

Université de Montréal

Caractérisation de la modulation de l'activité du récepteur nucléaire orphelin NUR77 (NR4A1) par ses modifications post-traductionnelles et son interactome

Par

Fatéma Dodat

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté de Pharmacie en vue de l'obtention du grade de

Ph.D en Sciences Pharmaceutiques, option Pharmacologie

Février 2021

© Fatéma Dodat, 2021

Université de Montréal

Faculté de pharmacie

Cette thèse intitulée

**Caractérisation de la modulation de l'activité du récepteur nucléaire orphelin NUR77 (NR4A1)
par ses modifications post-traductionnelles et son interactome**

Présentée par

Fatéma Dodat

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Geneviève Deblois

Président-rapporteur

Daniel Lévesque

Directeur de recherche

Sylvie Mader

Co-directrice de recherche

Simon-Pierre Gravel

Membre du jury

Jacques J. Tremblay

Examineur externe

Résumé

NUR77 est un récepteur nucléaire (RN) orphelin impliqué dans la régulation de processus biologiques dont la mort cellulaire, notamment dans la maladie de Parkinson (MP), découlant de la perte de neurones dopaminergiques, et dans le cancer du sein, résultant de la prolifération de cellules mammaires. NUR77 est impliqué dans le déclenchement et la protection de la mort cellulaire et son activité serait indépendante de la liaison d'un ligand. Nous avons émis l'hypothèse que l'activité de NUR77 est influencée par ses modifications post-traductionnelles (MPTs) et ses partenaires d'interactions. L'objectif général de cette thèse était de caractériser les MPTs et les partenaires d'interaction modulant l'activité de NUR77, dans des modèles de cellules en culture, afin de mieux comprendre ses fonctions biologiques - notamment dans la mort cellulaire.

Le premier objectif de ce doctorat était de caractériser le rôle de la SUMOylation, une modification modulant l'activité des RN, chez NUR77, par des essais rapporteurs dans les cellules *Human Embryonic Kidney 293* (HEK293). La surexpression de la E3 SUMO ligase PIAS γ et/ou de l'isoforme 2 de la SUMO, protéines importantes dans la régulation de la SUMOylation chez les RN, a engendré un effet répresseur sur l'activité transcriptionnelle de NUR77. L'effet de PIAS γ sur l'activité de NUR77 est modulé par la *Sentrin SUMO-specific protease 1*, qui hydrolyse la liaison des SUMO. Les mutations des résidus lysine dans des sites consensus de SUMOylation, de NUR77 (K102 et K577), empêchant cette MPT, ont causé des effets opposés sur son activité transcriptionnelle, suggérant le recrutement différent de corégulateurs de la transcription. Ces résultats combinés indiquent que la SUMOylation et les PIAS γ et SUMO2 sont, respectivement, une MPT et des corégulateurs importants dans l'activité de NUR77.

Le deuxième objectif de cette thèse était de caractériser l'interactome de NUR77 dans des HEK293 vivantes afin d'identifier les interacteurs pouvant moduler son activité, à l'aide d'une méthode de marquage des protéines proximales avec la biotine basée sur la peroxydase APEX2, combinée à la spectrométrie de masse. Ce procédé a identifié 336 potentiels interacteurs de NUR77, dont plusieurs connus. Des essais de coimmunoprécipitation et de coimmunofluorescence menés dans les HEK293 et dans les cellules du cancer du sein MCF-7 ont montré, respectivement, que la protéine régulatrice de l'apoptose *Apoptosis Inhibitor 5* (API5), interagissait et colocalisait avec

NUR77. La privation de sérum dans le milieu de culture des cellules et la diminution de l'expression de *API5* a conduit à une augmentation des niveaux protéiques et de l'activité de NUR77 et à une diminution de la survie cellulaire. Ces données suggèrent que *API5* constitue un régulateur de NUR77 dans les voies de signalisation associées à la mort cellulaire et que cette interaction pourrait constituer une cible pour moduler l'apoptose. Elles valident également l'approche d'identification d'interacteurs de NUR77.

Les travaux de cette thèse ont donc permis de générer des outils pour caractériser l'activité de NUR77 et ont révélé des corégulateurs de cette activité. La poursuite de ces projets pourrait révéler le caractère opportun de cibler NUR77 comme modulateur de la mort cellulaire, notamment dans la MP et le cancer du sein.

Mots-clés: NUR77, SUMOylation, PIAS γ , essais rapporteurs, interactome, mort cellulaire, *API5*, APEX2, Parkinson, Cancer du sein

Abstract

NUR77 is an orphan nuclear receptor (NR) involved in the regulation of multiple cell biology processes including cell death, in particular in Parkinson's disease (PD), which results of the loss of dopaminergic neurons, and in breast cancer (BC), which is caused by the proliferation of mammary epithelial cells. NUR77 is involved in triggering and inhibiting cell death and its activity is believed to be independent of a ligand binding. We hypothesized that the regulation of NUR77 activity does not occur through a ligand, but through the influence of its post-translational modifications (PTMs) and its interaction partners. The general objective of this PhD project was to characterize the PTMs and the interacting partners that modulate the activity of NUR77 in cultured cell models, to better understand its physiological roles, in particular in the regulation of cell death.

The first objective of this thesis was to characterize the role of SUMOylation, a modification that regulates NR activity, in regulating NUR77 transcriptional activity in reporter assays in Human Embryonic Kidney (HEK293) cells. Overexpression of the E3 SUMO ligase PIAS γ or/and the isoform 2 of SUMO, both important regulators in SUMOylation of the NUR77 homolog NURR1, produced a repressive effect on the transcriptional activity of NUR77. The effect of PIAS γ on the activity of NUR77 was shown to be modulated by the Sentrin SUMO-specific protease 1 protein, which removes SUMO tags on target proteins. In addition, mutations of lysine residues in SUMO consensus sites in NUR77 (K102 and K577) had opposite effects on its transcriptional activity, suggesting different recruitment of coregulators of transcription in the regions. The combination of these results indicates that SUMOylation is an important PTM for the regulation of NUR77 activity and that PIAS γ and SUMO2 proteins are important transcriptional coregulators of NUR77.

The second objective of this thesis was to evaluate NUR77 interactome in HEK293 living cells to identify the interactors that can modulate its activity, using a biotin-labelling method for proximal proteins based on the APEX2 peroxidase combined with mass spectrometry. This approach identified 336 potential interactors of NUR77, some that are consistent with the literature. Coimmunoprecipitation and coimmunofluorescence assays carried out in HEK293 cells and in MCF-7 breast cancer cell line have shown that the regulator of apoptosis Apoptosis Inhibitor 5

(API5), interacted and colocalized with NUR77. By depriving cells of serum and decreasing *API5* expression, increased protein levels and activity of NUR77 was observed, as well as a decrease in cell viability. These data support that API5 is a regulator of NUR77 in its involvement in signalling pathways associated with cell death and that this interaction could be a target for modulating apoptosis. More generally, they validate the APEX2 tool which can be used to identify novel NUR77 interactors.

In conclusion, the work of this thesis resulted in the generation of tools to better understand the activity of NUR77 and revealed important coregulators in this activity. The continued characterization of these interactors may provide opportunities to target NUR77 as a regulator of cell death, particularly in PD and in breast cancer.

Keywords: NUR77, SUMOylation, PIAS γ , gene reporter assays, interactome, cell death, API5, APEX2, Parkinson Disease, breast cancer

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Liste des sigles et abréviations	xv
Remerciements	i
Chapitre 1 – Introduction	1
1.1 Les récepteurs nucléaires et NUR77	1
1.1.1- Généralités.....	1
1.1.1.1 Les récepteurs nucléaires	1
1.1.1.2 Les NR4As et NUR77.....	2
1.1.2- Structure.....	3
1.1.2.1 Les récepteurs nucléaires	3
1.1.2.2 Les NR4As et NUR77.....	6
1.1.3- Classification des récepteurs nucléaires	6
1.1.4- Mécanismes d'action	9
1.1.4.1 Les récepteurs nucléaires	9
1.1.4.1.1 La liaison à l'ADN	9
1.1.4.1.2 La régulation de la transcription.....	11
1.1.4.2 Les NR4As et NUR77.....	13
1.1.4.2.1 La liaison à l'ADN	13
1.1.4.2.2 Des domaines et des activités atypiques	15
1.1.4.2.3 Des ligands potentiels.....	15
1.1.5- Les RN comme cibles thérapeutiques d'intérêt	16
1.1.6- Les fonctions de NUR77	18
1.1.6.1 Un facteur de transcription important	18
1.1.6.2 Un récepteur nucléaire aux multiples activités non génomiques	20
1.1.6.3 Une redondance fonctionnelle entre les NR4As	22

1.1.6.4 Implication de NUR77 dans la régulation de la neurotransmission dopaminergique	23
1.1.6.4.1 La maladie de Parkinson	23
1.1.6.4.2 NUR77 et la régulation de la survie des neurones dopaminergiques.....	24
1.1.6.5. Implication de NUR77 dans le cancer.....	25
1.1.6.5.1 Un facteur de prolifération	25
1.1.6.5.2 Un facteur pro-apoptotique	26
1.1.6.5.3 Une cible thérapeutique intéressante.....	26
1.1.6.6 Implication de NUR77 dans le cancer du sein	26
1.1.6.6.1. Le cancer du sein.....	26
1.1.6.6.2. NUR77 et le cancer du sein.....	28
1.2 Les modifications post-traductionnelles des récepteurs nucléaires	29
1.2.1- Généralités sur les modifications post-traductionnelles	30
1.2.2- La phosphorylation	30
1.2.2.1 Généralités sur la phosphorylation.....	30
1.2.2.2 La phosphorylation de NUR77	31
1.2.3- La SUMOylation	34
1.2.3.1 Généralités sur la SUMOylation	34
1.2.3.2 La SUMOylation chez les NR4As et NUR77.....	37
1.3 L'interactome des récepteurs nucléaires.....	40
1.3.1- Généralités sur les interactions entre protéines	40
1.3.2- Les cofacteurs des RN	41
1.3.3- Les cofacteurs de NUR77	42
1.4- La technologie APEX2.....	43
1.4.1. Les techniques « classiques » de capture des interactions.....	43
1.4.2. Les technologies de marquage des protéines à la biotine	45
1.4.3. Une peroxydase pour marquer les protéines : l'approche APEX2	45
1.5 API5, une cible d'intérêt dans l'apoptose.....	50
1.5.1- La protéine API5	50
1.5.2- Les interacteurs de API5.....	51
1.5.3- API5 et le cancer du sein	54

1.6 Modèles cellulaires	55
1.6.1- Les HEK293 pour développer et optimiser les essais	55
1.6.2- Les MCF-7 pour caractériser les mécanismes de NUR77 dans le cancer du sein ER+56	
1.7 Hypothèses et objectifs	58
Chapitre 2 – Complex regulation of orphan nuclear receptor NUR77 (NR4A1) transcriptional activity by SUMO2 and PIAS γ	61
2.1 Contribution de la candidate	61
2.2. Résumé	62
2.3. Highlights	62
2.4 Abstract.....	63
2.5 Introduction	65
2.6 Materials and methods.....	67
2.7 Results	71
2.8 Discussion.....	76
2.9 Conclusions	79
2.10 Figures	81
2.11 Supplementary Figures	86
2.12 References	94
Chapitre 3 – Proximity labeling reveals API5 as a key interactor of NUR77 (NR4A1) regulating apoptosis in MCF-7 breast cancer cells.....	99
3.1 Contribution de la candidate.....	99
3.2 Résumé	100
3.3. Highlights	100
3.4 Abstract.....	101
3.5 Introduction	102
3.6 Materials and methods.....	105
3.7 Results	111
3.8 Discussion and conclusion.....	116
3.9 Figures	120
3.10 Supplementary Figures	129
3.11 References	134

Chapitre 4 - Discussion générale et perspectives	143
4.1 La SUMOylation, une MPT importante et complexe pour l'activité de NUR77	143
4.1.1- Une modulation de l'activité de NUR77 par SUMO2 et PIASy	143
4.1.2- Limites de l'étude et perspectives à moyen terme.....	146
4.1.2.1. La caractérisation de la SUMOylation chez NUR77	146
4.1.2.2. Les outils utilisés	150
4.1.3- Perspectives à long terme	152
4.2 Une approche de marquage de proximité pour caractériser l'activité de NUR77.....	154
4.2.1- API5, un nouveau corégulateur de NUR77	154
4.2.2- Limites de l'étude et perspectives à moyen terme.....	156
4.2.2.1 L'implication de l'interaction entre NUR77 et API5 dans la mort cellulaire	156
4.2.2.2. Identification d'autres interacteurs de NUR77.....	158
4.2.2.3. Validation des interacteurs	159
4.2.3- Perspectives à long terme	160
Conclusion.....	165
Références bibliographiques	167
Annexes	195
1. Figures supplémentaires	195
2. L'approche APEX2 : Données supplémentaires.....	199
3. Revue de littérature : What is known about SUMOylation among NR4A family members?	207
3.1 Abstract	207
3.2 Introduction	207
3.3. The SUMOylation process.....	207
3.4 SUMOylation in NR4As family members	213
3.5 Concluding remarks	220
3.6 References	222

Liste des tableaux

Tableau 1 – Classification des RN selon leur homologie de séquence	8
Tableau 2 – Liste non exhaustive des molécules ciblant les RN dans des maladies spécifiques	17
Tableau 3 – Liste non exhaustive des kinases phosphorylant NUR77 et les effets de cette phosphorylation dans la cellule	33
Tableau 4 – Liste non exhaustive des interacteurs de API5	52
Table 5 - List of the first 25 proteins displaying the greater fold change in NUR77 interactome abundance between experimental and control conditions classified with décroissant p-value	123

Liste des figures

Figure 1 - Architecture générale des RN.....	3
Figure 2 - Similarité de structure entre les différents membres de la famille de NR4As.....	6
Figure 3 - Les 4 mécanismes d'action des RN.	9
Figure 4 - Les 3 mécanismes d'action des membres de la famille des NR4As.....	13
Figure 5 - Les différentes fonctions de NUR77.....	20
Figure 6 - Les 5 étapes enzymatiques du cycle de la SUMOylation.	35
Figure 7 – Sites de phosphorylation et de SUMOylation de NUR77 et enzymes impliquées	40
Figure 8 - Illustration du fonctionnement de la technique APEX	46
Figure 9 - Illustration de l'analyse des échantillons par spectrométrie de masse	47
Figure 10 – Architecture générale de la protéine API5	50
Figure 11 - Illustration du fonctionnement des essais rapporteurs	59
Figure 12 - Illustration du fonctionnement de la technologie APEX2	59
Figure 13 - Protein inhibitors of Activated STAT (PIAS3 and PIASγ) repress NUR77 transcriptional activity on NBRE response element and sentrin SUMO-specific protease 1 (SEN1) rescues PIASγ repression.....	81
Figure 14 - Putative SUMO acceptor sites K577 and K102 are highly probable and phylogenetically well-conserved in NUR77.....	82
Figure 15 - Mutations of putative SUMO acceptor sites K102 and K577 do not affect NUR77 protein stability.....	82
Figure 16 - Mutations of putative SUMO acceptor sites K102 and K577 modulate NUR77 transcriptional activity.....	83
Figure 17 - Both PIASγ and SUMO2 repress NUR77 transcriptional activity and SUMO2 potentializes PIASγ repression.....	84
Figure 18 - Identify NUR77 interactome in HEK293 cells.	120
Figure 19 - Changes in NUR77 interactome between the experimental condition and combined control conditions.	121
Figure 20 - API5 is extracted within the same protein complex and co-localizes with NUR77 in HEK293 and MCF-7 cells.	124

Figure 21 - Downregulation of API5 cooperates with serum deprivation to induce NUR77 expression and decrease cell viability	125
Figure 22 - The prognostic value of API5 and NUR77 gene expression for relapse-free survival in breast cancer patients.	127
Figure 23 - Schematic model proposed for API5 and NUR77 interaction in regulating apoptosis in ER+ Breast cancer.	128
Figure 24 – Schéma résumé et hypothétique des modulations de la SUMOylation et de l’interaction entre API5 et NUR77 pour réguler la survie et la mort cellulaire.....	162

Liste des sigles et abréviations

6-OHDA : *6-hydroxydopamine*

(Ada2p) : *Alteration/deficiency of activation 2*

AF-1 : *Activation Function-1*

Akt : *Protein Kinase B*

AP-1 : *Activator protein 1*

API5 : *Apoptosis Inhibitor 5*

AR : récepteur des androgènes

ATP : adénosine triphosphate

BC: *Breast Cancer* – Cancer du sein

BCL-2 : *B-cell lymphoma 2*

BCLAF1 : *BCL-2 Associated Transcription Factor 1*

BRET : *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*

CBP/300 : *CREB Binding Protein/p300*

CD437/AHPN : *(6-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphthalene carboxylic acid*

Co-IF: Co-Immunofluorescence

CoREST : *repressor element-1 silencing transcription factor Corepressor*

COUP-TF : facteur de transcription du promoteur proximal du gène de l'ovalbumine de poulet

DBD : *DNA Binding Domain* - domaine de liaison à l'ADN

DESI1/2: *Desumoylating isopeptidase 1/2*

DIM-C-pPhOCH₃: *1,1-bis(3'-Indolyl)-1-(p-methoxyphenyl)methane;* *3,3'-[(4-Methoxyphenyl)methylene]bis-1H-indole*

DNA-PK : protéine kinase dépendante de l'ADN

DR5 : *Direct-Repeat 5 responsive element*

ER : récepteur des œstrogènes

Fas : *FasL* ou *Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily Member 6*

FC : *Fold Change*

FXR : récepteurs X des farnésoïdes

GCNF : facteur nucléaire des cellules germinales

GLUT4 : protéine transporteur de glucose 4

GR : récepteur des glucocorticoïdes

HDAC : *Histone Deacetylase*

HER2 : *Human Epidermal Growth factor Receptor 2*

HNF4 : facteur nucléaire hépatocytaire 4

IGFR1 : *Insulin-like Growth Factor 1*

iTRAQ : *Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation*

JNK1 : *c-Jun N-terminal kinase*

KD : *Knockdown*

KO : *Knockout*

LBD : *Ligand Binding Domain* - domaine de liaison du ligand

LBP : *Ligand Binding Pocket* - poche de liaison du ligand

LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

LRH-1 : homologue 1 du récepteur du foie

LXR : récepteurs des oxystérols ou *liver X receptors*

MDM2 : *Mouse Double Minute 2*

MP : Maladie de Parkinson

MPTs : modifications post-traductionnelles

NBRE : *NGFI-B responsive element*

NCOR : *Nuclear Receptor Corepressor*

NES : Signal d'Export Nucléaire

NF- κ B : *nuclear factor-kappa B*

NGFI-B : facteur de croissance des nerfs 1-B (NUR77, NR4A1)

NK1R : *neurokinin-1*

NLS : Signal de Localisation Nucléaire

NOR-1 : récepteur dérivé des neurones 1 (NR4A3)

NuRE: *Nur-response element*

NURR1 : protéine liée au récepteur nucléaire 1 (NR4A2)

P53 : protéine tumorale 53

PCAF : *P300/CBP-Associated Factor*

PDSM : *Phosphorylation Dependent SUMOylation Motif*

PGA1 : prostaglandine A1

PGE1 : prostaglandine E1

PI3K : *Phosphatidylinositol 3-kinase*

PIAS : *Protein Inhibitors of Activated STAT*

Pin1 : *peptidyl-prolyl isomerase 1*

PPAR : récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes

PR : récepteur de la progestérone

RanBP2 : *Ran Binding Protein 2*

RAR : récepteurs de l'acide rétinoïque

REV-ERB : récepteurs rev-Erb

RN : Récepteur Nucléaire

ROR : récepteurs apparentés aux récepteurs de l'acide rétinoïque

ROS : espèces réactives de l'oxygène

RXR : récepteurs X des rétinoïdes

SAE1/ 2 : *SUMO-activating enzyme subunit 1/ 2*

SENP : *Sentrin-Specific Proteases*

SF-1 : facteur 1 stéroïdogénique

SILAC : *stable isotope labelling by amino acids in cell culture*

SIM: *SUMO interacting motif*

siRNA : *small interfering RNA* - ARN interférents

SMARCA4 : *SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member 4*

StAR : Steroidogenic Acute Regulatory

SUMO : *Small Ubiquitin-like Modifier*

TBP : *TATA box-binding protein*

TMPA : *Ethyl 2-[2,3,4-trimethoxy-6-(1-octanoyl)-phenyl] acetate*

TNF α : facteur de nécrose tumorale alpha

TPA : *12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate*

TR : hormones thyroïdiennes

TRAIL : *Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand*

TRIM28 : *Tripartite Motif Containing 28*

TXNDC5 : *thioredoxin domain-containing 5*

VDR : récepteurs de la vitamine D

Remerciements

Ce doctorat est l'aboutissement d'années d'efforts, de travail et d'enrichissement personnel et professionnel. Il n'aurait pas vu le jour sans l'influence d'acteurs clés que je tiens à remercier ici.

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de recherche, Daniel Lévesque, pour m'avoir fait confiance et m'avoir accueillie dans son laboratoire. Malgré ses fonctions de vice-doyen à la recherche et son emploi du temps chargé, il a su dégager de la disponibilité pour nos projets de recherche. Nos échanges d'idées, nécessaires aux avancées de la science et à l'approfondissement de l'esprit critique, m'ont fait évoluer en tant que chercheuse. Je lui suis reconnaissante à tous ces niveaux.

Je remercie également Sylvie Mader pour avoir été mon encadrante puis ma co-directrice de recherche, et m'avoir acceptée dans son laboratoire ce qui m'a permis d'effectuer ma thèse dans des conditions propices à mon épanouissement personnel et professionnel. Je lui exprime en outre ma gratitude pour son investissement dans nos travaux et le temps qu'elle a consacré à nos échanges qui ont stimulé ma curiosité scientifique.

Ensuite, je tiens à souligner l'aide de David Cotnoir-White, qui m'a pris sous son aile et a contribué à mon évolution dans cette aventure. Il a su me réconforter des maux de la recherche à l'aide de chocolaines et de course à pieds - un grand merci pour cela!

Grâce à nos discussions, Janelle Drouin-Ouellet, Marc Servant et Sylvie Marleau ont été d'une influence importante dans mon doctorat et dans sa poursuite, et je tiens à leur témoigner ma reconnaissance ici.

Bien évidemment, une expérience doctorale ne serait pas complète sans l'appui nécessaire de collègues et ami.e.s avec qui partager les moments à la *bench*, aux 5@7 et aux soupers! Je m'estime chanceuse et reconnaissante d'avoir développé des amitiés sincères et profondes qui ont allégé ces quatre années à l'université.

Un immense merci à mes parents, ma sœur et mes frères, qui ont appuyé ma décision d'entreprendre ma thèse et qui ont su être à mon écoute de manière constructive lorsque j'ai été

confrontée à d'importants défis. Merci à eux et à mes nièces d'avoir été des sources de réconfort intarissables grâce à leurs vidéos, leurs messages et ces courtes périodes de retrouvailles toujours revigorantes.

Une mention spéciale pour ma « famille du 915 » et mes proches, avec qui j'ai pu m'évader le temps d'un brunch ou d'une activité en plein air, et qui m'ont permis de développer mes compétences en communication scientifique en m'écoutant décrire mes projets de recherche.

Enfin, mes plus profonds remerciements vont à mon conjoint, Gautier Davesne. Sans lui, les moments d'émotions, d'exaltation et d'incertitudes qui sèment le parcours doctoral auraient été bien fades. Il a su trouver les mots justes pour m'encourager et me soutenir, stimuler ma motivation et m'aider à repousser mes limites, et même s'intéresser à mon domaine de recherche pourtant bien éloigné du sien afin de « vivre » NUR77 avec moi!

Chapitre 1 – Introduction

1.1 Les récepteurs nucléaires et NUR77

Ce premier sous-chapitre de l'introduction a pour but d'initier le lecteur au contexte des récepteurs nucléaires (RN), à ce qui les unifie au niveau structurel et à ce qui les différencie d'un point de vue mécanistique. Cette partie met l'accent sur leur implication dans une multitude de processus biologiques et pathologiques, soulignant la nécessité et la complexité de cibler les RN en thérapie. Elle met ainsi de l'avant la nécessité de poursuivre les efforts en recherche sur la compréhension des mécanismes d'action des RN.

Dans chacune de ces sous-sections, les éléments spécifiques au récepteur orphelin NUR77, principal objet de cette thèse, sont décrits. La famille des NR4As à laquelle appartient NUR77, les propriétés communes des membres de cette famille mais également le caractère unique de NUR77 au niveau de ses fonctions et de sa localisation dans la cellule, sont mis de l'avant. Ses activités génomiques et non-génomiques, impliquées dans de multiples voies de signalisation, ainsi que son rôle dans la modulation de la mort cellulaire sont décrites. NUR77 constitue à l'heure actuelle une cible d'intérêt dans différentes pathologies, notamment dans la régulation de la neurotransmission dopaminergique et dans le cancer du sein. Cibler ce RN représente donc un véritable enjeu et un défi thérapeutique, et a constitué la source de motivation de ce sujet de doctorat.

1.1.1- Généralités

1.1.1.1 Les récepteurs nucléaires

Le concept de RN est né en 1958, lors du 4^e congrès International de Biochimie à Vienne revu dans (Mazaira, 2018). La pensée courante était alors que les hormones stéroïdiennes entraient dans les cellules par simple diffusion à travers la membrane plasmique et que, à la suite de réactions métaboliques, l'énergie nécessaire aux stimulations de croissance et à d'autres actions spécifiques était libérée. Le Pr. Elwood Jensen a totalement chamboulé ces croyances en mettant en évidence

la liaison d'un œstrogène radiomarqué à une protéine dans la cellule et la translocation du complexe hormone-récepteur dans le noyau afin de réguler l'expression de gènes spécifique (Jensen et al., 1968). Par opposition aux récepteurs membranaires, les RN forment une famille de récepteurs spécialisés pouvant être modulés par la liaison de molécules lipophiles à l'intérieur de la cellule.

Avant même que les premiers gènes des RN aient été clonés, ces récepteurs étaient connus pour être des protéines de modulation, c'est-à-dire de régulation de l'expression des gènes cibles (Wrangé, 1978). Les rôles physiologiques des premiers RN caractérisés ont été inférés de ceux de leurs agonistes, à savoir les hormones et les vitamines, les impliquant dans le métabolisme, la prolifération cellulaire, la réponse immunitaire ou encore le développement – mais aussi dans de nombreux processus pathologiques tels que le cancer, le diabète, l'athérosclérose, les troubles endocriniens et la reproduction, les maladies cardiovasculaires, neurologiques, immunitaires, etc revue dans (Huang, 2010).

La superfamille des RN compte 48 facteurs de transcription chez l'humain (Mazaira, 2018). Le dogme initial était que l'activité de ces facteurs de transcription était régulée par des ligands uniques leur correspondant. Cependant, il apparaît qu'une certaine promiscuité existe, certains ligands naturels ou synthétiques modulant des récepteurs de plusieurs familles différentes. Ces RN, caractérisés par deux domaines de structure conservés, le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de liaison au ligand, sont désormais regroupés en famille sur la base de leur similarité de séquence (Evans, 1988; Laudet V, 1992). Cette nouvelle stratification a permis d'inclure au sein de cette famille certains récepteurs dont les ligands endogènes étaient - ou sont toujours – inconnus. L'activité de ces RN, appelés RN orphelins, serait indépendante de la liaison d'un ligand (Giguere, 1999). Une sous-famille particulière de RN orphelins, qui est la famille des NR4As, est détaillée dans la **section [1.1.1.2](#)**.

1.1.1.2 Les NR4As et NUR77

NUR77 (NR4A1, également connu sous les noms de TR3, NGFIB) appartient à la sous-famille 4 des récepteurs nucléaires avec NURR1 (NR4A2) et NOR-1 (NR4A3). *NUR77* a été initialement identifié comme un gène induit par le facteur de croissance nerveux (NGF) (*Nerve-Growth Factor Inducible gene B*, NGFI-B), dans les PC12, une lignée cellulaire dérivée d'un phéochromocytome de la médullosurrénale du rat (Milbrandt, 1988). *NURR1* a été isolé d'une

bibliothèque d'ADNc de cerveaux néonataux de souris (Davis, 1994) et *NOR-1* a été identifié dans des cellules en culture issues du cerveau antérieur de rat foetal (Ohkubo et al., 2002). À la base étudiés dans des mécanismes liés au cerveau, ces trois RN sont toutefois ubiquitaires et ils sont impliqués à différents niveaux physiologiques comme dans le système nerveux, endocrine, immunitaires, etc (Giguère, 1999; Ranhotra, 2015a). Plus particulièrement, *NUR77* est largement exprimé dans les tissus du thymus, des muscles, des poumons, du foie, des testicules, des ovaires de la thyroïde et des glandes pituitaires (Giguère, 1999).

1.1.2- Structure

1.1.2.1 Les récepteurs nucléaires

Malgré leur diversité de taille, de forme et d'implication dans les processus biologiques, les RN présentent une importante similarité de structure. Exceptée pour la sous-famille 0 qui sera décrite dans la [section 1.1.3](#), l'architecture générale des RN est composée de 5 régions avec des séquences distinctes, identifiées de A à E (**Figure 1**), chacune ayant des fonctions spécifiques et étant dissociable du reste de la protéine.

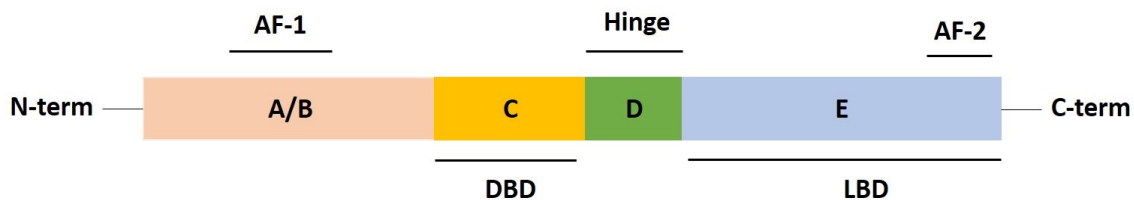


Figure 1 - Architecture générale des RN.

Les RN présentent une architecture similaire sous forme de régions. Les séquences de ces régions présentent une conservation variable. La région N-terminale A/B contient un domaine d'activation transcriptionnelle dit indépendant du ligand (Activation Function-1, AF-1). La région C correspond au domaine de liaison à l'ADN (DNA-Binding Domain, DBD), qui peut également contenir une séquence de localisation de signal nucléaire (NLS). La région D est dite charnière (« hinge »). La région C-terminale E correspond au domaine de liaison du ligand (Ligand Binding Domain, LBD) et contient un domaine d'activation de la transcription dépendant de la fixation d'un ligand (Activation Function-2, AF2).

Ces régions sont les suivantes :

-la région A/B, contenant la partie N-terminale, est la plus divergente au sein des RN. Cette région comprend le domaine AF-1 (*Activation Function-1*) qui est impliqué dans la régulation du récepteur. Cette régulation des RN est décrite de manière détaillée dans la section [1.1.4.1](#). L'activité du domaine AF-1 est indépendante de la présence d'un ligand mais elle est modulée par l'interaction avec de nombreux corégulateurs et par des modifications post-traductionnelles (PTMs) (Rochette-Egly, 2003b; Wärnmark, 2003). Le domaine AF-1 n'est pas conservé en termes de taille et de séquence au sein des RN, ce qui implique que la capacité d'activation des domaines AF-1 varie considérablement entre les RN et que leurs corégulateurs ne partagent généralement pas de motifs communs. À titre d'exemple, les protéines *TATA box-binding protein* (TBP), *Alteration/deficiency of activation 2* (Ada2p) et *response element binding protein-binding* interagissent avec le domaine AF-1 du récepteur des glucocorticoïdes (GR) mais ces coactivateurs ne partagent pas de séquence ou d'homologie de structure connues (Almlof, Wallberg, Gustafsson et Wright, 1998; Ford, McEwan, Wright et Gustafsson, 1997; Henriksson et al., 1997). Ceci entraîne une caractérisation plus ardue des corégulateurs du domaine AF-1. Des travaux ayant pour objectif de caractériser ce domaine pour certains RN comme GR et le récepteur des œstrogènes (ER) ont révélé que la structure de ces domaines était perturbée lorsqu'ils étaient isolés (Dahlman-Wright et al., 1995; Wärnmark, Wikstrom, Wright, Gustafsson et Hard, 2001). Cependant, l'interaction entre le domaine AF-1 et les corégulateurs semble spécifique et des études suggèrent que des structures ou des replis stables et communs existent entre ces domaines chez les différents RN intégraux (Tremblay, Tremblay, Labrie et Giguere, 1999; Wärnmark, Treuter, Wright et Gustafsson, 2003). Par ailleurs, le domaine AF-1 contient de nombreux sites de phosphorylation et il a été suggéré que cette modification et d'autres modifications post-traductionnelles (MPTs), qui seront détaillées dans la section 1.2, pouvaient influencer le repliement du domaine AF-1 ou du récepteur en entier (Wärnmark et al., 2003). Une hypothèse serait que la phosphorylation stabiliserait le complexe corégulateurs/AF-1 en modifiant la polarité du récepteur ou en modifiant les surfaces d'interaction entre les corégulateurs et le récepteur.

-la région C comprend le domaine de liaison à l'ADN (*DNA Binding Domain*, DBD) qui est la région la plus conservée au sein des RN. Le DBD est formé de deux doigts de Zinc qui contiennent chacun 4 résidus cystéine (Thompson, 2003). Cette structure unique permet aux RN d'interagir

avec l'ADN, en général dans la région du promoteur du gène cible, par des interactions spécifiques avec des motifs de type PuGGTCA ou PuGAACA (Pu étant la purine) et par des interactions non-spécifiques avec des phosphates. Cette région participe également à la dimérisation des RN (Claessens, 2004). La séquence de localisation nucléaire (NLS), responsable du transport du récepteur vers le noyau, peut être retrouvée dans cette région (Germain, 2006).

-la région D contient le domaine dit charnière (*hinge*) car il est situé entre le DBD et le LBD. C'est une région courte et peu conservée en termes de taille et de séquence entre les RN. Elle sert de lien flexible et permet au RN d'adopter différentes conformations tout en limitant les encombrements stériques (Haelens, Tanner, Denayer, Callewaert et Claessens, 2007). Cette région est également la cible de PTMs régulateurs et peut contenir un NLS (Germain, 2006).

-la région E contient le domaine de liaison du ligand (*Ligand Binding Domain*, LBD). Cette région est un domaine multifonctionnel complexe, qui est à la fois responsable de la liaison d'un ligand, de la dimérisation et de l'interaction avec des protéines co-régulatrices (Moras D, 1998). Ce domaine, structurellement conservé, contient 12 hélices alpha (H1 à H12) et un feuillet bêta entre les hélices 5 et 6. Le repliement de cette structure forme une poche de liaison du ligand (*Ligand Binding Pocket*, LBP) qui est bordée d'acides aminés essentiellement hydrophobes à la base du récepteur. La présence de résidus polaires sur la partie inférieure du LBP permettrait la reconnaissance sélective et l'ancrage du ligand dans le LBP (Lib, 2011). La superposition des structures des LBD des RN révèle que la partie supérieure du RN est très similaire alors que la partie basale contenant le LBP est très variable, ce qui expliquerait pourquoi différents RN reconnaissent différents ligands (Germain, 2006). Le LBD contient également une surface de transactivation (*Activation Function-2*, AF-2) dépendante du ligand correspondant à un site de liaison des corégulateurs (Aranda, 2001; Wärnmark, 2003). Un grand nombre de corégulateurs se liant au domaine AF-2 exhibe le motif consensus LXXLL (L étant la Leucine et X un acide aminé quelconque) aussi appelé *Nuclear Receptor box* (NR box), qui sert d'interface d'interaction entre les corégulateurs et le domaine AF-2 (Chang, 1999; Heery, Kalkhoven, Hoare et Parker, 1997). L'hélice 12 ou hélice de la fonction trans-activatrice est cruciale pour la formation de la surface de liaison du coactivateur avec le LBD (Schwabe, 1996). Cette hélice change de conformation selon la liaison d'un ligand et modifie ainsi l'orientation de la surface AF-2 pour faciliter l'interaction avec différentes protéines corégulatrices (Batista, 2013; Burris, 2013).

1.1.2.2 Les NR4As et NUR77

Appartenant à la même sous-famille des RN, les NR4As ont une structure très similaire. Le DBD est la région la plus conservée avec plus de 90% d'identité de séquence. Le LBD est relativement bien conservé avec ~60% de similitude tandis que la région N-terminale contenant le AF-1 ne présente que 27% de similitude entre les NR4As (Martínez-González, 2005) (**Figure 2**). Les analyses structurales ont révélé que NUR77 contient 2 motifs en doigt de zinc dans son DBD qui contiennent chacun un NLS du récepteur et trois Signaux d'Export Nucléaires (NES) dans son LBD qui sont impliqués dans l'export de NUR77 du noyau vers le cytoplasme (Katagiri, 2000).

	N-terminal	DBD	LBD
Similarité NR4As	26-28%	94-95%	58-65%

Figure 2 - Similarité de structure entre les différents membres de la famille de NR4As.

Les domaines des trois membres de la famille des NR4As possèdent des pourcentages de similarité d'acides aminés variables. En moyenne, le domaine N-terminal présente 27% de similitude, le DBD 95% et le LBD 60%. (Figure inspirée de (Kurakula, Koenis, van Tiel et de Vries, 2014))

Malgré leur appartenance à la famille des RN et certaines similarités au niveau de leurs mécanismes d'action, ces RN présentent des domaines et modes de fonctionnement atypiques qui seront décrits à la **section [1.1.4.2](#)**.

1.1.3- Classification des récepteurs nucléaires

Selon leur homologie de séquence, les RN sont classés en sept sous-familles (Germain, 2006; Owen, 2000) :

-la sous-famille 0 (NR0) comprend les RN dits « atypiques » DAX et SHP. Ils sont uniques en termes de structure car ils ne contiennent qu'un domaine de liaison du ligand (LBD) (Pardridge, 1981; Watanabe, Tani, Watanabe et Seno, 1991).

-la sous-famille 1 (NR1) est dite *TR-like*. Elle est constituée des récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR) (Evans, 1988), des récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR) (Giguere, Ong, Segui et Evans, 1987), des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) (Issemann et Green, 1990), des récepteurs rev-Erb (REV-ERB) et des récepteurs apparentés aux récepteurs de l'acide rétinoïque (ROR) (Guillaumond, Dardente, Giguere et Cermakian, 2005), des récepteurs X des farnésoïdes (FXR) (Leblanc et Stunnenberg, 1995), des récepteurs des oxystérols ou *liver X receptors* (LXR) (Calkin et Tontonoz, 2012) et des récepteurs de la vitamine D (VDR) (Hausler, 1986). Ces récepteurs sont régulés par différentes molécules de signalisation lipophiles dont les hormones thyroïdiennes, les acides gras, les acides biliaires et les stérols.

-la sous-famille 2 (NR2), dite *RXR-like*, contient les récepteurs X des rétinoïdes (RXR) (Mangelsdorf, 1995a), le facteur de transcription du promoteur proximal du gène de l'ovalbumine de poulet (COUP-TF) (Park, 2003) et le facteur nucléaire hépatocytaire 4 (HNF4) (Watt, 2003). Les études structurales ont mis en évidence que tous ces RN liaient des acides gras. Cependant, le rôle essentiel de ces ligands dans la régulation de l'activité de ces RN reste à démontrer. Il faut cependant souligner que RXR est le seul récepteur de ce groupe avec un ligand connu qui l'active, l'acide 9-cis rétinoïque (Levin et al., 1992), les autres membres de cette famille étant considérés comme RN orphelins. De plus, RXR joue un rôle important dans la famille des RN car il forme des complexes hétérodimériques avec plusieurs autres RN (Perlmann et Jansson, 1995).

-la sous-famille 3 (NR3) est appelée *ER-like* et comprend les récepteurs stéroïdiens. Elle inclut ER et les récepteurs reliés aux récepteurs des œstrogènes (ERR) (Giguere, Yang, Segui et Evans, 1988), le récepteur des androgènes (AR) (Gao, 2005), le récepteur de la progestérone (PR) (Hanukoglu, 1992), GR (Giguere, Hollenberg, Rosenfeld et Evans, 1986) et le récepteur des minéralocorticoïdes (MR) (Hanukoglu, 1992). Ces récepteurs sont régulés par la liaison directe des hormones dérivées du cholestérol comme le cortisol ou les œstrogènes.

-la sous-famille 4 (NR4) dite *NGFIB-like* comprend le facteur de croissance des nerfs 1-B (NGF1-B, NUR77), la protéine liée au récepteur nucléaire 1 (NURR1) et le récepteur dérivé des neurones 1 (NOR-1) (Maruyama, 1998). Ces récepteurs sont toujours classés comme orphelins et seront détaillés dans la section 1.2. NURR1 est connu pour son importance dans le développement et le maintien des neurones dopaminergiques (Jankovic, Chen et Le, 2005; Saucedo-Cardenas O, 1998).

-la sous-famille 5 (NR5), *SF1-like*, contient le facteur 1 stéroïdogénique (SF-1) et l'homologue 1 du récepteur du foie (LRH-1) (Pardridge, 1981; Watanabe et al., 1991). Même s'ils sont généralement classés comme récepteurs orphelins, des études suggèrent que ces récepteurs sont régulés par des phospholipides (Krylova, 2005; Ortlund, 2005).

-la sous-famille 6 (NR6) contient un seul récepteur qui est le facteur nucléaire des cellules germinales (GCNF) (Zechel, 2005). Ce récepteur est orphelin car son LBD diffère des autres RN de manière critique et pourrait conduire à la répression de l'expression des gènes cibles (Okumura, Lesch et Page, 2013).

Un résumé de cette classification est présenté dans le **Tableau 1**.

Sous-types	Récepteurs Nucléaires
NR0	DAX, SHP
NR1	TR, RAR, PPAR, REV-ERB, ROR, FXR, LXR, VDR
NR2	RXR, COUP-TF, HNF4
NR3	ER, EER, AR, PR, GR, MR
NR4	NUR77, NURR1, NOR-1
NR5	SF-1, LRH-1
NR6	GCNF

Tableau 1 – Classification des RN selon leur homologie de séquence

Inspirée de (Weikum, Liu et Ortlund, 2018)

Une autre classification divisant les RN en quatre grandes groupes existe également, cette fois basée sur leur mécanisme d'action, décrite dans la **section 1.1.4** (Maira, Martens, Philips et Drouin, 1999; Philips et al., 1997).

1.1.4- Mécanismes d'action

1.1.4.1 Les récepteurs nucléaires

1.1.4.1.1 La liaison à l'ADN

Même s'ils ont une fonction commune de réguler l'expression des gènes cibles et des mécanismes d'action globalement similaires, les RN présentent des variations dans certains aspects de ces mécanismes (**Figure 3**) (Weikum et al., 2018):

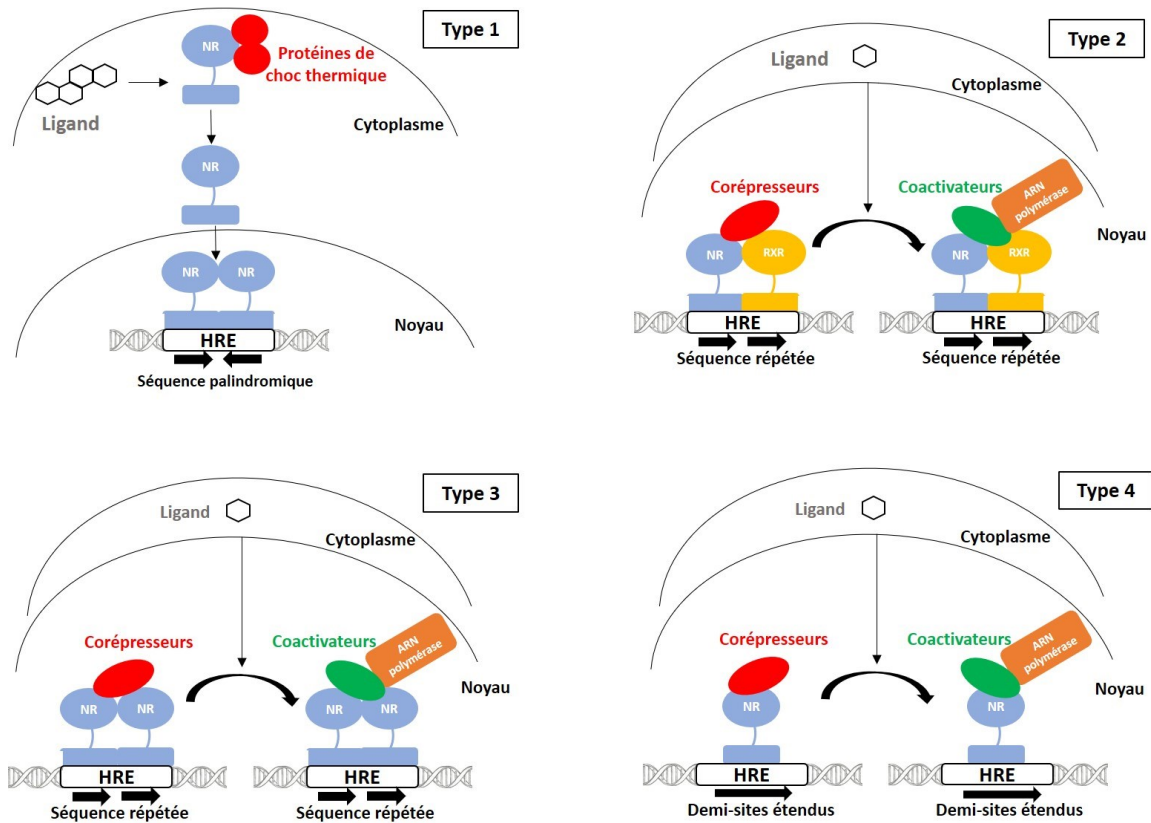


Figure 3 - Les 4 mécanismes d'action des RN.

Les membres de la famille des RN sont divisés en 4 types d'activation transcriptionnelle avec des variantes dans ces mécanismes. Dans le type 1, les RN se dissocient des protéines chaperonnes du cytoplasme après activation par un ligand et sont transloqués dans le noyau. Ils se lient alors à l'ADN en homodimères. Les RN du type 2 sont déjà dans le noyau et liés à l'ADN, généralement en hétérodimères avec RXR. Le complexe de corépresseurs liés à ces RN est échangé pour un complexe de coactivateurs et la machinerie transcriptionnelle à la suite

de l'activation par un ligand. Les types 3 et 4 fonctionnent comme le type 2 mais sous forme d'homodimères et de monomères respectivement. (Figure inspirée de (Weikum et al., 2018))

-Type 1 : les récepteurs qui suivent ce mode d'activation transcriptionnelle sont des récepteurs stéroïdiens activés par des hormones dérivées du cholestérol, tel que ER, GR, AR et PR (Fuller, 1991). Ces récepteurs sont séquestrés dans le cytoplasme où ils sont liés à des protéines chaperonnes, les protéines de choc thermique (*Heat shock proteins*) (**Figure 3**). Sous activation d'un ligand, il y a dissociation de ces protéines et translocation du récepteur dans le noyau. Néanmoins, il a été démontré que certains RN intégrés dans ce type d'action peuvent également être liés à leurs éléments de réponse dans le noyau, même en l'absence de ligand comme ER, AR et GR (Aronica et Katzenellenbogen, 1993; Patrone, Gianazza, Santagati, Agrati et Maggi, 1998; Weigel et Zhang, 1998). Dans ce cas, ce n'est pas le ligand mais les modifications post-traductionnelles (MPTs), détaillées à la section 1.2., qui régulent l'activité des RN. Les RN du type 1 peuvent s'homodimériser et se lier à l'ADN sur des éléments de réponse palindromiques contenant la séquence 5'- AGAACA - 3', sauf pour les ERs qui se lient à une séquence 5'- AGGTCA - 3' (Claessens, 2001; Leo, 2000).

-Type 2 : les récepteurs qui suivent ce mode d'activation transcriptionnelle sont les RAR et les LXR sont souvent retrouvés dans le noyau, indépendamment de la présence d'un ligand activateur (Tata, 2002). Avant la liaison d'un ligand, le récepteur est lié de façon constitutive à un complexe de corépresseurs. Après liaison du ligand, le complexe de corépresseurs est déplacé et remplacé par un nouveau complexe, formé cette fois de coactivateurs et de la machinerie transcriptionnelle. Ces récepteurs forment communément des hétérodimères avec RXR sur des séquences consensus répétées 5'- AGGTCA- 3' (Mangelsdorf, 1995b).

-Type 3 : ce type de RN a un mécanisme d'action similaire au type 2 mais ils forment des homodimères sur leurs éléments de réponse qui sont aussi des séquences directes répétées (Gronemeyer et Moras, 1995).

-Type 4 : ces RN ont également un mécanisme d'action similaire au type 2 mais se lient à l'ADN sous forme monomère et reconnaissent des éléments de réponse dits demi-sites étendus. Ce type inclut LRH-1 et SF-1 (Little, 2006; Weikum, 2016).

Attribuer les RN à une catégorie unique n'est pas toujours possible car certains RN opèrent par différents types de mécanismes d'action, comme NUR77 qui peut se lier à l'ADN en monomère, en homodimère et en hétérodimère avec RXR, NURR1 et NOR-1 (Mukherjee et Mani, 2010; Perlmann et Jansson, 1995). Nous reviendrons sur ce RN spécifique et son activation dans la section 1.1.4.2. Par ailleurs, bien que les récepteurs stéroïdiens n'interagissent pas avec RXR, ils peuvent être retrouvés dans le noyau en absence de ligand tel qu'énoncé précédemment. Aussi, certains RN ont également un mécanisme d'action atypique en modulant l'expression des gènes de manière combinée avec un autre facteur de transcription ou encore sans interagir avec l'ADN, par le biais d'autres facteurs de transcriptions - comme le complexe de protéines AP-1 (*Activator Protein 1*) et Fos/Jun pour ER (Kushner et al., 2000) et NF- κ B pour GR revu dans (Ratman et al., 2013) – ou par le biais du complexe du médiateur (complexe protéique qui facilite l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription et des RN) (Fondell, Ge et Roeder, 1996), qui lui interagit avec le facteur de transcription lié à l'ADN revu dans (Belakavadi et Fondell, 2006)

Il est admis que les RN orphelins pour lesquels aucun ligand n'a été découvert à ce jour, ne sont pas activés par un ligand, comme il a été décrit dans cette section. Leur activité est modulée autrement, notamment par des MPTs ou encore par des interactions protéines-protéines et avec des corégulateurs, comme il a été revu dans (Giguere, 1999). Ces parties seront notamment détaillées dans les sections 1.2 et 1.3 Ceci démontre l'importance d'étudier des différents mécanismes d'action et de régulation des RN, et plus particulièrement des RN orphelins. Une description plus en profondeur des mécanismes d'action des RN orphelins et particulièrement des NR4As sera présentée à la **section [1.1.4.2](#)**.

1.1.4.1.2 La régulation de la transcription

À travers leurs différents mécanismes d'action, les RN vont se lier au niveau des promoteurs (régions régulatrices de gènes cibles) et ainsi moduler la transcription de ces gènes au niveau de ces sites d'initiation de la transcription (Beato, 1991). Pour se faire, les RN recrutent les composants de la machinerie transcriptionnelle, à savoir les facteurs généraux de la transcription, les facteurs TFII, et l'ARN polymérase II qui réalise la transcription de l'ADN en ARN, revu dans (Latchman, 1993). Afin de caractériser en profondeur le recrutement de la machinerie transcriptionnelle par les RN, des études évaluant la liaison de RN sur leurs gènes cibles après traitement de cellules par des ligands ainsi que la localisation de l'ARN polymérase II en parallèle

ont été entreprises tel qu'il a été revu dans (Kininis et Kraus, 2008). Ces travaux ont démontré que l'ARN polymérase II pouvait interagir au niveau des promoteurs mais également des *enhancers* ou *silencers*. Ces dernières régions sont des régions régulatrices, souvent situées à distance des promoteurs et impliquées dans l'amplification ou la répression de la transcription des gènes cibles, respectivement (Huang, Schwyter, Shirokawa et Courey, 1993). Par ailleurs, les RN peuvent moduler le recrutement de la machinerie transcriptionnelle au niveau de ces régions en interagissant avec des protéines de régulation de l'ARN polymérase II.

En parallèle, les RN recrutent des coactivateurs et corépresseurs qui interagissent avec leurs domaines AF-1 et AF-2 (Warnmark et al., 2003). Comme il a été décrit dans **la section 1.1.2**, le potentiel d'activation de chacun de ces domaines d'activation dépend de la liaison des corégulateurs, des MPTs mais également du type cellulaire et du type de promoteur (Tzukerman et al., 1994). Certains corégulateurs des RN sont partagés avec d'autres facteurs de transcription se liant à l'ADN, tels que des protéines modifiant les histones (protéines associées à l'ADN et formant le nucléosome), notamment la protéine P300 qui est une *Histone acetyltransferase* (HAT), ou encore des facteurs de pontage, comme le coactivateur des récepteurs stéroïdiens (SRC) qui a pour fonction de recruter les enzymes de modification des histones (McKenna, Lanz et O'Malley, 1999; Orphanides, Lagrange et Reinberg, 1996). Ces corégulateurs peuvent interagir au niveau des promoteurs proximaux, situés environ 250 paires de base en amont du site d'initiation de la transcription, ou des promoteurs distaux, situés bien plus loin en amont (Aslam, 1995).

Lors de l'activation de la transcription des gènes cibles médiée par les RN, des modifications de l'état de la chromatine et des histones sont observés au niveau des promoteurs où se lient les RN (Oikarinen, 1991; Tsai et Fondell, 2004). Les modifications des histones modifient l'accessibilité à la chromatine. On distingue notamment l'acétylation et la désacétylation par les enzymes HAT et *Histone Désacétylases* (HDAC), respectivement, qui ajoutent et hydrolysent un groupement acétyle sur un résidu lysine, revu dans (Lehrmann, Pritchard et Harel-Bellan, 2002), ainsi que la méthylation et la déméthylation par les *Histones méthyltransférases* et les *Histones déméthylases*, qui ajoutent et hydrolysent un groupement méthyl sur un résidu lysine ou arginine revu dans (Chen et Riggs, 2011), de manière respective. Ces modifications entraînent un recrutement plus ou moins favorable du complexe de la machinerie transcriptionnelle ou des corégulateurs des RN, ou modifient des sites de liaison de protéines régulatrices sur les histones.

En général, l'acétylation des histones augmente l'accessibilité à la chromatine comme l'acétylation de l'histone H3 sur les résidus lysine 9 (K9) et 14 (K14) revu dans (Bannister et Kouzarides, 2011). La méthylation des histones est plus complexe car certaines histones méthylées témoignent d'une activation de la transcription comme sur le résidu K4 de l'histone H3 tandis que d'autres correspondent aux marqueurs d'une répression (triméthylation de l'histone H3 en K9 par exemple), tel qu'il a été revu dans (Bannister et Kouzarides, 2011).

