joue un rôle majeur dans la programmation cellulaire des cellules souches vers la différenciation ou la prolifération (Logan and Nusse, 2004). La protéine Dvl joue un rôle très important dans le mécanisme de signalisation Wnt. Les ligands Wnt sont reconnus par des récepteurs Fzd. En absence de stimulation des récepteurs Fzd, la β -caténine est phosphorylée par les kinases GSK3 β et CK1 α , et se retrouve dans un complexe de destruction avec l'axine et la protéine APC. Cette phosphorylation permet sa reconnaissance par son ubiquitine-ligase TRCP, qui conduit à sa dégradation dans le protéasome. L'activation du récepteur Fzd par un corécepteur Lrp5/6 conduit à la formation d'un complexe avec la protéine cytoplasmique Dvl, protéine adaptatrice dont l'activation par phosphorylation permet la rupture du complexe cytoplasmique où est engagé l'élément central de cette voie, la β -caténine, activateur transcriptionnel des gènes cibles (Logan and Nusse, 2004). Itch joue un rôle dans cette voie en favorisant l'ubiquitylation de la forme phosphorylée de Dvl ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome (Wei et al., 2012). Itch régule ainsi négativement la voie de signalisation Wnt.

La signalisation Notch a un rôle essentiel dans la régulation de la communication de

cellule-cellule au cours de l'embryogenèse, la prolifération cellulaire, la différenciation, et l'apoptose (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Notch est un récepteur transmembranaire, clivé suite à la liaison de son ligand. Le produit clivé migre vers le noyau, s'associe à un complexe de facteur de transcription et de coactivateur, qui déclenche la transcription de gènes spécifiques (Brou, 2009). La ligase Itch interagit avec le récepteur Notch, cause son ubiquitylation et permet sa dégradation dans le protéasome. Itch régule négativement la voie de Notch ainsi que les voies qui y sont associées (Qiu et al., 2000).

Les TGF β sont une famille de facteurs de croissance impliquée dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire, mais aussi dans de nombreux autres processus comme l'inflammation. La ligase Itch interagit avec Smad7, inhibiteur de la voie TGF β et cause son ubiquitylation et sa dégradation par le protéasome. L'inhibition de Smad7 par Itch conduit à l'activation des R-Smad et à la voie de TGF- β (Park et al., 2015). Itch active ainsi la transition épithélio-mésenchymateuse induite par le facteur de croissance TGF β (Park et al., 2015). La ligase Smurf-2 est aussi antagoniste de la voie TGF- β . Smurf2 interagit avec la protéine Smad 7. Le domaine NTD (*N-terminal domain*) de Smad7 lie le domaine HECT de Smurf2, et l'interaction cause la relocalisation du complexe du noyau au cytoplasme et facilite le recrutement de l'enzyme de conjugaison E2 UbcH7 (Ogunjimi et al., 2005). Smurf2 cause l'ubiquitylation du récepteur de TGF- β , terminant ainsi la signalisation induite par le ligand.

Apoptose et régulation du cycle cellulaire

Itch interagit avec plusieurs protéines intervenant dans le processus d'apoptose. En régulant des activateurs et des inhibiteurs de la mort cellulaire, Itch a un effet anti-apoptotique et pro-apoptotique, d'où son importance dans le ciblage des maladies qui y sont associées.

Dans les conditions apoptotiques, divers signaux induits par des stress intracellulaires ou d'origine extracellulaire sont apportés aux mitochondries par des protéines *BH3-only*, dont Bid.

Cette dernière sous la forme tronquée par protéolyse, t-Bid interagit avec les protéines mitochondriales de la famille BCL2, en favorisant l'ouverture du pore de transition qui cause la sortie du cytochrome c de la mitochondrie activant la caspase 3 qui déclenche l'apoptose (Li et al., 1998). La ligase Itch interagit avec t-Bid, suite à la stimulation à l'EGF, et cause sa dégradation par le protéasome (Azakir et al., 2010). Itch inhibe ainsi la voie apoptotique dans certains types de cellules.

La cytokine proinflammatoire inductrice de mort TNF, dépendamment du type cellulaire, reconnaît deux types de récepteurs TNFR. TNFRII possédant un motif TIM qui reconnaît une protéine adaptatrice, TRAF, à l'origine de l'activation de voies de signalisation aboutissant au facteur de transcription NFκB. TNFRI possède un domaine DD (*death domain*) qui lui permet d'interagir avec la protéine adaptatrice TRADD qui est à l'origine de l'activation de la caspase 8, induisant l'apoptose (Dempsey et al., 2003). L'activité NFκB protège la cellule de l'apoptose, en activant une protéine c-Flip inhibitrice de la caspase 8 (Thome and Tschopp, 2001). Cependant l'activation de la ligase Itch par JNK, cause l'ubiquitylation et la dégradation de c-Flip par le protéasome. Itch inhibe l'activité de NFκB et induit l'apoptose (Chang et al., 2006).

La protéine p53 est un suppresseur de tumeur, qui régule le cycle cellulaire et l'apoptose, dont la dérégulation est impliquée dans plusieurs cancers. Les protéines p63 et p73 appartiennent à la famille p53, et partagent une architecture modulaire commune. Elles induisent l'arrêt du cycle cellulaire et la transcription des gènes impliqués dans l'apoptose (Melino et al., 2003). Itch interagit par ses domaines WW avec les motifs PPXY des suppresseurs de tumeurs p63 et p73, et non avec p53, permet leur ubiquitylation et leur dégradation, diminuant l'activité transcriptionnelle de ces protéines (Rossi et al., 2006; Rossi et al., 2005).

La protéine LATS1 est une kinase serine/thréonine identifiée comme un homologue du suppresseur de tumeur chez la drosophile LATS, acteur central dans la voie Hippo-LATS, qui

joue un rôle important dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et la différenciation des cellules souches (Justice et al., 1995). La surexpression de LATS1 inhibe considérablement la croissance des cellules tumorales en induisant soit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M ou l'apoptose (Xia et al., 2002). La ligase Itch utilise ses domaines WW pour interagir avec les motifs PPXY de LATS1. La surexpression de Itch réduit l'activité kinase de LATS1, favorise sa polyubiquitylation et sa dégradation par le protéasome (Ho et al., 2011).

La protéine RASSF5/NORE1 de la famille RAS est un facteur apoptotique, suppresseur de la croissance tumorale en induisant l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S (Bee et al., 2010; Calvisi et al., 2009). Itch interagit avec RASSF5, induit sa polyubiquitylation et sa dégradation par le protéasome. Itch inhibe l'activité apoptotique de RASSF5 (Suryaraja et al., 2013).

Réponse immunitaire

Plusieurs substrats de Itch sont impliqués dans la réponse immunitaire. La perte de Itch (Itch^{-/-}) chez la souris étant accompagnée de déficiences dans l'inflammation et l'immunité, d'où le nom Itchy mice (Perry et al., 1998), l'identification de ces substrats ont permis de mettre en lumière le rôle de Itch dans ce processus.

En réponse à la stimulation de l'antigène, les cellules naïves auxiliaires T (Th) se différencient en cellules Th1 et Th2, classées en fonction des cytokines qu'elles produisent (Mosmann et al., 1986; Paul and Seder, 1994). Les cellules Th1 produisent de l'interleukine 2 (IL-2) et l'interféron γ (IFN- γ), et jouent un rôle important dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire contre des pathogènes. Les cellules Th2 produisent de l'IL-4, IL-5 et IL-10, et sont impliqués dans l'immunité humorale et la réponse allergique (Abbas et al., 1996). La protéine Jun-B, facteur de transcription de la famille Jun, est impliquée dans la différenciation des cellules Th2. Jun-B se lie au promoteur IL-4 qui conduit à l'expression du gène et à la production d'interleukine 4 (Li et al., 1999). La ligase Itch interagit, de par ses domaines WW

avec le motif PPXY de Jun-B, causant son ubiquitylation et sa dégradation par le protéasome. La protéine c-Jun impliquée dans la différenciation des cellules Th2, interagit aussi avec les domaines WW d'Itch. Itch atténue la différenciation des cellules Th2, et la réponse immunitaire (Fang et al., 2002).

La kinase p38 α joue un rôle crucial dans le signal inflammatoire dérivé des récepteurs des cytokines. p38 α est activé par phosphorylation dans la voie des MAP kinases par MKK3 et MKK6 (Ashwell, 2006). L'activation de p38 α est associée à des maladies inflammatoires de la peau (Johansen et al., 2005). La protéine Tab1 interagit avec p38 α indépendamment de la voie des MAPK, ce qui renforce son autophosphorylation et son activation (De Nicola et al., 2013). La ligase Itch interagit directement avec la protéine Tab1, cause son ubiquitylation et sa dégradation par le protéasome. Itch inhibe l'activation de p38 α et réduit l'inflammation de la peau (Theivanthiran et al., 2015).

La ligase WWP2 intervient dans les voies de la réponse inflammatoire et l'immunité en liaison avec la protéine TRIF. TRIF est une protéine adaptatrice de la voie de TLR3 et est impliquée dans l'activation de facteurs de transcription (Oshiumi et al., 2003). La ligase WWP2 interagit avec TRIF avec son deuxième domaine WW, induisant son ubiquitylation par une chaîne d'ubiquitine K48 et sa dégradation par le protéasome. La dégradation de TRIF inhibe la production d'interférons et de cytokines pro-inflammatoires (Yang et al., 2013). WWP2 régule ainsi négativement la réaction inflammatoire.

Itch et les protéines à domaine SH3

SH3 (Src homoly 3) est un domaine protéique d'environ 60 acides aminés de la famille de protéines Src présent chez les procaryotes et les eucaryotes (Whisstock and Lesk, 1999). Le domaine SH3 reconnaît les séquences riches en proline PxxP des ligands (Mayer, 2001). Itch de par son domaine riche en proline, interagit avec plusieurs protéines à domaine SH3. Endophiline

est une protéine contenant un domaine SH3 impliquée dans l'endocytose dépendante de la clathrine. Trois isoformes d'endophiline ont été identifiées : endophiline A1 spécifique au cerveau, endophiline A2 exprimé de façon ubiquitaire et endophiline A3 exprimé dans le cerveau et les testicules (de Heuvel et al., 1997). Itch interagit avec le domaine SH3 d'endophiline A1 et cause son ubiquitylation (Angers et al., 2004). SNX9 (sorting nexin 9) appartient à une famille de protéine impliquée dans l'endocytose et le trafic intracellulaire. SNX9 participe dans l'endocytose du récepteur de transferrine (Lundmark and Carlsson, 2009). Le domaine PRD de Itch interagit avec le domaine SH3 de SNX9, ce qui cause son ubiquitylation et sa dégradation. Itch régule le niveau intracellulaire de SNX9 (Baumann et al., 2010).

Des travaux récents de notre laboratoire ont montré l'interaction entre la ligase Itch et la protéine Grb2, à domaine SH3 (Desrochers G, non publié). Grb2 est une protéine ubiquitaire, impliquée dans diverses fonctions cellulaires et joue un rôle crucial dans plusieurs voies de signalisation cellulaire (Giubellino et al., 2008). Structurellement, Grb2 contient deux domaines SH3 entourant un domaine SH2 (Lowenstein et al., 1992). Le domaine SH2 reconnaît les motifs phosphotyrosines pYXNX (où X représente un acide aminé quelconque), et permet à Grb2 d'interagir avec les récepteurs à activité tyrosine kinase. Les domaines SH3 via la reconnaissance des motifs riches en proline PXXP permettent à Grb2 d'interagir avec plusieurs protéines (den Hertog and Hunter, 1996). Le rôle le plus étudié de Grb2 est son implication dans la signalisation de l'EGF. Suite à l'activation du récepteur de l'EGF, le domaine SH2 de Grb2 interagit avec les phosphotyrosines du récepteur, et recrute par son domaine SH3 la protéine adaptatrice Sos1. Le complexe Grb2-Sos1 active la protéine membranaire Ras, s'ensuit une cascade de phosphorylation Ras/MEK/Erk, conduisant à l'activation des facteurs de transcription induisant une prolifération cellulaire (Suen et al., 1993). Le domaine PRD de la ligase Itch interagit avec le domaine SH3 de Grb2, ce qui cause son ubiquitylation (voire Thèse de Desrochers G, 2015).

1.2.2 Régulation

L'activité des ligases de l'ubiquitine ayant une grande influence sur des processus cellulaires très fondamentaux, il est logique de penser que leur activité est elle aussi étroitement régulée. Plusieurs mécanismes régulateurs ont été mis en évidence. L'autoinhibition, la phosphorylation par des kinases, la liaison à des activateurs et répresseurs, l'interaction avec des adaptateurs ou la liaison aux enzymes de dé-ubiquitylation (DUB), ont été démontrés comme mécanisme de régulation de l'activité des ligases.

Autoinhibition

Les ligases CWH adoptent une conformation inactive causée par une interaction intramoléculaire du domaine HECT avec une autre région de la protéine ce qui bloque leur accès à l'enzyme E2. L'état inactif de Itch est causé par l'interaction entre son domaine HECT et ses domaines WW2 et WW3 (Riling et al., 2015). Dans le cas de Nedd4-2 l'inhibition intramoléculaire est causée par la liaison de son domaine WW et son domaine HECT. Les ligases Nedd4-1, WWP2 et Smurf2 sont inhibées par la liaison de leur domaine C2 avec leur domaine HECT (Wiesner et al., 2007). Ces ligases dépourvues du domaine C2 sont douées d'une forte activité catalytique. Le domaine C2 de la ligase Nedd4-1 étant un domaine de liaison aux phospholipides dépendante du calcium, ce dernier peut lever l'état de son autoinhibition en liant le domaine C2, libérant ainsi le domaine HECT. Le calcium régule l'activité de la ligase Nedd4-1 (Wang et al., 2010).

La Phosphorylation

Plusieurs ligases CWH sont régulées par phosphorylation. La phosphorylation de Itch par la kinase JNK augmente son activité ligase envers ses substrats c-Jun et Jun-B (Gao et al., 2004). Le site de phosphorylation de JNK dans Itch est situé dans la région riche en proline sur les résidus serine 199, thréonine 222 et serine 232. La phosphorylation par JNK libère l'interaction

intramoléculaire entre les domaines de Itch (Gallagher et al., 2006). À l'opposé, la phosphorylation de la ligase Itch par la kinase Fyn sur le résidu tyrosine 371 dans le domaine WW3 inhibe l'activité de Itch envers Jun-B (Yang et al., 2006). Dépendamment du site de phosphorylation, la ligase Itch peut être activée ou inhibée par des kinases.

L'activité de la ligase Nedd4-2 est modulée par phosphorylation de résidus thréonine et sérine par la kinase SGK1. Cette phosphorylation survient lorsqu'un stimulus active la kinase SGK1 qui à son tour interagit par son motif PY avec le domaine WW de Nedd4-2 et permet de la phosphoryler, causant ainsi une diminution de son activité catalytique. Cette phosphorylation empêche Nedd4-2 d'ubiquityler son substrat ENaC, entraînant ainsi dans la cellule l'augmentation de l'entrée du sodium (Debonneville et al., 2001).

La ligase Smurf1 est phosphorylée par la kinase PKA sur un résidu thréonine localisé dans son domaine WW. Cette phosphorylation module la préférence de Smurf1 entre deux protéines ayant des rôles opposés dans le développement de l'axone, Par6 et RhoA dans les neurones de l'hippocampe. Le développement de l'axone est influencé par l'état de phosphorylation de Smurf1 (Cheng et al., 2011).

Liaison à d'autres protéines

Les ligases CWH peuvent interagir avec des activateurs ou répresseurs, qui modulent leur activité. Itch peut interagir avec des protéines adaptatrices afin de recruter des substrats et augmenter son activité. Les protéines adaptatrices Ndfip augmentent l'activité de plusieurs ligases CWH (Mund and Pelham, 2009; Oliver et al., 2006). La protéine Ndfip1 interagit par ses motifs PY avec les domaines WW de la ligase Itch, et augmente son activité ligase en facilitant la réaction de transthiolation entre Itch et l'enzyme E2 (Oliver et al., 2006; Riling et al., 2015). Ndfip1 en activant Itch cause la diminution de Jun-B et la production de cytokine des cellules Th (Oliver et al., 2006). La protéine Numb permet l'interaction entre Itch et le facteur de

transcription Gli1 de la voie Hedgehog (Di Marcotullio et al., 2006). Numb interagit avec les domaines WW de Itch d'une part et recrute Gli1 d'autre part qui permet l'interaction entre les motifs PPXY de Gli1 et le domaine WW1 de Itch. La liaison de Numb sur le domaine WW1 de Itch libère le domaine HECT, ce qui favorise l'ubiquitylation de Gli1 (Di Marcotullio et al., 2006). La protéine adaptatrice N4BP1 interagit avec les domaines WW de la ligase Itch et empêche par compétition son interaction avec ses substrats. N4BP1 inhibe l'activité d'auto-ubiquitylation de Itch et l'ubiquitylation de ses substrats p73 α , p63 et c-Jun. N4BP1 est un répresseur de l'activité de la ligase Itch (Oberst et al., 2007).

La ligase Nedd4-2 est phosphorylée sur les résidus serine, suite à l'activation des kinases SGK1 ou AKT. La protéine 14-3-3 lie les phosphoserines de Nedd4-2, et par compétition empêche la liaison au substrat ENaC. 14-3-3 est un répresseur de l'activité de Nedd4-2 (Ichimura et al., 2005).

Auto-ubiquitylation et dés-ubiquitylation

La ligase Itch subit une auto-ubiquitylation *in vivo* (Gallagher et al., 2006; Gao et al., 2004; Mouchantaf et al., 2006; Scialpi et al., 2008), qui cause sa dégradation par le protéasome (Mouchantaf et al., 2006), influençant ainsi son activité dans la cellule. L'auto-ubiquitylation de Itch peut être enlevée par la protéase de l'ubiquitine FAM /USPX9 membre des USPs (*ubiquitin-specific proteases*). La protéase FAM interagit avec la ligase Itch par ses domaines WW et stabilise son niveau intracellulaire en le dés-ubiquitylant. La signalisation cellulaire activant la ligase Itch régule son interaction avec FAM (Mouchantaf et al., 2006).

1.3 Le mécanisme des ligases HECT

La spécificité des ligases E3 HECT est la catalyse de 2 réactions : une transthioesterification dans laquelle l'ubiquitine est transférée de la cystéine catalytique de l'enzyme E2 à la cystéine du domaine HECT, et l'attaque de la liaison thioester HECT~Ub par

une lysine d'un substrat (Huibregtse et al., 1995). Le domaine HECT est composé de 2 lobes : un lobe N-terminal et un lobe C-terminal. Une liaison flexible entre les deux lobes permet des configurations différentes afin de faciliter l'activité du domaine HECT (Verdecia et al., 2003).

1.3.1 Interactions entre les enzymes E2 et E3

L'enzyme de conjugaison E2 se lie à l'ubiquitine, puis permet son transfert au domaine HECT de l'enzyme E3. Ce transfert nécessite une liaison entre les enzymes E2 et E3. Le site de liaison de l'enzyme E2 est localisé dans le lobe N du domaine HECT (Huang et al., 1999) alors que la cystéine qui doit recevoir l'ubiquitine se trouve dans le lobe C, ce qui suggère que les 2 cystéines de l'enzyme E2 et du domaine HECT doivent se juxtaposer pour le transfert de l'ubiquitine. Pour comprendre les mécanismes par lesquels l'ubiquitine est transférée des enzymes E2 à E3, plusieurs études ont rapporté une structure cristalline d'un complexe E2~Ub-HECT (Figure 4). Cette structure révèle des interactions entre les composants individuels de E2~Ub intermédiaire et les lobes N et C du domaine HECT, respectivement, importantes pour le transfert de l'ubiquitine de l'enzyme E2 au domaine HECT de la ligase E3. La comparaison de l'interface Ubch5B-HECT^{NEDD4L} avec celle de la structure du complexe Ubch7-HECT^{E6AP} (Kamadurai et al., 2009) révèle la spécificité des séquences du domaine HECT qui reconnaissent l'enzyme E2. Les surfaces parallèles de HECT^{NEDD4L} et HECT^{E6AP} interagissent avec le résidu Phe62 dans la boucle de Ubch5B et Ubch7, respectivement. Ce résidu est critique pour la liaison de l'enzyme E2 au lobe N du domaine HECT. Toutefois, l'identité de l'interaction avec la Phe62 diffère entre les domaines HECT. Par exemple, le résidu Tyr736 dans l'hélice 7 de HECT^{NEDD4L} établit des contacts clés avec Phe62 de Ubch5B. En revanche, dans HECT^{E6AP}, ce rôle est réalisé par Tyr694 dans l'hélice 8 (Kamadurai et al., 2009). La structure E2~Ub-HECT montre comment E2~Ub interagit avec l'enzyme E3 et l'orientation optimale afin de rapprocher les cystéines catalytiques des 2 enzymes et l'interaction de ces derniers pour le transfert de l'ubiquitine. Le fait

qu'une même surface de l'enzyme E2 interagisse avec des surfaces différentes dans le domaine HECT explique le fait que quelques E2 seulement interagissent avec une panoplie d'enzymes E3.

