

2m11.3219.7

Université de Montréal

Identification de la sumoylation de ZNF74 et de l'interaction de cette protéine à
multidoigt de zinc avec UBC9 et PIAS1

Par Samantha Abenhaim

Département de Biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Biochimie

Avril 2004

© Samantha Abenhaim, 2004



W
4
U58
2004
V.128

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Identification de la sumoylation de ZNF74 et de l'interaction de cette protéine à
multidoigt de zinc avec UBC9 et PIAS1

Présenté par :
Samantha Abenhaim

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Gerardo Ferbeyre
président-rapporteur

Muriel Aubry
directrice de recherche

Daniel Skup
membre du jury

Résumé

ZNF74 est un gène candidat pour le syndrome de DiGeorge qui est perdu par délétion chez la majorité des patients atteints de ce syndrome. La protéine encodée par ce gène appartient à la grande famille des protéines à motifs KRAB et multidoigt de zinc. Il existe deux isoformes protéiques majeures de ZNF74. L'isoforme ZNF74-II, qui possède un motif de répression de type KRAB, régule négativement la transcription alors que l'isoforme ZNF74-I dont le motif KRAB est incomplet est transcriptionnellement neutre. Un rôle possible de ZNF74, et notamment de ZNF74-I, dans la maturation de l'ARN a été suggéré. De nouveaux partenaires protéiques des isoformes de ZNF74 ont été identifiés par double hybride chez la levure soit UBC9 et PIAS-1. Ces deux enzymes sont impliquées dans le processus de modification post-traductionnelle des protéines nommé sumoylation. Ce processus conduit au couplage covalent de la petite protéine SUMO à des protéines cibles. Nos résultats démontrent que ZNF74 est une cible pour la sumoylation. Ainsi, la coexpression de ZNF74 avec SUMO-1 résulte en une sumoylation de ZNF74 *in vivo* dans des cellules transfectées. D'autre part, nous mettons en évidence une sumoylation différentielle entre les deux isoformes de ZNF74. ZNF74-II semble être un meilleur substrat pour la sumoylation que ZNF74-I. Des études de mutations nous ont permis d'identifier que la lysine 130 (K130) de ZNF74 est la lysine cible majeure à laquelle se couple SUMO autant *in vivo* que dans des études de sumoylation *in vitro* en présence des enzymes purifiées minimalement requises pour la sumoylation soit l'enzyme E1 (SAE1/SAE2) et UBC9. Nous suggérons que la modification de ZNF74 par SUMO pourrait avoir un rôle dans la régulation de l'activité de répression transcriptionnelle de ZNF74.

Mots clés

Syndrome de DiGeorge, ZNF74, multidoigt de zinc, motif KRAB, sumoylation, UBC9, PIAS, répression transcriptionnelle, double hybride.

Abstract

ZNF74 is a candidate gene for DiGeorge syndrome that is deleted in the majority of affected patients. ZNF74 gene codes for a protein that is a member of the large family of KRAB box-containing multifinger proteins. There are two major isoforms of ZNF74. ZNF74-II, an isoform that includes a repressive KRAB box, regulates transcription negatively whereas ZNF74-I, an isoform with an incomplete KRAB box, has no effect on transcription. It has been suggested that at least ZNF74-I may be implicated in RNA maturation. In this study, we determined by yeast two-hybrid that UBC9 and PIAS1 interact with ZNF74. UBC9 and PIAS1 are enzymes implicated in the post-translational process of modification by sumoylation. This process leads to the covalent coupling of the small protein SUMO to target proteins. This study shows that ZNF74 is a target protein for sumoylation. Co-expression of ZNF74 and SUMO-1 in transfected cells resulted in the detection of sumoylated ZNF74 *in vivo*. There is evidence that ZNF74 isoforms are sumoylated to different extents. Our results show that the repressive ZNF74-II is a better substrate for sumoylation than the non repressive ZNF74-I. Lysine 130 (K130) that is included in a pseudo-consensus sequence for sumoylation was identified to be the major sumoylation target residue in ZNF74 *in vivo* but also *in vitro*, under minimal sumoylation conditions, in the presence of E1 (SAE1/SAE2) and UBC9 purified enzymes. We suggest that ZNF74's repressional activity may be regulated through its covalent modification by SUMO.

Key words

DiGeorge syndrome, ZNF74, zinc finger, KRAB, sumoylation, UBC9, PIAS, transcription, repression, yeast two-hybrid.

Table des matières

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
REMERCIEMENTS.....	xiii
Chapitre 1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Syndrome de DiGeorge et ZNF74.....	2
1.2 ZNF74, un gène candidat pour le syndrome de DiGeorge.....	3
1.3 ZNF74, une protéine à multidoigt de zinc à motif KRAB.....	3
1.4 Identification de nouveaux partenaires protéiques de ZNF74 par criblage double hybride.....	9
1.5 Sumoylation.....	9
1.6 Mécanisme de sumoylation.....	10
1.7 Les divers SUMO et leur implication dans la mono- ou polysumoylation.....	14
1.8 Localisation de SUMO sous forme libre ou conjuguée.....	18
1.9 Rôles de la sumoylation.....	18
1.9.1 Rôle dans les interactions protéine-protéine.....	20
1.9.1.1 Rôle de la sumoylation de SP100 sur son interaction avec HP1.....	20

1.9.1.2 Rôle de la sumoylation de l’histone H4 sur son interaction avec HP1.....	21
1.9.2 Rôle dans les interactions protéine-ADN.....	21
1.9.3 Rôle dans le ciblage subcellulaire.....	22
1.9.3.1 Sumoylation et ciblage du cytoplasme à l’enveloppe nucléaire...22	
1.9.3.2 Sumoylation et transport nucléaire.....	23
1.9.3.3 Transport entre nucléole et nucléoplasme.....	25
1.9.3.4 Ciblage sub-nucléaire vers des foci de type PODs.....	26
1.9.4 Rôle dans la régulation transcriptionnelle.....	28
1.9.5 Rôle de la sumoylation comme antagoniste possible de l’ubiquitination.....	29
1.10 Hypothèse et objectifs du projet de recherche.....	30

Chapitre 2. ARTICLE

The KRAB multifinger protein ZNF74 with Ubc9 and PIAS1 and is sumoylated <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	32
--	----

Chapitre 3. DISCUSSION.....

3.1 Sumoylation de ZNF74.....	63
3.1.1 Sumoylation <i>in vivo</i> de ZNF74-II par SUMO endogène.....	64
3.1.2 Sumoylation différentielle des deux isoformes de ZNF74.....	66
3.1.3 Sumoylation de ZNF74 <i>in vitro</i>	67

3.1.4	Séquence (s) cible (s) pour la sumoylation de ZNF74.....	68
3.1.5	Effet de E3 ligases de la famille PIAS sur la sumoylation de ZNF74.....	68
3.2	Conclusion et perspective.....	70
	BIBLIOGRAPHIE.....	72

Liste des tableaux

ARTICLE

Table 1: Interaction of ZNF74 isoforms with UBC9 and PIAS1 in yeast two-hybrid assays: Quantification assay of β -galactosidase activity from the lacZ reporter gene.....	53
---	----

Liste des figures

INTRODUCTION

Figure 1 : Modèle pour la répression par les protéines à motifs KRAB et multidoigt de zinc et par KAP-1	5
Figure 2 : Isoformes de ZNF74.....	7
Figure 3 : Structure primaire et tertiaire des différents SUMO et de l'ubiquitine.....	12
Figure 4 : Mono-sumoylation vs poly-sumoylation.....	15
Figure 5 : Mécanisme de sumoylation.....	16
Figure 6 : Ciblage de RanGAP1 sumoylé au nucléopore par interaction avec la protéine RanBP2	24

ARTICLE

Figure 1 : ZNF74 is sumoylated <i>in vivo</i>	54
Figure 2: Lysine 130 is the major sumoylation site <i>in vivo</i>	56
Figure 3: Comparison of the sumoylation motif of ZNF74 with those of other SUMO-modified proteins.....	58
Figure 4: Both the repressive and non-repressive isoforms of ZNF74 are sumoylated <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	60

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ATP: 'adenosine triphosphate'

β -Gal : beta-galactosidase

β -ME : beta- mercaptoethanol

BSA : albumine bovine du sérum

CtBP1: 'C-terminal binding protein of adenovirus E1A'

DGS : syndrome de DiGeorge

DMEM : 'Dulbecco's modified Eagle's medium'

E1, E2, E3 : enzyme de type 1, 2, 3

EDTA : acide tétraacétique d'éthylène diamine

FBS : Sérum fœtal de bovin

GAL4 AD : domaine d'activation transcriptionnelle du facteur GAL4

GAL4 BD : domaine de liaison à l'ADN du facteur GAL4

GFP: 'green fluorescent protein'

HEK 293T: 'human embryonic kidney 293T cells'

HDAC: histone déacetylase

HMT: Histone méthyl-transférase

HP1: 'heterochromatin protein 1'

HSF1: 'Heat Shock Protein 1'

Hsp: 'heat shock proteins'

IB: immunoblot

IP: immunoprécipitation

KAP-1: 'KRAB associated protein 1'

KRAB: Kruppel Associated Box

NaCl: chlorure de sodium

NEM: N-ethyl-maléimide

NLS: 'Nuclear Localisation Signal'

NPC: Complexe nucléopore

ONPG: *o*-nitrophényl- β -D-galactopyranoside

PBS: 'phosphate buffered saline'

Pc2: 'Polycomb protein 2'

PCR: 'polymerase chain reaction'

PIAS1: 'Protein Inhibitor of Activated Stat'

PMSF: 'phenylmethylsulfonyl fluoride'

PODS: 'PML Oncogenic domains'

RanBP2: 'Ran GTPase-Binding protein'

RanGAP1: 'Ran GTPase-Activation protein'

RAR α : récepteur de l'acide rétinoïque α

SAE1/SAE2: 'SUMO activating enzyme 1 and 2'

SDS: sodium dodécyl sulfate

SENP1: 'Sentrin protease 1'

SUMO: 'Small Ubiquitin-like Modifier'

SUSP1: 'SUMO-specific protease'

TBE: tris borate EDTA

TIF1 β : 'transcription intermediary factor 1 β '

Ubc9: 'Ubiquitin Conjugating Enzyme 9'

Ulp1: 'Protease Ubiquitin –like processing enzyme'

WT: type sauvage

ZNF74: 'zinc finger 74'

Remerciements

J'aimerais remercier :

Ma directrice Dr. Muriel Aubry pour sa direction et son aide attentionnée, sa confiance en moi et son amitié. J'ai rarement rencontrée quelqu'un avec autant d'énergie, de dévotion, de compréhension et un sens d'obligation manifesté durant toutes mes études.

Xavier Mascle, Karl Bergeron et Patricia Estephan pour avoir contribué à ma recherche et pour leur humour et leur amitié.

Delphine Germain-Desprez pour m'avoir tant encouragée et soutenue.

Les membres passés du laboratoire pour leurs contributions.

À mon fils, Matthew Zachary, pour son tendre sourire.

À ma famille pour leur soutien et leurs encouragements.

Chapitre 1. INTRODUCTION

1.1 Syndrome de DiGeorge et ZNF74

Le syndrome de DiGeorge (DGS) est une maladie autosomale dominante qui est caractérisée génétiquement par une délétion au niveau du chromosome 22q11.2 chez l'humain (Morrow et al., 1995; Carlson et al., 1997). La majorité des patients atteints de ce syndrome (> 90%) possèdent une délétion hémizygote de 1.5-3 Mb (Ravassard et al., 1999). Chez certains patients atteints du DGS, on retrouve des délétions non-superposables localisées dans cette région critique (Levy et al., 1995) suggérant la possibilité de l'implication de plus d'un gène dans la région chromosome 22q11.2 (syndrome de gènes contigus). Cependant, ni la taille de la délétion ni le type de délétion ne corrèle avec la sévérité des symptômes associées à cette maladie dont la pénétrance et les manifestations cliniques varient beaucoup entre les patients (Lindsay et al., 1995; Kurahashi et al., 1997). Ainsi, les patients atteints du DGS présentent à des degrés variables des malformations des gros vaisseaux du coeur, du thymus et des parathyroïdes ainsi que des malformations cranio-faciales (bec de lièvre) (Ryan et al., 1997). Le phénotype du DGS peut-être mimé chez l'animal, notamment chez le poulet, par extirpation de cellules de la crête neurale au niveau de rhombomères du cerveau postérieur durant le développement. Ceci est attribué au fait que les cellules de la crête neurale dérivées de la partie dorsale du tube neural au niveau rhombomérique migrent vers la partie ventrale de l'embryon durant le développement et contribuent à la formation de structures affectées dans le DGS comme le thymus, les parathyroïdes et les gros vaisseaux du cœur.

1.2 ZNF74, un gène candidat pour le syndrome de DiGeorge

Il existe plusieurs gènes candidats pour le DGS localisés dans la région critique de 1.5 à 3 Mb dont TBX1, CRKL et ZNF74. Chez la souris, l'abrogation de la fonction du facteur de transcription TBX1 ou bien de la protéine adaptatrice SH2-SH3 de la voie des tyrosine kinases CRKL par recombinaison homologue conduit au phénotype du DGS suggérant un rôle important de ces gènes dans la maladie humaine. ZNF74, un gène à motifs KRAB et multidoigt de zinc isolé dans notre laboratoire (Aubry et al., 1992), constitue un autre candidat d'intérêt compte tenu de sa délétion chez les patients (Aubry et al., 1993) et de son profil d'expression chez l'embryon humain durant le développement embryonnaire (Ravassard et al., 1999). Comme CRKL, ZNF74 a un profil d'expression très restreint et est exprimé dans des dérivés de crêtes neurales participant à la formation des tissus affectés dans le DGS (Ravassard et al., 1999). L'étude de l'implication de ZNF74 dans le DGS est compliqué actuellement par le fait que son orthologue chez la souris semble avoir été interrompu par une inversion étant survenu lors de l'évolution dans le génome des rongeurs (Lund et al., 2000) et qu'on ne lui connaît pas actuellement d'orthologue fonctionnel chez la souris. Il existe par contre des orthologues de ZNF74 tout au moins chez les primates, chez le chien et chez la vache (résultats non publiés).

1.3 ZNF74, une protéine à motif KRAB et multidoigt de zinc

ZNF74 fait partie de la grande famille de gènes à motif multidoigts de zinc de type C₂-H₂ qui encode des régulateurs d'expression génique potentiels (Mark et al., 1999). Les motifs doigts de zinc sont des structures versatiles qui sont capables

d'interagir selon le cas avec l'ADN, l'ARN et de médier des interactions protéines-protéines. ZNF74, en particulier, est une protéine qui a douze doigts de zinc de type Cys₂-His₂. ZNF74 possède de plus un motif conservé appelé boîte KRAB et fait donc partie de la famille des protéines à motifs KRAB et multidoigt de zinc (près de 300 membres encodés par le génome humain). Environ un tiers des gènes à multidoigt de zinc sont associés à une boîte KRAB (Krüppel Associated Box) en N-terminal (Bellefroid et al., 1991). La boîte KRAB contient deux sous-domaines différents : les domaines A et B. Le domaine A permet de réprimer la transcription lorsque fusionné à un domaine de liaison à l'ADN tel que celui de GAL4 chez la levure tandis que le domaine B permet de renforcer la répression tout en étant seul insuffisant pour permettre la répression. La capacité de répression transcriptionnelle conférée aux protéines à motifs KRAB et multidoigt de zinc par leur boîte KRAB dépend de l'interaction de la boîte KRAB avec le corépresseur KAP-1 aussi nommée TIF1 β (transcription intermediary factor 1 β) (Ryan et al., 1999). Selon le modèle courant, KAP-1 est recruté aux promoteurs grâce aux protéines à motifs KRAB multidoigts de zinc qui lient elles-mêmes l'ADN via leur domaine doigt de zinc (Ayyanathan et al., 2003). KAP-1 peut d'autre part initier la répression en servant de plateforme d'assemblage pour le recrutement d'histones déacétylases (Schultz et al., 2001), de SETDB1, une histone méthyltransferase spécifique à la lysine 9 de l'histone H3 (Schultz et al., 2002) et de la protéine de l'hétérochromatine, HP1 (Lechner et al., 2000) (voir Figure 1).

ZNF74 est une protéine nucléaire qui est associée à la matrice nucléaire (Grondin et al., 1996). ZNF74 est très solidement retenue par la matrice nucléaire tel que démontré par des expériences d'extractions séquentielles à la DNase, à haute teneur en sels et à la RNase. Dans ces conditions d'extraction, ZNF74 est retrouvée

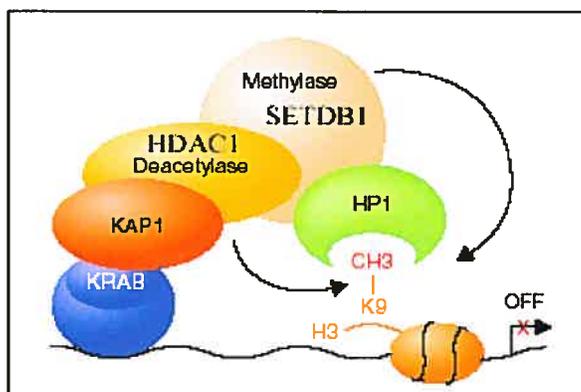


Figure 1 : Modèle pour la répression par les protéines à motifs KRAB et multidoigt de zinc et par KAP-1.

exclusivement dans la fraction dite insoluble, assimilée à la matrice nucléaire. Par contre, la solubilisation de ZNF74 comme celle des protéines de la matrice nucléaire peut être réalisé par l'emploi de détergents dénaturants tel le dodécyl sulfate de sodium (SDS) (Grondin et al., 1996; Grondin et al., 1997).