1.1.4.2 Les NR4As et NUR77

1.1.4.2.1 *La liaison à l'ADN*

Les NR4As et NUR77 exercent principalement leur activité de facteur de transcription en se liant à l'ADN de trois manières différentes (**Figure 4**) :

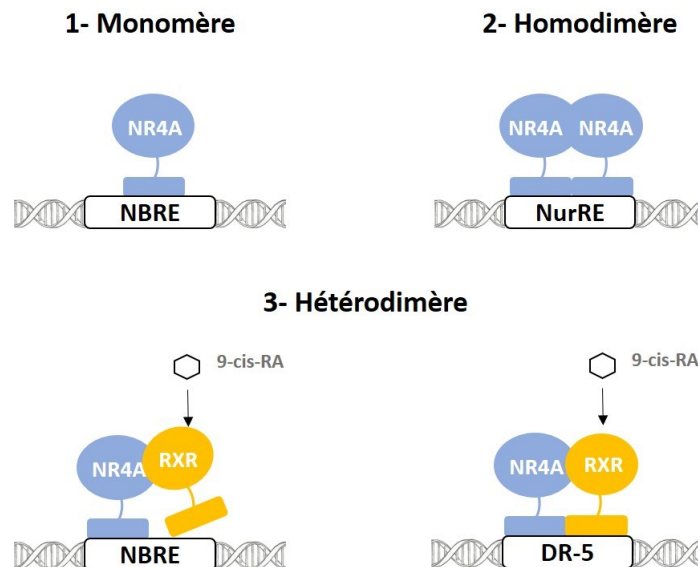


Figure 4 - Les 3 mécanismes d'action des membres de la famille des NR4As.

Les membres de la famille des NR4As peuvent se lier à l'ADN de 3 manières différentes : (1) en monomère sur les éléments de réponse de NGFIB (NBRE), (2) en homodimère sur les éléments de réponse NurRE et (3) en hétérodimère avec le Récepteur X aux rétinoïdes (RXR) pour NUR77 et NURR1 sur les éléments de réponse NGFI-B et rétinoïdes DR-5 (Figure inspirée de (Lévesque, 2007)).

1- Ils peuvent se lier en monomère à une séquence octamérique, l'élément de réponse de NGF1-B (NBRE, 5'-AAAGGTCA-3'). Le site NBRE contient l'hexanucléotide AGGTCA, un demi-site des séquences reconnues par ER, TR et RAR, additionné de deux résidus adénines qui les précèdent. La reconnaissance spécifique de ces deux adénines se fait par la partie C-terminale du DBD des NR4As (Wilson, 1992).

2- Ils peuvent également se lier à l'ADN en homodimère ou hétérodimères avec un autre membre de la famille NR4As à l'élément *Nur-response element* (NurRE, 5'-TGACCTTXX₆AAAGGTCA-3') (Maira et al., 1999; Philips et al., 1997).

3- NUR77 et NURR1, mais pas NOR-1, peuvent également s'hétérodimériser avec RXR en se liant soit à une séquence NBRE (Forman, 1995), soit à un élément de réponse des acides rétinoïques, le *Direct-Repeat 5 responsive element* (DR-5, 5'-GGTTCAAX₅AGGTCA-3') (Perlmann et Jansson, 1995). Cette hétérodimérisation explique pourquoi NUR77 et NURR1 peuvent être régulés par les réxinoïdes, ligands des RXR (Lévesque, 2007; Perlmann et Jansson, 1995).

Comme dans le cas d'autres RN mentionnés dans la section 1.1.4.1., les NR4As peuvent eux aussi réguler la transcription de gènes cibles en interagissant avec d'autres facteurs de transcription. Dans certains cas, ces facteurs de transcription sont liés à l'ADN, et dans d'autres, ne sont pas liés à l'ADN mais modifient la liaison des NR4As à l'ADN - comme décrit ci-après. Dans des cellules de Leydig traitées aux ROS (*Reactive Oxygen Species*) et où NUR77 est surexprimé de manière transitoire, NUR77 interagit avec le facteur de transcription AP-1 (Lee et al., 2009). Ceci conduit à la répression de l'activité transcriptionnelle de NUR77 et à l'inhibition de la transcription des gènes qu'il régule, dont les produits sont impliqués dans la stéroïdogénèse testiculaire. À l'aide d'essais de co-immunoprécipitations et d'essais rapporteurs, des travaux ont mis en évidence une interaction entre les différents NR4As et GR à travers leur domaine de liaison à l'ADN (Martens, Bilodeau, Maira, Gauthier et Drouin, 2005). Ceci conduit à une répression de l'activité transcriptionnelle de ces récepteurs après qu'ils ont été surexprimés de manière conjointe avec l'élément de réponse en homodimère des NR4A (NurRE) dans des fibroblastes issus du rein (CV-1). À l'aide d'essais de ChIP, la liaison de GR au niveau du promoteur du gène de la proopiomélanocortine (POMC), qui présente un élément de réponse NurRE, après traitement aux glucocorticoïdes a été mise en évidence. Comme les NR4As se lient au promoteur ce gène de manière endogène en homo- et en hétérodimères (Drouin, Maira et Philips, 1998; Murphy et

Conneely, 1997), les auteurs suggèrent qu'un mécanisme de compétition de la liaison de ces facteurs de transcription au gène de la POMC serait impliqué (Martens et al., 2005).

1.1.4.2.2 Des domaines et des activités atypiques

Les NR4A appartiennent à la famille des RN orphelins, comme il a été décrit dans la section 1.1.3. Ceci signifie qu'à ce jour, aucun ligand endogène qui ne puisse se lier à leur LBD n'a été mis en évidence. Néanmoins, il est admis que ces RN sont constitutivement actifs, c'est-à-dire que leur activité serait indépendante de la liaison d'un ligand (Ranhotra, 2015b; Zhao et Bruemmer, 2010b). Par ailleurs, ces RN possèdent la caractéristique unique d'être des gènes de réponse rapide, ce qui signifie que leur expression en ARNm est induite de manière transitoire, aiguë et rapide par une variété de stimuli dans différents types cellulaires. Différents stimuli peuvent induire leur expression: les facteurs de croissance, les hormones peptidiques, les esters de phorbol, les acides gras, le stress ou encore les neurotransmetteurs, revu dans (Maxwell et Muscat, 2006).

Ces RN présentent également des domaines atypiques qui influencent leur mode d'action en comparaison aux autres RN. En effet, le domaine AF-1 des NR4A est atypique car il est actif sans nécessité de liaison des coactivateurs, comme il a été revu dans (Maxwell et Muscat, 2006). Par ailleurs, bien que les NR4A ne présentent pas une similarité de structure élevée au niveau de leur LBD (voir [section 1.1.2.2](#)), de grandes similitudes existent au niveau de leur conformation, qui est également non conventionnelle pour un RN. En effet, les structures cristallines du LBD de NUR77 et NURR1 révèlent une poche de liaison du ligand fermée. Ceci est dû à la présence de volumineuses chaînes latérales d'acides aminés hydrophobes qui la rend inaccessible à la liaison d'un ligand (Flaig, 2005; Wang, 2003). Cette caractéristique du LBD se retrouve par ailleurs chez le récepteur DHR38, le récepteur orthologue/ancêtre des NR4As chez la drosophile (Baker, 2003).

Enfin, l'activité de ces RN peut être modulée par les modifications post-traductionnelles et par les interactions avec d'autres protéines ou des corégulateurs se liant à leurs domaines de transactivation, qui seront décrites plus en détails dans les [sections 1.2](#) et [1.3](#), respectivement.

1.1.4.2.3 Des ligands potentiels

Si plusieurs études classent ces RN comme des récepteurs orphelins sur la base de l'absence de ligands endogènes (Benoit, Malewicz et Perlmann, 2004), d'autres travaux soulignent un certain nombre de molécules comme ligands potentiels – notamment pour NURR1 et NUR77 (Popichak,

2018b; Wu et Chen, 2018). Ainsi, la prostaglandine E1 (PGE1) et son métabolite déshydraté (PGA1), pourraient se lier à NURR1 et induire son activité transcriptionnelle (Rajan S, 2020) et la cytosporone b, le celastrol, le TMPA (*Ethyl 2-[2,3,4-trimethoxy-6-(1-octanoyl)-phenyl] acetate*) et le DIM-C-pPhOCH₃ (*1,1-bis(3'-Indolyl)-1-(p-methoxyphenyl)methane; 3,3'-[(4-Methoxyphenyl)methylene]bis-1H-indole*), pourraient induire l'activité transcriptionnelle de NUR77 (Chintharlapalli et al., 2005; Hu M, 2017; Zhan Y, 2008). Une étude récente évaluant l'effet de 12 ligands potentiels de NURR1 et NUR77, sur l'activité transcriptionnelle de NURR1 et la liaison à son LBD, a mis en évidence que ces ligands agiraient de manière indirecte sur l'activité de NURR1 (Munoz-Tello et al., 2020). À l'aide de la technique de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), les auteurs démontrent que seulement 3 ligands se lieraient réellement à NURR1, à savoir l'amodiaquine, la chloroquine et la cytosporone-b. Une autre étude récente soutient que la cytosporone-b se lierait au LBD de NUR77, entraînant la formation d'un homodimère (Yang PB, 2020). Néanmoins, les affinités de ces molécules sont toujours faibles, ce qui requiert une concentration élevée de ligand lors de ces études - de l'ordre du µM.

Même si le mode d'action des NR4As et plus spécifiquement de NUR77 est toujours à l'étude, différentes fonctions de ce RN ont été démontrées et elles seront détaillées à la **section 1.1.6**.

1.1.5- Les RN comme cibles thérapeutiques d'intérêt

L'implication des RN dans de multiples processus biologiques et pathologiques en font des cibles thérapeutiques très populaires, comme le démontrent les chiffres : en 2017, 16% des drogues commercialisées ciblaient les RN, revu dans (Santos, 2017). Par ailleurs, différents aspects de l'activité des RN - tels que leur expression, leurs niveaux protéiques et leur localisation - peuvent être régulés par des petites molécules lipophiles qui peuvent être compétitionnées par un ligand synthétique, ce qui permet de les cibler plus facilement pour des thérapies. Les ligands peuvent agir comme des agonistes ou des antagonistes purs, mais aussi comme des agonistes ou des antagonistes partiels. Les agonistes partiels modifient la structure du récepteur mais engendrent un recrutement partiel de cofacteurs, et donc des effets biologiques différents (Sladek, 2003). Ce recrutement spécifique peut engendrer des effets spécifiques aux tissus ou aux gènes, selon l'expression des corégulateurs dans les différents tissus ou leur recrutement au niveau de différentes séquences régulatrices de gènes respectivement (Thompson, 2003). Cette capacité à

moduler de manière sélective les RN a été exploitée en clinique, notamment avec le développement de modulateurs sélectifs de ER comme il a été revu dans (Patel et Bihani, 2018), AR (Narayanan, Coss et Dalton, 2018) et PPAR (Sporn, 2001). Le **Tableau 2** présente des molécules ciblant les RN dans différentes pathologies ayant été approuvées par des agences gouvernementales ou qui sont encore à l'étude.

Médicament	RN	Maladie	Statut	Références (revues)
Apalutamide (<i>antagoniste</i>)	AR	Cancer de la prostate non métastatique	Approuvé en 2018 (FDA, US)	(Zhao, Zhou et Gustafsson, 2019)
Pemafibrate (<i>agoniste</i>)	PPARα	Hyperlipidémie	Approuvé en 2017 (PMDA, Japan)	(Cheng et al., 2019)
Rosiglitazone (<i>agoniste</i>)	PPARγ	Forme modérée de la Maladie d'Alzheimer	Phase 3: échec en monothérapie dans la cognition ou les fonctions globales	(Cheng et al., 2019)
Pioglitazone (<i>agoniste</i>)	PPARγ	Maladie de Parkinson	Phase 2: échec en monothérapie dans la modification de la progression de la maladie	(Cheng et al., 2019)
Fulvestrant (<i>Selective ER Degradier</i>)	ER	Cancer du sein (ER+, HER2-, métastatique avancée)	Approuvé en 2002 (FDA, US) et 2004 (Santé Canada)	(Zhao et al., 2019)
Composé C-DIM	NURR1	Maladie de Parkinson	Études pré-cliniques	(Moutinho, Codocedo, Puntambekar et Landreth, 2019)

Tableau 2 – Liste non exhaustive des molécules ciblant les RN dans des maladies spécifiques

Liste non exhaustive de molécules ciblant certains RN sélectionnés dans différentes pathologies (métaboliques, cancers et neurodégénératives) et statut d'approbation de ces molécules. Ces molécules ont été revues dans (Cheng et al., 2019; Moutinho et al., 2019; Zhao et al., 2019)

Une attention toute particulière est accordée aux RN orphelins, notamment aux membres de la famille des NR4As et à NUR77, impliqués dans de nombreux processus métaboliques et cancéreux, pour le développement de ligands synthétiques à des fins thérapeutiques. Néanmoins, le développement de médicaments pour ces récepteurs peine à aboutir en raison d'un manque de caractérisation approfondie de la régulation de ces récepteurs. Les essais en sont encore au stade pré-clinique pour cibler ce type de récepteurs, comme le récepteur NURR1 cité dans le **Tableau 2** (Shi, 2007). L'un des éléments clés pour développer des modulateurs d'un RN est d'identifier dans un premier temps les cofacteurs qui se lient au RN d'intérêt et de déterminer leur distribution tissulaire et leur profil d'expression durant le développement afin de prédire les effets systémiques de ces ligands.

1.1.6- Les fonctions de NUR77

1.1.6.1 Un facteur de transcription important

Comme tout RN, NUR77 est impliqué dans la régulation de différents procédés biologiques et pathologiques à travers son rôle de facteur de transcription. NUR77 se lie à l'ADN dans le noyau par l'un des trois mécanismes de reconnaissance décrits dans la **section 1.1.4.2** et peut réguler directement l'expression de gènes cibles. Ce RN est connu pour réguler des fonctions multiples comme le métabolisme lipidique, les fonctions énergétiques et le système nerveux central comme il a été revu dans (Maxwell et Muscat, 2006).

Des expériences de *Chromatin immunoprecipitation* (ChIP) revues dans (Das, Ramachandran, vanWert et Singal, 2004), évaluant la liaison endogène de NUR77 à l'ADN, ont montré que ce RN se liait en monomère à l'élément de réponse NBRE (décrit en section 1.2.3) du promoteur de *AR* dans les cellules de granulosa de souris (Dai, 2012). L'expression de *AR* est ainsi stimulée et le KO de *NUR77* dans ces mêmes cellules entraîne son atténuation, suggérant que ce

récepteur est régulé par NUR77 dans les ovaires et que NUR77 participe au développement du follicule de l'ovocyte. Dans le muscle squelettique, NUR77 augmente l'expression du gène codant pour la protéine transporteur de glucose 4 (GLUT4) et favorise l'absorption et l'utilisation du glucose par le muscle squelettique (Chao, 2007b; Kanzleiter, 2010). Dans le foie, NUR77 augmente la production de glucose en induisant l'expression des gènes dont les produits sont impliqués dans la néoglucogenèse, notamment les gènes codant pour la glucose-6-phosphatase, la fructose biphosphatase 1/2 et l'énolase 3 (Pei, 2006; Zhao et Bruemmer, 2010a). NUR77 régule également l'expression du gène codant pour la Serpine A3, impliquée dans les réponses inflammatoires et interagissant avec le peptide amyloïde bêta, impliqué dans la maladie d'Alzheimer (Abraham, 1989). Cette régulation opère par la liaison de NUR77 sur un élément NBRE situé dans le promoteur de la Serpine A3 (Zhao, Liu et Zheng, 2008). Par ailleurs, des travaux ont démontré que NUR77 et NUR77 peuvent empêcher l'activité du facteur de transcription NF- κ B (Koenis, 2018; Popichak, 2018b), médiateur clé de multiples voies de signalisation associées à l'inflammation et à la survie cellulaire (Liu, Zhang, Joo et Sun, 2017). Cette répression s'opère dans les macrophages et la microglie, à travers la stabilisation des corépresseurs sur les éléments de réponse de NF- κ B, qui sont situés au niveau des régions promotrices des gènes dont les produits sont impliqués dans l'inflammation (Murphy et Crean, 2015; Popichak, 2018b; Saijo, 2009). Dans les cellules T issues de souris, l'expression stable de NUR77 inhibe la différenciation des cellules T alors que son KO rétablit cette différenciation (Liu et al., 2019). Les expériences de ChIP démontrent que NUR77 est recruté au niveau des sites de liaison du facteur de transcription AP-1 et inhibe ainsi son activité d'activation de la transcription des gènes dont les produits sont impliqués dans la différenciation cellulaire. Cette étude suggère que Nur77 serait impliqué dans le dysfonctionnement des cellules T et représente une cible thérapeutique potentielle dans l'immunothérapie. Enfin, des expériences de ChIP-seq suivies de ChIP-qPCR, menées dans des cellules leucémiques Kasumi-1 après surexpression de la protéine de fusion NUR77-GFP, révèlent que NUR77 se lie au niveau des *enhancers* (voir la **section 1.1.4.1.2**) des gènes *IL7R* (*Interleukin 7 Receptor*), *FLT3* (*Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3*) et *BCL6* (*B-Cell Lymphoma 6 Protein*), dont les produits sont impliqués dans la différenciation des lymphocytes (Duren, Boudreaux et Conneely, 2016). Des marques d'acétylation des histones H3K27 et H3K9, indicatrices d'une augmentation de l'accessibilité à la chromatine (également décrites dans la **section 1.1.4.1.2**), ont par ailleurs été observées au niveau des sites de liaison de

NUR77. Cette même étude démontre que NUR77 se lie également au niveau de promoteurs des gènes dont les produits sont impliqués dans la prolifération cellulaire, à savoir les gènes *BCL-2* et *c-MYC*, ce qui entraîne leur répression (Duren et al., 2016). Dans leur ensemble, ces travaux suggèrent que NUR77 pourrait également avoir un rôle dans les maladies inflammatoires et la réponse immunitaire. Par ailleurs, ils soutiennent l'implication de NUR77 comme un facteur de prolifération et un facteur pro-apoptotique, des rôles qui seront plus détaillés dans la [section 1.1.6.5](#).

1.1.6.2 Un récepteur nucléaire aux multiples activités non génomiques

En parallèle de ces études, des travaux portant sur l'activité non génomique de NUR77 ont augmenté au fil des années. Les fonctions de NUR77 sont différentes selon sa localisation (**Figure 5**).

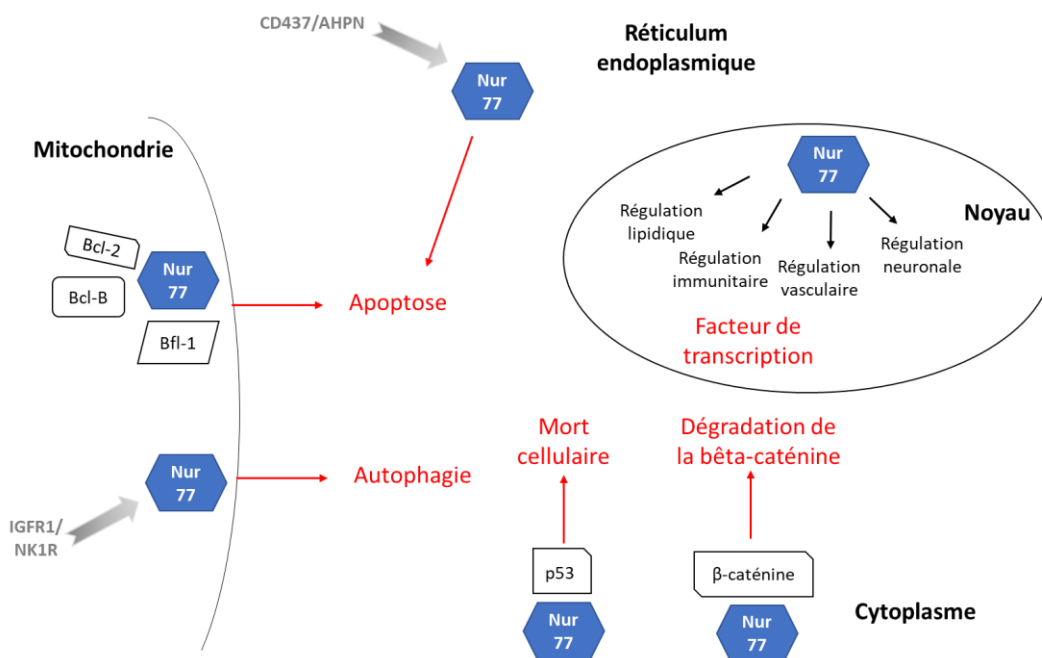


Figure 5 - Les différentes fonctions de NUR77.

Selon sa localisation et les stimuli auxquels il est soumis, NUR77 va exercer différentes fonctions au sein de la cellule. Dans le noyau, on estime que NUR77 exerce surtout des fonctions de facteur de transcription en régulant l'expression de gènes cibles dont les produits sont impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique, des fonctions vasculaires, immunitaires et neuronales. Dans la mitochondrie, il induit l'apoptose quand il interagit avec

BCL-2, BCL-B et BFL-1, et l'autophagie après une stimulation par IGF1R/NK1R. Dans le réticulum endoplasmique, il induit l'apoptose par suite d'une stimulation par CD437/AHPN. Dans le cytoplasme, il peut entraîner la mort cellulaire lorsqu'il interagit avec P53 ou la dégradation de la bêta-caténine en interagissant avec cette protéine (Figure inspirée de Pawlak et al, 2014).

Si sa fonction principale est celle d'un facteur de transcription quand il est situé dans le noyau, NUR77 est un facteur qui déclenche la mort cellulaire quand il est exporté vers d'autres organites cellulaires. La première description de l'activité non génomique de NUR77 démontre la délocalisation de NUR77 du noyau vers la mitochondrie suite à l'administration de stimuli apoptotiques : après traitement de cultures primaires de lymphocytes issues du sang périphériques par du TPA (*12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate*) et un ionophore de calcium qui induisent l'apoptose (Woronicz, 1994), NUR77 est transloqué à la mitochondrie. Les techniques de fractionnement cellulaire ont mis en évidence une accumulation du récepteur au niveau de la partie externe de la membrane mitochondriale. Par la suite, une étude a montré que lorsque NUR77 est situé dans la mitochondrie, son LBD interagit avec la boucle N-terminale de BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) (Lin, 2004), un membre de la famille des BCL qui sont des protéines importantes dans la régulation de la mort cellulaire programmée (apoptose) (Tsujimoto, 1998). Cette interaction entraîne la conversion de BCL-2 d'un facteur anti-apoptotique en un facteur pro-apoptotique et provoque le relargage du cytochrome c, protéine qui participe activement à l'apoptose à travers la régulation de l'activité des caspases (Lin, 2004). NUR77 semble également interagir avec d'autres membres de la famille BCL-2 comme BCL-B et BFL-1 et les convertir de facteurs protecteurs de la mort cellulaire à des facteurs initiateurs de la mort cellulaire (Luciano F, 2007).

Par ailleurs, un rôle de NUR77 dans l'autophagie, processus conduisant à la dégradation des composants cellulaires endommagés ou indésirables, est de plus en plus étayé (**Figure 5**). À la suite de la stimulation des récepteurs de IGF1R (*Insulin-like Growth Factor 1*) et de NK₁R (*neurokinin-1*) par des ligands dans les cellules HEK293, le phénomène de mort cellulaire impliquant l'autophagie, avec la présence de marqueurs associés, est observé. Dans ce cas, en plus d'une activité transcriptionnelle élevée dans le noyau, NUR77 est retrouvé dans le cytoplasme où il interagit avec la protéine tumorale P53, un facteur de transcription impliqué dans l'apoptose et

l'autophagie (Bouzas-Rodríguez, 2012). NUR77 interagit également avec P53 dans le noyau après surexpression dans les cellules HEK293, ce qui conduit à la diminution de l'activité transcriptionnelle de P53 en prévenant son acétylation (Zhao, 2006).

NUR77 peut aussi se rendre à la membrane externe du réticulum endoplasmique (**Figure 5**). Une étude montre que des traitements par le CD437/AHPN (*(6-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphthalene carboxylic acid)*) dans les cellules SK-N-SH issues d'un neuroblastome et les cellules EC109 et EC9706 provenant de carcinomes épidermoïdes œsophagiens humains, entraînent la translocation de NUR77 du noyau au réticulum endoplasmique et à la mitochondrie, ce qui conduit à une diminution de calcium au niveau du réticulum, engendrant un stress et par conséquent l'apoptose (Liang, 2007).

Enfin, une boucle de régulation existe entre NUR77 et la bêta-caténine, protéine dont l'activation aberrante contribue à la survie, à la prolifération et à la migration cellulaire, et qui est associée à différents cancers (Valenta, 2012) (**Figure 5**). Des études ont mis en évidence que cette protéine stimule la transcription de NUR77 (Wu, 2011) et que NUR77 contribue à la dégradation de la bêta-caténine par le protéasome dans les cellules du cancer du côlon *in vitro* et *in vivo* (Sun, 2012a).

1.1.6.3 Une redondance fonctionnelle entre les NR4As

En plus d'opérer par des mécanismes similaires décrits dans la **section 1.1.4.2**, les NR4As semblent également exercer une redondance fonctionnelle et une compensation en cas de l'absence de l'un des récepteurs. Dans des lymphocytes T des souris *Nur77 Knockout* (KO), *Nur77* n'est pas exprimé et ne peut donc pas assurer le déclenchement de la mort cellulaire, qui est alors enclenchée par NOR-1 (Lee, 1995). Par ailleurs, les souris KO à la fois pour *Nur77* et *NOR-1* succombent de leucémie myéloïde aiguë peu de temps après la naissance, suggérant de nouveau une redondance dans les fonctions exercées par NUR77 et NOR-1 (Shannon, 2007). *NUR77* possède également un rôle essentiel dans les fonctions de développement et de stéroïdogenèse, en activant notamment la transcription du gène codant pour la protéine StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory*), qui est une actrice essentielle de la biosynthèse des stéroïdes (Stocco, 2001), suite à la stimulation par l'AMPc dans les cellules de Leydig (Martin, Boucher, Brousseau et Tremblay, 2008). Des travaux ultérieurs ont par la suite démontré que l'activation de la transcription du gène codant pour la protéine StAR se faisait de manière additive par NUR77 et la protéine c-Jun, une protéine qui fait partie du

complexe du facteur de transcription AP-1 (Martin et Tremblay, 2009). Malgré ces preuves du rôle essentiel de NUR77 dans le développement et la stéroïdogenèse, les souris KO *Nur77* possèdent toutefois un phénotype reproducteur normal. Cette observation inattendue est attribuée à une compensation assurée par NURR1, qui semble avoir une activité redondante avec celle de NUR77 dans ces fonctions (Crawford, 1995).

Même si des études ont décrits des fonctions similaires entre les NR4As, il semble que leur liaison aux régions de régulations des gènes cibles puissent être distinctes. En effet, il a été démontré que le DBD de NUR77 et NOR-1, mais pas de NURR1, était nécessaire pour assurer la répression des gènes cibles du proto-oncogène *MYC* dans des cellules leucémiques Kasumi-1 (Boudreaux, Ramirez-Herrick, Duren et Conneely, 2012). Une délétion de ces domaines après surexpression stable de NUR77 et NOR-1 dans ces cellules entraînent une augmentation de l'activité de ces gènes. De plus, si la régulation des gènes cibles de NF- κ B, dont les produits sont impliqués dans l'inflammation, se fait similairement dans les cellules de monocyte THP-1 par les NR4As (augmentation ou diminution dépendamment des stimuli auxquels ils sont soumis), leur mécanisme d'action semble être différent. La surexpression de NURR1 WT et de NURR1 mutant - avec un DBD muté qui ne peut plus reconnaître l'élément de réponse en monomère NBRE - entraîne le même effet sur les gènes MIP-3a (*Macrophage Inflammatory Protein 3 Alpha*) et IL-6 (*Interleukine 6*), à savoir une activation et une répression de manière respective (McEvoy et al., 2017). Ceci est distinct de la même démonstration expérimentale des auteurs soulignant la nécessité des DBD de NUR77 et NOR-1 pour moduler l'expression de ces gènes.

En outre, l'activité de NUR77 est connue pour être régulée à travers ses modifications post-traductionnelles (MPTs) et son interaction avec d'autres protéines revue dans (Kurakula, 2014). Ces régulations seront détaillées dans les **sections 1.2** et **1.3**.

1.1.6.4 Implication de NUR77 dans la régulation de la neurotransmission dopaminergique

1.1.6.4.1 *La maladie de Parkinson*

La maladie de Parkinson (MP) est une pathologie neurodégénérative caractérisée par la perte de neurones dopaminergiques dans le striatum, situé dans la région sous-corticale (Emamzadeh et Surguchov, 2018). Les symptômes moteurs associés à la MP sont des tremblements

au repos, de la rigidité dans les mouvements et un ralentissement de ces derniers chez le patient. Parmi les patients affectés par la maladie, 5% d'entre eux sont associés à une forme familiale/génétique de la pathologie. Les causes de la MP restent inconnues à l'heure actuelle et les traitements utilisés servent principalement à alléger les symptômes moteurs des patients, sans arrêter le processus de perte de neurones dopaminergiques (Armstrong et Okun, 2020). Différents facteurs seraient à l'origine de la survenue de la maladie tels que le stress oxydatif et la cytotoxicité des espèces réactives de l'hydrogène (les ROS), la neuro-inflammation ou encore le dysfonctionnement de la mitochondrie. Différentes données récoltées à partir de cerveaux post-mortem de patients, dans des modèles animaux ou des cultures *in vitro*, indiquent que le phénomène de mort cellulaire par le processus d'apoptose survient dans la MP (Lev, Melamed et Offen, 2003). Pour développer de nouvelles thérapies plus efficaces, il est donc souhaitable d'identifier des cibles thérapeutiques impliquées dans la régulation de la mort cellulaire, comme les membres de la famille des NR4As (Herring, Elison et Tessem, 2019; Perlmann et Wallen-Mackenzie, 2004).

1.1.6.4.2 NUR77 et la régulation de la survie des neurones dopaminergiques

NUR77 est impliqué dans la régulation du système dopaminergique et semble avoir un rôle dans la maladie de Parkinson. Une corrélation entre la modulation de la neurotransmission dopaminergique réalisée de manière pharmacologique et l'expression de *Nur77* dans ses structures cibles a été démontrée (Lévesque, 2007). De surcroît, une augmentation et une diminution respectives de l'expression et de l'activité de la *tyrosine hydroxylase* et de la *catéchol-O-méthyltransférase*, enzymes impliquées respectivement dans la synthèse et dans la dégradation de la dopamine, ont été observées chez des souris *Nur77* KO (Gilbert et al., 2006). Ces animaux sont plus sensibles à des agonistes du récepteur D2 de la dopamine. De plus, le traitement à la *6-hydroxydopamine* (6-OHDA), une neurotoxine qui induit la mort sélective des neurones dopaminergiques, s'est révélé moins efficace chez des rats *Nur77* KO (Rouillard, 2018). Pour compléter, des souris *Nur77* KO qui ont été traitées à la 6-OHDA de manière unilatérale, ont subi une administration répétée du précurseur de la dopamine, la *lévodopa*. Ce médicament est utilisé pour traiter les patients atteints de la maladie de Parkinson et entraîne au fil du temps des mouvements involontaires anormaux (dyskinésie). Suite aux traitements chroniques avec la *lévodopa*, ces souris *Nur77* KO ont présenté une réponse rotatoire exacerbée (St-Hilaire, 2006). Toutes ces observations renforcent l'implication de NUR77 dans la régulation de la

neurotransmission dopaminergique et appuient un rôle de NUR77 dans la perte des neurones dopaminergiques dans des modèles de la maladie de Parkinson (Rouillard, 2018).

1.1.6.5. Implication de NUR77 dans le cancer

NUR77 peut agir à la fois comme un facteur pro-oncogénique ou suppresseur de tumeur. Cette dualité s'explique par la variabilité des lignées cancéreuses et des conditions utilisées dans les études menées.

1.1.6.5.1 *Un facteur de prolifération*

Jusqu'à récemment, on pensait que la surexpression de NUR77 était liée à une prolifération de cellules cancéreuses et que son *knockdown* (KD) diminuait la croissance tumorale. Ce RN est en effet surexprimé dans de nombreux cancers comme dans le cancer du côlon (Wilson, 2003), le cancer du sein (Alexopoulou, 2010), le cancer de la prostate (Mu, 2003), le cancer du foie (Zhao BX, 2011), le cancer des poumons (Kolluri SK, 2003) et dans le cancer du pancréas (Lee et al., 2010). Dans ces lignées cancéreuses, NUR77 semble participer à l'augmentation de la prolifération et de la survie des cellules cancéreuses en surrégulant l'expression de différents gènes cibles dont les produits sont impliqués dans la progression du cycle cellulaire, l'inhibition de l'apoptose et la régulation des ROS – à savoir les gènes codant pour la cycline D2, E2F1, survivine et TXNDC5 (*thioredoxin domain-containing 5*) de manière respectueuse (Beard, Tenga et Chen, 2015). En contrepartie, les études portant sur la perte d'expression de NUR77 relèvent une augmentation de l'apoptose dans les lignées cellulaires cancéreuses de peau, du côlon, du pancréas, dans les mélanomes et lymphomes, avec dans certains cas une diminution de la croissance cellulaire (Safe, Jin, Hedrick, Reeder et Lee, 2014; Shannon, 2007; Wilson, 2003; Yu, 2007). Néanmoins, toutes ces études de KD de NUR77 ont été réalisées sur des cellules non stimulées (par exemple par des inducteurs de NUR77 décrits dans la section 1.1.4.2.3) et évaluent donc le rôle de NUR77 dans des conditions basales. Comme il a été décrit à la section 1.1.6.1, NUR77 agit également comme un facteur de prolifération en régulant directement l'expression de gènes cibles dont les produits sont impliqués dans la prolifération cellulaire.

1.1.6.5.2 Un facteur pro-apoptotique

À l'inverse, d'autres études ont montré que NUR77 exerce un rôle dans l'apoptose à travers la régulation de l'expression de gènes cibles dont les produits sont impliqués dans l'apoptose – comme le ligand de Fas (*FasL* ou *Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily Member 6*) ou la cytokine TRAIL (*Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand*) (Kim, Ono, Tobias et Han, 2003; Rajpal A, 2003) – ou à travers des mécanismes non génomiques. Ces derniers comprennent l'export nucléaire du complexe NUR77-RXR α , l'interaction de NUR77 avec BCL-2 au niveau de la mitochondrie ou encore l'implication de NUR77 dans la voie de la bêta caténine. Comme discuté précédemment (**Section 1.1.6.2**), toutes ces voies conduisent à la mort de la cellule (Hedrick, 2016; Lin, 2004; Sun, 2012a). Comme il a été décrit à la **section 1.1.6.1**, NUR77 agit également comme un facteur pro-apoptotique en régulant également direction l'expression de gènes cibles dont les produits sont impliqués dans la prolifération cellulaire.

1.1.6.5.3 Une cible thérapeutique intéressante

En raison de cette dualité d'action de NUR77 dans la prolifération et la mort cellulaire, ce RN est devenu une cible thérapeutique d'intérêt en oncologie, le but étant de limiter ses fonctions oncogéniques tout en maintenant son programme de mort cellulaire. Ce paradigme repose sur l'hypothèse que les tissus non-tumoraux exprimeraient NUR77 à des niveaux très faibles et répondraient donc peu aux agents ciblant l'apoptose induite par NUR77 (Lee, 2011). L'implication de NUR77 dans certains types de cancer, notamment dans le cancer du sein, reste donc à éclaircir à ce jour.

1.1.6.6 Implication de NUR77 dans le cancer du sein

1.1.6.6.1. Le cancer du sein

Le cancer du sein résulte de la multiplication anormale des cellules épithéliales qui forment les canaux et les alvéoles dans la glande mammaire (Sims, Howell, Howell et Clarke, 2007). Ce cancer représente actuellement la première cause de décès par cancer chez la femme dans le monde, et la deuxième au Canada (Brenner, 2020). Cette maladie peut également affecter les hommes, mais le pourcentage reste inférieur à 1 % (Bray F, 2018). Selon l'expression différentielle des marqueurs moléculaires, le cancer du sein est classifié en trois différents sous-types qui permettent

de dégager des informations essentielles sur le comportement de la tumeur, les traitements à administrer et l'évolution de la maladie chez la patiente (Freedman, Petitti et Robins, 2004) :

-le sous-type qui contient le récepteur des œstrogènes (ER+), avec ou sans le récepteur de la progestérone (PR) (Sims et al., 2007). Ce sous-type est le plus répandu chez les femmes et regroupe près de 70 % des cas de cancer du sein. Dans ce cas, la prolifération cellulaire et la croissance tumorale dépendent de la fixation des œstrogènes au récepteur des œstrogènes (ER). Des traitements hormonaux visant à prévenir la synthèse d'hormones ou à bloquer la liaison des œstrogènes à ER permettent de lutter contre le développement de la tumeur (Awan et Esfahani, 2018). Malgré l'efficacité des traitements endocriniens, 30 % des femmes ne répondent pas aux traitements et de 30 à 50 % des patientes peuvent rechuter (Roop, 2012; Szostakowska, Trebinska-Stryjewska, Grzybowska et Fabisiewicz, 2019). En effet, des mutations du LBD de ER α entraînant une perte de l'expression du récepteur ou encore une activation constitutive de ER, sans nécessité d'œstrogènes, ont été observées chez certaines patients, revu dans (Ring et Dowsett, 2004). Par ailleurs, une modification de l'expression des corégulateurs, entraînant les effets décrits précédemment sur le récepteur peuvent survenir. Dans leur ensemble, ces modifications entraînent une perte d'efficacité des antiœstrogènes. Une chimiothérapie était généralement administrée aux patientes mais le développement de biomarqueurs de risque pour ce sous-type de tumeurs a permis d'éliminer la chimiothérapie pour les tumeurs avec bon pronostic (Cao et Lu, 2016).

-le sous-type identifié par l'amplification du gène codant pour le récepteur HER2 (*Human Epidermal Growth factor Receptor 2*) (Mitri Z, 2012). Les patientes atteintes ce sous-type cancéreux peuvent être traitées par un anticorps dirigé spécifiquement contre le récepteur HER2 (le *trastuzumab*), généralement en combinaison avec la chimiothérapie.

-le cancer du sein triple négatif où aucun de ces trois marqueurs n'est présent (Sharma, 2016). Aucun traitement spécifique n'existe contre ce sous-type et les patientes sont généralement traitées uniquement par chimiothérapie comme traitement adjuvant systémique. Les chances de survie des patientes atteintes par ce sous-type sont faibles et un grand nombre de patientes récidivent (Steward, Conant, Gao et Margenthaler, 2014).

Malgré des avancées considérables, des défis thérapeutiques sont donc à relever pour lutter contre le cancer du sein. De nombreuses études suggèrent que d'autres acteurs clés que les oncogènes cités précédemment pourraient avoir une influence sur le développement de la tumeur

et la résistance aux traitements (Chen, 2019; Fan, Chang et Fu, 2015; Paplomata et O'Regan, 2014), poussant les chercheurs à investiguer de nouvelles cibles thérapeutiques contre cette maladie.

1.1.6.6.2. NUR77 et le cancer du sein

Comme dans les autres types de cancers, NUR77 est à la fois décrit comme un facteur pro-oncogénique et un facteur suppresseur de tumeur dans le cancer du sein.

Une première étude décrit NUR77 comme un facteur anti-migratoire dans le cancer du sein. Son expression ectopique dans différentes lignées mammaires saines ER+ (MCF-10A et 226L) et cancéreuses ER+ (PMC42 et ZR-75-1) montre une diminution de la migration cellulaire et affecte l'expression des récepteurs d'adhésion cellulaire, les intégrines (Alexopoulou, 2010). Une étude récente démontre que le KO de *Nur77* dans deux modèles de souris de tumorigénèse mammaire stimule le développement des tumeurs, processus inversé par la réexpression spécifique de *Nur77* dans ces tissus (Yang PB, 2020). Des travaux révèlent également une diminution de l'expression en ARNm et les niveaux en protéine de NUR77 dans les tissus humains de patientes atteintes d'un cancer du sein triple-négatif comparés aux tissus sains (Wu H, 2017). Dans cette même étude, l'expression ectopique de NUR77 dans les lignées cellulaires MDA-MB-231 - où il est très peu exprimé - entraîne une inhibition de la prolifération, de la viabilité et de l'invasion cellulaire. Ces études suggèrent un rôle protecteur de NUR77 dans le cancer du sein.

Cependant, l'expression en ARNm de *NUR77* est augmentée dans les tumeurs mammaires de patientes - tous sous-types confondus – en comparaison aux tissus sains (Muscat GE, 2013). De plus, le KD de *NUR77* dans différentes lignées cellulaires qui représentent les différents sous-types du cancer du sein, diminue la prolifération et induit l'apoptose de ces cellules (Hedrick, 2015). Le KD de *NUR77* semble également engendrer une diminution de la migration cellulaire et une inhibition de l'expression du facteur de croissance transformant bêta (TGF- β) dans la lignée cellulaire du cancer du sein triple négative MDA-MB-231 (Hedrick, 2016). Ces études soulignent à l'inverse un rôle pro-oncogénique de NUR77 dans le cancer du sein.

Des interférences fonctionnelles semblent également exister entre la signalisation de NUR77 et de ER. Une étude suggère que NUR77 est dégradé dans les lignées cellulaires du cancer du sein résistantes au tamoxifène, un modulateur sélectif de ER utilisé en première ligne de traitement dans les cancers du sein hormonodépendants (Qi, 2017). NUR77 ne peut donc plus entraîner la conversion de BCL-2 en facteur pro-apoptotique et déclencher l'apoptose. Cette

modification des niveaux protéiques de NUR77 résulterait d'une modulation de la protéine kinase Akt, essentielle dans la voie de signalisation PI3K/Akt et importante dans le développement d'une résistance aux traitements hormonaux contre le cancer du sein (Bai, 2015) Cette kinase ne peut ainsi plus phosphoryler NUR77, ce qui activerait l'apoptose (Hou, 2018). Cette étude sera davantage discutée dans la **section 1.2.2.2** qui décrit la phosphorylation de NUR77.

Comme suggéré dans les études citées précédemment, le rôle de NUR77 dans le cancer du sein reste donc à éclaircir, à savoir si son rôle dépend du sous-type de cancer du sein, du contexte cellulaire ou encore de mécanismes de signalisation intracellulaire. Par exemple, il est logique de s'interroger si les différences d'implication de NUR77 dans la migration cellulaire résultent de la différence de modèle utilisé, à savoir les cellules ZR-75 (qui sont des cellules ER+) où il est mis en évidence comme un facteur anti-migratoire (Alexopoulou, 2010), et des cellules MDA-MB-231 (qui sont des cellules triples négatives) où il est mis en évidence comme un facteur pro-migratoire (Hedrick, 2016). Par ailleurs, son activité de facteur de transcription et sa localisation, définie par le contexte cellulaire et/ou les agents auxquels le modèle d'étude utilisé est soumis pourrait avoir une influence (voir **Figure 5**). Afin de documenter son implication dans les processus cellulaires et pathologiques décrits dans cette section, il est nécessaire de mieux comprendre les processus permettant de réguler son activité.

1.2 Les modifications post-traductionnelles des récepteurs nucléaires

Cette deuxième sous-partie introduit l'un des régulateurs de l'activité des RN en général et de NUR77 en particulier, à savoir les modifications post-traductionnelles (MPTs). L'effet de la phosphorylation y est plus spécifiquement décrit. L'accent est ensuite mis sur la SUMOylation, qui a constitué un élément d'étude-clé de cette thèse pour la compréhension de l'activité de NUR77 et a initialement été étudiée chez un homologue de NUR77 (NURR1). Cette revue de la littérature révèle un réel fossé à combler en termes de connaissances et d'outils moléculaires adaptés pour évaluer cette MPT chez NUR77.

1.2.1- Généralités sur les modifications post-traductionnelles

Les MPTs sont des processus fondamentaux qui régulent les RN (Anbalagan, 2012). Elles incluent notamment la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination, la neddylation et la SUMOylation. Les MPTs peuvent être divisées en deux catégories de modifications réversibles : des additions ou soustractions d'un groupement chimique fonctionnel sur des résidus d'acides aminés spécifiques au niveau des protéines cibles telles que la phosphorylation, l'acétylation ou la méthylation, et des additions ou soustractions d'autres protéines ou polypeptides sur des protéines cibles comme l'ubiquitination, la neddylation ou la SUMOylation (Hunter, 2007; Rochette-Egly, 2003b).

Ces modifications sur les RN régulent leur activité transcriptionnelle, leur interaction avec des protéines et des cofacteurs, leur localisation au sein de la cellule ou encore leur stabilité protéique. Elles résultent de l'action de voies de signalisation diverses qui influencent ainsi la plupart des processus cellulaires contrôlés par ces RN. Cependant, les répercussions physiologiques sont hautement dépendantes de la localisation de ces MPTs sur la protéine cible et des interactions protéine-protéine affectées (Anbalagan, 2012; Lalevée, 2010). La phosphorylation et la SUMOylation, MPTs sur lesquelles ces travaux de ce doctorat ont porté, sont décrites dans les **sections [1.2.2](#) et [1.2.3](#)**.

1.2.2- La phosphorylation

1.2.2.1 Généralités sur la phosphorylation

La phosphorylation est un mécanisme réversible qui consiste en l'addition d'un groupement phosphate sur une molécule cible (Sarre, 1989). Elle est catalysée par des enzymes appelées kinases qui permettent l'ajout du groupement phosphate par liaison covalente. Ce phosphate, provenant de l'adénosine triphosphate (ATP), est greffé sur les protéines cibles au niveau des groupes alcool présents dans trois acides aminés, à savoir la sérine, la thréonine et la tyrosine (Johnson, 2009). Ce phénomène est réversible par le mécanisme de déphosphorylation, qui consiste en l'élimination de ce groupement phosphate par des phosphatases. La phosphorylation se fait de manière rapide et souvent transitoire (Zhang, Li, Wang, Liu et Wang, 2006). Elle peut affecter les interactions protéiques si elle est localisée au niveau de surfaces d'interaction ou indirectement par modulation

de la conformation d'un domaine protéique. Ces changements de conformation peuvent ainsi entraîner une augmentation ou une diminution des niveaux de la protéine, de sa stabilité ou de son interaction avec d'autres protéines (Lalevée, 2010; Rochette-Egly, 2003b).

La phosphorylation régule la plupart des processus cellulaires et fait partie intégrante de la signalisation cellulaire. On estime que 30% des protéines cellulaires sont phosphorylées à un moment donné - ce que l'on appelle le phosphoprotéome – et que plus de 100 000 sites potentiels de phosphorylation existent dans le protéome humain (Smith, 2008).

1.2.2.2 La phosphorylation de NUR77

De nombreuses kinases ciblant NUR77 sur différents domaines affectent son activité. En effet, la phosphorylation peut inhiber la dégradation de NUR77 par le protéasome. La protéine Pin1 (*peptidyl-prolyl isomerase*), qui reconnaît les sérine ou thréonine phosphorylées et isomérisent les résidus proline qui leur sont adjacents (motif pSer/pThr-Pro) (Zhou, Lu, Wulf et Lu, 1999), interagit avec NUR77. Cette interaction a lieu notamment sur le résidu sérine 95 de NUR77 situé dans le domaine AF-1, quand elle est phosphorylée par la kinase JNK1, et aboutit en l'isomérisation de la proline 96. Cette isomérisation, subséquente à la phosphorylation, conduit à une augmentation de la stabilité et de l'activité transcriptionnelle de NUR77 après sa surexpression dans les cellules HEK293T (Chen, 2012; Liu, 2007). De plus, la phosphorylation de NUR77 par la sérine/thréonine kinase DNA-PK peut promouvoir à la fois la transactivation de la protéine tumorale P53 et le rôle de NUR77 dans la réparation des cassures de l'ADN double brin. Cette kinase, exprimée dans le noyau, peut phosphoryler NUR77 sur deux sites et conduire ainsi à deux effets distincts. Si la kinase DNA-PK phosphoryle NUR77 dans les cellules HepG2 sur le résidu Ser164 situé dans le DBD de Nur77, on observe une interaction entre DNA-PK et P53, ce qui mène à la phosphorylation de P53 et à une augmentation de son activité transcriptionnelle (Zhao, 2011). Cependant, en réponse à un dommage à l'ADN, la phosphorylation de NUR77 par DNA-PK a lieu sur le résidu Ser337 (Malewicz, 2011), également situé dans le DBD de Nur77. Une modification de la chromatine entourant le lieu de réparation de la cassure double brin opère alors, ce qui entraîne une liaison plus forte de NUR77 à l'endroit de la cassure. La présence de NUR77 à cet endroit permettrait un recrutement supplémentaire des facteurs de réparation de l'ADN. Enfin, la phosphorylation peut également modifier la localisation de NUR77 dans la cellule par le biais de la voie PI3K-Akt (Han, 2006; Pekarsky, 2001), l'une des médiatrices principales du trafic intracellulaire responsable des

signaux de prolifération et d'apoptose. Une modification de la voie PI3K-Akt engendre la phosphorylation de NUR77 sur la Ser351 (située dans le DBD de Nur77) par Akt, qui empêche NUR77 d'être transloqué au noyau et de se lier à l'ADN - entraînant par conséquent une diminution de son activité transcriptionnelle entre 50 et 85% dans les cellules HEK293. Par ailleurs, la surexpression de la phosphatase *Mitogen-Activated Protein Kinase 1* (MAPK1) dans des cellules de Leydig induit une régulation négative entre les niveaux d'ARNm de *Nur77* et l'activation de ERK1/2 (Mori Sequeiros Garcia, Gorostizaga, Brion, Gonzalez-Calvar et Paz, 2015).

Le **Tableau 3** présente le résumé des travaux décrits dans cette section avec les résidus d'acides aminés de NUR77 ciblés et les effets observés dans la cellule. Plusieurs autres sites de phosphorylation ont également été identifiés sur la protéine NUR77 et ont été détaillés dans une revue publiée en 2014 (Kurakula et al., 2014).

Kinase	Résidu d'acide aminé	Domaine de NUR77	Effet	Cellules	Références
JNK1	S95	AF-1	-Augmentation de l'activité transcriptionnelle -Augmentation de sa stabilité	HEK293T	(Chen, 2012; Liu, 2007)
DNA-PK	S164	DBD	-Augmentation de la transactivation de P53 -Augmentation de sa phosphorylation	HepG2	(Zhao, 2011)
DNA-PK	S337	DBD	-Augmentation de la liaison de NUR77 à la cassure d'ADN -Augmentation du recrutement de facteurs de réparation au niveau de la cassure	U2OS	(Malewicz, 2011)
PI3K-Akt	S351	DBD	-Pas de translocation de NUR77 du cytoplasme vers le noyau -Diminution de son activité transcriptionnelle	A549, LNCaP	(Han, 2006; Pekarsky, 2001)

Tableau 3 – Liste non exhaustive des kinases phosphorylant NUR77 et les effets de cette phosphorylation dans la cellule

Cette table recense les kinases phosphorylant NUR77 identifiées à la suite de cette revue de la littérature, le domaine de phosphorylation de NUR77, l'effet sur la cellule ainsi que les modèles cellulaires utilisés pour la démonstration.

Une figure schématique des sites de phosphorylation et des principales kinases modulant l'activité de NUR77 est présentée dans la **Figure 7**, avec les sites de SUMOylation de NUR77.

1.2.3- La SUMOylation

1.2.3.1 Généralités sur la SUMOylation

La SUMOylation consiste en la liaison covalente d'une ou de plusieurs protéine(s) SUMO (pour *Small Ubiquitin-like Modifier*) sur une lysine acceptrice d'une protéine cible. À ce jour, quatre SUMO ont été caractérisées chez l'homme, à savoir les SUMO1, 2, 3 et 4 (Geiss-Friedlander, 2007). Récemment, un nouvel isoforme de la SUMO (SUMO5), présent chez les primates a été décrit mais sa caractérisation est limitée (Liang et al., 2016). Les séquences de SUMO2 et 3 sont identiques à 96%, reflétant la similitude entre ces deux protéines, ce qui ne permet pas de les distinguer par des anticorps, d'où leur appellation SUMO2/3 (Ayaydin, 2004). SUMO1 semble être l'isoforme le plus actif dans des conditions basales, tandis que les SUMO2/3 seraient d'avantage conjuguées aux protéines dans des conditions de stress comme une augmentation de la température (Saitoh, 2000). La distribution des SUMO1, SUMO2 et SUMO3 est ubiquitaire alors que la SUMO4 n'est présente que dans des tissus bien spécifiques comme les ganglions lymphatiques, la rate et le rein (Bohren, Nadkarni, Song, Gabbay et Owerbach, 2004; Dohmen, 2004; Guo, 2004).

La SUMOylation est très proche biochimiquement d'une autre MPT, l'ubiquitination. Elle implique notamment une cascade similaire d'enzymes (**Figure 6**) (Wilson et Heaton, 2008). La SUMOylation semble réguler plusieurs propriétés biochimiques de la protéine à laquelle elle s'ajoute - comme le trafic intracellulaire, l'activité transcriptionnelle ainsi que l'interaction ADN-protéine et protéine-protéine (Zhao, 2007).

Le cycle de SUMOylation met en jeu cinq étapes enzymatiques :

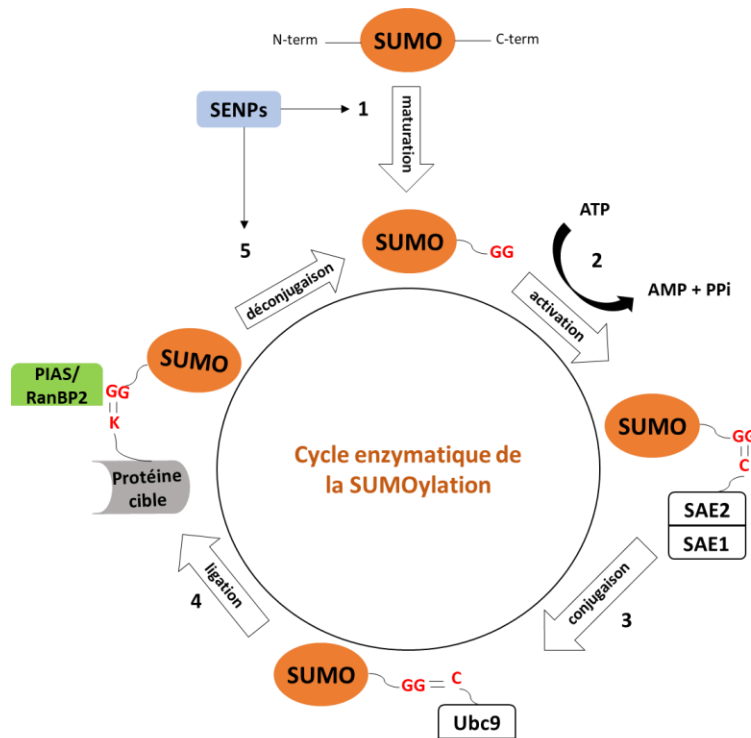


Figure 6 - Les 5 étapes enzymatiques du cycle de la SUMOylation.