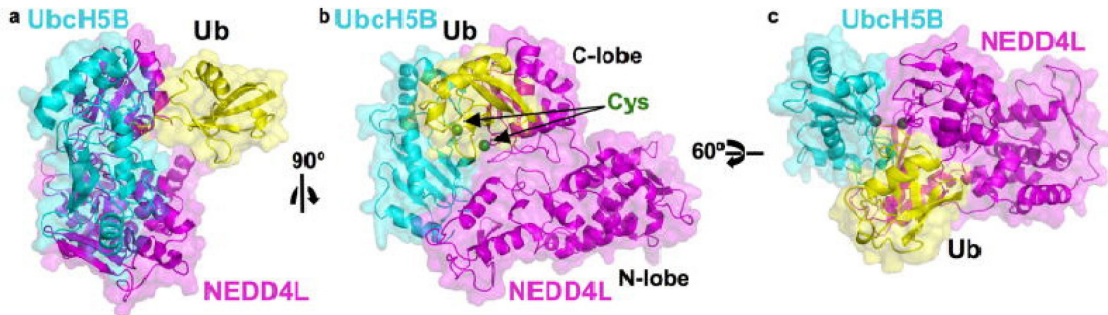


Figure 4: Structure de UbcH5B~Ub-HECT^{NEDD4L}. a-c. 3 vues du complexe UbcH5 (bleu)~Ub (jaune)- HECT^{NEDD4L} (cyan) séparées de 90° en b et 60° en c. (Kamadurai et al., 2009).

1.3.2 Interactions entre l'enzyme E3 et l'ubiquitine

La caractéristique importante des ligases HECT, est la liaison intermédiaire avec l'ubiquitine avant son transfert sur le substrat. Les ligases HECT sont responsables de la spécificité de la réaction d'ubiquitylation. Le site de liaison de l'ubiquitine dans le domaine HECT réside dans le lobe N, mais la cystéine catalytique du transfert se trouve dans le lobe C, ce qui implique des interactions entre la queue C-terminale de l'ubiquitine et les 2 lobes du domaine HECT. Cette structure est mise en évidence par des études sur les ligases chargées d'ubiquitine HECT^{Nedd4}~Ub et HECT^{Rsp5p}~Ub (Kamadurai et al., 2013; Maspero et al., 2011) (Figure 5A). Dans le complexe HECT^{Nedd4}~Ub, la surface d'interaction sur l'ubiquitine avec le lobe N implique les résidus Ile44, Gly47, Leu73 et Val70 de l'ubiquitine. La mutation de ces résidus empêche la liaison de l'ubiquitine au domaine HECT. Cependant, la surface d'interaction s'étend sur une interface hydrophobe qui implique d'autres résidus d'ubiquitine dont le rôle sert à stabiliser les liaisons principales. Le résidu Ile44 de l'ubiquitine, critique pour la reconnaissance de plusieurs UBD, interagit avec la ligase Rsp5p et est conservé pour l'interaction avec le lobe N

des ligases HECT (French et al., 2009). L'ubiquitine interagit avec une surface du lobe N de la ligase Rsp5p comprenant les résidus Tyr516, Phe618 et Val621 (French et al., 2009). La surface de liaison de l'ubiquitine sur le domaine HECT de la ligase Rsp5p augmente l'élongation de la chaîne d'ubiquitine sur ces substrats (Kim et al., 2011).

Le lobe C contient la cystéine catalytique permettant la liaison de l'ubiquitine à partir de sa glycine C-terminale à une lysine du substrat ou d'une molécule d'ubiquitine lors de la polyubiquitylation, donc nécessite une surface d'interaction avec l'ubiquitine. La structure de HECT^{Rsp5p}~Ub révèle des interactions entre les résidus Ile36, Gln40, Leu71 et Leu73 de l'ubiquitine avec les résidus Leu771, Leu798, Ala799, Glu802 et Thr803 du lobe C du domaine HECT de Rsp5p. La mutation de ces résidus altère la fonction du domaine HECT de Rsp5p (Kamadurai et al., 2013). La queue C-terminale de l'ubiquitine adopte une conformation étendue, conduisant à la formation d'un feuillet β de liaison covalente proche de la Cys777 catalytique (Figure 5C). Cette surface est formée entre les résidus Leu73 et Arg74 de l'ubiquitine et Ser774 de Rsp5p et n'est pas observée dans le complexe E2~Ub-HECT (Kamadurai et al., 2009; Maspero et al., 2013), donc résulte de la liaison covalente à la cystéine catalytique, et met en évidence l'implication du lobe C dans la liaison d'ubiquitine au substrat (Kamadurai et al., 2013). La comparaison des structures de HECT^{Nedd4} et HECT^{Nedd4}~Ub indique que la disposition du lobe C diffère dans les deux structures. Dans la deuxième, le lobe C est plus orienté vers le lobe N, afin que l'ubiquitine liée à la cystéine catalytique se rapproche de son site d'attaque (Kamadurai et al., 2009). Cela met en évidence la liberté de mouvement du lobe C, due à la flexibilité de la boucle centrale inter-lobaire qui est essentielle pour la fonction catalytique du domaine HECT (Verdecia et al., 2003).

1.3.3 Le transfert de l'ubiquitine au substrat

Les ligases E3 spécifient la réaction d'ubiquitylation en recrutant les substrats. Suite au recrutement du substrat, le domaine HECT de ligase E3 transfère l'ubiquitine liée à son lobe C sur une lysine du substrat. La conformation qu'adopte le domaine HECT lors du transfert de l'ubiquitine à une lysine du substrat est mise en évidence sur la ligase Rsp5p par une structure cristalline du complexe HECT~Ub-Substrat (Kamadurai et al., 2013). Le lobe C de la ligase Rsp5p chargée d'ubiquitine adopte une rotation de 130° qui rapproche l'ubiquitine de la lysine de son substrat Sna3 liée sur son domaine WW3. En effet le lobe C des ligases HECT détermine la spécificité de l'ubiquitylation des substrats. La substitution du lobe C du domaine HECT de la ligase Nedd4 par celui de la ligase E6-AP change le type de chaîne d'ubiquitine produite par Nedd4 sur son substrat (Maspero et al., 2013). Malgré la surface de liaison de l'ubiquitine, le lobe C du domaine HECT isolé n'interagit pas avec l'ubiquitine (French et al., 2009), ce qui implique une interaction supplémentaire des lobes N et C afin de stabiliser la liaison de l'ubiquitine sur la cystéine catalytique du domaine HECT. Cette surface d'interaction inter-lobaire est située près de la Cys777 dans la structure HECT~Ub de la ligase Rsp5p (Figure 5C). L'altération de cette interaction empêche le transfert de l'ubiquitine au substrat (Kamadurai et al., 2013).

Les ligases HECT peuvent adopter 2 mécanismes différents pour catalyser la polyubiquitylation du substrat. Le premier mécanisme décrit est le modèle d'indexation qui consiste à former une chaîne d'ubiquitine sur le domaine HECT de l'enzyme E3 à partir de E2~Ub. Puis le domaine HECT transfère d'un coup la chaîne d'ubiquitine sur le substrat (Verdecia et al., 2003). Ce mécanisme est confirmé par une étude sur la ligase HECT E6-AP (Wang and Pickart, 2005). Le second mécanisme, catalysé par toutes les ligases de la famille CWH, consiste en une addition séquentielle d'ubiquitine sur le substrat lors de l'élongation de

chaîne de polyubiquitine. Ce mécanisme est mis en évidence par l'étude sur la ligase de levure Rsp5p (Kim and Huibregtse, 2009).

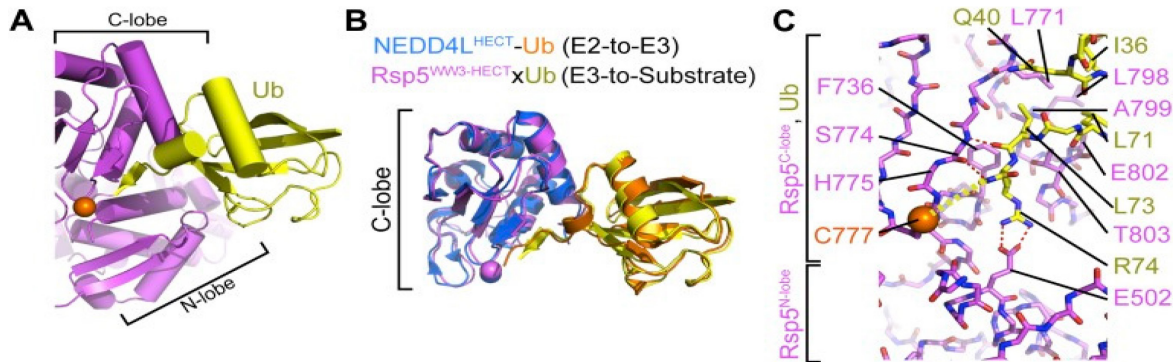


Figure 5: Interactions entre le domaine HECT et l'ubiquitine. (A) Liaison covalente entre l'ubiquitine et la Cys catalytique de la ligase Rsp5p dans la structure cristalline de WW3-HECT^{Rsp5p}-Ub. (B) Les lobes C superposés pour WW3-HECT^{Rsp5p}-Ub et HECT^{NEDD4L}-Ub. (C) Vue en gros plan des interactions entre le lobe C et la queue C-terminale de l'Ub dans la structure cristalline de WW3-HECT^{Rsp5p}-Ub. Le domaine HECT de Rsp5p est représenté en violet, celui de NEDD4L en bleu. L'ubiquitine fusionnée à Rsp5p est représentée en jaune, et celle fusionnée à NEDD4L en orange. (Kamadurai et al., 2013).

1.4 Objectifs et hypothèses

Il a été montré que l'ajout d'une première molécule d'ubiquitine sur un substrat liant les domaines WW des ligases de type CWH positionne cette dernière de façon à optimiser l'ajout d'unités subséquentes d'ubiquitine et favoriser la polyubiquitylation du substrat. La ligase Itch pouvant reconnaître certains de ses substrats via son domaine PRD plutôt que ses domaines WW, l'objectif principal de ce mémoire sera de déterminer si les substrats SH3 de Itch peuvent également être polyubiquitylés plus efficacement suite à l'ajout d'une molécule d'ubiquitine initiale. En corollaire, nous chercherons également à déterminer l'impact de l'ubiquitylation par Itch sur la stabilité et l'activité biologique de certains substrats à domaine SH3.

Notre hypothèse est que la seule présence d'une molécule d'ubiquitine sur un substrat est suffisante pour stimuler l'activité du domaine HECT, indépendamment du type d'interaction initiale entre la ligase et le substrat.

Pour vérifier cela, nous avons généré des protéines de fusion Grb2-ubiquitine et Endophiline-ubiquitine par recombinaison d'ADN. Nous utiliserons ces protéines de fusion pour comparer leur ubiquitylation à celle de Grb2 ou endophiline seuls. Nous utiliserons également ces protéines modifiées afin d'évaluer l'impact de l'ajout d'une molécule d'ubiquitine sur la stabilité et la localisation cellulaire de ces protéines.

2 Matériel et méthodes

2.1 Plasmides et anticorps

Le plasmide codant GFP-Endo-Ub a été réalisé en insérant la séquence de l'ubiquitine en phase du côté 3' de la séquence de l'endophiline dans le plasmide GFP-Endo cloné dans le vecteur pEGFP-C2. Les amorces indiquées dans le tableau I ont permis d'amplifier la séquence de l'ubiquitine et d'y insérer des sites BamHI à chaque extrémité. La séquence a été amplifiée par PCR à partir de la séquence codante de HA-Ubiquitine. Le plasmide encodant GFP-Endo-Ub^{AA} a été réalisé par la même procédure. La mutation des deux glycines en C-terminal de l'ubiquitine en alanine est dans la séquence de l'amorce antisens. Le plasmide codant GFP-Grb2-Ub^{AA} a été réalisé à l'aide des amorces de la séquence de Grb2-Ub indiquées dans le tableau I. La mutation des deux glycines en C-terminal de l'ubiquitine en alanine est induite dans la séquence de l'amorce antisens. La séquence est amplifiée par PCR à partir de la séquence codante de GFP-Grb2-Ub et est clonée dans le vecteur pEGFPC2 à l'aide des enzymes XhoI et HindIII (Invitrogen). Le plasmide codant GST-Grb2-Ub a été réalisé à l'aide des amorces de la séquence Grb2-Ub (Tableau I). La séquence est amplifiée par PCR à partir de la séquence codante de GFP-Grb2-Ub et est clonée dans le vecteur pGEX-4T-1 (Amersham Bioscience) à l'aide de l'enzyme EcoRI (Invitrogen). La construction GFP-Itch^{3R/E} a été obtenue par la méthode de mutagenèse dirigée, qui consistait en une série de mutations ponctuelles de 3 arginines (R255, R255, R258) en acide glutamique dans la séquence de Itch complète. La séquence GFP-Itch a été amplifiée par PCR à partir d'amorces portant les mutations, afin de produire le plasmide GFP-Itch^{3R/E} (Riham Ayoubi, non publié). Les constructions FLAG-Itch, GST-PRD-Itch, GFP-Itch et GFP-Endo ont été décrites auparavant (Angers et al., 2004). Le plasmide GST-HECT-Itch a été décrit auparavant (Mouchantaf et al., 2006). Le plasmide rLuc-Itch inséré dans le vecteur pRluc-C1 a été décrit auparavant (Eaton et al., 2011). Le plasmide GST-Grb2 a été décrit auparavant

(McPherson et al., 1994). Le plasmide HA-Ubiquitine (hemagglutine) fut donné par Ted Dawson (John Hopkins University). Le plasmide GFP-Grb2 fut donné par Michael Way (Imperial college London). Toutes les protéines de fusion GST ont été exprimées dans la souche DH5 α ou BL21 d'Escherichia coli et purifiées avec des billes de glutathion-sépharose selon les instructions du fabricant (Bio-World).

Tableau 1: Amorces utilisées pour le clonage des différentes constructions de plasmide

| Constructions | Enzymes de restriction | Séquence de l'amorce sens (5' → 3') | Séquence de l'amorce anti-sens (5' → 3') |
|---------------------------|---------------------------|-------------------------------------|--|
| GFP-Endo-Ub | BamHI | GAGAGGATCCTGCAG ATCTTCGTGAAGACTC | CACTGGATCCTTAC CCACCTCTGAGACGGAG |
| GFP-Endo-Ub ^{AA} | BamHI | GAGAGGATCCTGCAGA TCTTCGTGAAGACTC | CACTGGATCCTTA CGCAGCTCTGAGACGGAG |
| GFP-Grb2-Ub ^{AA} | XhoI et <i>HindIII</i> | GAGACTCGAGAATGGAA GCCATCGCCAAA | GAGAAAGCTTTT ACGCAGCTCTGAGACG |
| GST-Grb2-Ub | EcoRI | GAGAGAATTCATGG AAGCCATCGCCAAA | CACTGAATTCACC CACCTCTGAGACGGAG |

2.2 Transfection et extraction

Les cellules HEK-293T sont cultivées dans un milieu DMEM complété avec 10% de sérum de veau (Thermo Fisher Scientific), 1% Pencilline/Streptomycine, 0,1 % d'anti-fongique (Invitrogen) et incubées à 37°C à 5% de CO₂. Les cellules ont été transfectées avec différents plasmides à l'aide de la technique calcium/phosphate à 5 μ g d'ADN/boite de pétri de 10 cm.

Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été lavées 2 fois avec du tampon PBS (154 mM NaCl, 57,5 mM NaH₂PO₄, pH 7.4) et collectées dans une solution d'extraction contenant 10mM Hepes, 150mM NaCl et des inhibiteurs de protéases (PMSF 500X, benzamidine 100X, leupeptine et aprotinine). Les cellules sont lysées par sonication puis incubées sous agitation pendant 30 minutes à 4°C dans du triton X-100 à concentration finale 1%. Suite à l'incubation, les extraits sont centrifugés à 18 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant représente les protéines totales.

2.3 Protéines de fusion

Les constructions GST ont été obtenues par expression dans la souche bactérienne *Escherichia coli* (*E. coli*) à partir de vecteurs pGEX-4T-1 recombinés avec les séquences suivantes : GST, GST-PRD (le domaine PRD de Itch), GST-HECT (le domaine HECT de Itch), GST-Grb2, GST-Grb2-Ub. Les bactéries ont été inoculées dans du milieu LB et incubées à 37°C jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0,5 (phase maximale de croissance). Les cultures bactériennes sont induites à 0,5 mM d'IPTG (isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside) sous agitation pendant 3h à 37 °C. Les bactéries sont ensuite centrifugées pendant 30 minutes à 270 g à 4°C. Les culots sont resuspendues dans 20 ml de PBS. Les bactéries sont ensuite lysées par sonication puis par l'ajout de 1% triton X-100. Les extraits sont agités pendant 20 minutes à 4 °C puis centrifugés 10 minutes à 10 000 g. Le surnageant contient les protéines liées à GST. Afin de purifier les protéines, les surnageants sont incubés pendant 2h à température ambiante avec des billes de sépharose couplées au glutathion qui vont lier la protéine GST. Après centrifugation pendant 2 minutes à 1000 g et à 4°C, le surnageant est retiré et les billes sont ensuite lavées trois fois dans du PBS pour éliminer les protéines non liées, et récupérées dans du PBS (V/V). Nous avons quantifié les concentrations protéiques avec une concentration croissante de BSA (1 à 10 ug) sur

un gel SDS avec 10% de polyacrylamide. Les constructions GST sont ensuite utilisées dans la chromatographie d'affinité et l'ubiquitylation *in vivo*.

2.4 Chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité permet de déterminer l'interaction entre 2 protéines. Elle nous a permis de mettre en évidence l'interaction entre les protéines Grb2 et Grb2-Ub avec les domaines de la ligase Itch. Les cellules transfectées avec les plasmides indiqués ont été lavées et les protéines extraites comme décrit précédemment. Un volume représentant 10% des extraits totaux a été conservé pour les *SM* (matériel de départ), le volume restant fut incubé sous agitation pendant 2h à température ambiante avec 10 µg de billes de sépharose liées aux protéines de fusion GST. Les billes sont lavées 3 fois avec du PBS. Les échantillons sont ensuite chauffés 5 minutes à 95°C dans une solution de tampon de chargement à 1X finale (3% SDS - 115mM Sucrose - 65 mM Tris Cl pH 6,8 – bêta-mercaptoéthanol 1% et une touche de bleu de bromophénol) afin de dénaturer les protéines qui seront ensuite séparées par migration sur gel de SDS-PAGE. Les protéines sont transférées suite à la migration sur une membrane de nitrocellulose afin d'effectuer un western blot.

2.5 Ubiquitylation *in vivo*

Les différents plasmides ont été transfectés dans les cellules HEK-293T. Le plasmide HA-Ub est transfecté dans toutes les conditions. Suite à l'extraction des protéines, 10% de l'extrait total est conservé (*SM*), le reste fut incubé sous agitation pendant 2h à température ambiante avec 10 µg de billes de sépharose liées aux protéines de fusion GST pour une chromatographie d'affinité. Les protéines purifiées par les billes représentent le *pull down* (*PD*). Les billes sont lavées 3 fois dans la solution d'extraction. Les échantillons sont ensuite chauffés 5 minutes à 95°C dans la solution de tampon de chargement à 1X finale afin de dénaturer les protéines qui

seront ensuite séparées par migration sur gel de SDS-PAGE. Les protéines sont transférées suite à la migration sur une membrane de nitrocellulose afin d'effectuer un western blot.

2.6 Ubiquitylation *in vitro*

La réaction contenait 4mM d'ATP, 100 nM de l'enzyme UBE1 (E1), 2 µM de l'enzyme UBE2L3 (E2), 50 µM d'ubiquitine, 2 µM de Itch (E3), 2 µM de substrat et 1X de tampon d'ubiquitylation (40mM Tris pH 7,1, 40mM NaCl 1mM bêta-mercaptoéthanol, 5mM MgCl₂). Après incubation de 90 minutes à 30°C, la réaction est arrêtée par l'ajout du tampon de tampon de chargement à 1X finale, et les échantillons sont migrés sur un gel SDS-PAGE. La ligase Itch, l'ubiquitine et les substrats ont été purifiés à partir de bactéries exprimant les différentes protéines fusionnées à la GST et élués avec des billes de sépharose dans un tampon à pH 8,3 (50mM Tris-Cl pH 7.4, 5mM Glutathion). Le tampon d'ubiquitylation, l'ATP et l'ubiquitine proviennent d'UBPBio, les enzymes E1 et E2 de BostonBiochem.

2.7 Western blot

Suite au transfert des protéines du gel SDS sur une membrane de nitrocellulose (Thermo Fisher Scientific), cette dernière a été incubée pendant 1 heure sous agitation à température ambiante dans une solution de blot (60 mM NaPO₄, 150 mM NaCl, 5% de poudre de lait, pH 8). Suite à cela, la membrane a été incubée toute la nuit à 4°C avec un anticorps primaire spécifiquement dirigé contre une protéine (Tableau II). La membrane est ensuite lavée 3 fois à 10 minutes d'agitation dans la solution de blot, puis incubée pendant 1 heure sous agitation à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé à HRP. La membrane fut rincée 2 fois à 10 minutes d'agitation dans la solution de blot puis 1 fois dans du TBS (20 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7.4). L'immuno-réaction est détectée par chemiluminescence utilisant un Supersignal

West-Pico (Thermo Fisher Scientific). Les différents anticorps utilisés sont indiqués dans le tableau II.

2.8 Immunofluorescence

Les cellules HEK-293T sont cultivées sur des lamelles de verre recouvertes de poly-L-lysine pendant 12-18h. Suite à cela, les cellules ont été transfectées avec les plasmides par la technique calcium-phosphate. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été fixées pendant 30 minutes avec du PBS-paraformaldéhyde (PFA) à 3,3%. Les cellules furent lavées à température ambiante trois fois pendant 5 minutes dans du PBS et perméabilisée avec du PBS-Triton-X-100 (0,2%) pendant 4 minutes. Suite à un lavage avec du PBS, les cellules ont été bloquées dans une solution de blocage (5% BSA, 5% NGS dans du PBS) pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules ont été incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires (GFP : Invitrogen, Grb2 et Itch : BD Biosciences) dilués dans du PBS avec 1% BSA. Suite à l'incubation, les cellules furent lavées trois fois pendant 5 minutes à température ambiante dans du PBS, puis incubées pendant 1 heure dans le noir avec l'anticorps secondaire chèvre anti-souris-CY3 (Jackson Immunoresearch) dilué dans du PBS avec 1% BSA. Si le noyau doit être marqué, les cellules sont incubées avec du DAPI (Sigma Aldrich) pendant 5 minutes. Suite à un dernier lavage (trois fois pendant 5 minutes) les cellules sont montées sur lames, et examinées avec un microscope à fluorescence verticale (Olympus BX61), à un grossissement de 63 X. Les images sont traitées à l'aide du logiciel Adobe Photoshop CS5. Les micrographies ont été prises en couleur mais, pour mieux faire ressortir les contrastes, ont été transformées en monochrome à l'aide du logiciel. De fausses couleurs ont toutefois été rajoutées sur les photographies résultant de la superposition de photographies monotones.