Par utilisation alternative de promoteurs et épissage alternatif, deux isoformes protéiques principales sont générées (voir Figure 2) (Cote et al., 2001) soit : 1) l'isoforme longue, nommée ZNF74-II, qui contient une boîte KRAB répressive complète et un domaine multidoigt de zinc situé de façon C-terminale, 2) l'isoforme courte, nommée ZNF74-I, qui diffère de ZNF74-II par la présence d'une boîte KRAB incomplète et non-répressive. Étant donné que les séquences spécifiques de liaison à l'ADN de ZNF74 sont inconnues, l'activité de répression de la transcription des isoformes de ZNF74 a été testée en forçant le recrutement spécifique à l'ADN de ZNF74 via l'utilisation d'une protéine de fusion entre ZNF74 et le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription GAL4 (Cote et al., 2001). L'identification des séquences spécifiques de liaison à l'ADN des protéines KRAB multidoigt de zinc, par les techniques classiques de sélection par affinité et amplification, et de leur gènes cibles représente actuellement un défi qui a été relevé uniquement pour la protéine NT2 (Tanaka et al., 2002). Il n'y a pas d'explication claire permettant de comprendre la raison des difficultés éprouvées pour identifier *in vitro* les séquences de liaison spécifiques à l'ADN double brin des protéines à motifs KRAB et multidoigt de zinc. Quoiqu'on ne connaissent pas de séquences d'acides nucléiques spécifiques reconnues par ZNF74, des études du laboratoire ont montrées que ZNF74 peut lier des séquences d'ADN simple brin et hétéroduplex aléatoires avec plus d'affinité que des séquences d'ADN double brin (Guévremont, 1999). De plus, des études ont montrées que ZNF74

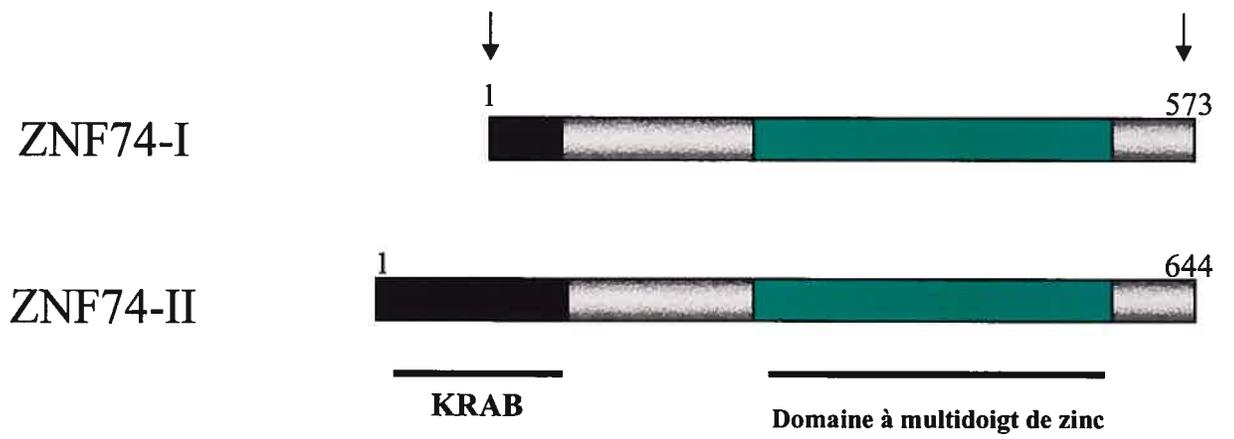


Figure 2 : Isoformes de ZNF74

lie des séquences d'ARN avec une préférence pour des poly U et poly G comparativement à des poly C ou poly A (Grondin et al., 1996). Il est possible que les protéines KRAB multidoigt de zinc requièrent la contribution de co-facteurs pour une liaison spécifique dépendante de la séquence d'acides nucléiques.

Les deux isoformes de ZNF74 sont distribuées de façon différentielle dans des sous-domaines nucléaires de la cellule (Cote et al., 2001). ZNF74-I co-localise majoritairement avec le facteur d'épissage SC-35 qui constitue un marqueur de sous-domaines ponctués du noyau enrichis en facteurs d'épissage ('speckles'). Cette observation a amené à proposer que ZNF74-I puisse avoir un rôle dans la maturation de l'ARN. De façon consistante avec cette hypothèse, ZNF74-I interagit directement avec une forme hyperphosphorylée de la large sous-unité de l'ARN polymérase II appelée pol I_o qui est reconnue par l'anticorps CC-3 et est concentrée dans les speckles (Grondin et al., 1997). La pol I_o interagit quasi exclusivement avec des protéines impliquées dans la maturation de l'ARN soit des enzymes impliquées dans l'addition de la coiffe, l'épissage, le clivage et la polyadénylation (Rosonina and Blencowe, 2004; Phatnani and Greenleaf, 2004). Contrairement à l'isoforme non-répressive, ZNF74-II n'est essentiellement pas associée aux domaines enrichis en facteur d'épissage. ZNF74-II est localisée dans des sous-domaines ponctués du noyau et sa distribution, plus diffuse que celle de SC-35 et ZNF74-I, est plus caractéristique de facteurs transcriptionnels. Des études récentes du laboratoire indiquent que les isoformes répressive et non répressive de ZNF74 hétérodimérisent (Delphine Desprez, résultats non publiés) et les conséquences fonctionnelles de cette hétérodimérisation sur la localisation de ces isoformes et sur leur activité de transcription lors de leur coexpression dans des cellules est à l'étude.

1.4 Identification de nouveaux partenaires protéiques de ZNF74 par criblage double hybride

Afin d'identifier de nouveaux partenaires protéiques de ZNF74 permettant de mieux comprendre son rôle cellulaire, on a réalisé un criblage d'une librairie d'ADNc de cerveau d'embryon humain par la méthode du double hybride chez la levure. Cette méthode permet d'isoler des partenaires protéiques sans *a priori* et donc de révéler dans plusieurs cas des fonctions inattendues des protéines. Dans cette étude, ZNF74-I, l'isoforme courte, a été choisie comme 'appât' et les protéines codées par les ADNc de la librairie servent comme 'proie' dans l'essai de double hybride. Cet essai nous a permis de mettre en évidence une interaction entre ZNF74-I et des enzymes de type E2 et E3 impliquées dans le mécanisme de sumoylation, soit Ubc9 ('Ubiquitin Conjugating Enzyme 9') et PIAS1 ('Protein Inhibitor of Activated Stat 1'), respectivement. Cela nous a conduit à suggérer que ZNF74 pourrait être une cible de la sumoylation et que cette modification post-traductionnelle pourrait affecter ses propriétés de régulateur génique.

1.5 Sumoylation

Les modifications post-traductionnelles des protéines par glycosylation, acylation, phosphorylation, acétylation, méthylation et ubiquitination constituent un moyen de régulation dynamique du fonctionnement biochimique de la cellule (Verger et al., 2003). La sumoylation est une nouvelle modification post-traductionnelle mise en évidence récemment soit en 1996. Les mécanismes de sumoylation sont très similaires à ceux impliqués dans l'ubiquitination des protéines. La sumoylation se définit par le

couplage covalent de la petite protéine SUMO ('Small Ubiquitin-like Modifier') à des protéines cibles. Comme dans le cas des modifications par ubiquitination, acétylation et méthylation, la liaison de SUMO survient sur des lysines de protéines cibles.

1.6 Mécanisme de sumoylation

Comme pour l'ubiquitination, le mécanisme de sumoylation implique différentes étapes enzymatiques successives (voir Figure 3, 5) (Muller et al., 2001; Wilson and Rangasamy, 2001) permettant:

- 1) la maturation de SUMO par clivage de son extrémité C-terminale par des hydrolases produisant un SUMO mature qui possède deux glycine C-terminales (SUMO-GG).

- 2) son activation en présence d'ATP par adenylation permettant la formation de SUMO-AMP et son attaque par le groupe SH d'une cystéine faisant partie du site actif d'une enzyme de type E1. L'enzyme d'activation E1 est constitué d'un hétérodimère composé de SAE1 et SAE2 (nommés AOS1 et UBA2 respectivement chez la levure). SUMO se couple par un lien thioester à SAE2. Alors que pour la sumoylation l'enzyme de type E1 est un hétérodimère, une seule protéine d'activation E1 permet l'ubiquitination. Cependant, il est à noter que SAE2 est homologue à la région C-terminale de l'enzyme de type E1 impliquée dans l'ubiquitination tandis que SAE1 est homologue à sa région N-terminale.

- 3) le transfert de SUMO à partir de l'enzyme d'activation E1 à l'enzyme de conjugaison E2 qui est appelée Ubc9. Ce transfert implique à nouveau la formation d'un

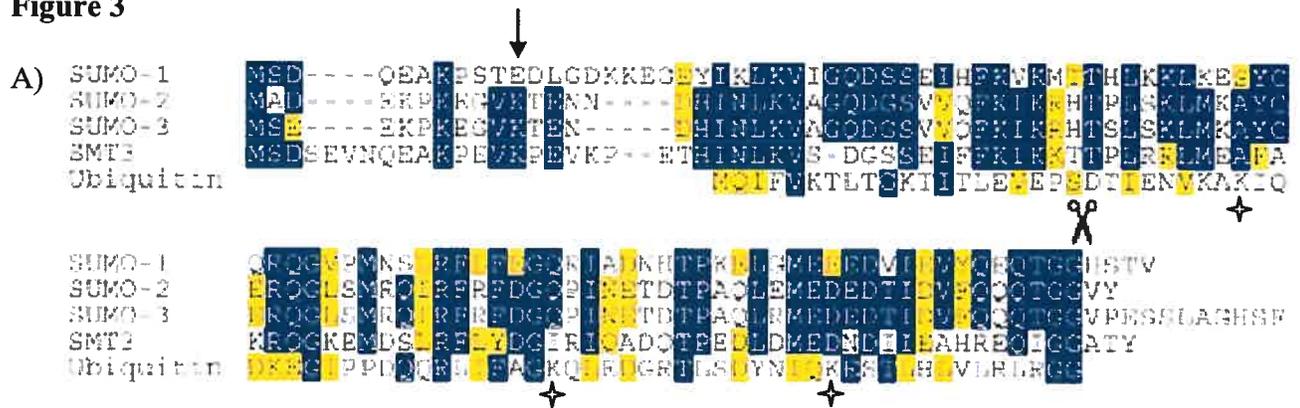
lien thioester entre le groupe carboxy-terminal de SUMO-1 et une cystéine spécifique de Ubc9.

4) la conjugaison de SUMO à la protéine cible par formation d'un lien isopeptidique entre le groupement COOH de la glycine terminale de SUMO et le groupe ϵ -NH₂ d'une lysine acceptrice sur la protéine cible. Cette étape peut être assistée par une ligase de type E3. Trois types de E3 ligases ayant une certaine spécificité pour différentes protéines cibles ont été identifiées soit la protéine RanBP2 (Pichler et al., 2002), la protéine polycomb Pc2 (Kagey et al., 2003) ainsi que les protéines de type 'Ring Finger' de la famille de PIAS (protein inhibitor of activated STAT) incluant PIAS1, PIAS3, PIASx α , PIASx β , PIASy (Schmidt and Muller, 2003; Schmidt and Muller, 2002). Quoique les ligases de type E3 facilitent la sumoylation, elles ne sont pas indispensables, contrairement à E1 et E2, pour permettre la sumoylation *in vitro*. Ceci contraste avec le processus de l'ubiquitination où l'intervention d'une E3 ligase est indispensable autant *in vitro* qu'*in vivo*.

Il est à noter que la sumoylation survient dans la majorité des cas sur une lysine de la protéine cible qui fait partie d'une séquence consensus de type Ψ KXE (Ψ = acide aminé hydrophobe, K = lysine acceptrice de SUMO).

La sumoylation est un processus réversible faisant intervenir des isopeptidases. A l'heure actuelle, on connaît cinq protéases impliquées dans la dé-sumoylation : SENP1 (Sentrin protease 1), SENP2/Axam, SMT3IP2/Axam2, SUSP1 (SUMO-specific protease), SMT3IP1 (Best et al., 2002). Il semble que ces protéines participent aussi à la maturation de SUMO en SUMO-GG (Melchior, 2000).

Figure 3



B)

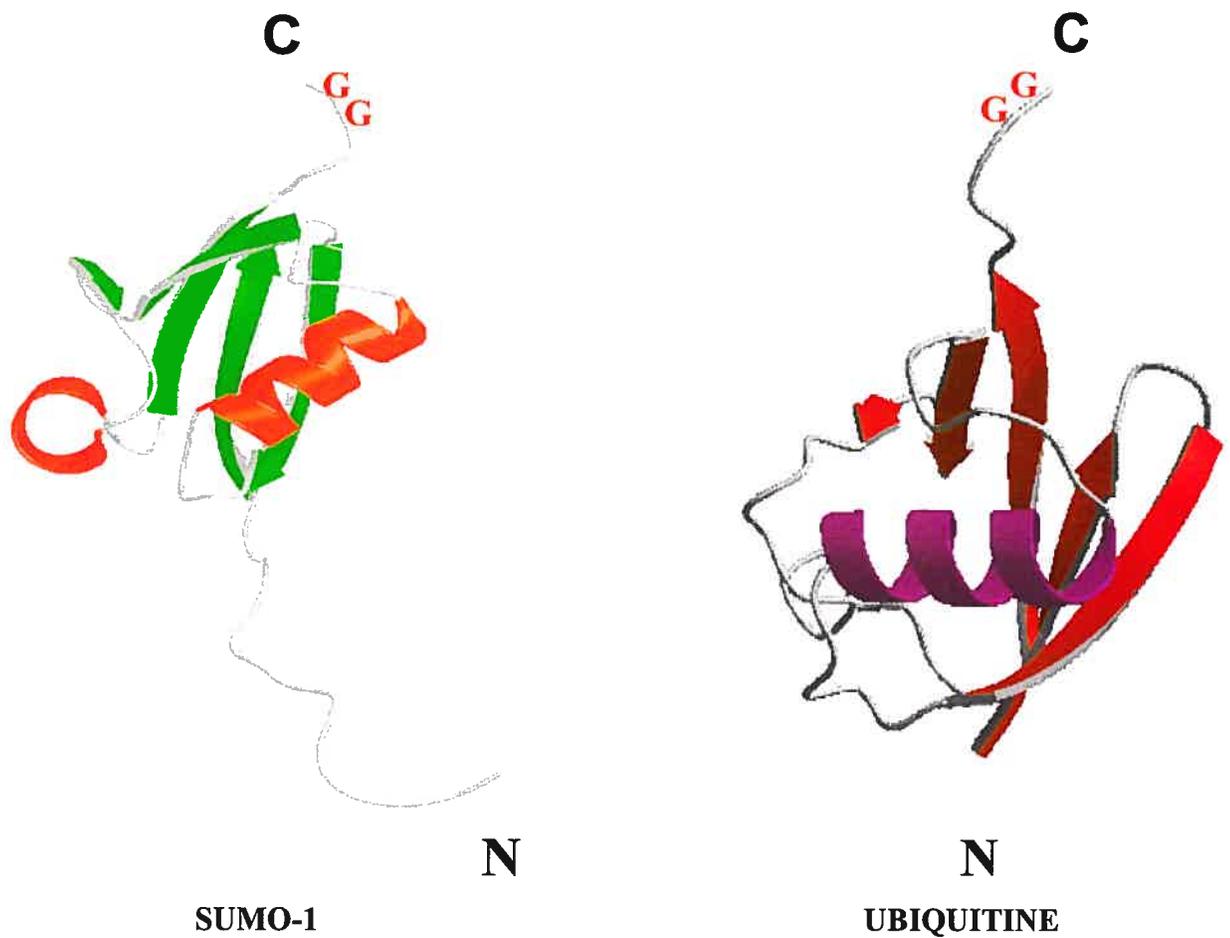


Figure 3 : Structure primaire et tertiaire des différents SUMO et de l'ubiquitine.

A) Comparaison de la séquence primaire des SUMOs et de l'ubiquitine. La flèche pointe sur la lysine acceptrice pour la conjugaison de SUMO qui permet une polysumoylation de SUMO-2 et -3. L'absence de lysine à cette position dans SUMO-1 explique le fait que SUMO-1 n'est pas propice à la polysumoylation (monosumoylation des substrats de SUMO-1). On note que la lysine acceptrice de SUMO-2 et -3 se trouve dans une séquence consensus de sumoylation (ψ KxE; ψ = acide aminé hydrophobe). Au niveau de la séquence de l'ubiquitine, les étoiles indiquent les lysines acceptrices (K 29, 48 et 63) pour la conjugaison d'ubiquitine donnant lieu à une polyubiquitination de l'ubiquitine. Il apparaît qu'il n'y a pas de site consensus évident pour l'ubiquitination.

Adapté à partir de Nature Review. Mol. Cell. Biol. 2: 202 (2001) Muller et al.

B) Comparaison de la structure tertiaire de SUMO-1 et de l'ubiquitine.

(Source : http://www.vli.research.com/Products_and_Solutions/NMR_Standards/Human_Ubiquitin/Structure_M.php)

1.7 Les divers SUMO et leur implication dans la mono- ou polysumoylation

Il existe un seul gène SUMO chez la levure et la drosophile tandis que chez l'humain, trois gènes SUMO différents encodent trois protéines nommées SUMO-1, SUMO-2 et SUMO-3. La séquence en acide aminé de SUMO-1 (aussi nommée Smt3c, GMP1, PIC1 ou Ub11) (Muller et al., 2001) est identique à seulement ~ 47 % à SUMO-2 et SUMO-3. Par contre, SUMO-2 et SUMO-3 sont très similaires (87 % d'identité entre eux). Quoique SUMO-1 n'ait que 18% d'identité avec l'ubiquitine, sa structure tertiaire est similaire ($\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$) et superposable à celle de l'ubiquitine (Melchior, 2000; Seeler and Dejean, 2003). Une comparaison de leur structure primaire et tertiaire est présentée à la Figure 3 (Muller et al., 2001).

Les études de sumoylation *in vivo* suggèrent qu'un seul SUMO-1 est ajouté sur la ou les lysines acceptrices des protéines cibles (mono-sumoylation). Par contre, SUMO-2 et -3 possèdent chacun une lysine sumoylable (voir Figure 3A) qui permet la formation de chaînes poly-sumoylées (poly-sumoylation). La mono-sumoylation et la poly-sumoylation sur des protéines cibles (substrat) sont schématisées à la Figure 4.