Le cycle de la SUMOylation comprend 5 étapes enzymatiques. La première consiste en la maturation de la protéine SUMO par des enzymes de clivage appelées SENPS (Sentrin-Specific Proteases), ce qui révèle son motif di-glycine GG. La deuxième étape, ATP-dépendante, active la protéine SUMO et permet son transfert à l'enzyme E1 activatrice (constituée de l'assemblage des sous-unités SAE1 et SAE2). La troisième étape permet de lier la SUMO sur l'enzyme Ubc9 qui peut alors la conjuguer à une lysine acceptrice de sa protéine cible. La quatrième étape peut faire intervenir des enzymes ligases, comme les PIAS (Protein Inhibitors of Activated STAT) et RanBP2 (Ran Binding Protein 2), qui assurent la spécificité de la liaison. La cinquième étape permet de déconjuguer la SUMO à l'aide des mêmes enzymes de clivage SENPs ([Partie 3 de l'annexe](#) - Revue de littérature soumise à *Journal of Molecular Biology.*, inspirée de Hay et al, 2005)

1) La première étape est celle de la maturation et permet de préparer la SUMO immature à la réaction en la clivant dans sa partie C-terminale. Ce clivage protéolytique est réalisé par des SUMO isopeptidases spécifiques, les SENPs (*Sentrin-Specific Proteases*), qui enlèvent les 4 derniers

acides aminés de la SUMO et révèlent son motif du dipeptide de glycines (GG) (Desterro, Rodriguez, Kemp et Hay, 1999).

2) La deuxième étape, nommée activation, permet le transfert de la SUMO à l'enzyme E1 activatrice - constituée de l'assemblage des sous-unités SAE1 et SAE2 (*SUMO-activating enzyme subunit 1 and 2*) chez les mammifères. Ce transfert est dépendant de l'ATP et consiste en la formation d'un lien thioester entre le motif GG de la SUMO et la cystéine de E1 (Wilson et Heaton, 2008).

3) La troisième étape est l'étape de conjugaison. La SUMO est cette fois transférée au site catalytique de l'enzyme de conjugaison E2 située au niveau de la cystéine 93. À ce jour, la seule E2 caractérisée est la protéine Ubc9 (Bernier-Villamor, 2002).

4) La quatrième étape est appelée ligation. Contrairement à l'ubiquitination, qui nécessite obligatoirement l'intervention d'enzymes de type E3 ligases, l'enzyme E2 suffit à transférer la SUMO sur le résidu lysine de son substrat protéique cible dans certains cas (Bernier-Villamor, 2002). Dans d'autres cas, elle fait intervenir des E3 ligases, récemment caractérisées, telles que les PIAS (*Protein Inhibitors of Activated STAT*) ou RanBP2 (*Ran Binding Protein 2*) (Rytinki et al., 2012; Tatham et al., 2005). Ces enzymes permettent d'assurer l'efficacité de la réaction et la spécificité du substrat (Gareau, 2010). La SUMO est en général conjuguée au site consensus ψ KXD/E (ψ pour un acide aminé hydrophobe, K pour la lysine cible, X un acide aminé quelconque et D/E pour un acide aspartique/glutamique) mais d'autres sites ont été mis en évidence. En effet, les sites SIM (*SUMO interacting motif*), permettant une interaction non covalente entre des protéines cibles et les SUMO, ont été décrits comme importants dans la régulation de la fonction des protéines et de processus biologiques, comme il a été revu dans (Cong, Pakala, Ohshiro, Li et Kumar, 2011). Initialement décrit comme des sites présentant la séquence consensus Val/Ile-X-Val/Ile-Val/Ile (V/I-X-V/I-V/I), il est désormais envisagé que d'autres séquences hydrophobes puissent également être des SIM (Kerscher, 2007). Par ailleurs, les PDSM (*Phosphorylation Dependent SUMOylation Motif*) ont également été décrits comme des sites de régulation importants pour une protéine (Hay, 2005; Hietakangas, 2006). Ces sites correspondent à une séquence SUMO consensus flanquée d'une proline ou d'une sérine pouvant être ciblée par la phosphorylation.

5) La cinquième et dernière étape du cycle est l'étape de déconjugaison. Comme la SUMOylation est un mécanisme dynamique et réversible, les protéines SUMOylées peuvent être déconjuguées

rapidement de leur SUMO par les SENPs (*Sentrin-specific protease*) (Hickey, 2012). À ce jour, six SENPs ont été répertoriées chez les mammifères et les humains, chacune ayant une spécificité de clivage pour un ou plusieurs isoformes des protéines SUMO (Kunz, 2018). Les SENPs sont majoritairement localisées dans le noyau mais d'autres SUMO protéases, localisées dans le cytoplasme, ont récemment été identifiées, telles que les enzymes DESI1 et 2 (*Desumoylating isopeptidase 1 et 2*) (Shin, 2012).

La SUMOylation est une MPT de haute importance chez les RN. Elle régule notamment le motif du contrôle de synergie de l'activité transcriptionnelle de GR ainsi que son *turn over* (Le Drean, 2002). Par ailleurs, la SUMOylation sur ER α survient en présence de l'anti-œstrogène total fulvestrant (Hilmi, 2012), et sa répression par SENP1 permet au récepteur de se lier plus longtemps à l'ADN et d'augmenter l'expression de gènes cibles dans les cellules MCF-7 (Traboulsi, 2019). De plus, des essais de co-immunoprécipitations menés dans des cellules HEK293 après surexpression de ERR et de la SUMO2 ont montré que le récepteur orphelin ERR est SUMOylé par cette SUMO au niveau d'un site PDSM décrit précédemment (qui peut être ciblé par la phosphorylation et la SUMOylation) dans sa partie N-terminale (Tremblay, Wilson, Yang et Giguere, 2008). Cette MPT engendre une diminution de l'activité transcriptionnelle du récepteur. La mutation de la lysine en arginine, entraînant une perte de la capacité de recrutement de la SUMO, engendre une augmentation de cette activité. À l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre le résidu sérine, qui constitue le site de phosphorylation en aval de la lysine, les auteurs ont montré que la phosphorylation était nécessaire pour la SUMOylation subséquente de ERR dans les extraits de foie de souris. Ces travaux suggèrent que l'activité transcriptionnelle de ERR est régulée par la SUMOylation et la phosphorylation. Dans leur ensemble, ces travaux soulignent l'importance de caractériser la SUMOylation afin de mieux comprendre la régulation de l'activité des RN et plus spécifiquement des récepteurs orphelins, dont aucun ligand n'a été identifié à ce jour pour moduler leur activité.

1.2.3.2 La SUMOylation chez les NR4As et NUR77

Les démonstrations de la SUMOylation des membres de la famille des NR4As et de son rôle dans la régulation de leur activité commencent tout juste à percer ([Annexe 3, Revue de littérature](#)). Deux sites consensus de SUMOylation ont été identifiés chez NURR1, à savoir les lysine 91 et 577. Après la surexpression de NURR1 et de SUMO2 dans les cellules HEK293, la

SUMOylation sur le résidu lysine 91 situé dans le domaine AF-1 de NURR1 entraîne une répression de l'activité transcriptionnelle de NURR1 tandis que la SUMOylation sur la lysine 577, situé dans le domaine AF-2 augmente son activité transcriptionnelle (Galleguillos, 2004). Par ailleurs, SUMO2 est ajoutée à NURR1 par les enzymes Ubc9 et PIASy (PIAS4). PIASy aurait le potentiel de réprimer seul la transactivation de NURR1, de manière indépendante à son activité de E3 ligase dans ce même modèle cellulaire (Arredondo, 2013; Galleguillos, 2004). Une autre étude a également suggéré que la SUMOylation par SUMO2/3 en C-terminal de NURR1 dans les macrophages serait nécessaire pour la liaison du corépresseur CoREST, qui réprime l'expression de gènes pro- inflammatoires (Saijo, 2009). Dans cette même étude, la mutation des lysine 558 et 576 de NURR1 chez la souris (équivalente du 577 humain pour cette dernière) en arginine, afin de perdre la capacité de recrutement de la SUMOylation, engendre une diminution de l'activité transcriptionnelle de NURR1 sur l'élément de réponse en monomère NBRE et, à l'inverse, augmente celle sur l'élément de réponse en hétérodimère DR-5. Cette opposition d'effet suggère que la SUMOylation favoriserait une activité transcriptionnelle sous la forme d'un monomère chez NURR1.

Jusqu'à cette thèse, seulement deux études faisant le lien entre la SUMOylation et NUR77 ont été publiées. La première étude a mis en évidence que NUR77 était SUMOylé par les SUMO2/3 dans les cellules HEK293 après surexpression de NUR77 et de la SUMO2 et que ce phénomène était favorisé par la E3 ligase PIAS3 (Zhang, Xie, Zhang, Dijke et Zhou, 2017). Cette MPT entrainerait une poly-ubiquitination de NUR77, médiée par la E3 ligase RNF4, menant à sa dégradation. Des mutations combinées des résidus lysine K102 (décrite comme étant K101 dans l'article de Zhang et al) et K577, potentiels sites de SUMOylation, en arginine, ont révélé une augmentation de la stabilité protéique et de l'activité transcriptionnelle de NUR77. Dans les cellules monocytes humaines THP-1, les auteurs montrent que la surexpression de ce double mutant de NUR77 entraîne une augmentation de l'expression en ARNm de *I κ B α* (*NF κ B Inhibitor Alpha*) et une diminution de celles de *TNF- α* et de *IL-1 β* , qui induisent l'activité de NF- κ B, contrairement à la surexpression de NUR77 WT. Comme NF- κ B est connu pour exercer des fonctions anti-apoptotiques, cette étude suggère que la SUMOylation de NUR77 serait critique pour la régulation de la signalisation des cytokines inflammatoires et le contrôle de la mort

cellulaire par les macrophages (Zhang et al., 2017). Cependant, une alternance de différents modèles cellulaires utilisés (HEK293, HeLa, THP-1) ainsi que l'utilisation d'un double mutant uniquement limitent l'interprétation de ces résultats. La seconde étude met également en évidence la SUMOylation de NUR77 dans les cellules HEK293 après l'administration de la substance P, qui est un neuropeptide se liant au récepteur de la neurokinine 1 et induisant l'autophagie cellulaire (Zárraga-Granados, 2020). Tel qu'il a été décrit précédemment, l'homologue de NUR77 (NURR1) est SUMOylé en K558 (Saijo, 2009). Comme ce site de SUMOylation est conservé chez NUR77, les auteurs ont voulu évaluer s'il était également impliqué dans la SUMOylation de NUR77 (Zárraga-Granados G, 2020). Ils ont donc généré un triple mutant de NUR77, résultant de la mutation des résidus de lysine K102, K577 et K558 en arginine, révélant une diminution de la SUMOylation de NUR77 une fois ces sites mutés et que l'activité transcriptionnelle du mutant augmente en comparaison à NUR77 sauvage. Par ailleurs, la localisation de NUR77 est également affectée par ces mutations : si la protéine non mutée est localisée dans le noyau et dans le cytoplasme après l'administration de la substance P, le triple mutant semble rester principalement dans le noyau (Zárraga-Granados G, 2020). Comme la substance P induit la mort cellulaire à travers la délocalisation de NUR77 vers le cytoplasme (voir [section 1.1.6.2.](#)), cette étude suggère que la SUMOylation de NUR77 est essentielle pour l'induction de la mort cellulaire après l'administration de cette substance.

Néanmoins, il est important de souligner que toutes ces études sur la SUMOylation de NUR77 et NURR1 ont été principalement réalisées dans des conditions de surexpression, ce qui peut générer des artefacts. Les sites de phosphorylation et de SUMOylation modulant l'activité de Nur77, ainsi que les kinases et SUMO E3 ligase modulant ces MPTs qui ont été identifiées après cette revue de littérature sont présentés dans la **Figure 7**.

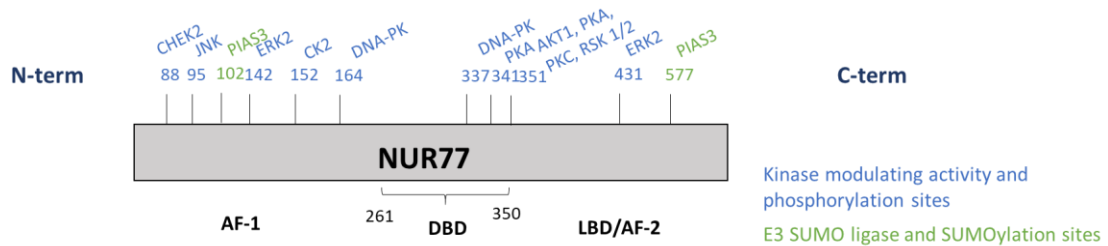


Figure 7 – Sites de phosphorylation et de SUMOylation de NUR77 et enzymes impliqués

Les sites de phosphorylation et de SUMOylation, ainsi que les kinases et les SUMO E3 ligase pouvant réguler ces MPTs sont présentées ici après la revue de la littérature décrite dans les sections précédentes.

1.3 L'interactome des récepteurs nucléaires

Cette partie décrit le deuxième aspect de la caractérisation de l'activité de NUR77, à savoir l'identification de ses partenaires d'interaction. Cette approche s'est révélée cruciale par le passé pour la compréhension des mécanismes d'action des RN en général et de NUR77 en particulier, comme en témoigne la littérature décrite ici. Jusqu'à présent, l'identification des interacteurs de NUR77 a principalement reposé sur des techniques ciblant des interactions stables *in vitro*. Comme les interactions transitoires peuvent être importantes dans les processus biologiques et cellulaires - en particulier dans la transcription - des approches aptes à capturer ce type d'interaction dans des cellules vivantes pourraient révéler de nouveaux pans de la biologie de ce récepteur. Les technologies récentes d'identification d'interactions protéine-protéine avec la biotine (BioID) ont marqué une réelle avancée dans le domaine de la cartographie des interactions protéines-protéines. Le principe de ces techniques et leur optimisation sont décrits, plus spécifiquement pour l'approche APEX2, utilisée durant cette thèse pour caractériser l'interactome de NUR77. Les différents procédés de quantification des interacteurs par analyse protéomique sont ensuite explicités.

1.3.1- Généralités sur les interactions entre protéines

L'ensemble des interactions entre protéines, ou « interactome », représente les contacts physiques qui ont lieu entre les protéines dans une cellule ou un organisme vivant. Ces interactions, dont la durée peut être variable et qui sont déterminées par la colocalisation des protéines dans un compartiment cellulaire, sont d'importance capitale pour la compréhension de l'activité de la cellule ou d'une protéine d'intérêt. En effet, l'identification de l'interactome permet de caractériser une protéine, de déterminer sa localisation subcellulaire grâce à l'identification de protéines d'interaction déjà connues, ou encore de mieux appréhender les mécanismes sous-jacents au

développement de maladies à travers le recensement des interactions entre protéines de signalisation ou métaboliques (Huttlin, 2017; Vidal, 2011). La caractérisation de l'interactome s'est révélée d'importance cruciale pour la compréhension des mécanismes d'activité de nombreuses protéines, notamment des RN.

1.3.2- Les cofacteurs des RN

Les protéines qui interagissent avec les RN participent à leurs fonctions et peuvent également moduler leur activité transcriptionnelle.

À titre d'exemple, l'identification de l'interactome de GR dans différents compartiments cellulaires a offert une meilleure compréhension au niveau moléculaire des processus anti-inflammatoires dans lesquels GR est impliqué (Petta I, 2016). La comparaison des interactomes de ER α et ER β , à partir d'études réalisées sur les noyaux de lignées cellulaires ER⁺ du cancer du sein MCF-7 après activation par estradiol, a permis d'identifier plusieurs centaines de partenaires potentiels pour chaque récepteur - dont 70 protéines communes - suggérant des pistes de recherche pour comprendre les rôles spécifiques de ces deux sous-types de ER (Nassa, 2011). Enfin, la caractérisation de l'interactome de PPAR γ a mis en évidence plusieurs corégulateurs potentiels et a suggéré des différences d'interactions protéiques associées aux fonctions du récepteur selon les compartiments cellulaires (Lam, 2017).

Tel qu'il a été mentionné dans la [section 1.1.4.1](#), l'identification des corégulateurs est particulièrement importante dans la compréhension de l'activité des RN orphelins, dont aucun ligand n'est identifié à ce jour. À titre d'exemple, l'un des corégulateurs les plus décrits du RN orphelin ERR α est le coactivateur *PPAR γ -coactivator 1 α* (PGC-1 α) (Huss, Kopp et Kelly, 2002). L'interaction entre ces protéines a été démontrée par des essais double-hybride issu d'une librairie d'ADNc cardiaque. Par la suite, il a été mis en évidence que l'interaction opérait par le motif LXXLL de PGC-1 α et que la surexpression de cette protéine et de ERR α dans des myocytes cardiaques néonataux primaires entraînait l'activation transcriptionnelle de ERR α (Huss et al., 2002). D'autres travaux ont montré que la modulation de ERR α endogène par PGC-1 α endogène entraînait des changements dans la régulation de l'expression des gènes cibles dont les produits

sont impliqués dans la phosphorylation oxydative et la biogenèse mitochondriale dans des lignées cellulaires SAOS2 et COS7 (Schreiber et al., 2004).

1.3.3- Les cofacteurs de NUR77

La caractérisation de l'interactome de NUR77 au fil des années a mené à l'identification de plus de 80 partenaires d'interaction cruciaux, revu dans (Kurakula, 2014). Ces protéines peuvent interagir en N-terminal (domaine AF-1) ou C-terminal (LBD/ domaine AF-2) de NUR77.

Parmi eux, des corégulateurs de l'activité transcriptionnelle de NUR77 ont été mis en évidence, certains responsables d'une augmentation de son activité tels que les coactivateurs CBP/P300 (*CREB Binding Protein/p300*), TRIM28 (*Tripartite Motif Containing 28*) et PCAF (*P300/CBP-Associated Factor*) (Kang, 2010; Rambaud, 2009; Wansa, 2002). À l'inverse, des corépresseurs impliqués dans la diminution de cette activité ont également été décrits comme SMARCA4 (*SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member 4*), HDAC1 (*Histone Deacetylase 1*) ou encore NCOR2 (*Nuclear Receptor Corepressor 2*) (Bilodeau, 2006a; Kang, 2010; Sohn, 2001).

De manière plus spécifique, après surexpression de NUR77 et de P300 dans les cellules du cancer du foie HepG2, l'acétylation de NUR77 au niveau de son LBD est augmentée et la protéine est stabilisée (Kang, 2010). Le traitement des cellules par la trichostatine A (TSA), un inhibiteur des histones désacétylases (HDACi), augmente l'acétylation de NUR77, ses niveaux protéiques et son activité transcriptionnelle. À l'inverse, la surexpression de HDAC1 - qui hydrolyse la liaison de groupement acétyl - diminue l'acétylation de NUR77 et de la même façon, ses niveaux protéiques et son activité transcriptionnelle. De plus, la surexpression de NUR77 augmente les niveaux protéiques de P300 et de HDAC1, ce qui suggère que NUR77 effectuerait une boucle de rétrocontrôle sur son activité et ses niveaux protéiques (Kang, 2010). La protéine TRIM28 a été identifiée comme interacteur potentiel de NUR77 par spectrométrie de masse dans un complexe protéique nucléaire après surexpression de NUR77 dans des cellules HEK293 (Rambaud, Desroches, Balsalobre et Drouin, 2009). À l'aide d'essais de co-immunoprécipitations, TRIM28 et NUR77 ont été extraits du même complexe, suggérant que cette protéine est un interacteur (direct ou indirect) de NUR77. Les auteurs ont par la suite mis en évidence que TRIM28 est recruté sur

les promoteurs de gènes cibles de NUR77 dont les produits sont impliqués dans la régulation des hormones produites par l'hypothalamus. Dans leur ensemble, ces travaux soulignent l'intérêt de caractériser les corégulateurs de NUR77 qui modulent son activité afin de mieux comprendre son implication dans la régulation des gènes cibles.

Les protéines BCL-2 et P53, impliquées dans l'apoptose et le cancer et dont les mécanismes ont été décrits dans les **sections 1.1.6.2 et 1.1.6.6**, interagissent également avec NUR77 (Lin, 2004; Zhao, 2006). En effet, l'interaction de NUR77 avec P53 empêche l'ubiquitination de P53 et sa dégradation subséquente par la protéine oncogène MDM2 (*Mouse Double Minute 2*) (Zhao, 2006). Ce mécanisme conduit à l'ubiquitination et à la dégradation de MDM2 dans les cellules HEK293. Dans le même modèle cellulaire, l'interaction de NUR77 avec BCL-2 induit quant à elle un changement conformationnel de BCL-2, qui ne protège alors plus de l'apoptose mais l'initie (Lin, 2004).

Ces travaux soulignent l'importance des corégulateurs et partenaires d'interaction dans la modulation de l'activité de NUR77, tant au niveau de son activité transcriptionnelle que de ses fonctions pro- et anti-apoptotiques. Par ailleurs, ils mettent en évidence qu'aucune étude caractérisant l'éventail des partenaires physiologiques de NUR77 dans des cellules vivantes n'a pour le moment été décrite.

1.4- La technologie APEX2

1.4.1. Les techniques « classiques » de capture des interactions

Les protéines agissent rarement seules : en effet, plus de 80% des protéines exercent leurs fonctions sous forme de complexes protéiques (Berggard, Linse et James, 2007). Pour mieux comprendre la biochimie de la cellule et les mécanismes qui opèrent entre les protéines, il faut donc pouvoir être capable de capturer et caractériser ces complexes protéiques.

Différentes techniques ont été largement employées afin de capturer ces interactions telles que la co-immunoprécipitation, la chromatographie par affinité ou encore la technique de *Tandem affinity purification* suivie de la spectrométrie de masse pour caractériser les protéines purifiées (Rao, Srinivas, Sujini et Kumar, 2014). La technique du double-hybride, qui met en évidence une

interaction physique entre deux protéines à travers l'expression d'un gène rapporteur et la reconstitution d'un facteur de transcription fonctionnel (Bruckner, Polge, Lentze, Auerbach et Schlattner, 2009; Fields et Song, 1989), et celle du *Glutathione-S-Transferase (GST) pull-down*, basée sur la capture des interacteurs d'une protéine spécifique étiquetée par la GST et immobilisée sur des billes de glutathion, ont été largement utilisées pour identifier les cofacteurs des RN (Albers, 2005; Goodson, Farboud et Privalsky, 2007).

Les données récoltées lors des approches précédemment citées contiennent de nombreux faux positifs et faux négatifs en raison de la purification limitée des échantillons protéiques et des limites de sensibilité de ces techniques pour les protéines peu abondantes. Ces procédés, qui nécessitent la lyse cellulaire et la co-purification de protéines, ne permettent par ailleurs de capturer que les interactions protéiques stables. Elles sont donc susceptibles de générer des interactions artéfactuelles car elles se produisent hors du contexte natif de la cellule (Perkins, Diboun, Dessailly, Lees et Orenge, 2010; van der Merwe et Barclay, 1994). Les interactions faibles ou transitoires, qui peuvent se révéler essentielles aux mécanismes d'activité d'une protéine, ne sont souvent pas capturées par ces technologies (Perkins et al., 2010; van der Merwe et Barclay, 1994). En effet, différentes études ont montré le comportement dynamique des protéines impliquées dans l'activation transcriptionnelle, le remodelage de la chromatine ou encore la réparation de l'ADN (Carrero, McDonald, Crawford, de Vries et Hendzel, 2003; Misteli, 2001). À titre d'exemple, des auteurs ont démontré que les coactivateurs de ER, SRC-1 (*Steroid Receptor Coactivator-1*) et CBP, interagissaient à tour de rôle avec ER et de manière dynamique au niveau d'un site de liaison chromatinien de ER. Ceci a été mis en évidence grâce à une approche combinant le photoblanchiment et des protéines de fusion chimériques (Stenoien et al., 2001).

Pour résoudre ces problématiques, des techniques basées sur des enzymes capables d'ajouter un groupement biotine aux partenaires d'interaction stables et transitoires d'une protéine d'intérêt, ont été développées ces dernières années (Branon, 2018; Hung, 2016; Kim, 2016; Lam, 2015; Rhee et al., 2013; Sable et al., 2018).

1.4.2. Les technologies de marquage des protéines à la biotine

Ces techniques exploitent la capacité d'enzymes à ajouter un groupement biotine sur des protéines qui sont situées dans un environnement relativement proche, ce qui permet ensuite de les collecter et de les identifier par spectrométrie de masse et des analyses bio-informatiques (Kulman, 2007; Nesbeth, 2006; Roux, 2012).

La première technique de cette catégorie à avoir été développée est l'identification des interactions protéine-protéine par biotinylation ou « BioID », issue du laboratoire de Brian Burke en 2012 (Roux, 2012). Dans cette technique, la protéine d'intérêt est fusionnée avec la biotine ligase BirA. Quand cette protéine de fusion est exprimée dans des cellules et en présence du substrat de l'enzyme (biotine), elle ajoute un groupement biotine aux résidus lysine des protéines situées dans un rayon de 10 nm. Par la suite, les protéines situées à proximité de la protéine d'intérêt peuvent être purifiées grâce à des billes de streptavidine qui vont lier la biotine située sur ces protéines, grâce à la force de l'interaction entre la streptavidine et la biotine qui constitue une des interactions les plus fortes (Chivers, Koner, Lowe et Howarth, 2011). Les protéines récoltées sont ensuite analysées et identifiées par spectrométrie de masse.

Néanmoins, deux inconvénients majeurs dans cette technique ont été relevés. Premièrement, l'incubation avec la biotine dans les cellules dure de 18 à 24h, ce qui peut augmenter le risque d'interactions non spécifiques et changer la composition interne des cellules. Par ailleurs, la taille de l'enzyme est de 35 kDa ce qui peut changer la conformation de la protéine d'intérêt, voire bloquer son interaction avec d'autres protéines (Trinkle-Mulcahy, 2019). D'autres générations de BioID plus optimales, comme la miniTurbo de taille réduite (28kDa) et qui nécessite une biotinylation de 10 min, ont été générées par la suite grâce à des mutations de l'enzyme (Branon, 2018; Kim, 2016).

1.4.3. Une peroxydase pour marquer les protéines : l'approche APEX2

En parallèle, le laboratoire de Alice Ting à Stanford a mis au point un nouvel outil appelé « APEX » qui utilise comme enzyme de biotinylation une ascorbate peroxydase (Rhee et al., 2013). Similairement, cette enzyme est fusionnée à la protéine d'intérêt et exprimée dans des cellules. Les substrats de l'ascorbate peroxydase sont ensuite ajoutés : la biotine-phénol est incubée 30 min et le

H₂O₂ nécessaire pour la réaction est incubé 1 min (**Figure 8**). La peroxydase réagit alors avec les résidus tyrosine exposés des protéines qui sont situées dans un rayon de 20 nm (Rhee et al., 2013). De la même manière que pour le BioID décrit précédemment, les protéines biotinylées sont capturées par affinité entre des billes de streptavidine et la biotine. Après purification, les billes sont envoyées à la spectrométrie de masse pour identification des protéines.

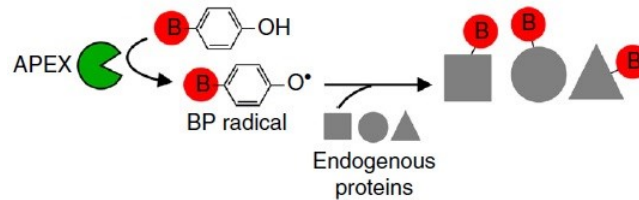


Figure 8 - Illustration du fonctionnement de la technique APEX

Après surexpression d'une protéine de fusion spécifique avec APEX, les cellules vivantes sont incubées avec de la biotine-phénol pendant 30 min et 1 mM de H₂O₂ pendant 1 min, ce qui permet une biotinylation des protéines qui se trouvent dans un rayon de 20nm de la protéine de fusion. Les protéines biotinylées sont ensuite récoltées grâce à un système de capture d'affinité de la biotine (billes de streptavidine) et les protéines sont identifiées par spectrométrie de masse (Figure tirée de (Hung, 2016)).

Après avoir testé différentes mutations sur l'enzyme, le laboratoire a généré une dernière version appelée « APEX2 » (Hung, 2016) qui présente une meilleure efficacité catalytique et résolvait ainsi une des limites majeures de cette approche (Lam, 2015). Cette dernière génération présente de nombreux avantages comparés au BioID basé sur l'enzyme BirA et aux autres techniques de capture de l'interactome. Premièrement, elle permet une capture instantanée des protéines situées à proximité car la réaction a lieu en moins d'une minute. Elle représente donc la technique de choix pour étudier la réponse dynamique de cellules en culture à la suite d'un traitement par des drogues ou des facteurs de stress. Aussi, la taille de l'enzyme est réduite (27 kDa) en comparaison à BirA (35 kDa). Un autre avantage de APEX2 est qu'elle est toujours active dans le cytosol contrairement à BirA et à la peroxydase *Horseradish peroxidase* (HRP) (Chen, 2017). Cette technologie innovante a été validée sur des cellules de mammifères, des levures et des

drosophiles (Chen, 2017; Hung, 2016; Hwang et Espenshade, 2016). Néanmoins, le traitement des modèles avec du H₂O₂ qui est toxique limite l'utilisation de cette approche dans des modèles animaux, comme il a été revu dans (Xu, Fan et Hu, 2021). Afin d'identifier les interactomes de complexes moléculaires, une approche scindant la protéine de fusion APEX2 en deux parties a été développée, en fusionnant chaque partie avec une des deux protéines d'intérêt (Han et al., 2019).

Les techniques d'identification des protéines

Après purification des billes de streptavidine, les échantillons vont être traités à la trypsine afin de fragmenter les protéines en peptides et de les identifier par le spectromètre de masse (Lopez-Ferrer, Capelo et Vazquez, 2005). Séquentiellement, les protéines des différents échantillons sont soumises aux étapes de séparation à l'aide de la chromatographie liquide, puis d'ionisation, d'analyse et de détection par spectrométrie de masse et enfin de traitement du signal à l'aide d'outils bio-informatiques (**Figure 9**).

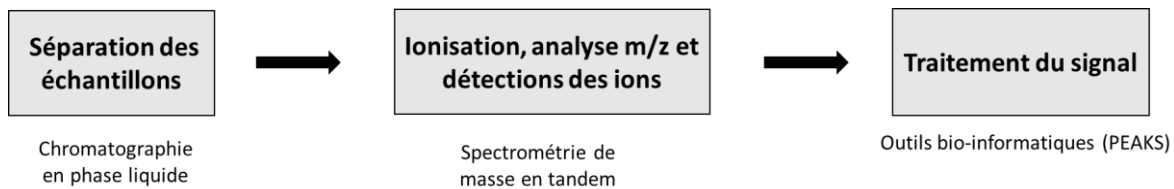


Figure 9 - Illustration de l'analyse des échantillons par spectrométrie de masse

Après clivage des protéines avec de la trypsine, les peptides sont séparés par chromatographie liquide à haute performance. L'ionisation, l'analyse masse/charge et la détection des ions sont opérées par la spectrométrie de masse en tandem. Lorsque les ions frappent un détecteur, celui-ci génère un signal proportionnel à la charge des ions reçus. Les données sont ensuite traitées par le moteur de recherche PEAKS en extrapolant les données de quantification sélectionnées (Zhang, 2016).

Les techniques d'identification de protéines utilisant la biotine comme la technologie APEX2 peuvent également être combinées avec des approches de quantification par marquage pour augmenter la fiabilité des résultats (DeSouza et Siu, 2013). Différentes techniques de marquage existent pour assurer cette quantification :

-le marquage chimique est le plus couramment utilisé avec les procédés iTRAQ (*Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation*) et TMT (*Tandem Mass Tag*). Ces deux types de marquage isobariques utilisent des isotopes qui vont se lier aux amines primaires de peptides et permettent ainsi de distinguer les signaux générés par différents échantillons analysés en même temps. Les signaux sont ensuite comparés pour obtenir la concentration d'une protéine donnée dans les différents échantillons (Aggarwal, Choe et Lee, 2006; Sinclair et Timms, 2011).

-le marquage métabolique avec la méthode SILAC, se base sur l'ajout de deutérium à toutes les leucines (Deng, Erdjument-Bromage et Neubert, 2019).

-le marquage protéolytique repose sur l'incorporation de l'isotope ^{18}O sur les extrémités C-terminales durant la digestion enzymatique des échantillons en présence de H_2^{18}O (Stewart, Thomson et Figeys, 2001).

L'étude de la représentation différentielle des protéines peut cependant se faire par une quantification sans marquage (Zhu, Smith et Huang, 2010). Cette approche, moins sensible, a l'avantage d'être plus rapide, plus simple et moins coûteuse. La quantification se base alors sur deux types de mesures :

-La mesure des changements d'intensité des protéines : cette quantification repose sur l'observation que l'intensité des pics associés à une protéine a été corrélée avec la concentration en ions pour cette protéine (Chen, 2008). L'intensité protéique reflèterait donc le nombre d'ions détecté par la spectrométrie de masse à un temps donné. Cependant, comme la complexité d'un échantillon influence l'intensité des ions, l'hypothèse sous-jacente à cette approche est que les échantillons comparés ont exactement le même niveau de complexité et des compositions identiques (DeSouza et Siu, 2013). Comme cette approche nécessite un alignement précis de l'intensité des pics et de jongler avec une grande quantité de données, des algorithmes spécialisés sont nécessaires afin d'aligner automatiquement les pics d'intensité des protéines (Zhu et al., 2010).

-Le comptage spectral des protéines : dans cette approche, le nombre de fois où un peptide spécifique est détecté par le spectromètre de masse est mesuré. Elle se base sur l'hypothèse qu'une protéine présente en plus grande quantité génère plus de peptides lors de l'étape de la digestion à la trypsine (Zhu et al., 2010). Par conséquent, les peptides les plus abondants sont le plus souvent détectés par l'appareil. Cette approche ne considère pas les effets de suppression des peptides les plus abondants sur ceux qui sont présents en quantité moindre, ou encore ceux qui ont une efficacité d'ionisation réduite. Dans cette approche, une normalisation et des tests statistiques suffisent à évaluer les changements en protéines entre des conditions tests et contrôles (Lai, Wang et Witzmann, 2013).

1.5 API5, une cible d'intérêt dans l'apoptose

Cette sous-partie introduit une cible d'intérêt dans l'apoptose, la protéine API5. La structure de API5 et son implication dans l'apoptose et dans le cancer du sein, ainsi que certains de ses interacteurs sont décrits. Cette revue de la littérature ciblée suggère que la caractérisation de cette cible apoptotique et de ses interacteurs représente un intérêt dans la compréhension des mécanismes reliés à l'apoptose, au cancer du sein et à NUR77.

1.5.1- La protéine API5

Tewari et collab. ont démontré pour la première fois en 1997 que la protéine API5 a une activité anti-apoptotique (Tewari et al., 1997). Les auteurs ont développé une librairie d'ADNc à partir de fibroblastes murins afin d'identifier des gènes dont les produits sont impliqués dans la survie cellulaire. Ils ont ainsi identifié API5, un gène conservé au sein des espèces et exprimé de manière ubiquitaire dans les tissus embryonnaires et adultes, ainsi que dans différentes lignées cellulaires tumorales humaines. API5 possède 11 transcrits et 7 isoformes identifiés à ce jour. L'étude met en évidence deux isoformes de API5, l'un codant pour la protéine native de 55kDa et l'autre pour la région C-terminale de la protéine de 25kDa - et souligne l'importance du *domaine leucine-zipper* de API5 situé en C-terminal, qui une fois muté, empêche API5 de prévenir l'apoptose. Différentes études suggèrent que l'intégrité de ce domaine est essentielle pour la fonction anti-apoptotique de API5 (Rigou et al., 2009; Tewari et al., 1997). L'architecture générale de API5 est présentée dans la **Figure 10**.

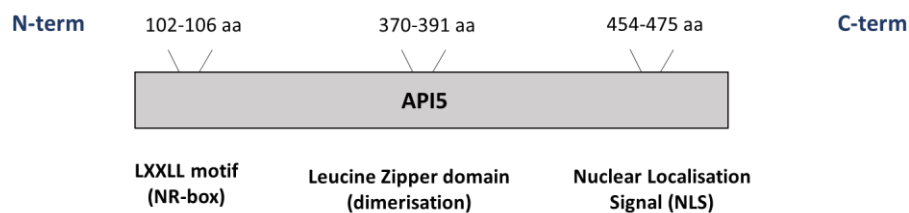


Figure 10 – Architecture générale de la protéine API5

Les isoformes les plus longs de API5 (504 et 510 aa) présentent un motif LXXLL à leur extrémité N-terminale qui joue un rôle clé dans le recrutement des corégulateurs par les RN ; un domaine

Leucine-zipper impliqué dans la dimérisation ; un signal de localisation nucléaire (NLS) ciblant API5 vers le noyau de la cellule.

1.5.2- Les interacteurs de API5

Par la suite, différents travaux ont visé à caractériser API5 à travers l'identification de ses interacteurs et ont proposé ce facteur comme cible thérapeutique anti-cancéreuse. Un résumé des interacteurs de API5 identifiés lors de cette revue de la littérature est présenté dans le **Tableau 4**.

Protéine	Autre nom	Domaine d'interaction avec API5	Cellules	Références
<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>	FGF-2	N-term	SK-HEP1	(Van den Berghe et al., 2000)
<i>E2F transcription factor</i>	E2F1	Inconnu	Drosophila, SaOS-2	(Morris et al., 2006)
<i>Apoptotic Chromatin Condensation Inducer 1</i>	ACINUS	Inconnu	HEK293, U2OS	(Rigou et al., 2009)
<i>Nucleoprotein of Influenza A Virus</i>	NP-IAV	Inconnu	A549	(Mayank, Sharma, Nailwal et Lal, 2015)
<i>Caspase 2</i>	CASP-2	Inconnu	HeLA	(Imre, 2017)
<i>Estrogen receptor α</i>	ER α	N-term (motif LXXLL)	MCF-7	(Basset, 2017)

Tableau 4 – Liste non exhaustive des interacteurs de API5

Ce tableau recense les interacteurs de API5 identifiés à la suite de cette revue de la littérature, leur domaine de liaison avec cette protéine, ainsi que les modèles cellulaires utilisés pour la démonstration de l'interaction.

La protéine API5 interagit notamment avec le facteur de croissance des fibroblastes 2 (FGF-2), impliqué dans le développement et la migration cellulaire, dans les cellules SK-Hep-1. À l'aide d'essais de co-immunoprécipitation suivis d'essais de liaison *in vitro*, l'interaction directe entre ces deux protéines a été démontrée (Van den Berghe et al., 2000). Les travaux ont également mis en

lumière que c'est la région N-terminale de API5 qui est impliquée dans cette interaction en réalisant des délétions des différentes régions de API5. Comme FGF-2 est connu pour être à la fois un activateur et un inhibiteur de l'apoptose et de la tumorigénicité, les auteurs suggèrent que l'interaction entre API5 et FGF-2 pourrait stimuler ou réprimer sa régulation dans ces voies de signalisation. Par la suite, une étude menée chez les drosophiles et dans la lignée cellulaire SaOS-2 dérivée d'un ostéosarcome humain a révélé que API5 était un inhibiteur crucial du Facteur 1 de liaison au promoteur E2 (E2F-1), lorsque celui-ci est dérégulé. API5 interagit avec E2F-1 et l'empêche d'engendrer l'apoptose (Morris et al., 2006). Par ailleurs, l'utilisation de shRNAs dirigés contre API5 dans une lignée cellulaire dérivée d'un carcinome squameux a révélé que les cellules sont plus sensibles à l'apoptose (données non publiées de l'étude) et que le KD de API5 est létale dans les cellules de drosophiles S2 (*Schneider 2*). Les auteurs proposent donc que l'inhibition de la fonction de API5 serait un mécanisme à exploiter pour lutter contre le développement des tumeurs. À l'aide d'essais double-hybride et de co-immunoprécipitation menés dans les lignées cellulaires HEK293 et U20S, une étude a ensuite révélé que API5 interagissait avec le facteur nucléaire Acinus, ce qui protège ce facteur du clivage par la caspase-3 et l'empêche ainsi de fragmenter l'ADN (Rigou et al., 2009). Dans ces travaux, la répression de l'expression de *API5* dans différentes lignées cellulaires cancéreuses (U20S, HeLa, A549 et Molt-4) augmente la sensibilité des cellules aux traitements anticancéreux (étoposide et camptothécine) ainsi que l'activité des caspases -3 et -7. Par ailleurs, l'interaction entre la nucléoprotéine du virus de l'influenza (NP-IAV) avec API5, menant à la suppression de l'expression de *API5* dans les cellules épithéliales A549 dérivées d'un carcinome du poumon, engendre le clivage des caspase-3 et -9 (Mayank et al., 2015). L'interaction et la co-localisation dans le noyau des protéines API5 et de NP-IAV ont été mises en évidence par immunoprécipitation et microscopie confocale, respectivement. La caspase-2 est également régulée par API5, cette fois-ci par l'interaction entre les deux protéines (Imre, 2017). En effet, API5 a été identifiée par protéomique dans le complexe protéique de la caspase-2, lorsque celle-ci est activée par des protéines porogènes (*pore-forming toxin* - PFT) (Imre, 2012), dans les cellules HeLa. Cette interaction a été confirmée de manière endogène par immunoprécipitation dans ces mêmes cellules et a révélé que API5 est un inhibiteur direct de la caspase-2 à travers la liaison du domaine de recrutement des caspases (CARD), en empêchant ainsi la caspase-2 de s'y lier et d'être activée. La suppression de l'expression de *API5*

par siRNA augmente la dimérisation et l'activation de la caspase-2 dans ces cellules, ce qui les sensibilise à l'apoptose médiée par cette caspase (Imre, 2012).

1.5.3- API5 et le cancer du sein

Deux études récentes ont mis l'accent sur l'implication de API5 dans le cancer du sein (Basset, 2017; Bousquet, 2019). Des travaux publiés en 2017 révèlent une interaction endogène entre API5 et ER α et une co-localisation de ces protéines dans le noyau, grâce à des essais d'immunoprécipitation et de microscopie confocale respectivement, menés dans la lignée cellulaire du cancer du sein ER+ MCF-7 (Basset, 2017). En mutant le motif LXXLL (décrit comme un motif d'interface de liaison entre les RN et les corégulateurs – voir la [section 1.1.2.1](#)) de API5 en LXXAA, les protéines n'interagissent plus, ce qui démontre que l'intégrité de ce motif est essentielle pour assurer cette liaison. Dans les cellules MCF-7 stables dont l'expression de *API5* est diminuée par le biais de shRNAs spécifiques, la croissance cellulaire n'est pas affectée de manière significative en condition basale. Cependant, après stimulation par des œstrogènes, le KD de API5 inhibe significativement la prolifération cellulaire. Le KD de *API5* dans ces cellules affecte l'expression des gènes cibles de ER α , à savoir *TFF1* (*Trefoil factor 1*), *PR* (*Progesterone Receptor*), *BCL-2* et *Mcl-1* (*Induced myeloid leukemia cell differentiation*) et prévient le recrutement de ER α au niveau des promoteurs de ses gènes cibles *TFF1* et *PR*. Enfin, l'injection sous-cutanée des lignées cellulaires stables MCF-7 contrôles et API5 KD dans des souris *nude* et l'administration d'œstrogène pour favoriser la croissance tumorale a révélé une diminution significative de la croissance tumorale dans le groupe *API5* KD (Basset, 2017). Toutes ces observations poussent les auteurs à considérer API5 comme un facteur crucial qui participe à la croissance tumorale dans le cancer du sein ER+. API5 est identifié comme un mauvais facteur de pronostic pour la survie des patientes atteintes du BC ER+ selon les données générées par *KM plotter* présentées dans cette étude. Il est à noter que la quantité de patientes recensée depuis 4 ans a augmenté dans l'outil *KM plotter* (1228 en 2017 et 2565 en 2021), ce qui pourrait induire des différences de résultats à l'heure actuelle.

La seconde étude a cette fois évalué l'importance de API5 dans le cancer du sein ER- (Bousquet, 2019). L'évaluation de l'expression de *API5* par marquage à la peroxydase révèle que ce facteur est significativement augmenté dans les cellules endothéliales, provenant de biopsies de

patientes BC ER-, qui ne répondent pas aux traitements de chimiothérapie. Cette observation suggère une association négative entre API5 et la survie des patientes dans le cancer du sein. L'administration d'un peptide anti-API5 pendant 28 jours dans des modèles de xénogreffes de souris BC ER- a sensibilisé les cellules aux traitements de chimiothérapie, comme en atteste la diminution du volume de la tumeur. Dans ce même modèle, cette sensibilisation est accompagnée d'une inhibition de l'angiogenèse et d'une augmentation de l'apoptose, cette-dernière étant mise en évidence par une augmentation et une diminution significatives de la caspase-3 clivée et du marqueur de prolifération Ki67, respectivement. D'autres études ont également souligné le rôle de API5 dans d'autres mécanismes associés à la tumorigénèse dans divers types de cancers (Cho, 2014; Song, 2017).

Ces travaux, dans leur ensemble, soulignent l'intérêt de cibler API5 dans les mécanismes associés à l'apoptose dans le cancer. Ils suggèrent également que la caractérisation de API5 et de ses interacteurs présente un réel intérêt afin de mieux comprendre les mécanismes reliés à l'apoptose dans le cancer – et plus spécifiquement dans le cancer du sein.

1.6 Modèles cellulaires

Cette dernière sous-partie de l'introduction décrit les différents modèles cellulaires explorés lors de cette thèse pour le développement et l'optimisation des essais de biologie moléculaire, ainsi que pour la caractérisation de la modulation de l'activité de NUR77. L'intérêt d'utiliser ces lignées et leur pertinence relative aux travaux menés lors de cette thèse sont justifiés.

1.6.1- Les HEK293 pour développer et optimiser les essais

Depuis leur génération il y a près de 40 ans, les cellules HEK293 sont utilisées couramment en laboratoire de recherche en raison de leur facilité de culture, de leur dédoublement rapide et de leur efficacité de transfection et de production de protéines recombinantes (Thomas et Smart, 2005). Elles sont souvent privilégiées pour exprimer des gènes de manière transitoire - mais également de manière stable - et permettent ainsi l'étude d'une pléiotropie de mécanismes biologiques. La lignée cellulaire HEK293T, dérivée des cellules HEK293, exprime le virus à ADN

Simian Vacuolating Virus 40 (SV40) large T antigen (Ahuja, Saenz-Robles et Pipas, 2005). Cette mutation confère une efficacité de réplication supérieure aux ADN plasmidique transfectés de manière transitoire, conduisant à une quantité de protéines produite plus importante.

La lignée cellulaire HEK293, longuement considérée comme provenant de cellules épithéliales embryonnaires rénales ou même de fibroblastes, pourrait en fait provenir d'une lignée cellulaire neuronale du système nerveux autonome (Shaw, Morse, Ararat et Graham, 2002). En effet, des analyses du transcriptome et des données immunohistochimiques ont révélé la présence de plus de 60 gènes spécifiques aux neurones (Shaw et al., 2002; Stepanenko et Dmitrenko, 2015). Par la suite, d'autres études ont révélé la présence de patrons d'expression génique avec d'autres modèles cellulaires comme les lignées cellulaires du cancer du sein et les lignées cellulaires de la glande surrénale. Ces résultats indiquent que les cellules HEK293 ne présentent pas une expression de gènes spécifiques aux tissus rénaux et suggèrent qu'elles pourraient être utilisées pour caractériser des gènes présents dans d'autres tissus.

La protéine NUR77 est très peu détectée dans les cellules HEK293 en condition basale et après stimulation par la Trichostatine A (TSA), un HDACi qui augmente les niveaux protéiques de NUR77 décrit dans la section 1.4.3.1 (Kang, 2010) ([Annexe 1](#)). Cette lignée cellulaire représente donc un modèle intéressant pour évaluer les mécanismes d'action de NUR77 après transfection d'un vecteur d'expression pour *NUR77*, avant validation dans des modèles physiologiques pertinents au contexte pathologique d'étude.

1.6.2- Les MCF-7 pour caractériser les mécanismes de NUR77 dans le cancer du sein ER+

Pour évaluer les mécanismes de NUR77 dans un modèle cellulaire du cancer du sein pertinent, différentes lignées cellulaires représentatives de différents sous-types du cancer du sein peuvent être utilisées: les lignées MCF-7, SKBR3 et MDA-MB-231, représentatives du cancer du sein ER+, du cancer HER2+ et du cancer triple négatif respectivement (Bartel et Jackson, 2017; Chavez, Garimella et Lipkowitz, 2010; Comsa, Cimpean et Raica, 2015). Les niveaux protéiques de NUR77 dans ces lignées ont été évalués au préalable ([Annexe 2](#)). Les immunobuvardages montrent que les niveaux protéiques de NUR77 sont détectés principalement dans les cellules

MCF-7 et non dans les SKBR3 ou dans les MDA-MB-231, corroborant les résultats de la littérature pour cette dernière lignée (Hedrick, 2015; Wu H, 2017). Comme les études suggèrent un rôle de ce RN comme cible thérapeutique d'intérêt dans les différents sous-types de cancer du sein, dont le cancer ER+ (Alexopoulou, 2010; Hedrick, 2016; Qi, 2017), la lignée MCF-7 ER+ semble être la plus pertinente pour caractériser les mécanismes d'action de ce RN dans ce cancer.

1.7 Hypothèses et objectifs

Tel qu'il a été décrit en introduction, NUR77 est un facteur de transcription polyvalent aux fonctions multiples, selon sa localisation cellulaire et les stimuli auxquels il est soumis. Il représente une cible d'intérêt dans différents processus pathologiques, notamment dans le cancer du sein et dans la perte neuronale du système dopaminergique.

Néanmoins, la caractérisation des fonctions de NUR77 a toutefois été difficile pour deux raisons majeures:

- 1) pour le moment, aucun ligand endogène avec une affinité élevée n'a été clairement identifié. Ceci limite la capacité à moduler son activité à des fins expérimentales.
- 2) de plus, bien qu'un rôle de NUR77 ait été associé à plusieurs pathologies, les mécanismes pathophysiologiques impliquant NUR77 ne sont pas clairement établis dans la majorité des cas.

Il est donc dans un premier temps essentiel de mieux caractériser ce RN afin de mieux cerner son activité et ses fonctions dans la cellule. En se basant sur les études antérieures de caractérisation de l'activité des RN à travers les MPTs et l'interactome et les démonstrations de l'importance de ces régulateurs dans l'activité de NUR77 décrites en introduction, nous avons émis l'hypothèse que la caractérisation des MPTs et des partenaires d'interaction de NUR77 permettrait de mieux comprendre son activité.

Dans cette thèse, il est proposé de répondre aux problématiques énoncées précédemment, à travers deux objectifs principaux, qui ont façonné les deux prochains chapitres :

- 1) nous proposons de caractériser une modification post-traductionnelle de NUR77 susceptible de modifier son activité, la SUMOylation, afin de mieux comprendre son activité. Ce volet représente le chapitre 2 de cette thèse.
- 2) la caractérisation de l'interactome de NUR77 dans des cellules vivantes est privilégiée afin de cartographier ses interacteurs potentiels et ainsi, élucider les mécanismes relatifs à son activité. Cette étude constitue le chapitre 3 de cette thèse.

Ces caractérisations nécessitent l'utilisation de tests moléculaires, spécifiques et sensibles. Les essais rapporteurs (**Figure 11**) et la technologie APEX2 (**Figure 12**) ont donc été optimisés à cet effet pour mener à bien les objectifs 1 et 2, respectivement.

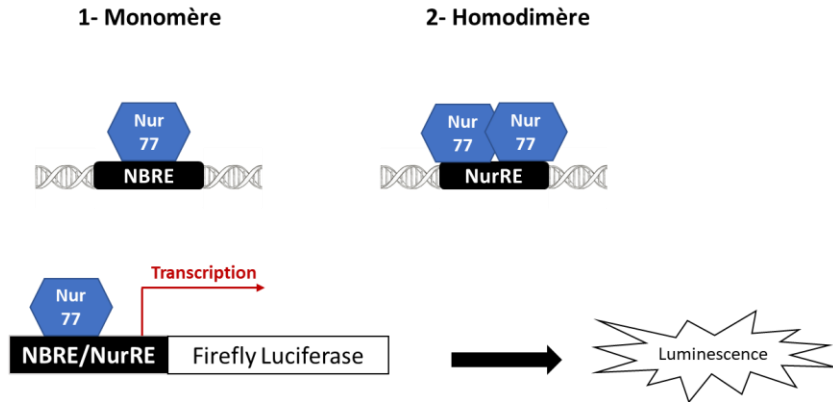


Figure 11 - Illustration du fonctionnement des essais rapporteurs

Un vecteur d'expression pour NUR77 et un vecteur rapporteur contenant le gène Firefly Luciferase, précédé d'un promoteur contenant un élément de réponse de NUR77 monomérique (NBRE) ou homodimérique (NurRE), ont été transfectés de manière transitoire dans des cellules de mammifères HEK293. 36h plus tard, le substrat de la Firefly Luciferase (la luciférine) a été ajouté et l'intensité de luminescence a été évaluée grâce à un lecteur de plaque.

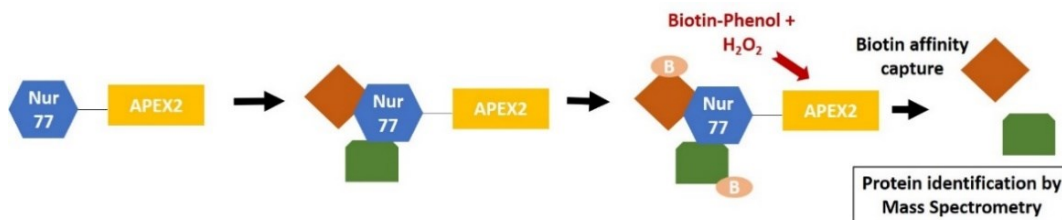


Figure 12 - Illustration du fonctionnement de la technologie APEX2

La protéine NUR77 humaine a été fusionnée à APEX2 à sa partie N- ou C-terminale. 36h après avoir exprimé de manière transitoire la protéine de fusion APEX2-NUR77 ou NUR77-APEX2 dans des cellules de mammifères, les cellules ont été incubées en présence de biotine-phénol pendant 30 min. Le substrat H_2O_2 de APEX2 a été ensuite ajouté pendant 1 min, permettant une biotinylation des protéines qui se trouvent dans un rayon de 20 nm de la protéine de fusion. Les protéines biotinylées sont purifiées à l'aide d'un système de capture d'affinité de la biotine (billes de streptavidine) et les protéines sont identifiées grâce à la spectrométrie de masse.