Tableau 2: Liste des anticorps utilisés pour le western blot

| Anticorps | Spécificité | Compagnie |
|------------------|--------------------|------------------|
| anti-Grb2 | Souris, polyclonal | BD Biosciences |
| anti-Itch | Souris, polyclonal | BD Bioscience |
| anti-GFP | Lapin, polyclonal | Invitrogen |
| anti-HA | Souris, monoclonal | Invitrogen |
| anti-c-Jun | Souris, monoclonal | Cedarlane |
| anti-Flag | Souris, monoclonal | Sigma Aldrich |

2.9 Quantification de la fluorescence et analyses statistiques

La fluorescence des cellules exprimant les protéines Grb2 et Grb2-Ub a été mesurée par le logiciel ImageJ (v1.440 *National Institutes of Health, USA*). Nous avons mesuré l'intensité de la fluorescence dans toute la cellule ainsi que dans le noyau en traçant une région d'intérêt. La valeur obtenue représente la densité intégrée. La fluorescence totale est obtenue par soustraction de l'aire sélectionnée à la densité intégrée (Image J). La fluorescence dans le cytoplasme est obtenue par la soustraction de la fluorescence du noyau de celle de la cellule. Nous avons mesuré ces données dans 25 cellules exprimant les protéines Grb2 et les moyennes des intensités par compartiment subcellulaire ont été comparées et représentées en graphique avec le logiciel Excel. Un test statistique par analyse Anova a été réalisé avec les moyennes des fluorescences des 25 cellules sélectionnées par traitement avec le logiciel R. Les données sont représentées en *box plot*.

3 Résultats

3.1 Ubiquitylation *in vivo* et *in vitro* de Grb2 par Itch.

L'interaction entre la protéine Grb2 et Itch a été établie par l'étude de Desrochers et ses collègues (non publiée), qui montre une interaction directe du domaine PRD de Itch avec les motifs SH3 de Grb2. Puisque Itch possède une activité ligase et qu'il a été démontré qu'elle peut modifier les protéines à domaine SH3 liant le domaine PRD, nous avons vérifié l'ubiquitylation de la protéine Grb2. Pour ce faire, nous avons co-transfecté les plasmides GFP-Grb2, HA-Ub et Myc-Itch dans les cellules HEK2-93T. Les protéines sont ensuite extraites et incubées avec des billes de glutathion-sépharose couplées au domaine PRD de Itch afin de récupérer GFP-Grb2. Les protéines purifiées sont séparées sur un gel SDS-PAGE et soumises à un Western blot. Les anticorps anti Myc et anti GFP révèlent la présence des protéines Itch et Grb2 dans l'extrait de départ. L'anticorps anti-HA détecte l'ubiquitine, et la présence d'ubiquitine dans la fraction purifiée indique l'ubiquitylation de Grb2 (Figure 6A). Aucune trace d'ubiquitylation n'est observée en absence de Grb2 ou de Itch, ce qui démontre que la fraction ubiquitylée au centre est bel et bien attribuable à l'effet de Itch sur GFP-Grb2.

L'ubiquitylation par la ligase Itch implique la plupart du temps la dégradation protéasomale du substrat ubiquitylé, comme ceci a été démontré pour c-Jun, Endophiline et SNX9 (Azakir and Angers, 2009; Baumann et al., 2010; Gao et al., 2004). Nous voulions vérifier si l'ubiquitylation de Grb2 par la ligase Itch cause sa dégradation. Pour ce, nous avons transfecté dans les cellules HEK-293T avec d'une part Flag-Itch^{WT} (type sauvage) et Flag-Itch^{CA}, dans laquelle la cystéine catalytique du domaine HECT est mutée en alanine. Le plasmide Flag-Itch^{CA} nous sert de contrôle car les substrats ne seront pas ubiquitylés par cette construction. Nous avons traité les cellules selon les conditions avec le MG132, un inhibiteur du protéasome (Tsubuki et al., 1996). Suite à l'extraction des protéines et un transfert sur un gel SDS-PAGE, les quantités

cellulaires de Itch et des substrats ont été vérifiées par western blot. Les anticorps anti-FLAG, anti-c-Jun et anti-Grb2 révèlent respectivement le niveau de Itch, c-Jun et Grb2 dans la cellule. La figure 6B permet d'observer que le niveau de c-Jun diminue fortement en présence de Flag-Itch^{WT}. Le MG132 réduit le taux de dégradation de c-Jun. Le plasmide Flag-Itch^{CA} montre la même tendance que Flag-Itch^{WT} avec un effet de dégradation moins prononcé, dû à l'inactivité catalytique de Itch surexprimé, montrant que l'ubiquitylation de c-Jun par Itch cause une dégradation protéasomale. Concernant la protéine Grb2, on constate que son niveau cellulaire ne varie pas en réponse à Flag-Itch^{WT} et Flag-Itch^{CA}, et à la présence ou absence de MG132. Ceci montre que l'ubiquitylation de Grb2 par Itch ne mène pas à une dégradation par le protéasome.

Puisque l'ubiquitylation observée sur Grb2 indique une trainée d'ubiquitine correspondant à une poly-ubiquitylation, et que la non-dégradation suggère que les chaînes formées ne sont pas K48, nous avons voulu déterminer le type de chaîne d'ubiquitine sur Grb2. Une façon de réaliser cela est d'observer l'ubiquitylation *in vitro* de Grb2 en présence d'ubiquitines dont toutes les lysines sauf une ont été mutée, ne permettant la formation que d'un type de chaîne à la fois.

La figure 6C permet d'observer l'ubiquitylation *in vitro* de la protéine Grb2 en présence de Itch et d'ubiquitine (WT), d'ubiquitine dépourvue de lysines (K0), et d'ubiquitine portant une seule lysine spécifique (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63). La piste contrôle est réalisée en absence de la ligase Itch. Une seule bande de poids moléculaire plus élevée reconnue par l'anticorps anti-Grb2 est visible et ce dans toute les pistes sauf le contrôle où Itch est omis, qui montre l'ubiquitylation de Grb2 par la ligase Itch. Cependant on observe une seule forme de plus haut poids moléculaire dans toutes les pistes d'ubiquitylation, ce qui indique une absence de poly-ubiquitylation. Ainsi la protéine Grb2 est mono-ubiquitylée *in vitro* par la ligase Itch.

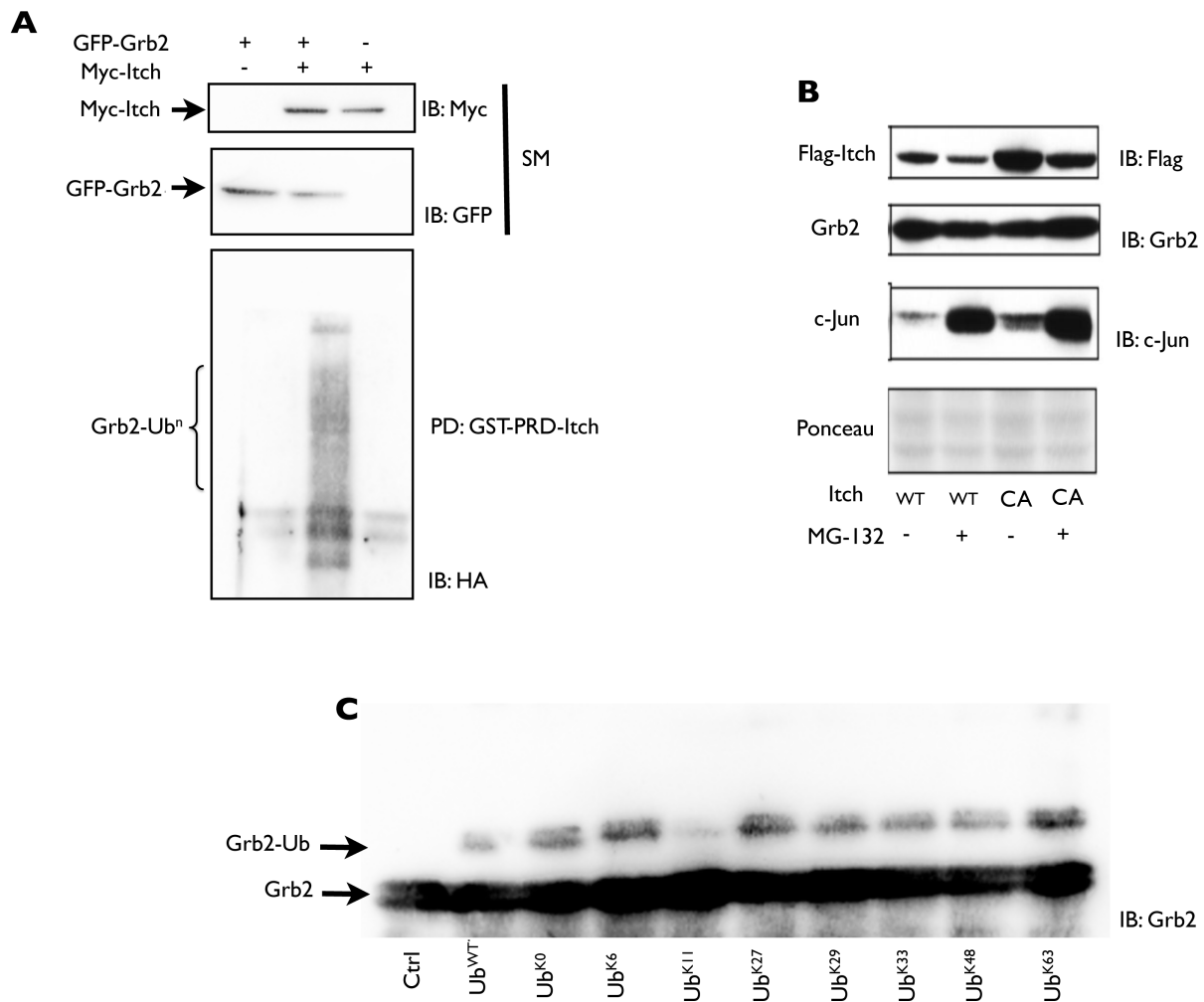


Figure 6: Ubiquitylation de Grb2 par la ligase Itch. A, Ubiquitylation *in vivo* de Grb2 par Itch. Des cellules HEK-293T sont co-transfectées avec HA-Ub et les plasmides indiqués. Des extraits totaux sont traités par immunomarquage par les anticorps indiqués (panneaux du haut et du milieu). Les extraits liés aux billes GST-PRD sont traités par immunoblot anti-HA pour montrer l'ubiquitylation de Grb2 (panneau du bas). B, Grb2 n'est pas dégradé suite à son ubiquitylation. Les cellules HEK-293T sont transfectées avec Flag-Itch^{WT} ou Flag-Itch^{CA}, et traitées selon les conditions avec 20μM de MG132. Les extraits sont soumis à un immunomarquage avec les anticorps indiqués pour révéler la présence de c-Jun, Grb2 et Itch. C, Ubiquitylation *in vitro* de Grb2. Grb2 recombinant a été incubé avec la E1, la E2, l'ATP, Itch recombinant et différentes formes de l'ubiquitine. Les réactions sont transférées sur gel SDS-PAGE et soumises à un immunomarquage anti-Grb2. L'ubiquitylation est identifié par la fixation de l'ubiquitine sur Grb2. (Guillaume Desrochers, communication personnelle).

3.2 Ubiquitylation des fusions Grb2-Ub par Itch

Puisque l'ubiquitylation de Grb2 n'entraîne pas la dégradation, nous avons voulu savoir quelles étaient les conséquences. Nous avons donc voulu «mimer» l'ubiquitylation en fabriquant des protéines de fusion à l'ubiquitine. Nous avons ajouté la séquence de l'ubiquitine à la partie terminale du plasmide Grb2, encodant une protéine de fusion à l'ubiquitine (GFP-Grb2-Ub ou rLuc-Grb2-Ub). Des études précédentes ont montré que la fusion de l'ubiquitine sur un substrat augmente l'activité du domaine HECT de la ligase Rsp5p de la levure (Kim et al., 2011). Nous avons voulu voir si l'ajout de l'ubiquitine sur Grb2 active le domaine HECT de la ligase Itch. La construction Grb2-Ub nous permettra de voir l'impact de l'ubiquitylation initiale d'un substrat SH3 sur l'activité du domaine HECT de la ligase Itch.

Tel qu'indiqué sur la figure 7A, la molécule d'ubiquitine est fusionnée sur la portion C-terminale de la séquence d'ADN de Grb2, afin de produire une protéine de fusion stable (Grb2-Ub). Lorsque l'ubiquitine est liée en sa partie C-terminale sur une protéine, elle est rapidement clivée par les USP (*ubiquitin-specific proteases*), protéases endogènes de l'ubiquitine (Baker, 1996).

L'ubiquitylation des protéines Grb2 et Grb2-Ub a été réalisée avec la transfection des plasmides rLuc-Grb2 et rLuc-Grb2-Ub dans les cellules HEK-293T en présence de HA-Ub avec ou sans la présence GFP-Itch (Figure 7B). Suite à l'extraction, les protéines sont incubées avec la protéine de fusion GST-PRD de Itch couplée aux billes de glutathion-sépharose, afin de purifier rLuc-Grb2 et rLuc-Grb2-Ub. Les protéines sont ensuite migrées sur un gel SDS-PAGE et soumises à un western blot. Les anticorps anti-GFP et anti-Grb2 révèlent l'expression respective de Itch et des protéines Grb2 dans l'extrait total. Nous constatons la différence de poids moléculaire entre Grb2-Ub et Grb2 due à l'ajout d'une molécule d'ubiquitine sur Grb2.

L'anticorps anti-HA indique l'ubiquitylation des protéines Grb2 purifiées. Sur toutes les pistes, nous observons l'ubiquitylation des substrats due à la présence endogène de la ligase Itch dans la cellule. Par contre nous remarquons que le niveau de marquage de l'anti-HA est plus élevé dans les pistes où GFP-Itch est aussi transfecté (pistes 2 et 4), ce qui montre l'ubiquitylation due à l'activité de la ligase Itch. En comparant d'une part les pistes 1,3 et d'autre part les pistes 2,4 ; nous pouvons constater que la protéine de fusion Grb2-Ub est plus ubiquitylée que la forme normale Grb2. La fusion de l'ubiquitine sur Grb2 semble donc augmenter l'ubiquitylation de Grb2 par Itch.

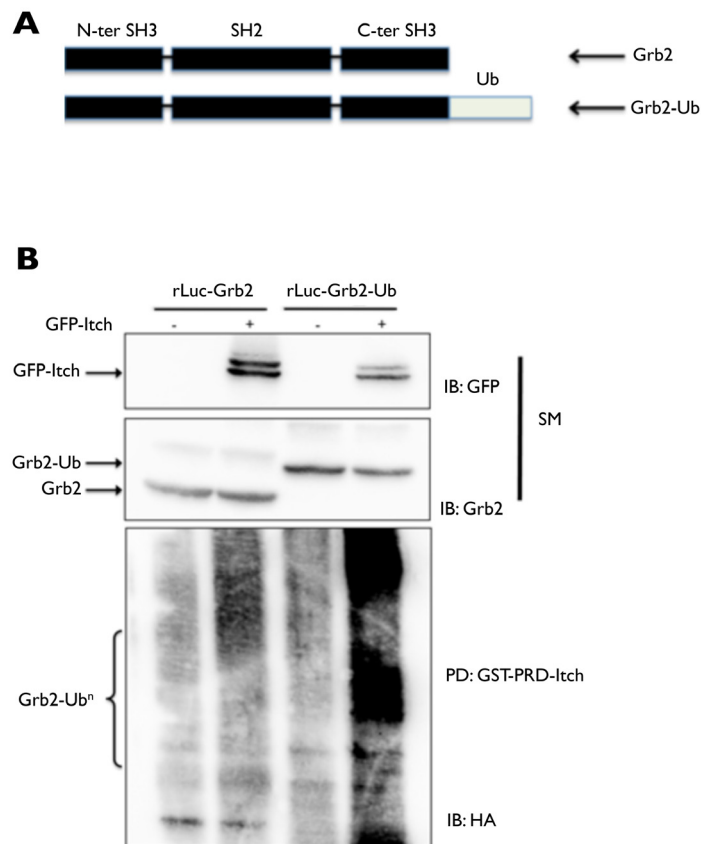


Figure 7: Ubiquitylation de la protéine de fusion Grb2-Ub. A, Schéma des constructions des protéines Grb2 et Grb2-Ub. B, Ubiquitylation *in vivo* de Grb2-Ub et Grb2. Des cellules ont été transfectées avec les plasmides indiqués. Des extraits totaux sont traités par immunomarquage par les anticorps indiqués pour révéler les protéines surexprimées (panneaux du haut et du milieu). Les extraits liés aux billes GST-PRD sont traités par immunoblot anti-HA pour montrer l'ubiquitylation de Grb2 et Grb2-Ub (panneau du bas).

Les ligases E3 catalysent la formation d'une liaison peptidique entre la glycine de l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine et l'amine de la chaîne latérale d'une lysine du substrat ou de l'ubiquitine. L'extrémité C-terminale de l'ubiquitine fusionnée à Grb2 est libre et pourrait donc être liée elle-même à une lysine du substrat ou à une ubiquitine déjà liée au substrat. Dans ce cas, l'augmentation de l'ubiquitylation de Grb2-Ub ne serait pas due à une plus grande ubiquitylation par Itch, mais à une augmentation de la quantité d'ubiquitine libre à lier le substrat. Pour éliminer ce possible effet confondant, nous avons effectué une mutation des deux résidus glycine en C-terminal de l'ubiquitine fusionnée à Grb2 en alanine (Grb2-Ub^{AA}). La protéine de fusion Grb2-Ub^{AA} ne pouvant pas être utilisée par une ligase E3 comme 'donneur' d'ubiquitine, l'ubiquitylation observée avec cette forme devrait être spécifique à la protéine Grb2.

Dans le but de vérifier la spécificité de l'ubiquitylation des protéines de fusion sur Grb2, nous avons observé la localisation cellulaire des Grb2, Grb2-Ub et Grb2-Ub^{AA} (Figure 8). Ainsi nous pouvons observer que les protéines Grb2 et Grb2-Ub^{AA} ont la même distribution, elles sont diffuses dans toute la cellule, tandis que la protéine Grb2-Ub montre une distribution différente, qui est plus ponctuée par rapport à Grb2. Nous ne pouvons donc exclure que l'ubiquitine de la construction Grb2-Ub puisse permettre une liaison à un autre substrat ou une molécule d'ubiquitine en chaîne.

Nous avons utilisé la protéine Grb2-Ub^{AA} afin de vérifier l'influence de l'ubiquitine sur l'activité de Itch. Dans le but de comparer l'ubiquitylation des protéines Grb2 et Grb2-Ub^{AA} nous avons réalisé la même expérience qu'à la figure 7B, en remplaçant Grb2-Ub par Grb2-Ub^{AA}. Nous constatons, suite aux mêmes observations effectuées sur la figure 7B, que l'ubiquitylation est plus marquée sur la forme Grb2-Ub^{AA} que la forme Grb2^{WT} (Figure 9), ce qui confirme que la fusion de l'ubiquitine sur Grb2 augmente l'activité du domaine HECT de la ligase Itch.

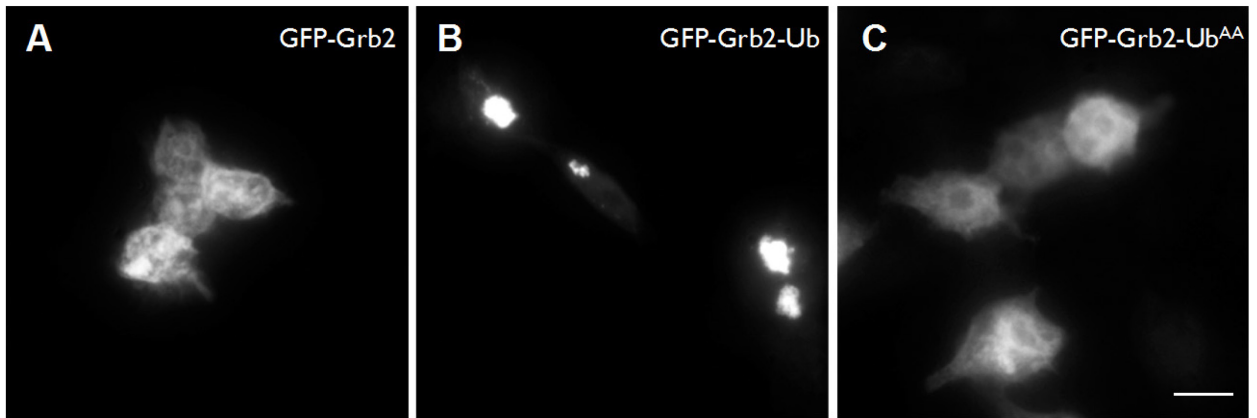


Figure 8: Localisation des constructions Grb2. Localisation dans les cellules HEK-293T des protéines Grb2(A), Grb2-Ub (B) et Grb2-Ub^{AA} (C). Barre d'échelle= 12 μ M.