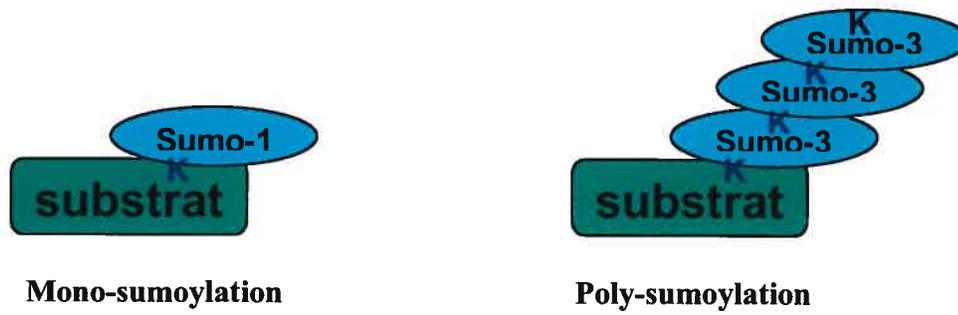


Figure 4. Mono-sumoylation vs poly-sumoylation

Figure 5 : Mécanisme de sumoylation

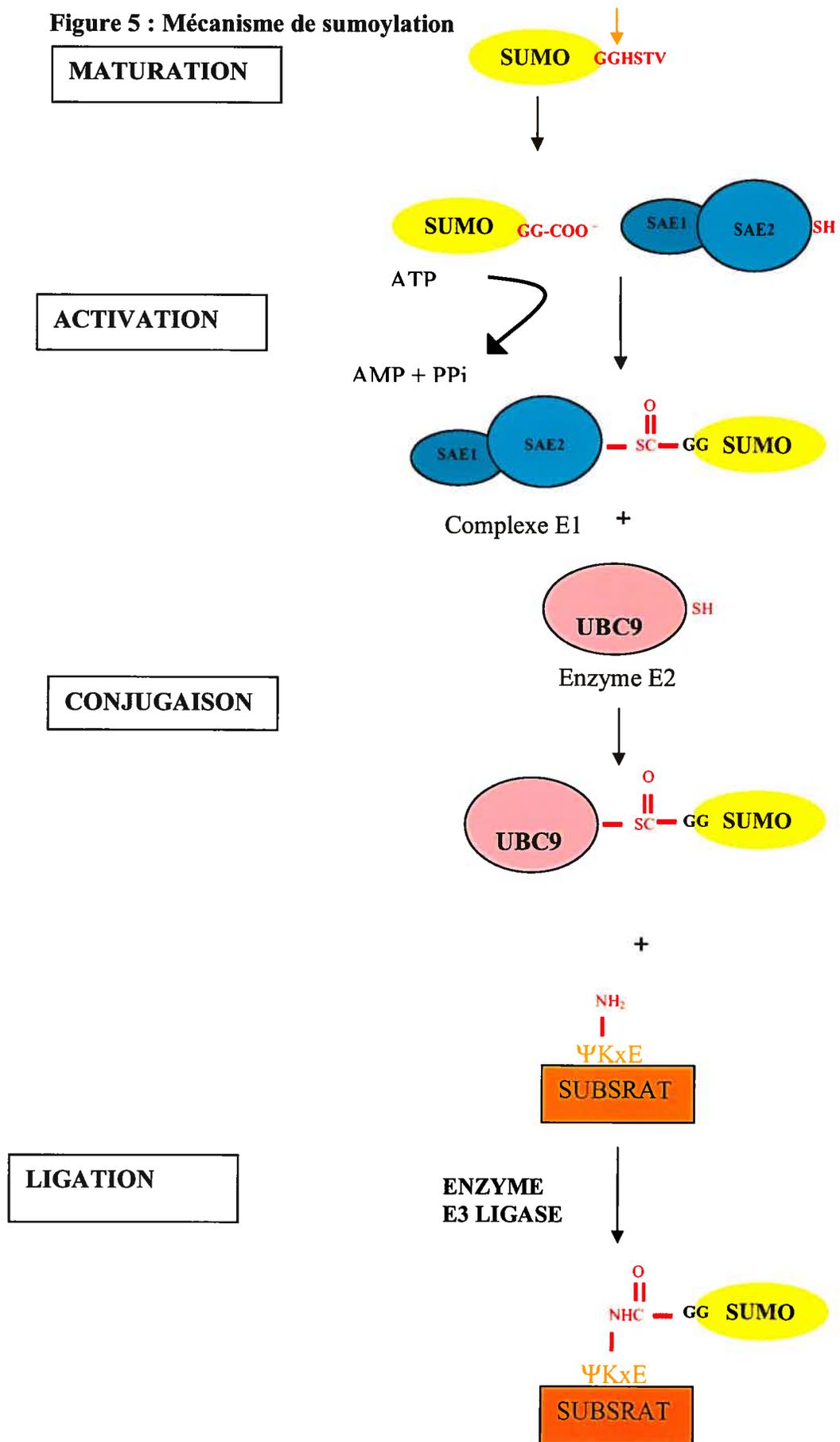


Figure 5 : Mécanisme de sumoylation.

Le clivage protéolytique par des hydrolases du C-terminal de SUMO (maturation) permet l'exposition d'un résidu glycine. Ce résidu sera couplé par un lien thioester à l'enzyme SAE1/SAE2, une enzyme de type E1, durant la réaction d'activation dépendante d'ATP. SUMO est ensuite conjugué à UBC9 puis transféré sur la protéine cible servant de substrat via la formation d'un lien isopeptide avec la protéine cible. Des enzymes de E3 peuvent assister cette ligation. Les enzymes de type E3 ne sont pas indispensables au mécanisme de sumoylation mais peuvent servir à augmenter la stabilité du complexe entre UBC9 (E2) et les protéines cibles et ainsi favoriser la réaction catalytique.

1.8 Localisation de SUMO sous forme libre ou conjuguée

SUMO-1, 2 et 3 sont détectés dans le cytoplasme, au niveau de l'enveloppe nucléaire et dans le noyau. La majorité des SUMOs conjugués se trouvent au niveau de l'enveloppe nucléaire et du noyau notamment dans des sous-domaines ponctués du noyau. Comme toutes les protéines sumoylées identifiées sont soit localisées au niveau de l'enveloppe nucléaire soit au niveau du noyau, on présume que les faibles niveaux de SUMO détectés dans le cytoplasme dans certaines cellules sont attribuables à des SUMOs libres (non-conjugués). SUMO-1 est en quantité limitante dans les cellules et très peu de SUMO-1 libre est détecté par Western blot. Par immunofluorescence, SUMO-1 est essentiellement détecté au niveau du noyau et à un niveau extrêmement faible dans le cytoplasme. Par contre, les isoformes SUMO-2 et SUMO-3 existent principalement sous la forme libre dans les cellules normales et sont détectable à plus haut niveau dans le cytoplasme. Les formes libres de SUMO-2 et -3 sont par contre rapidement conjugués à des protéines après un stress cellulaire (choc thermique, stress osmotique ou oxydation) (Seeler and Dejean, 2003; Melchior, 2000). A l'heure actuelle, la sumoylation par SUMO-1 a été plus étudié que celle par SUMO-2 et SUMO-3.

1.9 Rôles de la sumoylation

A ce jour, une soixantaine de protéines ont été décrites comme des substrats de la sumoylation (Seeler and Dejean, 2003). La majorité des protéines sumoylées sont 1) des facteurs transcriptionnels (ex : p53, Sp3, Lef1, c-myc, plusieurs récepteurs nucléaires, HSF), 2) des co-facteurs nucléaires (ex : p300, HDAC-1 et -4, CtBP, TIF1 α , GRIP1,

SCR-1 et les E3 ligases Pc2 et PIAS), 3) des protéines impliquées dans l'intégrité ou la structure génomique (ex : Topoisomérase 1 et 2 et DNA méthyl transférase 3b, histone H4), 4) des protéines faisant partie des corps nucléaires ('Nuclear bodies') (ex : PML, SP100, Daxx, Télomérase) et 5) des protéines du nucléopore (RanGap1 et la E3 ligase RanBP2) (Seeler and Dejean, 2003).

Chez la levure, les études de souches mutantes pour SMT3 (= SUMO), Uba2 (sous-unité de E1) ou Ubc9 (E2) ou Ulp1, une enzyme de dé-sumoylation (Protease Ubiquitin -like processing enzyme), qui présentent chacune un processus de sumoylation altéré, ont mis en évidence un rôle essentiel de la sumoylation dans le transport nucléaire, la croissance cellulaire, la ségrégation des chromosomes, l'intégrité des fuseaux mitotiques et la réparation de l'ADN (hypersensibilité des mutants aux agents endommageant l'ADN) (Muller et al., 2001; Stade et al., 2002b; Stade et al., 2002a). Cependant, les substrats de SUMO importants dans ces phénotypes n'ont pas été clairement élucidés.

Contrairement à l'ubiquitination qui est majoritairement associée à la dégradation des protéines, la sumoylation ne conduit pas à la dégradation de protéines cibles mais semble plutôt affecter leur stabilité d'interaction avec d'autres protéines ou avec les acides nucléiques, leur localisation ainsi que leur activité transcriptionnelle tel que décrit plus bas. L'étude des conséquences biochimiques et fonctionnelles de la sumoylation est cependant compliquée par le fait que, dans la majorité des cas, seule une petite proportion des protéines cibles sont sumoylées *in vivo* et que les lysines cibles pour la sumoylation peuvent aussi être des substrats pour d'autres modifications telles que l'ubiquitination, l'acétylation et la méthylation. De plus, comme c'est le cas pour plusieurs autres modifications post-traductionnelles, la sumoylation est un processus

dynamique et réversible. Pour contourner ces problèmes, certaines études ont utilisé des chimères réalisées par fusion directe d'une protéine cible et de SUMO placée en N- ou C-terminal de cette protéine (Shiio and Eisenman, 2003; Ross et al., 2002). Ces fusions semblent exercer un rôle comparable aux protéines sumoylées par couplage de SUMO via un lien isopeptidique sur une lysine.

1.9.1 Rôle dans les interactions protéines-protéines

Il existe actuellement au moins trois exemples pour lesquels on a pu mettre en évidence que le couplage de SUMO à une protéine modifie sa stabilité d'interaction avec un partenaire. Le rôle de la sumoylation dans l'interaction de SP100/HP1 et histone H4/HP1 est décrit ci-dessous tandis que celui de l'interaction RanGAP1, RanBP2 sera décrit à la section 1.9.3.1.

1.9.1.1 Rôle de la sumoylation de SP100 sur son interaction avec HP1

Certaines maladies pathologiques tel que la leucémie promyélocytaire ainsi que l'infection virale sont causées par une perte de l'intégrité des corps nucléaires. Ces corps nucléaires nommés les PODs (PML Oncogenic Domains) sont en majorité constitués des protéines SP100 et PML. SP100 est un antigène reconnu par des anticorps retrouvés chez des patients atteints de maladies du système immunitaire. SP100 interagit et co-localise avec les membres de la famille HP1 ('heterochromatin protein 1'), des protéines associées et nécessaires pour l'intégrité de l'hétérochromatine (Seeler et al., 2001; Nathan et al., 2003). Il a été démontré qu'une isoforme de SP100, SP100A est sumoylée *in vivo* et *in vitro*. D'autre part, des essais d'affinité effectués *in vitro* ont permis de démontrer que la sumoylation de SP100A permet de stabiliser son interaction

avec la protéine HP1. Les conséquences fonctionnelles de cette sumoylation demeurent à 'investiguer' (Seeler et al., 2001).

1.9.1.2 Rôle de la sumoylation de l'histone H4 sur son interaction avec HP1

Les histones sont les protéines responsables de la régulation de la structure et de la fonction de la chromatine. L'unité de base de la chromatine, le nucléosome est composé d'environ 149pb d'ADN enroulées autour d'un octamer d'histones incluant les histones H2A, H2B, H3 et H4. Les domaines C-terminal globulaires de chaque histone se lient entre eux afin de former l'octamer, tandis que le N-terminal libre est susceptible de subir des modifications post-traductionnelles. Les possibilités de modifications des résidus lysines des histones incluent l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la glycosylation ainsi que l'ADP-ribosylation (Shiio and Eisenman, 2003; Nathan et al., 2003). Récemment, il a été démontré que l'histone H4 peut être de plus sumoylée sur son extrémité C-terminale. Des études d'immunoprécipitation ont permis de mettre en évidence que la protéine HP1 γ interagit préférentiellement avec la forme sumoylée de l'histone H4. Une meilleure affinité de la forme sumoylée de l'histone H4 avec l'histone déacétylase HDAC1 a aussi été rapportée. Il a été suggéré que la sumoylation de l'histone H4 favorise la répression transcriptionnelle à travers le recrutement des histones déacétylases et de la protéine HP1 γ (Shiio and Eisenman, 2003; Nathan et al., 2003).

1.9.2 Rôle dans les interactions protéine-ADN

La sumoylation des protéines du choc thermique HSF1 et HSF2 ('heat Shock factor 1 and 2') entraîne une augmentation de leur liaison à l'ADN de leurs gènes cibles.

Ainsi par exemple, suite à un choc thermique, on observe une augmentation de l'expression de HSF1, de sa sumoylation et de sa capacité à lier l'ADN résultant en une transcription augmentée de ses gènes cibles. De plus, on observe une re-localisation de HSF1 vers des granules nucléaires caractéristique du stress ('stress granules'). La mutation du résidu 298 sumoylable de HSF1 prévient par contre la re-localisation vers les granules de stress. De plus, le mutant se lie moins bien aux ADN cibles et il induit une transcription atténuée en condition de stress par rapport à la protéine sauvage. En conséquence, la liaison de SUMO à HSF1 joue un rôle dans la régulation de la transcription (Hong et al., 2001).

1.9.3 Rôle dans le ciblage subcellulaire

La régulation des interactions protéine-protéine dépendantes de SUMO est dans plusieurs cas associée à des changements dans le ciblage sub-cellulaire. Ainsi, des exemples de changements de compartiments cellulaires (exemple : cytoplasme vers enveloppe nucléaire ou import-export entre cytoplasme et noyau) et de changements de compartiments sub-nucléaires (exemple : nucléoplasme vers foci nucléaires ou nucléole vers nucléoplasme) seront donnés ci-dessous.

1.9.3.1 Sumoylation et ciblage du cytoplasme à l'enveloppe nucléaire

RanGAP1 (Ran GTPase-Activation protein) est une protéine qui active la GTPase Ran, une protéine nucléaire requise pour le transport bidirectionnel des

protéines à travers le complexe du nucléopore. Quoique RanGAP1 puisse effectuer une navette entre le cytoplasme et le noyau, elle est normalement retrouvée en majorité dans le cytoplasme et au niveau des nucléopores de l'enveloppe nucléaire. Il est apparu que la sumoylation de RanGAP1 était essentielle pour le ciblage aux nucléopores (voir Figure 6). Ainsi, un mutant de RanGAP1 non-sumoylable (K526R) n'est plus ciblé aux nucléopores et est localisé uniquement au niveau du cytoplasme (Matunis et al., 1998; Mahajan et al., 1997; Mahajan et al., 1998) (voir Figure 6). Il a été suggéré que le ciblage de RanGAP1 vers le nucléopore pourrait dépendre de son interaction avec la nucléoporine RanBP2 (Nup358) (Matunis et al., 1998), une protéine impliquée dans le transport nucléaire qui fonctionne comme une E3 ligase pour SUMO (Pichler et al., 2002). En effet, des études *in vitro* indiquent que seule RanGAP1 sumoylée interagit avec RanBP2 (Matunis et al., 1998).

1.9.3.2 Sumoylation et transport nucléaire

Le rôle direct de la sumoylation dans l'importation de protéines vers le noyau ou l'exportation du noyau vers le cytoplasme a été décrit pour quelques protéines (Melchior et al., 2003). Il a été rapporté récemment que la sumoylation de CtBP1 ('C-terminal binding protein of adenovirus E1A'), un co-répresseur participant à la répression transcriptionnelle d'une variété de gènes impliqués dans la croissance cellulaire et la différenciation, était requise pour sa localisation nucléaire (Lin et al., 2003). En effet, CtBP1 est normalement localisée dans le noyau quoiqu'elle ait aussi des fonctions cytoplasmiques. La mutation d'une lysine spécifique de CtBP1 (K428R), qui est une cible pour sa sumoylation, résulte en une redistribution majoritaire vers le cytoplasme. Puisque l'abolition de la sumoylation diminue l'expression de CtBP1 dans

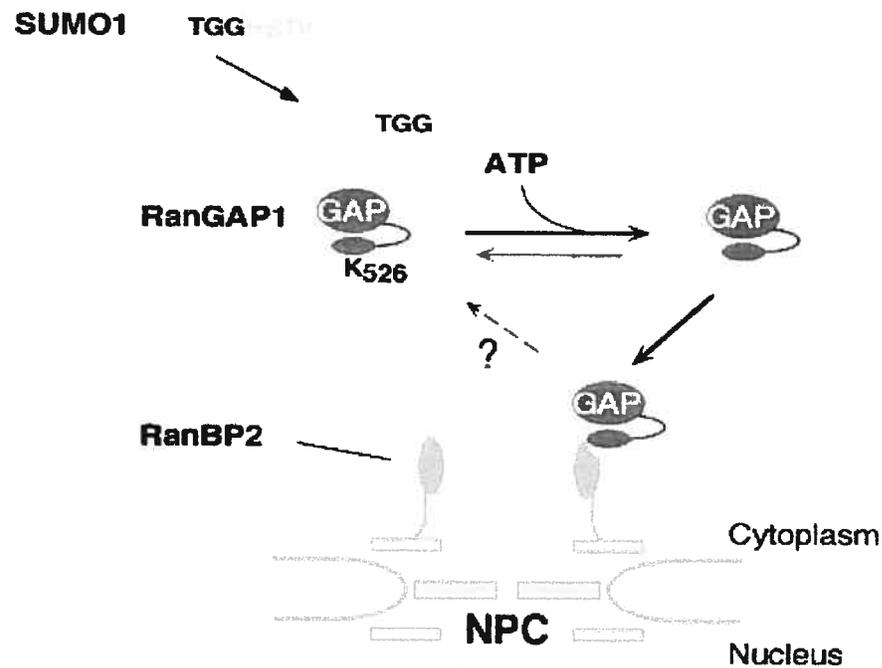


Figure 6 : Ciblage de RanGAP1 sumoylé au nucléopore par interaction avec la protéine RanBP2. Par clivage de son extrémité C-terminale, SUMO-1 est maturé en SUMO-GG actif. SUMO-GG est transféré sur la lysine K526 de RanGAP1. RanGAP1 sumoylé forme ensuite une liaison stable avec RanBP2 localisé au niveau des fibrilles cytoplasmiques du nucléopore (NPC). Tiré de *J. Cell. Biol* 140:259 (1998) Mahajan et al.

le noyau, il est suggéré que la sumoylation de CtBP1 joue un rôle soit dans son importation soit dans sa rétention nucléaire. La sumoylation semble aussi réguler l'importation de la protéine de drosophile, dorsal, et de la protéine virale, E1 (Muller et al., 2001).