Chapitre 2 – Complex regulation of orphan nuclear receptor NUR77 (NR4A1) transcriptional activity by SUMO2 and PIAS γ

Article publié dans: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. Volume 1868, Issue 2, February 2021, 118908.

Cet article a été modifié de la version publiée en ligne dans ce chapitre de thèse.

Auteurs: Fatéma Dodat^a, David Cotnoir-White^{a,b}, Elham Dianati^b, Amandine Vallet^b, Sylvie Mader^b and Daniel Lévesque^{a*}

Affiliations: ^aFaculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada

^bInstitut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC), Université de Montréal et Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada

*Auteur correspondant pour l'article

2.1 Contribution de la candidate

La majorité des plasmides utilisés pendant cette étude ont été générés et vérifiés par la candidate. Elle a également développé et optimisé les essais rapporteurs avec la contribution de David Cotnoir-White, les Western blot et la RT-qPCR dans le cadre de cette étude et effectué l'ensemble des expériences de cet article, excepté la co-immunofluorescence menée en collaboration avec Elham Dianati et le Western blot de la figure supplémentaire 1 qui a été réalisé par Amandine Vallet. La candidate, Daniel Lévesque et Sylvie Mader ont participé à l'analyse, l'interprétation des résultats et à la rédaction du manuscrit.

2.2. Résumé

NUR77 (NGFI-B) est un récepteur nucléaire qui appartient à la famille NR4A des récepteurs nucléaires orphelins (NR4A1). Ce facteur de transcription est impliqué dans la régulation de multiples fonctions, telles que la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, l'inflammation, le métabolisme du glucose et des lipides et la fonction cérébrale. Cependant, les mécanismes impliqués dans ses différentes propriétés régulatrices restent peu définis à ce jour. Dans l'objectif de démystifier les mécanismes de régulation de NUR77, nous avons identifié la protéine *activated STAT gamma protein inhibitor* (PIAS γ), une E3 SUMO-protéine ligase, qui réprime de manière significative l'activité transcriptionnelle de NUR77 dans les cellules HEK293T. Cette activité de PIAS γ est modulée par la *Sentrin SUMO specific protease 1* (SEN1). La substitution de deux sites potentiels de SUMOylation phylogénétiquement bien conservés, la lysine 102 (K102) et 577 (K577) par des résidus d'arginine (R) a modulé l'activité transcriptionnelle de NUR77. En particulier, les mutants NUR77-K102R et NUR77-K102R/K577R ont significativement diminué l'activité transcriptionnelle de NUR77, tandis que la substitution unique de K577R a augmenté l'activité transcriptionnelle de NUR77. La répression de l'activité transcriptionnelle de NUR77 par SUMO2 et PIAS γ a été réduite par la mutation K577R, tandis que le mutant K102R est resté insensible à la surexpression de la SUMO2. Par ailleurs, les effets de ces sites accepteurs SUMO dans NUR77 sont distincts de ceux précédemment observées sur son homologue NURR1. Ainsi, la présente étude a identifié SUMO2 et PIAS γ comme d'importants corégulateurs transcriptionnels de NUR77.

2.3. Highlights

- The mechanisms involved in NUR77 (NR4A1) regulatory properties remain unclear.
- PIAS γ , a E3 SUMO-protein ligase, potently represses NUR77 transcriptional activity.
- PIAS γ activity is sensitive to Sentrin SUMO-specific protease 1 (SEN1).

- SUMO acceptor sites K102 and K577 modulated NUR77 transcriptional activity in opposite directions.
- The study identifies SUMO2 and PIAS γ as important transcriptional coregulators of NUR77.

2.4 Abstract

NUR77 (NGFI-B) is a nuclear receptor that belongs to the NR4A family of orphan nuclear receptors (NR4A1). This transcription factor has been implicated in the regulation of multiple functions, such as cell cycle regulation, apoptosis, inflammation, glucose and lipid metabolism, and brain function. However, the mechanisms involved in its different regulatory properties remain unclear. In search for regulatory mechanisms of NUR77 function, we identified that Protein Inhibitor of Activated STAT gamma (PIAS γ), an E3 SUMO-protein ligase, potently repressed NUR77 transcriptional activity in HEK293T cells. This PIAS γ activity was sensitive to Sentrin SUMO-specific protease 1 (SEN1). Substitution of two putative phylogenetically well-conserved small ubiquitin-like modifier (SUMO) acceptor sites, lysine 102 (K102) and 577 (K577) by arginine residues (R) modulated NUR77 transcriptional activity. In particular, NUR77-K102R and NUR77-K102R/K577R mutants strongly decreased the transcriptional activity of NUR77, whereas single K577R substitution increased transcriptional activity of NUR77. Repression of NUR77 transcriptional activity by SUMO2 and PIAS γ was reduced by the K577R mutation, whereas the K102R mutant remained insensitive to SUMO2. Interestingly, the roles of these SUMO acceptor sites in NUR77 are distinct from previously observed activities on its close homolog NURR1. Thus, the present study identified SUMO2 and PIAS γ as important transcriptional co-regulators of NUR77.

Abbreviations

PIAS γ , Protein Inhibitor of Activated STAT gamma ; SEN1, Sentrin SUMO-specific protease 1 ; SUMO, Small Ubiquitin-like Modifier ; NGFI-B, Nerve Growth Factor Inducible gene B ; RXR, retinoid X receptor ; NBRE, NGFI-B response element ; NurRE, Nur Responsive Element ; PTM,

post-translational modification ; LBD, ligand binding domain ; DBD, DNA binding domain ; AF-1, Activation Function-1 ; AF-2, Activation Function-2.

Keywords

NGFI-B ; Small ubiquitin-like modifier protein ; Protein inhibitor of activated STAT ; Gene reporter assays ; Amino acid residue specific mutation ; SENP1 ; Phylogenetic analysis ; NURR1.

2.5 Introduction

NUR77 (NR4A1, also known as Nerve-Growth Factor Inducible gene B, [NGFI-B] or TR3), together with NURR1 (NR4A2, TINUR), and NOR-1 (NR4A3, MINOR) form the NR4A subfamily of orphan nuclear receptors. This subfamily is involved in multiple essential physiological processes such as cell cycle regulation, apoptosis, steroidogenesis, inflammation, glucose and lipid metabolism and neurotransmission (Campos-Melo, Galleguillos, Sanchez, Gysling et Andres, 2013; Kurakula et al., 2014; Maxwell et Muscat, 2006). The NR4A receptors are classified as immediate early genes, which means that they are rapidly induced by a variety of stimuli like growth factors, cytokines, neurotransmitters and stress (Campos-Melo et al., 2013; Kurakula et al., 2014; Maxwell et Muscat, 2006). NUR77 and the other NR4A members share the structural organization common to most nuclear receptors. This structure consists of the N-terminal domain containing the Activation Function-1 (AF-1), the DNA-binding domain (DBD) and the C-terminal domain containing the ligand binding domain (LBD) and the transcriptional activation function-2 (AF-2) (Hsu, Zhou et Mountz, 2004). NUR77 and the other NR4A family members can bind DNA as monomers to the NGFI-B response element (NBRE; AAAGGTCA) and as homodimers or heterodimers with another NR4A family member to the synthetic consensus Nur-response element (NurRE; TGACCTTTX6AAAGGTCA). Also, NUR77 and NURR1 can form heterodimers with a retinoid X receptor (RXR) partner and activate transcription through direct repeat 5 (DR5) retinoid response elements (Maira et al., 1999; Philips et al., 1997; Wilson, Fahrner, Johnston et Milbrandt, 1991).

NR4A receptors belong to the orphan nuclear receptor class and are thought to function without a canonical ligand binding pocket. Indeed, structural studies have shown that NUR77 and NURR1 ligand binding pockets are in closed conformation because of the presence of bulky hydrophobic amino acid side chains and therefore lack the cavity to accommodate a ligand (Flaig, Greschik, Peluso-Iltis et Moras, 2005; Wang, 2003). However, a recent structural analysis of NURR1 LBD supports the presence of a dynamic, solvent-accessible ligand binding pocket (de Vera et al., 2019). Although some groups have identified potential ligand-induced NR4A activities (Safe, 2014; Zhan, 2008), the mechanism of action of these ligands remains unclear. It is important to note that NUR77, and other NR4A receptors, display an important constitutive transcriptional activity, as compared to ligand-activated steroid hormone receptors (Flaig et al., 2005).

Since NUR77 activities might be independent of endogenous ligands, their regulation by post-translational modifications (PTMs) should play an important role in controlling signaling in addition to regulation of receptor expression levels revue dans (Kurakula et al., 2014). Several co-regulators that modulate Nur family member-dependent transactivation have been identified in recent years and include the steroid receptor coactivator-2 (SRC-2), p300, P300/CREB-binding protein (CBP)-associated factor (PCAF), and silencing mediator for retinoid and thyroid hormones (SMRT) (Kelly, McKenna et Young, 2005; Wansa, 2002). In addition, PTMs such as the addition of a Small Ubiquitin-like MOdifier peptide (SUMO), phosphorylation and ubiquitination have been also shown to be key regulators of nuclear receptor activity, including NR4A receptors (Arredondo, 2013; Galleguillos, 2004; Kurakula et al., 2014; Zhang et al., 2017). Modification by SUMO regulates various aspects of cell physiology including cell cycle, transcription, intracellular trafficking and cell signaling (Hannoun, Greenhough, Jaffray, Hay et Hay, 2010).

SUMOylation is a PTM that targets lysine (K) residues mainly within a consensus sequence composed of a characteristic Ψ KX(E/D) motif (Ψ being a hydrophobic residue, K lysine residue, X any residue, E is for glutamic acid and D for aspartic acid). The SUMO modification process is dynamic and requires the action of three enzymes: an E1 activating enzyme (SAE1/SAE2), the E2 conjugation enzyme (Ubc9) and an E3 ligase enzyme (like PIAS proteins or RanBP2), while SUMO residues are removed by Sentrin SUMO-specific proteases (SENPs) (Henley, Craig et Wilkinson, 2014; Kaur, Park, Pandey, Azuma et De Guzman, 2017; Kunz, 2018).

Previous reports have shown that the NUR77 homolog NURR1 contained multiple putative consensus SUMOylation sites located in the N- and C-terminal portion of human NURR1 (including lysine 91 [corresponding to lysine 102 in human NUR77] and lysine 577, respectively) (Arredondo, 2013; Galleguillos, 2004). NURR1 transcriptional activity was repressed by the SUMO E3-ligase, Protein Inhibitor of Activated STAT gamma isoform (PIAS γ), and this inhibition was enhanced by SUMO type 2 (SUMO2) SUMOylation at lysine 91 (Arredondo, 2013; Galleguillos, 2004). It has recently been shown that NUR77 SUMOylation at both Lysine 102 and 577 residues can be associated with receptor degradation and substance P-induced autophagic cell death in specific cellular contexts (Zárraga-Granados G, 2020; Zhang et al., 2017). However, the role of individual SUMO acceptor sites in mediating the effects of SUMO and PIAS proteins on the regulation of NUR77 transcriptional activity has never been reported.

To gain more insights into the molecular mechanisms that govern NUR77 transcriptional activity, we evaluated the regulatory impact of SUMO2 and of E3 ligase PIAS γ on NUR77 transcriptional activity. Using gene reporter assays in HEK293T cells, we showed that both PIAS γ and SUMO2 can act as suppressors of NUR77 transcriptional activity and that the effect of PIAS γ was partially dependent on a SUMO activity. Mutations of putative SUMO acceptor sites lysine residues (K) 102 and 577 into arginine residues (R) had opposite effects on modulation of NUR77 transcriptional activity. SUMO2 repression was respectively abolished or reduced in the presence of the K102R or the K577R mutation. PIAS γ repression was partially reduced with the K577R mutation, but was independent of the K102R mutation. Altogether, these data suggest an important role of PIAS γ and SUMO2 in the regulation of NUR77 transcriptional activity.

2.6 Materials and methods

a- Plasmids

The human NUR77 cDNA was subcloned into the pcDNA3.1(+1) expression vector (Clontech, Mountain View, CA, USA) between the BamH1 and Nhe1 sites. NUR77-K102R, NUR77-K577R and NUR77-K102R/K577R mutations were introduced using the Q5[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs, E0554S) according to the manufacturer protocol. Point mutations were generated using the mutagenic primers (fwd: GCCTCCTTCAGGTTTCGAGGACTTCC; rev: AGAGGCAGGGGAGGTGGC) for K102R and (fwd: TTCTACCTCAGGCTGGAGGACTTGG; rev: GATGCGCTGCAGGCCCTG) for K577R. All mutants were verified by DNA sequencing. Response elements NBRE (5'-AAAGGTCA-3') and NurRE (5'-TGACCTTTx6AAAGGTCA-3') were subcloned in the pGL3 expression vector upstream the Firefly Luciferase reporter gene at the BglII site (yielding 3xNBRE-Fluc and 3xNurRE-Fluc, respectively). Flag-mPIAS3 and Flag-hPIAS γ plasmids were gifts from Dr. Ke Shuai (Addgene plasmids #15207 and #15208; <https://www.addgene.org>) (Chung et al., 1997), the Flag-hSENP1 was a gift from Dr. Edward Yeh (Addgene plasmid #17357) (Cheng, Kang, Zhang et Yeh, 2007). The eYFP-HA-SUMO2 was subcloned into pcDNA3.1. The pGFP-N2 plasmid (Clontech) was used to normalize transfection.

b- Cell culture and transient transfection

Human embryonic kidney 293T (HEK293T) cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 2 mL/500 mL glutamine, and 100 U/mL penicillin-streptomycin (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) at 37 °C in 5% CO₂. Transfections were carried out using the polyethylenimine (PEI; Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) method (300 ng of linear PEI plus 100 ng of branched PEI for 100 ng of DNA). To maintain the same ratio of DNA in the co-transfections, we used the empty vector pcDNA3.1 to equilibrate the amount of total DNA transfected.

c- Gene reporter assays

HEK293T cells were plated in 12-well plates (White Optiplate; PerkinElmer, Waltham, MA) at a density of 1×10^5 cells per well. Since preliminary results indicated that NUR77 mutant plasmids had reduced protein expression compared to wild-type NUR77 (see also Fig. 3A), cells were co-transfected with 100 ng of NUR77, 200 ng of NUR77-K102R, or 150 ng of NUR77-K577R or NUR77-K102R/K577R mutants, in order to obtain similar protein levels of expression for all constructs. Similar preliminary titration experiments were performed to determine transfection conditions of constructs that generated similar PIAS protein levels in basal conditions (see supplementary Fig. S1). Western blots showing protein levels of transfected plasmids for all experimental conditions used are presented in the supplementary data file, Figs. S1, S2, S4 and S7. Three hundred nanograms of reporter plasmids 3xNBRE or 100 ng of 3xNurRE were used in indicated experiments. A reporter gene expressing the GFP fluorophore (100 ng) was included in all experiments as an internal control for transfection efficiency. To make sure that the same amount of DNA was used in all experiments, pcDNA3.1 was transfected as carrier DNA to normalize transfected DNA quantity up to 1.5 µg/well. Cells were harvested 48 h after transfection and luciferase activities were measured after addition of luciferin (500 µM; NanoLight Technology) at 560 nm wavelength on the Veritas microplate luminometer (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA, USA). Results were normalized for transfection efficiency with the GFP signal (400 nm excitation and 515 nm emission wavelengths) on a Spectramax 190 plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and data were expressed as relative activation levels.

d- Western blotting

Cells were grown and transfected in 100 mm plates and lysed with 0.5 mL of RIPA lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS), supplemented with a cocktail of proteases (Roche, #05892970001) and phosphatase inhibitors (Roche, #4906845001). Cell extracts were incubated with rotation during 1 h at 4 °C and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. Protein extracts were dosed using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo-Fisher, #23225). Western blot was performed using Criterion XT Precast Gel, 10% Bis-Tris, (BioRad #3450112) with a mouse monoclonal anti-NUR77 antibody (BD Pharmingen™, #554088) followed by an anti-mouse HRP-linked IgG antibody (Cell signaling, #7076) and a rabbit monoclonal anti-β-actin antibody (Cell signaling #4970) followed by an anti-rabbit HRP-linked IgG antibody (Cell signaling, #7074). To evaluate epitope-tagged PIAS (Flag-PIAS3 and γ) protein expression, an anti-Flag antibody (Abcam, #ab18230) was used. An anti-GFP (Roche, #11814460001) was used to evaluate GFP protein levels for eYFP-HA-SUMO2 plasmid. Molecular weight markers (Precision Plus Protein Kaleidoscope Pre-stained standards #1610375, Bio-Rad) were incorporated in all gels. For cycloheximide time course experiment, cells were treated with 50 μM of cycloheximide (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) and collected every hour for up to 6 h.

e- RNA extraction, reverse transcription and quantitative PCR (RT-qPCR)

HEK293T cells were seeded in 12-well plates (White Optiplate; PerkinElmer, Waltham, MA) at a density of 1×10^5 cells per well. The next day, cells were co-transfected with 100 ng of NUR77, or 200 ng of NUR77-K102R, or 150 ng of NUR77-K577R or NUR77-K102R/K577R mutants. 48 h after transfection, cell pellets were lysed with QIAzol (QIAGEN 79306 (Toronto, ON, Canada)) and RNA was extracted according to manufacturer's instructions. RNA was reverse transcribed with the MultiScribe Reverse Transcriptase enzyme (50 U/μL) and cDNA was quantified by qPCR (Light Cycler 480) using Taqman Fast qPCR MasterMix (Applied Biosystems). Primer sequences for Glut4 (glucose transporter type 4) were: fwd: ggcatggggttccagtatgt, rev: gcctcgagtttcaggactctt). Results were analyzed by the $\Delta\Delta C_t$ method using two endogenous control genes (β-actin (Actb) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)). Results were normalized to the “wild type NUR77” condition.

f- Co-immunofluorescence

Forty-eight hours post-transfection, HEK293T cells were washed with PBS-1X, fixed with 4% formaldehyde for 20 min and permeabilized with PBS-1X/0.01% Tween 20 for 10 min at room temperature. After the final wash with PBS-1X, cells were blocked in 3% BSA-PBS-1×-0.01% Tween 20 for 1 h at room temperature. Purified mouse anti-NUR77 antibody (BD Pharmingen™, #554088) was diluted in blocking solution (1:100) and incubated with cells at 4 °C overnight. Goat anti-Mouse IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 488 (Invitrogen, #A32723) was diluted in blocking solution (1:1000) and used to detect the primary NUR77 antibody or as a specificity control. All cells were incubated with Texas Red™-X Phalloidin antibody (ThermoFisher, #T7471) diluted in blocking solution (1:250) at 4 °C overnight. Between each antibody, cells were always washed 3 times with PBS-1X-0.01% Tween 20. DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride, Sigma Aldrich, # D1306) was used to stain the nuclei. Cells were imaged in glass bottom Petri dishes (MatTek #P35GCOL-1.5-14-C). Image acquisition was performed with a Zeiss confocal microscope (LSM700) and images were prepared with the Zeiss Zen blue software.

g- Bioinformatic analysis

Putative SUMOylation sites were identified using three different SUMOylation algorithms: Abgent SUMO plot™, <https://www.abgent.com/sumoplot>, GPS-SUMO, <http://sumosp.biocuckoo.org/> and SUMOhydro, <https://omictools.com/sumohydro-tool>. These algorithms identified multiple sequences that conformed to the SUMO-consensus motif ΨKX(E/D) (Ψ being a hydrophobic residue, K lysine residue, X any residue, E is for glutamic acid and D for aspartic acid). The alignment of NUR77 protein sequences across species from the NCBI library (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3164/ortholog>) was performed on Clustal Omega software.

h- Statistical analysis

A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's multiple comparison post hoc test was used to determine statistically significant differences among groups. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

2.7 Results

1) PIAS3 and PIAS γ decrease NUR77 transcriptional activity on an NBRE response element and PIAS γ repression is rescued by SENP1

Since it has been demonstrated that PIAS γ acts as a SUMO E3 ligase that regulates transcriptional activity of NURR1 through SUMOylation, while PIAS3 leads to NUR77 SUMOylation (Arredondo, 2013; Galleguillos, 2004; Saijo, 2009; Zhang et al., 2017), we aimed to investigate the involvement of these PIAS proteins on NUR77 transcriptional activity. To test this possibility, we co-expressed PIAS3 or γ with human NUR77 and the 3xNBRE reporter gene in HEK293T cells. PIAS3 and PIAS γ significantly inhibited the transactivation of the 3xNBRE reporter gene by NUR77 (**Figure 13**). Overexpression of PIAS proteins did not change the basal activity of the reporter gene (**Figure 13A**) ([Fig. S1](#) is showing similar expression levels from transfected PIAS expression plasmids as assessed by Western blotting using a Flag Tag antibody).

To determine whether the effects of PIAS proteins are mediated via their activity as SUMO E3 ligases, we co-expressed NUR77, PIAS γ and the SENP1 protease, which catalyzes the deconjugation of SUMOylated proteins (Kunz, 2018). SENP1 significantly rescued NUR77 transcriptional repression by PIAS γ , the loss of 60% of NUR77 transcriptional activity being reduced to 26% when SENP1 was added (**Figure 13**). Overexpression of SENP1 alone (without NUR77) remained without effect (**Figure 13**) (see [Fig. S2](#) for comparison of protein levels of transfected plasmids for experimental conditions presented in **Figure 13**). This result is compatible with what has been previously observed with NURR1 (Arredondo, 2013; Galleguillos, 2004).

2) The two major putative SUMO acceptor sites in NUR77 are well conserved across evolution

Since a SUMO-dependent process seems to be involved in PIAS γ transcriptional repression of NUR77, we decided to further investigate potential NUR77 SUMOylation sites. The analysis of the human NUR77 protein sequence with three different SUMO acceptor site prediction algorithms (Abgent SUMO plotTM, GPS-SUMO, and SUMOhydro) identified multiple sequences that conformed to the SUMO-consensus motif Ψ KX(E/D) (**Figure 14**). All three analyzes identified high probability scores for the two putative SUMO acceptor sites lysine residues 102 and 577, as

previously described (Zhang et al., 2017). These sites are located in the AF1 and AF2 domains, respectively (**Figure 14B**).

In addition, we also performed alignments of selected NUR77 protein sequences surrounding the K102 and K577 sites from different species using the Clustal Omega software (**Figure 14C**). The comparison of multiple NUR77 protein orthologues sequences indicates that the K102 site is conserved across mammal species, whereas the K577 site is fully conserved down through birds (crested ibis) and drosophila (DHR38), the ancestor of the NR4A receptor family (Baker, 2003; Sutherland, Kozlova, Tzertzinis et Kafatos, 1995) (**Figure 14C**). These putative SUMO acceptor sites are also well-conserved in NUR77 homologs NURR1 (K91, K577) (Arredondo, 2013; Galleguillos, 2004) and NOR-1 (K85, K605) (**Figure 14C**). This analysis supports an important physiological role of these sites. However, the K102 consensus site seems to appear later on in mammals (human, macaque, rat and mouse). To assess the involvement of these consensus SUMO acceptor sites on NUR77 transcriptional activity, we generated mutants of NUR77, one in which the lysine 102 was replaced with an arginine (K102R), another in which lysine 577 was replaced with an arginine (K577R) and the last one where both lysine residues were replaced with arginine residues (K102R/K577R).

3) Mutations of putative SUMO acceptor sites affect neither NUR77 protein stability nor localization

Since SUMOylation can modulate protein degradation, we evaluated protein expression of wild type and NUR77 SUMO acceptor site mutants K102R and K577R (**Figure 15**). Non-linear regression analysis of protein levels in HEK293T cell extracts collected at different time points after cycloheximide treatment showed that wild type and NUR77 mutants have similar decay times (**Figure 15B**), suggesting that these putative SUMO acceptor sites did not alter NUR77 protein stability in this context. This result is consistent with data obtained for the NURR1 K91R mutant (equivalent to K102R mutant for NUR77) (Arredondo, 2013) in HEK293T cells, but not with NUR77 K102R/K577R double mutant in HeLa cells (Zhang et al., 2017) or triple NUR77 mutant (K102R/K558R/K577R) in HEK293T cells (Zárraga-Granados G, 2020). In addition, localization of NUR77 was not affected by mutations as wild type and NUR77 mutants are all mainly present in the nuclear compartment (see [Fig. S3](#)).

It is interesting to note that NUR77 Western blot signals generated two very close bands (Fig. 15A), as previously reported with the antibody used herein (Zhang et al., 2017). Both bands were reduced in the presence of cycloheximide and both signals were included in our quantifications. However, the lower band was predominant at time 0 (before cycloheximide), while this signal faded away after cycloheximide treatment, whereas the upper band progressively gained intensity. This suggests that these signals are differently affected by inhibition of protein synthesis.

4) Mutations of putative SUMO acceptor sites differently modulate NUR77 transcriptional activity

It has been shown that the AF-1 domain mediates transactivation and co-activator recruitment of NUR77 and that the LBD/AF-2 domain containing the helix 11 is associated with a NUR77 co-regulator interface (Flaig et al., 2005; Wansa, 2002). After co-transfection of the constructs with reporter genes containing NUR77 response elements in mammalian cells (see [Fig. S4](#) for comparison of protein levels of transfected plasmids for experimental conditions presented in **Figure 16**), we observed that mutating each of the NUR77 putative SUMOylation sites affected NUR77 transcriptional activity in an opposite manner with the 3xNBRE reporter plasmid (**Figure 16**). More precisely, the K577R mutation significantly increased transcriptional activity, whereas the K102R and K102R/K577R mutants lost more than 60% of the NUR77 transcriptional activity (**Figure 16**). This suggests that integrity of the K102 residue is associated with NUR77 activity, whereas K577 repressed its activity.

In addition, similar increased activity of the K577R mutant was also observed with a 3xNurRE reporter vector (see [Fig. S5](#)). The K102R mutant was less responsive, but the K102R/K577R double mutant potentiated the effect of the K102R mutation ([Fig. S5](#)). Surprisingly, these effects (on NBRE and NurRE) are opposite to what has been observed with the two equivalent SUMO acceptor sites in NURR1, mutation of K91 being associated with higher and mutation of K577 with lower NURR1 activity (Galleguillos, 2004). To validate the data obtained with our artificial promoter constructs, we investigated the modulation of a target gene known to bind NUR77 through a NBRE site, the glucose transporter type 4 (Chao, 2007a) using RT-qPCR. Interestingly, overexpression of NUR77-K577R and NUR77-K102R/K577R in HEK293T cells increased relative expression of *GLUT4* mRNA (see [Fig. S6](#)).

5) Repression of NUR77 transcriptional activity by PIAS γ is weaker with the K577R mutation and SUMO2 potentializes PIAS γ repression

Then, we assessed whether mutations of these putative SUMO acceptor sites had an effect on repression of NUR77 transcriptional activity exerted by PIAS γ . Overexpression of increasing concentrations of PIAS γ (0, 50 and 200 ng) in HEK293T cells with wild type or NUR77 mutants led to a dose-dependent decrease in both wild type and NUR77 mutant transcriptional activities (**Figure 17A**; see [Fig. S7](#) for comparison of protein levels of transfected constructs for all experimental conditions presented in **Figure 17**). However, PIAS γ -induced repression was attenuated in the NUR77-K577R mutant (70% reduction in wild type compared to 35% reduction with NUR77-K577R mutant) (**Figure 17A**). Since the K102R mutation already strongly reduced NUR77 activity, this may have limited the magnitude of PIAS γ effect. Nevertheless, high amounts of PIAS γ significantly reduced transcriptional activity of the NUR77-K102R and NUR77-K102R/K577R mutants on NBRE response elements (**Figure 17A**).

The isoform 2 of SUMO (SUMO2) has been shown to interact with NURR1 on a homologous SUMO acceptor sites (K91) (Arredondo, 2013) and to regulate NUR77 activity (Zárraga-Granados G, 2020; Zhang et al., 2017). Co-expression of increasing concentrations of SUMO2 (0, 100, 300 ng) reduced wild type and NUR77-K577R mutant transcriptional activities in a manner similar to PIAS γ overexpression (**Figure 17B**). Reduction was also less pronounced with the K577R mutation (100 ng and 300 ng of SUMO2 reduced wild type receptor activity by 38% and 67%, whereas 100 ng did not alter K577R mutant receptor activity and 300 ng reduced its activity by 32%) (**Figure 17B**). However, NUR77-K102R and NUR77-K102R/K577R mutants were not affected by SUMO2 overexpression (**Figure 17B**), suggesting that the effect of SUMO2 is lost in the presence of the K102R mutation. These results are compatible with the inhibitory effect of PIAS γ and SUMO2 on NUR77 transcriptional activity being mediated in part via SUMOylation at the K577 site, while K102 may contribute to activity of the receptor in a SUMO-independent manner. We cannot exclude however that other SUMO isoforms or SUMO acceptor sites also contribute to the repressive effect of PIAS γ overexpression.

Interestingly, combination of SUMO2 and PIAS γ overexpression further decreased wild type transcriptional activity (up to 87% reduction) and to a lesser extend NUR77-K577R mutant activity (58% reduction) (**Figure 17B**). Addition of PIAS γ + SUMO2 was also able to reduce

NUR77-K102R containing mutants (**Figure 17B**), as observed in **Figure 15A** (200 ng condition). Note that wild type and NUR77 mutant protein levels were similar in all experimental conditions (see [Fig. S7](#)). Together, these results suggest that PIAS γ and SUMO2 cooperate to suppress NUR77 transcriptional activity, acting in part via the conserved K577 site, while mutation of the K102 site residue strongly reduces transcriptional activity and the capacity of SUMO2 overexpression to synergize with PIAS γ overexpression.

2.8 Discussion

It is now well known that nuclear receptor activities are modulated by an array of co-regulators, including PIAS proteins (Kurakula et al., 2014; Zhang et al., 2017), which promote SUMOylation by enhancing recruitment of the E2 SUMO conjugase Ubc9 on target proteins (Rytinki, 2009). While SUMOylation of transcription factors has been usually associated with transcriptional repression, PIAS proteins have been shown to act either as co-activators and co-repressors of nuclear receptors, acting in a catalytically-dependent or independent manner (Rytinki, 2009). In the present study, we used gene reporter assays to monitor the impact of overexpression of PIAS proteins on NUR77 transcriptional activity at both monomeric and dimeric response elements in HEK293T cells. We show that both PIAS3 and PIAS γ , which are homologous proteins (Schmidt et Muller, 2003), although they regulate STAT activity and DNA binding differently (Seif et al., 2017), both suppress NUR77 transcriptional activity, consistent with previous reports linking each enzyme with NUR77 (NR4A1) or NURR1 (NR4A2) regulation (Arredondo, 2013; Galleguillos, 2004; Zhang et al., 2017). Since PIAS γ was shown to regulate the transcriptional activity of NURR1 we pursued our investigation with this isoform in order to compare regulation of NURR1 and NUR77 by this protein. A schematic summary of the results described herein is shown in supplementary data, [Fig. S8](#).

Our results indicate that PIAS γ and SUMO2 can act in a cooperating manner as NUR77 transcriptional corepressors. The SENP1 sensitivity of PIAS γ repression supports a mechanism whereby PIAS γ elicits its action through NUR77 SUMOylation. This is compatible with reports showing that NURR1 transcriptional activity was regulated by PIAS γ -mediated SUMOylation (Arredondo, 2013; Nishida et Yasuda, 2002; Sharrocks, 2006; Yunus et Lima, 2009). We further evaluated the individual impact of two putative consensus SUMO acceptor sites in NUR77, lysine residues 102 and 577, that are conserved in other NR4A members.

Phylogenetic analysis showed that a lysine residue at position 577 is present in most of the NUR77 orthologs evaluated, whereas the one at position 102 appeared later in mammals, suggesting that this site might represent a more recent adaptation of the gene. In addition, a similar phylogenetic analysis comparing NURR1 or NOR-1 orthologs also generated similar conclusions (see **Figure 13C**). It has been proposed that when putative SUMOylation sites are conserved

between related proteins and species (as observed here), this could be an indicator of SUMOylation at an endogenous level (Dustrude et al., 2017).

The repression exerted by PIAS γ and SUMO2 on NUR77 required, at least partially, NUR77 putative SUMO acceptor site K577, since repression was weaker when we mutated this site. This repressive effect is reminiscent of a role for SUMOylation in decreasing transcriptional activity of estrogen, glucocorticoid and androgen receptors (Hua, Ganti et Chambon, 2016; Poukka, Karvonen, Janne et Palvimo, 2000; Traboulsi, 2019). Lysine 577 is located in helix 11 and this helix is known to stabilize NURR1 and NUR77 activity through their co-regulator interface (Flaig et al., 2005; Volakakis, Malewicz, Kadkhodai, Perlmann et Benoit, 2006; Wang, 2003), in part by interacting with co-repressors that limit interactions between NUR77 and the transcriptional machinery such as HDAC1 (Kang, 2010) and TIM-1 (Balasubramanian, Kota, Kuchroo, Humphreys et Strom, 2012). It is therefore tempting to suggest that SUMOylation at lysine 577 in NUR77 may be necessary for the recruitment of NUR77 co-repressors.

On the other hand, the NUR77-K102R mutant displayed a significant decrease of NUR77 transcriptional activity and was resistant to the inhibitory effect of SUMO2 overexpression. Lysine 102 is within the AF-1 domain of NUR77 and this domain is known to interact with transcriptional coactivators that enhance interactions between NUR77 and the transcriptional machinery (Kurakula et al., 2014) such as CBP/p300, PCAF or SRC-1 (Kang, 2010; Kelly et al., 2005; Wansa, 2002). One obvious explanation is that lysine 102 may be involved in the recruitment of one of the co-activators mentioned above. Additional experiments will be needed in order to validate this hypothesis.

Comparison of the transcriptional activity of wild type and NUR77 mutants on the monomer NBRE and homodimer NurRE response elements is interesting because the increase of transcriptional activity observed with mutant K577R is higher, whereas the decrease with K102R is smaller on the homodimer than on the monomer response element (compared **Figure 16** and [Fig. S5](#)). Of note, the K577 residue location partially overlaps with the region involved in the dimerization of NURR1 and NUR77 (Flaig et al., 2005; Volakakis et al., 2006), although the specific involvement of K577 residue in NUR77 dimerization has never been experimentally investigated. Nevertheless, the present results suggest that the difference of activity observed between homodimeric and monomeric response elements might be influenced by this residue.

Also, the K102R mutation appears to mask the effect of the K577R site on NurRE response elements, supporting an activating role of the K102 residue in NUR77 activity, contrary to the K577 residue.

Interestingly, overexpressing NUR77-K577R and NUR77-K102R/K577R induced a significant increase of NUR77 target gene Glut4 expression in HEK293T cells, as compared to wild type NUR77 (see [Fig. S6](#)). As Glut4 is known to be induced by NUR77 expression (Chao, 2007a), this confirms that mutation of K577R induced activation of NUR77 target gene observed with artificial reporter assays, and suggests that this putative SUMO acceptor site could induce an activation of NUR77 target genes in physiological conditions. However, the effect observed with the K102R/K577R double mutant differs from the results observed in reporter assays, suggesting a context-dependent impact of these residues and/or their SUMOylation.

The mechanism underlying the ability of PIAS γ to repress NUR77-dependent transcription remains so far partly elusive. SUMOylation of other acceptor sites might be involved, as well as of other NUR77 cofactors. In addition, mutations of the SUMO acceptor sites may affect other properties of NUR77, such as its conformation, stability and/or capacity to recruit specific cofactors, complicating interpretation. Of note, the stability of the NUR77 protein was not significantly changed in the presence of these mutations in our study. This differs from previous results reporting that NUR77 SUMOylation could lead to increased degradation of the receptor (Zárraga-Granados G, 2020; Zhang et al., 2017). One possible explanation is the difference in experimental designs and cellular context used in these studies (different cell types, the use of double or triple mutant).

A striking finding of the present study is the opposite effects of the mutations of putative SUMO acceptor sites on transcriptional activity of NUR77 compared to NURR1 (Arredondo, 2013; Galleguillos, 2004). Indeed, the NURR1 K91 site was associated with lower, and the K577 site with higher, NURR1 transcriptional activity. The K91 residue of NURR1 is part of a synergy control motif (G85-X4-IKVE) (Arredondo, 2013). The K102 residue of NUR77 may also be included in a synergy control motif (P96-X4-FKFE) (Iniguez-Lluhi et Pearce, 2000), but the proline residue is flanked by a serine residue (S95) targeted by JNK kinase (Liu, 2007) and the isomerase Pin1 (Chen, 2012) in NUR77. Thus, mutation of the K102 residue may interfere with phosphorylation-dependent regulatory processes. Conversely, SUMOylation at K102 might be

regulated by the state of phosphorylation at S95 residue, as reported in other synergy control motifs (Hietakangas, 2006). It is important to mention that the S95 residue of NUR77 is not conserved in NURR1 (Kurakula et al., 2014).

Although NUR77 and NURR1 have been shown to display redundant activities (Lee, 1995), they may play different roles in a specific cellular context. For example, they seem to have opposite roles in midbrain dopamine neurons of the substantia nigra, where NURR1 exerts a pro-survival activity (Wallen-Mackenzie, 2003), whereas NUR77 is associated with dopamine cell loss after exposition to neurotoxins (Rouillard, 2018). Differential PTMs of NUR77 and NURR1 may explain, at least in part, differential activities of NUR77 and NURR1, despite the fact that they regulate similar gene responsive elements.

2.9 Conclusions

In summary, our results indicate that SUMO2 and PIAS γ are co-regulators of NUR77 that can play a key role in limiting the transcriptional activation mediated by this orphan nuclear receptor. To fully understand the regulation of NUR77 transcriptional activity by SUMOylation, the next steps should focus on extensively characterizing the SUMOylation sites of NUR77 and the signaling events controlling receptor SUMOylation.

Credit authorship contribution statement

FD, SM and DL designed the project. FD performed all the experimental work except for the co-immunofluorescence, which was done by ED and the western blot of the Fig. S1, which was performed by AV. FD, DL and SM analysed the results and wrote the manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Giovanni Hernandez for his help for the optimization of Western blots, to Dr. Pierre-Luc Boulay for his contribution to the generation of SUMO2 plasmid and Marine Diennet and Sandra Weber from the Mader laboratory for technical support. This work was supported by research grants from Canadian Institutes of Health Research (CIHR grant #PJT-156199 to SM and operating grant #130407 to DL).

2.10 Figures

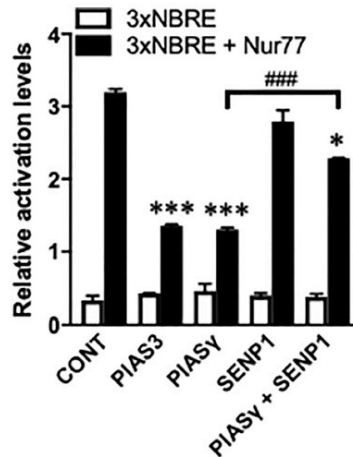


Figure 13 - Protein inhibitors of Activated STAT (PIAS3 and PIAS γ) repress NUR77 transcriptional activity on NBRE response element and sentrin SUMO-specific protease 1 (SENP1) rescues PIAS γ repression.

HEK293T cells were transiently transfected with 3xNBRE-Rluc (300 ng), human NUR77 (100 ng), PIAS3 or γ (200 ng) and human SENP1 (200 ng) constructs. Forty-eight hours post-transfection cells were harvested and lysed. Then, samples were assayed for luciferase activity. Histogram bars represent mean \pm SD (results are representative of 2 experiments performed independently with 3 technical replicates in each experiment). One-way ANOVA analysis followed by Tukey's multiple comparison post-hoc test was applied to determine statistical significance ($p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs NBRE + NUR77 control (CONT) group; ### $p < 0.001$ vs NBRE + NUR77 + PIAS γ group) (see supplementary data, Figs. S1 and S2 for additional information).*

A SUMO acceptor site prediction analysis

Number	Position	SUMO motif Ψ KX(E/D)	Score Abgent SUMOplot™	Score GPS- SUMO	Score SUMOhydro
1	K577	QRIFY <u>LKLE</u> DLVPP	0.91	26.34	0.95
2	K102	PASAS <u>FKFE</u> DFQVY	0.85	16.575	0.93
3	K381	SGPST <u>AKLD</u> YSKFQ	0.79	21.518	0.78
4	K397	VLPHF <u>GKED</u> AGDVQ	0.67	14.542	-
5	K558	LSRLL <u>GKLP</u> ELRTL	0.57	-	0.51

B



	K102		NUR77	K577	
<i>Homo sapiens</i> (human)	SSSATSPASAS <u>FKFE</u> DFQVYGCYPGPLSGPVDLSSSG	128	LQRIFY <u>LKLE</u> DLVPPPPPIIDKIFMDTLPF	598	
<i>Macaca fascicularis</i> (macaque)	SSSATSPASAS <u>FKFE</u> DFQVYGCYPGPLSGPVDLSSSG	200	LQRIFY <u>LKLE</u> DLVPPPPPIIDKIFMDTLPF	670	
<i>Rattus norvegicus</i> (rat)	SSSATSPASAS <u>FKFE</u> DFQVYGCYPGTLSPGLDETLSSSG	127	LQRIF <u>LKLE</u> DLVPPPPPIVDKIFMDTLSF	597	
<i>Mus musculus</i> (mouse)	SSSATSPASAS <u>FKFE</u> DFQVYGCYPGTLSPGLDETLSSSG	130	LQRIF <u>LKLE</u> DLVPPPPPIVDKIFMDTLSF	601	
<i>Nipponia nippon</i> (Crested ibis)	-----	0	LQRIFY <u>LKLE</u> DLVPPPPPIVDKIFMDTLPF	353	
<i>Drosophila melanogaster</i> (DHR38)	--SPSSASSLYEYNGV-----SAA	91	LQRIFY <u>LKLE</u> DLVPAPALIENMFVTTLPF	551	
	K91		NURR1	K577	
<i>Homo sapiens</i> (human)	GQQSS <u>IKVE</u> DIQMHNYYQHQSHLPPQSEEMPHSGSV	120	QGLQRIFY <u>LKLE</u> DLVPPPAIIDKLFDLTLPF	598	
<i>Macaca fascicularis</i> (macaque)	GQQSS <u>IKVE</u> DIQMHNYYQHQSHLPPQSEEMPHSGSV	120	QGLQRIFY <u>LKLE</u> DLVPPPAIIDKLFDLTLPF	598	
<i>Rattus norvegicus</i> (rat)	GQQSS <u>IKVE</u> DIQMHNYYQHQSHLPPQSEEMPHSGSV	120	QGLQRIFY <u>LKLE</u> DLVPPPAIIDKLFDLTLPF	598	
<i>Mus musculus</i> (mouse)	GQQSS <u>IKVE</u> DIQMHNYYQHQSHLPPQSEEMPHSGSV	120	QGLQRIFY <u>LKLE</u> DLVPPPAIIDKLFDLTLPF	598	
<i>Nipponia nippon</i> (Crested ibis)	GQQSS <u>IKVE</u> DIQMHNYYQHQSHLPPQSEEMPHSGSV	120	QGLQRIFY <u>LKLE</u> DLVPPPAIIDKLFDLTLPF	538	
<i>Drosophila melanogaster</i> (DHR38)	GQQQQQQQSSYQHNH-----NSHNGER	107	QGLQRIFY <u>LKLE</u> DLVPAPALIENMFVTTLPF	551	
	K85		NOR-1	K605	
<i>Homo sapiens</i> (human)	SNYELKPSVCYQMQ-----RPL <u>IKVE</u> EGRAPSYHHHHHQ	100	EPTESKVLGALVELRRICTGLQRIFY <u>LKLE</u> DLVSPPS	614	
<i>Macaca fascicularis</i> (macaque)	SNYELKPSVCYQMQ-----RPL <u>IKVE</u> EGRAPSYHHHHHQ	100	EPTESKVLGALVELRRICTGLQRIFY <u>LKLE</u> DLVSPPS	625	
<i>Rattus norvegicus</i> (rat)	SSCELKPSCLYQMP--SGPRPL <u>IKME</u> EGREHGHHH--H	274	EPSEPKVLRALVELRRICTGLQRIFY <u>LKLE</u> DLVSPPS	788	
<i>Mus musculus</i> (mouse)	SSCELKPSCLYQMP--SGPRPL <u>IKME</u> EGREHGHHH--H	100	EPSEPKVLRALVELRRICTGLQRIFY <u>LKLE</u> DLVSPPS	615	
<i>Nipponia nippon</i> (Crested ibis)	GSYELKPSCLYQMSASSGQRPL <u>IKME</u> DTLRSYQ-----	104	ESAEPKVLGVLADLRSCLTGLQRIFY <u>LKLE</u> DLVPAPS	597	
<i>Drosophila melanogaster</i> (DHR38)	-----QM-----S-HPNSSNNSSNAGNSHNSNGG	56	QHYFSRLLGKLPRLRSLSVQGLQRIFY <u>LKLE</u> DLVPAPA	539	

Figure 14 - Putative SUMO acceptor sites K577 and K102 are highly probable and phylogenetically well-conserved in NUR77.

A) *In silico* analysis of SUMO acceptor sites in human NUR77. The table shows the SUMO motif sequences and probability scores of the potential SUMO acceptor sites (Ψ KxE/D) of human NUR77 according to three different softwares. Putative SUMO acceptor lysines (K) are in bold and potential SUMO sites are underlined. **B)** Putative NUR77 SUMO acceptor site at K102 is contained in the activity function domain-1 (AF-1 or transactivation domain, TD), whereas K577 site is in the ligand binding domain (LBD)/AF-2 domain. DBD, DNA binding domain. **C)** Phylogenetic alignments of amino acid segments of NUR77, NURR1 and NOR-1 proteins containing putative SUMO acceptor sites K102 and K577 across different species with an ortholog of NUR77 from drosophila (DHR38) with Clustal Omega software.

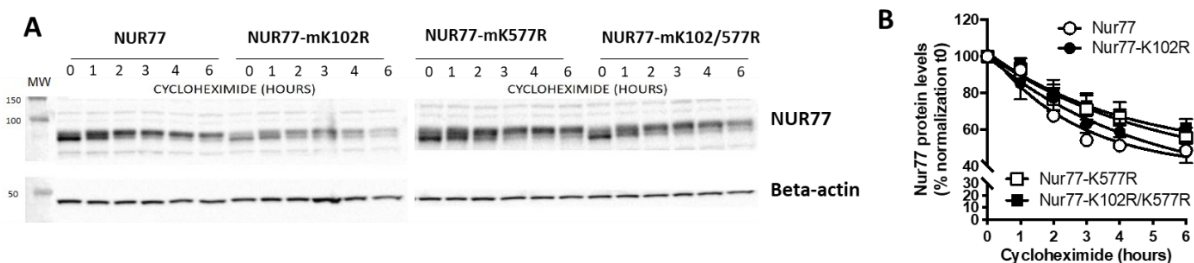


Figure 15 - Mutations of putative SUMO acceptor sites K102 and K577 do not affect NUR77 protein stability.

HEK293T cells were transfected with human NUR77 (100 ng), NUR77-K102R (100 ng), NUR77-K577R (100 ng) or NUR77-K102R/K577R mutant (100 ng). A) Representative Western blots generated 36 h after transfection of the cells treated or not (time 0) with protein synthesis inhibitor cycloheximide (50 μ M) and harvested at the indicated hours. Total extracts were migrated in SDS-PAGE and Western blots performed with anti-NUR77 and anti- β -actin (load control) antibodies. Expected signal bands are ~64 kDa for NUR77 and ~45 kDa for β -actin (MW, molecular weight markers). B) Quantitative densitometry analysis was performed and analyzed using non-linear regression (one phase decay) best least squares fit. Data are expressed as percentage of wild type NUR77 levels or respective NUR77 mutant expression normalized over β -actin levels at zero time point. Each time point corresponds to the mean \pm SEM (N = 3 experiments performed independently with 3 technical replicates in each experiment). No significant difference was evidenced between wild-type and NUR77 mutants.

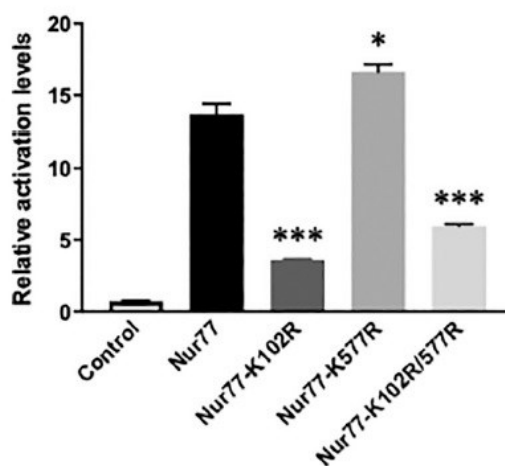


Figure 16 - Mutations of putative SUMO acceptor sites K102 and K577 modulate NUR77 transcriptional activity.

HEK293T cells were transiently transfected with 3xNBRE-Fluc (300 ng) with wild type NUR77 (100 ng), NUR77-K102R (200 ng), NUR77-K577R (150 ng) or NUR77-K102R/K577R mutant (150 ng). Forty-eight hours post-transfection, cells were harvested and the extracts assayed for luciferase activity. Control condition contains the NBRE construct alone. Histogram bars represent mean \pm SD (N = 3 experiments performed independently with 3 technical replicates in

each experiment). One-way ANOVA analysis followed by Tukey's multiple comparison post-hoc test was applied to determine statistical significance (* p -value <0.05 and *** p -value <0.001 vs NUR77 group) (See supplementary data, Fig. S4 for additional information).

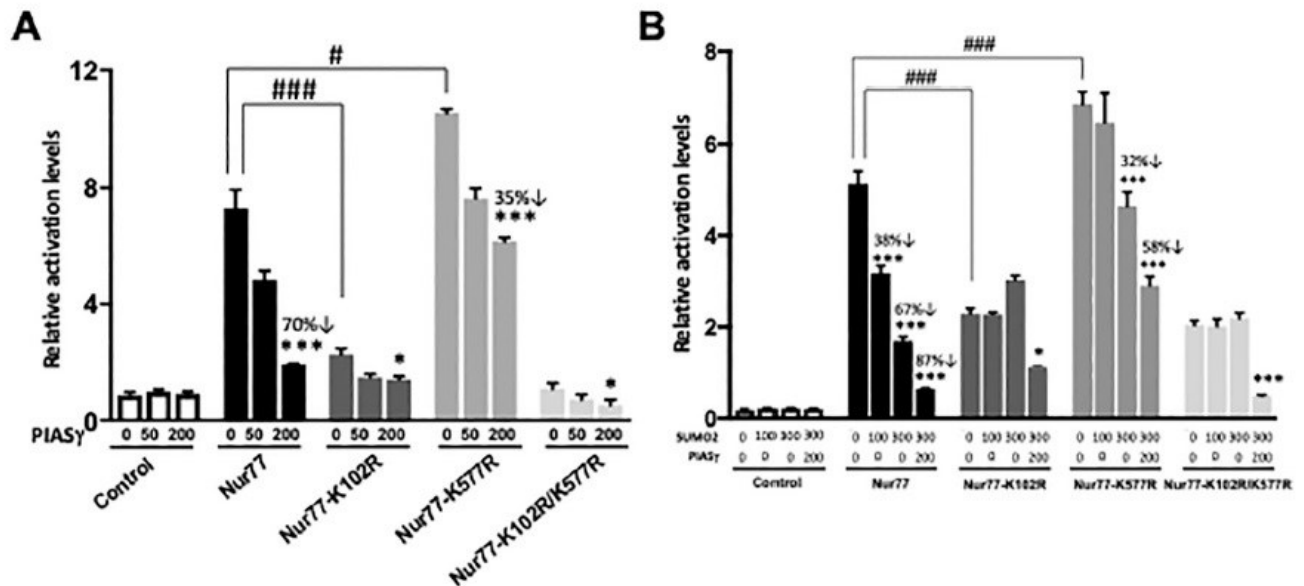


Figure 17 - Both PIAS γ and SUMO2 repress NUR77 transcriptional activity and SUMO2 potentializes PIAS γ repression.

(A) HEK293T cells were transiently transfected with 3xNBRE-Fluc (300 ng), with NUR77 (100 ng), NUR77-K102R (200 ng), NUR77-K577R (150 ng) or NUR77-K102R/K577R mutant (150 ng) and human PIAS γ (0, 50 or 200 ng) constructs. Forty-eight hours post-transfection, cells were harvested and the extracts assayed for luciferase activity. The control condition contains the 3xNBRE construct alone. Histogram bars represent mean \pm SD (results are representative of 2 experiments performed independently with 3 technical replicates in each experiment). A one-way ANOVA analysis followed by a Tukey's multiple comparison post-hoc test was applied to determine statistical significance between groups co-transfected with different concentrations of PIAS γ (***) $p < 0.001$ and * $p < 0.05$ for wild type or mutant NUR77 with vs without PIAS γ , respectively; # $p < 0.05$ and #### $p < 0.001$ for mutant NUR77 vs wild type NUR77 (0 ng PIAS γ). (B) HEK293T cells were transiently transfected with 3xNBRE-Fluc (300 ng) with human NUR77 (100 ng), NUR77-K102R (200 ng), NUR77-K577R (150 ng) or NUR77-K102R/K577R mutant (150 ng) and human

SUMO2 (0, 100 or 300 ng) constructs. Groups of wild type and NUR77 mutant constructs were also co-transfected with SUMO2 (300 ng) + PIAS γ (200 ng). Forty-eight hours post-transfection, cells were harvested and the extracts assayed for luciferase activity. Histogram bars represent mean \pm SD (results are representative of 2 experiments performed independently with 3 technical replicates in each experiment). The one-way ANOVA analysis followed by a Tukey's multiple comparison post-hoc test was applied to determine statistical significance between groups ($p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ for the impact of SUMO2 + PIAS γ overexpression vs the respective 0 SUMO2 – 0 PIAS γ controls, ### $p < 0.001$ for mutant vs wild type NUR77 without SUMO2 and PIAS γ overexpression) (see supplementary data, Fig. S7 for additional information).*

2.11 Supplementary Figures

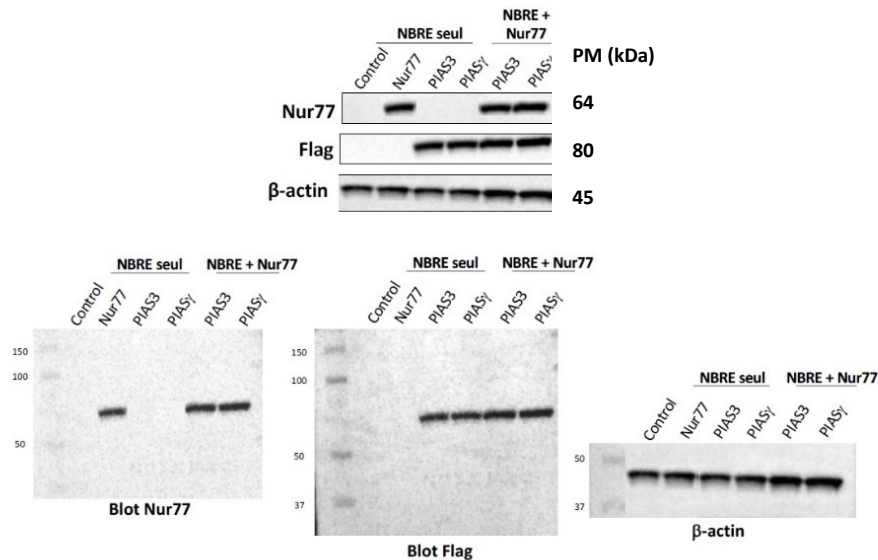
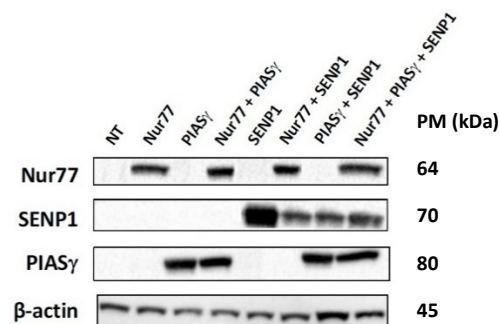


Figure S1 - NUR77 and PIAS protein expression from our transfected constructs in HEK293T cells.