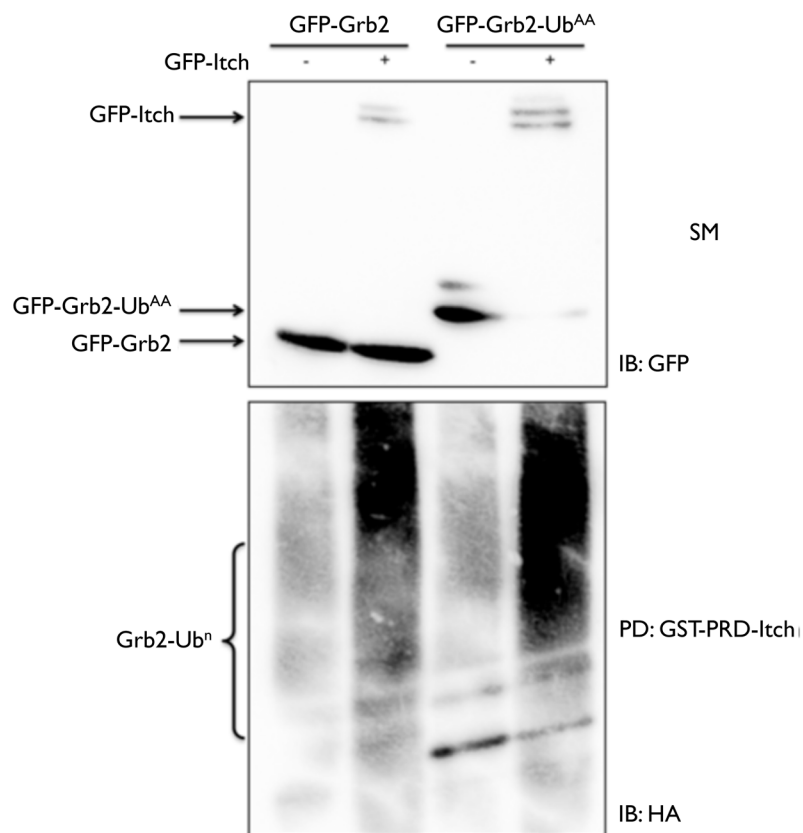


Figure 9: Ubiquitylation de la protéine de fusion Grb2-Ub^{AA}. L'expérience est réalisée avec la même procédure que la figure 7B.

3.3 Ubiquitylation *in vitro* de Grb2-Ub

Après avoir démontré que la fusion de l'ubiquitine augmente l'activité de Itch envers Grb2 *in vivo*, nous avons voulu voir si elle a le même effet *in vitro*. Pour cela, nous avons réalisé l'ubiquitylation *in vitro* des protéines Grb2 et Grb2-Ub en absence et en présence de la ligase Itch (Figure 10). L'immunoblot avec l'anticorps anti-Grb2 relève dans la réaction la présence de Grb2 et Grb2-Ub avec la différence de poids moléculaire due à l'ajout d'une molécule d'ubiquitine sur Grb2. Seuls les substrats sont révélés dans les pistes où la ligase Itch est absente. Suite à l'ajout de Itch, nous observons l'ajout d'une molécule d'ubiquitine sur Grb2 et Grb2-Ub, indiquant leur mono-ubiquitylation. Une exposition prolongée de 30 minutes (non montrée) n'a pas permis d'observer des bandes nettes de plus haut poids moléculaire correspondant à l'ajout de plusieurs unités d'ubiquitine. Ce résultat montre que la fusion de l'ubiquitine sur Grb2 n'a pas d'influence sur son ubiquitylation *in vitro* par la ligase Itch.

Ainsi, nous constatons une différence sur l'ubiquitylation de Grb2 par la ligase Itch *in vivo*, qui semble indiquer une poly-ubiquitylation ou une multi-ubiquitylation, et *in vitro*, qui démontre une mono-ubiquitylation. Puisque, l'ajout de l'ubiquitine sur Grb2 n'a aucun effet sur l'activité de Itch *in vitro*, ceci suggère que d'autres facteurs pourraient intervenir dans l'ubiquitylation de Grb2 *in vivo*.

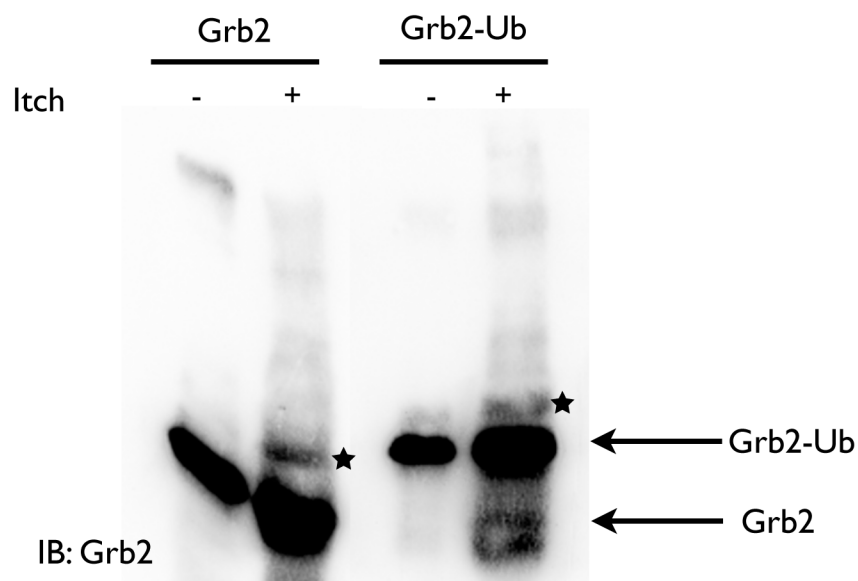


Figure 10: Ubiquitylation in vitro de Grb2 et Grb2-Ub. Grb2 et Grb2-Ub recombinants ont été incubés avec l'ubiquitine, E1, E2, l'ATP et Itch recombinant à 30°C pendant 90 minutes. Les réactions sont arrêtées par le tampon SDS puis transférées sur gel SDS-PAGE et soumises à un immunomarquage anti-Grb2. L'ubiquitylation est identifiée par la fixation de l'ubiquitine sur les protéines Grb2 et Grb2-Ub. * : Les substrats Grb2 et Grb2-Ub ubiquitylés

3.4 Interaction des fusions Grb2-Ub avec la ligase Itch

La ligase Itch possède deux types de domaines d'interaction avec ses substrats, les domaines WW et le domaine PRD, ce qui lui permet de lier respectivement les protéines à motif PPXY (Gao et al., 2004) ou à motif SH3 (Angers et al., 2004). D'autre part, des études précédentes ont identifié une surface d'interaction de l'ubiquitine dans le lobe N du domaine HECT des ligases Rsp5p, Nedd4 et Smurf2 de la famille CWH (French et al., 2009; Kim et al., 2011; Maspero et al., 2011; Ogunjimi et al., 2010). Cette surface intrinsèque de liaison de l'ubiquitine sur le domaine HECT joue un rôle dans l'élongation de la chaîne d'ubiquitine sur la ligase E3 et les substrats.

Nous avons cherché à savoir si l'ubiquitine fusionnée à Grb2 interagirait avec le domaine HECT de la ligase Itch, permettant une meilleure affinité de la ligase par rapport à la forme

normale Grb2, et de voir si cette affinité entre l'ubiquitine et le domaine HECT était responsable de l'effet de Grb2-Ub sur l'activité de Itch. Pour ce faire, nous avons transfecté dans les cellules HEK-293T les plasmides GFP-Grb2 et GFP-Grb2-Ub. Les extraits cellulaires ont été incubés avec des billes de sépharose couplées avec la GST seule ou la GST-PRD ou GST-HECT. Suite à une migration sur gel SDS-PAGE et un transfert sur une membrane de nitrocellulose, l'interaction entre les domaines de Itch et les formes de Grb2 est déterminée par un immunoblot dirigé contre la GFP fusionnée aux protéines Grb2 et Grb2-Ub (Figure 11A). La figure montre une absence de récupération de Grb2 et Grb2-Ub par la GST seule, nous servant de contrôle. Nous constatons que les protéines Grb2 et Grb2-Ub sont récupérées par la GST-PRD à un niveau égal par rapport à leur taux d'expression dans les extraits totaux (SM). Par contre, les protéines Grb2 et Grb2-Ub n'ont pas pu être récupérées par GST-HECT. L'analyse quantitative de ces résultats est présentée dans la figure 11B. Ce résultat confirme que Grb2 et Grb2-Ub interagissent par leurs domaines SH3 avec le domaine PRD de la ligase Itch, et que Grb2-Ub n'interagit pas avec le domaine HECT isolé de la ligase Itch.

Puisque le domaine HECT isolé ne semble pas montrer d'affinité à Grb2-Ub, nous avons essayé une autre approche afin d'observer l'interaction de l'ubiquitine de Grb2-Ub et Itch. Nous avons empêché l'interaction entre le domaine SH3 de Grb2-Ub et le domaine PRD de Itch, afin de voir si l'ubiquitine pourrait interagir avec la ligase. Le domaine PRD de la ligase est constitué de la séquence d'acides aminés suivante PSRPPRPSRPPPPTPRRP entre les résidus 250-257. L'étude de Desrochers et ses collègues (non publiée) montre que la mutation des 3 premières arginines (252-255-258) du domaine PRD retire sa capacité d'interaction avec le domaine SH3 des protéines. Nous avons réalisé une construction de la ligase Itch portant une mutation des 3 premiers arginines en acide glutamique dans le domaine PRD, Itch^{3R/E} (Riham Ayoubi, communication personnelle) afin d'empêcher l'interaction entre Itch et le

domaine SH3 de Grb2-Ub. De cette façon, nous sommes en mesure d'observer l'effet de la fusion de l'ubiquitine à la protéine Grb2 sur son interaction avec la ligase Itch suite à la transfection cellulaire des plasmides GFP-Itch^{WT} et GFP-Itch^{3R/E}. Suite à l'extraction, les protéines furent incubées avec des billes glutathion-sépharose couplées à GST seul ou GST-Grb2 et GST-Grb2-Ub. Les protéines sont soumises à une migration sur gel SDS-PAGE, et un immunoblot avec un anticorps dirigé contre la GFP.

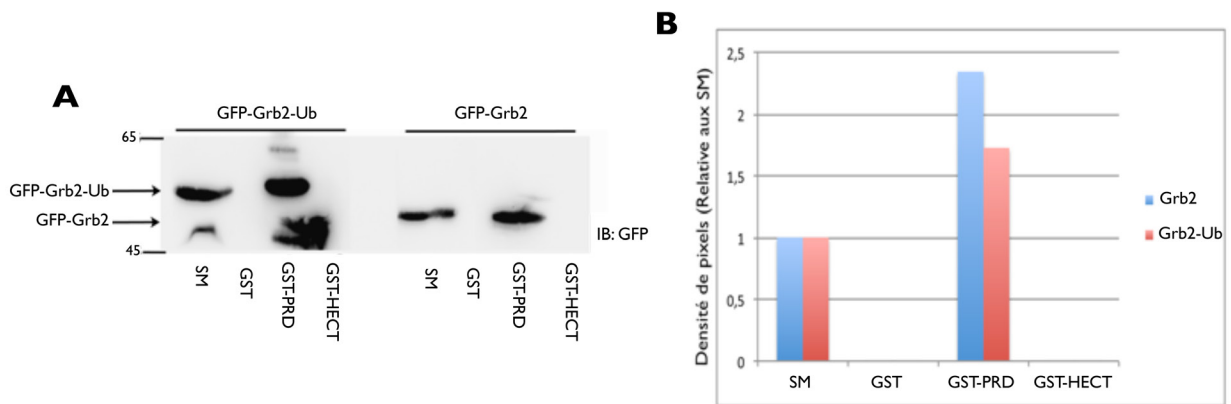


Figure 11: Interaction des protéines Grb2 et Grb2-Ub avec Itch. A, des extraits de cellules transfectées avec GFP-Grb2 et GFP-Grb2-Ub, ont été incubées avec GST seul, ou GST-PRD-Itch et GST-HECT-Itch couplés aux billes glutathion-sépharose. Les extraits liés aux billes ont été soumis à un immunomarquage par l'anticorps anti-GFP. B, diagramme de la représentation quantitative des interactions entre les protéines indiquées en A.

La figure 12A résume le résultat d'interaction entre les différentes protéines. Nous n'observons pas d'interaction entre les formes de Itch et la GST servant de contrôle. Au niveau du pull down sur Itch^{WT}, nous constatons une meilleure récupération par Grb2-Ub par rapport à Grb2. Ceci semble indiquer une meilleure affinité de Grb2-Ub à Itch. Concernant Itch^{3R/E}, il y a absence d'interaction pour GST-Grb2 alors que nous observons une très faible récupération de la mutation de Itch (GFP-Itch^{3R/E}) par GST-Grb2-Ub. Ceci confirme que l'ubiquitine fusionnée au substrat interagit avec le domaine HECT de la ligase Itch. La

représentation quantitative de ces résultats est indiquée dans la figure 12B. Cependant l'affinité entre le domaine HECT de Itch et l'ubiquitine est très faible. Ainsi, cette interaction semble jouer un rôle dans l'activité d'élongation de polyubiquitine par le domaine HECT de la ligase Itch mais n'est pas responsable de cette activité comme observée dans les études précédentes.

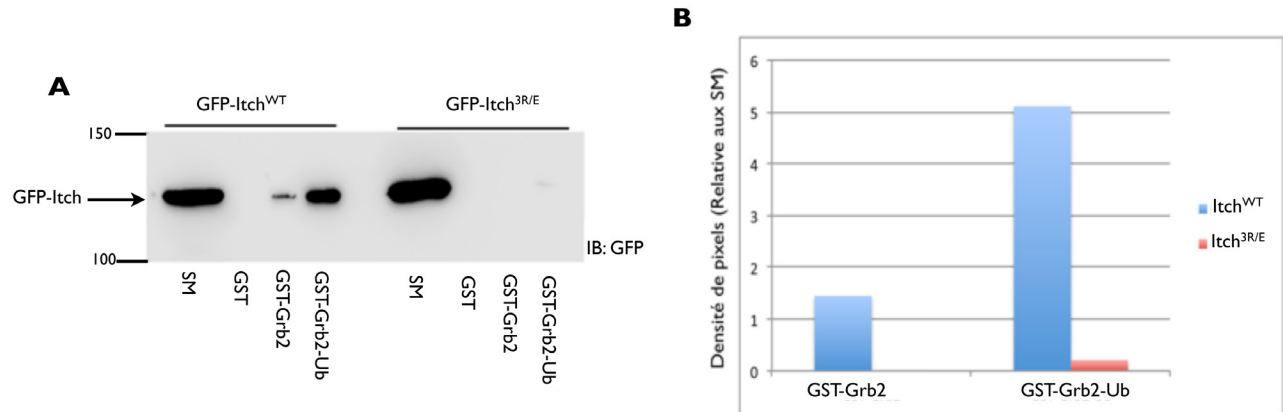


Figure 12: Interaction du domaine HECT de Itch avec l'ubiquitine fusionnée à Grb2. A, des extraits de cellules transfectées avec GFP-Itch^{WT} et GFP-Itch^{3R/E}, ont été incubés avec GST seul ou GST-Grb2 et GST-Grb2-Ub couplés aux billes glutathion-sépharose. Les extraits liés aux billes ont été soumis à un immunomarquage par l'anticorps anti-GFP. B, diagramme de la représentation quantitative des interactions entre les protéines indiquées en A.

3.5 Localisation cellulaire des fusions SH3-Ub

Puisque l'ajout de l'ubiquitine sur Grb2 augmente son ubiquitylation dans la cellule, nous voulions vérifier s'il influence sa localisation cellulaire. Pour ce faire, nous avons surexprimé dans les cellules HEK-293T les plasmides Grb2, Grb2-Ub et Grb2-Ub^{AA} qui contiennent un tag GFP, afin de suivre leurs localisations dans la cellule par accumulation d'une couleur verte. Nous avons aussi marqué le noyau en bleu avec le colorant DAPI afin de le discerner du reste de la cellule.

La figure 13 montre les variantes de Grb2 sur les photos de la colonne de gauche, le noyau dans les photos de la colonne centrale et la superposition des images sur les photos de la

colonne de droite. Sur la photo de superposition, nous pouvons voir que la protéine Grb2 (figure 13A) est dispersée dans le cytoplasme ainsi que dans le noyau. La protéine Grb2-Ub (figure 13B), par rapport à Grb2, ne colocalise pas avec le noyau, et est ponctuée dans le cytoplasme. Ainsi l'ubiquitine fusionnée à Grb2 affecte sa distribution dans la cellule. La protéine Grb2-Ub^{AA} (figure 13C) par contre, colocalise avec le noyau mais est plus ponctuée dans le cytoplasme par rapport à Grb2.

Nous avons quantifié l'intensité de la fluorescence des protéines Grb2 et Grb2-Ub^{AA} dans le noyau et le cytoplasme. Nous avons mesuré l'aire de la fluorescence de chaque protéine dans le noyau, le cytoplasme et la cellule totale, en délimitant une région d'intérêt. La figure 14 montre le pourcentage de la localisation des protéines dans chaque compartiment par rapport à la cellule totale. Les moyennes ont été faites à partir de 25 cellules pour chaque transfection. On constate que la protéine Grb2 est plus nucléaire car on observe une fluorescence de $64 \pm 13\%$ dans le noyau alors que la fluorescence de Grb2-Ub^{AA} est à $48 \pm 10\%$ au même niveau (figure 14 A). Afin d'observer la variabilité de la localisation des protéines dans le cytoplasme, nous avons représenté les données quantitatives en *box plot* suite à la transfection de Grb2 et Grb2-Ub^{AA} (figure 14B). On constate que la localisation cytoplasmique de l'ensemble des protéines Grb2 est comprise entre 10-60%, et Grb2-Ub^{AA} entre 40-78%. Nous remarquons également que la médiane dans le cytoplasme des protéines Grb2 est de 38% alors qu'elle est de 50% pour Grb2-Ub^{AA}. On constate une faible variance de la distribution pour Grb2-Ub^{AA}. En somme, nous observons que la protéine Grb2-Ub^{AA} est plus cytoplasmique que Grb2. Ces résultats montrent que l'ajout d'ubiquitine sur la protéine Grb2 favorise son maintien dans le cytoplasme par rapport à Grb2 seul.

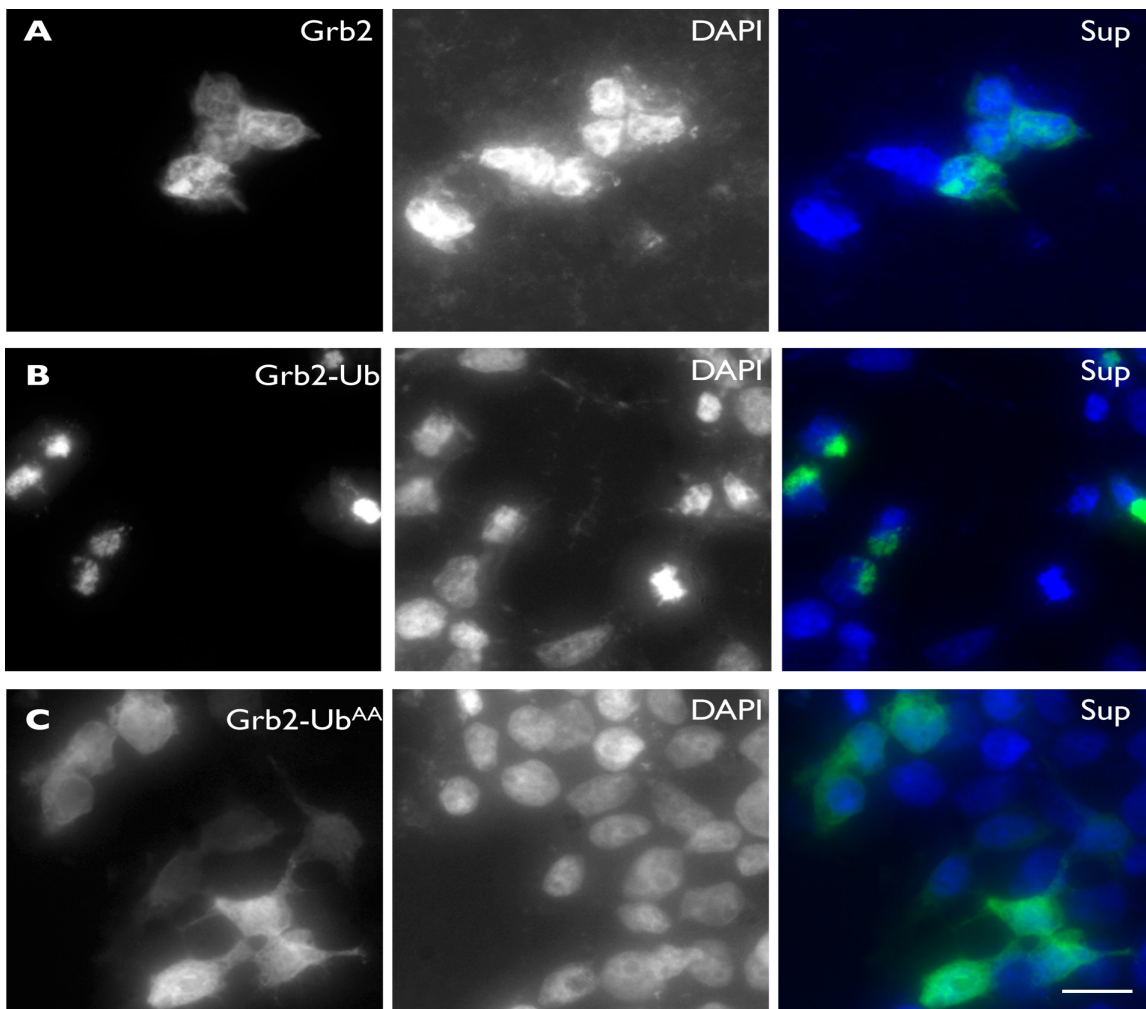


Figure 13: Localisation cellulaire de Grb2 et les fusions avec l'ubiquitine. Les cellules HEK-293T ont été transfectées avec GFP-Grb2 (A), GFP-Grb2-Ub (B) et Grb2-Ub^{AA} (C). Les cellules ont été fixées puis perméabilisées. Sur les photos de la colonne de droite, le noyau des cellules est marqué en bleu et les protéines GFP sont en vert. Sup = Superposition. Barre d'échelle=12 μ M.