En contraste avec ces exemples, un rôle de la sumoylation dans l'exportation nucléaire a aussi été rapporté pour les protéines TEL humaines et MEK1 chez *dictyostelium*. Ainsi, la sumoylation du répresseur transcriptionnel TEL semble requise pour son exportation dépendante du récepteur d'exportation nucléaire Crm-1 (Wood et al., 2003). TEL est normalement majoritairement localisé dans le cytoplasme. Sa localisation cytoplasmique est considérablement réduite par traitement des cellules avec un inhibiteur de crm1 (leptomycin B) ou par une mutation de sa lysine acceptrice de SUMO (K99R). De même, la sumoylation de la protéine MEK1 ('Mitogen-activated protein kinase kinase 1') chez *dictyostelium* semble importante pour son export vers le cytoplasme, une étape indispensable pour former un organisme multicellulaire. MEK1 est normalement située dans le noyau. En réponse à des stimulations de *dictyostelium* par des agents de chemoattraction, MEK1 est sumoylée et relocalisée vers le cytosol (Sobko et al., 2002).

1.9.3.3 Transport entre nucléole et nucléoplasme

La Topoisomerase-1, une enzyme responsable de couper et dérouler l'ADN, fait la navette entre deux compartiments, le nucléoplasme et le nucléole, où on la détecte dans des conditions cellulaires normales. La protéine endogène ou surexprimée par transfection n'est sumoylée qu'à environ 1%. Lorsqu'on augmente sa sumoylation par un traitement à la camptothecin, un inhibiteur de la topoisomérase (Rallabhandi et

al., 2002) ou par la sur-expression d'UBC9 (Mo et al., 2002), cela conduit à une déplétion de la topoisomérase nucléolaire. Par contre, un mutant non sumoylable (mutation de trois lysines cibles pour la sumoylation) est retrouvé uniquement dans le nucléole autant en absence qu'en présence de camptothecin. Ceci suggère que la sumoylation de la topoisomérase est requise pour sa localisation dans le nucléoplasme. Comme le site majeur de la Topo-1 est dans sa région NH₂ terminale qui interagit avec la nucléoline, une protéine nucléolaire, il a été proposé que la sumoylation pourrait perturber l'interaction avec la nucléoline permettant à la topoisomérase de quitter le nucléole et de poursuivre une navette continue entre le nucléole et le nucléoplasme.

1.9.3.4 Ciblage sub-nucléaire vers des foci de type PODs

Les PODs (corps riches en protéine PML) font partie d'une panoplie de domaines identifiés dans le noyau des cellules eucaryotes. Il y a évidence que les PODs jouent un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire, dans le contrôle de l'acétylation de la chromatine, dans l'apoptose ainsi que dans la différenciation cellulaire (Eskiw and Bazett-Jones, 2002). Ce rôle dans la croissance et la différenciation cellulaire est consistant avec le fait que des patients atteints d'une leucémie promyélocytaire aigüe, suite à une translocation associée à la formation d'une fusion entre PML et le récepteur de l'acide rétinoïque RAR α , ont des cellules déficientes en corps PML (Eskiw and Bazett-Jones, 2002). Les corps PML pourraient avoir un rôle dans le recrutement de facteurs et de complexes responsables de l'organisation de la chromatine environnante car plusieurs histones déacétylases (N-CoR/SMRT, Ski) et acétyltransférases (CBP, P300) co-localisent avec PML (Eskiw and Bazett-Jones, 2002).

Les PODS pourraient donc contrôler la transcription grâce à leur capacité de réguler l'état d'acétylation des protéines impliquées dans la transcription incluant les protéines de la chromatine et de concentrer les facteurs nécessaires pour certaines fonctions cellulaires.

PML qui est concentrée dans les PODS est modifiée par SUMO sur les lysines 65 (région 'ring finger'), 160 (Boite B1) et 490 (région NLS 'Nuclear Localisation Signal') (Seeler et al., 2001). En mutant les lysines cibles pour la sumoylation de PML, les PODS cessent d'être formés (Muller et al., 1998; Eskiw and Bazett-Jones, 2002; Zhong et al., 2000). Il a donc été suggéré que la modification par SUMO est requise pour le recrutement de PML au niveau des PODS (Duprez et al., 1999). D'autre part, il a aussi été suggéré que cette modification permet le ciblage de PML vers la matrice nucléaire au niveau des PODS (Muller et al., 1998; Lallemand-Breitenbach et al., 2001). Ainsi, une fois modifiée par SUMO, PML résiste à son extraction du noyau, une caractéristique des protéines associées à la matrice nucléaire. Il existe dans le noyau, des formes de PML sumoylées par un, deux ou trois SUMO (Sternsdorf et al., 1997). Il a été suggéré que plus PML est sumoylée sur un nombre important de ses trois lysines cibles, plus PML forment des complexes stables au niveau des PODS. Il est proposé que l'état et le degré de sumoylation pourrait affecter la capacité de multimériser de PML et donc sa capacité à former des PODS stables. AS_2O_3 est utilisé comme agent thérapeutique chez les patients atteints de la leucémie promyélocytaire aigüe ce qui permet notamment une reconstruction des corps PML. Après traitement des cellules avec du AS_2O_3 , seul le complexe PML-(SUMO)₃ est détecté par immunoblot indiquant une augmentation de sa modification par SUMO (Sternsdorf et al., 1997; Burkham et al., 2001).

En conclusion, il apparaît que la sumoylation peut affecter la localisation subnucléaire de protéines.

1.9.4 Rôle dans la régulation transcriptionnelle

Plusieurs exemples illustrent le rôle direct des modifications post-traductionnelles par SUMO dans la régulation transcriptionnelle et plus particulièrement dans la répression transcriptionnelle. Ainsi, la mutation des sites de sumoylation de plusieurs régulateurs transcriptionnels tels c-jun (Schmidt and Muller, 2002), p53 (Michael and Oren, 2003; Melchior, 2000; Schmidt and Muller, 2002), Sp3 (Sapetschnig et al., 2002), récepteurs de la progestérone (Abdel-Hafiz et al., 2002), des androgènes (Poukka et al., 2000) et des glucocorticoides (Le Drean et al., 2002) augmente leur activité transcriptionnelle. Ceci suggère que SUMO est un régulateur négatif de l'efficacité de transcription. Il est à noter que SUMO pourrait avoir une activité répressive intrinsèque tel que suggéré par le fait qu'une protéine de fusion de SUMO à un domaine de liaison à l'ADN tel le domaine liaison du facteur Gal4 (Gal4 DBD-SUMO) peut réprimer la transcription dans des essais de gènes rapporteurs (Ross et al., 2002). Cet effet a aussi été observé avec une protéine de fusion de Ubc9 avec Gal4 (Gal4DBD-Ubc9) (Shiio and Eisenman, 2003). Actuellement, on ne sait pas si cet effet est intrinsèque à Ubc9 ou bien est due à la capacité de Ubc9 de lier SUMO ou à celle de lier ses substrats et de les sumoyler. Actuellement, outre la possibilité d'une activité répressive intrinsèque à SUMO, il n'y a pas d'explication moléculaire claire sur le ou les mécanismes par lesquels le couplage covalent de SUMO régule l'activité transcriptionnelle mais trois hypothèses principales, qui ne sont pas mutuellement exclusives, ont été formulées. Selon un premier modèle, il est suggéré que SUMO peut

modifier les propriétés d'interaction de ses protéines cibles. Comme décrit plus haut, cela peut résulter dans un changement dans l'affinité et la stabilité d'interaction avec des modulateurs de la transcription (exemple: nécessité de sumoylation de l'histone H4 pour interaction avec la protéine HP1 (Shiio and Eisenman, 2003)) ou dans l'altération des propriétés de liaison à l'ADN de facteurs transcriptionnels (exemple: HSF1 et HSF2 (Hong et al., 2001)). Selon un second modèle, il est suggéré que la conjugaison de SUMO peut induire des changements dans la localisation cellulaire (probablement en altérant certaines interactions protéines-protéines) (exemples: changement de localisation du répresseur Daxx ainsi que de l'activateur LEF1 vers les domaines PODs riches en PML après leur sumoylation et cessation donc de la régulation de leurs gènes cibles (Ishov et al., 1999; Sachdev et al., 2001)). Enfin, la sumoylation pourrait potentiellement modifier l'activité transcriptionnelle en antagonisant d'autres modifications postraductionnelles régulant la transcription soit par exemple en prévenant l'ubiquitination (Melchior, 2000; Desterro et al., 1998) (voir section suivante), l'acétylation ou la méthylation de lysines acceptrices communes ou la phosphorylation de résidus localisés à proximité des sites de sumoylation.

1.9.5 Rôle de la sumoylation comme antagoniste possible de l'ubiquitination

Les facteurs de transcription de la famille de NF κ B permettent la régulation d'une variété de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire ainsi que dans le contrôle des réponses inflammatoire et immunitaire (Kroll et al., 1997). L'activité de ces facteurs est régulée négativement par I κ B α qui peut les séquestrer dans le cytoplasme. En présence de certains signaux inducteurs (exemple TNF α), I κ B α est

phosphorylé, ubiquitiné sur sa lysine 21 et dégradé par le protéasome. Cela permet de relâcher NF κ B qui peut alors être ciblé dans le noyau. I κ B α est aussi retrouvé dans le noyau où il semble contribuer à la régulation de l'exportation de NF κ B du noyau vers le cytoplasme. Cette fraction nucléaire de I κ B α est sumoylable sur la même lysine qui sert de cible à l'ubiquitination. Ces observations ainsi que le fait que I κ B α sumoylée est résistant à la dégradation induite par TNF α suggèrent que la sumoylation de I κ B α pourrait antagoniser son ubiquitination (Melchior, 2000; Desterro et al., 1998).

1.10 Hypothèse et Objectifs du projet de recherche

La mise en évidence par double hybride des interactions entre une isoforme de ZNF74 (ZNF74-1) et les enzymes Ubc9 (E2) et PIAS1 (E3) nous a permis de suggérer que ZNF74 pourrait être modifiée post-traductionnellement par SUMO. En conséquence, l'hypothèse de recherche de ce mémoire est que ZNF74 est une des protéines cibles de la sumoylation et que cette modification pourrait affecter ses propriétés.

Les **OBJECTIFS** de ce projet seront de :

- 1) Confirmer l'interaction de l'isoforme non répressif ZNF74-I avec Ubc9 et PIAS1
- 2) Déterminer si l'isoforme répressif ZNF74-II interagit avec Ubc9 et PIAS1
- 3) Déterminer si ZNF74 (isoformes I et/ou II) est modifiée par la sumoylation *in vivo*
- 4) Déterminer si ZNF74 est sumoylable *in vitro* et quelles sont les enzymes minimalement requises pour sa sumoylation
- 5) Identifier les sites de sumoylation de ZNF74, par mutation des lysines candidates.

Ces études serviront de base pour déterminer si les propriétés transcriptionnelles et la localisation du KRAB multidoigt ZNF74 sont régulées par sumoylation, une modification post-traductionnelle affectant majoritairement des protéines nucléaires et notamment des régulateurs transcriptionnels.

Chapitre 2. ARTICLE

The KRAB multifinger protein ZNF74 interacts with UBC9 and PIAS1
and is sumoylated *in vivo* and *in vitro*

Samantha Abenheim, Xavier Mascle, Karl-Frédéric Bergeron,
Patricia Estéphan and Muriel Aubry

Department of Biochemistry, Université de Montréal, C.P. 6128,
Succ. Centre-Ville, Montréal, Qc, H3C 3J7, Canada

ABSTRACT

ZNF74 belongs to the KRAB (Krüppel-Associated-Box) multifinger proteins that function as transcriptional repressors. This protein, which gene was isolated as a potential candidate for DiGeorge syndrome, is developmentally expressed in neural crest-derived tissues. Searching for new ZNF74's protein partners by yeast two-hybrid methods, we identified two enzymes actively involved in the sumoylation process, the E2 conjugating enzyme, UBC9, and PIAS1 which acts as an E3 ligase. Both of these enzymes participate post-translationally in the covalent coupling of SUMO protein to target substrates. Here, UBC9 and PIAS1 were shown to interact with the two major ZNF74 isoforms, ZNF74-II, an isoform with a repressive KRAB box, as well as ZNF74-I, a shorter isoform with a non functional KRAB box, as revealed by yeast-two hybrid semi-quantitative assays. This suggested that ZNF74 was a potential sumoylation target. By overexpressing SUMO-1 in 293T cells, we have found that ZNF74 is sumoylated *in vivo*. Higher molecular species co-reacting with antibodies directed against ZNF74 and SUMO-1 were observed by Western blots performed on cells extracts and immunoprecipitates. As demonstrated by single point mutation, *in vivo* as well as *in vitro*, SUMO-1 modification of ZNF74 occurs at least at one lysine, K₁₃₀, which is located in a context differing from the classic "ΨCKXE" sumoylation consensus (where Ψ is a hydrophobic residue and K the residue to which SUMO is conjugated). While a growing number of nuclear proteins have recently been shown to be sumoylated, ZNF74 is the first member of the large KRAB multifinger family reported as a target for SUMO modification. These results suggest that SUMO modification may participate in the transcriptional regulation mediated by KRAB multifinger proteins.

Key words: Sumoylation, KRAB, multifinger protein, zinc finger, DiGeorge syndrome

INTRODUCTION

We previously isolated a zinc finger gene, ZNF74, as a candidate for the DiGeorge developmental disorder (1) and found that it is embryonically expressed in neural crest derived tissues, a profile coincident with structures affected in DiGeorge patients (2). ZNF74 belongs to a vertebrate-specific subfamily of zinc finger genes, the KRAB motif-containing multifinger genes (3). This subfamily considerably increases in number and complexity late during vertebrate evolution (4). Thus, KRAB multifinger genes are likely to have a significant impact on species-specific aspects of biology. Despite the fact that KRAB multifinger genes belong to the largest subgroup of Cys₂-His₂ zinc finger protein (Krüppel/TFIIIA type) (about half of the 800 known human Cys₂His₂ zinc finger genes), little is known about their biochemical and functional properties.

ZNF74 encodes two functional domains, a conserved motif called KRAB involved in transcriptional regulation and a nucleic acid binding domain composed of 12 tandemly organized Cys₂His₂ zinc finger motifs of the TFIIIA/Krüppel type. Two main isoforms, ZNF74-I and ZNF74-II, differing in the length of their KRAB domain are generated by alternative promoter usage and splicing (5). Whereas ZNF74-I is preferentially located to nuclear speckles enriched in splicing factors and is transcriptionally inactive, ZNF74-II has a more diffuse nuclear localization and its KRAB box has been shown to repress transcription (5;6). The potent transcriptional repressive activity of ZNF74 KRAB box is mediated through its interaction with the co-repressor KAP-1 (7), a proposed universal regulator for KRAB multifinger proteins (8-10).

Recent studies have demonstrated that post-translational modification of transcription factors and their co-regulators by the small ubiquitin-related modifier protein, SUMO, can

modulate transcriptional activity (11-15). The three mammalian SUMO, SUMO-1, -2 and -3, all resemble ubiquitin both in tertiary structure and mechanism of ligation to substrate, but unlike for ubiquitination, the main known functional consequences of sumoylation are not degradation (15). Several examples illustrate the direct involvement of SUMO modification in gene regulation and in particular in gene repression (11; 12; 16). All three SUMO proteins form an isopeptide bond between their carboxy-terminal glycine and a lysine ϵ -amino group on their target proteins. The target lysine to which SUMO is conjugated is usually part of a short consensus sequence, ψ KXE (where ψ represents a large hydrophobic residue). The sumoylation process involves SUMO-activating E1 enzyme (SAE1/SAE2) and SUMO-conjugating E2 enzyme (UBC9). Furthermore, sumoylation-specific E3 ligases that enhance SUMO conjugation have also been described. These E3 ligases belong to three classes represented by RanBP2 (17), Pc2 (18) and PIAS family members (protein inhibitor of activated STAT), PIAS1, PIAS3, PIASy, PIASx α and PIASx β (19). It has been suggested that E3 ligases may be a less important determinant for the substrate specificity in the SUMO pathway than ubiquitin E3 ligases in the ubiquitin pathway (20). SUMO E3 ligases might rather play a role for stabilizing the interaction between the E2 conjugating enzyme UBC9 and target substrate to be sumoylated. Sumoylation is a dynamic and reversible process. Several SUMO-specific proteases referred to as proteins of the SENP family have been characterized; they function both for the maturation of SUMO as carboxy-terminal hydrolases and in the removal of SUMO from its target protein as isopeptidases (15;21).

To understand ZNF74 molecular mechanisms of action in regulation of gene expression, we used the yeast two-hybrid system to identify its interacting proteins. In the present study, we identified two enzymes involved in sumoylation, UBC9 and PIAS1, as partners for ZNF74

KRAB multifinger protein. We report here that ZNF74 is a novel target for post-translational covalent modification by SUMO both *in vivo* and *in vitro*. Furthermore, we found that the target sequence for ZNF74 slightly differs from the classic consensus for SUMO modification.