Top panel. Representative Western blots generated 36 hours after transfection of 3xNBRE-Rluc (300 ng), NUR77 (100 ng), PIAS3 (200 ng) and/or PIASy (200 ng) are presented. Total protein extracts from HEK293T cells were migrated in SDS-PAGE and Western blotting performed with anti-NUR77 antibody (BD Pharmingen™), anti-Flag (Abcam) to detect PIAS proteins, and anti- β -actin (Cell Signaling) antibodies (this figure supports data presented in **Figure 13**) (control = non transfected cells). **Lower panels.** Representative Western blots showing molecular weight markers (Precision Plus Protein Kaleidoscope Pre-stained standards #1610375, Bio-Rad). Expected signal bands are: around 64 kDa for NUR77 (lower left panel), about 80 kDa for PIAS proteins (anti-Flag, lower middle panel) and 45 kDa for β -actin (lower right panel).



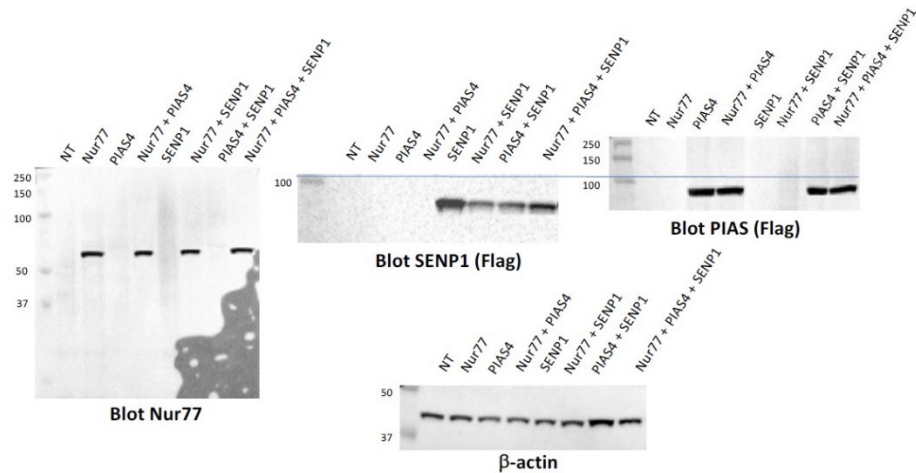


Figure S2 - Co-expression of PIAS γ , SENP1, GFP and NUR77 proteins in HEK293T cells.

Top Panel. HEK293T cells were transiently transfected with 3xNBRE-Rluc (300 ng), human NUR77 (100 ng), human PIAS γ (200 ng) and human Flag-SENP1 (200 ng) constructs. Representative Western blots generated 36 hours after transfection are presented. Total extracts were migrated in SDS-PAGE and Western blotting performed with anti-NUR77, anti-Flag to detect SENP1 and PIAS γ , and anti-b-actin antibodies. All experimental conditions show similar NUR77 and PIAS γ protein levels (this figure supports data presented in **Figure 13**) (NT= non transfected cells). **Lower panels.** Representative Western blots showing molecular weight markers (Precision Plus Protein Kaleidoscope Pre stained standards #1610375, Bio-Rad). Expected signal bands are: around 64 kDa for NUR77 (lower left panel), about 80 kDa for PIAS proteins (anti-Flag, lower middle panel), about 70 kDa for SENP1 protease (anti-Flag) and 45 kDa for b-actin (lower right panel).

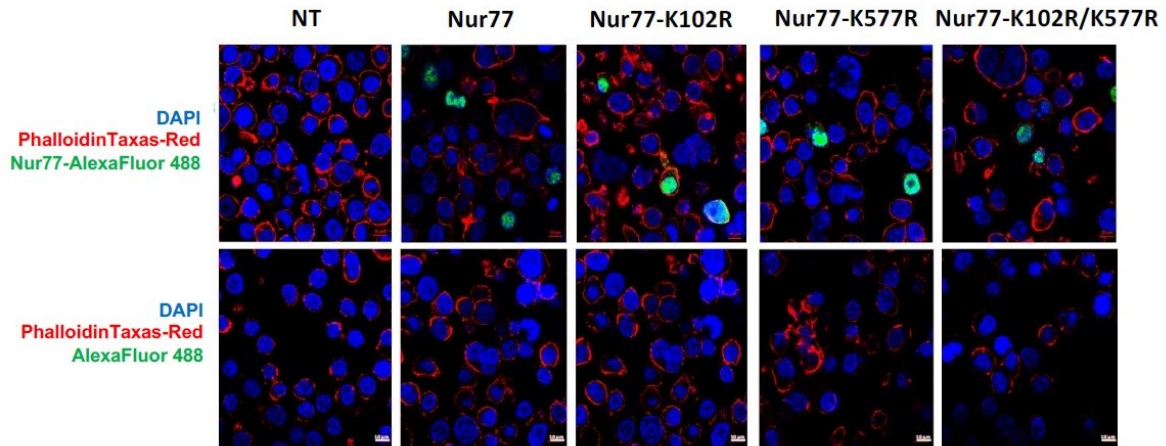
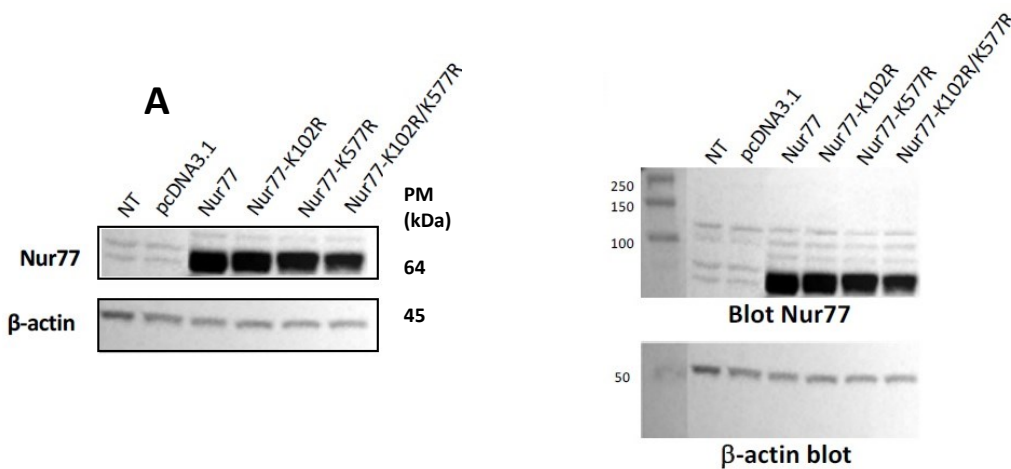


Figure S3 - Localization of NUR77 was not affected by mutations.

HEK293T cells were transfected with 100 ng of human NUR77, 200 ng of NUR77-K102R, 150 ng of NUR77- K577R or 150 ng of NUR77-K102R/K577R to ensure comparable amount of protein expression. 48 h post-transfection, cells were stained with Phalloidin-Texas Red and NUR77 antibody coupled with secondary antibody coupled to Alexa-mouse 488 (in green) were used. The bottom panel represents the isotype controls for NUR77. DAPI was used to stain the nuclei. Image acquisition was performed with Zeiss confocal microscopy (NT= non transfected cells, scale bars are located at lower panels bottom right corners and represents 10 μm of length).



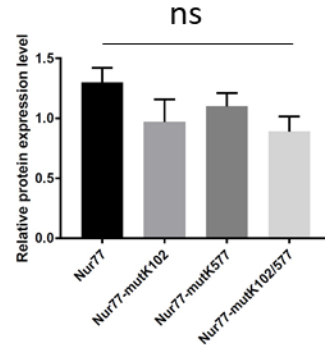
B

Figure S4 - Transfections of NUR77 and mutants with normalized plasmid amounts leads to similar protein expression levels.

A) Left panel. HEK293T cells were transfected with 100 ng of human NUR77, 200 ng of NUR77-K102R, 150 ng of NUR77-K577R and 150 ng of NUR77-K102R/K577R. Representative Western blots generated 36 hours after transfection is presented. Total extracts were migrated in SDS-PAGE and Western blotting performed with anti-NUR77 and anti-b-actin (loading control) antibodies (this figure supports data presented in **Figure 14**) (NT= non transfected cells). **Right panel.** Representative Western blots showing molecular weight markers (Precision Plus Protein Kaleidoscope Pre-stained standards #1610375, Bio-Rad). Expected signal bands are: around 64 kDa for NUR77 (rith top panel) and 45 kDa for b-actin (right lower panel).

B) Expression protein levels of NUR77 and mutants were evaluated from western blot from Figure S4A. Histogram bars represent mean \pm SD of 3 experiments performed independently with 3 technical replicates in each experiment \pm SD. A one-way ANOVA analysis followed by a Tukey's multiple comparison post-hoc test was applied to determine statistical significance.

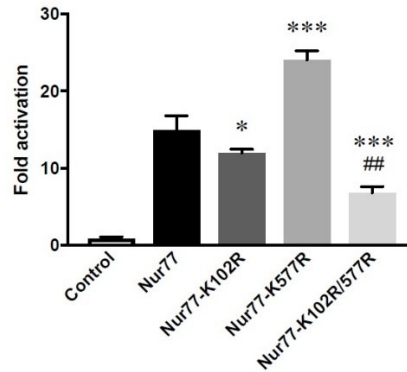


Figure S5 - Mutations of putative SUMO acceptor sites K102 and K577 modulate transcriptional activity of NUR77 homodimers on NurRE response elements.

HEK- 293T cells were transiently transfected with the 3xNurRE-Fluc reporter vector with wild type NUR77 or NUR77 mutants, as indicated. Forty-eight hours post-transfection, cells were harvested, and the extracts assayed for luciferase activity. Histogram bars represent mean luciferase activity \pm SD (N=3). One-way ANOVA analysis followed by Tukey's multiple comparison post-hoc test was applied and statistical significance is represented (p -value < 0.05 and *** p -value < 0.001 vs NUR77 group; ## p <0.01 vs NUR77-K102R group).*

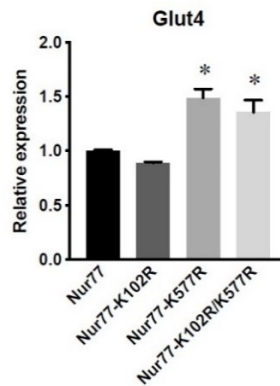


Figure S6 - Mutations of putative SUMO acceptor sites K577 and K102/K577 modulate RNA levels of the NUR77 direct target gene GLUT4 in HEK293T cells.

Cells were transiently transfected with wild type NUR77 or mutants, as indicated. Twenty-four hours post-transfection, cells were collected for total RNA extraction and RT-qPCR. Histogram bars represent mean \pm SD relative expression of GLUT4 (N=2). One-way ANOVA analysis

followed by Dunnett's multiple comparison post-hoc test was applied and statistical significance with NUR77 is represented (* P value < 0.05 vs NUR77 group).

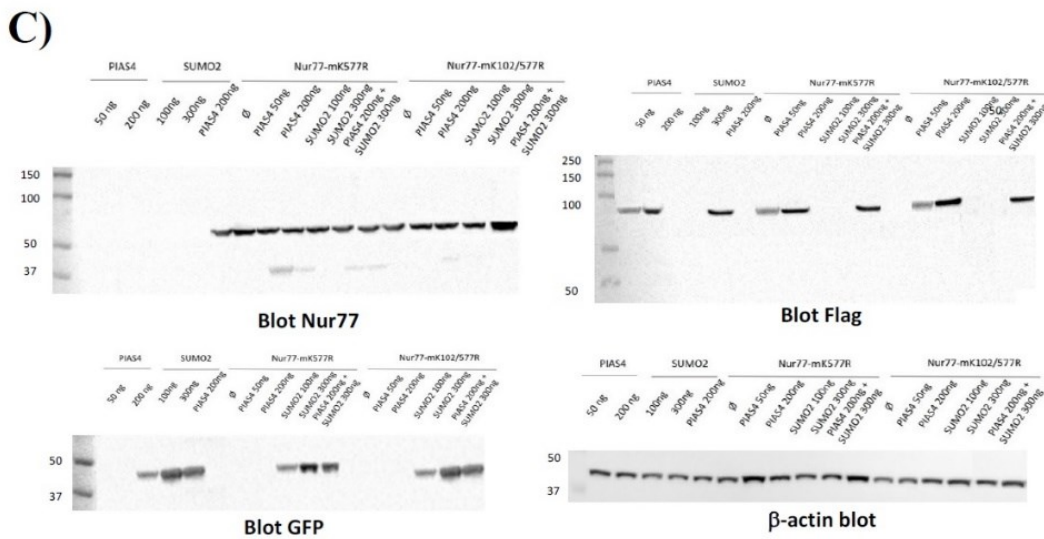
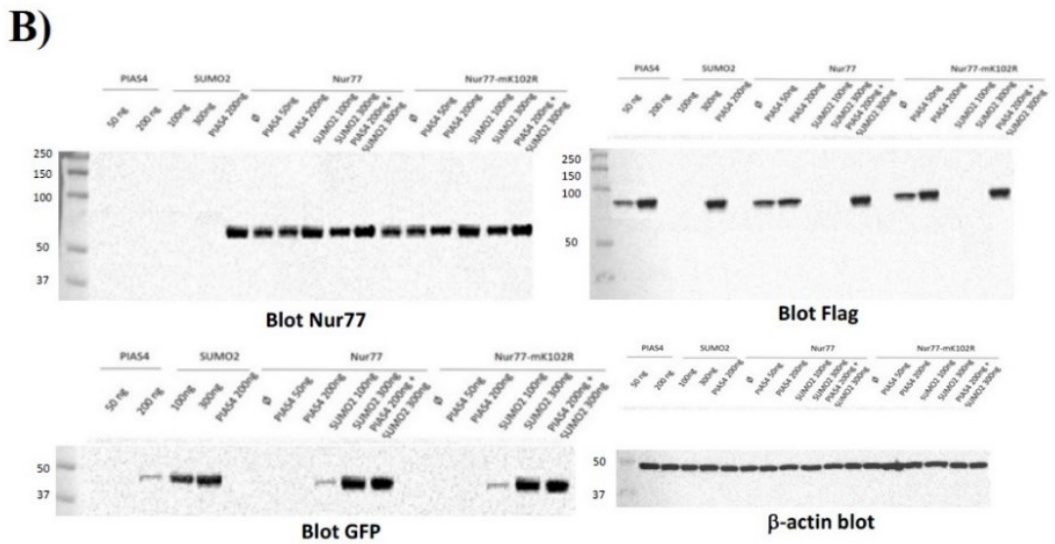
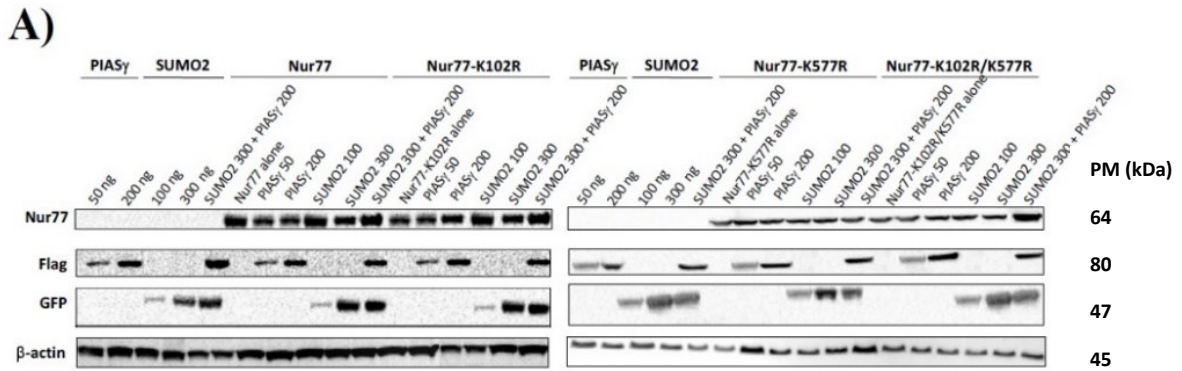


Figure S7 - Co-expression of PIAS γ , SUMO2 and or GFP and NUR77 proteins.

(A) HEK293T cells were transiently transfected with 3xNBRE-Fluc (300 ng), NUR77 (100 ng), or NUR77-K102R (200 ng), NUR77-K577R (150 ng) or NUR77-K102R/K577R double mutants (150 ng), with human Flag-PIAS γ (50 or 200 ng) and human GFP-SUMO2 (100 or 300 ng) constructs. Representative Western blots generated 36 hours after transfection are presented. Total extracts were migrated in SDS-PAGE and Western blotting performed with anti-NUR77, anti-Flag, anti-GFP (to detect GFP and HA-SUMO2-YFP plasmids) antibodies (this figure supports data presented in **Figure 17A and B**). (B) Representative Western blots showing molecular weight markers (Precision Plus Protein Kaleidoscope Pre-stained standards #1610375, Bio-Rad) for wild type NUR77 and NUR77-K102R mutant. Expected signal bands are: around 64 kDa for NUR77 (top left panel), about 80 kDa for PIAS γ protein (anti-Flag, top right panel), about 45 kDa for SUMO2 (anti-GFP for HA-SUMO2-YFP plasmid, lower left panel) and 45 kDa for b-actin (lower right panel). (C) Representative Western blots showing molecular weight markers (Precision Plus Protein Kaleidoscope Pre-stained standards #1610375, Bio-Rad) for NUR77-K577R and NUR77-K102R/K577R mutants. Expected signal bands are: around 64 kDa for NUR77 (top left panel), about 80 kDa for PIAS γ protein (anti-Flag, top right panel), about 45 kDa for SUMO2 (anti-GFP for HA-SUMO2-YFP plasmid, lower left panel) and 45 kDa for b-actin (lower right panel).

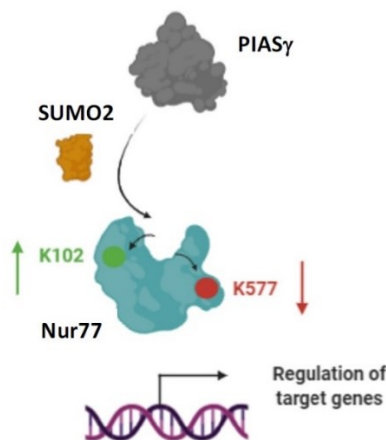


Figure S8 - Schematic summary of the results.

The present data indicate that NUR77 transcriptional activity is regulated by SUMO2 and PIASy. Mutation of the two putative SUMO acceptor sites K102 and K577 regulate NUR77 activity in opposite fashion. Mutation of K102 site strongly reduced NUR77 activity, whereas mutation of K577 potentialized its transcriptional activity, suggesting that post-translational modifications at these sites may participate in the upregulation (green arrow) and downregulation (red arrow) of the expression of NUR77 gene targets, respectively.

2.12 References

- [1] M.A. Maxwell, G.E.O. Muscat, The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles, *Nucl. Recept. Signal.*, 4 (2005) e002 Epub.
- [2] K. Kurakula, D.S. Koenis, C.M. van Tiel, C.J. de Vries, NR4A nuclear receptors are orphans but not lonesome, *Biochim. Biophys. Acta*, 1843 (2014) 2543-2555.
- [3] D. Campos-Melo, D. Galleguillos, N. Sanchez, K. Gysling, M.E. Andres, Nur transcription factors in stress and addiction, *Front. Mol. Neurosci.*, 6 (2013) 44.
- [4] H.C. Hsu, T. Zhou, J.D. Mountz, NUR77 family of nuclear hormone receptors, *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 3 (2004) 413-423.
- [5] T.E. Wilson, T.J. Fahrner, M. Johnston, J. Milbrandt, Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast, *Science*, 252 (1991) 1296-1300.
- [6] M. Maira, C. Martens, A. Philips, J. Drouin, Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation, *Mol. Cell. Biol.*, 19 (1999) 7549-7557.
- [7] A. Philips, S. Lesage, R. Gingras, M.-H. Maira, Y. Gauthier, P. Hugo, J. Drouin, Novel dimeric NUR77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells, *Mol. Cell. Biol.*, 17 (1997) 5946-5951.
- [8] Z. Wang, G. Benoit, J. Liu, S. Prasad, P. Aarnisalo, X. Liu, H. Xu, N.P. Walker, T. Perlmann, Structure and function of NURR1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors, *Nature*, 423 (2003) 555-560.
- [9] R. Flaig, H. Greschik, C. Peluso-Iltis, D. Moras, Structural basis for the cell-specific activities of the NGFI-B and the NURR1 ligand-binding domain, *J. Biol. Chem.*, 280 (2005) 19250-19258.
- [10] I.M.S. de Vera, P. Munoz-Tello, J. Zheng, V. Dharmarajan, D.P. Marciano, E. Matta-Camacho, P.K. Giri, J. Shang, T.S. Hughes, M. Rance, P.R. Griffin, D.J. Kojetin, Defining a Canonical Ligand-Binding Pocket in the Orphan Nuclear Receptor NURR1, *Structure (London, England : 1993)*, 27 (2019) 66-77.e65.
- [11] Y. Zhan, X. Du, H. Chen, J. Liu, B. Zhao, D. Huang, G. Li, Q. Xu, M. Zhang, B.C. Weimer, D. Chen, Z. Cheng, L. Zhang, Q. Li, S. Li, Z. Zheng, S. Song, Y. Huang, Z. Ye, W. Su, S.C. Lin, Y. Shen, Q. Wu, Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor NUR77, *Nat. Chem. Biol.*, 4 (2008) 548-556.

- [12] S. Safe, U.H. Jin, E. Hedrick, A. Reeder, S.O. Lee, Minireview: role of orphan nuclear receptors in cancer and potential as drug targets, *Mol. Endocrinol.*, 28 (2014) 157-172.
- [13] K.D.S.A. Wansa, J.M. Harris, G.E. Muscat, The activation function-1 domain of NUR77/NR4A1 mediates trans-activation, cell specificity, and coactivator recruitment, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 33001-33011.
- [14] S.N. Kelly, T.J. McKenna, L.S. Young, Coregulatory protein-orphan nuclear receptor interactions in the human adrenal cortex, *J. Endocrinol.*, 186 (2005) 33-42.
- [15] L. Zhang, F. Xie, J. Zhang, P.T. Dijke, F. Zhou, SUMO-triggered ubiquitination of NR4A1 controls macrophage cell death, *Cell Death Differ.*, 24 (2017) 1530-1539.
- [16] C. Arredondo, M. Orellana, A. Vecchiola, L.A. Pereira, L. Galdames, M.E. Andres, PIASgamma enhanced SUMO2 modification of NURR1 activation-function-1 domain limits NURR1 transcriptional synergy, *PLoS One*, 8 (2013) e55035.
- [17] D. Galleguillos, A. Vecchiola, J.A. Fuentealba, V. Ojeda, K. Alvarez, A. Gomez, M.E. Andres, PIASgamma represses the transcriptional activation induced by the nuclear receptor NURR1, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 2005-2011.
- [18] Z. Hannoun, S. Greenhough, E. Jaffray, R.T. Hay, D.C. Hay, Post-translational modification by SUMO, *Toxicology*, 278 (2010) 288-293.
- [19] K. Kaur, H. Park, N. Pandey, Y. Azuma, R.N. De Guzman, Identification of a new small ubiquitin-like modifier (SUMO)-interacting motif in the E3 ligase PIASy, *J. Biol. Chem.*, 292 (2017) 10230-10238.
- [20] J.M. Henley, T.J. Craig, K.A. Wilkinson, Neuronal SUMOylation: mechanisms, physiology, and roles in neuronal dysfunction, *Physiol. Rev.*, 94 (2014) 1249-1285.
- [21] K. Kunz, T. Piller, S. Müller, SUMO-specific proteases and isopeptidases of the SENP family at a glance, *J. Cell Sci.*, 131 (2018) jcs211904.
- [22] G. Zárraga-Granados, G. Muciño-Hernández, M.R. Sánchez-Carbente, W. Villamizar-Gálvez, A. Peñas-Rincón, C. Arredondo, M.E. Andrés, C. Wood, L. Covarrubias, S. Castro-Obregón, The nuclear receptor NR4A1 is regulated by SUMO modification to induce autophagic cell death, *PLoS One*, 15 (2020) e0222072.
- [23] C.D. Chung, J. Liao, B. Liu, X. Rao, P. Jay, P. Berta, K. Shuai, Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3, *Science*, 278 (1997) 1803-1805.

- [24] J. Cheng, X. Kang, S. Zhang, E.T. Yeh, SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1 α during hypoxia, *Cell*, 131 (2007) 584-595.
- [25] K. Saijo, B. Winner, C.T. Carson, J.G. Collier, L. Boyer, M.G. Rosenfeld, F.H. Gage, C.K. Glass, A NURR1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death, *Cell*, 137 (2009) 47-59.
- [26] J.D. Sutherland, T. Kozlova, G. Tzertzinis, F.C. Kafatos, Drosophila hormone receptor 38: a second partner for Drosophila USP suggests an unexpected role for nuclear receptors of the nerve growth factor-induced protein B type, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 (1995) 7966-7970.
- [27] K.D. Baker, L.M. Shewchuk, T. Kozlova, M. Makishima, A. Hassell, B. Wisely, J.A. Caravella, M.H. Lambert, J.L. Reinking, H. Krause, C.S. Thummel, T.M. Willson, D.J. Mangelsdorf, The Drosophila orphan nuclear receptor DHR38 mediates an atypical ecdysteroid signaling pathway, *Cell*, 113 (2003) 731-742.
- [28] L.C. Chao, Z. Zhang, L. Pei, T. Saito, P. Tontonoz, P.F. Pilch, NUR77 coordinately regulates expression of genes linked to glucose metabolism in skeletal muscle, *Mol. Endocrinol.*, 21 (2007) 2152-2163.
- [29] M.M. Rytinki, S. Kaikkonen, P. Pehkonen, T. Jaaskelainen, J.J. Palvimo, PIAS proteins: pleiotropic interactors associated with SUMO, *Cell. Mol. Life Sci.*, 66 (2009) 3029-3041.
- [30] D. Schmidt, S. Müller, PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation, *Cell. Mol. Life Sci.*, 60 (2003) 2561-2574.
- [31] F. Seif, M. Khoshmirsafa, H. Aazami, M. Mohsenzadegan, G. Sedighi, M. Bahar, The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells, *Cell Commun. Signal.*, 15 (2017) 23.
- [32] A.D. Sharrocks, PIAS proteins and transcriptional regulation--more than just SUMO E3 ligases?, *Genes Dev.*, 20 (2006) 754-758.
- [33] A.A. Yunus, C.D. Lima, Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 ligase Siz1 and determinants required for SUMO modification of PCNA, *Mol. Cell*, 35 (2009) 669-682.
- [34] T. Nishida, H. Yasuda, PIAS1 and PIAS α function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 41311-41317.

- [35] E.T. Dustrude, S. Perez-Miller, L. Francois-Moutal, A. Moutal, M. Khanna, R. Khanna, A single structurally conserved SUMOylation site in CRMP2 controls NaV1.7 function, *Channels (Austin)*, 11 (2017) 316-328.
- [36] T. Traboulsi, M. El Ezzy, V. Dumeaux, E. Audemard, S. Mader, Role of SUMOylation in differential ERalpha transcriptional repression by tamoxifen and fulvestrant in breast cancer cells, *Oncogene*, 38 (2019) 1019-1037.
- [37] H. Poukka, U. Karvonen, O.A. Janne, J.J. Palvimo, Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 (2000) 14145-14150.
- [38] G. Hua, K.P. Ganti, P. Chambon, Glucocorticoid-induced tethered transrepression requires SUMOylation of GR and formation of a SUMO-SMRT/NCoR1-HDAC3 repressing complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113 (2016) E635-E643.
- [39] N. Volakakis, M. Malewicz, B. Kadkhodai, T. Perlmann, G. Benoit, Characterization of the NURR1 ligand-binding domain co-activator interaction surface, *J. Mol. Endocrinol.*, 37 (2006) 317-326.
- [40] S.A. Kang, H. Na, H.J. Kang, S.H. Kim, M.H. Lee, M.O. Lee, Regulation of NUR77 protein turnover through acetylation and deacetylation induced by p300 and HDAC1, *Biochem. Pharmacol.*, 80 (2010) 867-873.
- [41] S. Balasubramanian, S.K. Kota, V.K. Kuchroo, B.D. Humphreys, T.B. Strom, TIM Family Proteins Promote the Lysosomal Degradation of the Nuclear Receptor NUR77, *Sci. Signal.*, 5 (2012) ra90.
- [42] J.A. Iniguez-Lluhi, D. Pearce, A common motif within the negative regulatory regions of multiple factors inhibits their transcriptional synergy, *Mol. Cell. Biol.*, 20 (2000) 6040-6050.
- [43] B. Liu, J.F. Wu, Y.Y. Zhan, H.Z. Chen, X.Y. Zhang, Q. Wu, Regulation of the orphan receptor TR3 nuclear functions by c-Jun N terminal kinase phosphorylation, *Endocrinology*, 148 (2007) 34-44.
- [44] H.Z. Chen, L. Li, W.J. Wang, X.D. Du, Q. Wen, J.P. He, B.X. Zhao, G.D. Li, W. Zhou, Y. Xia, Q.Y. Yang, C.L. Hew, Y.C. Liou, Q. Wu, Prolyl isomerase Pin1 stabilizes and activates orphan nuclear receptor TR3 to promote mitogenesis, *Oncogene*, 31 (2012) 2876-2887.

- [45] V. Hietakangas, J. Anckar, H.A. Blomster, M. Fujimoto, J.J. Palvimo, A. Nakai, L. Sistonen, PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 (2006) 45-50.
- [46] S.L. Lee, R.L. Wesselschmidt, G.P. Linette, O. Kanagawa, J.H. Russell, J. Milbrandt, Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (NUR77), *Science*, 269 (1995) 532-535.
- [47] A. Wallen-Mackenzie, A.M. de Urquiza, S. Petersson, F.J. Rodriguez, S. Friling, J. Wagner, P. Ordentlich, J. Lengqvist, R.A. Heyman, E. Arenas, T. Perlmann, NURR1-RXR heterodimers mediate RXR ligand-induced signaling in neuronal cells, *Genes & Development*, 17 (2003) 3036-3047.
- [48] C. Rouillard, J. Baillargeon, B. Paquet, M. St-Hilaire, J. Maheux, C. Levesque, N. Darlix, S. Majeur, D. Levesque, Genetic disruption of the nuclear receptor NUR77 (NR4A1) in rat reduces dopamine cell loss and l-Dopa-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease, *Exp. Neurol.*, 304 (2018) 143-153.

Chapitre 3 – Proximity labeling reveals API5 as a key interactor of NUR77 (NR4A1) regulating apoptosis in MCF-7 breast cancer cells

Article en préparation

Auteurs: Fatéma Dodat^{1,2}, David Cotnoir-White^{1,2}, Éric Audemard², Daniel Lévesque¹ and Sylvie Mader^{2*}

Affiliations: ¹*Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada*

²*Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC), Université de Montréal*

*Auteur correspondant de l'article

3.1 Contribution de la candidate

La candidate a développé et optimisé l'approche APEX2 utilisée pour caractériser les partenaires de NUR77 rapporteurs, effectué l'ensemble des expériences de ce manuscrit ainsi que les analyses des résultats de spectrométrie de masse. David Cotnoir-White a encadré la candidate pendant le développement de l'approche APEX2 et Éric Audemard a participé aux analyses bio-informatiques de spectrométrie de masse. La candidate, Daniel Lévesque et Sylvie Mader ont participé à l'analyse, à l'interprétation des résultats et à la rédaction du manuscrit. Ce manuscrit est actuellement en préparation.

3.2 Résumé

Le cancer du sein (BC) caractérisé par la présence du récepteur des œstrogènes (ER+) est le sous-type le plus courant de BC. Bien que les thérapies endocriniennes puissent être utilisées pour lutter contre la progression de ces tumeurs, une résistance intrinsèque ou acquise peut limiter le succès thérapeutique dû à la persistance de cellules tumorales locales ou déjà disséminées. NUR77 (NR4A1) est un récepteur nucléaire qui appartient à la famille des récepteurs nucléaires orphelins NR4A. Ce facteur de transcription joue un rôle aussi bien pro-oncogénique que suppresseur de tumeurs dans de nombreux cancers, parmi lesquels le BC. Pour explorer le rôle de NUR77 dans le cancer du sein de type ER+, nous avons identifié les protéines situées à proximité de NUR77 dans des cellules HEK293 vivantes en utilisant une méthode de marquage basée sur l'ascorbate peroxydase (APEX2) combinée à la spectrométrie de masse. Cette approche a permis d'identifier 336 protéines, dont certaines sont des interacteurs connus de NUR77. Plusieurs candidats jouent un rôle dans la régulation de la mort cellulaire et de l'apoptose, dont l'inhibiteur d'apoptose 5 (API5). Nous avons validé l'interaction entre API5 et NUR77 par co-immunoprécipitation et démontré leur colocalisation par microscopie confocale dans les cellules HEK293 et MCF-7, ces dernières étant des cellules de cancer du sein ER+. Nos expériences indiquent que la suppression de l'expression de API5 est en synergie avec la privation de sérum pour augmenter la mort cellulaire et les niveaux protéiques de NUR77. La stabilisation de NUR77 par suppression de API5 corrèle avec une augmentation de son activité transcriptionnelle. Nos données suggèrent que API5 inhibe NUR77 tout en protégeant les cellules tumorales mammaires de l'apoptose, et sont supportées par le rôle pronostique opposé de ces deux protéines pour la survie sans rechute du cancer du sein. De plus, nos résultats démontrent que le marquage des protéines environnantes par la protéine de fusion recombinante APEX2-NUR77 peut identifier de nouveaux interacteurs de NUR77 dans les cellules vivantes.

3.3. Highlights

- Identification of NUR77 interactome through APEX2 labeling in HEK293 cells
- Proteomics analysis identifies Apoptosis Inhibitor 5 (API5) as a candidate NUR77 cofactor
- NUR77 and API5 interact and co-localize in ER+ breast cancer MCF-7 cells
- Downregulation of *API5* increases NUR77 protein expression and activity which induces a decrease in MCF-7 cell viability after serum deprivation

3.4 Abstract

Estrogen receptor positive (ER+) breast cancer (BC) is the most common subtype of BC. Although these tumors are candidates for endocrine therapies, intrinsic and acquired resistance limit therapeutic success due to failure to achieve tumor cell clearance and prevent tumor progression. NUR77 (NR4A1) is a nuclear receptor that belongs to the NR4A family of orphan nuclear receptors. This transcription factor plays both a pro-oncogenic and a tumor suppressor role in multiple cancers, among which BC, but its role in this disease remains unclear. To shed light on NUR77 function in BC ER+, we defined the network of proteins in the immediate proximity of NUR77 in HEK293 living cells using an ascorbate peroxidase (APEX2)-based labeling method combined with mass spectrometry. This approach identified 336 proteins, some of which are known interactors of NUR77. Several candidates play roles in the regulation of cell death and apoptosis including Apoptosis inhibitor 5 (API5). We validated the interaction between API5 and NUR77 by co-immunoprecipitation and demonstrated their co-localization by confocal microscopy in both HEK293 and ER+ BC MCF-7 cells. Downregulation of API5 synergized with serum withdrawal to increase MCF-7 cell death and NUR77 protein levels. NUR77 protein stabilization by API5 depletion correlated with increased NUR77 activity. Our data suggest that API5 suppresses NUR77 activity while protecting BC from apoptosis and are supported by opposite roles of these proteins as prognostic factors for BC disease free survival. Moreover, our results demonstrate that proximity labeling with a recombinant APEX2-NUR77 fusion protein can identify novel interactors of NUR77 in living cells.

Abbreviations

BC, Breast Cancer ; API5, Apoptosis Inhibitor 5 ; APEX2, ascorbate peroxidase ; ER+, Estrogen receptor positive

Key words

NUR77, API5, interactome, APEX2 technology, apoptosis, breast cancer

3.5 Introduction

Breast cancer (BC) is the most common cancer type in women and the leading cause of cancer-related death around the world (Bray F, 2018). Based on the differential expression of molecular markers, BC is classified into different subtypes associated with different prognosis and therapeutic options (Sims AH, 2007). Estrogen receptor-positive (ER+) BC represents ~70% of cases, and patients with this BC subtype can benefit from endocrine therapies that target estrogen receptor (ER) alpha by preventing hormone synthesis or blocking estrogen binding to ER. Although endocrine therapies represent an effective therapeutic approach for ER+ BC, response is limited by high rates of intrinsic and acquired resistance during treatment (Dowsett, 2004; Schiff, 2011). Only about 30% of patients with metastatic ER+ BC experience objective regression of tumor after initial endocrine treatment, while another 20% have prolonged stable disease (Osborne et Schiff, 2011; Roop, 2012; Szostakowska et al., 2019). As suggested (Fan et al., 2015), failure to eradicate tumor cells may result from activation of alternative proliferation and survival pathways.

NUR77 (NR4A1, also known as Nerve-Growth Factor Inducible gene B [NGFI-B], or TR3) belongs to the family of orphan nuclear receptor (NR4A) together with NURR1 (NR4A2, TINUR), and NOR-1 (NR4A3, MINOR). Like other nuclear receptors, NUR77 and the two other NR4A members present several conserved domains consisting of the N-terminal transactivation domain (TAD), the DNA-Binding Domain (DBD), and the C-terminal Ligand Binding Domain (LBD) (Hsu et al., 2004). NR4A members can activate transcription and bind DNA as monomers on NGFI-B-responsive elements (NBRE), which consists of an octanucleotide AAAGGTCA, and as homodimers or heterodimers with another NR4A family member to the synthetic consensus Nur-response element (NurRE) TGACCTTXX6AAAGGTCA (Philips et al., 1997; Wilson et al., 1991). In addition, NUR77 and NURR1 (but not NOR-1) can heterodimerize with RXR and activate transcription through a DR-5 element in a 9-cis retinoic acid-dependent manner (Mangelsdorf, 1995a; Perlmann et Jansson, 1995). The NR4A family is thought to function without a canonical ligand binding pocket. Structural studies have revealed that bulky hydrophobic amino acid side chains lining the NUR77 and NURR1 ligand binding pockets are responsible for a closed conformation lacking a cavity to accommodate a ligand (Flaig et al., 2005; Wang, 2003). However, a recent crystallographic study of NURR1 LBD suggests the presence of a dynamic, solvent-accessible ligand binding pocket (de Vera et al., 2019).

The NR4A receptors display constitutive transcriptional activity (Flaig et al., 2005) and their expression is rapidly induced by a variety of stimuli such as growth factors, cytokines, neurotransmitters and various stresses, which classify them as immediate early genes (Campos-Melo et al., 2013; Kurakula et al., 2014; Maxwell et Muscat, 2006). This receptor family plays essential roles in metabolic processes, vascular function, steroidogenesis, inflammation and central nervous system (Campos-Melo et al., 2013; Kurakula et al., 2014; Maxwell et Muscat, 2006). NUR77 is also overexpressed in various tumors and cancer cell lines, and evidence suggests that this versatile transcription factor plays dual roles in cell survival and apoptosis in normal and cancer cells (Li H, 2000b; Lin, 2004; Moll, 2006; Shannon, 2007; Wu, 2011). Knockdown of *NUR77* by RNA interference suggests that this receptor might be pro-oncogenic and regulates cell growth and survival in many tumours types (Bras, Albar, Leonardo, de Buitrago et Martinez, 2000; Li H, 2000b; Sun, 2012b; Uemura et Chang, 1998), including in BC (Hedrick, 2015, 2016; Wu, 2017). In addition, *NUR77* mRNA expression was reported to be increased in ER+ breast tumor tissue compared to normal breast (Muscat, 2013) and to correlate with decreased relapse-free survival in breast cancer patients (Zhou F, 2014). However, NUR77 overexpression in ER+ ZR-75-1 BC cells suggests that NUR77 might be an anti-migratory factor (Alexopoulou, 2010) in contrast with the pro-migratory activity reported in the ER triple negative cell line MDA-MB-231 (Zhou F, 2014). In parallel, several studies reported this nuclear receptor as an apoptosis-inducer in a wide variety of cultured as well as primary tumor cell types such as bladder, colon and breast cancer (Cho, 2007; Sun, 2012b; Wu, 2017). In ER+ MCF-7 BC cells induced by all-trans retinoic acid treatment, highly expressed NUR77 interacts with RXR α and promotes the NUR77/RXR α signalling pathway causing apoptosis (Ye Xf, 2004). Taken together, these results suggest an important role of NUR77 in regulating cell fate in BC that needs further characterization.

Despite the fact that NUR77 activity seems to be independent of endogenous ligands, regulation by post-translational modifications (PTMs) such as phosphorylation, SUMOylation and acetylation have shown an important role in controlling signaling in addition to regulation of receptor expression levels (Dodat et al., 2021; Kang, 2010; Kurakula et al., 2014). Indeed, NUR77 acetylation is increased by p300 and treatment with a histone deacetylase inhibitor (HDACi), trichostatine A (TSA), induced NUR77 protein expression and activity (Kang, 2010). Also, a literature review of NUR77 binding partners published in 2014 identified more than 80 NUR77 co-regulators (Kurakula, 2014). Characterization of its interaction with key proteins in cancer

development, such as Tumor Protein 53 (TP53), which interacts with NUR77 causing cell death and B-cell lymphoma 2 (BCL-2), whose interaction with NUR77 in mitochondria activates cytochrome c pathway and apoptosis, have provided a better understanding of NUR77 mechanisms of action in regulating cell proliferation and cell death (Bouzas-Rodríguez, 2012; Lin, 2004; Zhao, 2006). Therefore, the elucidation of NUR77 interactome in BC can provide essential clues to its function in this disease (König, 2019; Pranavathiyani, 2018; Vidal, 2011). However, most of the known NUR77 interactors were identified using co-immunoprecipitation in conjunction with mass spectrometry. While unbiased, this approach however requires cell lysis, which can disrupt the native cellular context and place constraints based on protein complex stability (Perkins et al., 2010; van der Merwe et al., 1994).

In this study, we used an alternative approach to identify NUR77 protein-protein interaction network within its native environment using a proximity-based biotinylation identification approach. As the modified soybean peroxidase APEX2 quickly biotinylates proteins in living cells in presence of H₂O₂, this reaction has been combined with mass spectrometry to define the proteome of organelles, including the mitochondrial matrix (Rhee et al., 2013) and intermembrane space (Hung, 2016). This technique is performed in live cells, preserving sub-cellular compartment integrity, and can detect even transient interactions. Based on peptide intensity, we identified 336 potential NUR77 interactors in HEK293 cells, that were significant (adjusted p-value ≤ 0.05) and enriched more than two times in the three biological replicates including the Apoptosis Inhibitor 5 (API5) protein. We then used co-immunoprecipitation and co-localization to confirm that API5 colocalized and physically interacted with NUR77, both in HEK293 and human ER+ BC MCF-7 cells. Finally, we showed that downregulation of *API5* leads to an increase in NUR77 protein expression and activity on its monomeric and homodimeric response elements and a decrease in MCF-7 cell survival after serum deprivation. Furthermore, treatment of cells with MG132 proteasome inhibitor significantly stabilized NUR77 protein expression in the absence, but not the presence of API5 downregulation. Interestingly, NUR77 is a predictor of good prognosis in ER+, but not ER- breast tumors, while API5 expression predicts worse prognosis in ER-negative tumor cells, where its expression is elevated. Altogether, our study shows that API5 may represent a new key interacting partner of NUR77 that suppresses its signaling while protecting BC against apoptosis.

3.6 Materials and methods

Plasmids and reagents

The human NUR77 cDNA was subcloned into the pcDNA3.1(+1) expression vector (Clontech, Mountain View, CA, USA) between the BamH1 and Nhe1 sites as previously described (Dodat et al., 2021). The pHAGE-fEIF1a-ametrine plasmid was a gift from Dr Jeng-Shin Lee (Harvard Medical School Plasmid, <https://plasmid.med.harvard.edu/PLASMID/GetVectorDetail.do?vectorid=233>) and a T2A self-cleaving peptide was inserted using Xba1 and BsmB1 (fwd : GATCCGCCACGAACTTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCC GGTCCTCA ; rev : GATCTGGGACCGGGGTTTTCTTCCACGTCTCCTGCTTGCTTTAACAGAGAGAAGTTTCG TGGCG). To generate pHAGE-fEIF1a-APEX2-NUR77-T2A-ametrine, human APEX2 cDNA that was a gift from Dr Alice Ting (Addgene plasmids #49386; <https://www.addgene.org/49386/>) and from which NES was removed and human NUR77 cDNA were subcloned in pHAGE-EIF1a-T2A-ametrine using Gibson assembly in Nhe1/BamH1 and BamH1/Xba1 respectively (fwd : CGT GAA GCG GCC GCA CCG GTC TGC AGC TAG CCA CCA TGG GAA AGT CTT ACC CAA CTG TG ; rev : GAA GTT CGT GGC GGA ACC CAG ATC GAT TCT AGA GGC ATC AGC AAA CCC AAG).

pFR/TO-HIS-FLAG-HA-API5 plasmid was a gift from Dr Markus Landthaler (Addgene plasmids #38074; <https://www.addgene.org>).

MG132 proteasome inhibitor (Abcam, #ab141003) was resuspended in DMSO (Sigma, #D8418) at 10mM for a final concentration of treatment of 10 μ M.

siRNA

The siRNA targeting API5 and scrambled siRNA were purchased from Thermofisher (# 121609). The siRNA sequence are as follows: API5 sense : 5' GGU GGU ACU AAG GAA AA GCTT 3' ; API5 antisense : 5' GCU UUU CCU UAG UAC CAC CTT 3' ; scrambled sequence sense : 5'-GGA ACG AUG CGA CCU CAU AATT-3' ; scrambled sequence antisense : 5' GUU UCC UAG UAC CUU CAC CTT.

Cell culture and transient transfection

Human Embryonic Kidney 293 (HEK293) cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 2 mL/500 mL glutamine, and 100 U/mL penicillin-streptomycin (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) and Human Breast Cancer cells MCF-7 were maintained in Minimum Essential Medium Eagle - alpha modification (α MEM) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) and 100 U/mL penicillin-streptomycin (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) at 37°C in 5% CO₂. Plasmids transfection were carried out using the polyethylenimine (PEI; Polysciences Inc, Warrington, PA, USA) method (300 ng of linear PEI plus 100 ng of branched PEI for 100 ng of DNA) for HEK293 cells. For transfection of siRNA targeting API5, lipofectamine 3000 was used according to the manufacturer instructions (Thermofisher, #L3000015).

Peroxydase enzymatic activity

HEK293 cells were plated in 12-well plates (White Optiplate; PerkinElmer, Waltham, MA) at a density of 1×10^5 cells per well. The next day, cells were co-transfected with 100 ng of either NUR77, APEX2-NUR77-T2A-ametrine or APEX2-T2A-ametrine construct. To make sure that the same amount of DNA was used in all experiments, pcDNA3.1 as carrier DNA, was transfected to normalize transfected DNA quantity up to 1.5 μ g/well. Cells were harvested thirty-six hours after transfection and luminescence activity was measured after addition of luminol (10 μ M) and H₂O₂ (10 μ M) at 570 nm wavelength on a Veritas microplate luminometer (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA, USA). Data were expressed as Relative Luminescence Unit (RLU).

Biotinylation assay and streptavidin pull-down

Proximity biotinylating assay in living cells was performed essentially as described in previous report (Hung, 2016). About 36h after transfection, cells were incubated with 500 μ M of biotinyl tyramide (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada # SML2135) for 30 min at 37°C. H₂O₂ was added from a freshly made stock (100mM) to achieve a final concentration of 1mM. Cells were incubated at room temperature for 1 min and then were washed three times with a quencher solution containing 10mM sodium ascorbate (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada # A4034), 5mM Trolox (Cayman Chemical, USA, # 10011659) and 10mM sodium azide (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada # S2002). After lysis, whole-cell lysate (500 μ g each) were incubated with streptavidin sepharose beads (30 μ L, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada #GE 17-5113-01) at 4°C overnight.

The next day, beads were pelleted by centrifugation and washed serially (1mL for each wash) as follows: twice with RIPA lysis buffer, once with 1M KCl, once with 0.1M Na₂CO₃, once with 2M urea in 10mM Tris-HCl pH8.0 and five times with PBS 1X.

Mass spectrometry and data analysis

Samples were reconstituted in 50 mM ammonium bicarbonate with 10 mM TCEP [Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride; Thermo Fisher Scientific], and vortexed for 1 h at 37°C. Chloroacetamide (Sigma-Aldrich) was added for alkylation to a final concentration of 55mM. Samples were vortexed for another hour at 37°C. One microgram of trypsin was added, and digestion was performed for 8h at 37°C. Samples were dried down and solubilized in 5% ACN-0.2% formic acid (FA). The samples were loaded on a 1.5µL pre-column (Optimize Technologies, Oregon City, OR). Peptides were separated on a home-made reversed-phase column (150-µm i.d. by 200 mm) with a 56-min gradient from 10 to 30% ACN-0.2% FA and a 600-nL/min flow rate on a Easy nLC-1000 connected to a Q-Exactive HF (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Each full MS spectrum acquired at a resolution of 60,000 was followed by tandem-MS (MS-MS) spectra acquisition on the 15 most abundant multiply charged precursor ions. Tandem-MS experiments were performed using higher energy collision dissociation (HCD) at a collision energy of 27%. The data were processed using PEAKS X (Bioinformatics Solutions, Waterloo, ON) and a Uniprot human database (20349 entries). Mass tolerances on precursor and fragment ions were 10ppm and 0.01 Da, respectively. Fixed modification was carbamidomethyl (C). Variable selected posttranslational modifications were oxidation (M), deamidation (NQ), phosphorylation (STY). Differential Enrichment analysis of Proteomics data (DEP) package (Zhang et al., 2018) was used to perform differential analyses on proteins, using quantitative mass spectrometry-based proteomics data based on peptides intensity, given by PEAKS X software. The DEP package (Zhang et al., 2018) was used to perform differential analyses on proteins, using quantitative mass spectrometry-based proteomics data based on peptides intensity, given by PEAKS X. DEP package (Zhang et al., 2018) was configured to filter proteins detected by at least 1 peptide, without missing value in at least one condition and using knn method to imput missing values (Zhang, 2016). P-values were adjusted according to the Benjamini and Hochberg method (Benjamini, 1993).

Western blotting

After washing with quencher solution, cells were lysed with 0.5 mL of RIPA lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS), supplemented with a cocktail of protease (Roche, # 05892970001) and phosphatase inhibitors (Roche, # 4906845001). Cell suspensions were incubated at rotation for 1 h at 4°C and centrifuged at 10 000 rpm for 10 min. Protein extracts were quantified using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo-Fisher, #23225). Western blotting was performed using Criterion XT Precast Gel, 10%Bis-Tris, (BioRad #3450112). Blots were incubated with the primary antibodies overnight at 4°C, followed by either an anti-rabbit HRP-linked IgG antibody (Cell signaling, #7074) or an anti-mouse HRP-linked IgG antibody (Cell signaling, #7076). A rabbit polyclonal anti-NUR77 antibody (Novus Biologicals, # 56745SS) or a rabbit polyclonal anti-GFP antibody (Cell signaling, #2555S) were used to evaluate endogenous NUR77, APEX2-ametrine and ametrine-tagged NUR77 (uncleaved APEX2-NUR77-T2A-ametrine construction) protein expression, respectively. A rabbit polyclonal anti-API5 antibody (Thermo-Fisher, # PA5-55354) or a mouse anti-Flag antibody (Abcam, #ab18230) were used to evaluate endogenous API5 and epitope-tagged API5 (Flag-API5) protein expressions respectively. The Clarity Western ECL Substrate (BioRad, #1705060) was used to reveal the membranes. Alexa Fluor 488 streptavidin (Thermo-Fisher, # S32354) was used to detect biotinylated proteins in HEK293 cells. The ChemiDoc™ Imaging Systems (Bio-Rad, ##12003153) was used to reveal the membranes and densitometric analysis were performed using Image Lab 6.0.1.

Co-immunoprecipitation

HEK293 and MCF-7 cells were plated in 15cm petri dishes plates (White Optiplate; PerkinElmer, Waltham, MA) at a density of 10×10^6 cells per well. The next day, they were transfected by the polyethyleneimine (PEI) method with 10 µg of APEX2-NUR77-T2A-ametrine and pFR/TO-HIS-FLAG-HA-API5 either alone or together. Thirty-six hours after transfection seeding (for MCF-7) or transfection (for HEK293 cells), cells were lysed in RIPA lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS), supplemented with a cocktail of protease (Roche, # 05892970001) and phosphatase inhibitors (Roche, # 4906845001). HEK293 and MCF-7 cell extracts were incubated with the primary antibodies described above to immunoprecipitate NUR77 or API5 followed by PureProteome™ Protein G Magnetic Bead

(Millipore Sigma, # LSKMAGG02). Protein complexes were separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and specific proteins were detected by western blotting.