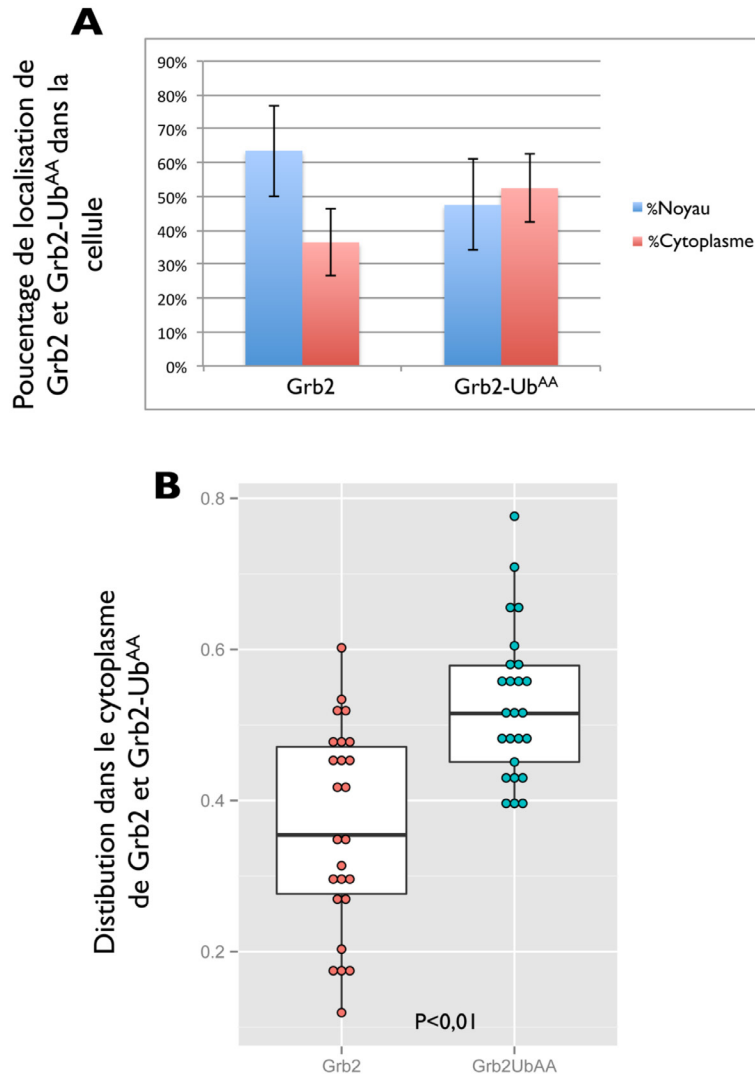


Figure 14: Effet de l'ajout de l'ubiquitine sur la localisation de Grb2. A, Pourcentage de la localisation des protéines Grb2, Grb2-Ub et Grb2-Ub^{AA} dans le noyau (bleu) ou le cytoplasme des cellules HEK-293T. B, Distribution relative dans le cytoplasme des protéines Grb2 (rouge) et Grb2-Ub^{AA} (vert). Trans = transfection.

Comme nous venons de le voir, la fusion de l'ubiquitine augmente la présence de Grb2 dans le cytoplasme. Pour vérifier que c'est bien l'ubiquitylation par la ligase Itch qui induit la relocalisation cytoplasmique, nous avons cherché à déterminer si elle se colocalise avec Grb2 et Grb2-Ub^{AA}. Pour vérifier cela, des immunofluorescences ont été faites pour déterminer la colocalisation des 2 protéines avec la ligase Itch.

La figure 15 montre la colocalisation de GFP-Grb2 (rangée A) par rapport à GFP-Grb2-Ub^{AA} (rangée B) en présence de Myc-Itch (centre). Le marquage de Itch est présenté en rouge, et le noyau en bleu. Les flèches pointent la colocalisation des différentes protéines avec le noyau. La protéine Itch est ponctuée au niveau périnucléaire correspondant au système trans-golgien et aux endosomes tel que rapporté par les études précédentes (Angers et al., 2004; Marchese et al., 2003). On peut voir que la protéine Grb2 colocalise avec le noyau mais est aussi ponctuée dans le cytoplasme. Par contre la protéine Grb2-Ub^{AA} apparaît plus dans les compartiments périnucléaires. Ces résultats suggèrent bien que la ligase Itch en ubiquitylant Grb2 et Grb2-Ub^{AA} induit leur maintien dans le cytoplasme.

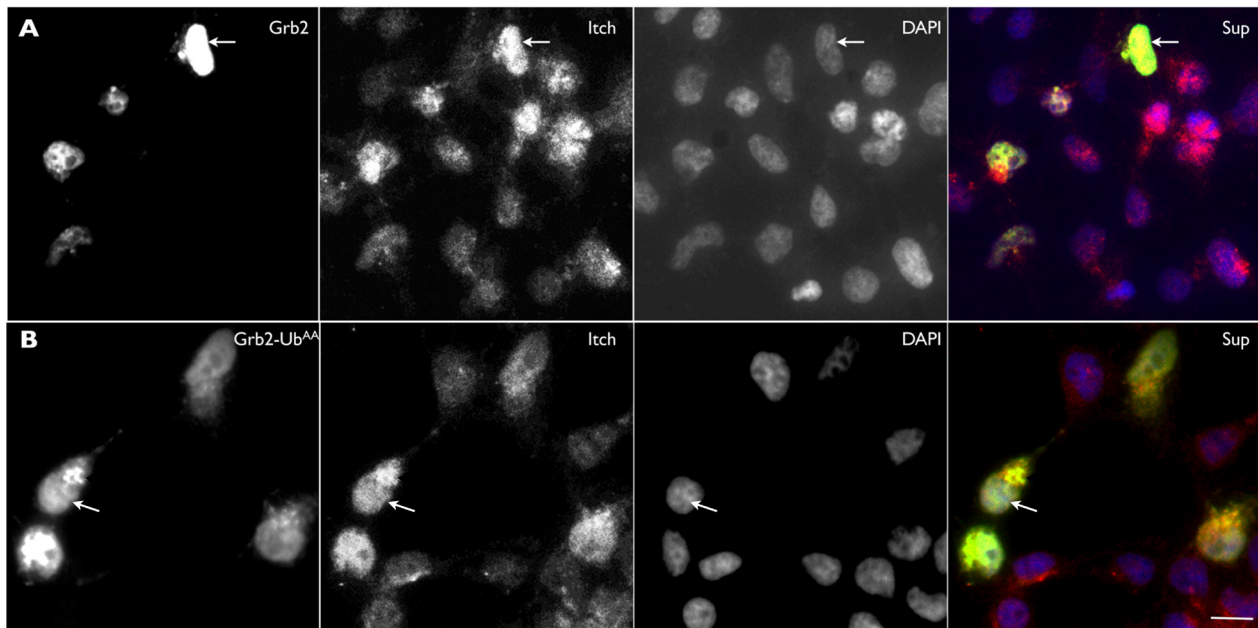


Figure 15: Colocalisation des constructions de Grb2 avec la ligase Itch. Co-transfection dans les cellules HEK-293T des plasmides Myc-Itch avec GFP-Grb2 (A), GFP-Grb2-Ub (B), et GFP-Grb2-Ub^{AA} (C). Sur les photos de la colonne de droite, le noyau des cellules est marqué en bleu, Itch en rouge, et les GFP en vert. Les flèches sont indicatrices de la colocalisation des protéines avec le noyau. Sup = Superposition. Barre d'échelle=10 μ M.

Afin de mieux mettre en évidence l'effet de Itch sur la localisation de Grb2, nous avons surexprimé la ligase seule et observé la localisation de Itch ou de Itch^{3R/E} ainsi que de Grb2 par immunofluorescence. La construction GFP-Itch^{3R/E} contient une mutation de 3 arginines en acide glutamique dans la séquence PRD de Itch, qui empêche son interaction avec le domaine SH3 de Grb2. La figure 16 montre la surexpression de la GFP seule (A) qui sert de contrôle dans cette expérience, GFP-Itch (B) et GFP-Itch^{3R/E} (C). Le marquage de Grb2 est présenté en rouge, et le noyau en bleu. Les flèches pointent la colocalisation des différentes protéines avec le noyau. On constate qu'avec la GFP seule, Grb2 est localisé dans le noyau et dans le cytoplasme, mais semble plus nucléaire. Avec la surexpression de Itch, Grb2 est plus ponctué dans le cytoplasme; dans les compartiments endocytiques, mais aussi au niveau de la membrane plasmique. La surexpression de GFP-Itch^{3R/E} induit aussi une accumulation cytoplasmique de la protéine Grb2. La construction GFP-Itch^{3R/E} induit un patron de distribution de Grb2 similaire à celui qui résulte de la surexpression de Itch alors que l'absence d'interaction entre Itch^{3R/E} aurait dû résulter en un patron plus proche de celui induit par la surexpression de GFP seule.

La quantification de la fluorescence (figure 17A) dans les compartiments cellulaires montre que l'expression de Grb2 est nucléaire à $73 \pm 10\%$, $50 \pm 13\%$, et $48 \pm 12\%$ suite à la surexpression respective de GFP, Itch et Itch^{3R/E}. La figure 17B représente en *box plot* l'analyse statistique de la présence de Grb2 dans le cytoplasme suite à la transfection de GFP, GFP-Itch et GFP-Itch^{3R/E}. La localisation cytoplasmique de l'ensemble des protéines Grb2 est comprise entre 8-48%, 20-78%, 25-71% respectivement suite à la transfection de la GFP seule, Itch et Itch^{3R/E}. On constate une faible variabilité de la distribution des protéines Grb2 suite à la surexpression de GFP seule par rapport à Itch et Itch^{3R/E}. Nous remarquons également que la médiane dans le cytoplasme des protéines Grb2 est de 23, 42 et 45% respectivement suite à la surexpression de GFP, Itch et Itch^{3R/E}. Ainsi l'ubiquitylation de la protéine Grb2 par la ligase Itch semble causer sa

relocalisation du noyau vers le cytoplasme. Par contre, la construction $Itch^{3R/E}$ semble conserver un effet d'ubiquitylation résiduel qui serait la cause de la relocalisation cytoplasmique de Grb2. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour le déterminer.

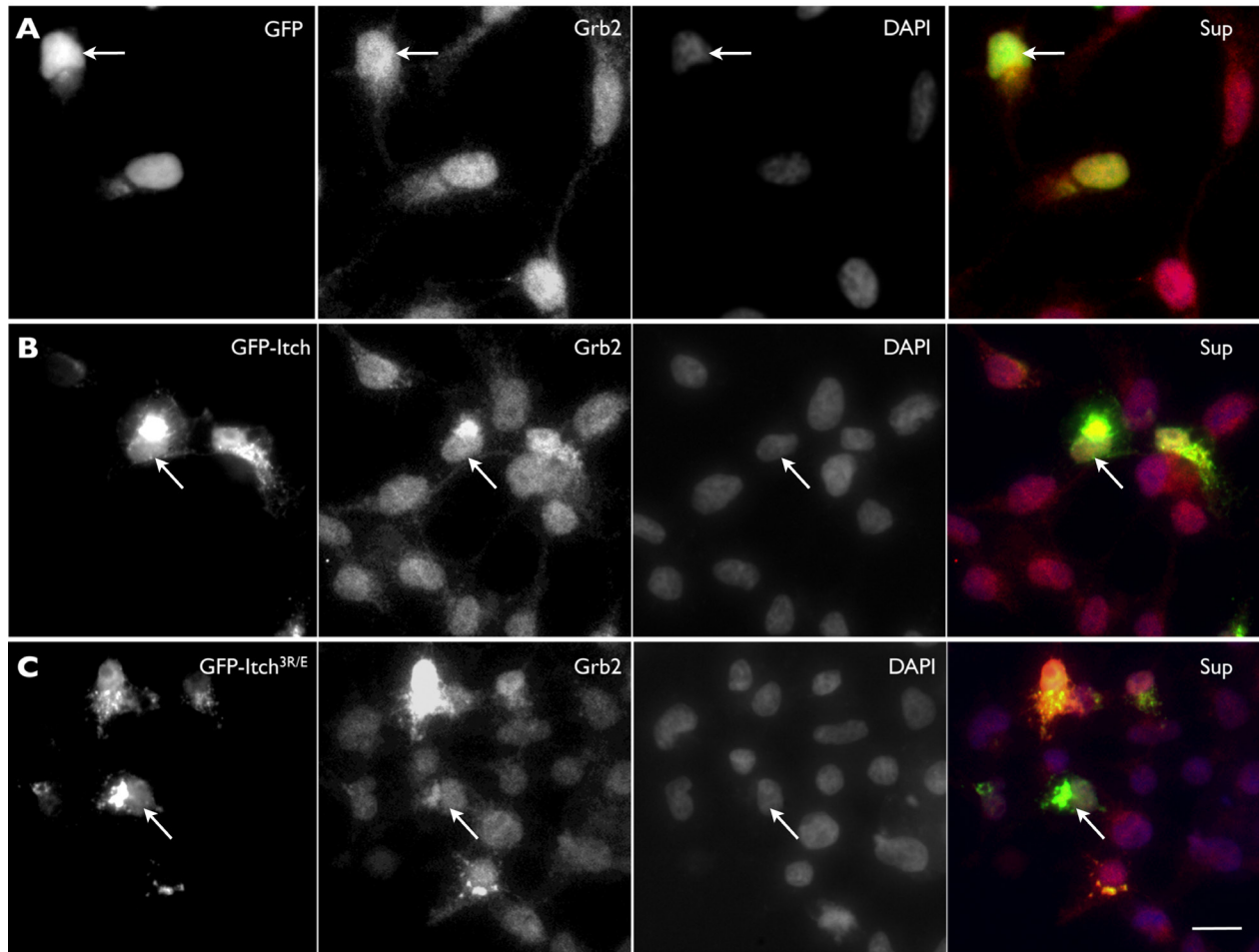


Figure 16: Effet de la surexpression de Itch sur la localisation de Grb2. Les cellules HEK-293T ont été transfectées avec GFP (A), GFP-Itch (B) et GFP-Itch^{3R/E} (C). Sur les photos de la colonne de droite, le noyau des cellules est marqué en bleu, Grb2 en rouge, et les GFP en vert. Les flèches sont indicatrices de la colocalisation des protéines avec le noyau. Sup = Superposition. Barre d'échelle=10 μ M.

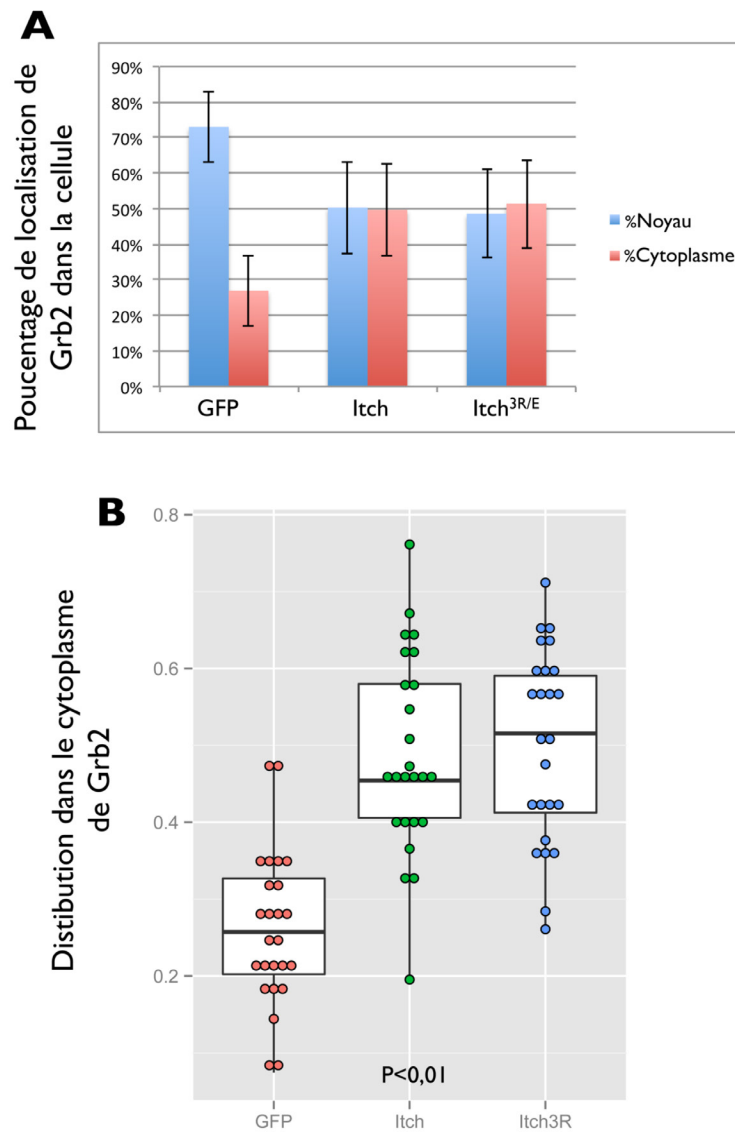


Figure 17: Itch induit une localisation cytoplasmique de la protéine Grb2. A, pourcentage de la localisation de la protéine Grb2 dans le noyau (bleu) ou dans le cytoplasme (rouge) des cellules HEK-293T suite à la transfection de GFP seul, GFP-Itch et GFP-Itch^{3R/E}. B, distribution relative dans le cytoplasme de la protéine Grb2 dans le cytoplasme suite à la surexpression de GFP seul (rouge), GFP-Itch (vert) et GFP-Itch^{3R/E} (bleu). Trans= transfection.

Après avoir montré l'effet de la fusion de l'ubiquitine sur la protéine Grb2, nous avons testé par immunofluorescence l'effet de l'ajout de l'ubiquitine sur la localisation de la protéine endophiline (Endo), un autre substrat à domaine SH3 de la ligase Itch. Cette protéine est distribuée dans le cytoplasme, et se retrouve aux endosomes suite à la stimulation avec EGF, ce

qui est corrélé avec son ubiquitylation par la ligase Itch (Angers et al., 2004; Soubeyran et al., 2002). Nous voulions observer la localisation des protéines de fusion Endo-Ub et Endo-Ub^{AA}. Pour ce faire, nous avons transfecté dans les cellules HEK-293T les plasmides GFP-Endo, GFP-Endo-Ub et GFP-Endo-Ub^{AA}.

La figure 18 montre la localisation de la protéine Endo sur la colonne de gauche, Endo-Ub sur la colonne centrale et Endo-Ub^{AA} sur la colonne de droite. Nous constatons que toutes les trois sont distribuées dans le cytoplasme et au niveau de la membrane plasmique. Nos résultats ne montrent pas de différences notables dans la répartition cytoplasmique de l'endophiline entre les trois conditions, ce qui suggère que la fusion de l'ubiquitine sur la protéine endophiline n'a pas d'effet sur sa localisation cellulaire.

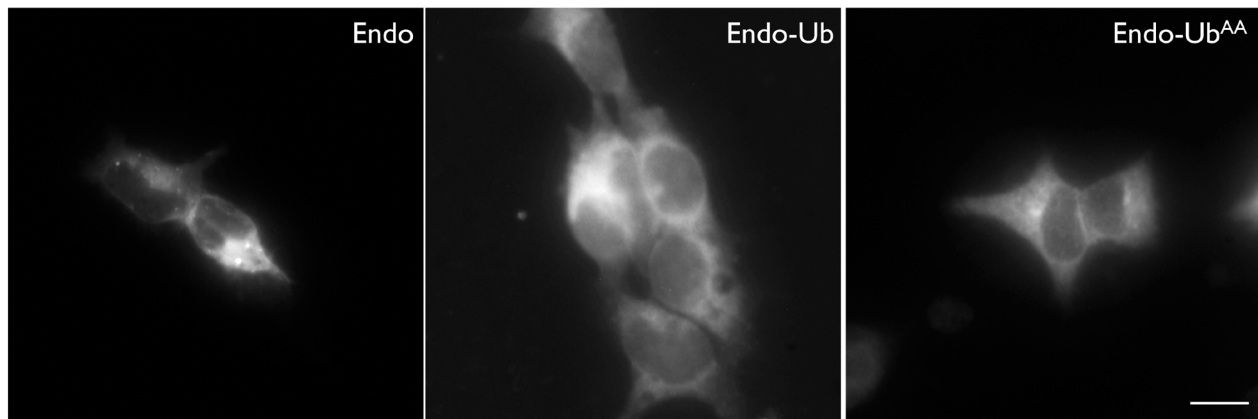


Figure 18: Effet de l'ubiquitylation sur la localisation cellulaire d'endophiline. Les cellules HEK-293T ont été transfectées d'une part avec GFP-Endo (gauche), GFP-Endo-Ub (centre) et GFP-Endo-Ub^{AA} (droite). Barre d'échelle =13 μ M.

4 Discussion

Les ligases CWH interagissent par leur domaine WW avec leurs substrats à motif riche en proline. Lors de l'ubiquitylation, le domaine HECT des ligases CWH constitué de 2 lobes N-terminal et C-terminal, catalyse un ajout séquentiel d'ubiquitine sur le substrat lié au domaine WW. La proximité des domaines WW et HECT permet un rapprochement du substrat au lobe N du domaine HECT facilitant son accessibilité à l'ubiquitine liée au lobe C. Ainsi l'ajout d'une molécule d'ubiquitine sur le substrat génère un site de recrutement du substrat sur le domaine HECT des CWH, augmentant leur activité (Kim et al., 2011). La ligase Itch possède un domaine conservé supplémentaire par rapport aux autres CWH qui lui permet d'interagir avec des substrats à domaine SH3. Le but de cette étude était de déterminer si l'ajout d'une molécule d'ubiquitine sur les substrats à domaine SH3 activerait la ligase Itch et d'observer l'effet de cette activation sur leur régulation.