MATERIALS AND METHODS

cDNA constructs

For expression in 293T cells, full length ZNF74-I isoform (Accession No. X71623; aa 1-573) (22) cloned in pBluescript (Stratagene) (clone 63) was subcloned as an XbaI fragments in the XbaI site of either cytomegalovirus-driven pCGN vector in phase with an N-terminal HA tag (23) (clone 50) or a pcDNA 3.1 vector (Invitrogen) that includes an N-terminal myc tag (clones 201). ZNF74-II isoform (Accession No. X92715; aa 1-644) (5) cloned in pBluescript (Stratagene) (clone 162) was subcloned as XbaI-KpnI fragment in the XbaI-KpnI site of pCGN (clones 161) or as an XbaI fragment in the XbaI site of pcDNA 3.1-myc vector (clone 202). Most ZNF74-II mutants were generated from wild type ZNF74-II cloned in pBluescript using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene), verified by DNA sequencing and subcloned as XbaI fragments in pCGN (K130R/clone 350 and K130R;K557R/clone 353) or pcDNA3.1 (K130R/clone 351 and K130R;K557R/clone 360). pCGN-ZNF74-II (clone 161) was used as template for generating pCGN-ZNF74-II K557R mutant (clone 331). For expression in yeast cells, ZNF74-I and ZNF74-II were subcloned in phase as XbaI blunted fragments in the XmaI site of pGBT9 expression vector (Clontech) encoding the DNA binding domain of GAL4 (aa 1-147) at the N-terminal of the fusion protein (clones L23 and L30). Full length UBC9 (Accession No. U45328) cloned in phase in the pACT2 vector (Clontech) encoding the GAL4 activation domain (aa768-881) at the N-terminal of the fusion protein was isolated from a human fetal brain Matchmaker cDNA library (Clontech). The full length UBC9 was subcloned blunt as a NotI-SpeI 0.6 kb fragment (both NotI and SpeI are part of UBC9 untranslated region) into the blunted BamHI site of pBluescript (Stratagene) (clone 308). Full length UBC9 was transferred as an XbaI-KpnI fragment from pBluescript into pCGN eukaryotic expression vector that encodes an N-terminal HA epitope tag under the control of cytomegalovirus promoter (23) (clone 309). A

PIAS1 clone (Accession No NM_016166) isolated from the pACT2 cDNA library started at the second amino acid just after the initiating ATG and included the stop codon. This PIAS1 sequence was released by cutting the vector with SmaI-BglIII and the generated 2.4 kb fragment was subcloned in the SmaI-BamHI site of pCGN (clone 336). Myc-SUMO-1 (clone e3) from which SUMO-1 was derived as an XhoI fragment for subcloning in pGFP (clone 315) was a generous gift from Dr François-Michel Boisvert.

Antibodies used. Mouse hybridoma cell lines secreting mAbs 12CA5 (24) and 9E10 (American Type Culture Collection) were used to detect the HA- and myc-epitope tag, respectively. A combination of two mouse monoclonal antibodies (clones 7.1 and 13.1) against the green fluorescent protein (anti-GFP) was obtained from Roche. A polyclonal antibody against two unique regions of ZNF74 (aa 139 to 261 and aa 584 to 643 of ZNF74-II) was generated in rabbits.

Yeast two hybrid screen. We used the Matchmaker GAL4-based Two-Hybrid kit (Clontech) with pGBT9-ZNF74-I as bait. The screen was performed as recommended by the manufacturer using HF7c yeast cells containing two genomically integrated reporters, GAL1 UAS-HIS3 and GAL1 UAS-lacZ. In brief, yeast cells already containing ZNF74-I bait (cloned in pGBT9 which carries a wild type TRP1 gene) were transformed by the lithium acetate method with a human fetal brain Matchmaker cDNA library (Clontech) derived from whole brains from Caucasian fetus of 20-25 weeks. This library was cloned in pACT2 expression vector which carries a wild type LEU2 gene. We screened approximately 8×10^5 transformants for growth on SD (synthetic dropout) plates lacking histidine, leucine and tryptophan in the presence of 5 mM 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol). pACT2 plasmids, from colonies that were growing on a minimal medium

lacking His and were positive for β -galactosidase expression as assessed by filter assay, were recovered from HF7c yeast cells, transformed into E. coli DH5 α and sequenced. In a second round of testing, pACT2 plasmids of interest were cotransformed with pGFT9-ZNF74-I in SFY526 yeast strain containing a lacZ reporter gene for quantitative β -galactosidase assays. Pool of three colonies grown on selective plates lacking leu and tryptophan were picked, grown overnight in selective liquid medium and assayed for β -galactosidase activity. The β -galactosidase activity was measured in the yeast extracts using ONPG as substrate and the β -galactosidase activity per μ g of extract calculated. The data were collected from independent experiments as indicated in Table 1.

Cell culture and transfections. Human embryonic kidney 293T cells maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented by 10% fetal bovine serum, 100 μ g/ml penicillin and streptomycin, 1mM L-glutamine were seeded at a density of 3×10^5 cells per 60-mm dish. Transient transfections of plasmids were performed the following day by using the calcium phosphate precipitation method. The PGEM-4 vector (Promega) was used to keep the total amount of transfected DNA constant (usually 10 μ g). Forty eight hours post-transfection, cells were detached with 2 ml phosphate-buffered saline/2 mM EDTA/20 mM N-ethyl-maleimide (NEM) and recovered by centrifugation for preparing cell extracts.

Cells extracts and immunoprecipitations. For preparing whole cell extracts to be separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, cells were lysed in denaturing Laemmli buffer containing 20 mM NEM (400-600 μ l/dish) and DNA was immediately sheared using a 1ml syringe with a 26G $\frac{1}{2}$ needle to reduce sample viscosity. For immunoprecipitation, cells were

lysed in SDS solubilizing buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.8% SDS, 10 mM NEM) (1 ml/ dish) for 4 min at 95 °C in order to solubilized ZNF74 protein that is a nuclear matrix protein (22). The following steps were done at 4 °C. Extracts were diluted with an equivalent amount of Triton buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 4 % Triton X-100, 10 mM NEM, 2 mM PMSF, $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinine, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepstatine, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptine), passed through a 26G $\frac{1}{2}$ needle to reduce viscosity and centrifuged at 15,000 x 2 min. Extracts were then precleared with protein A-Sepharose (1ml/ 10-20 μl stacked beads) (Sigma) for 1 h. Immunoprecipitations of the precleared extracts (1ml) were then carried out for 2 h using 10 μl of the appropriate antibody and 40-50 μl of protein A-Sepharose. The protein A-sepharose beads were washed 3 times with 1 ml washing buffer (50 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.4% SDS, 2% Triton, 10 mM NEM). Washed immunoprecipitates were resuspended in Laemmli buffer containing 20 mM NEM. Whole cell extracts and immunoprecipitates were separated on 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and electrotransferred for Western blotting.

SUMO-1 in vitro modification assay. The *in vitro* SUMO-1 modification was carried out using the LAE biotech Sumoylation kit according the recommendation of the manufacturer. In brief, ZNF74-I, ZNF74-II and mutants cloned in pcDNA 3.1-myc were *in vitro* translated in the presence of translation grade ^{35}S -methionine (20 μCi ; 1200 Ci/mmol) by using the T7 TNT Quick coupled transcription/translation reticulocyte lysate system (Promega) (1 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ reaction). Translation products (5-6 μl) were incubated for 1 h at 30 °C in a 20 μl reaction containing 150 ng SUMO-1 activating E1 (AOS1/UBA2), 1 μg UBC9, 1 μg SUMO-1-GG and 2 mM ATP. ZNF74 and ZNF74 sumoylated products were detected by autoradiography of the proteins separated by SDS-PAGE electrophoresis and transferred on nitrocellulose membrane. (25)

RESULTS

Identification of UBC9 and PIAS1 as ZNF74 protein partners

In order to identify new protein partners for the KRAB multifinger ZNF74 and further elucidate its function, we conducted a yeast-two hybrid screen using as a bait ZNF74-I isoform. ZNF74-I corresponds to a short isoform of ZNF74 lacking a functional KRAB repressive box (5). A human fetal brain library was used as a source of preys. The screen performed led to isolation of several clones encoding proteins that may interact with ZNF74. UBC9 (3 clones) and PIAS1 (1 clone) were among the 56 different clones identified as positive in the yeast strain HF7c for all selection markers (His3, leu, trp) and β -galactosidase expression on filter assay. All UBC9 clones encompassed the full length open reading frame of human UBC9 protein. The PIAS1 clone was also encompassing the full length human PIAS1 protein sequence except for the initiating methionine. To confirm the interaction of ZNF74 with UBC9 or PIAS1, we used a semi-quantitative yeast two hybrid liquid assay measuring β -galactosidase expressed by a lacZ reporter gene in the yeast strain SFY526. As shown in Table 1, this assay revealed a significant interaction between ZNF74-I, our initial bait, and both UBC9 and PIAS1 when compared to the negative controls. UBC9 and PIAS1 interactions were found to be stronger with ZNF74-II, the long isoform with a functional repressive KRAB box, and comparable to the known robust interaction between p53 and SV40 Large T antigen. However, the KRAB box alone or the zinc finger domain alone were not sufficient for interaction with UBC9 and PIAS1 (not shown). Given that the SUMO E2 conjugating enzyme usually binds directly to its substrates (38), the

observed interactions of ZNF74 isoforms with UBC9 as well as with the SUMO E3 ligase, PIAS1, suggests that ZNF74 could be a sumoylation target.

ZNF74 is covalently modified by SUMO-1 *in vivo*

In order to determine if ZNF74 is a target for sumoylation, we tested whether it was covalently modified with SUMO-1 in 293T cells co-transfected with myc-tagged ZNF74-II and SUMO-1 fused to GFP. In the presence of both ZNF74-II and SUMO-1, a prominent novel protein species of higher molecular mass was detected in cell extracts with antibodies recognizing either myc-ZNF74-II or GFP-SUMO-1 (Fig 1A, lane 5). To confirm that this slower migrating band represents ZNF74 modified by SUMO-1, immunoprecipitations were performed using cells co-transfected with ZNF74 and SUMO-1 fused to HA- and myc-tag, respectively. The presence of a new protein species was also detected in immunoprecipitates from cells co-expressing ZNF74-II and SUMO-1, both with antibodies against ZNF74 (Fig 1B, lanes 3-4 and Fig 1C lane 2) and myc-tagged SUMO-1 (Fig 1C, lane 3). Taken together, these results indicate that the slower migrating bands formed in the presence of either GFP-SUMO-1 (Fig 1A) or myc-SUMO-1 (Fig 1B) correspond to ZNF74 covalently modified by SUMO. As for most known sumoylation targets (15), only a small proportion of ZNF74-II is sumoylated. Although the SUMO E2 conjugating enzyme UBC9 and PIAS1 SUMO E3 ligase were found to interact with ZNF74 in our yeast-two hybrid screen, their overexpression did not increase the ratio of SUMO-1 modified over unmodified forms of ZNF74-II (Fig 1A, lanes 5-6 and Fig 1B lanes 3-4). Considering that UBC9 is the only known E2 SUMO conjugating enzyme, this suggests that UBC9 is not limiting in 293T cells. Furthermore, taking into account that several E3 ligase enzymes, including other members of the PIAS family, are known to function as SUMO E3 ligases, this suggests that

either PIAS1 or other E3 enzymes are not limiting in the cells used or that PIAS1 is not a specific E3 ligase for SUMO-1 conjugation to ZNF74.

K130 is the major ZNF74 site modified by SUMO-1 *in vivo*

Analysis of the primary sequence of ZNF74 amino acid sequence revealed only one region that strictly conforms to the known sumoylation consensus ψ KXE/D (ψ is a large hydrophobic residue and X any amino acid). Indeed, K557 was found in the tetrapeptide sequence FKCE. Furthermore, K130 was also suspected to be a potential target for SUMO conjugation although its KXE sequence was not preceded by a residue typically classified as hydrophobic (sequence CKEE); the SH group of cysteine is however considered as isosteric to a hydrophobic methyl group. To test whether these residues were indeed SUMO acceptor sites, single and double point mutations were introduced in HA-ZNF74-II by replacing lysine residues with arginine residues (K130R, K557R). As shown in Fig 2, in contrast to the results obtained with the wild type ZNF74-II (lanes 3 and 4), no higher molecular weight protein species was detected in immunoprecipitates from extracts expressing ZNF74-K130R/K557R double mutant (lane 5). Furthermore, the mutation K130R was found to be sufficient to completely abolish the appearance of ZNF74 SUMO conjugates (lane 6). Even at longer exposure of the immunoblots, conjugates were not detected. This suggests that K130 rather than K557 is the major target for ZNF74 sumoylation. Noticeably, whereas a protein species cross-reacting with anti-ZNF74 antibodies and migrating above ZNF74-II at about 100-105 KDa (identified by a star) was observed in cells expressing wild type ZNF74-II, no band was seen in those expressing the single or double mutants. This protein band most likely corresponds to ZNF74-II conjugated to

endogenous SUMO. Indeed, the intensity of its signal was also reduced in cells overexpressing GFP-SUMO-1 (Fig 2, lane 3 and 4; Fig 1A, lane 5) compared to cells only transfected with ZNF74 (Fig 2, lane 2 and Fig 1A, lane 4). Consistently, the signal was also reduced in cells overexpressing SENP-1, a desumoylating isopeptidase whereas it was increased in cells overexpressing a dominant negative mutant of SENP-1 (26) (SENP-1C603S obtained from Dr Bailey) (Xavier Mascle, unpublished data).

Both isoforms of ZNF74 are sumoylated *in vivo* and *in vitro*.

Similarly to ZNF74-II, the non repressive isoform ZNF74-I (Fig. 4A) was found to be sumoylated *in vivo* (Fig. 4B) but as consistently found in several other experiments, the sumoylation was always less efficient than for ZNF74-II. To directly demonstrate that both isoforms are substrates for SUMO modification, *in vitro* sumoylation assays were conducted with purified enzymes in the presence of *in vitro* translated ZNF74-I or ZNF74-II. Both ZNF74 isoforms were converted to a large extent to more slowly migrating species (Fig. 4C). This conversion was found to require the presence of at least the following purified proteins: E1 enzymes, UBC9 E2 conjugating enzyme and SUMO-1. Two modified forms of ZNF74-II were observed suggesting that two different lysines are targets for sumoylation *in vitro*. In contrast, no SUMO-modified species were detected with the *in vitro* translated ZNF74 double mutant K130R/K557R (Fig. 4C). Furthermore, mutation of K130 in ZNF74-II was found sufficient in order to completely abolish the appearance of both SUMO-modified forms. Thus, as previously found *in vivo*, K130 was confirmed as the major ZNF74 SUMO-modified residue *in vitro*. The basis of the existence of a second ZNF74-II modified form remains unexplained unless one assumes that SUMO-1 could be a substrate for poly-sumoylation in the *in vitro* assay as previously reported by others (17) or that an initial sumoylation event at K130 is required for

subsequent modification of other lysine residues within ZNF74 as shown for c-myb (27). No change in the sumoylation pattern was observed with K557R mutant in comparison to wild type ZNF74-II suggesting that K557, located in the zinc finger domain, is not a primary target sequence for sumoylation.

DISCUSSION

In this study, we identified ZNF74, a member of the large KRAB multifinger family, as a novel sumoylation target. We provided evidence for ZNF74 sumoylation *in vivo* and *in vitro*. SUMO modification is associated with the direct interaction of ZNF74 with UBC9 E2 conjugating enzyme and occurs at a single lysine residue located between the N-terminal KRAB repressive domain and the C-terminal multifinger domain. Noticeably the repressive isoform of ZNF74, ZNF74-II interacts more strongly with UBC9 and is more efficiently sumoylated than the non repressive isoform, ZNF74-I.

Our identification of UBC9 as a protein partner for ZNF74 provides an additional example of a sumoylated protein that interacts with UBC9 E2-conjugating enzymes (28). The direct interaction of UBC9 with several SUMO target proteins and the fact that several SUMO substrates can be sumoylated *in vitro* without any E3 ligase led to the suggestion that an E3 ligase may be dispensable for sumoylation of targets *in vivo* (19;20). This would be contrary to ubiquitination which requires in most cases E3 ubiquitin ligases to recruit E2 conjugating enzymes to the substrate proteins (29). However, RanBP2, Pc2 and members of the PIAS family were shown to significantly enhance sumoylation of various mammalian SUMO target proteins and to function as SUMO-E3 ligases (17) (18;19). Yet, PIAS1 was identified in this study as a protein interacting with ZNF74 in a yeast-two hybrid system but did not increase ZNF74 sumoylation when overexpressed in 293T. In several cases, more than one PIAS family member was shown to favour the sumoylation of particular target proteins and in some cases the enhancement of sumoylation was more easily evidenced *in vitro*. It thus remains to determine if PIAS1 and possibly other family member increase ZNF74 sumoylation *in vitro* and *in vivo*.

Among the three mammalian SUMO, SUMO-1 was the main focus of most studies. In a few studies, it was shown that SUMO-1 target proteins could also be sumoylated by SUMO-2 and -3 at least in conditions of overexpression of these SUMO proteins (30-33). Interestingly, an enhancement of GATA-2 transcription factor sumoylation by PIASy was observed in the presence of overexpressed SUMO-2 but not SUMO-1 (30). The possibility that PIAS1 enhances SUMO-2 or -3 rather than SUMO-1 modification of ZNF74 remains to be tested.

ZNF74 exerts its repressive activity through its interaction with the co-repressor KAP-1 (7-9;34;35). We have evidence that KAP-1 is also a substrate for sumoylation (data not shown). Furthermore, since KAP-1 encodes a RING finger motif like PIAS family members and a subclass of ubiquitin E3 ligases, we tested the hypothesis that KAP-1 could function as an E3 ligase for ZNF74. This was however not substantiated since no increase in ZNF74 sumoylation by endogenous SUMO or by overexpressed SUMO-1 was observed in cell overexpressing KAP-1 (not shown). In this study, the repressive isoform of ZNF74, ZNF74-II, appeared as a better target for sumoylation than its shorter isoform that contains a non repressive KRAB domain. It will be interesting to determine if the sumoylation of ZNF74-II modulates its repressive activity. There is presently no clear molecular basis for the mechanism by which SUMO addition regulates transcriptional activity. Strikingly, the possibility that SUMO itself has a negative effect on transcription was suggested by the fact that fusion of GAL4 DNA binding domain to a single SUMO can repress transcription in reporter gene assays (36). Such an effect was also found with GAL DNA binding domain fused to UBC9 although it is not presently known if this is dependent on UBC9 ability to bind SUMO and SUMO substrates (37). Furthermore, SUMO modification has been shown to i) modify the affinity of sumoylated proteins for modulators of transcription, ii) alter the DNA binding properties of transcription factors, iii) change subcellular

targeting and iv) antagonize ubiquitination by competing for a same lysine residue (15). It would be important to determine if the subcellular localization of ZNF74 and its nucleic acid binding properties are affected by its sumoylation.