Co-immunofluorescence

Thirty-six hours after seeding for MCF-7 or post-transfection for HEK293 cells, cells were washed with PBS-1X, fixed with 4% formaldehyde for 20 min and permeabilized with True-Nuclear 10X Perm Buffer (BioLegend, # 424401) diluted in distilled water. After two washes with PBS-1X, cells were blocked in 3% BSA-PBS-1X-0.01% Tween 20 for 1 hour at room temperature. Either purified mouse anti-NUR77 antibody (BD Pharmingen™, #554088) or rabbit polyclonal anti-GFP antibody (Cell signaling, #2555S) were used to detect endogenous NUR77, APEX2-ametrine and ametrine tagged NUR77 (uncleaved APEX2-NUR77-T2A-ametrine construction) protein localization, respectively. A rabbit polyclonal anti-API5 antibody (Thermo-Fisher # PA5-55354) or a mouse anti-Flag antibody (Abcam, #ab18230) were used to evaluate endogenous API5 and epitope-tagged API5 (Flag-API5) protein localization, respectively. Goat anti-mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 488 (Invitrogen, #A32723) or goat anti-rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 555 (Invitrogen, # A32732) was used to detect the primary antibody or as a specificity control. Between each antibody, cells were always washed 3 times with PBS-1X-0.01% tween20. DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride, Sigma Aldrich, # D1306) was used to stain the nuclei. Cells were imaged in glass bottom Petri dishes (matTek #P35GCOL-1.5-14-C). Image acquisition was performed with A Laser scanning confocal microscope (Leica TCS SP8) at 40x magnification and images were prepared with the Leica LAS X software.

Cell viability assays

MCF-7 cells were seeded in triplicate for each experiment in 6-well plates at a density of 1×10^6 cells per well. Cells were transfected with siRNAs targeting API5 or with scrambled siRNAs. After 48h, cells were serum deprived and 72h post-transfection, absorbance was read after addition of Alamar blue detection solution (Thermo-Fisher, #DAL1025) at 560 nm on a Veritas microplate luminometer (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA, USA) to evaluate cell viability.

Gene reporter assays

HEK293 cells were plated in 12-well plates (White Optiplate; PerkinElmer, Waltham, MA) at a density of 1×10^5 cells per well. The next day, cells were co-transfected with 100 ng of either NUR77, APEX2-NUR77-T2A-ametrine or APEX2-T2A-ametrine construct. Three hundred ng of reporter plasmids 3xNBRE or 100 ng of 3xNurRE were used in indicated experiments. A reporter gene expressing GFP fluorophore (100 ng) was included in all experiments as an internal control for transfection efficiency. To make sure that the same amount of DNA was used in all experiments, pcDNA3.1 as carrier DNA, was transfected to normalize transfected DNA quantity up to 1.5 $\mu\text{g}/\text{well}$. Cells were harvested forty-eight hours after transfection and luciferase activity was measured after addition of luciferin (500 μM ; NanoLight Technology) at 560 nm wavelength on a Veritas microplate luminometer (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA, USA). Results were normalized with the GFP signal (400 nm excitation and 515 nm emission) on a Spectramax 190 plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and data were expressed as normalized fold activation.

Breast Cancer microarray database

The association between API5 and NUR77 mRNA expression levels and recurrence free survival (RFS) was analyzed with the online KM-Plotter database using the gene expression data and survival information of 3779 patients with breast cancer downloaded from Gene Expression Omnibus (Gyorffy et al., 2010). Cohorts of patients (all, ER+ or ER-) were split using the auto-select best cut-off.

TCGA data and cBioPortal

The breast invasive carcinoma (TCGA, Provisional) dataset including data from 1108 samples with pathology reports was selected for further analyses of API5 and NUR77 using cBioPortal (www.cbioportal.org) (Cerami, 2012; Gao, 2013). The genomic profiles included mutations, copy-number variance (CNV) from GISTIC and mRNA expression levels (RNA Seq V2 RSEM).

Statistical analysis

A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's multiple comparison post hoc test was used to determine statistically significant differences among groups. Statistical significance was set at $p\text{-value} \leq 0.05$.

3.7 Results

1) Mapping the NUR77 interactome by proximity labeling in HEK293 cells

To identify potential NUR77 interactors, we developed a proximity biotinylation assay based on the APEX2 technology (**Figure 18A**). The APEX2 peroxidase was fused to the N-terminal domain of NUR77 to biotinylate proximal proteins after addition of the biotin-phenol substrate and H2O2. The plasmid design also included a C-terminal fusion of NUR77 with a T2A self-cleaving peptide and the ametrine fluorophore to enable evaluation of the transfection efficiency.

We first monitored the T2A cleavage efficiency by overexpressing the APEX2-NUR77-T2A-ametrine construct in HEK293 cells. Expected signals at ~30kDa (T2A-ametrine) and ~120kDa (APEX2-NUR77-T2A-ametrine) were observed ([Fig. S9A.a](#)). As expected with the T2A peptide (Liu, Chen, et al., 2017), the cleavage was efficient but not complete, as about 70% of the protein was cleaved as assessed by the evaluation of ametrine levels by western blotting using a GFP tag antibody (see [Fig. S9A.b](#)). Comparison of APEX2 and APEX2-NUR77-T2A-ametrine enzymatic activity and NUR77 and APEX2-NUR77-T2A-ametrine transcriptional activity on the monomeric response element NBRE confirmed the functional integrity of the fusion protein ([Fig. S9B](#)).

To evaluate NUR77 interactome, we compared enriched proteins in the experimental condition APEX2-NUR77-T2A-ametrine to combined control conditions., i.e. APEX2-T2A-ametrine to control for nonspecific APEX2 binding partners and unfused NUR77 to control for endogenously biotinylated proteins (**Figure 18A**). We performed three biological replicates (MS1-3) as described (Hung, 2016) in HEK293 cells and validated transfection and biotinylating efficiencies (one biological replicate is represented in **Figure 18B**). As expected, background labeling following overexpression of NUR77 alone was low (**Figure 18B.c**).

Biotinylated proteins were then purified using Streptavidin Sepharose beads and analyzed by label-free, quantitative mass spectrometry (LC-MS/MS). We identified 2217, 1938 and 1959 proteins for APEX2-T2A-ametrine, 1602, 1795 and 1788 for NUR77 and 2217, 2176 and 2187 for APEX2-NUR77-T2A-ametrine for MS1, MS2 and MS3 respectively, suggesting that our assay yielded reproducible results (**Figure 18C** and [Fig. S9C](#)). Overall, 2077 NUR77 proximal proteins

were reproducibly identified between the three replicate experiments (**Figure 18C**). A Gene Ontology analysis performed using the Panther software revealed that “DNA and protein binding” proteins and “catalytic activity” proteins represented the most enriched molecular pathways, as expected for a transcription factor like NUR77 (**Figure 18D**) (Kurakula, 2014).

2) Identification of NUR77 potential interacting partners in HEK293 cells

Since protein intensity from electrospray ionization (ESI) has been shown to correlate with ion concentration (Voyksner et Lee, 1999; Zhu et al., 2010) and previous studies showed that the relative quantification of proteins could be achieved through direct comparison of peak intensity of each peptide ion in multiple LC-MS datasets (Bondarenko, Chelius et Shaler, 2002; Chelius et Bondarenko, 2002), we demonstrated enrichment based on protein intensity in the APEX2-NUR77-T2A-ametrine experimental condition compared to combined control conditions APEX2-T2A-ametrine and NUR77 (**Figure 19**). DEP package (Zhang et al., 2018) was configured to filter proteins detected by at least 1 peptide, without missing value in at least one condition and using knn method to impute missing values (suppl. Figure 10) (Zhang, 2016). As shown in [Fig. S10C](#), imputation did not alter the normalization assessing the quality of our data. As expected, the top NUR77 “interacting partner” was NUR77 (NR4A1) itself, reflecting auto- and possibly cross-labeling within homodimers (Philips et al., 1997). Consistent with previous observations, SMARCC2 (Bilodeau, 2006b), TRIM28 (Balasubramanian et al., 2012), SMARCA4 (Bilodeau, 2006b) and HDAC1 (Kang, 2010) peptides were observed in the experimental conditions but not in controls ($\log_2(\text{FC}) = 3.52 ; 2.77 ; 1.21 ; 1.51 ; -\log_{10}(\text{adjusted p-value}) = 1.37 ; 1.61 ; 0.54 ; 0.60$, respectively) (**Figure 19**).

For 88% of the proteins identified, peptide intensity changed by less than 2-fold between the three experiments, suggesting that NUR77 network composition is relatively similar in biological replicates (data not shown). When comparing experimental and combined control conditions, 336 proteins reproducibly displayed at least 2-fold change in intensity after purification (**Figure 19**).

Table 5 presents the top 25 proteins displaying the greater fold change in abundance comparing experimental and control conditions. Notably, most of the proteins (22 proteins out of

25) are nuclear proteins. Our analysis revealed in particular that Apoptosis Inhibitor 5 (API5) and BCL-2 Associated Transcription Factor 1 (BCLAF1) proteins, with known roles in modulation of apoptosis (Rigou et al., 2009; Shao, 2016), displayed higher abundance in the experimental condition compared to controls (\log_2 (FC) = 4.44 and 2.63 ; $-\log_{10}$ (adjusted p-value) = 2.05 ; 1.81, respectively) (**Figure 19**). API5 prevents apoptosis induced by growth factor deprivation and suppresses E2F1 apoptotic function (Morris et al., 2006; Van den Berghe et al., 2000) and BCLAF1 is a corepressor of BCL-2 family proteins (Sarras, Alizadeh Azami et McPherson, 2010). Overall, our mass spectrometry analysis uncovered several potential regulators of NUR77 involved in cell fate determination pathways.

3) API5 is within the same complex and co-localizes with NUR77 in HEK293 and MCF-7 cells

As API5 is involved in the inhibition of apoptosis in BC (Basset, 2017; Bousquet, 2019), this factor might have a role in regulation of cell fate in BC by interacting with NUR77. To test this hypothesis and confirm the mass spectrometry analysis results, we performed co-immunoprecipitation assays against API5 both in HEK293 cells and MCF-7 cells.

Transiently expressed NUR77-ametrine co-immunoprecipitated with Flag-API5 using both anti-Flag and anti-ametrine antibodies (**Figure 20A**, upper and lower panels). Immunoblotting input lysates and co-immunoprecipitated protein extracts using IgG antibodies revealed that proteins were expressed in the expected transfection conditions and that pulldown was achieved only with antibodies against target proteins, respectively. Further, confocal microscopy revealed that the two proteins are both mainly located in the nucleus, consistent with previous observations (Cho, 2014; Dodat et al., 2021) and colocalized in this compartment (**Figure 20B**) (See [Fig. S11A](#) for isotype controls).

To test whether this observation occurs between endogenous proteins in human ER+ BC cells, immunoprecipitation and co-localization assays were performed in MCF-7 cells. To induce NUR77 expression, cells were treated for 16h with the Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A (TSA, 500nM) (Kang, 2010). As expected, immunoblotting input lysates confirmed that API5 is expressed in MCF-7 cells and that TSA induces NUR77 expression (**Figure 20C**) (Kang, 2010; Sohn, Kwak, Na, Lee et Lee, 2001). Similar to observations in HEK293 cells, endogenous NUR77

co-immunoprecipitated with endogenous API5 in MCF-7 cells (**Figure 20C**, upper). This result was confirmed by a reverse co-immunoprecipitation where the two previously characterized splicing isoforms of API5 (Van den Berghe et al., 2000), namely the 504 and 510 amino acid isoforms, coimmunoprecipitated with endogenous NUR77 when using an antibody against this protein (**Figure 20C**, lower). Co-immunofluorescence assays in MCF-7 cells confirmed that endogenous NUR77 and API5 are both located in the nucleus in MCF-7 cells as demonstrated before (Basset, 2017; Hedrick, 2016), and co-localize in this compartment (**Figure 20D**) (See [Fig. S11B](#) for isotype controls).

Together, these results indicate that NUR77 and API5 can be extracted in the same protein complexes, both when transiently expressed in HEK293 cells and at endogenous expression levels in ER+ MCF-7 BC cells.

4) Downregulation of API5 cooperates with serum deprivation to induce NUR77 protein levels and decrease cell viability

Since API5 is known to inhibit apoptosis (Van den Berghe et al., 2000) and its overexpression has been associated with tumor progression in patients with cervical cancer (Cho, 2014) and ER+ BC (Basset, 2017), we tested whether *API5* knockdown would influence NUR77 involvement in apoptosis in ER+ BC. First, we evaluated an efficient siRNA concentration to knockdown *API5* expression in MCF-7 cell lines. As shown in [Fig. S12A](#), transfection of a siRNA targeting *API5* efficiently knockdowned this factor after 72h of overexpression since endogenous API5 decreased by almost 4 folds compared to cells transfected with a scrambled siRNA.

As API5 is known to prevent apoptosis after growth factor deprivation (Morris et al., 2006), we knocked down API5 in MCF-7 cells and cultured them for 24 hrs with or without serum. As expected (Basset, 2017; Rigou et al., 2009), API5 depletion did not significantly affect MCF-7 cells viability under basal growth conditions, although a small, non-statistically significant decrease (~35%) was observed (**Figure 21A**). Serum deprivation significantly decreased cell numbers (by about 2-fold) and this decrease was significantly potentiated by API5 depletion (reaching about 75% inhibition). Furthermore, downregulation of API5 increased NUR77 protein levels by almost 3-fold, which was further increased by serum deprivation to about 4-fold, while

serum deprivation alone induced NUR77 expression less than 2-fold (**Figure 21B.b** and **Figure 21C.b**). In comparison, API5 protein levels were less affected by serum deprivation (less than 1.5-fold both in the absence or presence of API5 siRNA) (**Figure 21C.a**). Thus, serum deprivation and API5 depletion cooperate to induce NUR77 expression and decrease cell survival.

Turnover of NR4As protein can be regulated by signaling molecules (Hedrick et Safe, 2017; Xie L, 2016). Accordingly, MCF-7 cells treatment with the proteasome inhibitor MG132 for 4 hours stabilized NUR77 in MCF-7 cells by ~1.8 fold (**Figure 21D.b** and **Figure 21E.b**). API5 downregulation induced NUR77 protein levels by ~2.4 fold in the absence of MG132 treatment. Combination of API5 depletion and MG132 treatment induced NUR77 levels by ~3-fold, but NUR77 protein levels were not significantly different in the absence or presence of MG132 when API5 was depleted (**Figure 21D** and **Figure 21E**). Importantly, transcriptional activity of NUR77 markedly increased after treatment with the API5-targeting siRNA compared to the scrambled siRNA both on the monomeric and homodimeric response elements in transfected HEK293 cells (~2.8 fold and ~2.2 fold respectively) ([Fig. S12B](#)). This induction was more important than the one observed with the inducer of NUR77 TSA (~1.6 fold and ~1.4 fold respectively) (Kang, 2010). These results indicate that API5 downregulation induces NUR77 signaling, possibly in part via protein stabilization.

Taking together, these data demonstrate that API5 depletion and serum deprivation cooperate to affect NUR77 protein levels and MCF-7 cells survival.

3.8 Discussion and conclusion

To better understand the function of NUR77, characterization of protein interactors and their roles in modulating NUR77 signaling is of crucial importance (Perkins et al., 2010; van der Merwe et Barclay, 1994). To this end, we expressed a functional APEX2-NUR77 fusion protein to identify proteins located in proximity of NUR77 in living HEK293 cells (**Figure 18**). LC-MS/MS identified peptides whose abundance was increased by expression of the fusion protein versus that of negative controls ($FC \geq 2$ and adjusted p-value ≤ 0.05) (Zhang, 2016) leading to the characterization of 336 potential NUR77 interactors. We focused on Apoptosis Inhibitor 5 (API5), a putative novel NUR77 cofactor associated with apoptosis. We validated that API5 and NUR77 were extracted in the same complexes of proteins by immunoprecipitation and demonstrated co-localization by confocal microscopy in HEK293 cells and in ER+ BC MCF-7 cell line (**Figure 20**), indicating that our approach identified valid binding partners for NUR77.

API5 is an apoptosis inhibitory protein whose expression prevents apoptosis after growth factor deprivation (Rigou et al., 2009). So far, few API5 interacting partners have been identified, such as fibroblast growth factor 2 (FGF2) (Bong, 2020), Acinus (Rigou et al., 2009), influenza A virus nucleoprotein (Mayank et al., 2015), caspase 2 (Imre, 2017) and another nuclear receptor relevant to BC, estrogen receptor alpha (ER α) (Basset, 2017). API5 contains an LXXLL motif, known to be key for co-regulator binding with nuclear receptors (Savkur et Burris, 2004) and important for ER α binding (Basset, 2017). Therefore, it is relevant to ask whether this region also mediates API5 binding with nuclear receptor NUR77 monomers or dimers. Further studies should map the functional regions involved in NUR77 and API5 interaction.

Like NUR77, API5 is expressed in all breast tumor subtypes. API5 has been associated with poor prognosis (Basset, 2017) a finding confirmed by KM plotter (Gyorffy et al., 2010) analysis (**Figure 22A**), while KM plotter indicates that NUR77 has a good prognosis in BC (**Figure 22A**), especially to ER+ breast tumors (**Figure 22B**) where NUR77 has been shown to induce apoptosis (Hedrick, 2015, 2016). Further, our results demonstrate that API5 depletion significantly induces NUR77 activity in a reporter gene assay in HEK293 cells using monomeric and homodimeric response elements (NBRE and NurRE, respectively) ([Fig. S12B](#)), suggesting that API5 represses NUR77 signaling. API5 depletion also increased NUR77 protein expression in ER+ BC MCF-7 cells (**Figure 21B** and **Figure 21C**). Interestingly, cell treatment with the MG132 proteasome

inhibitor stabilized NUR77 protein expression in MCF-7 cells, but not significantly after overexpression of siRNA API5 (**Figure 21D**), suggesting that API5 could play a role in NUR77 degradation by the proteasome, whether directly or indirectly. Of note, an interaction between API5 and the E3 ubiquitin ligase TRIM25 has been reported (Choudhury, 2017). A schematic summary of this regulation that modulate cell fate is proposed in **Figure 23**.

Irrespective of the mechanism involved, our results are consistent with the opposite roles of NUR77 and API5 as markers of outcome in BC tumors (**Figure 22**). Interestingly, NUR77 predicts good outcome mainly in ER+ tumors while API5 is a negative predictor of survival mostly in ER- tumors (**Figure 22C**). As ER has been shown to interact with API5, this may titrate API5 away from NUR77, especially if the same interface is used to interact with both receptors. In addition, expression of API5 is positively correlated with copy number in breast cancer ([Fig. S13](#)), indicating that copy number gain may modulate BC survival, possibly in part via interference on NUR77 function.

As PARP-1 was shown to interact with the other NR4As members, NURR1 and NOR-1 (Ohkura, Nagamura et Tsukada, 2008; Sacchetti, Carpentier, Segard, Olive-Cren et Lefebvre, 2006), it is legitimate to ask whether PARP-1 may also be a NUR77 interactor. However, while this protein was found in our proteomics data (**Figure 19**), enrichment in the experimental versus control conditions was not significant for p-value in HEK293 cells in basal conditions ($\log_2(\text{FC})=1.29$; $-\log_{10}(\text{adjusted p-value}) = 0.53$). Our proteomics data pointed out also other proteins linked to apoptosis pathways such as Cytokine Induced Apoptosis Inhibitor 1 (CIAPIN1) ($\log_2(\text{FC}) = 1.22$ $-\log_{10}(\text{adjusted p-value}) = 0.53$), Tumor Protein P53 Binding Protein 1 (TP53BP1) ($\log_2(\text{FC})=3.28$; $-\log_{10}(\text{adjusted p-value}) = 1.60$) and BCL-2 Associated Transcription Factor 1 (BCLAF1) ($\log_2(\text{FC}) = 2.63$; $-\log_{10}(\text{adjusted p-value}) = 1.81$) (**Figure 19**). As NUR77 interacts with BCL-2 following its translocation from the nucleus to the mitochondria to activate apoptosis (Lin, 2004) and interacts with several members of the BCL-2 family (Luciano, 2007), future studies will be important to investigate whether BCLAF1 is included in the complex leading to NUR77-BCL-2 apoptosis signaling pathway. Furthermore, the Biological General Repository for Interaction Datasets (BioGRID) database indicates that TP53BP1 is an interactor of API5. Since this protein has also been identified in the interactome of NUR77, it might be relevant

to ask whether those three proteins might be interacting – directly or indirectly – in the same protein complex.

Since NUR77 role may differ depending on its localization within the cell, identifying its interactome in different compartments is relevant. Using NUR77 delocalization agents like phorbol ester (Li H, 2000a; Zhan, 2008), our APEX2-NUR77 fusion protein can be used to compare proteins in close proximity to NUR77 in different cell compartments and therefore unravel the molecular mechanisms related to NUR77 functions. Although rapid biotinylation of proteins in proximity to NUR77 enables the capture of transient interactions and while the strong affinity between streptavidin and biotin allows to isolate the biotinylated proteins even with harsh and extensive washing procedures to reduce background, the need to confirm interaction by other techniques such as co-immunoprecipitation (ten Have, Boulon, Ahmad et Lamond, 2011) still places limits on the stability of the interactions that can be confirmed. Alternative approaches may use proximity-ligation assay (Sable et al., 2018), although this independent approach also does not guarantee physical interactions.

In conclusion, our study has identified several potential interactors of NUR77 that may modulate its role in apoptosis and further validated API5 as a potential interactor that may limit the pro-apoptotic and tumor protective role of NUR77 in breast cancer.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We are grateful to Dr Elham Dianati from the Mader laboratory and Dr Dilan Mulumba from the Ong laboratory for technical support and to Eric Bonneil for proteomic analyses performed at the Center for Advanced Proteomics Analyses, a Node of the Canadian Genomic Innovation Network located at the Institute of Research of Immunology and Cancerology (IRIC) and is supported by the Canadian Government through Genome Canada.

3.9 Figures

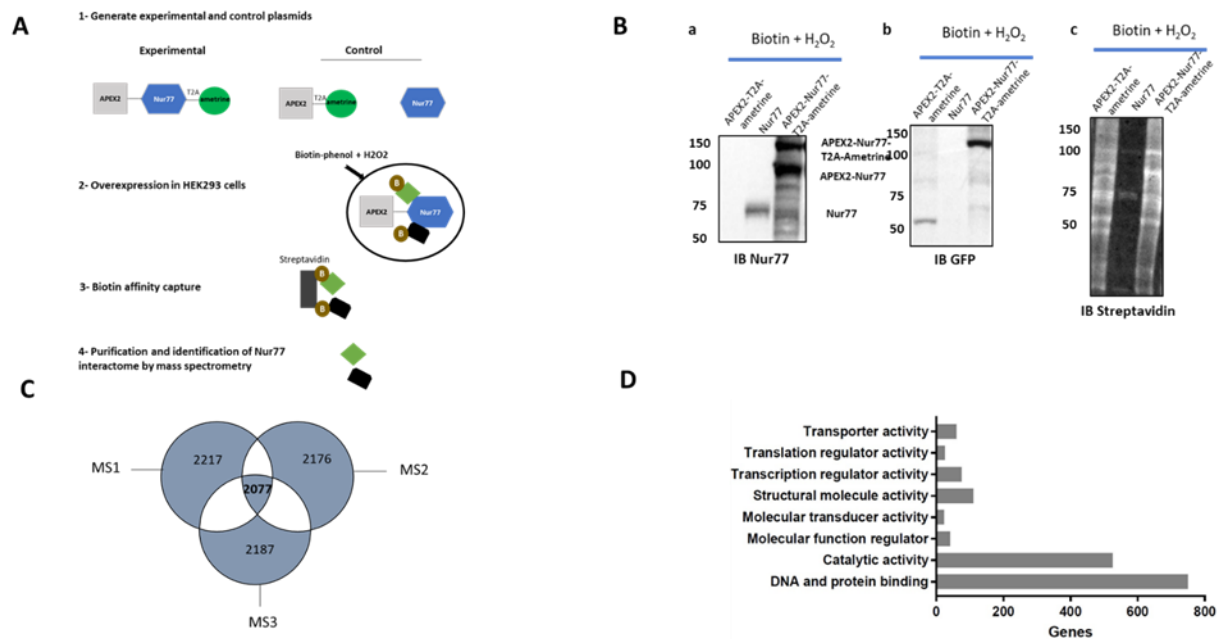


Figure 18 - Identify NUR77 interactome in HEK293 cells.

(A) Schematic representation of the APEX2 technology procedure and the experimental pipeline. HEK293 cells were transiently transfected with human NUR77, APEX2-T2A-ametrine and APEX2-NUR77-T2A-ametrine (10 μ g) constructs. Thirty-six hours post-transfection cells were treated with BP for 30 min and H₂O₂ for 1 min and lysed. Biotin affinity capture was performed using streptavidin beads and beads were sent to LC-MS/MS for protein identification after purification.

(B) Total extracts were migrated in SDS-PAGE and Western blots performed with (a) anti-NUR77 antibody, (b) anti-GFP antibody and (c) Alexa fluor488 streptavidin conjugate antibody to detect biotinylation. Expected signals bands are NUR77 ~64kDa, APEX2-T2A-ametrine ~50kDa and APEX2-NUR77-T2A-ametrine and APEX2-NUR77 ~120kDa and ~100kDa respectively.

(C) Total number of proteins enriched in experimental condition APEX2-NUR77-T2A-ametrine. Overlap between the three mass spectrometry experiments appears in bold.

(D) Gene Ontology Panther protein classification of molecular functions of the three mass spectrometry data sets of APEX2-NUR77-T2A-ametrine.

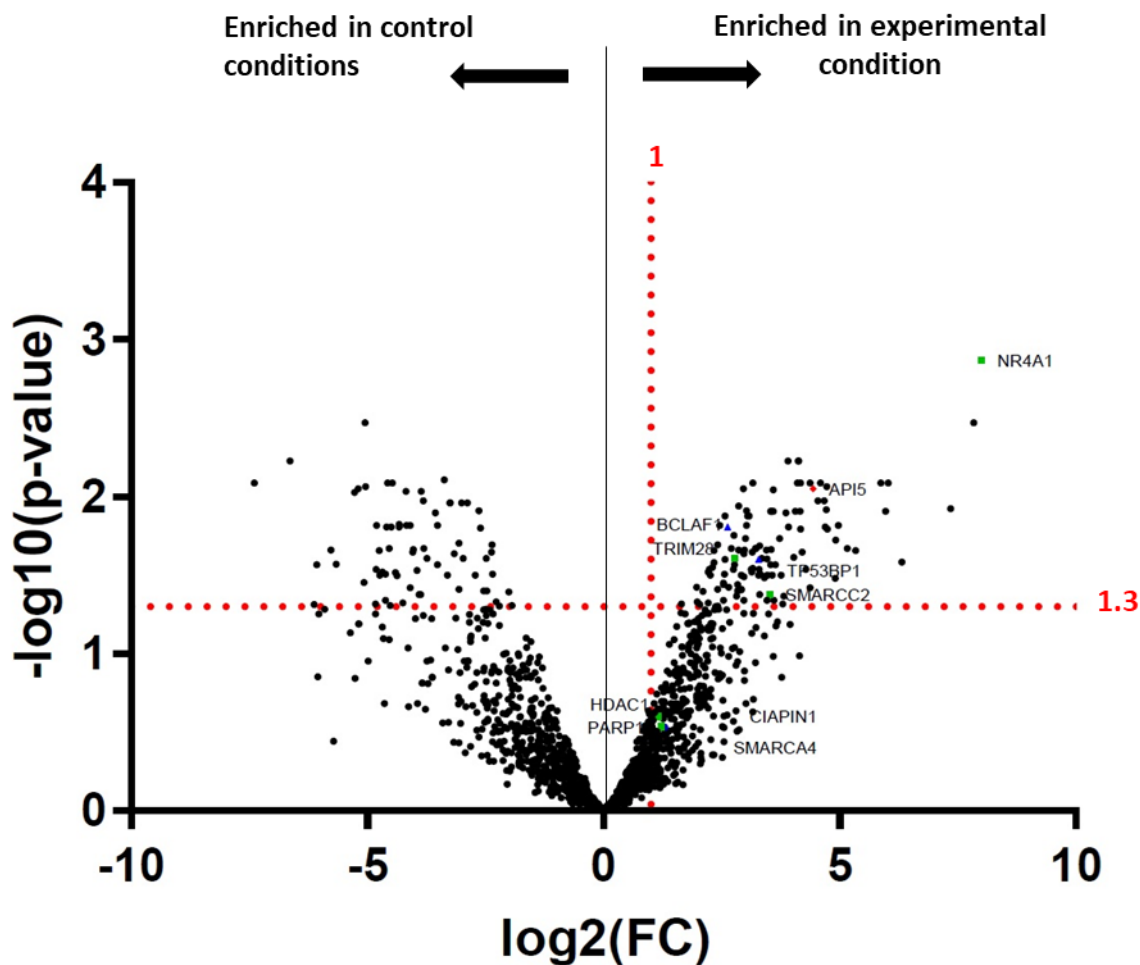


Figure 19 - Changes in NUR77 interactome between the experimental condition and combined control conditions.

NUR77 interactome abundance changes between experimental and control conditions as estimated by protein intensity. The graph displays proteins according to their fold change (FC) and p-value computed by a differential analysis between the APEX2-NUR77-T2A-ametrine interactome and combined APEX2-T2A-ametrine and NUR77 interactomes. The DEP package was used to perform this analysis (see Methods section). Proteins displaying $\log_2(\text{FC}) \geq 1$ ($\text{FC} \geq 2$) and $-\log_{10}(\text{adjusted p-value}) \geq 1.3$ (adjusted p-value < 0.05) were considered as significant and are located on the right upper side of the graph. Some of the proteins already known to interact with NUR77 are highlighted with green squares and API5 protein evaluated in this work is symbolized by a red diamond.

Protein name	Gene name	Log2(FC)	-log10(p-value)	Unique peptide	Main cellular compartment
Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1	NR4A1	8,01	2,87	27	nucleus, cytosol
Far Upstream Element Binding Protein 1	FUBP1	7,84	2,47	20	nucleus
Proline Rich Mitotic Checkpoint Control Factor	PRCC	6,02	2,09	2	nucleus
Splicing Factor 3a Subunit 1	SF3A1	5,87	2,09	15	nucleus
ZNF207	ZNF207	4,59	2,09	5	nucleus
RNA Binding Motif Protein 17	RBM17	4,38	2,09	7	nucleus
Metastasis Associated 1	MTA1	4,73	2,06	8	nucleus, cytosol
Apoptosis Inhibitor 5	API5	4,44	2,05	5	nucleus, cytoplasm
Cleavage And Polyadenylation Specific Factor 6	CPSF6	4,67	1,98	9	nucleus
Serrate, RNA Effector Molecule	SRRT	4,53	1,98	34	nucleus
Annexin A7	ANXA7	7,35	1,93	9	nucleus, endoplasmic reticulum
MMS19 Homolog, Cytosolic Iron-Sulfur Assembly Component	MMS19	4,72	1,92	4	nucleus, cytosol
Proteasome Activator Subunit 3	PSME3	5,98	1,91	6	nucleus, cytosol
Structural Maintenance Of Chromosomes Flexible Hinge Domain Containing 1	SMCHD1	4,97	1,82	6	nucleus
Interferon Regulatory Factor 2 Binding Protein 2	IRF2BP2	4,69	1,81	5	nucleus

Bromodomain Adjacent To Zinc Finger Domain 2A	BAZ2A	4,74	1,80	8	nucleus, cytosol
Microtubule Associated Protein RP/EB Family Member 1	MAPRE1	4,18	1,80	2	cytosol
Death Inducer-Obliterator 1	DIDO1	4,91	1,72	8	nucleus
Sirtuin 1	SIRT1	5,16	1,67	6	mitochondria, nucleus, cytosol
IK Cytokine	IK	5,34	1,66	13	nucleus
Transgelin 2	TAGLN2	4,21	1,65	5	cytosol
Ataxin 2	ATXN2	6,32	1,58	5	cytosol, golgi
RNA Binding Motif Protein 10	RBM10	4,28	1,54	8	nucleus
Valosin Containing Protein	VCP	4,90	1,48	7	nucleus, endoplasmic reticulum, cytosol
CWC22 Spliceosome Associated Protein Homolog	CWC22	4,37	1,42	11	nucleus, cytosol

Table 5 - List of the first 25 proteins displaying the greater fold change in NUR77 interactome abundance between experimental and control conditions classified with decreasing p-value

The table lists the top 25 proteins significantly (adjusted p-value < 0.05) enriched more than 10 times ($\log_2(FC) > 4$) in cells transfected with APEX2-NUR77-T2A-ametrine compared with controls (APEX2 and NUR77).

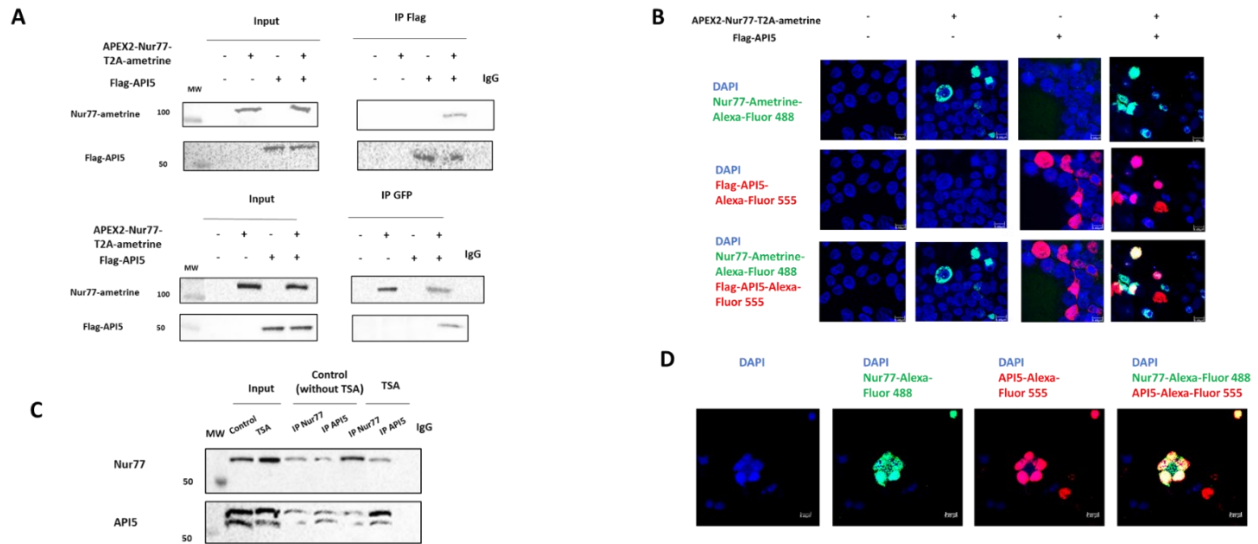


Figure 20 - API5 is extracted within the same protein complex and co-localizes with NUR77 in HEK293 and MCF-7 cells.

(A) HEK293 cells were transfected with APEX2-NUR77-T2A-ametrine and Flag-API5. Forty-eight hours post-transfection, cells were lysed and immunoprecipitated with rabbit GFP antibody or mouse Flag antibody. Ametrine-NUR77 and Flag-API5 were detected with rabbit-GFP antibody and mouse Flag antibody respectively. Expected signals bands are APEX2-NUR77-T2A-ametrine ~120kDa and Flag-API5 ~60kDa (MW, molecular weight markers). (B) HEK293T cells were transfected with APEX2-NUR77-T2A-ametrine and Flag-API5. Forty-eight hours post-transfection, rabbit GFP antibody coupled with secondary antibody coupled to Alexa-rabbit 488 (in green) and mouse Flag antibody coupled with secondary antibody coupled to Alexa-mouse 555 (in red) were used. Isotype controls for GFP and API5 are presented in suppl. Fig 3. DAPI was used to stain the nuclei. Image acquisition was performed with Leica SP8 confocal microscopy (scale bars are located at lower panels bottom right corners and represents 9.49 μ m of length). (C) MCF-7 were immunoprecipitated with mouse NUR77 antibody or rabbit API5 antibody before and after treatment of cells with TSA (500nM, 16h). NUR77 and API5 were detected with mouse NUR77 and rabbit API5 antibodies respectively. Expected signals bands are NUR77 ~64kDa and API5 ~55kDa (MW, molecular weight markers). (D) MCF-7 cells were seeded and after 48h, rabbit NUR77 antibody coupled with secondary antibody coupled to Alexa-rabbit 488 (in green) and mouse API5 antibody coupled with secondary antibody coupled to Alexa-mouse 555 (in red) were used. Isotype controls are presented in suppl. Fig 3. DAPI was used to stain the nuclei. Image

acquisition was performed with Leica SP8 confocal microscopy (scale bars are located at lower panels bottom right corners and represents 9.49 μ m of length).

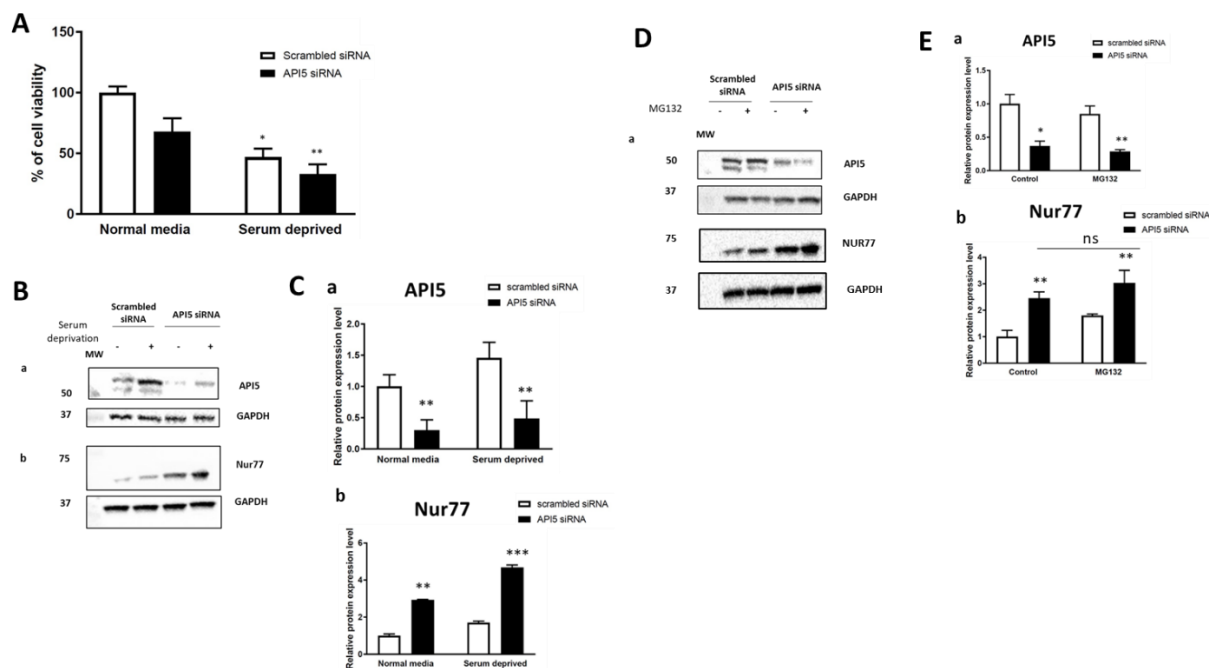
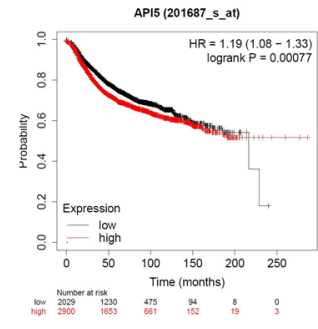
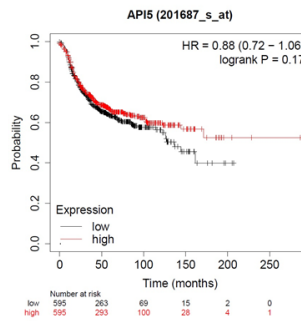
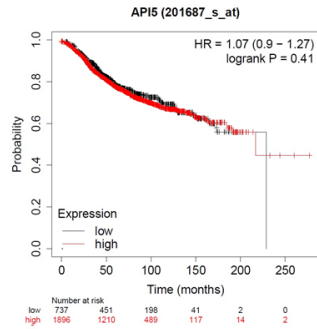


Figure 21 - Downregulation of API5 cooperates with serum deprivation to induce NUR77 expression and decrease cell viability

MCF-7 cells were transfected either with siRNA targeting API5 or scrambled siRNA (20nM). After 48h, media was changed in media depleted in serum or regular media and cells were lysed after 72h of transfection. (A) Cells were plated in 96 wells plate and absorbance was read at 560 nm wavelength after addition of Alamar blue detection solution for each condition. Histogram bars represent mean \pm SD (N = 3 experiments performed independently with 3 technical replicates in each experiment). One-way ANOVA analysis followed by Tukey's multiple comparison post-hoc test was applied to determine statistical significance (* p-value <0.05 and ** p-value <0.01 vs scrambled siRNA cultured in normal media group). (B) Total extracts were migrated in SDS-PAGE and Western blots performed with anti-API5 antibody and anti-NUR77 antibody. Anti-GAPDH antibody was used as a load control. Expected signals bands are API5 ~55kDa, NUR77 ~64kDa, and GAPDH ~37kDa (MW, molecular weight markers). (C) Expression protein levels of API5 (a)

and NUR77 (b) were evaluated from western blot from Figure 19B. Histogram bars represent mean \pm SD of 3 experiments performed independently with 3 technical replicates in each experiment \pm SD. A one-way ANOVA analysis followed by a Tukey's multiple comparison post-hoc test was applied to determine statistical significance for the comparison between normal media + scrambled siRNA and scrambled siRNA + deprived serum or API5 siRNA + normal media or API5 siRNA + deprived serum (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$). (D) MCF-7 cells were transfected either with siRNA targeting API5 or scrambled siRNA (20nM). Cells were treated with MG132 proteasome inhibitor (10 μ m) or control (DMSO) for 4 hours and cells were lysed after 72h of transfection. Total extracts were migrated in SDS-PAGE and Western blots performed with anti-API5 antibody, anti-NUR77 antibody and anti-GAPDH antibody as a load control. Expected signals bands are API5 ~55kDa, NUR77 ~64kDa and GAPDH ~37kDa (MW, molecular weight markers). (E) Expression protein levels of API5 (a) and NUR77 (b) were evaluated from western blots from Figure 19D. Histogram bars represent mean \pm SD of 3 experiments performed independently with 3 technical replicates in each experiment \pm SD. A one-way ANOVA analysis followed by a Tukey's multiple comparison post-hoc test was applied to determine statistical significance for the comparison between control + scrambled siRNA and control + siRNA API5 or MG132+scrambled siRNA or MG132 + siRNA API5 (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

API5



NUR77

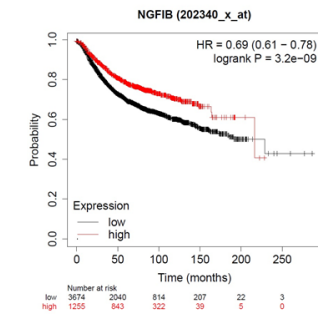
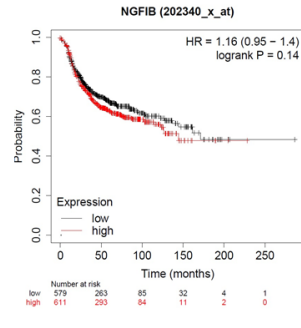
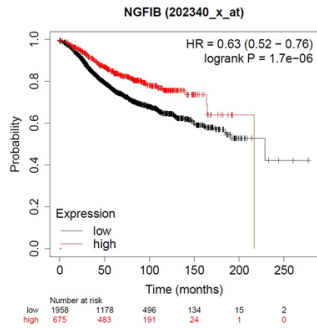


Figure 22 - The prognostic value of API5 and NUR77 gene expression for relapse-free survival in breast cancer patients.

Kaplan Meier curves for relapse-free survival in patients groups classified by levels of expression of API5 (Affy id.: 201687_s_at) or NUR77 (NGFIB, Affy id.: 202340_x_at) for all subtypes (A), ER+ breast cancer (B), or ER- breast cancer (C).

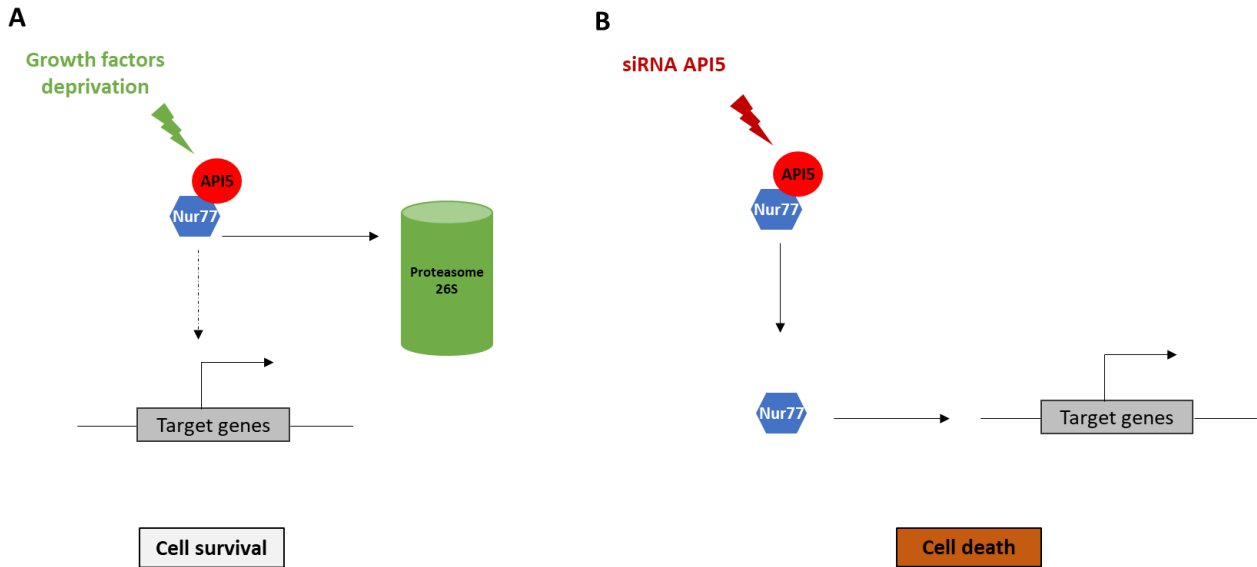


Figure 23 - Schematic model proposed for API5 and NUR77 interaction in regulating apoptosis in ER+ Breast cancer.

(A) Our hypothesized model is that API5 interaction with NUR77 in ER+ BC cells induces cell survival in activating the proteasome pathway and thus inducing a decrease of NUR77 protein expression and represses the activation of NUR77 target genes involved in cell death.

(B) After API5 depletion, NUR77 protein expression is stabilized and induces activation of target genes involved in cell death.

3.10 Supplementary Figures

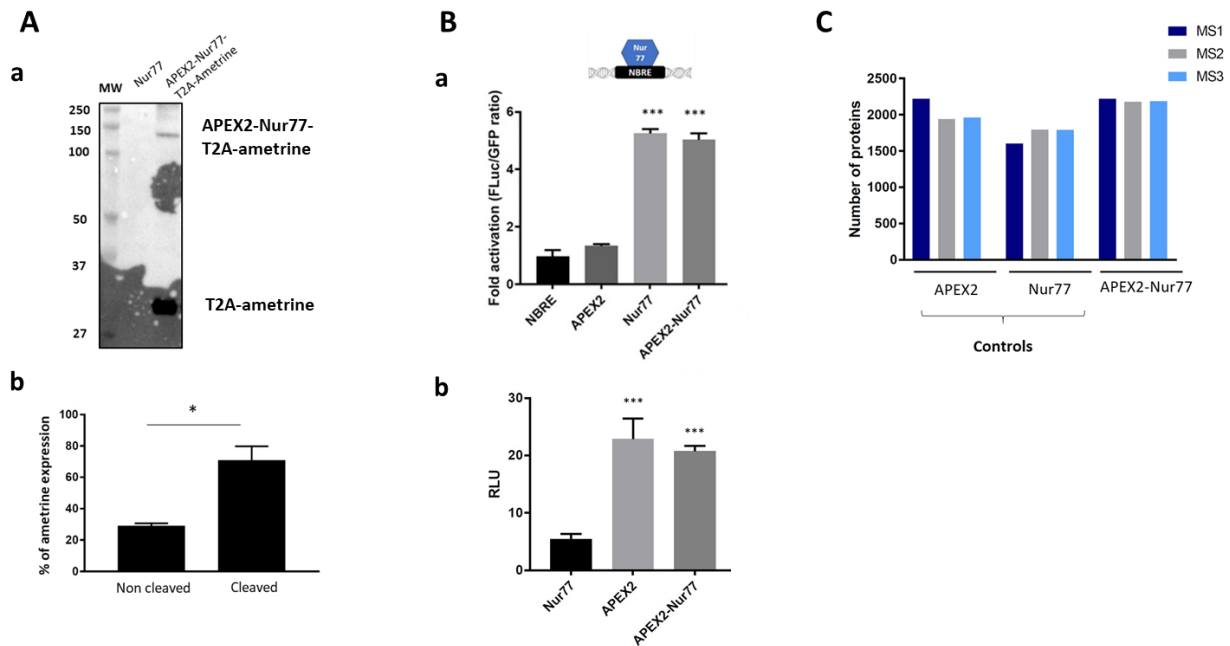


Figure S9 - Identify NUR77 interactome in HEK293 cells.

(A) The APEX2-NUR77-ametrine protein is efficiently cleaved in HEK293 cells. HEK293 cells were transiently transfected with NUR77 and APEX2-NUR77-T2A-ametrine. Thirty-six hours post-transfection, cells were harvested and lysed. Proteins from total extracts were separated by SDS-PAGE and Western blotting performed with an anti-GFP antibody (a). Expected molecular weights are ~120kDa for APEX2-NUR77-T2A-ametrine and ~30kDa T2A-ametrine (MW, molecular weight markers). Densitometric quantification of cleaved ametrine using data in (a) is quantified in (b). One-way ANOVA analysis followed by Tukey's multiple comparison post-hoc test was performed to determine statistical significance of the difference between amounts of non-cleaved and cleaved ametrine generated by the APEX-NUR77-T2A-ametrine construct (* p-value < 0.05).

(B) APEX and NUR77 activities are preserved in the fusion protein in HEK293 cells. (a) NUR77 transcriptional activity is maintained on the monomeric NBRE in HEK293 cells. HEK293 cells were transiently transfected with the 3xNBRE-Fluc reporter vector (300 ng), together with an expression vector for human NUR77 or APEX2-T2A-ametrine or APEX2-NUR77T2A-ametrine (100 ng). Forty-eight hours post-transfection cells were harvested and lysed, and samples were

assayed for luciferase activity. Histogram bars represent mean \pm SD ($N=3$). One-way ANOVA analysis followed by Tukey's multiple comparison post-hoc test was applied to determine statistical significance for the comparison between 3xNBRE+APEX2 or 3xNBRE+NUR77 or 3xNBRE+APEX2-NUR77 vs the 3xNBRE control ($*** p < 0.001$). (b) APEX2 enzymatic activity is maintained in HEK293 cells. HEK293 cells were transiently transfected with an expression vector for human NUR77, APEX2-T2A-ametrine or APEX2-NUR77-T2A-ametrine (100 ng) constructs. Thirty-six hours post-transfection, cells were harvested and lysed, and samples were assayed for luminescent activity (RLU) after addition of peroxide and luminol. Histogram bars represent mean \pm SD ($N=3$). One-way ANOVA analysis followed by Tukey's multiple comparison post-hoc test was applied to determine statistical significance of the comparison between APEX2 or APEX2-NUR77 and NUR77 control ($*** p < 0.001$). (C) Number of total proteins identified in the experimental or control condition for the three mass spectrometry data sets corresponding to each biological repeat.

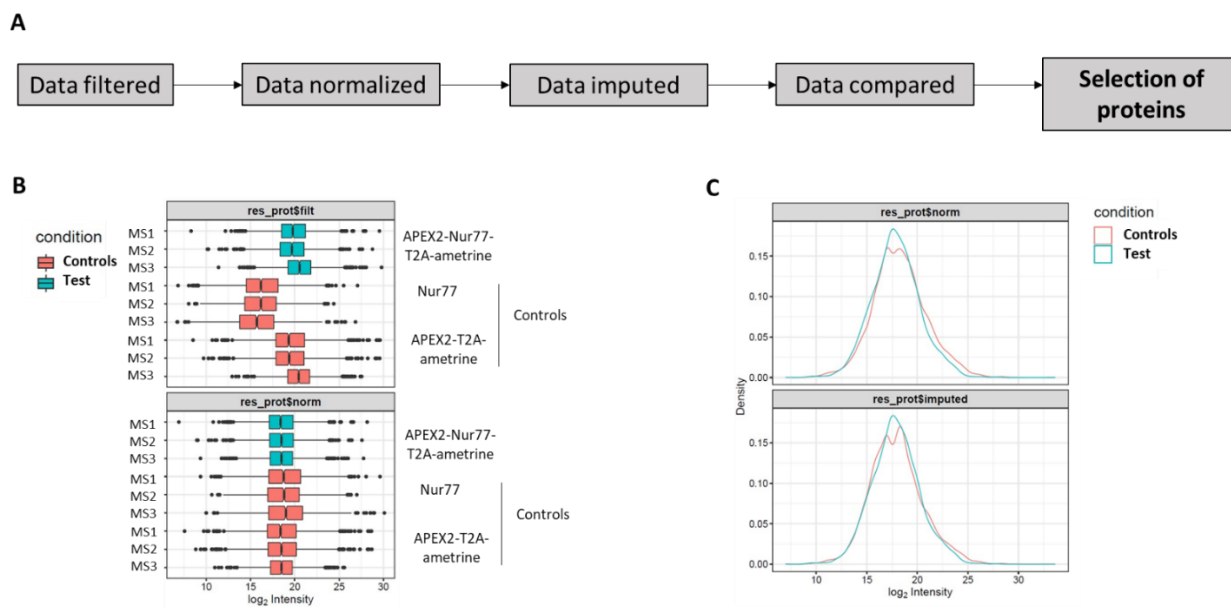


Figure S10 - DEP analysis of peak intensity of proteins enriched in three biological replicates.

(A) DEP package was used to perform differential analyses on proteins, using quantitative mass spectrometry-based proteomics data based on peptides intensity, given by PEAKS X (Zhang et al., 2018).

(B) Distribution of intensities before and after Variance Stabilizing Normalization (VSN).

(C) Distribution of intensities without and with imputed values, using knn method (Zhang, 2016).