4.1 Ubiquitylation de la protéine Grb2

Des études précédentes ont montré l'interaction entre le domaine PRD de Itch et des protéines à domaine SH3 dont endophiline (Angers et al., 2004), β -Pix (Janz et al., 2007), SNX9, SNX18 (Baumann et al., 2010), Stam1 (Malik et al., 2012), Pacsin et Amphiphysine (Desrochers et al., 2015). Nous avons identifié la protéine Grb2 contenant 2 domaines SH3 comme substrat de la ligase Itch (Thèse Desrochers 2015, communication personnelle). Grb2 subit des modifications post-transcriptionnelles qui régulent son activité ainsi que les voies de signalisation où il est impliqué. La phosphorylation et la sumoylation de Grb2 activent son interaction avec la protéine Sos1 et la voie ERK, promouvant la croissance cellulaire (Ahmed et al., 2015; Qu et al., 2014). Nos résultats montrent que l'interaction de Grb2 avec le domaine PRD de la ligase Itch induit son ubiquitylation, révélant un nouveau mécanisme de régulation de son activité.

Les interactions établies entre les protéines à domaine SH3 et le domaine PRD de Itch semblent promouvoir une variété de conséquences. Ainsi, l'interaction de Itch avec la protéine β -Pix ne mène pas à son ubiquitylation (Desrochers et al., 2015), tandis que son interaction avec endophiline et plusieurs autres substrats cause leur polyubiquitylation et leur dégradation protéasomale (Azakir and Angers, 2009). Nous avons remarqué que l'interaction entre Itch et Grb2 mène à sa polyubiquitylation *in vivo*, mais ne provoque pas sa dégradation. C'est ainsi pour la protéine Stam1, dont l'ubiquitylation par Itch ne conduit pas à une dégradation, mais est nécessaire pour l'activation de la voie ERK (Malik et al., 2012). L'ubiquitylation de Grb2 par Itch pourrait agir sur la voie de prolifération cellulaire ERK en influençant son interaction avec le récepteur d'EGF ou la protéine Sos1.

L'ubiquitylation observée sur Grb2 peut correspondre à une multiubiquitylation ou une polyubiquitylation sur une chaîne de lysine non protéolytique. Cependant, *in vitro*, nous observons une monoubiquitylation de Grb2 par la ligase Itch, ce qui est contradictoire avec l'observation *in vivo*. Certaines ligases peuvent causer la mono ou la multiubiquitylation d'un même substrat. Ce phénomène est observé pour la ligase Nedd4, qui catalyse les 2 types d'ubiquitylation sur son substrat PTEN. La polyubiquitylation de PTEN par Nedd4 conduit à une dégradation protéasomale dans le cytoplasme (Wang et al., 2007). Tandis que la monoubiquitylation sur les résidus K13 et K289 de PTEN résulte en une accumulation de PTEN dans le noyau (Trotman et al., 2007).

La régulation du substrat et de la ligase peut influencer l'ubiquitylation. Le niveau d'expression de la ligase Itch dépend du type cellulaire et de la présence de la protéase de l'ubiquitine FAM (Mouchantaf et al., 2006). Les études de Li et al (2003) montrent que l'activité d'ubiquitylation de la ligase MDM2 envers son substrat p53 dépend étroitement de son niveau d'expression dans la cellule. Des niveaux élevés de MDM2 se traduisent par une

polyubiquitylation et une dégradation de p53 dans le noyau, tandis que de faibles niveaux de MDM2 conduisent à une monoubiquitylation et l'exportation de p53 dans le cytoplasme (Li et al., 2003). Donc, le niveau d'expression cellulaire de la ligase Itch pourrait influencer l'ubiquitylation de la protéine Grb2.

La régulation de Itch peut influencer son activité envers la protéine Grb2 dans la cellule. Mund et Pelham (2009) ont montré que l'interaction de la ligase Itch avec la protéine adaptatrice Ndfip augmente l'ubiquitylation de son substrat endophiline. L'activation de Itch dans la cellule peut causer une augmentation de son activité envers Grb2, ce qui peut conduire à sa polyubiquitylation *in vivo*.

La protéine Grb2 subit une phosphorylation et sumoylation, qui peuvent influencer son ubiquitylation par Itch dans la cellule (Ahmed et al., 2015; Qu et al., 2014).

La phosphorylation de Grb2 pourrait intervenir dans la liaison entre Grb2 à la ligase Itch causant un type spécifique d'ubiquitylation. En effet, la ligase Itch interagit avec la protéine Dvl, qui joue un rôle crucial dans la signalisation Wnt, mais induit seulement l'ubiquitylation de sa forme phosphorylée (Wei et al., 2012). Il en est de même pour la protéine Akt, dont la phosphorylation par la protéine PDK1 sur les résidus Thr-308 et Ser-473 augmente son activité kinase. La ligase E3 de l'ubiquitine CHIP interagit avec la protéine Akt mais induit l'ubiquitylation ainsi que la dégradation uniquement de ses formes phosphorylées (Thr-308, Ser-473) inhibant sa signalisation (Su et al., 2011). La phosphorylation de Grb2 pourrait intervenir dans la liaison entre Grb2 et Itch causant un type spécifique d'ubiquitylation.

Pareillement, il a été démontré que la sumoylation peut influencer l'activité de certaines ligases de l'ubiquitine. La ligase RNF4 de la famille RING possède un motif SIM (*SUMO interaction motif*), de reconnaissance de la protéine SUMO, qui lui permet d'ubiquityler des substrats sumoylés dans la cellule (Sun et al., 2007). La protéine PML (*promyelocytic leukaemia*)

impliquée dans la leucémie promyélocytaire aiguë, est un substrat de la ligase RNF4, qui cause son ubiquitylation et sa dégradation protéasomale. Cependant, l'activité de RNF4 est précédée d'une sumoylation de PML (Tatham et al., 2008). Ainsi, la sumoylation de Grb2 pourrait influencer l'activité de la ligase Itch dans la cellule.

Les conditions cellulaires peuvent aussi influencer les ligases E3 à catalyser soit la monoubiquitylation ou la polyubiquitylation d'un substrat.

Une étude a montré que la ligase Itch catalyse selon les conditions cellulaires une monoubiquitylation et une polyubiquitylation de la protéine TIEG1 (Venuprasad et al., 2008). La monoubiquitylation de TIEG1 par la ligase Itch cause sa translocation dans le noyau et induit la différenciation des cellules T naïves en cellules régulatrices Treg, suite à la stimulation par le TGF-beta (Venuprasad et al., 2008). Alors qu'une induction par l'interleukine-6, cause une phosphorylation de la protéine TIEG1 par la kinase Tyk2 qui favorise sa polyubiquitylation par la ligase Itch. La polyubiquitylation de TIEG1 induit une différenciation des cellules T en cellules auxiliaires Th17 (Peng et al., 2011). L'ubiquitylation de TIEG1 par la ligase Itch établit un équilibre dans la différenciation des lymphocytes T et la réaction immune.

Ainsi les 2 types d'ubiquitylation observés sur Grb2 pourraient réguler son activité dans la cellule, puisqu'elles ne sont pas protéolytiques. L'ubiquitylation de Grb2 par la ligase Itch peut jouer un rôle dans sa localisation cellulaire, et influencer son activité dans la signalisation des facteurs de croissance.

4.2 L'ajout de l'ubiquitine sur Grb2 augmente l'activité de la ligase Itch

Nos résultats montrent que la protéine de fusion Grb2-Ub est plus ubiquitylée que la protéine normale Grb2 par la ligase Itch. La mutation de la glycine c-terminale de Grb2-Ub en alanine (Grb2-Ub^{AA}) appuie ce résultat car cette forme ne peut pas servir de donneur d'ubiquitine et montre une localisation comparable à la forme sauvage, bien que la proportion cytoplasmique

semble augmentée. Ces observations montrent que l'ajout de l'ubiquitine sur la protéine Grb2 augmente l'activité ligase de Itch. D'autres chercheurs ont montré que la présence d'une molécule d'ubiquitine fusionnée au substrat favorise l'activité du domaine HECT. Kim et al ont montré que l'ajout d'une unité d'ubiquitine à la protéine Sna3 augmente l'activité du domaine HECT de la ligase Rsp5p (Kim et al., 2011). Cependant, la ligase Rsp5 interagit avec Sna3 par son troisième domaine WW (plus proche du domaine HECT) (McNatt et al., 2007; Oestreich et al., 2007). La proximité du domaine WW lié au substrat monoubiquitylé avec le lobe N du domaine HECT facilite l'interaction de ce dernier avec l'ubiquitine. Dans notre étude, le substrat est lié à la région PRD, plus éloignée du domaine HECT. Ceci suggère que la ligase Itch adopte une conformation dans laquelle sa partie centrale est proche de son HECT pendant le transfert de l'ubiquitine. En plus dans l'étude de Kim et al, (2011) seul le fragment C-terminal de la protéine Sna3 contenant le site de l'ubiquitylation a été utilisé comme substrat de fusion à l'ubiquitine. À titre de comparaison, dans notre étude l'ubiquitine est fusionnée à la protéine complète Grb2, et non sur un fragment de la protéine. Il est difficile de spéculer sur la conformation tridimensionnelle de ce complexe, mais nos résultats indiquent qu'elle est favorable à l'augmentation de l'activité catalytique de Itch envers Grb2 *in vivo*.

Les ligases CWH n'ont évidemment pas une conformation linéaire. La ligase Itch, à l'état inactif adopte une conformation fermée dans laquelle son domaine WW3 interagit avec son domaine HECT (Riling et al., 2015). Donc, la ligase Itch peut adopter une conformation dans laquelle le domaine PRD est proche du domaine HECT. Ainsi la protéine de fusion SH3-Ub liée sur le domaine PRD de la ligase pourrait aussi être proche du domaine HECT, ce qui permet la liaison de l'ubiquitine sur le lobe N, activant ainsi la polyubiquitylation du substrat. L'ubiquitylation des substrats à domaine SH3 semble avoir un mécanisme identique que les substrats à motif PPXY, malgré les surfaces d'interaction différentes sur la ligase Itch. La nature

du substrat (SH3 et PPXY) ne semble pas influencer l'activité de la ligase Itch, car il n'existe pas de spécificité d'ubiquitylation entre les 2 types de substrat. Ceci est confirmé par le fait que Itch catalyse 2 types d'ubiquitylation pour la protéine Grb2. En plus, de récentes études montrent qu'une surface de liaison de l'ubiquitine sur le lobe N du domaine HECT promeut l'élongation de la polyubiquitylation du domaine HECT (Maspero et al., 2013; Ronchi et al., 2013). Ceci est appuyé par nos observations, car l'ubiquitine fusionnée à Grb2 pourrait reconnaître le domaine HECT de la ligase Itch, augmentant ainsi son activité. Cependant, dans la même étude Maspero et al (2013) ont montré que c'est le lobe C de la ligase HECT qui détermine le type de chaîne de polyubiquitine. Ceci était déjà observé pour l'activité du domaine HECT de la ligase Rsp5p (Kim and Huibregtse, 2009). D'autant plus que certaines ligases HECT telles que la ligase KIAA10 ne possèdent pas de surface d'interaction à l'ubiquitine (Wang and Pickart, 2005).

Nos résultats montrent que la protéine de fusion Grb2-Ub *in vitro* est monoubiquitylée par la ligase Itch, dans ce cas l'ubiquitine fusionnée à Grb2 ne semble pas activer le domaine HECT de Itch, ou n'interagit pas avec le lobe N de ce dernier. Ce résultat est opposé à ce qui est observé dans l'étude de Kim, où l'ubiquitylation du substrat Ub-Sna3C active la ligase de la levure Rsp5p (Kim et al., 2011), à la différence Grb2 est monoubiquitylé par Itch alors que Sna3C est polyubiquitylé via une chaîne Lys63 par Rsp5p (Stawiecka-Mirota et al., 2007). Dans ce cas, d'autres facteurs interviendraient suite à la liaison de l'ubiquitine sur le lobe N du domaine HECT afin d'activer la polyubiquitylation. Le mécanisme par lequel l'interaction du substrat monoubiquitylé sur le lobe N active le domaine HECT de la ligase reste inconnu.

Nous avons aussi testé l'ubiquitylation par la ligase Itch de la fusion de l'ubiquitine avec la protéine endophiline (non présenté). Cependant nous n'avons pas d'observation concluante. La fusion de l'ubiquitine avait différents effets sur l'ubiquitylation d'endophiline; elle activait ou inhibait dans les mêmes conditions l'activité de la ligase Itch. Il semble donc que la seule

présence d'une molécule d'ubiquitine sur le substrat SH3 ne soit pas suffisante pour augmenter l'activité de Itch envers ce substrat.

Ainsi, nos résultats montrent des différences sur l'ubiquitylation des protéines Grb2 et endophiline par la ligase Itch. L'ajout de l'ubiquitine sur Grb2 augmente l'activité *in vivo* de Itch, tandis que l'ajout de l'ubiquitine sur endophiline ne montre pas d'effet conséquent sur l'activité de Itch.

4.3 La surface intrinsèque de liaison de l'ubiquitine sur le domaine HECT n'influence pas son activité ligase.

Après avoir déterminé que l'ajout de l'ubiquitine sur Grb2 augmente son ubiquitylation, nous avons observé son interaction avec la ligase Itch. Nos résultats montrent que l'ajout de l'ubiquitine sur Grb2 augmente son affinité à Itch. Cependant l'interaction est faible, et n'est observée qu'avec la mutation du domaine PRD de Itch. Ceci indique une interaction supplémentaire de l'ubiquitine sur le domaine HECT en plus de l'interaction du PRD avec le SH3 de Grb2.

Ce résultat peut être comparé à l'observation faite dans des études où la fusion de l'ubiquitine sur les protéines RhoA et Sna3 augmente leur affinité à leurs ligases respectives Smurf2 et Rsp5p, de la même famille que Itch (Kim et al., 2011; Ogunjimi et al., 2010). Cependant, par comparaison, l'interaction observée entre la protéine de fusion Grb2-Ub et le domaine HECT de la ligase Itch est très faible. Nous n'étions pas en mesure d'observer cette interaction par isolement du domaine HECT. Alors que French et al (2009) montrent dans leur étude de la ligase Rsp5p une forte affinité entre le domaine HECT et l'ubiquitine. Mieux même, le lobe N du domaine HECT de Rsp5p isolé interagit avec l'ubiquitine (French et al., 2009). Donc, ceci semble montrer qu'il y a une différence structurelle de la surface de liaison de l'ubiquitine entre les domaines HECT des ligases CWH.

La surface intrinsèque du lobe N du domaine HECT de ces ligases interagit avec l'ubiquitine fixée au substrat et joue un rôle dans les premiers événements de l'ubiquitylation. Cette interaction augmente l'élongation de chaîne d'ubiquitine sur le substrat (Maspero et al., 2013). Par contre les résidus critiques de la surface de liaison de l'ubiquitine sur le domaine HECT ne sont pas conservés pour toutes les ligases de la famille CWH. Le résidu Phe618 observé pour la ligase Rsp5p est remplacé par un Leu pour les ligases Itch, WWP1 et WWP2 (Kim et al., 2011). Le résidu Leu618 a un effet sur la surface de liaison car le domaine HECT de ces ligases a une faible affinité pour l'ubiquitine (Maspero et al., 2011). Ceci correspond à nos observations puisque nos résultats montrent une faible interaction du domaine HECT de la ligase Itch avec la protéine Grb2 fusionnée à l'ubiquitine. Ces études suggèrent que l'élongation de la chaîne d'ubiquitine sur les ligases Rsp5p, Nedd4 et Smurf est étroitement liée à la surface d'interaction de l'ubiquitine dans leur domaine HECT. Alors que le domaine HECT de la ligase Itch présente une faible affinité à l'ubiquitine, mais est doué d'une forte activité catalytique d'élongation de chaîne de polyubiquitine sur ses substrats. La mutation de la surface d'interaction de l'ubiquitine des domaines HECT des ligases Itch, WWP1 et WWP2 influencerait-elle leur activité d'élongation de chaînes de polyubiquitine?

Nous suggérons que la surface d'interaction dans le lobe N du domaine HECT permet une accessibilité des lysines de l'ubiquitine au lobe C plutôt que de promouvoir la polyubiquitylation telle que décrite par les études précédentes. La surface dans l'ubiquitine comportant le résidu Ile44 qui interagit avec le domaine HECT des ligases CWH est proche de la Lys48 (French et al., 2009), ce qui fait que ces dernières catalysent préférentiellement une chaîne de polyubiquitine via Lys63 (Maspero et al., 2013) dont le résidu est à l'opposé de la surface d'interaction, et donc accessible pour la réaction de fusion.

4.4 Effet de l'ajout d'ubiquitine sur la localisation du substrat.

Le troisième rôle de l'ajout de l'ubiquitine sur le substrat observé, portait sur la localisation cellulaire de ce dernier. Nous avons réalisé plusieurs expériences utilisant l'immunofluorescence afin d'observer la localisation de Grb2, et sa fusion à l'ubiquitine. Les résultats montrent une distribution dans toute la cellule. Ces observations sont conformes aux études précédentes, selon lesquelles la protéine Grb2 est localisée dans le noyau et dans le cytoplasme de plusieurs types de cellules (Jiang and Sorkin, 2002; Romero et al., 1998; Tanase, 2010; Yamazaki et al., 2002).

L'un des rôles de Grb2 les plus étudiés est son implication dans les voies de signalisations des récepteurs de facteur de croissance, notamment les voies de récepteurs à tyrosine kinase RTK (Schlaepfer et al., 1998). Suite à la signalisation au niveau de la membrane plasmique, les RTK sont internalisés au niveau des compartiments endosomaux, soit pour permettre leur recyclage au niveau de la membrane plasmique ou leur dégradation lysosomale (Miura et al., 2008). L'étude de Yamakazi et al montre que la protéine Grb2 est impliquée dans l'internalisation du récepteur de l'EGF. Ils ont montré que Grb2 accompagne le récepteur dans les endosomes précoces, les endosomes tardifs et dans les lysosomes (Yamazaki et al., 2002), et est indispensable à l'internalisation de ce dernier dans les puits recouverts de clathrine (Jiang et al., 2003).

Concernant la localisation nucléaire, peu de choses sont connues concernant le rôle de Grb2 dans le noyau. Étant une protéine adaptatrice, elle pourrait interagir avec des protéines nucléaires. Une étude a montré son interaction avec la protéine nucléaire hnRNP C (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C*), cependant elle ne montre pas une implication fonctionnelle de Grb2 (Romero et al., 1998). Il serait intéressant d'explorer la localisation nucléaire de Grb2 et de voir son effet dans ce compartiment.

Nos résultats indiquent que le pourcentage des protéines endogène et exogène de Grb2 dans le noyau est de 60% dans les cellules HEK-293T. Dans les cellules COS-7 et A431, la protéine Grb2 endogène semble plutôt nucléaire (Yamazaki et al., 2002), tandis qu'elle est estimée à seulement 20% dans le noyau des cellules Jurkat T et UT7-S Epo (Romero et al., 1998). Donc la distribution cellulaire de Grb2 dépend du type cellulaire.

La plupart des protéines conjuguées à l'ubiquitine sont récupérées dans la fraction insoluble suite à l'extraction par le Triton après une incubation des cellules avec des inhibiteurs de protéasome. Qian et al ont utilisé cette approche pour identifier le profil des fusions de l'ubiquitine. Par ubiquitylation *in vitro* de différentes constructions de fusion d'ubiquitine, il ont montré que l'ubiquitine fusionnée en C-terminal d'une protéine (X-Ub) peut se conjuguer à une chaîne d'ubiquitine sur un autre substrat, et pourrait se retrouver au niveau du protéasome. La mutation de lysine K48 (ciblage au protéasome) ne peut pas palier à ce ciblage, car la protéine de fusion X-Ub^{K48muté} (incapable d'accepter une ubiquitine) pourra quand même s'attacher à une terminaison de chaîne de polyubiquitine. Seule la mutation de la partie C-terminale (X-Ub^{G76muté}) empêche une conjugaison de la protéine de fusion (Qian et al., 2002). On observe d'ailleurs que la distribution cellulaire de Grb2-Ub est très différente de celle de la protéine sauvage Grb2. Ce qu'on remarque en premier avec sa localisation, c'est qu'elle n'est pas présente dans le noyau, mais dans des structures périnucléaires qui peuvent correspondre aux compartiments endosomaux, lysosomaux et/ou du protéasome.

Étant donné que l'ubiquitine de la construction Grb2-Ub pourrait servir de donneur dans une chaîne de polyubiquitine, nous avons muté les glycines en c-terminale de l'ubiquitine en alanine (Grb2-Ub^{AA}), rendant l'ubiquitylation spécifique à Grb2. Ainsi nous avons utilisé cette construction pour la suite des observations par immunofluorescence de l'effet de l'ubiquitylation sur la localisation de Grb2. La répartition de Grb2-Ub^{AA} dans les cellules HEK-293T est similaire

à celle de la protéine sauvage Grb2, montrant de façon claire que la mutation est efficace, et que cette construction représente une monoubiquitylation de la protéine Grb2. On remarque au niveau de la localisation, que Grb2-Ub^{AA} est plus cytoplasmique par rapport à la forme sauvage, laissant donc penser que l'ubiquitine fusionnée à Grb2 cause son export du noyau ou son maintien au cytoplasme. Étant donné que Grb2 est un substrat de la ligase Itch, et que Grb2-Ub^{AA} augmente son activité ligase, il est probable que la ligase Itch par ubiquitylation, induirait aussi un export du noyau de la protéine Grb2.