Despite the fact that K557 lies within a postulated SUMO-modification consensus site, it is not modified by SUMO. Noticeably, this consensus target sequence was not evolutionarily conserved in other mammals such as dog and cow. In contrast, K130 was efficiently sumoylated both *in vivo* and *in vitro* even if it is found in a sequence slightly different (CKEE) from the ψ KXE consensus, ψ being classically a large hydrophobic residue (V, L, I, P) (Fig. 3). According to crystallographic analysis, the four amino acids of the ψ KXE consensus are contacted by Ubc9 surfaces including Ubc9 catalytic cystein linked to SUMO as illustrated in the complex Ubc9/RanBP2 sumoylation target (38). Obviously, the presence of a cystein rather than a large hydrophobic residue preceding K130 in ZNF74 does not impair adequate interactions with UBC9 for proper positioning of UBC9 catalytic cystein and the subsequent transfer of SUMO from UBC9 to ZNF74 K130.

In conclusion, ZNF74 being the first member of the large family of KRAB multifinger proteins found to be sumoylated, it will be important to investigate the role of the sumoylation on its transcriptional properties and possibly on the repression mediated by other members of this family.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs. F.M Boisvert and Dr D. Bailey for generously providing myc-SUMO-1 and SENP1 vectors, respectively. This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research, Heart and Stroke foundation of Canada and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (to M.A.). M.A. is supported by a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

1. Aubry, M., Demczuk, S., Desmaze, C., Aikem, M., Aurias, A., Julien, J. P., and Rouleau, G. A. (1993) *Hum.Mol.Genet.* **2**, 1583-1587
2. Ravassard, P., Côté, F., Grondin, B., Bazinet, M., Mallet, J., and Aubry, M. (1999) *Genomics* **62**, 82-85
3. Looman, C., Abrink, M., Mark, C., and Hellman, L. (2002) *Mol.Biol.Evol.* **19**, 2118-2130
4. Shannon, M., Hamilton, A. T., Gordon, L., Branscomb, E., and Stubbs, L. (2003) *Genome Res.* **13**, 1097-1110
5. Cote, F., Boisvert, F. M., Grondin, B., Bazinet, M., Goodyer, C. G., Bazett-Jones, D. P., and Aubry, M. (2001) *DNA Cell Biol.* **20**, 159-173
6. Grondin, B., Côté, F., Bazinet, M., Vincent, M., and Aubry, M. (1997) *J.Biol.Chem.* **272**, 27877-27885
7. Germain-Desprez, D., Bazinet, M., Bouvier, M., and Aubry, M. (2003) *J.Biol.Chem.* **278**, 22367-22373
8. Schultz, D. C., Friedman, J. R., and Rauscher, F. J., III (2001) *Genes Dev.* **15**, 428-443
9. Schultz, D. C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G. G., and Rauscher, F. J., III (2002) *Genes Dev.* **16**, 919-932
10. Peng, H., Begg, G. E., Harper, S. L., Friedman, J. R., Speicher, D. W., and Rauscher, F. J., III (2000) *J.Biol.Chem.* **275**, 18000-18010
11. Yang, S. H., Jaffray, E., Senthinathan, B., Hay, R. T., and Sharrocks, A. D. (2003) *Cell Cycle* **2**, 528-530
12. Verger, A., Perdomo, J., and Crossley, M. (2003) *EMBO Rep.* **4**, 137-142
13. Gill, G. (2003) *Curr.Opin.Genet.Dev.* **13**, 108-113
14. Kim, K. I., Baek, S. H., and Chung, C. H. (2002) *J.Cell Physiol* **191**, 257-268
15. Seeler, J. S. and Dejean, A. (2003) *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **4**, 690-699
16. Nathan, D., Sterner, D. E., and Berger, S. L. (2003) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 13118-13120
17. Pichler, A., Gast, A., Seeler, J. S., Dejean, A., and Melchior, F. (2002) *Cell* **108**, 109-120
18. Kagey, M. H., Melhuish, T. A., and Wotton, D. (2003) *Cell* **113**, 127-137
19. Schmidt, D. and Muller, S. (2003) *Cell Mol.Life Sci.* **60**, 2561-2574

20. Schwartz, D. C. and Hochstrasser, M. (2003) *Trends Biochem.Sci.* **28**, 321-328
21. Melchior, F., Schergaut, M., and Pichler, A. (2003) *Trends Biochem.Sci.* **28**, 612-618
22. Grondin, B., Bazinet, M., and Aubry, M. (1996) *J.Biol.Chem.* **271**, 15458-15467
23. Tanaka, M. and Herr, W. (1990) *Cell* **60**, 375-386
24. Niman, H. L., Houghten, R. A., Walker, L. E., Reisfeld, R. A., Wilson, I. A., Hogle, J. M., and Lerner, R. A. (1983) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **80**, 4949-4953
25. Tanaka, K., Tsumaki, N., Kozak, C. A., Matsumoto, Y., Nakatani, F., Iwamoto, Y., and Yamada, Y. (2002) *Mol.Cell Biol.* **22**, 4256-4267
26. Bailey, D. and O'Hare, P. (2003) *J.Biol.Chem.*
27. Bies, J., Markus, J., and Wolff, L. (2002) *J.Biol.Chem.* **277**, 8999-9009
28. Lamond, A. I. and Carmo-Fonseca, M. (1993) *Trends Cell Biol.* **3**, 198-204
29. Theunissen, O., Rudt, F., Guddat, U., Mentzel, H., and Pieler, T. (1992) *Cell* **71**, 679-690
30. Chun, T. H., Itoh, H., Subramanian, L., Iniguez-Lluhi, J. A., and Nakao, K. (2003) *Circ.Res.* **92**, 1201-1208
31. Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thain, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N. D., and Hay, R. T. (2003) *Mol.Cell* **11**, 1043-1054
32. Holmstrom, S., Van Antwerp, M. E., and Iniguez-Lluhi, J. A. (2003) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 15758-15763
33. Azuma, Y., Arnautov, A., and Dasso, M. (2003) *J.Cell Biol.* **163**, 477-487
34. Friedman, J. R., Fredericks, W. J., Jensen, D. E., Speicher, D. W., Huang, X. P., Neilson, E. G., and Rauscher III, F. J. (1996) *Genes Dev.* **10**, 2067-2978
35. Lechner, M. S., Begg, G. E., Speicher, D. W., and Rauscher, F. J., III (2000) *Mol.Cell Biol.* **20**, 6449-6465
36. Ross, S., Best, J. L., Zon, L. I., and Gill, G. (2002) *Mol.Cell* **10**, 831-842
37. Shio, Y. and Eisenman, R. N. (2003) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*
38. Bernier-Villamor, V., Sampson, D. A., Matunis, M. J., and Lima, C. D. (2002) *Cell* **108**, 345-356

**Table 1. Interaction of ZNF74 isoforms with UBC9 and PIAS1 in yeast two-hybrid assays:
Quantification assay of β -galactosidase activity from the lacZ reporter gene**

Insert in pGBT9 GAL4-DBD vector ^a	Insert in pACT2 GAL4-AD vector ^a	Relative activity	β -gal No. of independent experiments
P53 (Ctrl +) ^b	Large T antigen ^b	100	4
ZNF74-I	UBC9	5,8	2
ZNF74-I	PIAS1	25,6	2
ZNF74-I	-	0,1	4
ZNF74-II	UBC9	59,3	3
ZNF74-II	PIAS1	59,6	2
ZNF74-II	-	1,8	4
-	UBC9	0,9	3
-	PIAS1	1,7	2
Lamin C (Ctrl -) ^c	Large T antigen ^c	0,3	2

^a *SFY526 yeasts were co-transformed with plasmids expressing GAL4 DNA binding domain (GAL4-DBD) either alone (-) or in fusion the indicated sequences and GAL4 activating domain (GAL4-AD) alone (-) or as a fusion.*

^b *β -gal activity obtained with co-transformants encoding two strongly interacting proteins, p53 and large T antigen, was used as a 100 % standard (Ctrl+).*

^c *Lamin C and large T antigen co-transformants were used as negative control (Ctrl -).*

The mean of independent experiments performed on three independent colonies is shown.

FIGURE 1

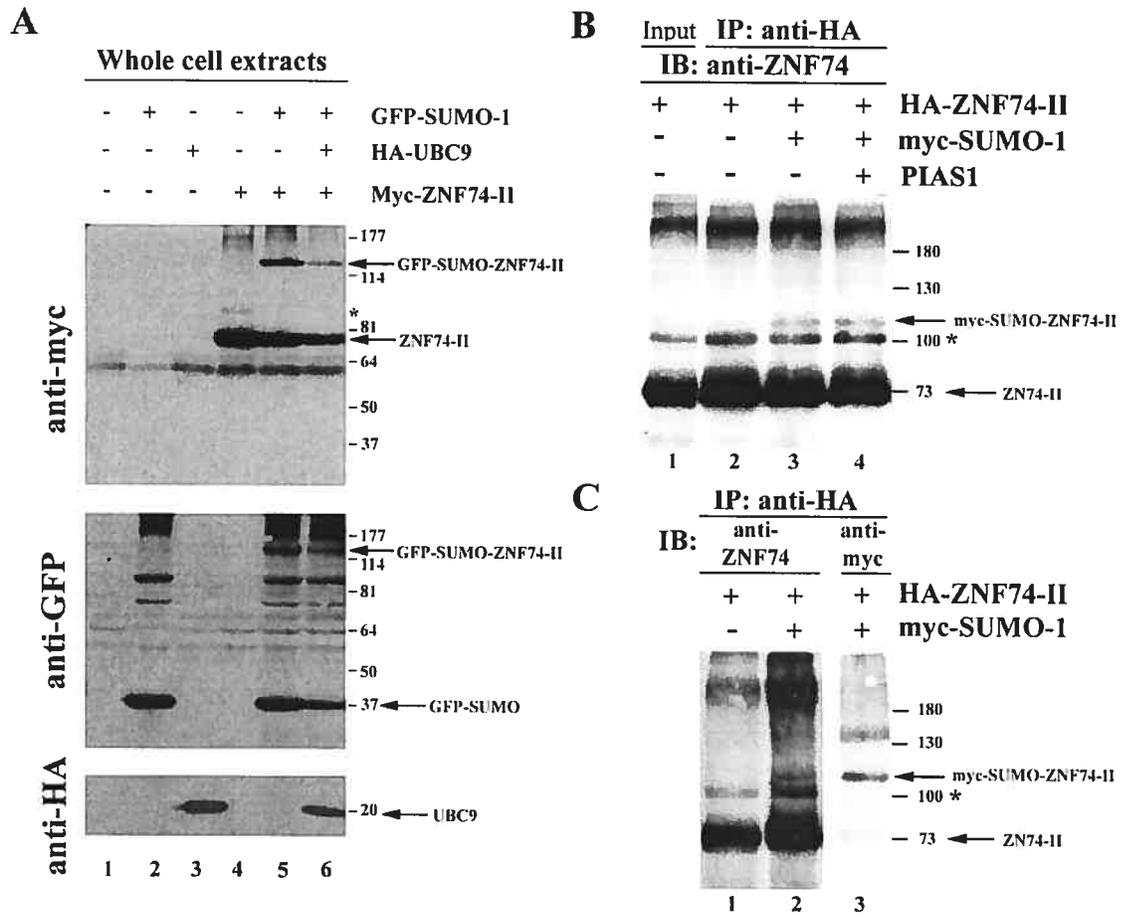


Figure 1- ZNF74 is sumoylated *in vivo*. (A) Detection of ZNF74-II modification by GFP-SUMO-1 in whole cell extracts. 293T cells were transfected with myc epitope-tagged ZNF74-II (4 μ g) in the presence or absence of GFP-SUMO-1 (2 μ g) and HA-Ubc9 (2 μ g). Five percent of cell extracts from confluent 60-mm petri dishes were immunoblotted with the indicated antibodies. B) Detection of ZNF74-II modification by myc-SUMO-1 after immunoprecipitation. 293T cells were transfected with HA-ZNF74-II (3 μ g), myc-SUMO-1 (2 μ g) and/or PIAS1 (1 μ g). Immunoprecipitates from extracts corresponding to twenty five percent of confluent 60-mm petri dishes were used for immunoblotting.

Extracts of (B) and (C) but not (A) were prepared in the presence of N-ethylmaleimide (NEM), a cysteine alkylating agent, to inhibit SUMO-deconjugating enzymes. Each membrane was hybridized with a single antibody. ZNF74-II potentially modified by the endogenous SUMO proteins is identified by a star. The calibrated molecular mass of prestained marker proteins (Fermentas) is indicated in kDa.

FIGURE 2

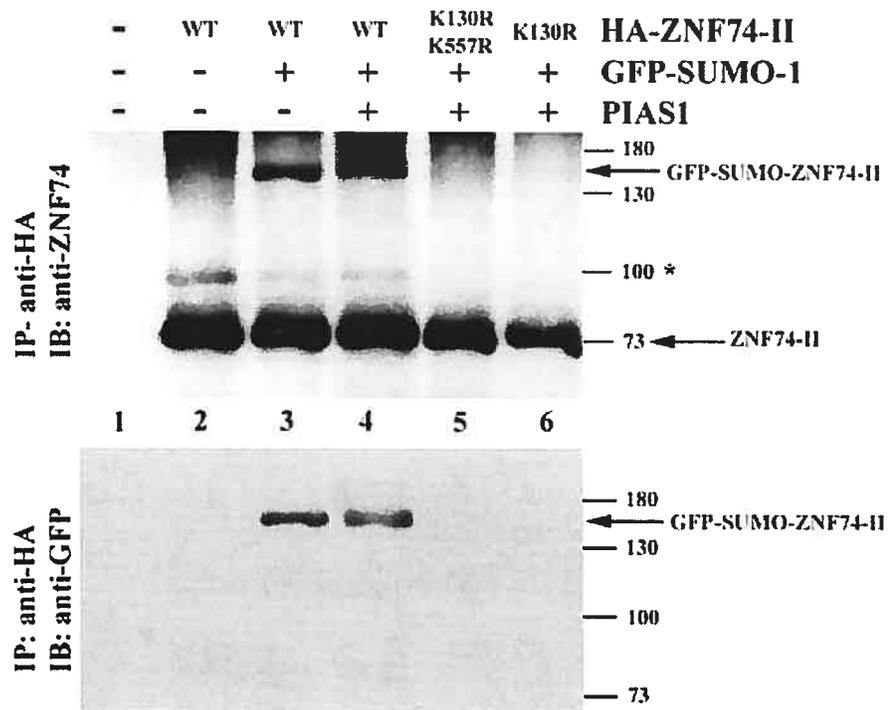


Figure 2. Lysine 130 is the major ZNF74 sumoylation site *in vivo*. 293T cells were transfected with HA epitope-tagged wild type (WT) or K→R mutants of ZNF74-II (3 μg) in the presence or absence of GFP-SUMO-1 (2 μg) and HA-PIAS1 (1 μg). In each lane, anti-HA immunoprecipitates (IP) corresponding to 10 % of a confluent 60-mm Petri dish were loaded for separation in SDS-polyacrylamide gel. Western blots (IB) were performed on two different membranes using the indicated antibodies. Arrows mark the position of the immunoprecipitated unmodified ZNF74 and GFP-SUMO-1-conjugated species. On the top panel, ZNF74-II (lanes 2-4), potentially modified by the endogenous SUMO proteins, is identified by a star. Numbers on right are molecular masses in kDa.

FIGURE 3

SUMO-MODIFIED SEQUENCES

Consensus: ψ KXE/D ($\psi = \text{V/L/I/F}$)

ZNF74-II (K130)	QQGIC <u>K</u> EEPAQ
HSF1 (K298)	PLVRV <u>K</u> EEPPS
c-JUN (K229)	RLQAL <u>K</u> EEPQT
SP3 (K539)	ADIRI <u>K</u> EEEPD
P73 α (K627)	RKQPI <u>K</u> EEFTE
PR (K388)	PALKI <u>K</u> EEEEG
TEL (K99)	LLLLT <u>K</u> EDFRY

Atypical target sequences

PML (K65)	CQAE <u>A</u> K <u>C</u> P <u>K</u> LL
HIPK2 (K1182)	PLSPA <u>K</u> V <u>N</u> QYP
PCNA (K164)	VISCA <u>K</u> D <u>G</u> V <u>K</u> F
MDM2 (K446)	CQGRP <u>K</u> <u>N</u> G <u>C</u> IV

Figure 3. Comparison of the sumoylation motif of ZNF74 with those of other SUMO-modified proteins. The typical consensus sumoylation sequence is shown. Proteins with a sumoylation motif resembling that of ZNF74 are presented. For ZNF74 and TEL, the amino acid preceding the target lysine differs from the classis consensus sequence. Atypical target sequences are also shown. The target lysine is in bold and amino acids that differ from the consensus are underlined. The sumoylation of the target sequence shown has been confirmed by mutating the target lysine. The references for these target sequences are: Hong/J.Biol.Chem. 2001, Muller/J.Biol.Chem. 2000, Ross/Mol. Cell 2002, Minty/J.Biol.Chem 2000, Abdel-Hafiz/J.Biol.Chem., Chakrabarti/Proc. Nat. Acad. Sci. USA 2000, Kamitani /J. Biol. Chem. 1998, Kim/ Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, Hoege et al./Nature 2002, Buschmann/ Cell 2000.