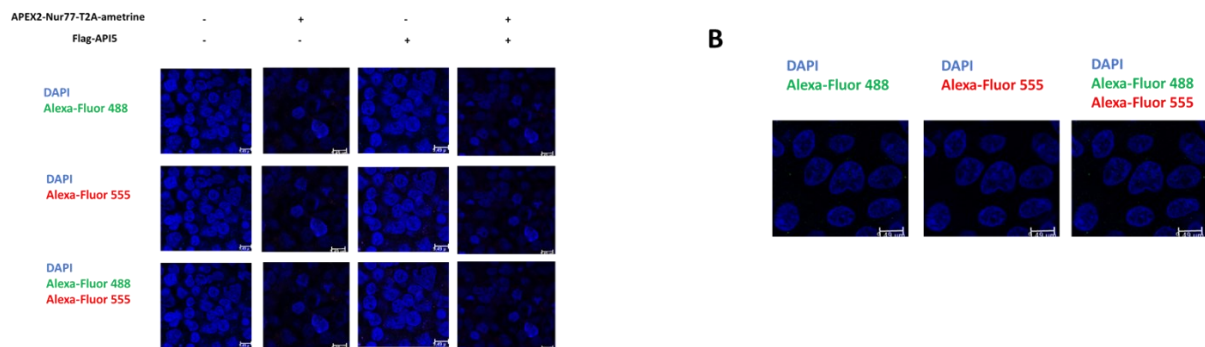


Figure S11 - Isotype controls of immunofluorescence assays in HEK293 and MCF-7 cells.

(A) HEK293 cells were transfected with APEX2-NUR77-T2A-ametrine and Flag-API5. Forty-eight hours post-transfection, rabbit GFP antibody and a secondary antibody coupled to Alexa-rabbit 488 (in green) or mouse Flag antibody and a secondary antibody coupled to Alexa-mouse 555 (in orange) were incubated with permeabilized and fixed cells. Isotype controls for GFP and API5 are used as negative controls. DAPI was used to stain the nuclei. (B) MCF-7 cells were seeded and stained after 48h, with a rabbit API5 antibody together with a secondary antibody coupled to Alexa-rabbit 488 (in green) or with the mouse NUR77 antibody together with a secondary antibody coupled to Alexa-mouse 555 (in orange) were used. Isotype controls are used as negative controls. DAPI was used to stain the nuclei. (A) and (B) Image acquisition was performed with a Leica TCS SP8 confocal microscope (scale bars are located at lower panels bottom right corners and represent 9.49 μ m).

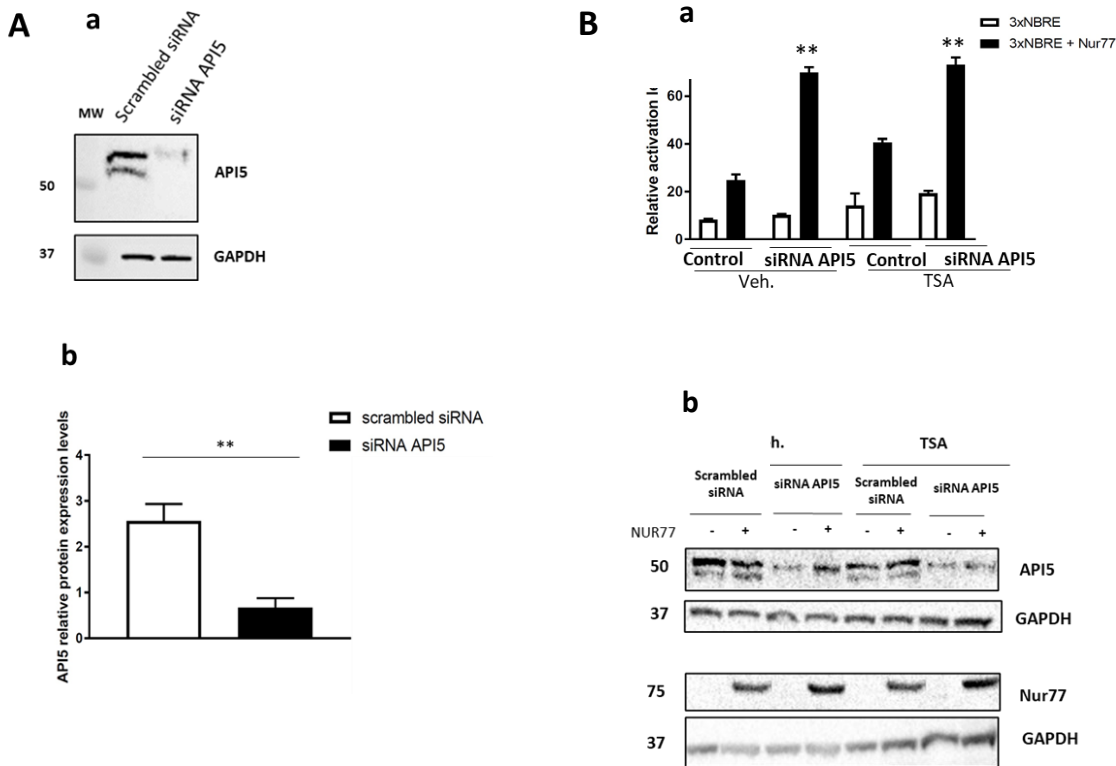


Figure S12 - API5 knockdown increases NUR77 transcriptional activity.

(A) MCF-7 cells were transfected either with siRNA targeting API5 or scrambled siRNA (20nM). Cells were lysed 72h after transfection. Total extracts were migrated in SDS-PAGE and Western blotting performed with anti-API5 antibody and anti-GAPDH antibody used as load control (a). Densitometric quantification of API5 protein expression in (a) is represented in (b) (N=3). (B) HEK293 cells were transiently transfected with 3xNBRE-Rluc (300 ng), human NUR77 (100 ng) constructs and siRNA targeting API5 or scrambled siRNA (20nM) constructs. Cells were either treated with DMSO (control) or TSA (500nM, 16h). Seventy-two hours post-transfection cells were harvested and lysed. Samples were then assayed for luciferase activity. Histogram bars represent mean \pm SD of 3 experiments performed independently with 3 technical replicates in each experiment \pm SD. A one-way ANOVA analysis followed by a Tukey's multiple comparison post-hoc test was applied to determine statistical significance for the comparison between 3xNBRE + NUR77 (siRNA API5 or scrambled siRNA + TSA or siRNA API5 + TSA) vs 3NBRE + NUR77

(scrambled siRNA) (** $p < 0.01$). Western blot evaluating protein detection in (a) is represented in (b).

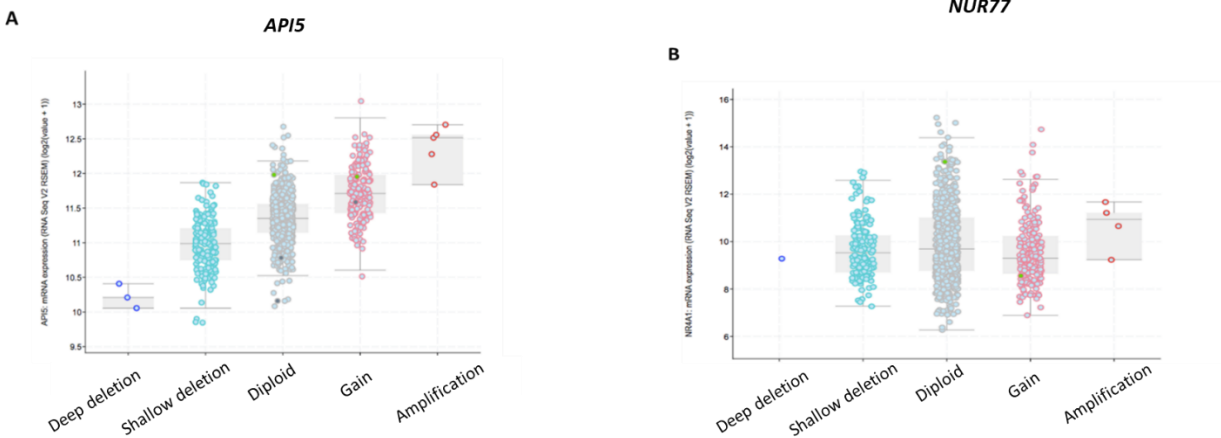


Figure S13 - Genomic profiles of API5 and NUR77 mRNA expression breast invasive carcinoma

Representation of API5 (A) and NUR77 (B) mRNA expression levels (RNA Seq V2 RSEM) as a function of copy-number variation (from GISTIC) generated with the cBioPortal genomic online.

3.11 References

1. Bray F, F. J., Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* **68(6)**, 394–424
2. Sims AH, H. A., Howell SJ, Clarke RB. (2007) Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Oncol.* **4(9)**, 516-525
3. Dowsett, A. R. a. M. (2004) Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocrine-Related Cancer* **11**, 643–658
4. Schiff, C. K. O. a. R. (2011) Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med.* **62**, 233–247
5. Osborne, C. K., and Schiff, R. (2011) Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med* **62**, 233-247
6. Roop, R. P., and Ma, C. X. (2012) Endocrine resistance in breast cancer: molecular pathways and rational development of targeted therapies. *Future Oncol* **8**, 273-292
7. Szostakowska, M., Trebinska-Stryjewska, A., Grzybowska, E. A., and Fabisiewicz, A. (2019) Resistance to endocrine therapy in breast cancer: molecular mechanisms and future goals. *Breast Cancer Res Treat* **173**, 489-497
8. Fan, W., Chang, J., and Fu, P. (2015) Endocrine therapy resistance in breast cancer: current status, possible mechanisms and overcoming strategies. *Future Med Chem* **7**, 1511-1519
9. Hsu, H. C., Zhou, T., and Mountz, J. D. (2004) NUR77 family of nuclear hormone receptors. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **3**, 413-423
10. Philips, A., Lesage, S., Gingras, R., Maira, M. H., Gauthier, Y., Hugo, P., and Drouin, J. (1997) Novel dimeric NUR77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Mol Cell Biol* **17**, 5946-5951
11. Wilson, T. E., Fahrner, T. J., Johnston, M., and Milbrandt, J. (1991) Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* **252**, 1296-1300
12. Maira, M., Martens, C., Philips, A., and Drouin, J. (1999) Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol Cell Biol* **19**, 7549-7557

13. Flaig, R., Greschik, H., Peluso-Iltis, C., and Moras, D. (2005) Structural basis for the cell-specific activities of the NGFI-B and the NURR1 ligand-binding domain. *J Biol Chem* **280**, 19250-19258
14. Wang, Z., Benoit, G., Liu, J., Prasad, S., Aarnisalo, P., Liu, X., Xu, H., Walker, N. P., and Perlmann, T. (2003) Structure and function of NURR1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* **423**, 555-560
15. de Vera, I. M. S., Munoz-Tello, P., Zheng, J., Dharmarajan, V., Marciano, D. P., Matta-Camacho, E., Giri, P. K., Shang, J., Hughes, T. S., Rance, M., Griffin, P. R., and Kojetin, D. J. (2019) Defining a Canonical Ligand-Binding Pocket in the Orphan Nuclear Receptor NURR1. *Structure* **27**, 66-77 e65
16. Campos-Melo, D., Galleguillos, D., Sanchez, N., Gysling, K., and Andres, M. E. (2013) Nur transcription factors in stress and addiction. *Front Mol Neurosci* **6**, 44
17. Kurakula, K., Koenis, D. S., van Tiel, C. M., and de Vries, C. J. (2014) NR4A nuclear receptors are orphans but not lonesome. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 2543-2555
18. Maxwell, M. A., and Muscat, G. E. (2006) The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl Recept Signal* **4**, e002
19. Shannon, E., Mullican, Zhang, S., Konopleva, M., Ruvolo, V., Andreeff, M., Milbrandt, J., Conneely, OM. (2007) Abrogation of nuclear receptors NR4A3 and NR4A1 leads to development of acute myeloid leukemia. *NATURE MEDICINE* **13**
20. Wu, H., Lin, Y., Li, W., Sun, Z., Gao, W. et al. (2011) Regulation of NUR77 expression by beta-catenin and its mitogenic effect in colon cancer cells. *The FASEB Journal* **25**, 192–205.
21. Li, H., Kolluri, S. K., Gu, J., Dawson, M. I., Cao, X., Hobbs, P. D., Lin, B., Chen, G., Lu, J., Lin, F., Xie, Z., Fontana, J. A., Reed, J. C., and Zhang, X. (2000) Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science* **289**, 1159-1164
22. Lin, B., Kolluri, SK., Lin, F., Liu, W., Han, YH., Cao, X., Dawson, MI., Reed, JC., Zhang, XK. (2004) Conversion of BCL-2 from Protector to Killer by Interaction with Nuclear Orphan Receptor NUR77/TR3. *Cell* **116**, 527–540
23. Moll, U., Marchenko, N., Zhang, XK. (2006) P53 and NUR77/TR3 – transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene* **25**, 4725–4743

24. Bras, A., Albar, J. P., Leonardo, E., de Buitrago, G. G., and Martinez, A. C. (2000) Ceramide-induced cell death is independent of the Fas/Fas ligand pathway and is prevented by NUR77 overexpression in A20 B cells. *Cell Death Differ* **7**, 262-271
25. Sun, Z., Cao, X., Jiang, M. M., Qiu, Y., Zhou, H., Chen, L., Qin, B., Wu, H., Jiang, F., Chen, J., Liu, J., Dai, Y., Chen, H. F., Hu, Q. Y., Wu, Z., Zeng, J. Z., Yao, X. S., and Zhang, X. K. (2012) Inhibition of beta-catenin signaling by nongenomic action of orphan nuclear receptor NUR77. *Oncogene* **31**, 2653-2667
26. Uemura, H., and Chang, C. (1998) Antisense TR3 orphan receptor can increase prostate cancer cell viability with etoposide treatment. *Endocrinology* **139**, 2329-2334
27. Hedrick, E., Lee, SO., Doddapaneni, R., Singh, M., Safe, S. (2015) Nuclear receptor 4A1 as a drug target for breast cancer chemotherapy. *Endocr Relat Cancer* **22**, 831-840
28. Hedrick, E., Lee, SO., Doddapaneni, R., Singh, M., Safe, S. (2016) NR4A1 Antagonists Inhibit β 1-Integrin-Dependent Breast Cancer Cell Migration. *Mol Cell Biol.* **36(9)**, 1383-1394
29. Wu, H., Bi, J., Peng, Y., Huo, L., Yu, X., Yang, Z., et al. (2017) Nuclear receptor NR4A1 is a tumor suppressor down-regulated in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* **8**, 54364-54377
30. Muscat, G., Eriksson, NA., Byth, K., Loi, S., Graham, D., Jindal, S., et al. (2013) Research Resource: Nuclear Receptors as Transcriptome: Discriminant and Prognostic Value in Breast Cancer. *Mol Endocrinol* **27**, 350–365
31. Zhou, F., Drabsch, Y., Dekker, T.J.A., Garcia de Vinuesa, A., Li, Y., Hawinkels L.J.A.C.,(...), den Dijke, P. . (2014) Nuclear receptor NR4A1 promotes breast cancer invasion and metastasis by activating TGF- β signalling. *Nature Communications volume* **3388**
32. Alexopoulou, A. N., Leao, M., Caballero, O.L., Da Silva, L., Reid, L., Lakhani, S.R., Simpson, A.J., Marshall, J.F., Neville, A.M., Jat, PS. (2010) Dissecting the transcriptional networks underlying breast cancer: NR4A1 reduces the migration of normal and breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res.* **12(4)**, R51
33. Cho, S. D., Yoon, K., Chintharlapalli, S., Abdelrahim, M., Lei, P., Hamilton, S., Khan, S., Ramaiah, S. K., and Safe, S. (2007) NUR77 agonists induce proapoptotic genes and

- responses in colon cancer cells through nuclear receptor-dependent and nuclear receptor-independent pathways. *Cancer Res* **67**, 674-683
34. Ye, X., Wu, Q., Liu, S., Lin, X., Zhang, B., Wu, J., Cai, J., Zhang, M., and Su, W. (2004) Distinct role and functional mode of TR3 and RARalpha in mediating ATRA-induced signalling pathway in breast and gastric cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 98-113
 35. Kang, S., Na, H., Kang, HJ., Kim, SH., Lee, MH., Lee, MO. (2010) Regulation of NUR77 protein turnover through acetylation and deacetylation induced by p300 and HDAC1. *Biochem Pharmacol.* **80(6)**, 867-873
 36. Dodat, F., Cotnoir-White, D., Dianati, E., Vallet, A., Mader, S., and Levesque, D. (2021) Complex regulation of orphan nuclear receptor NUR77 (NR4A1) transcriptional activity by SUMO2 and PIASgamma. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 118908
 37. Kurakula, K., Koenis, DS., van Tiel, CM., de Vries, CJ. (2014) NR4A nuclear receptors are orphans but not lonesome. *Biochim Biophys Acta.* **1843(11)**, 2543-2555.
 38. Zhao, B., Chen, HZ., Lei, NZ., Li, GD., Zhao, WX., Zhan, YY., Liu, B., Lin, SC., Wu, Q. (2006) P53 mediates the negative regulation of MDM2 by orphan receptor TR3. *The EMBO Journal* **25**, 5703–5715
 39. Bouzas-Rodríguez, J., Zárraga-Granados, G., Sánchez-Carbente, MR., Rodríguez-Valentín, R., Gracida, X., Anell-Rendón, D., Covarrubias, L., Castro-Obregón, S. (2012) The nuclear receptor NR4A1 induces a form of cell death dependent on autophagy in mammalian cells. *PLoS One* **7**
 40. Vidal, M., Cusick, ME., Barabási, AL. (2011) Interactome Networks and Human Disease. *Cell* **144**, 986-998
 41. Pranavathiyani, G., Thanmalagan, RR., Leimarembi Devi, N., Venkatesan, A. (2018) Integrated transcriptome interactome study of oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer. *Genes Dis* **6**, 78-87
 42. König, S., Rissler, V., Terkelsen, T., Lambrugh, M., Papaleo, E. (2019) Alterations of the interactome of BCL-2 proteins in breast cancer at the transcriptional, mutational and structural level. *PLoS Comput Biol.* **15**
 43. Perkins, J. R., Diboun, I., Dessailly, B. H., Lees, J. G., and Orengo, C. (2010) Transient protein-protein interactions: structural, functional, and network properties. *Structure* **18**, 1233-1243

44. van der Merwe, P. A., and Barclay, A. N. (1994) Transient intercellular adhesion: the importance of weak protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci* **19**, 354-358
45. Rhee, H. W., Zou, P., Udeshi, N. D., Martell, J. D., Mootha, V. K., Carr, S. A., and Ting, A. Y. (2013) Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science* **339**, 1328-1331
46. Hung, V., Udeshi, N. D., Lam, S. S., Loh, K. H., Cox, K. J., Pedram, K., Carr, S. A., and Ting, A. Y. (2016) Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2. *Nat Protoc* **11**, 456-475
47. Zhang, X., Smits, A. H., van Tilburg, G. B., Ovaa, H., Huber, W., and Vermeulen, M. (2018) Proteome-wide identification of ubiquitin interactions using UbIA-MS. *Nat Protoc* **13**, 530-550
48. Zhang, Z. (2016) Introduction to machine learning: k-nearest neighbors. *Ann Transl Med* **4**, 218
49. Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1993) Controlling the False Discovery Rate: of practical and powerful approach two multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B* **57** (1), 289-300
50. Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., and Schultz, N. (2012) The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* **2**, 401-404
51. Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C., and Schultz, N. (2013) Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* **6**, p11
52. Voyksner, R. D., and Lee, H. (1999) Investigating the use of an octupole ion guide for ion storage and high-pass mass filtering to improve the quantitative performance of electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **13**, 1427-1437
53. Zhu, W., Smith, J. W., and Huang, C. M. (2010) Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 840518
54. Bondarenko, P. V., Chelius, D., and Shaler, T. A. (2002) Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **74**, 4741-4749

55. Chelius, D., and Bondarenko, P. V. (2002) Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry. *J Proteome Res* **1**, 317-323
56. Bilodeau, S., Vallette-Kasic, S., Gauthier, Y., Figarella-Branger, D., Brue, T., Berthelet, F., Lacroix, A., Batista, D., Stratakis, C., Hanson, J., Meij, B., and Drouin, J. (2006) Role of Brg1 and HDAC2 in GR trans-repression of the pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease. *Genes Dev* **20**, 2871-2886
57. Balasubramanian, S., Kota, S. K., Kuchroo, V. K., Humphreys, B. D., and Strom, T. B. (2012) TIM family proteins promote the lysosomal degradation of the nuclear receptor NUR77. *Sci Signal* **5**, ra90
58. Shao, A. W., Sun, H., Geng, Y., Peng, Q., Wang, P., Chen, J., Xiong, T., Cao, R., and Tang, J. (2016) Bclaf1 is an important NF-kappaB signaling transducer and C/EBPbeta regulator in DNA damage-induced senescence. *Cell Death Differ* **23**, 865-875
59. Rigou, P., Piddubnyak, V., Faye, A., Rain, J. C., Michel, L., Calvo, F., and Poyet, J. L. (2009) The antiapoptotic protein AAC-11 interacts with and regulates Acinus-mediated DNA fragmentation. *EMBO J* **28**, 1576-1588
60. Morris, E. J., Michaud, W. A., Ji, J. Y., Moon, N. S., Rocco, J. W., and Dyson, N. J. (2006) Functional identification of Api5 as a suppressor of E2F-dependent apoptosis in vivo. *PLoS Genet* **2**, e196
61. Van den Berghe, L., Laurell, H., Huez, I., Zanibellato, C., Prats, H., and Bugler, B. (2000) FIF [fibroblast growth factor-2 (FGF-2)-interacting-factor], a nuclear putatively antiapoptotic factor, interacts specifically with FGF-2. *Mol Endocrinol* **14**, 1709-1724
62. Sarras, H., Alizadeh Azami, S., and McPherson, J. P. (2010) In search of a function for BCLAF1. *ScientificWorldJournal* **10**, 1450-1461
63. Basset, C., Bonnet-Magnaval, F., Navarro, M. G., Touriol, C., Courtade, M., Prats, H., Garmy-Susini, B., and Lacazette, E. (2017) Api5 a new cofactor of estrogen receptor alpha involved in breast cancer outcome. *Oncotarget* **8**, 52511-52526
64. Bousquet, G., Feugeas, J. P., Gu, Y., Leboeuf, C., Bouchtaoui, M. E., Lu, H., Espie, M., Janin, A., and Benedetto, M. D. (2019) High expression of apoptosis protein (Api-5) in chemoresistant triple-negative breast cancers: an innovative target. *Oncotarget* **10**, 6577-6588

65. Cho, H., Chung, J. Y., Song, K. H., Noh, K. H., Kim, B. W., Chung, E. J., Ylaya, K., Kim, J. H., Kim, T. W., Hewitt, S. M., and Kim, J. H. (2014) Apoptosis inhibitor-5 overexpression is associated with tumor progression and poor prognosis in patients with cervical cancer. *BMC Cancer* **14**, 545
66. Sohn, Y. C., Kwak, E., Na, Y., Lee, J. W., and Lee, S. K. (2001) Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors and activating signal cointegrator-2 as transcriptional coregulators of the orphan nuclear receptor NUR77. *J Biol Chem* **276**, 43734-43739
67. Mullen, P. (2004) PARP cleavage as a means of assessing apoptosis. *Methods Mol Med* **88**, 171-181
68. Shah, G. M., Shah, R. G., and Poirier, G. G. (1996) Different cleavage pattern for poly(ADP-ribose) polymerase during necrosis and apoptosis in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **229**, 838-844
69. Hedrick, E., and Safe, S. (2017) Transforming Growth Factor beta/NR4A1-Inducible Breast Cancer Cell Migration and Epithelial-to-Mesenchymal Transition Is p38alpha (Mitogen-Activated Protein Kinase 14) Dependent. *Mol Cell Biol* **37**
70. Xie, L., Jiang, F., Zhang, X., Alitongbieke, G., Shi, X., Meng, M., Xu, Y., Ren, A., Wang, J., Cai, L., Zhou, Y., Xu, Y., Su, Y., Liu, J., Zeng, Z., Wang, G., Zhou, H., Chen, Q. C., and Zhang, X. K. (2016) Honokiol sensitizes breast cancer cells to TNF-alpha induction of apoptosis by inhibiting NUR77 expression. *Br J Pharmacol* **173**, 344-356
71. Bong, S. M., Bae, S. H., Song, B., Gwak, H., Yang, S. W., Kim, S., Nam, S., Rajalingam, K., Oh, S. J., Kim, T. W., Park, S., Jang, H., and Lee, B. I. (2020) Regulation of mRNA export through API5 and nuclear FGF2 interaction. *Nucleic Acids Res* **48**, 6340-6352
72. Mayank, A. K., Sharma, S., Nailwal, H., and Lal, S. K. (2015) Nucleoprotein of influenza A virus negatively impacts antiapoptotic protein API5 to enhance E2F1-dependent apoptosis and virus replication. *Cell Death Dis* **6**, e2018
73. Imre, G., Berthelet, J., Heering, J., Kehrlouesser, S., Melzer, I. M., Lee, B. I., Thiede, B., Dotsch, V., and Rajalingam, K. (2017) Apoptosis inhibitor 5 is an endogenous inhibitor of caspase-2. *EMBO Rep* **18**, 733-744
74. Savkur, R. S., and Burris, T. P. (2004) The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *J Pept Res* **63**, 207-212

75. Gyorffy, B., Lanczky, A., Eklund, A. C., Denkert, C., Budczies, J., Li, Q., and Szallasi, Z. (2010) An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat* **123**, 725-731
76. Yu, H., Kumar, SM., Fang, D., Acs, G., Xu, X. (2007) Nuclear orphan receptor TR3/NUR77 mediates melanoma cell apoptosis. *Cancer Biol Ther.* **6**, 405-412
77. Chang, L., Lin, PC., Ho, LI., Liu, PY., Wu, WC., Chiang, IP., Chang, HW., Lin, SZ., Harn, YC., Harn, HJ., Chiou, TW. (2011) Overexpression of the orphan receptor NUR77 and its translocation induced by PCH4 may inhibit malignant glioma cell growth and induce cell apoptosis. *J Surg Oncol.* **103**, 442-450
78. Choudhury, N. R., Heikel, G., Trubitsyna, M., Kubik, P., Nowak, J. S., Webb, S., Granneman, S., Spanos, C., Rappsilber, J., Castello, A., and Michlewski, G. (2017) RNA-binding activity of TRIM25 is mediated by its PRY/SPRY domain and is required for ubiquitination. *BMC Biol* **15**, 105
79. Ohkura, N., Nagamura, Y., and Tsukada, T. (2008) Differential transactivation by orphan nuclear receptor NOR1 and its fusion gene product EWS/NOR1: possible involvement of poly(ADP-ribose) polymerase I, PARP-1. *J Cell Biochem* **105**, 785-800
80. Sacchetti, P., Carpentier, R., Segard, P., Olive-Cren, C., and Lefebvre, P. (2006) Multiple signaling pathways regulate the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NURR1. *Nucleic Acids Res* **34**, 5515-5527
81. Luciano, F., Krajewska, M., Ortiz-Rubio, P., Krajewski, S., Zhai, D., Faustin, B., et al. (2007) NUR77 converts phenotype of Bcl-B, an antiapoptotic protein expressed in plasma cells and myeloma. *Blood* **109**, 3849–3855
82. Li, H., Kolluri, SK (...), Zhang, X. (2000) Cytochrome c Release and Apoptosis Induced by Mitochondrial Targeting of Nuclear Orphan Receptor TR3. *SCIENCE* **289**
83. Zhan, Y., Du, X., Chen, H., Liu, J., Zhao, B., Huang, D., et al. (2008) Cyclosporine B is an agonist for nuclear orphan receptor NUR77. *Nat Chem Biol.* **4(9)**, 548-556.
84. ten Have, S., Boulon, S., Ahmad, Y., and Lamond, A. I. (2011) Mass spectrometry-based immuno-precipitation proteomics - the user's guide. *Proteomics* **11**, 1153-1159

85. Sable, R., Jambunathan, N., Singh, S., Pallerla, S., Kousoulas, K. G., and Jois, S. (2018) Proximity ligation assay to study protein-protein interactions of proteins on two different cells. *Biotechniques* **65**, 149-157

Chapitre 4 - Discussion générale et perspectives

4.1 La SUMOylation, une MPT importante et complexe pour l'activité de NUR77

4.1.1- Une modulation de l'activité de NUR77 par SUMO2 et PIAS γ

L'activité des RN est modulée par un large nombre de corégulateurs qui modulent leurs propriétés fonctionnelles dont la régulation de la transcription, leur demi-vie et leur localisation sub-cellulaire. Leurs interacteurs incluent les protéines PIAS, qui induisent la SUMOylation des récepteurs et possiblement aussi celle de leurs cofacteurs (Kurakula et al., 2014; Rytinki, 2009; Zhang et al., 2017). Jusqu'à présent, deux études ont mis en évidence la SUMOylation de NUR77 dans des lignées cellulaires HEK293 et HeLa (Zárraga-Granados G, 2020; Zhang et al., 2017). Néanmoins, ces deux études se basent sur des double ou triple mutations des sites potentiels de SUMOylation pour évaluer l'effet de la SUMOylation chez NUR77. L'effet d'un seul site de SUMOylation sur l'activité de NUR77 n'avait pas été caractérisé jusqu'à présent. Comme les sites potentiels individuels de SUMOylation K91 et K577 se sont révélés cruciaux chez NURR1 (Arredondo, 2013; Galleguillos, 2004), avec des effets opposés sur son activité transcriptionnelle, il nous est apparu essentiel de se pencher sur l'effet des sites homologues chez NUR77. Par ailleurs, une augmentation de la SUMOylation de NUR77 par la surexpression de la E3 ligase PIAS3 a été mise en évidence dans une étude (Zhang et al., 2017), mais l'effet de la E3 ligase PIAS γ (PIAS4), ayant un rôle répresseur sur NURR1 (Galleguillos, 2004), n'a jusqu'alors pas été étudiée chez NUR77.

Nos travaux ont mis en lumière que les protéines PIAS γ et SUMO2 exercent une répression coopérative sur l'activité transcriptionnelle de NUR77. La sensibilité de la répression engendrée par PIAS γ à la protéine SENP-1 appuie un mécanisme d'action impliquant la SUMOylation, ce qui fait écho aux études ayant démontré ce phénomène sur l'activité transcriptionnelle de NURR1 (Arredondo, 2013; Galleguillos, 2004). Comme des courbes de titration en faisant varier les concentrations de la SUMO2 et de PIAS γ n'ont pas été réalisées, il n'est pas possible de conclure si cet effet est additif ou synergique.

Comme la répression exercée par PIAS γ sur NUR77 est plus faible une fois le site potentiel accepteur de SUMOylation K577 muté, il semble que cette régulation nécessite – du moins en partie – l'intégrité de ce site. Par ailleurs, la surexpression de la SUMO2 semble potentialiser cette répression, dont l'effet est réduit avec la mutation de la lysine 577. Cette diminution significative de l'activité transcriptionnelle de NUR77 est compatible avec l'effet répresseur de la SUMOylation sur l'activité d'autres RN tels que ER, GR et AR (Hua et al., 2016; Poukka et al., 2000; Traboulsi, 2019). La lysine 577 est située dans l'hélice 11, qui stabilise l'activité de NURR1 et NUR77 (Flaig et al., 2005; Volakakis et al., 2006; Wang, 2003). Cette hélice sert notamment d'interface de recrutement à des corépresseurs comme HDAC1 et TIM-1, qui limitent l'interaction entre NUR77 et la machinerie transcriptionnelle (Balasubramanian et al., 2012; Kang, 2010). Une explication logique serait que la SUMOylation de la lysine 577 augmenterait le recrutement des corépresseurs de NUR77. Pour tester cette hypothèse, une première étape serait de confirmer que NUR77 est SUMOylée par la SUMO2 en surexprimant NUR77 et la SUMO2 dans des cellules HEK293 et en vérifiant qu'elles interagissent physiquement par la technique de co-immunoprécipitation (co-IP). Par la suite, l'interaction physique entre la SUMO2 et NUR77 pourrait être comparée avec celle de la SUMO2 et NUR77-mK577R. Cette étape permettrait de confirmer que la SUMOylation de NUR77 opère par un mécanisme nécessitant l'intégrité de la lysine 577. Par la suite, le recrutement des corépresseurs par NUR77 au niveau la lysine 577 pourra être évaluée à partir d'essais comparant l'interaction entre les corépresseurs cités précédemment avec NUR77 WT et NUR77-mK577R à l'aide de la co-IP ou de la technique *Bioluminescence Resonance Energy Transfer* (BRET). Les niveaux de SUMOylation de NUR77 WT et NUR77-mK577R pourraient être évalués en parallèle par co-IP. Cette approche comporte tout de même des limites car même si l'interaction entre ces corépresseurs et le mutant 577 est diminuée en comparaison avec NUR77 WT, elle ne permettra pas de conclure que l'interaction opère réellement sur ce site, mais plutôt qu'elle nécessite son intégrité. En effet, la mutation en lysine 577 peut affecter la conformation de la protéine qui recruterait alors différemment les corépresseurs. Des études cristallographiques permettraient de confirmer que le site K577 est bien impliqué dans la surface d'interaction avec le/les corépresseurs, comme utilisé pour l'identification de corégulateurs d'autres RN orphelins (Kallen et al., 2004).

Par ailleurs, la surexpression du mutant K577R induit une augmentation significative de l'expression du gène cible de NUR77 transporteur de glucose 4 (GLUT4) dans les cellules

HEK293, en comparaison avec la surexpression de NUR77 WT. Glut4 étant un gène induit par l'expression de NUR77 (Chao, 2007b), cette observation confirme que la mutation du résidu lysine 577 en arginine induit l'activation d'un gène cible de NUR77 et que les résultats observés dans le contexte plus artificiel des essais rapporteurs pourraient être pertinents à l'activité de NUR77 dans des conditions physiologiques. Néanmoins, cette observation ne permet pas de conclure que la régulation de *GLUT4* par NUR77 est directe car l'expression de *GLUT4* peut être modulée par d'autres facteurs qui seraient influencés par les conditions de l'étude, comme la surexpression, les autres facteurs ou voies de signalisation modulés par la surexpression de NUR77 et/ou des mutants. Afin de d'assurer que *GLUT4* est modulé directement ou non par NUR77, une expérience de ChIP-qPCR après surexpression de NUR77 dans les cellules HEK293, évaluant la liaison de NUR77 au niveau du promoteur de *GLUT4* pourrait être conduite par la suite. L'expression en ARNm d'autres gènes cibles ont également été évalués en parallèle, à savoir l'expression de *GLUT2* et du Glucose-6-Phosphatase Catalytic (*G6PC*), qui sont également des gènes cibles de NUR77 dans les HEK293 comme il a été revu dans (To, Zeng et Wong, 2012). Néanmoins, aucune modification de leur expression n'a été observée entre les conditions de surexpression de Nur77 WT et des mutants. Pour renforcer notre observation, une autre approche serait d'utiliser le promoteur endogène natif de *GLUT4* comme promoteur de la *Renilla Luciferase* exprimée dans notre vecteur d'expression (qui a été généré lors de notre étude) et d'évaluer les effets de la surexpression de NUR77 WT et des mutants, en combinaison avec ce vecteur rapporteur, sur l'activité de la *Renilla Luciferase* – et donc de l'activité transcriptionnelle de NUR77.

À l'inverse, la mutation sur le site K102 engendre une diminution significative de l'activité transcriptionnelle de NUR77, qui n'a pas été modifiée par la surexpression de la SUMO2. Cette lysine est située dans le domaine AF-1 de NUR77, principale interface de recrutement des coactivateurs de la transcription comme CBP/P300, PCAF ou SRC-1 (Kang, 2010; Kelly et al., 2005; Wansa, 2002), qui permettent d'augmenter les interactions entre NUR77 et la machinerie transcriptionnelle revue dans (Kurakula et al., 2014). Il est donc tentant de proposer que la lysine 102 serait impliquée dans le recrutement de l'un des coactivateurs cités. La même stratégie que celle expliquée précédemment pour évaluer l'implication de la lysine 577 dans le recrutement des corépresseurs pourrait être utilisée ici pour déterminer l'effet de la lysine 102 dans le recrutement des coactivateurs.

Les effets opposés des mutations des sites potentiels de SUMOylation sur l'activité transcriptionnelle de NUR77 observés dans notre étude, en comparaison à NURR1, sont particulièrement intéressants à souligner (Arredondo, 2013; Galleguillos, 2004). En raison de l'homologie de ces deux récepteurs et de l'effet répresseur similaire de PIAS γ sur leur activité (Dodat et al., 2021; Galleguillos, 2004), des effets similaires des mutations des sites potentiels de SUMOylation sur l'activité transcriptionnelle étaient attendus. Même si NURR1 et NUR77 appartiennent à la sous-famille des NR4As, leur structure est néanmoins différente - notamment au niveau de leur domaine N-terminal qui ne comprend que 27% d'identité de séquence - ce qui suggère une diversité dans leurs fonctions. Par ailleurs, les activités respectives des domaines AF-1 de ces récepteurs pourraient varier selon le contexte cellulaire et les MPT auxquels ils sont soumis.

4.1.2- Limites de l'étude et perspectives à moyen terme

4.1.2.1. La caractérisation de la SUMOylation chez NUR77

Les résultats de notre étude soutiennent l'hypothèse que PIAS γ et SUMO2 exercent un effet répresseur sur l'activité transcriptionnelle de NUR77, d'une part engendrée par la SUMOylation à travers le site K577, alors que le site K102 contribuerait à l'activité du récepteur par un mécanisme indépendant de la SUMOylation. Des essais de BRET et d'IP ont été entrepris lors de cette thèse afin de valider l'interaction entre NUR77 et la SUMO2, mais n'ont pas été concluants dans nos conditions expérimentales. Différentes conditions expérimentales ont été évaluées selon les informations des protocoles qui étaient disponibles dans les études ayant évalué la SUMOylation des NR4As (Arredondo, 2013; Zárraga-Granados G, 2020; Zhang et al., 2017). Ainsi, l'évaluation de la SUMOylation de NUR77 sans traitement préalable des cellules (Arredondo, 2013) et après traitement avec l'inhibiteur de protéasome MG132 (Zhang et al., 2017), comme il a été expérimenté pour NURR1 et NUR77 respectivement, ont été testés. Par ailleurs, l'homologue de NUR77, NURR1, dont la SUMOylation a été mise en évidence dans des travaux antérieurs (Arredondo, 2013), a été utilisé comme contrôle positif. Néanmoins, le recrutement de la SUMO2 par ce RN n'a pas été mise en évidence dans nos essais, suggérant que les conditions expérimentales n'étaient pas adéquates. Il est à noter que des informations cruciales telles que la quantité de plasmides transfectés ou encore la concentration des anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation et

l'immunobuvardage n'était pas disponibles dans les protocoles sur lesquels nos travaux se sont basés. Ceci pourrait expliquer l'infructuosité de nos essais. Des conditions de stress, telle que l'administration de la substance P, qui est un neuropeptide se liant au récepteur de la neurokinine 1 et induisant l'autophagie cellulaire, qui a été testée dans la dernière étude de la caractérisation de la SUMOylation de NUR77 (Zárraga-Granados G, 2020) et décrit dans la **section [1.2.3.2](#)** de l'introduction, pourraient cependant être testées dans la suite de nos travaux.

Afin d'évaluer si le contexte cellulaire influence le recrutement de la SUMOylation et comme cette MPT a été mise en évidence dans des modèles cellulaires de la maladie de Parkinson (Luo et al., 2017; Zhu et al., 2018), il serait possible d'évaluer la SUMOylation de NUR77 endogène dans des lignées cellulaires présentant un phénotype catécholaminergique - la dopamine étant une catécholamine - à savoir dans les cellules PC12 qui proviennent d'un phéochromocytome de rat et les cellules SH-SY5Y qui sont dérivées d'un neuroblastome (Das, Freudenrich et Mundy, 2004; Kovalevich et Langford, 2013; Xicoy, Wieringa et Martens, 2017).

Nos efforts se sont surtout concentrés sur l'isoforme 2 de la SUMO, dont l'interaction a été mise en évidence avec NURR1 (Arredondo, 2013) et vers lequel les données préliminaires du laboratoire pointaient (Giner X., Thèse 2015). Nos expériences ont cependant été menées en conditions basales - sans stimuli de stress - et des études suggèrent que les SUMO2/3 seraient principalement actives lors d'un stress (Flotho et Melchior, 2013). Nos travaux se sont majoritairement basés sur ceux de NURR1, homologue de NUR77, dont les protocoles étaient disponibles au moment de l'initiation de ce projet. Les essais pour évaluer la SUMOylation de NURR1 ont été évalués sans stimuli de stress. Aussi, même s'il a été démontré que NUR77 étaient induit après traitement des cellules HEK293 avec des esters de phorbol et que NUR77 peut être stimulé par la TSA dans les cellules HeLa (Kang, 2010), aucune modification des quantités de protéine de NUR77 dans les HEK293 n'a été observée dans nos essais ([Annexe 1](#)).

Les surexpressions utilisées pour nos essais rapporteurs ont pu stresser les cellules, en raison d'une saturation du réticulum endoplasmique dans la production de protéines et de la capacité de la cellule à replier correctement les protéines (Raden et al., 2005), ce qui n'aurait pas été visible lors des essais d'IP. La lyse cellulaire pour les essais rapporteurs a été faite après 48h de surexpression, contrairement aux IP où les cellules ont été lysées au bout de 36h. Comme le turn-over de NUR77 et de la SUMOylation est très rapide, il se peut que ces 12h de différence ait

influencé nos observations. Des travaux ultérieurs où les essais rapporteurs et d'IP sont réalisés en parallèle et dans les mêmes conditions (de surexpression et de lyse cellulaire) apparaissent donc nécessaires pour caractériser la SUMOylation de NUR77. Une alternative pour évaluer la fonction d'un gène est de diminuer ou supprimer son expression et d'observer les conséquences. Des essais de siRNA ou de CRISPR-cas9, permettant la diminution de l'ARNm de PIASy et la délétion du gène codant pour PIASy par CRISPR-cas9, de manière respective, pourraient être envisagées. Comme la délétion d'un gène n'est envisageable que si le gène n'interfère pas avec des processus biologiques essentiels du modèle utilisé (cellule ou animal) et que des souris KO en PIASy présentent un phénotype normal (Wong et al., 2004), l'approche CRISPR-cas9 peut être également envisagée dans ce cas-ci. Une fois le KD ou la délétion de PIASy, réalisées, une expérience de RNAse-seq pourra être menée en vue d'évaluer les quantités en ARNm modulés par cette modification. Si des niveaux en ARNm de gènes modulés par NUR77 comme *GLUT4* dans les HEK293 sont modifiés, des expériences de ChIP-qPCR ou de retard sur gel pourront être utilisées ensuite pour valider l'effet de ce KD ou délétion sur la liaison de NUR77 sur ses gènes cibles. Cette approche ne pourrait être utilisée pour un KO de SUMO2 car l'expression de ce gène est indispensable pour la survie du développement embryonnaire de souris (Wang et al., 2014).

Par ailleurs, l'effet différentiel de PIASy observé pourrait également découler du recrutement différentiel de corégulateurs entre NUR77 WT et les mutants. Afin d'explorer cette hypothèse, une approche basée sur la technologie APEX2 développée dans l'étude décrite au chapitre 3 pourrait être utilisée. Des protéines de fusion des mutants de NUR77 fusionnée avec la peroxydase APEX2 pourraient être générées et les différents interactomes de NUR77 WT et des mutants pourraient être comparés après surexpression dans les HEK293. Néanmoins, cette approche serait laborieuse et nécessiterait de plus amples validations des partenaires potentiels identifiés par des co-IP et/ou de GST-pull down par la suite.

D'autres sites accepteurs de la SUMOylation et des motifs alternatifs de liaison de la SUMO, comme les sites SIM (Kaur et al., 2017) et/ou PDSM (Hietakangas, 2006) (voir **section 1.2.3.1**), pourraient également participer à l'effet répresseur induit par la surexpression de PIASy et seraient pertinents à caractériser dans la poursuite de ce projet. Des travaux suggèrent que le résidu K91 chez NURR1 se trouve dans un motif de contrôle synergique (G85-X4-IKVE) (Arredondo, 2013). Ce motif présente une séquence consensus de recrutement de la SUMO

(ψ KXD/E) flanquée de résidus proline ou glycine (Iniguez-Lluhi et Pearce, 2000) et restreint l'activation transcriptionnelle du facteur de transcription au niveau des sites de liaison d'un gène qui présente plus d'un élément de réponse pour ce facteur de transcription. L'homologue K102 de NUR77 pourrait également se trouver dans un motif similaire (P96-X4-FKFE) (Iniguez-Lluhi et Pearce, 2000). La proline 96 succède à la sérine 95, ciblée par la kinase JNK et l'isomérase Pin1 chez NUR77 (Chen, 2012; Liu, 2007). Par conséquent, la mutation de la lysine 102 pourrait interférer avec des processus de régulation dépendant de la phosphorylation. De manière inverse, la SUMOylation sur le site K102 pourrait être régulée par le niveau de phosphorylation sur le résidu S95, comme il a été observé pour d'autres motifs de contrôles synergiques (Hietakangas, 2006).

Afin d'évaluer la possibilité d'une action synergique entre la SUMOylation et la phosphorylation, nous avons examiné l'effet qui découle de la mutation de la sérine 95 en alanine et en acide aspartique (S95A et S95D respectivement), ce qui empêche la phosphorylation et mime une partie des charges négatives qui surviennent lors de la phosphorylation de manière respective, chez NUR77 WT et le mutant K102. Après la génération de ces mutants et la surexpression de ces protéines de fusion dans les cellules HEK293, l'activité transcriptionnelle des mutants NUR77-S95D et NUR77-K102R/S95D est significativement réduite sur l'élément de réponse en monomère NBRE en comparaison à celle des contrôles NUR77 et NUR77-K102R respectivement – et à l'inverse de celle des mutants NUR77-S95A et NUR77-K102R/S95A où aucun effet n'est observé ([Annexe 3](#)). L'évaluation des quantités de protéines en immunobuvardage a confirmé que leurs niveaux étaient similaires dans les différentes conditions, ce qui permet de s'assurer que les modifications de l'activité transcriptionnelle observée ne proviennent pas d'une modification de la quantité de protéines. Ces résultats préliminaires suggèrent que les mutations concomitantes du site potentiel de SUMOylation de la lysine 102 en arginine et du site potentiel de phosphorylation de la sérine 95 en alanine, ont un effet répressif qui semble coopératif sur l'activité transcriptionnelle de NUR77. Afin de documenter ce mécanisme, il faudrait confirmer que la lysine 102 est bien SUMOylée – pas la stratégie présentée en 4.1.a - et que la sérine 95 est phosphorylée. Pour cette dernière démonstration, l'évaluation de la phosphorylation par des expériences d'immunobuvardage après la surexpression de kinases, et plus spécifiquement de la kinase JNK (Wu et al., 2020) qui phosphoryle la sérine 95 de NUR77 dans les cellules HEK293 (Chen, 2012) (voir [section 1.2.2.2](#)), pourrait être réalisée en comparant les niveaux de phosphorylation lorsque la sérine 95 est intègre et lorsqu'elle est mutée en alanine – ce qui prévient la phosphorylation sur

ce site. Une fois ces MPTs et la nécessité de l'intégrité de ces sites dans ce contexte confirmés, il sera possible d'évaluer s'ils sont modulés par les mutations des sites K102 (en arginine) et S95 (en alanine et acide aspartique) de manière individuelle et combinée. Une action synergique de la SUMOylation et de la phosphorylation a déjà été observée dans la régulation de l'activité d'autres RN, tels que le récepteur de la progestérone et le récepteur de l'hormone thyroïdienne (Abdel-Hafiz, Dudevoir et Horwitz, 2009; Liu et Brent, 2018). Pour évaluer si une même coopération opère dans notre contexte d'étude, l'activité de NUR77 et de NUR77-K102R pourraient être évaluées à la suite du traitement des cellules par des inhibiteurs de la phosphorylation et plus spécifiquement de la kinase JNK (Chen, 2012; Wu et al., 2020). Si l'effet engendré par ces inhibiteurs est similaire à celui observé avec les mutants, ce serait une indication supplémentaire de l'implication de la phosphorylation dans ce processus. En parallèle, il serait nécessaire de vérifier les niveaux protéiques de NUR77 et de ces mutants, ainsi que l'effet des inhibiteurs sur ces niveaux.

4.1.2.2. Les outils utilisés

L'une des techniques couramment utilisées pour identifier l'effet d'une protéine et/ou d'une MPT sur l'activité des récepteurs nucléaires est de réduire l'expression du gène codant pour cette protéine et d'évaluer ensuite ses répercussions. Pour se faire, la méthode des petits ARN interférents (*small interfering RNA – siRNA*) pourrait être utilisée (Curtis et Nardulli, 2009). Néanmoins, pour déterminer l'effet de la SUMOylation sur l'activité d'un RN, il faudrait utiliser des siRNA dirigés contre chacune des protéines de SUMOylation (SUMO1, 2, 3), la suppression combinée des trois isoformes pouvant être difficile à réaliser (Gavrilov et Saltzman, 2012). Par ailleurs, la SUMOylation étant connue pour réguler l'homéostasie cellulaire, la suppression des gènes codant pour les protéines SUMO ou pour les SUMO E1 ou E2 ligases pourrait engendrer des effets majeurs sur la physiologie cellulaire (Enserink, 2015). Il serait donc difficile de déterminer si l'effet observé sur le RN résulte d'une conséquence directe ou indirecte de cette suppression.

Une autre stratégie serait d'utiliser des inhibiteurs chimiques qui empêchent la poursuite du cycle de SUMOylation (Cohen, 2009). Cependant, cette stratégie peut se révéler difficile à optimiser selon les inhibiteurs disponibles. L'inhibiteur de la SUMOylation 2-D08 (Sigma, #SML1052), qui empêche le transfert de la protéine SUMO de l'enzyme E2 au substrat (Kim, Keyser et Schneekloth, 2014), a été testé dans nos travaux pour évaluer son effet (10µM) sur

l'activité transcriptionnelle de NUR77 dans les essais rapporteurs. Son effet n'a néanmoins pas été concluant dans nos conditions expérimentales ([Annexe 4](#)) mais son efficacité à supprimer la SUMOylation n'a pas pu être démontrée car les résultats de notre contrôle positif NURR1 n'était pas concluant dans nos conditions expérimentales, comme mentionné précédemment. L'effet du composé synthétique ML-792, qui inhibe l'activité de l'enzyme E1 activatrice en se liant à la SUMO en C-terminal et qui a été testé dans différentes lignées cancéreuses à une concentration de 30nM (He, 2017), pourrait être exploré dans de futurs essais.

Comme différents outils bio-informatiques existent pour identifier les sites potentiels de SUMOylation (Da Silva-Ferrada, Lopitz-Otsoa, Lang, Rodriguez et Matthiesen, 2012), des délétions des régions contenant ces sites consensus de SUMOylation aurait également pu être menées (Ebert, 2009; Hug et al., 1996). Cependant, l'effet sur l'activité du RN observé pourrait alors résulter d'une modification de la conformation de la protéine, de délétions d'autres sites de MPTs, et/ou des modifications des régions d'interaction avec des corégulateurs (Cox, Platt et Zhang, 2015).

Pour pallier ces limites, la stratégie utilisée ici a été d'introduire des mutations individuelles des sites potentiels de SUMOylation qui ont le plus de probabilité d'être SUMOylés et d'évaluer l'effet de la mutation de ces sites potentiels de SUMOylation sur l'activité de NUR77 à travers le développement d'un essai rapporteur (Karimi, Goldie, Cruickshank, Moses et Abraham, 2009; Li, 2018; Li S, 2018). Ainsi, les conséquences de ces mutations sur l'activité transcriptionnelle de NUR77 ont pu être étudiées. En parallèle, l'expression en ARNm et les quantités de protéines, ainsi que la localisation cellulaire de NUR77 ont été évaluées. Malgré les techniques complémentaires utilisées pour caractériser l'activité de NUR77, des limites existent au niveau de l'interprétation des résultats. Tout d'abord, toutes ces évaluations ont été faites après surexpression de NUR77, ce qui peut engendrer une modification du contexte cellulaire (Prelich, 2012). Comme mentionné précédemment, une alternative intéressante à la surexpression aurait été de diminuer les niveaux protéiques en réalisant un KD de PIASy ou SUMO2 par siRNA. Ensuite, l'essai rapporteur utilisé pour évaluer l'activité transcriptionnelle de NUR77 ne permet pas de caractériser si l'effet observé résulte de l'action directe de la protéine surexprimée ou d'une action indirecte qui agirait sur d'autres voies de signalisation (Li, 2018; Li S, 2018). Dans chacune des expériences, des conditions avec l'élément de réponse seul et/ou avec les différentes protéines testées ont été réalisées afin de

s'assurer que l'effet observé était engendré par la surexpression des protéines. On a également vérifié que la surexpression des différentes protéines était efficace et qu'elle ne diminuait pas l'expression de NUR77.

4.1.3- Perspectives à long terme

Comme mentionné en introduction, aucun ligand endogène de NUR77 n'a été identifié à ce jour. Moduler NUR77 à travers ses régulateurs apparaît donc comme une alternative intéressante dans différentes pathologies, dont la maladie de Parkinson. Nos travaux ont mis en évidence que l'activité transcriptionnelle de NUR77 était réprimée par la SUMO E3 ligase PIAS γ et l'isoforme 2 de la SUMO. Même si des études ultérieures sont nécessaires afin d'évaluer les mécanismes sous-jacents à cet effet, cette découverte offre un moyen de moduler NUR77 et peut guider les efforts afin de le cibler au niveau physiologique. L'implication de NUR77 dans la maladie de Parkinson suggère que ce RN joue un rôle dans la perte des neurones dopaminergiques (Rouillard, 2018). Si ce lien est avéré, l'activation des protéines PIAS γ ou SUMO2 permettrait de réprimer l'activité de ce RN et de réduire la mort cellulaire dans cette maladie.

Aucune molécule permettant de stimuler la SUMO2 ou PIAS γ n'est actuellement disponible (Cox et Huber, 2019; Woo et Abe, 2010). Comme la SUMOylation régule un grand nombre de processus biologiques (Wilkinson et Henley, 2010; Woo et Abe, 2010; Yau, Molina et Courey, 2020) et que des modifications de son activité – augmentation ou diminution – peuvent causer le développement de différentes maladies ou cancers, perturber son fonctionnement pourrait avoir des conséquences négatives (Wilkinson, Nakamura et Henley, 2010). Néanmoins, l'utilisation d'inhibiteurs ou d'activateurs généraux de la SUMOylation a déjà été envisagée dans le cas où la mort de certaines cellules est reliée à un état d'hyper- ou d'hypo-SUMOylation (Cox et Huber, 2019). Cette stratégie thérapeutique reposerait sur un dosage spécifique, où l'activité de la SUMOylation des cellules normales serait inchangée, mais serait modifiée dans les cellules pathologiques. Dans le cas discuté ici, la SUMOylation pourrait être augmentée dans les cellules dopaminergiques pathologiques en délivrant directement un activateur de la machinerie de la SUMOylation (Cox et Huber, 2019). Bien entendu, de nombreux défis quant à la délivrance de molécules à travers la barrière-hématoencéphalique seraient à résoudre au préalable (Pardridge, 2012).