Nous avons donc testé par immunofluorescence l'effet de la ligase Itch sur la distribution cellulaire de la protéine Grb2. Nos résultats montrent qu'en présence de la ligase Itch, les protéines Grb2 et Grb2-Ub^{AA} deviennent plus cytoplasmiques, ce qui confirme l'hypothèse avancée suite à la distribution cytoplasmique de la protéine de fusion Grb2-Ub^{AA}. Cependant, l'échange bidirectionnel des protéines entre le noyau et le cytoplasme se produit *via* les pores nucléaires, qui permettent la diffusion passive des molécules de taille inférieure à 90~100 kDa (Mohr et al., 2009; Wang and Brattain, 2007). Les grosses molécules nécessitent un signal de localisation nucléaire reconnu par des protéines adaptatrices appelées importines, qui permettent leur entrée dans le noyau. Les protéines de fusion GFP-Grb2 et GFP-Grb2-Ub^{AA} font respectivement 51 et 59 kDa, peuvent donc diffuser passivement dans les pores nucléaires. Ces protéines de fusion auront une liberté d'échange bidirectionnelle entre le noyau et le cytoplasme dans la cellule. Cependant, il a été démontré que la fusion de l'ubiquitine sur Grb2 augmente l'activité ligase de Itch, qui résulte en une polyubiquitylation de Grb2. L'ajout d'unités d'ubiquitine sur GFP-Grb2-Ub^{AA} (supérieure à 110 kDa) pourrait empêcher l'entrée de Grb2 dans le noyau. Ceci expliquerait la présence de Grb2-Ub^{AA} dans le cytoplasme.

Ainsi l'expérience réalisée avec la transfection de Itch, permet d'observer la distribution cytoplasmique de Grb2 endogène (25 kDa), montrant l'effet de l'ubiquitylation sur sa

distribution. Le résultat montre que la ligase Itch cause une relocalisation du noyau vers le cytoplasme de la protéine Grb2. Nous avons pu observer que la ligase Itch est présente dans le noyau mais est plus ponctuée au niveau du cytoplasme. Il a été démontré que Itch est localisé dans les endosomes et au compartiment trans-golgien (Angers et al., 2004; Marchese et al., 2003). Étant donné que Itch interagit avec des protéines nucléaires, notamment des facteurs de transcription (Gao et al., 2004; Rossi et al., 2006; Rossi et al., 2005; ZeRuth et al., 2015), il est probable qu'elle se retrouve au moins partiellement dans le compartiment nucléaire. Toutefois, cette question n'a jamais été étudiée à notre connaissance.

Certaines protéines possèdent des séquences spécifiques d'acides aminés qui sont reconnues par des récepteurs nucléaires permettant leur import (*nuclear localization signal*, NLS) ou leur export (*nuclear export signal*, NES) dans le noyau (Xu et al., 2010). Le signal d'export nucléaire NES composé de la séquence LxxxLxxLxL (L représente une leucine, et x un acide aminé quelconque) a été identifié dans la ligase HECT Smurf2. Ce signal permet l'exportation de la ligase Smurf2 en complexe avec son substrat Smad7 du noyau par la reconnaissance de la protéine CRM1, un récepteur d'export nucléaire (Tajima et al., 2003). La séquence NES identifiée chez Smurf2 est présente dans la ligase Itch entre les acides aminés 135 et 145 (LSICLDGLQL). Cette séquence pourrait permettre l'export de la ligase Itch, peut-être en lien avec la protéine Grb2 du noyau. Il serait intéressant de déterminer l'interaction entre Itch et des récepteurs nucléaires, ou muter cette séquence et observer la distribution cellulaire de Itch et Grb2.

La ligase Itch catalyse une monoubiquitylation ainsi qu'une polyubiquitylation de la protéine Grb2. Quelle proportion de Grb2, nucléaire ou cytoplasmique, est spécifique à un type d'ubiquitylation? Et quelle proportion de Grb2 a une meilleure affinité avec la ligase Itch?

Sachant que la distribution de Grb2 dépend du type cellulaire, donc la ligase Itch interagirait avec Grb2 dans le compartiment où il est plus exprimé, causant ainsi sa relocalisation. Ceci a été observé avec la protéine p53, dont la monoubiquitylation par la ligase E3 MDM2 cause son export du noyau dépendamment de son abondance dans la cellule (Li et al., 2003). Par contre, la protéine PTEN qui est aussi modifiée avec les 2 types d'ubiquitylation cités pour Grb2 par la ligase Nedd4, sa monoubiquitylation cause son import dans le noyau (Trotman et al., 2007). Dans les cellules HEK-293T, Grb2 est plutôt nucléaire. On pourrait donc émettre l'hypothèse que l'ubiquitylation de Grb2 se fait dans le noyau, causant son export vers le cytoplasme.

Nous avons aussi testé l'effet de Itch incapable d'interagir avec la protéine Grb2 (Itch^{3R/E}) sur sa localisation. Il est évident qu'en absence d'interaction avec le SH3 de Grb2, cette construction de Itch devrait rétablir la localisation nucléaire de Grb2. Cependant on observe une distribution cytoplasmique de Grb2, similaire à celle observée en présence de Itch sauvage, indiquant un effet d'ubiquitylation même en absence d'interaction avec la construction de Itch muté. Ce qui laisse penser que la protéine Grb2 est ubiquitylée par une autre ligase. Cependant si tel était le cas, on aurait dû observer l'effet de cette ligase dans la condition contrôle où la GFP seule était surexprimée. Il serait intéressant par des essais d'ubiquitylation *in vivo* de voir l'effet de Itch^{3R/E} sur la protéine Grb2. La même situation a été observée avec la protéine endophiline. L'étude d'Angers et al, montre que la ligase Itch interagit par son domaine PRD avec Endo et cause son ubiquitylation, (Angers et al., 2004). Malgré qu'ils n'observent pas d'ubiquitylation d'endophiline avec la construction Itch^{C/A} (perte d'activité catalytique), ils observent une activité très réduite avec la construction Itch^{ΔPRD} (incapable d'interagir avec le domaine SH3). C'est par la suite, qu'une étude révèle que la ligase E3 Parkin peut causer l'ubiquitylation d'endophiline (Trempe et al., 2009). Nous émettons l'hypothèse que, sous toute réserve, la construction Itch^{C/A} en interagissant avec endophiline pourrait diminuer son accessibilité à la ligase Parkin. Dans

notre étude, nous pensons que Itch pourrait aussi par compétition bloquer l'effet de l'autre ligase de la protéine Grb2, ce qui expliquerait en partie l'effet d'ubiquitylation observée avec la construction Itch^{3R/E}, cependant il faudra réaliser l'ubiquitylation de Grb2 en présence de Itch^{3R/E} afin de vérifier ces théories.

Concernant la protéine endophiline (Endo), nous avons vérifié aussi par immunofluorescence l'effet de l'ajout de l'ubiquitine sur sa localisation cellulaire. Nos résultats montrent que la protéine Endo est diffuse dans le cytoplasme avec une ponctuation dans une structure ressemblant aux vésicules endocytiques. La protéine Endo-Ub est beaucoup plus ponctuée que la forme sauvage. Par contre, la protéine monoubiquitylée Endo-Ub^{AA} montre une distribution similaire par rapport à la forme sauvage.

La protéine endophiline possède plusieurs isoformes, et joue un rôle dans l'endocytose et le trafic cellulaire (Kjaerulff et al., 2011). L'étude d'Angers et al montre que la ligase Itch colocalise avec la protéine endophiline au niveau des endosomes, suite à la stimulation à l'EGF et cause son ubiquitylation (Angers et al., 2004), ce qui s'ensuit par sa dégradation dans le protéasome (Azakir and Angers, 2009). Nous observons une distribution cytoplasmique d'endophiline qui concorde avec les observations précédentes. Contrairement à Grb2, la fusion de l'ubiquitine n'a pas d'impact sur la localisation d'endophiline, car la localisation de Endo-Ub^{AA} ressemble à celle d'Endo. Cette différence était déjà observée au niveau de l'ubiquitylation (non représentée), où la fusion de l'ubiquitine n'avait pas d'effet conséquent sur endophiline. En fait, l'ubiquitylation d'endophiline par la ligase Itch est difficile à spécifier, car elle se retrouve dans un complexe multi-protéique dont certaines sont aussi ubiquitylées, lors de l'internalisation du récepteur de l'EGF dans l'endosome précoce (Schmidt and Dikic, 2005). Et de surcroit, en plus de la ligase Itch, elle est ubiquitylée par la ligase Parkin (Trempe et al., 2009), d'où toute la

difficulté d'observer l'effet de l'ajout de l'ubiquitine sur la localisation cellulaire ainsi que son ubiquitylation.

5 Conclusion et perspectives

Ce projet de recherche avait comme objectif d'étudier le mécanisme d'activité des ligases CWH. Plusieurs études avaient montré que la surface d'interaction de l'ubiquitine sur le domaine HECT des ligases CWH était responsable de l'élongation de la polyubiquitylation par ce domaine (Kim et al., 2011; Maspero et al., 2011; Maspero et al., 2013; Ogunjimi et al., 2010). La ligase Itch, de cette famille, possède spécifiquement un domaine riche en proline qui lui permet d'interagir avec des protéines à motif SH3. Nous voulions déterminer l'effet de l'ajout d'une molécule d'ubiquitine sur un substrat à domaine SH3 sur l'activité de la ligase Itch. Nous avons émis l'hypothèse que la fusion de l'ubiquitine sur le substrat augmenterait l'activité du domaine HECT de Itch.

Nos résultats montrent que l'ajout d'ubiquitine sur la protéine Grb2 active le domaine HECT de Itch de sorte à promouvoir l'ubiquitylation. On remarque que la protéine de fusion Grb2-Ub est plus ubiquitylée que la protéine Grb2 par Itch. Ce résultat concorde avec les études précédentes effectuées sur des substrats à motif PPXY. Cependant, les expériences *in vitro* ne permettent pas de déceler un effet d'activateur de la fusion d'ubiquitine sur Itch, ce qui montre que d'autres facteurs peuvent influencer l'activité des ligases dans la cellule.

Nos résultats montrent également que le domaine HECT de Itch a une très faible affinité avec l'ubiquitine. Ceci montre que la surface d'interaction de l'ubiquitine dans le domaine HECT n'est pas responsable de l'élongation de la polyubiquitylation du substrat tel que décrit pour d'autres ligases CWH. Il serait intéressant de préciser comment l'ubiquitine fusionnée au substrat active le domaine HECT de Itch.

Nous avons observé l'effet de l'ubiquitylation sur la localisation de la protéine Grb2. Nos résultats montrent que Itch en ubiquitylant Grb2 cause sa relocalisation du noyau vers le cytoplasme.

L'ubiquitylation de Grb2 ne menant pas à une dégradation, elle pourrait avoir un effet sur ses fonctions au niveau de la signalisation cellulaire. Il faudrait déterminer le site d'ubiquitylation de Grb2 par Itch, c'est-à-dire la lysine qui accepte l'ubiquitine. Ainsi nous serons en mesure de voir l'effet de l'ubiquitylation de Grb2 dans la signalisation cellulaire, ceci pourrait avoir un effet conséquent sur la motilité cellulaire, la prolifération et la tumorigenèse.

Le mécanisme d'activité des ligases HECT reste peu connu, mais ce projet de maîtrise nous a permis d'apporter quelques précisions. Il est clair que des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre la régulation ainsi que le mécanisme d'activité des ligases HECT.

6 Références

- Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383:787-793.
- Ahmed, Z., Z. Timsah, K.M. Suen, N.P. Cook, G.R.t. Lee, C.C. Lin, M. Gagea, A.A. Marti, and J.E. Ladbury. 2015. Grb2 monomer-dimer equilibrium determines normal versus oncogenic function. *Nature communications*. 6:7354.
- An, H., D.T. Krist, and A.V. Statsyuk. 2014. Crosstalk between kinases and Nedd4 family ubiquitin ligases. *Mol Biosyst*. 10:1643-1657.
- Angers, A., A.R. Ramjaun, and P.S. McPherson. 2004. The HECT domain ligase itch ubiquitinates endophilin and localizes to the trans-Golgi network and endosomal system. *J Biol Chem*. 279:11471-11479.
- Artavanis-Tsakonas, S., M.D. Rand, and R.J. Lake. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 284:770-776.
- Ashwell, J.D. 2006. The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 6:532-540.
- Azakhir, B.A., and A. Angers. 2009. Reciprocal regulation of the ubiquitin ligase Itch and the epidermal growth factor receptor signaling. *Cell Signal*. 21:1326-1336.
- Azakhir, B.A., G. Desrochers, and A. Angers. 2010. The ubiquitin ligase Itch mediates the antiapoptotic activity of epidermal growth factor by promoting the ubiquitylation and degradation of the truncated C-terminal portion of Bid. *FEBS J*. 277:1319-1330.
- Baker, R.T. 1996. Protein expression using ubiquitin fusion and cleavage. *Curr Opin Biotechnol*. 7:541-546.
- Baumann, C., C.K. Lindholm, D. Rimoldi, and F. Levy. 2010. The E3 ubiquitin ligase Itch regulates sorting nexin 9 through an unconventional substrate recognition domain. *FEBS J*. 277:2803-2814.
- Bedford, M.T., D.C. Chan, and P. Leder. 1997. FBP WW domains and the Abl SH3 domain bind to a specific class of proline-rich ligands. *Embo j*. 16:2376-2383.
- Bedford, M.T., R. Reed, and P. Leder. 1998. WW domain-mediated interactions reveal a spliceosome-associated protein that binds a third class of proline-rich motif: the proline glycine and methionine-rich motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:10602-10607.
- Bee, C., A. Moshnikova, C.D. Mellor, J.E. Molloy, Y. Koryakina, B. Stieglitz, A. Khokhlatchev, and C. Herrmann. 2010. Growth and tumor suppressor NORE1A is a regulatory node between Ras signaling and microtubule nucleation. *J Biol Chem*. 285:16258-16266.
- Brou, C. 2009. Intracellular trafficking of Notch receptors and ligands. *Exp Cell Res*. 315:1549-1555.
- Calvisi, D.F., H. Donniger, M.D. Vos, M.J. Birrer, L. Gordon, V. Leaner, and G.J. Clark. 2009. NORE1A tumor suppressor candidate modulates p21CIP1 via p53. *Cancer Res*. 69:4629-4637.
- Chang, L., H. Kamata, G. Solinas, J.L. Luo, S. Maeda, K. Venuprasad, Y.C. Liu, and M. Karin. 2006. The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell*. 124:601-613.
- Chastanger, P., A. Israel, and C. Brou. 2006. Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO Rep*. 7:1147-1153.

- Chen, H.I., and M. Sudol. 1995. The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:7819-7823.
- Cheng, P.L., H. Lu, M. Shelly, H. Gao, and M.M. Poo. 2011. Phosphorylation of E3 ligase Smurf1 switches its substrate preference in support of axon development. *Neuron*. 69:231-243.
- de Heuvel, E., A.W. Bell, A.R. Ramjaun, K. Wong, W.S. Sossin, and P.S. McPherson. 1997. Identification of the major synaptojanin-binding proteins in brain. *J Biol Chem*. 272:8710-8716.
- De Nicola, G.F., E.D. Martin, A. Chaikuad, R. Bassi, J. Clark, L. Martino, S. Verma, P. Sicard, R. Tata, R.A. Atkinson, S. Knapp, M.R. Conte, and M.S. Marber. 2013. Mechanism and consequence of the autoactivation of p38alpha mitogen-activated protein kinase promoted by TAB1. *Nat Struct Mol Biol*. 20:1182-1190.
- Debonneville, C., S.Y. Flores, E. Kamynina, P.J. Plant, C. Tauxe, M.A. Thomas, C. Munster, A. Chraïbi, J.H. Pratt, J.D. Horisberger, D. Pearce, J. Loffing, and O. Staub. 2001. Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. *The EMBO journal*. 20:7052-7059.
- Dempsey, P.W., S.E. Doyle, J.Q. He, and G. Cheng. 2003. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*. 14:193-209.
- den Hertog, J., and T. Hunter. 1996. Tight association of GRB2 with receptor protein-tyrosine phosphatase alpha is mediated by the SH2 and C-terminal SH3 domains. *The EMBO journal*. 15:3016-3027.
- Desrochers, G., M. Lussier-Price, J.G. Omichinski, and A. Angers. 2015. Multiple Src Homology 3 Binding to the Ubiquitin Ligase Itch Conserved Proline-Rich Region. *Biochemistry*. 54:7345-7354.
- Di Marcotullio, L., E. Ferretti, A. Greco, E. De Smaele, A. Po, M.A. Sico, M. Alimandi, G. Giannini, M. Maroder, I. Screpanti, and A. Gulino. 2006. Numb is a suppressor of Hedgehog signalling and targets Gli1 for Itch-dependent ubiquitination. *Nature cell biology*. 8:1415-1423.
- Dunn, R., D.A. Klos, A.S. Adler, and L. Hicke. 2004. The C2 domain of the Rsp5 ubiquitin ligase binds membrane phosphoinositides and directs ubiquitination of endosomal cargo. *J Cell Biol*. 165:135-144.
- Eaton, H.E., G. Desrochers, S.B. Drory, J. Metcalf, A. Angers, and C.R. Brunetti. 2011. SIMPLE/LITAF expression induces the translocation of the ubiquitin ligase itch towards the lysosomal compartments. *PloS one*. 6:e16873.
- Fang, D., C. Elly, B. Gao, N. Fang, Y. Altman, C. Joazeiro, T. Hunter, N. Copeland, N. Jenkins, and Y.C. Liu. 2002. Dysregulation of T lymphocyte function in itchy mice: a role for Itch in TH2 differentiation. *Nature immunology*. 3:281-287.
- Fisher, R.D., B. Wang, S.L. Alam, D.S. Higginson, H. Robinson, W.I. Sundquist, and C.P. Hill. 2003. Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif. *J Biol Chem*. 278:28976-28984.
- French, M.E., B.R. Kretzmann, and L. Hicke. 2009. Regulation of the RSP5 ubiquitin ligase by an intrinsic ubiquitin-binding site. *J Biol Chem*. 284:12071-12079.
- Galan, J.M., V. Moreau, B. Andre, C. Volland, and R. Haguenaer-Tsapis. 1996. Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J Biol Chem*. 271:10946-10952.

- Gallagher, E., M. Gao, Y.C. Liu, and M. Karin. 2006. Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:1717-1722.
- Gao, M., T. Labuda, Y. Xia, E. Gallagher, D. Fang, Y.C. Liu, and M. Karin. 2004. Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science*. 306:271-275.
- Giubellino, A., T.R. Burke, Jr., and D.P. Bottaro. 2008. Grb2 signaling in cell motility and cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 12:1021-1033.
- Harper, J.W., and B.A. Schulman. 2006. Structural complexity in ubiquitin recognition. *Cell*. 124:1133-1136.
- Hatakeyama, S., M. Yada, M. Matsumoto, N. Ishida, and K.I. Nakayama. 2001. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem*. 276:33111-33120.
- Hershko, A., and A. Ciechanover. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 67:425-479.
- Hicke, L. 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2:195-201.
- Hicke, L., H.L. Schubert, and C.P. Hill. 2005. Ubiquitin-binding domains. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 6:610-621.
- Ho, K.C., Z. Zhou, Y.M. She, A. Chun, T.D. Cyr, and X. Yang. 2011. Itch E3 ubiquitin ligase regulates large tumor suppressor 1 stability [corrected]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:4870-4875.
- Huang, L., E. Kinnucan, G. Wang, S. Beaudenon, P.M. Howley, J.M. Huibregtse, and N.P. Pavletich. 1999. Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science*. 286:1321-1326.
- Huibregtse, J.M., M. Scheffner, S. Beaudenon, and P.M. Howley. 1995. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92:5249.
- Husnjak, K., and I. Dikic. 2012. Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu Rev Biochem*. 81:291-322.
- Ichimura, T., H. Yamamura, K. Sasamoto, Y. Tominaga, M. Taoka, K. Kakiuchi, T. Shinkawa, N. Takahashi, S. Shimada, and T. Isobe. 2005. 14-3-3 proteins modulate the expression of epithelial Na⁺ channels by phosphorylation-dependent interaction with Nedd4-2 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*. 280:13187-13194.
- Ikeda, F., and I. Dikic. 2008. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. *EMBO Rep*. 9:536-542.
- Ingham, R.J., G. Gish, and T. Pawson. 2004. The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene*. 23:1972-1984.
- Iwai, K. 2011. Linear polyubiquitin chains: a new modifier involved in NFkappaB activation and chronic inflammation, including dermatitis. *Cell Cycle*. 10:3095-3104.
- Janz, J.M., T.P. Sakmar, and K.C. Min. 2007. A novel interaction between atrophin-interacting protein 4 and beta-p21-activated kinase-interactive exchange factor is mediated by an SH3 domain. *J Biol Chem*. 282:28893-28903.
- Jiang, X., F. Huang, A. Marusyk, and A. Sorkin. 2003. Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits. *Molecular biology of the cell*. 14:858-870.