FIGURE 4

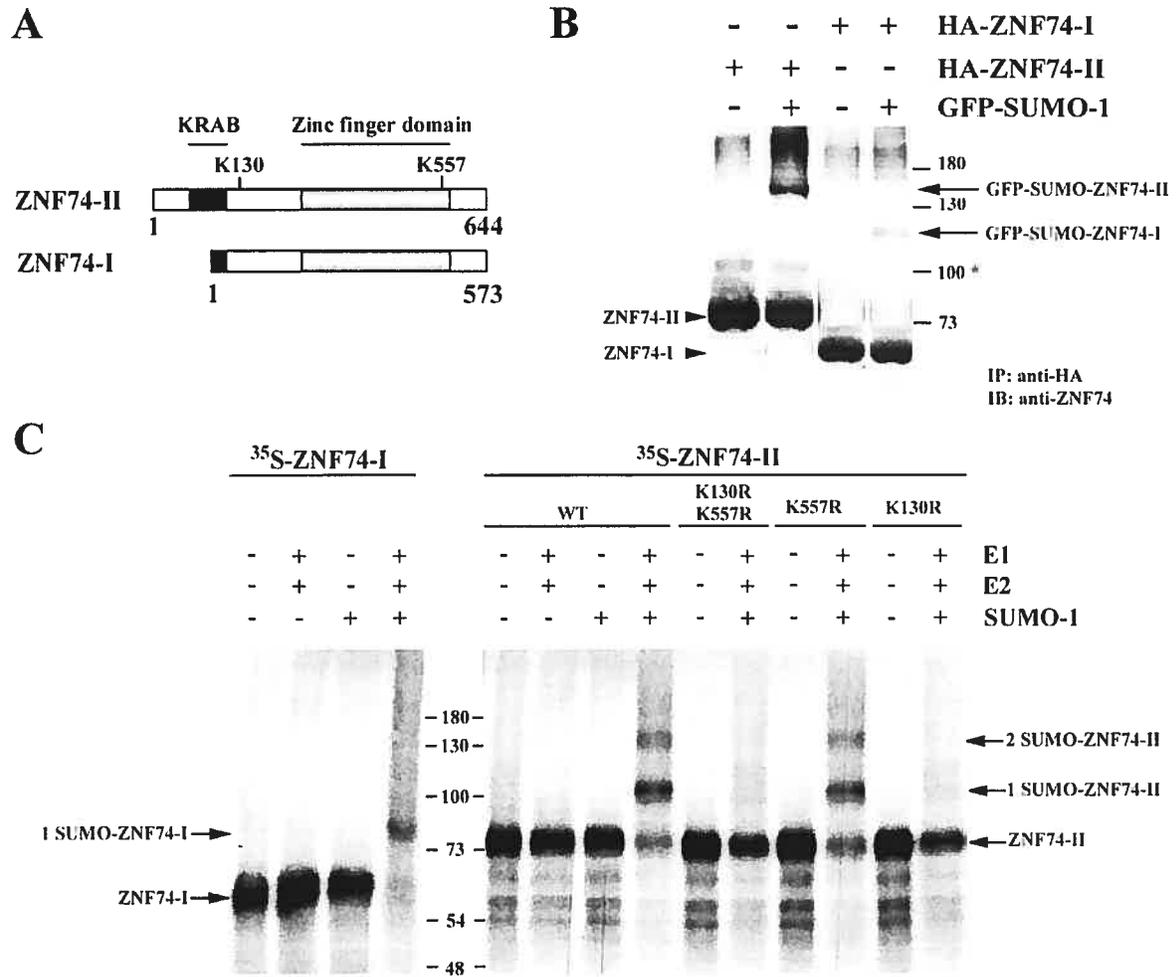


Figure 4. Both the repressive and non-repressive isoforms of ZNF74 are sumoylated *in vivo* and *in vitro*. **A)** Representation of ZNF74 isoforms, ZNF74-II and ZNF74-I. The first and last amino acids are numbered for each isoforms. The KRAB box and the zinc finger domains as well as the two lysines (K130 and K557) tested as targets for sumoylation are positioned. **B)** Sumoylation of ZNF74 isoforms *in vivo*. 293T cells were transfected with either HA-ZNF74-I or HA-ZNF74-II (3 μ g) in the presence or absence of GFP-SUMO-1 (2 μ g). In each lane, anti-HA immunoprecipitates (IP) corresponding to 15 % of a confluent 60-mm Petri dish were loaded. Arrowheads point to the unmodified ZNF74 isoforms and arrows to the GFP-SUMO-1 modified forms. ZNF74 isoforms, potentially modified by the endogenous SUMO proteins, are identified by stars. **C)** Sumoylation of ZNF74 isoforms *in vitro*. 35 S-labelled *in vitro* translated ZNF74-I and -II wild type and mutants were subjected to an *in vitro* sumoylation assay. Arrows point to the unmodified and SUMO-conjugated species.

Chapitre 3. DISCUSSION

Dans la présente étude, il a été démontré que ZNF74, un membre de la famille multidoigt de zinc à motif KRAB, est une protéine cible de la sumoylation. Les résultats obtenus ont mis en évidence la sumoylation de ZNF74 *in vivo* et *in vitro*. D'autre part, le résidu lysine accepteur de SUMO a été identifié et est localisé entre le domaine répressif KRAB et le domaine à multidoigt de zinc de ZNF74. Ce site majeur de sumoylation de ZNF74 diffère légèrement du site consensus $\Psi Kx E$ étant donné qu'une cystéine plutôt qu'un acide aminé hydrophobe précède la lysine cible. Il a aussi été mis en évidence que l'isoforme répressive, ZNF74-II, est un meilleur substrat pour la sumoylation que l'isoforme non répressive ZNF74-I.

3.1 Sumoylation de ZNF74

Quoiqu'il existe trois protéines SUMO retrouvées chez les mammifères, SUMO-1, -2 et -3, nos études de sumoylation de ZNF74 ont été réalisées en présence de SUMO-1 surexprimée *in vivo* dans des cellules ou sous forme purifiée dans des essais *in vitro*. En effet, SUMO-2 et SUMO-3 ont, à l'encontre de SUMO-1, une lysine faisant partie d'un site consensus de sumoylation susceptible de conduire à une polysumoylation. Etant donné que la polysumoylation peut conduire à des résultats d'analyse plus complexe, la majorité des études publiées ont été réalisées avec SUMO-1 et il existe peu d'études qui se sont penchées sur la sumoylation de protéines cibles par SUMO-2 ou -3. Pour mettre clairement en évidence la sumoylation par SUMO-1, il est important de le surexprimer dans les cellules car il existe essentiellement sous forme couplée aux protéines cibles et est donc disponible en quantité limitante, contrairement à SUMO-2 et -3 (Saitoh and Hinchev, 2000); ces derniers sont en effet plus abondants et existent aussi

sous forme libre. Une surexpression de SUMO-1 facilite aussi les études compte tenu du fait que la sumoylation est un processus dynamique et réversible et que seule une sous-population de chaque protéine cible est détectable dans sa forme sumoylée (généralement moins de 20 %).

La protéine ZNF74 sumoylée générée par co-expression de ZNF74-II avec soit GFP-SUMO-1 soit myc-SUMO-1 a une taille apparente sur gel d'acrylamide de 155 kDa et 125 kDa, respectivement (voir Figure 1B et Figure 2, *section résultats*). Cette taille apparente correspond à 40-45 kDa de plus que la taille attendue en tenant compte des poids moléculaires de ZNF74-II (74 kDa incluant l'épitope HA), de GFP-SUMO-1 (37 kDa) et de myc-SUMO-1 (12 kDa). De façon similaire, le poids moléculaire apparent de l'isoforme ZNF74-I (65 kDa) sumoylée est supérieure de 26 kDa à son poids moléculaire calculé (138 kDa avec GFP-SUMO1). Ces résultats ne sont pas surprenants car plusieurs études ont démontré que la modification de protéines cibles par SUMO induit une migration aberrante des protéines vers des poids moléculaires apparents plus élevés (Chauchereau et al., 2003). D'autre part, il semble que la position de la lysine acceptrice de SUMO dans la séquence de la protéine cible a un effet sur le poids moléculaire apparent des protéines sumoylées (Dobrev et al., 2003) en affectant la migration sur gel présumément par un effet d'encombrement stérique différentiel.

3.1.1 Sumoylation *in vivo* de ZNF74-II par SUMO endogène

Outre une protéine majeure d'environ 74 kDa correspondant à la forme non modifiée de ZNF74-II, des anticorps dirigés contre ZNF74 révèlent une bande de 100-105 kDa dans des cellules de mammifères transfectées avec ZNF74-II autant en absence qu' en présence de formes exogènes de SUMO. Cette protéine de 100-105 kDa correspond à ZNF74 sumoylée par une forme endogène de SUMO. Plusieurs

expériences concourent à supporter cette hypothèse. L'intensité relative de cette bande varie en fonction des conditions de l'expérience. Notamment, la surexpression de protéine de fusion incluant SUMO-1 (Figure 2, *Section Résultats*) ou de SENP-1, une protéase clivant spécifiquement SUMO, entraîne une diminution de la quantité relative de la protéine de 100-105 kDa par rapport à celle de 73 kDa tandis que la surexpression d'un mutant dominant négatif de SENP1 conduit de façon inverse à une augmentation de la quantité relative de la protéine de 100-105 kDa (Xavier Mascle, résultats non publiés). De plus, le fait que la protéine de 100-105 kDa ne soit plus détectable lorsque le site de sumoylation majeur (K130) de ZNF74 est muté suggère fortement que cette protéine correspond à une forme sumoylée de ZNF74. Enfin, quoique la protéine de 100-105 kDa ne soit pas détectable par un anticorps anti-SUMO-1 après immunoprécipitation de ZNF74, elle est révélée par un anticorps anti-SUMO-2 et -3 (Xavier Mascle, résultats non publiés) (il n'existe pas d'anticorps reconnaissant uniquement SUMO-2 ou SUMO-3 chez les mammifères). Il est à noter qu'une deuxième protéine de poids moléculaire de 140-145 kDa immunoprécipitée avec l'anticorps anti-ZNF74 est aussi détecté par l'anti-SUMO-2/3 suggérant une polysumoylation (Xavier Mascle, résultats non publiés). Il n'est pas exclu que la sumoylation par SUMO-1 endogène soit plus difficile à détecter compte tenu du niveau plus faible d'expression de SUMO-1 et du fait qu'il existe essentiellement sous forme couplée aux protéines contrairement à SUMO-2 et -3. Actuellement, on ne sait pas si SUMO-1 a un rôle différent de SUMO-2 et -3 et si certaines protéines peuvent être de meilleurs substrats pour un SUMO particulier *in vivo*. Il a toute fois été rapporté que RanGAP semble préférentiellement être modifié par SUMO-1 (Saitoh and Hinchey, 2000). À l'heure actuelle, la majorité des expériences de

sumoylation publiées ont été réalisées dans des conditions de surexpression et très peu font référence à la sumoylation endogène des protéines (Kagey et al., 2003).

3.1.2. Sumoylation différentielle des deux isoformes de ZNF74

En présence d'une surexpression de SUMO, le pourcentage de la forme sumoylée de ZNF74-II en comparaison avec la forme non sumoylée est toujours supérieur au pourcentage des formes sumoylées vs non-sumoylées de ZNF74-I. Ceci suggère que ZNF74-II, l'isoforme répressive de ZNF74 est un meilleur substrat pour la sumoylation que ZNF74-I, l'isoforme non répressive. En accord avec ce résultat, alors que la sumoylation par SUMO endogène est détectable pour ZNF74-II, aucune sumoylation de ZNF74-I par SUMO endogène n'a pu être observée. Ces résultats sont aussi consistants avec le fait que ZNF74-II interagit plus fortement avec Ubc9, l'enzyme de conjugaison, que ZNF74-I. On ne sait pas à l'heure actuelle si cette sumoylation différentielle a des conséquences fonctionnelles. Compte tenu du fait que la sumoylation a été principalement associée à la répression transcriptionnelle (Holmstrom et al., 2003), il est possible de spéculer que la sumoylation de la forme répressive de ZNF74 (ZNF74-II) pourrait réguler positivement son activité répressive. Actuellement, on ne connaît pas le rôle de la forme non-répressive de ZNF74 (ZNF74-I). Il a été suggéré que ZNF74-I pourrait avoir un rôle dans la maturation de l'ARN compte tenu de sa localisation préférentielle au niveau de domaines enrichis en facteurs d'épissage ('speckles') tel le facteur SC35 (Cote et al., 2001; Grondin et al., 1997). Compte tenu du fait que ZNF74-II a une localisation plus diffuse et distincte des 'speckles', il sera important de déterminer si la sumoylation peut avoir un rôle dans la localisation différentielle de ces deux protéines (Cote et al., 2001).

3.1.3 Sumoylation de ZNF74 *in vitro*

Afin de confirmer la sumoylation de ZNF74 et de déterminer les pré-requis de cette réaction catalysée enzymatiquement, des études de sumoylation *in vitro* ont été réalisées. Nos résultats indiquent que la présence des enzymes de type E1 et E2 (Ubc9) dans un milieu contenant de l'ATP et du SUMO-1 est suffisante pour permettre la sumoylation des deux isoformes de ZNF74, ZNF74-I et ZNF74-II. Dans le cas de ZNF74-II, l'isoforme répressive, deux bandes de poids moléculaire apparent de 105 kDa et 140 kDa sont générées par l'ajout de SUMO-1 dans l'essai *in vitro*. Ceci suggère qu'il s'agit de formes de ZNF74 contenant un et deux SUMO, respectivement. La protéine sumoylée de 105 kDa détectée *in vitro* a le même poids moléculaire que celle sumoylée *in vivo* par SUMO endogène. De façon surprenante, la mutation de la lysine K130 est suffisante pour abolir l'apparition des deux formes sumoylées *in vitro*. Deux explications possibles peuvent être proposées soit: 1) une polysumoylation peut survenir sur la lysine K130 *in vitro* tel que déjà observé *in vitro* avec SUMO-1 (Pichler et al., 2002) compte tenu du rapport molaire plus élevé entre d'une part SUMO-1 et les protéines purifiées catalysant la réaction et d'autre part la protéine cible à sumoyler ou 2) la sumoylation sur la lysine K130 est requise et favorise la sumoylation subséquente d'une deuxième lysine plus cryptique. L'isoforme non-répressive, ZNF74-I est aussi sumoylable *in vitro* tel que suggéré par la mise en évidence d'une protéine sumoylée principale de poids moléculaire apparent de 88 kDa. En accord avec les résultats obtenus *in vivo*, la sumoylation de ZNF74-I *in vitro* semble cependant être moins efficace que celle de ZNF74-II tel que suggéré par la présence d'une traînée de protéines de poids moléculaires plus élevés que celui de ZNF74 qui correspondent possiblement à des

protéines sumoylées de façon non-spécifique sur de multiples résidus (Figure 4C, *Section Résultats*).

3.1.4 Séquence (s) cible (s) pour la sumoylation de ZNF74

Nos études de sumoylation *in vivo* et *in vitro* confirme que le site majeur de sumoylation au niveau de ZNF74 se situe entre les deux domaines fonctionnels de ZNF74 soit le domaine KRAB et le domaine multidoigt de zinc. Ce site de sumoylation CK₁₃₀EE dérive du consensus classique de sumoylation ψ KXE où ψ représente un acide aminé hydrophobe. Quoique que la cystéine qui précède la lysine cible ne puisse pas être considérée comme un acide aminé hydrophobique, en assimilant un groupement SH à un groupement méthyl, des résidus cystéines peuvent stéréochimiquement être considérés comme isostériques à des résidus isoleucines . Quoiqu'on ne puisse exclure que le site de sumoylation de ZNF74 constitue une particularité de cette protéine, notre étude peut amener à considérer d'inclure une cystéine dans le consensus typique de sumoylation utilisé lors de la recherche de sites possibles de sumoylation dans la séquence primaire de protéines. Ce consensus élargit pourrait se détailler comme suit : I/V/L/F/CKXE.

3.1.5 Effet de E3 ligases de la famille de PIAS sur la sumoylation de ZNF74

Les E3 ligases connues (Pichler et al., 2002) tel que RanBP2, Pc2 ou les membres de la famille PIAS, permettent une augmentation significative de la sumoylation de plusieurs protéines chez les mammifères (Kagey et al., 2003; Schmidt and Muller, 2003; Schmidt and Muller, 2002).

Dans cette étude, PIAS1 a été identifiée comme partenaire protéique de ZNF74 par la méthode de double hybride chez la levure. Malgré la démonstration d'une interaction de ZNF74 avec PIAS1, nos expériences n'ont pas révélé d'augmentation de la sumoylation de ZNF74 en présence d'une surexpression de cette E3 ligase. Ceci suggère que soit PIAS1 n'est pas une E3 ligase envers ZNF74, soit PIAS1 n'est pas localisé dans les domaines enrichis en ZNF74 et ne peut donc catalyser la réaction de sumoylation de ZNF74, soit PIAS1 n'est pas en quantité limitante dans les cellules utilisées. Des études récentes d'immunofluorescence indiquent que PIAS-1 co-localise partiellement avec ZNF74-II (Xavier Mascle, résultats non publiés). Par contre, un autre membre de la famille des PIAS, PIASy co-localise très strictement avec ZNF74-II (Xavier Mascle). De façon intéressante, PIASy (Sachdev et al., 2001), qui comme ZNF74 (Grondin et al., 1996) est associé à la matrice nucléaire, augmente la sumoylation de ZNF74 par SUMO endogène et par des formes surexprimées de SUMO-1 (Xavier Mascle). Ceci suggère que PIASy est une E3 ligase pour ZNF74. Il est à noter que dans des conditions de surexpression de SUMO-1 ou SUMO-2, PIASy semble augmenter plus significativement la sumoylation par SUMO-2 des facteurs de transcription GATA-2 (Chun et al., 2003) et LEF-1 (Sachdev et al., 2001). Il n'y a pas d'explication actuellement pour cette régulation préférentielle de la sumoylation de ces deux protéines par SUMO-2 en présence de PIASy. On ne sait pas non plus si PIASy favorise préférentiellement la sumoylation de ZNF74 par SUMO-1 ou SUMO-2 ou -3. Des études de sumoylation *in vitro* devraient permettre de déterminer la fonction régulatrice de PIAS1 et PIASy dans la sumoylation de ZNF74 et de déterminer si ces E3 ligase favorisent plutôt la sumoylation par SUMO-1, 2 ou 3.

3.2 Conclusion et perspective

La sumoylation des protéines représente un mécanisme de régulation des protéines découvert relativement récemment. La nature des protéines modifiées identifiées jusqu'à lors a suggéré un rôle de la sumoylation dans l'organisation de la chromatine et l'expression génique (Melchior, 2000; Melchior et al., 2003; Verger et al., 2003). Dans ce mémoire, ZNF74, un prototype de la famille des protéines KRAB multidoigt de zinc a été identifié comme un nouveau substrat pour la sumoylation. Il s'agit du premier membre de la large famille des protéines KRAB multidoigt de zinc pour lequel on démontre une modification post-traductionnelle covalente par SUMO.