- Jiang, X., and A. Sorkin. 2002. Coordinated traffic of Grb2 and Ras during epidermal growth factor receptor endocytosis visualized in living cells. *Molecular biology of the cell*. 13:1522-1535.
- Joazeiro, C.A., and A.M. Weissman. 2000. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*. 102:549-552.
- Johansen, C., K. Kragballe, M. Westergaard, J. Henningsen, K. Kristiansen, and L. Iversen. 2005. The mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 are increased in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol*. 152:37-42.
- Justice, R.W., O. Zilian, D.F. Woods, M. Noll, and P.J. Bryant. 1995. The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev*. 9:534-546.
- Kamadurai, H.B., Y. Qiu, A. Deng, J.S. Harrison, C. MacDonald, M. Actis, P. Rodrigues, D.J. Miller, J. Souphron, S.M. Lewis, I. Kurinov, N. Fujii, M. Hammel, R. Piper, B. Kuhlman, B.A. Schulman, and J. Kuriyan. 2013. Mechanism of ubiquitin ligation and lysine prioritization by a HECT E3. *eLife*. 2.
- Kamadurai, H.B., J. Souphron, D.C. Scott, D.M. Duda, D.J. Miller, D. Stringer, R.C. Piper, and B.A. Schulman. 2009. Insights into Ubiquitin Transfer Cascades from a Structure of a UbcH5B~Ubiquitin-HECTNEDD4L Complex. *Molecular cell*. 36:1095-1102.
- Kim, H.C., and J.M. Huibregtse. 2009. Polyubiquitination by HECT E3s and the Determinants of Chain Type Specificity. *Molecular and cellular biology*. 29:3307-3318.
- Kim, H.C., A.M. Steffen, M.L. Oldham, J. Chen, and J.M. Huibregtse. 2011. Structure and function of a HECT domain ubiquitin-binding site. *EMBO Rep*. 12:334-341.
- Kirisako, T., K. Kamei, S. Murata, M. Kato, H. Fukumoto, M. Kanie, S. Sano, F. Tokunaga, K. Tanaka, and K. Iwai. 2006. A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *The EMBO journal*. 25:4877-4887.
- Kjaerulff, O., L. Brodin, and A. Jung. 2011. The structure and function of endophilin proteins. *Cell Biochem Biophys*. 60:137-154.
- Kumar, S., Y. Tomooka, and M. Noda. 1992. Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 185:1155-1161.
- Li, B., C. Tournier, R.J. Davis, and R.A. Flavell. 1999. Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *The EMBO journal*. 18:420-432.
- Li, H., H. Zhu, C.J. Xu, and J. Yuan. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 94:491-501.
- Li, M., C.L. Brooks, F. Wu-Baer, D. Chen, R. Baer, and W. Gu. 2003. Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science*. 302:1972-1975.
- Logan, C.Y., and R. Nusse. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 20:781-810.
- Lowenstein, E.J., R.J. Daly, A.G. Batzer, W. Li, B. Margolis, R. Lammers, A. Ullrich, E.Y. Skolnik, D. Bar-Sagi, and J. Schlessinger. 1992. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*. 70:431-442.
- Lundmark, R., and S.R. Carlsson. 2009. SNX9 - a prelude to vesicle release. *Journal of cell science*. 122:5-11.

- Malik, R., U.J. Soh, J. Trejo, and A. Marchese. 2012. Novel roles for the E3 ubiquitin ligase atrophin-interacting protein 4 and signal transduction adaptor molecule 1 in G protein-coupled receptor signaling. *J Biol Chem.* 287:9013-9027.
- Marchese, A., C. Raiborg, F. Santini, J.H. Keen, H. Stenmark, and J.L. Benovic. 2003. The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Dev Cell.* 5:709-722.
- Maspero, E., S. Mari, E. Valentini, A. Musacchio, A. Fish, S. Pasqualato, and S. Polo. 2011. Structure of the HECT:ubiquitin complex and its role in ubiquitin chain elongation. *EMBO Rep.* 12:342-349.
- Maspero, E., E. Valentini, S. Mari, V. Cecatiello, P. Soffientini, S. Pasqualato, and S. Polo. 2013. Structure of a ubiquitin-loaded HECT ligase reveals the molecular basis for catalytic priming. *Nat Struct Mol Biol.* 20:696-701.
- Mayer, B.J. 2001. SH3 domains: complexity in moderation. *Journal of cell science.* 114:1253-1263.
- McNatt, M.W., I. McKittrick, M. West, and G. Odorizzi. 2007. Direct binding to Rsp5 mediates ubiquitin-independent sorting of Sna3 via the multivesicular body pathway. *Molecular biology of the cell.* 18:697-706.
- McPherson, P.S., A.J. Czernik, T.J. Chilcote, F. Onofri, F. Benfenati, P. Greengard, J. Schlessinger, and P. De Camilli. 1994. Interaction of Grb2 via its Src homology 3 domains with synaptic proteins including synapsin I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 91:6486-6490.
- Melino, G., X. Lu, M. Gasco, T. Crook, and R.A. Knight. 2003. Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Biochem Sci.* 28:663-670.
- Miura, G.I., J.Y. Roignant, M. Wassef, and J.E. Treisman. 2008. Myopic acts in the endocytic pathway to enhance signaling by the Drosophila EGF receptor. *Development (Cambridge, England).* 135:1913-1922.
- Mohr, D., S. Frey, T. Fischer, T. Guttler, and D. Gorlich. 2009. Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes. *The EMBO journal.* 28:2541-2553.
- Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, and R.L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950).* 136:2348-2357.
- Mouchantaf, R., B.A. Azakir, P.S. McPherson, S.M. Millard, S.A. Wood, and A. Angers. 2006. The ubiquitin ligase itch is auto-ubiquitylated in vivo and in vitro but is protected from degradation by interacting with the deubiquitylating enzyme FAM/USP9X. *J Biol Chem.* 281:38738-38747.
- Mund, T., and H.R. Pelham. 2009. Control of the activity of WW-HECT domain E3 ubiquitin ligases by NDFIP proteins. *EMBO Rep.* 10:501-507.
- Murillas, R., K.S. Simms, S. Hatakeyama, A.M. Weissman, and M.R. Kuehn. 2002. Identification of developmentally expressed proteins that functionally interact with Nedd4 ubiquitin ligase. *J Biol Chem.* 277:2897-2907.
- Oberst, A., M. Malatesta, R.I. Aqeilan, M. Rossi, P. Salomoni, R. Murillas, P. Sharma, M.R. Kuehn, M. Oren, C.M. Croce, F. Bernassola, and G. Melino. 2007. The Nedd4-binding partner 1 (N4BP1) protein is an inhibitor of the E3 ligase Itch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 104:11280-11285.

- Oestreich, A.J., M. Aboian, J. Lee, I. Azmi, J. Payne, R. Issaka, B.A. Davies, and D.J. Katzmann. 2007. Characterization of multiple multivesicular body sorting determinants within Sna3: a role for the ubiquitin ligase Rsp5. *Molecular biology of the cell*. 18:707-720.
- Ogunjimi, A.A., D.J. Briant, N. Pece-Barbara, C. Le Roy, G.M. Di Guglielmo, P. Kavsak, R.K. Rasmussen, B.T. Seet, F. Sicheri, and J.L. Wrana. 2005. Regulation of Smurf2 Ubiquitin Ligase Activity by Anchoring the E2 to the HECT Domain. *Molecular cell*. 19:297-308.
- Ogunjimi, A.A., S. Wiesner, D.J. Briant, X. Varelas, F. Sicheri, J. Forman-Kay, and J.L. Wrana. 2010. The ubiquitin binding region of the Smurf HECT domain facilitates polyubiquitylation and binding of ubiquitylated substrates. *J Biol Chem*. 285:6308-6315.
- Oliver, P.M., X. Cao, G.S. Worthen, P. Shi, N. Briones, M. MacLeod, J. White, P. Kirby, J. Kappler, P. Marrack, and B. Yang. 2006. Ndfip1 protein promotes the function of itch ubiquitin ligase to prevent T cell activation and T helper 2 cell-mediated inflammation. *Immunity*. 25:929-940.
- Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, and T. Seya. 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nature immunology*. 4:161-167.
- Park, S.H., E.H. Jung, G.Y. Kim, B.C. Kim, J.H. Lim, and C.H. Woo. 2015. Itch E3 ubiquitin ligase positively regulates TGF-beta signaling to EMT via Smad7 ubiquitination. *Mol Cells*. 38:20-25.
- Paul, W.E., and R.A. Seder. 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. 76:241-251.
- Pawson, T. 1995. Protein modules and signalling networks. *Nature*. 373:573-580.
- Peng, D.J., M. Zeng, R. Muromoto, T. Matsuda, K. Shimoda, M. Subramaniam, T.C. Spelsberg, W.Z. Wei, and K. Venuprasad. 2011. Noncanonical K27-linked polyubiquitination of TIEG1 regulates Foxp3 expression and tumor growth. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 186:5638-5647.
- Perry, W.L., C.M. Hustad, D.A. Swing, T.N. O'Sullivan, N.A. Jenkins, and N.G. Copeland. 1998. The itchy locus encodes a novel ubiquitin protein ligase that is disrupted in a18H mice. *Nat Genet*. 18:143-146.
- Pickart, C.M., and D. Fushman. 2004. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol*. 8:610-616.
- Plant, P.J., H. Yeger, O. Staub, P. Howard, and D. Rotin. 1997. The C2 domain of the ubiquitin protein ligase Nedd4 mediates Ca²⁺-dependent plasma membrane localization. *J Biol Chem*. 272:32329-32336.
- Ponting, C.P., and P.J. Parker. 1996. Extending the C2 domain family: C2s in PKCs delta, epsilon, eta, theta, phospholipases, GAPs, and perforin. *Protein Sci*. 5:162-166.
- Qian, S.B., D.E. Ott, U. Schubert, J.R. Bennink, and J.W. Yewdell. 2002. Fusion proteins with COOH-terminal ubiquitin are stable and maintain dual functionality in vivo. *J Biol Chem*. 277:38818-38826.
- Qiu, L., C. Joazeiro, N. Fang, H.Y. Wang, C. Elly, Y. Altman, D. Fang, T. Hunter, and Y.C. Liu. 2000. Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*. 275:35734-35737.
- Qu, Y., Q. Chen, X. Lai, C. Zhu, C. Chen, X. Zhao, R. Deng, M. Xu, H. Yuan, Y. Wang, J. Yu, and J. Huang. 2014. SUMOylation of Grb2 enhances the ERK activity by increasing its binding with Sos1. *Mol Cancer*. 13:95.
- Raasi, S., I. Orlov, K.G. Fleming, and C.M. Pickart. 2004. Binding of polyubiquitin chains to ubiquitin-associated (UBA) domains of HHR23A. *J Mol Biol*. 341:1367-1379.

- Riling, C., H. Kamadurai, S. Kumar, C.E. O'Leary, K.P. Wu, E.E. Manion, M. Ying, B.A. Schulman, and P.M. Oliver. 2015. Itch WW Domains Inhibit Its E3 Ubiquitin Ligase Activity by Blocking E2-E3 Ligase Trans-thiolation. *J Biol Chem.* 290:23875-23887.
- Rizo, J., and T.C. Sudhof. 1998. C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem.* 273:15879-15882.
- Romero, F., F. Ramos-Morales, A. Dominguez, R.M. Rios, F. Schweighoffer, B. Tocque, J.A. Pintor-Toro, S. Fischer, and M. Tortolero. 1998. Grb2 and its apoptotic isoform Grb3-3 associate with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C, and these interactions are modulated by poly(U) RNA. *J Biol Chem.* 273:7776-7781.
- Ronchi, V.P., J.M. Klein, and A.L. Haas. 2013. E6AP/UBE3A ubiquitin ligase harbors two E2~ubiquitin binding sites. *J Biol Chem.* 288:10349-10360.
- Rossi, M., R.I. Aqeilan, M. Neale, E. Candi, P. Salomoni, R.A. Knight, C.M. Croce, and G. Melino. 2006. The E3 ubiquitin ligase Itch controls the protein stability of p63. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 103:12753-12758.
- Rossi, M., V. De Laurenzi, E. Munarriz, D.R. Green, Y.C. Liu, K.H. Vousden, G. Cesareni, and G. Melino. 2005. The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *Embo j.* 24:836-848.
- Schlaepfer, D.D., K.C. Jones, and T. Hunter. 1998. Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. *Molecular and cellular biology.* 18:2571-2585.
- Schmidt, M.H., and I. Dikic. 2005. The Cbl interactome and its functions. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 6:907-918.
- Scialpi, F., M. Malatesta, A. Peschiaroli, M. Rossi, G. Melino, and F. Bernassola. 2008. Itch self-polyubiquitylation occurs through lysine-63 linkages. *Biochem Pharmacol.* 76:1515-1521.
- Shearwin-Whyatt, L., H.E. Dalton, N. Foot, and S. Kumar. 2006. Regulation of functional diversity within the Nedd4 family by accessory and adaptor proteins. *Bioessays.* 28:617-628.
- Sims, J.J., and R.E. Cohen. 2009. Linkage-specific avidity defines the lysine 63-linked polyubiquitin-binding preference of rap80. *Molecular cell.* 33:775-783.
- Skaug, B., X. Jiang, and Z.J. Chen. 2009. The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu Rev Biochem.* 78:769-796.
- Soubeyran, P., K. Kowanetz, I. Szymkiewicz, W.Y. Langdon, and I. Dikic. 2002. Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature.* 416:183-187.
- Springael, J.Y., J.M. Galan, R. Haguenaer-Tsapis, and B. Andre. 1999. NH₄⁺-induced down-regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1p permease involves its ubiquitination with lysine-63-linked chains. *Journal of cell science.* 112 (Pt 9):1375-1383.
- Stawiecka-Mirota, M., W. Pokrzywa, J. Morvan, T. Zoladek, R. Haguenaer-Tsapis, D. Urban-Grimal, and P. Morsomme. 2007. Targeting of Sna3p to the endosomal pathway depends on its interaction with Rsp5p and multivesicular body sorting on its ubiquitylation. *Traffic.* 8:1280-1296.
- Su, C.H., C.Y. Wang, K.H. Lan, C.P. Li, Y. Chao, H.C. Lin, S.D. Lee, and W.P. Lee. 2011. Akt phosphorylation at Thr308 and Ser473 is required for CHIP-mediated ubiquitination of the kinase. *Cell Signal.* 23:1824-1830.

- Suen, K.L., X.R. Bustelo, T. Pawson, and M. Barbacid. 1993. Molecular cloning of the mouse *grb2* gene: differential interaction of the Grb2 adaptor protein with epidermal growth factor and nerve growth factor receptors. *Molecular and cellular biology*. 13:5500-5512.
- Sun, H., J.D. Levenson, and T. Hunter. 2007. Conserved function of RNF4 family proteins in eukaryotes: targeting a ubiquitin ligase to SUMOylated proteins. *The EMBO journal*. 26:4102-4112.
- Suryaraja, R., M. Anitha, K. Anbarasu, G. Kumari, and S. Mahalingam. 2013. The E3 ubiquitin ligase Itch regulates tumor suppressor protein RASSF5/NORE1 stability in an acetylation-dependent manner. *Cell Death Dis*. 4:e565.
- Suzuki, C., G. Murakami, M. Fukuchi, T. Shimanuki, Y. Shikauchi, T. Imamura, and K. Miyazono. 2002. Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J Biol Chem*. 277:39919-39925.
- Tajima, Y., K. Goto, M. Yoshida, K. Shinomiya, T. Sekimoto, Y. Yoneda, K. Miyazono, and T. Imamura. 2003. Chromosomal region maintenance 1 (CRM1)-dependent nuclear export of Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1) is essential for negative regulation of transforming growth factor-beta signaling by Smad7. *The Journal of biological chemistry*. 278:10716-10721.
- Tanase, C.A. 2010. Histidine domain-protein tyrosine phosphatase interacts with Grb2 and GrpL. *PloS one*. 5:e14339.
- Tatham, M.H., M.C. Geoffroy, L. Shen, A. Plechanovova, N. Hattersley, E.G. Jaffray, J.J. Palvimo, and R.T. Hay. 2008. RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nature cell biology*. 10:538-546.
- Theivanthiran, B., M. Kathania, M. Zeng, E. Anguiano, V. Basrur, T. Vandergriff, V. Pascual, W.Z. Wei, R. Massoumi, and K. Venuprasad. 2015. The E3 ubiquitin ligase Itch inhibits p38alpha signaling and skin inflammation through the ubiquitylation of Tab1. *Science signaling*. 8:ra22.
- Thome, M., and J. Tschopp. 2001. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol*. 1:50-58.
- Trempe, J.F., C.X. Chen, K. Grenier, E.M. Camacho, G. Kozlov, P.S. McPherson, K. Gehring, and E.A. Fon. 2009. SH3 domains from a subset of BAR proteins define a Ubl-binding domain and implicate parkin in synaptic ubiquitination. *Molecular cell*. 36:1034-1047.
- Trotman, L.C., X. Wang, A. Alimonti, Z. Chen, J. Teruya-Feldstein, H. Yang, N.P. Pavletich, B.S. Carver, C. Cordon-Cardo, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, S.G. Chi, H.J. Kim, T. Misteli, X. Jiang, and P.P. Pandolfi. 2007. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell*. 128:141-156.
- Tsubuki, S., Y. Saito, M. Tomioka, H. Ito, and S. Kawashima. 1996. Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J Biochem*. 119:572-576.
- Varadan, R., O. Walker, C. Pickart, and D. Fushman. 2002. Structural properties of polyubiquitin chains in solution. *J Mol Biol*. 324:637-647.
- Venuprasad, K., H. Huang, Y. Harada, C. Elly, M. Subramaniam, T. Spelsberg, J. Su, and Y.C. Liu. 2008. The E3 ubiquitin ligase Itch regulates expression of transcription factor Foxp3 and airway inflammation by enhancing the function of transcription factor TIEG1. *Nature immunology*. 9:245-253.

- Venuprasad, K., M. Zeng, S.L. Baughan, and R. Massoumi. 2015. Multifaceted role of the ubiquitin ligase Itch in immune regulation. *Immunol Cell Biol.* 93:452-460.
- Verdecia, M.A., C.A.P. Joazeiro, N.J. Wells, J.-L. Ferrer, M.E. Bowman, T. Hunter, and J.P. Noel. 2003. Conformational Flexibility Underlies Ubiquitin Ligation Mediated by the WWP1 HECT Domain E3 Ligase. *Molecular cell.* 11:249-259.
- Wang, J., Q. Peng, Q. Lin, C. Childress, D. Carey, and W. Yang. 2010. Calcium activates Nedd4 E3 ubiquitin ligases by releasing the C2 domain-mediated auto-inhibition. *J Biol Chem.* 285:12279-12288.
- Wang, M., and C.M. Pickart. 2005. Different HECT domain ubiquitin ligases employ distinct mechanisms of polyubiquitin chain synthesis. *The EMBO journal.* 24:4324-4333.
- Wang, R., and M.G. Brattain. 2007. The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa. *FEBS letters.* 581:3164-3170.
- Wang, X., L.C. Trotman, T. Koppie, A. Alimonti, Z. Chen, Z. Gao, J. Wang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, C. Cordon-Cardo, P.P. Pandolfi, and X. Jiang. 2007. NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell.* 128:129-139.
- Wei, W., M. Li, J. Wang, F. Nie, and L. Li. 2012. The E3 ubiquitin ligase ITCH negatively regulates canonical Wnt signaling by targeting dishevelled protein. *Molecular and cellular biology.* 32:3903-3912.
- Weissman, A.M. 2001. Themes and variations on ubiquitylation. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 2:169-178.
- Whisstock, J.C., and A.M. Lesk. 1999. SH3 domains in prokaryotes. *Trends Biochem Sci.* 24:132-133.
- Wiesner, S., A.A. Ogunjimi, H.-R. Wang, D. Rotin, F. Sicheri, J.L. Wrana, and J.D. Forman-Kay. 2007. Autoinhibition of the HECT-Type Ubiquitin Ligase Smurf2 through Its C2 Domain. *Cell.* 130:651-662.
- Xia, H., H. Qi, Y. Li, J. Pei, J. Barton, M. Blackstad, T. Xu, and W. Tao. 2002. LATS1 tumor suppressor regulates G2/M transition and apoptosis. *Oncogene.* 21:1233-1241.
- Xu, D., A. Farmer, and Y.M. Chook. 2010. Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin-beta proteins. *Current opinion in structural biology.* 20:782-790.
- Xu, P., D.M. Duong, N.T. Seyfried, D. Cheng, Y. Xie, J. Robert, J. Rush, M. Hochstrasser, D. Finley, and J. Peng. 2009. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell.* 137:133-145.
- Yaffe, M.B., M. Schutkowski, M. Shen, X.Z. Zhou, P.T. Stukenberg, J.U. Rahfeld, J. Xu, J. Kuang, M.W. Kirschner, G. Fischer, L.C. Cantley, and K.P. Lu. 1997. Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science.* 278:1957-1960.
- Yamazaki, T., K. Zaal, D. Hailey, J. Presley, J. Lippincott-Schwartz, and L.E. Samelson. 2002. Role of Grb2 in EGF-stimulated EGFR internalization. *Journal of cell science.* 115:1791-1802.
- Yang, C., W. Zhou, M.S. Jeon, D. Demydenko, Y. Harada, H. Zhou, and Y.C. Liu. 2006. Negative regulation of the E3 ubiquitin ligase itch via Fyn-mediated tyrosine phosphorylation. *Molecular cell.* 21:135-141.
- Yang, Y., B. Liao, S. Wang, B. Yan, Y. Jin, H.B. Shu, and Y.Y. Wang. 2013. E3 ligase WWP2 negatively regulates TLR3-mediated innate immune response by targeting TRIF for ubiquitination and degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 110:5115-5120.

- Young, P., Q. Deveraux, R.E. Beal, C.M. Pickart, and M. Rechsteiner. 1998. Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a. *J Biol Chem.* 273:5461-5467.
- ZeRuth, G.T., J.G. Williams, Y.C. Cole, and A.M. Jetten. 2015. HECT E3 Ubiquitin Ligase Itch Functions as a Novel Negative Regulator of Gli-Similar 3 (Glis3) Transcriptional Activity. *PloS one.* 10:e0131303.
- Zhang, W., Z. Qin, X. Zhang, and W. Xiao. 2011. Roles of sequential ubiquitination of PCNA in DNA-damage tolerance. *FEBS letters.* 585:2786-2794.