Des études à venir devront déterminer quel est le rôle de la sumoylation sur les propriétés de ZNF74-II comme notamment sa localisation cellulaire, ses interactions protéine-protéine et son activité de répresseur de la transcription. Dans ce but, des études sont en cours au laboratoire pour déterminer si la sumoylation affecte la localisation subcellulaire des deux isoformes de ZNF74. Pour ce faire, une comparaison de la localisation subcellulaire de la forme sauvage des isoformes de ZNF74 et de la forme mutante de ces protéines (K130R) a été entreprise. Pour augmenter le niveau de sumoylation de ZNF74, ces études sont aussi faites dans des conditions où SUMO-1 est surexprimé ou en présence d'un mutant dominant négatif de la peptidase SENP1. D'autre part, sachant que l'activité répressive de ZNF74 dépend de son interaction avec le co-répresseur KAP-1 (Germain-Desprez et al., 2003), l'influence de la sumoylation sur l'interaction avec le co-répresseur KAP-1 sera déterminée. Ainsi, il est prévu d'effectuer des études quantitatives d'interaction *in vivo* par BRET et des études d'affinité *in vitro* tel que réalisées par Muller et Dejean (Muller and Dejean, 1999) en utilisant ici ZNF74 sumoylé *in vitro*. Il est à noter que KAP-1 est aussi un substrat pour

la sumoylation tel que démontré récemment (Zhao et al., 2004). Le rôle de la sumoylation individuelle ou simultanée de ces deux protéines sera investigué. Afin de déterminer si la sumoylation de ZNF74 et/ou de KAP-1 affecte l'activité transcriptionnelle de ZNF74, des études de gène rapporteur seront entreprises comme décrit précédemment (Côte et al., 2001). Étant donné que les sites de liaison spécifique à l'ADN de ZNF74 ne sont pas connus, on utilisera une protéine de fusion couplant ZNF74 au domaine de liaison à l'ADN du facteur transcriptionnel GAL4 et un rapporteur luciférase sous le contrôle des éléments de réponse de GAL4. Compte tenu du fait que SUMO semble avoir un rôle intrinsèque de répression (Schmidt and Muller, 2003; Schmidt and Muller, 2002), il est possible que des conditions permettant d'augmenter la sumoylation de ZNF74 et/ou de KAP-1 (présence de SUMO surexprimé ou d'un dominant négatif de SENP1) conduisent à une augmentation de l'activité de répression de ces protéines. Il sera aussi important de déterminer par des études de précipitation de chromatine si les formes sumoylées de ZNF74 et/ou de KAP-1 sont préférentiellement recrutées aux promoteurs. Ces études devraient permettre de mieux comprendre la régulation de la transcription médiée par les protéines KRAB multidoigt et leur co-répresseur universel KAP-1.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abdel-Hafiz,H., Takimoto,G.S., Tung,L., and Horwitz,K.B. (2002). The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression. *J. Biol. Chem.* 277, 33950-33956.
2. Aubry,M., Demczuk,S., Desmaze,C., Aikem,M., Aurias,A., Julien,J.P., and Rouleau,G.A. (1993). Isolation of a zinc finger gene consistently deleted in DiGeorge syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1583-1587.
3. Aubry,M., Marineau,C., Zhang,F.R., Zahed,L., Figlewicz,D., Delattre,O., Thomas,G., de Jong,P.J., Julien,J.P., and Rouleau,G.A. (1992). Cloning of six new genes with zinc finger motifs mapping to short and long arms of human acrocentric chromosome 22 (p and q11.2). *Genomics* 13, 641-648.
4. Ayyanathan,K., Lechner,M.S., Bell,P., Maul,G.G., Schultz,D.C., Yamada,Y., Tanaka,K., Torigoe,K., and Rauscher,F.J., III (2003). Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation. *Genes Dev.* 17, 1855-1869.
5. Bellefroid,E.J., Poncelet,D.A., Lecocq,P.J., Revelant,O., and Martial,J.A. (1991). The evolutionarily conserved Kruppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 3608-3612.
6. Best,J.L., Ganiatsas,S., Agarwal,S., Changou,A., Salomoni,P., Shirihai,O., Meluh,P.B., Pandolfi,P.P., and Zon,L.I. (2002). SUMO-1 protease-1 regulates gene transcription through PML. *Mol. Cell* 10, 843-855.
7. Burkham,J., Coen,D.M., Hwang,C.B., and Weller,S.K. (2001). Interactions of herpes simplex virus type 1 with ND10 and recruitment of PML to replication compartments. *J. Virol.* 75, 2353-2367.
8. Carlson,C., Sirotkin,H., Pandita,R., Goldberg,R., McKie,J., Wadey,R., Patanjali,S.R., Weissman,S.M., Anyane-Yeboa,K., Warburton,D., Scambler,P., Shprintzen,R., Kucherlapati,R., and Morrow,B.E. (1997). Molecular definition of 22q11 deletions in 151 velo-cardio- facial syndrome patients. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 620-629.
9. Chauchereau,A., Amazit,L., Quesne,M., Guiochon-Mantel,A., and Milgrom,E. (2003). Sumoylation of the progesterone receptor and of the steroid receptor coactivator SRC-1. *J. Biol. Chem.* 278, 12335-12343.

10. Chun, T.H., Itoh, H., Subramanian, L., Iniguez-Lluhi, J.A., and Nakao, K. (2003). Modification of GATA-2 transcriptional activity in endothelial cells by the SUMO E3 ligase PIASy. *Circ. Res.* *92*, 1201-1208.
11. Cote, F., Boisvert, F.M., Grondin, B., Bazinet, M., GOODYER, C.G., Bazett-Jones, D.P., and Aubry, M. (2001). Alternative promoter usage and splicing of ZNF74 multifinger gene produce protein isoforms with a different repressor activity and nuclear partitioning. *DNA Cell Biol.* *20*, 159-173.
12. Desterro, J.M., Rodriguez, M.S., and Hay, R.T. (1998). SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol. Cell* *2*, 233-239.
13. Dobрева, G., Dambacher, J., and Grosschedl, R. (2003). SUMO modification of a novel MAR-binding protein, SATB2, modulates immunoglobulin mu gene expression. *Genes Dev.* *17*, 3048-3061.
14. Duprez, E., Saurin, A.J., Desterro, J.M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M.N., Solomon, E., de The, H., Hay, R.T., and Freemont, P.S. (1999). SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J. Cell Sci.* *112 (Pt 3)*, 381-393.
15. Eskiw, C.H. and Bazett-Jones, D.P. (2002). The promyelocytic leukemia nuclear body: sites of activity? *Biochem. Cell Biol.* *80*, 301-310.
16. Germain-Desprez, D., Bazinet, M., Bouvier, M., and Aubry, M. (2003). Oligomerization of transcriptional intermediary factor 1 regulators and interaction with ZNF74 nuclear matrix protein revealed by bioluminescence resonance energy transfer in living cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 22367-22373.
17. Grondin, B., Bazinet, M., and Aubry, M. (1996). The KRAB zinc finger gene ZNF74 encodes an RNA-binding protein tightly associated with the nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* *271*, 15458-15467.
18. Grondin, B., Côté, F., Bazinet, M., Vincent, M., and Aubry, M. (1997). Direct interaction of the KRAB/Cys2-His2 zinc finger protein ZNF74 with a hyperphosphorylated form of the RNA polymerase II largest subunit. *J. Biol. Chem.* *272*, 27877-27885.
19. Guévremont, M. Interactions de la protéine à multidoigt de zinc ZNF74 avec les acides nucléiques. 1-100. 1999. Université de Montréal.
Ref Type: Thesis/Dissertation
20. Holmstrom, S., Van Antwerp, M.E., and Iniguez-Lluhi, J.A. (2003). Direct and distinguishable inhibitory roles for SUMO isoforms in the control of transcriptional synergy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 15758-15763.
21. Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M.J., Mayhew, C.N., Goodson, M.L., Park-Sarge, O.K., Sarge, K.D., and Goodson, M. (2001). Regulation of heat shock

- transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.* *276*, 40263-40267.
22. Ishov,A.M., Sotnikov,A.G., Negorev,D., Vladimirova,O.V., Neff,N., Kamitani,T., Yeh,E.T., Strauss,J.F., III, and Maul,G.G. (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J. Cell Biol.* *147*, 221-234.
 23. Kagey,M.H., Melhuish,T.A., and Wotton,D. (2003). The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* *113*, 127-137.
 24. Kroll,M., Conconi,M., Desterro,M.J., Marin,A., Thomas,D., Friguet,B., Hay,R.T., Virelizier,J.L., Arenzana-Seisdedos,F., and Rodriguez,M.S. (1997). The carboxy-terminus of I kappaB alpha determines susceptibility to degradation by the catalytic core of the proteasome. *Oncogene* *15*, 1841-1850.
 25. Kurahashi,H., Tsuda,E., Kohama,R., Nakayama,T., Masuno,M., Imaizumi,K., Kamiya,T., Sano,T., Okada,S., and Nishisho,I. (1997). Another critical region for deletion of 22q11: a study of 100 patients. *Am. J. Med. Genet.* *72*, 180-185.
 26. Lallemand-Breitenbach,V., Zhu,J., Puvion,F., Koken,M., Honore,N., Doubeikovsky,A., Duprez,E., Pandolfi,P.P., Puvion,E., Freemont,P., and de Thé,H. (2001). Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J. Exp. Med.* *193*, 1361-1371.
 27. Le Drean,Y., Mincheneau,N., Le Goff,P., and Michel,D. (2002). Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation. *Endocrinology* *143*, 3482-3489.
 28. Lechner,M.S., Begg,G.E., Speicher,D.W., and Rauscher,F.J., III (2000). Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interaction is essential. *Mol. Cell Biol.* *20*, 6449-6465.
 29. Levy,A., Demczuk,S., Aurias,A., Depétris,D., Mattei,M.-G., and Philip,N. (1995). Interstitial 22q11 microdeletion excluding the ADU breakpoint in a patient with DiGeorge syndrome. *Hum. Mol. Genet.* *4*, 2417-2419.
 30. Lin,X., Sun,B., Liang,M., Liang,Y.Y., Gast,A., Hildebrand,J., Brunicardi,F.C., Melchior,F., and Feng,X.H. (2003). Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Mol. Cell* *11*, 1389-1396.
 31. Lindsay,E.A., Greenberg,F., Shaffer,L.G., Shapira,S.K., Scambler,P.J., and Baldini,A. (1995). Submicroscopic deletions at 22q11.2: variability of the clinical picture and delineation of a commonly deleted region. *Am. J. Med. Genet.* *56*, 191-197.

32. Lund,J., Chen,F., Huang,A., Roe,B., Budarf,M., Emanuel,B.S., and Reeves,R.H. (2000). Comparative sequence analysis of 634 kb of the mouse chromosome 16 region of conserved synteny with the human velocardiofacial syndrome region on chromosome 22q11.2. *Genomics* 63, 374-383.
33. Mahajan,R., Delphin,C., Guan,T., Gerace,L., and Melchior,F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88, 97-107.
34. Mahajan,R., Gerace,L., and Melchior,F. (1998). Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. *J. Cell Biol.* 140, 259-270.
35. Mark,C., Abrink,M., Hellman,L., and . (1999). Comparative analysis of KRAB zinc finger proteins in rodents and Man: Evidence for several evolutionarily distinct subfamilies of KRAB zinc finger genes. *DNA and Cell Biol.* 18, 381-396.
36. Matunis,M.J., Wu,J., and Blobel,G. (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 140, 499-509.
37. Melchior,F. (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 591-626.
38. Melchior,F., Schergaut,M., and Pichler,A. (2003). SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends Biochem. Sci.* 28, 612-618.
39. Michael,D. and Oren,M. (2003). The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin. Cancer Biol.* 13, 49-58.
40. Mo,Y.Y., Yu,Y., Shen,Z., and Beck,W.T. (2002). Nucleolar delocalization of human topoisomerase I in response to topotecan correlates with sumoylation of the protein. *J. Biol. Chem.* 277, 2958-2964.
41. Morrow,B., Goldberg,R., Carlson,C., Das Gupta,R., Sirotkin,H., Collins,J., Dunham,I., O'Donnell,H., Scambler,P., Shprintzen,R., and et al (1995). Molecular definition of the 22q11 deletions in velo-cardio- facial syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 1391-1403.
42. Muller,S. and Dejean,A. (1999). Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *J. Virol.* 73, 5137-5143.
43. Muller,S., Hoegge,C., Pyrowolakis,G., and Jentsch,S. (2001). SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 202-210.

44. Muller,S., Matunis,M.J., and Dejean,A. (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J.* *17*, 61-70.
45. Nathan,D., Sterner,D.E., and Berger,S.L. (2003). Histone modifications: Now summoning sumoylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 13118-13120.
46. Phatnani,H.P. and Greenleaf,A.L. (2004). Identifying phosphoCTD-associating proteins. *Methods Mol. Biol.* *257*, 17-28.
47. Pichler,A., Gast,A., Seeler,J.S., Dejean,A., and Melchior,F. (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* *108*, 109-120.
48. Poukka,H., Karvonen,U., Janne,O.A., and Palvimo,J.J. (2000). Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 14145-14150.
49. Rallabhandi,P., Hashimoto,K., Mo,Y.Y., Beck,W.T., Moitra,P.K., and D'Arpa,P. (2002). Sumoylation of topoisomerase I is involved in its partitioning between nucleoli and nucleoplasm and its clearing from nucleoli in response to camptothecin. *J. Biol. Chem.* *277*, 40020-40026.
50. Ravassard,P., Côté,F., Grondin,B., Bazinet,M., Mallet,J., and Aubry,M. (1999). ZNF74, a gene deleted in DeGeorge syndrome is expressed in human neural crest-derived tissues and foregut endoderm epithelia. *Genomics* *62*, 82-85.
51. Rosonina,E. and Blencowe,B.J. (2004). Analysis of the requirement for RNA polymerase II CTD heptapeptide repeats in pre-mRNA splicing and 3'-end cleavage. *RNA*. *10*, 581-589.
52. Ross,S., Best,J.L., Zon,L.I., and Gill,G. (2002). SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol. Cell* *10*, 831-842.
53. Ryan,A.K., Goodship,J.A., Wilson,D.I., Philip,N., Levy,A., Seidel,H., Schuffenhauer,S., Oechsler,H., Belohradsky,B., Prieur,M., Aurias,A., Raymond,F.L., Clayton-Smith,J., Hatchwell,E., McKeown,C., Beemer,F.A., Dallapiccola,B., Novelli,G., Hurst,J.A., Ignatius,J., Green,A.J., Winter,R.M., Brueton,L., Brondum-Nielsen,K., Scambler,P.J., and et al (1997). Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J. Med. Genet.* *34*, 798-804.
54. Ryan,R.F., Schultz,D.C., Ayyanathan,K., Singh,P.B., Friedman,J.R., Fredericks,W.J., and Rauscher III,F.J. (1999). KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol. Cell Biol.* *19*, 4366-4378.

55. Sachdev,S., Bruhn,L., Sieber,H., Pichler,A., Melchior,F., and Grosschedl,R. (2001). PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev.* *15*, 3088-3103.
56. Saitoh,H. and Hinchev,J. (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J. Biol. Chem.* *275*, 6252-6258.
57. Sapetschnig,A., Rischitor,G., Braun,H., Doll,A., Schergaut,M., Melchior,F., and Suske,G. (2002). Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO J.* *21*, 5206-5215.
58. Schmidt,D. and Muller,S. (2002). Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 2872-2877.
59. Schmidt,D. and Muller,S. (2003). PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation. *Cell Mol. Life Sci.* *60* , 2561-2574.
60. Schultz,D.C., Ayyanathan,K., Negorev,D., Maul,G.G., and Rauscher,F.J., III (2002). SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev.* *16*, 919-932.
61. Schultz,D.C., Friedman,J.R., and Rauscher,F.J., III (2001). Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD. *Genes Dev.* *15*, 428-443.
62. Seeler,J.S. and Dejean,A. (2003). Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 690-699.
63. Seeler,J.S., Marchio,A., Losson,R., Desterro,J.M., Hay,R.T., Chambon,P., and Dejean,A. (2001). Common properties of nuclear body protein SP100 and TIF1alpha chromatin factor: role of SUMO modification. *Mol. Cell Biol.* *21*, 3314-3324.
64. Shio,Y. and Eisenman,R.N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
65. Sobko,A., Ma,H., and Firtel,R.A. (2002). Regulated SUMOylation and ubiquitination of DdMEK1 is required for proper chemotaxis. *Dev. Cell* *2*, 745-756.
66. Stade,K., Vogel,F., Schwienhorst,I., Meusser,B., Volkwein,C., Nentwig,B., Dohmen,R.J., and Sommer,T. (2002a). A lack of SUMO conjugation affects cNLS-dependent nuclear protein import in yeast. *J. Biol. Chem.* *277*, 49554-49561.

67. Stade,K., Vogel,F., Schwienhorst,I., Meusser,B., Volkwein,C., Nentwig,B., Dohmen,R.J., and Sommer,T. (2002b). A lack of SUMO conjugation affects cNLS-dependent nuclear protein import in yeast. *J. Biol. Chem.* *277*, 49554-49561.
68. Sternsdorf,T., Jensen,K., and Will,H. (1997). Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *J. Cell Biol.* *139*, 1621-1634.
69. Tanaka,K., Tsumaki,N., Kozak,C.A., Matsumoto,Y., Nakatani,F., Iwamoto,Y., and Yamada,Y. (2002). A Kruppel-associated box-zinc finger protein, NT2, represses cell-type-specific promoter activity of the alpha 2(XI) collagen gene. *Mol. Cell Biol.* *22*, 4256-4267.
70. Verger,A., Perdomo,J., and Crossley,M. (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep.* *4*, 137-142.
71. Wilson,V.G. and Rangasamy,D. (2001). Intracellular targeting of proteins by sumoylation. *Exp. Cell Res.* *271*, 57-65.
72. Wood,L.D., Irvin,B.J., Nucifora,G., Luce,K.S., and Hiebert,S.W. (2003). Small ubiquitin-like modifier conjugation regulates nuclear export of TEL, a putative tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 3257-3262.
73. Zhao,Y., Kwon,S.W., Anselmo,A., Kaur,K., and White,M.A. (2004). Broad-spectrum Identification of cellular SUMO substrate proteins. *J. Biol. Chem.*
74. Zhong,S., Muller,S., Ronchetti,S., Freemont,P.S., Dejean,A., and Pandolfi,P.P. (2000). Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* *95*, 2748-2752.