Cibler la SUMOylation afin de moduler des protéines impliquées dans la maladie de Parkinson est une stratégie ambitieuse, qui a déjà été suggérée dans d'autres travaux (Princz et Tavernarakis, 2020; Verma, 2020; Yau et al., 2020). La protéine α -synucléine, dont les mutations sont associées aux formes familiales de la maladie de Parkinson, est également modifiée par les SUMO1 et 2. Cette protéine présynaptique est retrouvée sous forme non repliée dans le cytoplasme ou liée aux vésicules synaptiques en condition normale, tandis qu'elle forme des oligomères qui peuvent s'agglomérer en condition pathologique (Verma, 2020). L'addition de la SUMO2 à l' α -synucléine sur les lysines 96 et 102 augmente la solubilité de la protéine, alors que celle de la SUMO1 favorise la formation d'oligomères. Ces observations soutiennent le fait que l'on ne trouve que de la SUMO1 et non la SUMO2 dans les corps de Lewy (Rott, 2017), qui correspondent à l'agglomération de la protéine α -synucléine, et que l'effet de la SUMOylation diffère selon l'isoforme étudié et les conditions de stress (Celen et Sahin, 2020; Enserink, 2015).

De manière plus globale, la stratégie consistant à cibler les MPT s'est déjà avérée fructueuse pour d'autres pathologies comme le cancer (Deng, Meng, Chen, Wei et Wang, 2020). Différentes molécules existent en effet, validées en clinique ou étudiées en études pré-cliniques, pour cibler l'ubiquitination et la voie ubiquitine-protéasome, dont la suractivation ou la sous-activation peut induire le développement de maladies (Wertz et Wang, 2019). Ces molécules visent les E3 ligase, les dé-ubiquitinases ou le protéasome. La stratégie novatrice PROTAC (*Proteolysis Targeting Chimeric Molecule*), basée sur une molécule chimérique qui sert de pont entre une E3 Ubiquitine ligase et une protéine cible afin que celle-ci soit ubiquitinée et ensuite dégradée par le protéasome, offre l'opportunité de cibler des acteurs cruciaux dans le cancer (Wang, Jiang, Feng, Liu et Sun, 2020). Ce procédé a par ailleurs été suggéré comme une stratégie pour inhiber des protéines complexes à cibler comme les facteurs de transcription (Gu, Cui, Chen, Xiong et Zhao, 2018). Une approche similaire pourrait être utilisée pour cibler une protéine à travers la SUMOylation, en utilisant une molécule chimérique qui recruterait une SUMO E3 ligase ou une SENP (Ovaa et Vertegaal, 2018). Cette technologie permettrait de moduler l'activité de la protéine cible à travers les fonctions de la SUMOylation – à savoir la stabilité, la localisation cellulaire ou encore les interactions protéines-protéines (Celen et Sahin, 2020). Les différents isoformes de SUMO et leurs effets distincts constituent une limite qui pourrait être résolue si les E3 SUMO ligases ou les SENPs utilisées présentent des spécificités pour ces isoformes. À cet effet, la SENP2 hydrolyse préférentiellement la SUMO2 tandis que la SENP1 hydrolyse la SUMO1 (Kunz, 2018). Une autre

stratégie chimérique où l'enzyme E2 (Ubc9) est directement liée à la protéine cible pour induire la SUMOylation existe également (Jakobs et al., 2007).

4.2 Une approche de marquage de proximité pour caractériser l'activité de NUR77

4.2.1- API5, un nouveau corégulateur de NUR77

Afin de mieux comprendre la modulation de l'activité de NUR77, nous avons opté pour la caractérisation de ses protéines d'interaction et de leur contribution à l'activité de NUR77. Nous avons développé et optimisé une approche basée sur la technologie APEX2 pour identifier les protéines situées à proximité de NUR77 dans des cellules vivantes HEK293. Cette lignée cellulaire, qui n'est pas représentative de la pathophysiologie du cancer du sein qui nous intéresse, permet néanmoins une optimisation facile et rapide de l'essai APEX2. Comme détaillé en introduction dans la [section 1.6.1.](#), cette lignée cellulaire permet une grande production de protéines recombinantes et représente un modèle intéressant pour identifier des partenaires potentiels et les valider par la suite dans des modèles cellulaires pertinents au niveau physiologique.

L'analyse bio-informatique des jeux de données générés a permis d'identifier 336 protéines enrichies de manière significative ($FC \geq 2$ and *adjusted p-value* ≤ 0.05) dans la condition expérimentale (APEX2-NUR77-T2A-ametrine), parmi lesquelles la protéine API5 (*Apoptosis Inhibitor 5*). Nos travaux ont permis de valider que les protéines NUR77 et API5 pouvaient être extraites du même complexe protéique par co-immunoprécipitation et nous avons démontré leur colocalisation dans le noyau par microscopie confocale dans les lignées cellulaires HEK293 et MCF-7 (ER+ BC). La protéine TP53BP1 (*Tumor Protein P53 Binding Protein 1*) est un interacteur de API5 selon la base de données BioGrid (Stark et al., 2006). Cette protéine a été enrichie de manière significative dans la condition expérimentale APEX-NUR77-T2A-ametrine en comparaison aux contrôles et mentionnée dans la discussion dans la [section 3.8](#). Ceci renforce la possibilité d'un complexe protéique entre API5 et NUR77 et suggère que TP53BP1 pourrait appartenir à ce complexe.

Le KD de *API5* par siRNA a conduit à une augmentation des niveaux de protéines de *NUR77*, ce qui a été potentialisé par la privation de sérum dans les cellules MCF-7. Ce KD a également été associé à une diminution de la survie des cellules en privation de sérum. En parallèle, une augmentation de l'activité transcriptionnelle de *NUR77* sur ses éléments de réponse monomérique et homodimérique dans la lignée cellulaire HEK293 a été observée. Enfin, l'inhibition du protéasome par le traitement de MG132 révèle une stabilisation de *NUR77*, et la forte réduction de l'induction de *NUR77* par la suppression d'*API5* en présence de cet inhibiteur suggère que l'interaction *NUR77-API5* pourrait moduler la stabilité de *NUR77*. Ces résultats indiquent que *API5* agit comme un répresseur de *NUR77* à la fois sur ses niveaux protéiques et sur son activité, les deux étant possiblement liés. En effet, les niveaux d'expression des RN ou leur stabilité protéique sont souvent reliés à l'induction de leur dégradation (Alarid, 2006; Dennis, Haq et Nawaz, 2001).

Ces découvertes sont intéressantes à mettre en parallèle avec les associations entre l'expression de *API5* et de *NUR77* et les pronostics du cancer du sein (Gyorffy et al., 2010). En effet, *NUR77* est considéré comme un marqueur de bon pronostic dans le cancer du sein tandis que *API5* est un marqueur de mauvais pronostic selon les données de KM plotter. De plus, l'expression de *API5* est positivement corrélée avec la variation du nombre de copies dans le BC, ce qui suggère que l'amplification génétique d'*API5* pourrait moduler la survie dans le BC, possiblement en partie à travers une régulation des fonctions de *NUR77*. Une étude ayant évalué les niveaux protéiques de *API5* par marquage à la peroxydase révèle que ses niveaux sont significativement augmentés dans les cellules endothéliales provenant de biopsies de patientes BC ER- qui ne répondent pas aux traitements de chimiothérapie (Bousquet, 2019). Cette observation est compatible avec l'association négative entre *API5* et la survie des patientes présentée dans nos travaux, bien qu'il s'agisse ici de l'expression dans les cellules endothéliales et non tumorales. Ces travaux, décrits en introduction dans la [section 1.5.3](#), combinés aux nôtres, soulignent l'intérêt de cibler *API5* dans les mécanismes associés à l'apoptose dans le cancer. Ils renforcent la conviction qu'il est nécessaire de caractériser l'interaction entre ce facteur nucléaire et *NUR77* afin de mieux comprendre les mécanismes reliés à l'apoptose dans le cancer du sein.

Une autre construction expérimentale a été utilisée en parallèle, avec APEX2 située en C-terminale mais le nombre de protéines significativement enrichies était considérablement diminué

lorsqu'elle était intégrée dans les analyses. Comme l'activité transcriptionnelle de NUR77 et l'activité enzymatique de APEX2 étaient également diminuées après surexpression de cette protéine de fusion ([Annexe 8](#)), une explication serait que cette protéine de fusion est moins active. Par ailleurs, une autre analyse a été effectuée en parallèle en analysant les comptes de peptides pour identifier l'interactome de NUR77, aboutissant à une cartographie différente. Ces résultats sont davantage décrits dans la partie 2 des annexes ([Approche APEX2, Données supplémentaires](#)).

4.2.2- Limites de l'étude et perspectives à moyen terme

4.2.2.1 L'implication de l'interaction entre NUR77 et API5 dans la mort cellulaire

D'après nos travaux, l'interaction entre NUR77 et API5 pourrait jouer un rôle important dans la régulation de l'apoptose dans la lignée cellulaire du cancer du sein ER+ MCF-7. Toutefois, de nombreuses interrogations quant aux mécanismes et à la physiologie sous-jacents demeurent à l'heure actuelle. S'il est clairement établi que les niveaux protéiques de NUR77 sont augmentés dans les cellules MCF-7 à la suite de la diminution de l'expression de API5, il n'a pas été démontré que cette expression est reliée aux mécanismes apoptotiques. Ceci est suggéré par l'implication connue de NUR77 dans les mécanismes associés à ce processus (Kim et al., 2003; Pawlak, Strzadala et Kalas, 2015). Afin de démontrer cette implication, il faudrait évaluer la prolifération/survie cellulaire après la diminution des niveaux en ARNm de *NUR77* par l'utilisation d'un siRNA spécifique, ainsi qu'évaluer les niveaux protéiques de API5 et de la protéine PARP-1 clivée, marqueur d'apoptose, en conditions normales et en déprivation de sérum. Des essais préliminaires de quantification des niveaux protéiques de PARP-1 clivés ont été évalués en deux répliques biologiques. La quantité de PARP-1 clivée ne semble pas différer après le KD de *API5* ([Annexe 5](#)). Néanmoins, un troisième réplica permettrait de valider cette observation. Aussi, il est possible que cette observation résulte d'un problème technique (problème de transfert, de la diffusion homogène de la solution contenant l'anticorps PARP sur la nuit, etc).

Des essais préliminaires d'optimisation des conditions de surexpression d'un siRNA dirigé contre *NUR77* (Dharmacon, #J-003426-08-0050) dans les cellules MCF-7 ont été initiés durant cette thèse. Pour s'assurer que les siRNA sont valides et ciblent le gène désiré, il est préférable de comparer le KD à la suite du traitement des cellules par deux siRNA dirigés contre le même gène,

mais ciblant des séquences distinctes (Jackson et Linsley, 2010). Un siRNA dirigé contre *API5* commercialisé par Sigma (#NM_006595) a été évalué en parallèle du siRNA utilisé dans le chapitre 3 commercialisé par Thermofisher afin de confirmer les résultats, mais aucune diminution des niveaux protéiques de *API5* n'a été observée en immunobuvardage. Les transfections ayant été réalisées en parallèle, il est peu probable que le problème provienne d'un problème technique à ce niveau. Le siRNA a été commandé en deux fois et l'hypothèse d'une déficience du lot a également été écartée. L'explication la plus pertinente serait donc que ce siRNA ne fonctionne pas et que pour la suite du projet, d'autres siRNA commercialisés par d'autres compagnies pourraient être testés afin de s'assurer de la validité des résultats.

En parallèle, une approche intéressante serait d'évaluer les gènes cibles de *NUR77* qui pourraient être modulés par *API5*, afin de confirmer que ce sont des gènes dont les produits sont impliqués dans la régulation de l'apoptose. Une première étape serait de faire un séquençage de l'ARN (*RNA-seq*) afin d'identifier les gènes cibles de *NUR77* et ceux qui sont également modulés par *API5* à l'aide des siRNA dirigés respectivement contre ces gènes. Ensuite, la technique de *Chromatin Immunoprecipitation quantitative real-time PCR* (ChIP-qPCR) permettrait de confirmer que ces gènes sont bien directement modulés par *NUR77* et *API5*. Par la même occasion, cette stratégie offrirait une meilleure compréhension du rôle de *API5* dans le noyau, qui reste peu caractérisé à ce jour.

Une autre stratégie pour caractériser l'interaction entre *NUR77* et *API5* serait d'identifier la région d'interaction entre *API5* et *NUR77*. *API5* possède une séquence LXXLL, motif de prédilection de liaison des corégulateurs avec les récepteurs nucléaires décrit dans la [section 1.1.2](#) (Savkur et Burris, 2004), qui est notamment impliquée dans son interaction avec $ER\alpha$ (Basset, 2017). La protéine TRAF2 (*Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*), protéine d'échafaudage et E3 ubiquitine ligase impliquée dans la signalisation inflammatoire, interagit avec *NUR77* par ce même motif (Hu, 2017). Il est donc pertinent de s'interroger si cette séquence est impliquée dans l'interaction avec *NUR77*. Une approche évidente serait de muter le motif LXXLL en LXXAA et d'évaluer s'il est toujours possible d'extraire les protéines du même complexe par des essais d'immunoprécipitation. En parallèle, comme la protéine *API5* a été enrichie dans la condition expérimentale APEX2-*NUR77*-T2A-ametrine (fusion en N-terminale) basée sur l'intensité de peptides, mais pas dans la condition *NUR77*-APEX2-T2A-ametrine (fusion en C-

terminale) (données supplémentaires dans [la partie 2 des annexes](#)), il est légitime de se questionner si l'ajout de la protéine de fusion en C-terminale pourrait interférer avec sa capacité à interagir avec API5. Une mutagenèse de délétion de NUR77, où les différentes régions de NUR77 seraient tronquées, serait une stratégie envisageable afin d'identifier la régions d'interaction de NUR77 avec API5. La même approche peut être utilisée avec API5 afin d'identifier la région d'interaction de cette protéine avec NUR77.

Comme souligné en introduction dans la [section 1.1.6.3](#), les membres de la famille NR4A possèdent une redondance fonctionnelle, notamment dans la régulation de l'apoptose (Campos-Melo et al., 2013). Par ailleurs, NUR77 partage des partenaires d'interaction communs avec NURR1 tels que NF- κ B, P53 et RXR α et avec NOR-1 comme BCL-2, CPB/P300 et TRIM28 tel qu'il a été revu dans (Kurakula et al., 2014). Il serait donc pertinent d'évaluer si API5 interagirait également avec les autres membres des NR4As et quels seraient les mécanismes sous-jacents à ces interactions.

4.2.2.2. Identification d'autres interacteurs de NUR77

Une étude récente évaluant l'interactome de NUR77 dans les cellules MCF-7 à l'aide d'une immunoprécipitation suivie d'une spectrométrie de masse confirme certains des interacteurs identifiés dans notre essai, comme HDAC1 et SMARCA4 (Yang PB, 2020). Comme NUR77 et RXR α peuvent interagir à travers leur DBDs en l'absence du ligand de RXR α , le *9-cis-retinoic acid* (9-cis-RA) (Perlmann et Wallen-Mackenzie, 2004), et que les niveaux protéiques de RXR α sont détectés dans les cellules HEK293 (Fadel et al., 2020), il aurait été attendu d'identifier RXR α dans notre cartographie. Néanmoins, cette protéine n'a pas été enrichie à la suite de nos analyses, ce qui pourrait être expliqué par la surexpression de NUR77 qui favoriserait la formation d'homodimères et non d'hétérodimères (Rastinejad, Huang, Chandra et Khorasanizadeh, 2013).

Bien que la protéine PIAS γ , qui interagit avec l'homologue de NUR77 (NURR1) dans les cellules HEK293 (Galleguillos, 2004), n'ait pas été identifiée à l'issue de nos analyses, la protéine SUMO E3 Ligase RBP2 (RanBP2) a été enrichie de manière significative ($\log_2(\text{FC})=3,63$; $-\log_{10}(\text{adjusted p-value}) = 3,15$) dans la quantification basée sur le comptage spectral ([Annexes 10 et 11](#)). Il serait donc pertinent d'évaluer si cette E3 ligase influencerait l'activité transcriptionnelle

de NUR77 et des mutants générés dans le chapitre 2 et plus généralement, la SUMOylation de ce RN.

La caractérisation de l'interactome de NUR77 à partir de cette quantification et de la quantification par compte de peptide ([Partie 2 de l'annexe](#)) a mis en lumière la protéine BCLAF1 (*BCL-2 Associated Transcription Factor 1*) comme potentiel interacteur de NUR77. Comme NUR77 interagit avec BCL-2 et d'autres protéines associées à BCL-2 qui sont des protéines impliquées dans la mort cellulaire (Lin, 2004; Luciano F, 2007; Shao, 2016), il est légitime de s'interroger si BCLAF1 appartiendrait à un complexe d'interaction avec BCL-2 et serait impliqué dans ce phénomène. Des essais préliminaires afin de valider l'interaction entre NUR77 et BCLAF1 ont été menés lors de cette thèse mais ils n'ont pas été concluants, principalement en raison du manque de spécificité de l'anticorps utilisé pour reconnaître la protéine BCLAF1 (Sigma, #HPA006484) en analyse Western. Pour la poursuite de ce projet, il serait pertinent d'optimiser les conditions expérimentales et de confirmer l'interaction entre NUR77 et BCLAF1. Si des anticorps dirigés contre BCLAF1 ne permettent pas d'évaluer l'interaction endogène entre NUR77 et BCLAF1, il pourrait être envisagé de générer une protéine de fusion avec BCLAF1 et une petite étiquette (comme FLAG ou HA), afin d'utiliser les anticorps spécifiques dirigés contre cette petite étiquette.

Quelle que soit l'approche utilisée, l'identification d'un interacteur potentiel par spectrométrie de masse requiert une confirmation par des techniques complémentaires permettant de valider ce partenaire d'interaction (Sable et al., 2018; ten Have et al., 2011).

4.2.2.3. Validation des interacteurs

L'une des techniques couramment utilisée pour évaluer la présence de deux protéines dans un même complexe est la co-immunoprécipitation, réalisée à partir d'un extrait cellulaire entier où les protéines sont présentes sous leur forme native (Rao et al., 2014). D'un point de vue technique, la spécificité et l'affinité des anticorps sont des critères essentiels à optimiser lors de l'utilisation de cette technique (ten Have et al., 2011). Dans notre étude, les anticorps ont été validés en comparant les résultats de Western blot des complexes protéiques immunoprécipités avec les anticorps d'intérêts ou avec des anticorps contrôles IgG. Différents anticorps de NUR77 et de API5

de différentes compagnies ont été testés pour sélectionner celui qui permettait de détecter optimalement ces protéines.

Lors de l'immunoprécipitation, l'extraction de protéine issus d'un même complexe est évaluée à la suite d'une lyse cellulaire, ce qui peut influencer les interaction mesurées au sein du complexe. Cette technique nécessite de collecter un ensemble de protéines, ce qui ne permet pas de différencier les partenaires protéiques intermédiaires des partenaires directs d'une protéine donnée. La validation de l'extraction de NUR77 et API5 du même complexe protéique par cette technique seule ne permet pas de s'assurer qu'il s'agisse d'une interaction directe. De plus, la lyse cellulaire pourrait permettre à des protéines localisées dans des compartiments cellulaires différents d'interagir de façon artificielle. Après avoir confirmé que API5 et NUR77 pouvaient être extraits du même complexe par co-immunoprécipitation, les essais de co-immunofluorescence indirecte ont révélé que API5 et NUR77 co-localisent dans le noyau, ce qui indique que leur interaction est possible dans ce compartiment. Pour soutenir l'interaction potentielle entre API5 et NUR77, d'autres approches peuvent être utilisées telles que les techniques de double-hybride et de GST pull-down décrites dans la [section 1.3.2](#) ou encore des approches basées sur la *Protein Fragment Complementation* (PCA), où les protéines d'intérêt sont fusionnées à une partie complémentaire d'une protéine rapporteur sélectionnée (Michnick, Ear, Landry, Malleshaiah et Messier, 2011; Stynen, Tournu, Tavernier et Van Dijck, 2012). L'utilisation de la technologie Résonance Plasmon de Surface (SPR), basée sur l'optique, a été utilisée pour caractériser l'interaction directe entre le RN orphelin ERR α et la calmoduline, et pourrait également être envisagée ici (Hentschke, Schulze, Susens et Borgmeyer, 2003).

4.2.3- Perspectives à long terme

API5 est connu pour ses fonctions de régulation de la mort cellulaire dans différents types de cancers, dont le cancer du sein (Basset, 2017; Bousquet, 2019; Cho, 2014). Si nos expériences confirment que l'interaction protéique entre NUR77 et API5 est importante pour réprimer l'activité pro-apoptotique de NUR77, cela représenterait le premier pas vers une potentielle modulation de l'activité de NUR77 dans la mort cellulaire à plus long terme. Une modulation de cette interaction par des petites molécules pourrait constituer une opportunité thérapeutique pour induire la mort cellulaire ou sensibiliser les cellules aux traitements de chimiothérapie (Makin et Hickman, 2000;

Matsuno, Hyodo, Fujimori, Shimizu et Yoshioka, 2018). Afin de développer des drogues efficaces contre cette interaction, différentes étapes seraient à poursuivre (Fry, 2015; Goncarenco, Li, Simonetti, Shoemaker et Panchenko, 2017; Mabonga et Kappo, 2019). La première est d'identifier la région impliquée dans l'interaction entre NUR77 et API5 au niveau moléculaire. En combinant les structures tridimensionnelles de ces protéines déjà disponibles (Bong, 2020; Zhan YY, 2012) et des outils computationnels, la possibilité de cibler le site d'interaction par des petites molécules sera évaluée. À l'heure actuelle, notre laboratoire travaille à développer et optimiser des molécules modulant indirectement l'activité de NUR77 par l'intermédiaire de son partenaire d'hétérodimérisation, la protéine RXR (Perlmann et Jansson, 1995). Une fois ces molécules disponibles, des études seront menées pour évaluer leur effet sur la liaison entre API5 et NUR77. Si ces molécules interfèrent avec la liaison, empêchant ainsi API5 et NUR77 d'interagir, leur potentiel thérapeutique pourra être évalué dans les cellules MCF-7 du cancer du sein ER+. L'un des enjeux thérapeutiques dans le cancer du sein ER+ réside dans la résistance aux traitements, tels que souligné dans la **section [1.1.6.6.1](#)**. Il serait intéressant d'évaluer l'activité de API5 et NUR77 dans des cellules MCF-7 résistantes aux tamoxifène. Une étude montre notamment une augmentation de la dégradation de NUR77 dans des cellules MCF-7 résistantes aux tamoxifène et que l'administration d'un potentiel ligand synthétique de NUR77, le Z-ligustilide, restaurerait les niveaux protéiques de NUR77 et augmenterait les dommages à l'ADN – marqueurs de la mort cellulaire (Qi, 2017). Ces travaux corroborent notre hypothèse dans laquelle NUR77 serait un inducteur de la mort cellulaire dans les MCF-7 tandis que API5 inhiberait son activité. Il serait intéressant de caractériser la relation entre API5 et NUR77 dans un modèle de cellules MCF-7 résistantes au tamoxifène, générées par exposition chronique et croissante à ce traitement hormonal tel qu'il a été revu dans (Wang, Gun et Hong, 2019).

La stratégie reposant sur le ciblage d'une interaction protéine-protéine a déjà abouti au développement de molécules évaluées en clinique pour leur potentiel thérapeutique. En effet, des molécules ciblant l'interaction entre les protéines MDM2 et P53 ont présenté des résultats prometteurs dans les premières phases des essais cliniques (Khurana et Shafer, 2019). La surexpression de la protéine MDM2 est fréquente dans de nombreux cancers et elle empêche la fonction du suppresseur de tumeur P53 en interagissant avec cette protéine (Vassilev, 2004). À travers le criblage et l'identification de petites molécules qui inhibent l'activité de MDM2, des travaux ont ainsi mis en évidence des composés qui se lient à MDM2, au niveau de sa poche de

liaison à P53. Cette liaison permet l'activation de la voie de signalisation de P53 dans le cancer et conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et au déclenchement de l'apoptose. Différentes classes de molécules sont en cours d'évaluation en clinique et celles dont les travaux sont le plus avancés appartiennent à la classe des *Nutlins* (Andreeff, 2016; Khurana et Shafer, 2019).

Un schéma-bilan de cette thèse est proposé en **Figure 24**. En se basant sur l'hypothèse que NUR77 régule la mort cellulaire à travers la modulation de gènes cibles spécifiques dans le noyau et engendre l'apoptose par sa délocalisation à la mitochondrie où il active des voies de signalisation pro-apoptotiques, l'activité de NUR77 peut être modulée à travers la SUMOylation et son interaction avec API5 afin de réguler la survie et/ou la mort cellulaire.

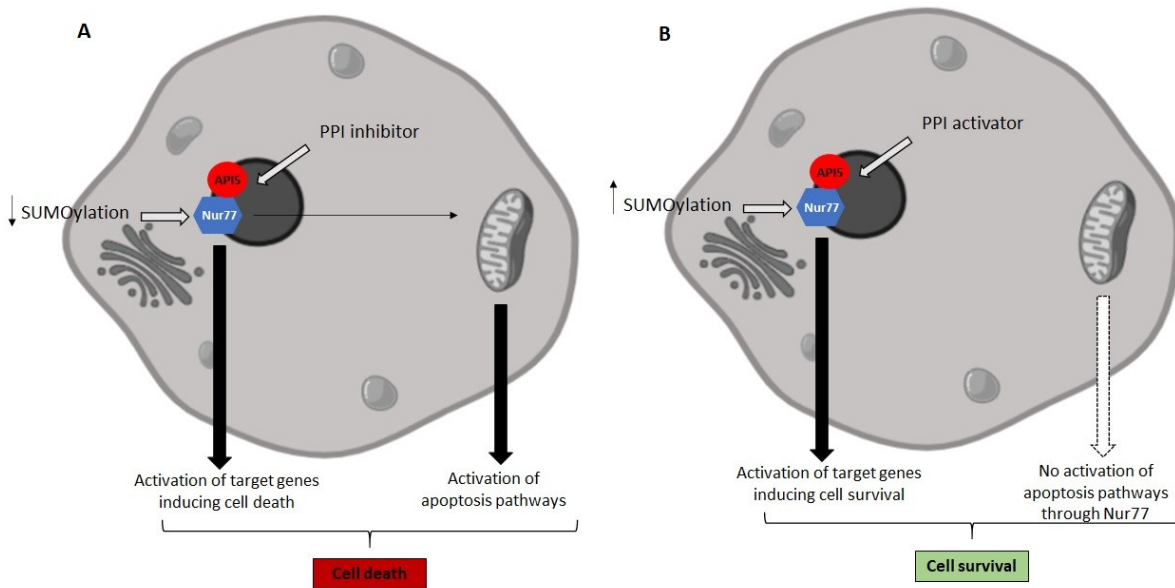


Figure 24 – Schéma résumé et hypothétique des modulations de la SUMOylation et de l'interaction entre API5 et NUR77 pour réguler la survie et la mort cellulaire

Le schéma-bilan de nos travaux proposé ici se base sur l'hypothèse que l'activité de NUR77 régule la mort cellulaire, à travers la modulation de gènes cibles spécifiques et engendre l'apoptose par sa délocalisation à la mitochondrie où il active des voies de signalisation pro-apoptotiques (PPI : Protein-Protein Interaction).

A) Une diminution de la SUMOylation chez NUR77 et/ou l'utilisation d'un inhibiteur de l'interaction entre API5 et NUR77 peut entraîner l'activation de gènes cibles impliqués dans la mort cellulaire ou la délocalisation de NUR77 à la mitochondrie, responsable de

l'activation des voies de signalisation apoptotiques. Ce scénario conduit à l'activation de NUR77 et à la mort cellulaire.

B) Une augmentation de la SUMOylation chez NUR77 et/ou un activateur de l'interaction entre API5 et NUR77 peut entraîner l'activation de gènes cibles impliqués dans la survie cellulaire ou empêcher la délocalisation de NUR77 à la mitochondrie, ce qui n'induit pas les voies de signalisation apoptotiques qu'il module. Cette voie conduit à l'inhibition de NUR77 et à la survie cellulaire.

Conclusion

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse nous ont permis de développer des outils moléculaires afin d'évaluer l'activité de NUR77 dans des modèles cellulaires et d'identifier des régulateurs cruciaux de l'activité de NUR77, permettant de mieux comprendre son mode d'action, à savoir les protéines PIASy, SUMO2 et API5. Cette étude suggère que cibler la SUMOylation et les interactions protéine-protéine de NUR77 pourraient constituer des approches thérapeutiques novatrices et intéressantes pour moduler la mort cellulaire médiée par ce RN dans différentes pathologies.

Références bibliographiques

- Aarnisalo, P., Kim, C. H., Lee, J. W. et Perlmann, T. (2002). Defining requirements for heterodimerization between the retinoid X receptor and the orphan nuclear receptor Nurr1. *J Biol Chem*, 277(38), 35118-35123. doi: 10.1074/jbc.M201707200
- Abdel-Hafiz, H., Dudevoir, M. L. et Horwitz, K. B. (2009). Mechanisms underlying the control of progesterone receptor transcriptional activity by SUMOylation. *J Biol Chem*, 284(14), 9099-9108. doi: 10.1074/jbc.M805226200
- Abraham, C., Potter, H. (1989). The protease inhibitor, alpha 1-antichymotrypsin, is a component of the brain amyloid deposits in normal aging and Alzheimer's disease. *Ann Med.*, 21(2), 77-81.
- Aggarwal, K., Choe, L. H. et Lee, K. H. (2006). Shotgun proteomics using the iTRAQ isobaric tags. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 5(2), 112-120. doi: 10.1093/bfgp/ell018
- Ahuja, D., Saenz-Robles, M. T. et Pipas, J. M. (2005). SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene*, 24(52), 7729-7745. doi: 10.1038/sj.onc.1209046
- Alarid, E. T. (2006). Lives and times of nuclear receptors. *Mol Endocrinol*, 20(9), 1972-1981. doi: 10.1210/me.2005-0481
- Albers, M., Kranz, H., Kober, I., Kaiser, C., Klink, M., Suckow, J., Kern, R., Koegl, M. (2005). Automated yeast two-hybrid screening for nuclear receptor-interacting proteins. *Mol Cell Proteomics*, 4(2), 205-213. doi: 10.1074/mcp.M400169-MCP200
- Alexopoulou, A. N., Leao, M., Caballero, O.L., Da Silva, L., Reid, L., Lakhani, S.R., Simpson, A.J., Marshall, J.F., Neville, A.M., Jat, PS. (2010). Dissecting the transcriptional networks underlying breast cancer: NR4A1 reduces the migration of normal and breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res.*, 12(4), R51.
- Almlof, T., Wallberg, A. E., Gustafsson, J. A. et Wright, A. P. (1998). Role of important hydrophobic amino acids in the interaction between the glucocorticoid receptor tau 1-core activation domain and target factors. *Biochemistry*, 37(26), 9586-9594. doi: 10.1021/bi973029x
- Anbalagan, M., Huderson, B., Murphy, L., Rowan, BG. (2012). Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nucl Recept Signal.*, 10:e001.
- Andreeff, M., Kelly, K. R., Yee, K., Assouline, S., Strair, R., Popplewell, L., Bowen, D., et al. (2016). Results of the Phase I Trial of RG7112, a Small-Molecule MDM2 Antagonist in Leukemia. *Clin Cancer Res*, 22(4), 868-876. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0481
- Aranda, A., Pascual, A. (2001). Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiol Rev.*, 81(3), 1269-1304.
- Armstrong, M. J. et Okun, M. S. (2020). Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA*, 323(6), 548-560. doi: 10.1001/jama.2019.22360
- Aronica, S. M. et Katzenellenbogen, B. S. (1993). Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Mol Endocrinol*, 7(6), 743-752. doi: 10.1210/mend.7.6.7689695
- Arredondo, C., Orellana, M., Vecchiola, A., Pereira, LA., Galdames, L., Andrés, ME. (2013). PIASy enhanced SUMO-2 modification of Nurr1 activation-function-1 domain limits Nurr1 transcriptional synergy. *PLoS One*, 8(1):e55035.
- Aslam, F., Shalhoub, V., van Wijnen, A. J., Banerjee, C., Bortell, R., Shakoori, A. R. et al. (1995). Contributions of distal and proximal promoter elements to glucocorticoid regulation of osteocalcin gene transcription. *Mol Endocrinol*, 9(6), 679-690. doi: 10.1210/mend.9.6.8592514
- Awan, A. et Esfahani, K. (2018). Endocrine therapy for breast cancer in the primary care setting. *Curr Oncol*, 25(4), 285-291. doi: 10.3747/co.25.4139

- Ayaydin, F., Dasso, M. (2004). Distinct in vivo dynamics of vertebrate SUMO paralogs. *Mol Biol Cell*, 15(12), 5208-5218.
- Baker, K., Shewchuk, L.M., Kozlova, L., Makishima, M., Hassell, A., Wisely, B., et al. (2003). The *Drosophila* orphan nuclear receptor DHR38 mediates an atypical ecdysteroid signaling pathway. *Cell*, 113(6), 731-742.
- Balasubramanian, S., Kota, S. K., Kuchroo, V. K., Humphreys, B. D. et Strom, T. B. (2012). TIM family proteins promote the lysosomal degradation of the nuclear receptor NUR77. *Sci Signal*, 5(254), ra90. doi: 10.1126/scisignal.2003200
- Bannister, A. J. et Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*, 21(3), 381-395. doi: 10.1038/cr.2011.22
- Bartel, C. A. et Jackson, M. W. (2017). HER2-positive breast cancer cells expressing elevated FAM83A are sensitive to FAM83A loss. *PLoS One*, 12(5), e0176778. doi: 10.1371/journal.pone.0176778
- Basset, C., Bonnet-Magnaval, F., Navarro, M. G., Touriol, C., Courtade, M., Prats, H., Garmy-Susini, B., Lacazette, E. (2017). Api5 a new cofactor of estrogen receptor alpha involved in breast cancer outcome. *Oncotarget*, 8(32), 52511-52526. doi: 10.18632/oncotarget.17281
- Batista, M., Martínez, L. (2013). Dynamics of Nuclear Receptor Helix-12 Switch of Transcription Activation by Modeling Time-Resolved Fluorescence Anisotropy Decays. *Biophys J*, 105(7), 1670-1680.
- Beard, J. A., Tenga, A. et Chen, T. (2015). The interplay of NR4A receptors and the oncogene-tumor suppressor networks in cancer. *Cell Signal*, 27(2), 257-266. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.11.009
- Beato, M. (1991). Transcriptional control by nuclear receptors. *FASEB J*, 5(7), 2044-2051. doi: 10.1096/fasebj.5.7.2010057
- Belakavadi, M. et Fondell, J. D. (2006). Role of the mediator complex in nuclear hormone receptor signaling. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 156, 23-43. doi: 10.1007/s10254-005-0002-0
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1993). Controlling the False Discovery Rate: of practical and powerful approach two multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B*, 57 (1), 289-300.
- Benoit, G., Malewicz, M. et Perlmann, T. (2004). Digging deep into the pockets of orphan nuclear receptors: insights from structural studies. *Trends Cell Biol*, 14(7), 369-376.
- Berggard, T., Linse, S. et James, P. (2007). Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics*, 7(16), 2833-2842. doi: 10.1002/pmic.200700131
- Bergink, S. et Jentsch, S. (2009). Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature*, 458(7237), 461-467. doi: 10.1038/nature07963
- Bernier-Villamor, V., Sampson, D.A., Matunis, M.J., Lima, C.D. (2002). Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell*, 108(3), 345-356.
- Bilodeau, S., Caron, V., Gagnon, J., Kuftedjian, A. et Tremblay, A. (2017). A CK2-RNF4 interplay coordinates non-canonical SUMOylation and degradation of nuclear receptor FXR. *J Mol Cell Biol*, 9(3), 195-208. doi: 10.1093/jmcb/mjx009
- Bilodeau, S., Vallette-Kasic, S., Gauthier, Y., et al. (2006a). Role of Brg1 and HDAC2 in GR trans-repression of the pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease. *Genes Dev*, 20(20), 2871-2886.
- Bilodeau, S., Vallette-Kasic, S., Gauthier, Y., Figarella-Branger, D., Brue, T., Berthelet, F., Lacroix, A., Batista, D., Stratakis, C., Hanson, J., Meij, B., Drouin, J. (2006b). Role of Brg1 and HDAC2 in GR trans-repression of the pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease. *Genes Dev*, 20(20), 2871-2886. doi: 10.1101/gad.1444606
- Bohren, K., Nadkarni, V., Song, J., Gabbay, K. et Owerbach, D. (2004). A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem*, 279(26), 27233-27238.
- Bondarenko, P. V., Chelius, D. et Shaler, T. A. (2002). Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 74(18), 4741-4749. doi: 10.1021/ac0256991

- Bong, S. M., Bae, S. H., Song, B., Gwak, H., Yang, S. W., Kim, S., Nam, S., Rajalingam, K., Oh, S. J., Kim, T. W., Park, S., Jang, H., Lee, B. I. (2020). Regulation of mRNA export through API5 and nuclear FGF2 interaction. *Nucleic Acids Res*, 48(11), 6340-6352. doi: 10.1093/nar/gkaa335
- Boudreaux, S. P., Ramirez-Herrick, A. M., Duren, R. P. et Conneely, O. M. (2012). Genome-wide profiling reveals transcriptional repression of MYC as a core component of NR4A tumor suppression in acute myeloid leukemia. *Oncogenesis*, 1, e19. doi: 10.1038/oncsis.2012.19
- Bousquet, G., Feugeas, J. P., Gu, Y., Leboeuf, C., Bouchtaoui, M. E., Lu, H., Espie, M., Janin, A., Benedetto, M. D. (2019). High expression of apoptosis protein (Api-5) in chemoresistant triple-negative breast cancers: an innovative target. *Oncotarget*, 10(61), 6577-6588. doi: 10.18632/oncotarget.27312
- Bouzas-Rodríguez, J., Zárraga-Granados, G., Sánchez-Carbente, MR., Rodríguez-Valentín, R., Gracida, X., Anell-Rendón, D., Covarrubias, L., Castro-Obregón, S. (2012). The nuclear receptor NR4A1 induces a form of cell death dependent on autophagy in mammalian cells. *PLoS One*, 7(10).
- Boylan, M., Athanassiou, M., Houle, B., Wang, Y., Zarbl, H. (1996). Activation of tumor suppressor genes in nontumorigenic revertants of the HeLa cervical carcinoma cell line. *Cell Growth Differ.*, 7(6), 725-735.
- Branon, T. C., Bosch, J. A., Sanchez, A. D., Udeshi, N. D., Svinkina, T., Carr, S. A., Feldman, J. L., Perrimon, N., Ting, A. Y. (2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat Biotechnol*, 36(9), 880-887. doi: 10.1038/nbt.4201
- Bras, A., Albar, J. P., Leonardo, E., de Buitrago, G. G. et Martinez, A. C. (2000). Ceramide-induced cell death is independent of the Fas/Fas ligand pathway and is prevented by Nur77 overexpression in A20 B cells. *Cell Death Differ*, 7(3), 262-271. doi: 10.1038/sj.cdd.4400653
- Bray F, F. J., Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.*, 68(6), 394-424.
- Brenner, D. R., Weir, H. K., Demers, A. A., Ellison, L. F., Louzado, C., Shaw, A. et al. (2020). Projected estimates of cancer in Canada in 2020. *CMAJ*, 192(9), E199-E205. doi: 10.1503/cmaj.191292
- Bruckner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D. et Schlattner, U. (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int J Mol Sci*, 10(6), 2763-2788. doi: 10.3390/ijms10062763
- Burris, T. P., Solt, L.A., Wang, Y., Crumbley, C., Banerjee, S., Griffett, K., Lundasen, T., Hughes, T., and Kojetin, D.J. (2013). Nuclear Receptors and Their Selective Pharmacologic Modulators. *Pharmacological Reviews*, 65 (2), 710-778.
- Calkin, A. C. et Tontonoz, P. (2012). Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(4), 213-224. doi: 10.1038/nrm3312
- Campos-Melo, D., Galleguillos, D., Sanchez, N., Gysling, K. et Andres, M. E. (2013). Nur transcription factors in stress and addiction. *Front Mol Neurosci*, 6, 44. doi: 10.3389/fnmol.2013.00044
- Cao, S. S. et Lu, C. T. (2016). Recent perspectives of breast cancer prognosis and predictive factors. *Oncol Lett*, 12(5), 3674-3678. doi: 10.3892/ol.2016.5149
- Carrero, G., McDonald, D., Crawford, E., de Vries, G. et Hendzel, M. J. (2003). Using FRAP and mathematical modeling to determine the in vivo kinetics of nuclear proteins. *Methods*, 29(1), 14-28. doi: 10.1016/s1046-2023(02)00288-8
- Castro-Obregón, S., Del Rio, G., Chen, SF., et al. (2002). A ligand-receptor pair that triggers a non-apoptotic form of programmed cell death. *Cell Death Differ.*, 9(8), 807-817.
- Celen, A. B. et Sahin, U. (2020). Sumoylation on its 25th anniversary: mechanisms, pathology, and emerging concepts. *FEBS J*, 287(15), 3110-3140. doi: 10.1111/febs.15319
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., Schultz, N. (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*, 2(5), 401-404. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095
- Chang, C., Norris, J. D., Gron, H., Paige, L. A. Hamilton, P. T., Kenan, D. J., Fowlkes, D., McDonnell, D. P. (1999). Dissection of the LXXLL nuclear receptor-coactivator interaction motif using

- combinatorial peptide libraries: discovery of peptide antagonists of estrogen receptors alpha and beta. *Mol Cell Biol*, 19(12), 8226-8239. doi: 10.1128/mcb.19.12.8226
- Chao, L., Zhang, Z., Pei, L., Saito, T., Tontonoz, P., Pilch, PF. (2007a). Nur77 coordinately regulates expression of genes linked to glucose metabolism in skeletal muscle. *Mol Endocrinol.*, 21(9), 2152-2163.
- Chao, L., Zhang, Z., Pei, L., Saito, T., Tontonoz, P., Pilch, PF. . (2007b). Nur77 coordinately regulates expression of genes linked to glucose metabolism in skeletal muscle. *Mol Endocrinol.*, 21(9), 2152-2163.
- Chavez, K. J., Garimella, S. V. et Lipkowitz, S. (2010). Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis*, 32(1-2), 35-48. doi: 10.3233/BD-2010-0307
- Chelius, D. et Bondarenko, P. V. (2002). Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry. *J Proteome Res*, 1(4), 317-323. doi: 10.1021/pr025517j
- Chen, C., Perrimon, N. (2017). Proximity-dependent labeling methods for proteomic profiling in living cells. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.*, 6(4), 10.1002/wdev.1272.
- Chen, C. H. (2008). Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. *Anal Chim Acta*, 624(1), 16-36. doi: 10.1016/j.aca.2008.06.017
- Chen, H., Li, L., Wang, WJ., Du, XD., Wen, Q., He, JP., et al. (2012). Prolyl isomerase Pin1 stabilizes and activates orphan nuclear receptor TR3 to promote mitogenesis. *Oncogene.*, 31(23), 2876-2887.
- Chen, X., Xu, D., Li, X., Zhang, J., Xu, W., Hou, J., Zhang, W., Tang, J. (2019). Latest Overview of the Cyclin-Dependent Kinases 4/6 Inhibitors in Breast Cancer: The Past, the Present and the Future. *J Cancer*, 10(26), 6608-6617. doi: 10.7150/jca.33079
- Chen, Z. X. et Riggs, A. D. (2011). DNA methylation and demethylation in mammals. *J Biol Chem*, 286(21), 18347-18353. doi: 10.1074/jbc.R110.205286
- Cheng, H. S., Tan, W. R., Low, Z. S., Marvalim, C., Lee, J. Y. H. et Tan, N. S. (2019). Exploration and Development of PPAR Modulators in Health and Disease: An Update of Clinical Evidence. *Int J Mol Sci*, 20(20). doi: 10.3390/ijms20205055
- Cheng, J., Kang, X., Zhang, S. et Yeh, E. T. (2007). SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia. *Cell*, 131(3), 584-595. doi: 10.1016/j.cell.2007.08.045
- Chintharlapalli, S., Burghardt, R., Papineni, S., Ramaiah, S., Yoon, K. et Safe, S. (2005). Activation of Nur77 by selected 1,1-Bis(3'-indolyl)-1-(p-substituted phenyl)methanes induces apoptosis through nuclear pathways. *J Biol Chem*, 280(26), 24903-24914. doi: 10.1074/jbc.M500107200
- Chivers, C. E., Koner, A. L., Lowe, E. D. et Howarth, M. (2011). How the biotin-streptavidin interaction was made even stronger: investigation via crystallography and a chimaeric tetramer. *Biochem J*, 435(1), 55-63. doi: 10.1042/BJ20101593
- Cho, H., Chung, J. Y., Song, K. H., Noh, K. H., Kim, B. W., Chung, E. J., Ylaya, K., Kim, J. H., Kim, T. W., Hewitt, S. M., Kim, J. H. (2014). Apoptosis inhibitor-5 overexpression is associated with tumor progression and poor prognosis in patients with cervical cancer. *BMC Cancer*, 14, 545. doi: 10.1186/1471-2407-14-545
- Cho, S. D., Yoon, K., Chintharlapalli, S., Abdelrahim, M., Lei, P., Hamilton, S., Khan, S., Ramaiah, S. K., Safe, S. (2007). Nur77 agonists induce proapoptotic genes and responses in colon cancer cells through nuclear receptor-dependent and nuclear receptor-independent pathways. *Cancer Res*, 67(2), 674-683. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2907
- Choudhury, N. R., Heikel, G., Trubitsyna, M., Kubik, P., Nowak, J. S., Webb, S., Granneman, S., Spanos, C., Rappsilber, J., Castello, A., Michlewski, G. (2017). RNA-binding activity of TRIM25 is mediated by its PRY/SPRY domain and is required for ubiquitination. *BMC Biol*, 15(1), 105. doi: 10.1186/s12915-017-0444-9
- Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., et al. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *SCIENCE*, 278(5344), 1803-1805. doi: 10.1126/science.278.5344.1803

- Claessens, F., Gewirth, D.T. (2004). DNA recognition by nuclear receptors. *Essays Biochem.*, 40:59-72.
- Claessens, F., Verrijdt, G., Schoenmakers, E., Haelens, A., Peeters, B., Verhoeven, G., Rombauts, W. (2001). Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 76(1-5), 23-30.
- Cohen, P. (2009). Guidelines for the effective use of chemical inhibitors of protein function to understand their roles in cell regulation. *Biochem J*, 425(1), 53-54. doi: 10.1042/BJ20091428
- Comsa, S., Cimpean, A. M. et Raica, M. (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res*, 35(6), 3147-3154.
- Cong, L., Pakala, S. B., Ohshiro, K., Li, D. Q. et Kumar, R. (2011). SUMOylation and SUMO-interacting motif (SIM) of metastasis tumor antigen 1 (MTA1) synergistically regulate its transcriptional repressor function. *J Biol Chem*, 286(51), 43793-43808. doi: 10.1074/jbc.M111.267237
- Cox, D. B., Platt, R. J. et Zhang, F. (2015). Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*, 21(2), 121-131. doi: 10.1038/nm.3793
- Cox, O. F. et Huber, P. W. (2019). Developing Practical Therapeutic Strategies that Target Protein SUMOylation. *Curr Drug Targets*, 20(9), 960-969. doi: 10.2174/1389450119666181026151802
- Crawford, P., Sadovsky, Y., Woodson, K., Lee, S.L., Milbrandt, J. (1995). Adrenocortical function and regulation of the steroid 21-hydroxylase gene in NGFI-B-deficient mice. *Mol Cell Biol.*, 15(8), 4331-4336.
- Curtis, C. D. et Nardulli, A. M. (2009). Using RNA interference to study protein function. *Methods Mol Biol*, 505, 187-204. doi: 10.1007/978-1-60327-575-0_11
- Da Silva-Ferrada, E., Lopitz-Otsoa, F., Lang, V., Rodriguez, M. S. et Matthiesen, R. (2012). Strategies to Identify Recognition Signals and Targets of SUMOylation. *Biochem Res Int*, 2012, 875148. doi: 10.1155/2012/875148
- Dahlman-Wright, K., Baumann, H., McEwan, I. J., Almlöf, T., Wright, A. P., Gustafsson, J. A., et al. (1995). Structural characterization of a minimal functional transactivation domain from the human glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(5), 1699-1703. doi: 10.1073/pnas.92.5.1699
- Dai, A., Yan, G., He, Q., Jiang, Y., Zhang, Q., Fang, T. et al. (2012). Orphan nuclear receptor Nur77 regulates androgen receptor gene expression in mouse ovary. *PLoS One*, 7(6), e39950. doi: 10.1371/journal.pone.0039950
- Das, K. P., Freudenrich, T. M. et Mundy, W. R. (2004). Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. *Neurotoxicol Teratol*, 26(3), 397-406. doi: 10.1016/j.ntt.2004.02.006
- Das, P. M., Ramachandran, K., vanWert, J. et Singal, R. (2004). Chromatin immunoprecipitation assay. *Biotechniques*, 37(6), 961-969. doi: 10.2144/04376RV01
- Davey, J. S., Carmichael, R. E. et Craig, T. J. (2019). Protein SUMOylation regulates insulin secretion at multiple stages. *Sci Rep*, 9(1), 2895. doi: 10.1038/s41598-019-39681-6
- Davis, I., Lau, L.F. . (1994). Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurr-1 in the adrenal glands. *Mol Cell Biol.*, 14(5), 3469-3483.
- de Vera, I. M. S., Munoz-Tello, P., Zheng, J., Dharmarajan, V., Marciano, D. P., Matta-Camacho, E., et al. (2019). Defining a Canonical Ligand-Binding Pocket in the Orphan Nuclear Receptor Nurr1. *Structure*, 27(1), 66-77 e65. doi: 10.1016/j.str.2018.10.002
- Deng, J., Erdjument-Bromage, H. et Neubert, T. A. (2019). Quantitative Comparison of Proteomes Using SILAC. *Curr Protoc Protein Sci*, 95(1), e74. doi: 10.1002/cpps.74
- Deng, L., Meng, T., Chen, L., Wei, W. et Wang, P. (2020). The role of ubiquitination in tumorigenesis and targeted drug discovery. *Signal Transduct Target Ther*, 5(1), 11. doi: 10.1038/s41392-020-0107-0
- Dennis, A. P., Haq, R. U. et Nawaz, Z. (2001). Importance of the regulation of nuclear receptor degradation. *Front Biosci*, 6, D954-959. doi: 10.2741/dennis
- DeSouza, L. V. et Siu, K. W. (2013). Mass spectrometry-based quantification. *Clin Biochem*, 46(6), 421-431. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.10.025

- Desterro, J., Rodriguez, M., Kemp, G. et Hay, R. (1999). Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *J Biol Chem.*, 274(15), 10618-10624.
- Deutsch, A., Angerer, H., Fuchs, TE., Neumeister, P. (2012). The nuclear orphan receptors NR4A as therapeutic target in cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem.*, 12(9), 1001-1014.
- Dodat, F., Cotnoir-White, D., Dianati, E., Vallet, A., Mader, S. et Levesque, D. (2021). Complex regulation of orphan nuclear receptor Nur77 (Nr4a1) transcriptional activity by SUMO2 and PIASgamma. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 118908. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118908
- Dohmen, R. (2004). SUMO protein modification. *Biochim Biophys Acta.*, 1695(1-3), 113-131.
- Dowsett, A. R. a. M. (2004). Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocrine-Related Cancer*, 11, 643–658.
- Drouin, J., Maira, M. et Philips, A. (1998). Novel mechanism of action for Nur77 and antagonism by glucocorticoids: a convergent mechanism for CRH activation and glucocorticoid repression of POMC gene transcription. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 65(1-6), 59-63. doi: 10.1016/s0960-0760(97)00180-5
- Druker, J., Liberman, A. C., Antunica-Noguerol, M., Gerez, J., Paez-Pereda, M., Rein, T., Iniguez-Lluhi, J. A., Holsboer, F., Arzt, E. (2013). RSUME enhances glucocorticoid receptor SUMOylation and transcriptional activity. *Mol Cell Biol*, 33(11), 2116-2127. doi: 10.1128/MCB.01470-12
- Duren, R. P., Boudreaux, S. P. et Conneely, O. M. (2016). Genome Wide Mapping of NR4A Binding Reveals Cooperativity with ETS Factors to Promote Epigenetic Activation of Distal Enhancers in Acute Myeloid Leukemia Cells. *PLoS One*, 11(3), e0150450. doi: 10.1371/journal.pone.0150450
- Dustrude, E. T., Perez-Miller, S., Francois-Moutal, L., Moutal, A., Khanna, M. et Khanna, R. (2017). A single structurally conserved SUMOylation site in CRMP2 controls NaV1.7 function. *Channels (Austin)*, 11(4), 316-328. doi: 10.1080/19336950.2017.1299838
- Ebert, B. L. (2009). Deletion 5q in myelodysplastic syndrome: a paradigm for the study of hemizygous deletions in cancer. *Leukemia*, 23(7), 1252-1256. doi: 10.1038/leu.2009.53
- Emamzadeh, F. N. et Surguchov, A. (2018). Parkinson's Disease: Biomarkers, Treatment, and Risk Factors. *Front Neurosci*, 12, 612. doi: 10.3389/fnins.2018.00612
- Enserink, J. M. (2015). Sumo and the cellular stress response. *Cell Div*, 10, 4. doi: 10.1186/s13008-015-0010-1
- Evans, R. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *SCIENCE*, 13(240 (4854)), 889-895.
- Fadel, L., Reho, B., Volko, J., Bojesuk, D., Kolostyak, Z., Nagy, G., et al. (2020). Agonist binding directs dynamic competition among nuclear receptors for heterodimerization with retinoid X receptor. *J Biol Chem*, 295(29), 10045-10061. doi: 10.1074/jbc.RA119.011614
- Fan, W., Chang, J. et Fu, P. (2015). Endocrine therapy resistance in breast cancer: current status, possible mechanisms and overcoming strategies. *Future Med Chem*, 7(12), 1511-1519. doi: 10.4155/fmc.15.93
- Federici, M. M., Venkat, K., Bam, N., Patel, K., Dal Monte, P. R., Fernie, B., Hensley, P., Carr, S., Baldoni, J., Truneh, A., Erickson, J. (2003). Detection and consequences of recombinant protein isoforms: implications for biological potency. *Dev Biol (Basel)*, 113, 53-57; discussion 113-114.
- Fields, S. et Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340(6230), 245-246. doi: 10.1038/340245a0
- Finkbeiner, E., Haindl, M. et Muller, S. (2011). The SUMO system controls nucleolar partitioning of a novel mammalian ribosome biogenesis complex. *EMBO J*, 30(6), 1067-1078. doi: 10.1038/emboj.2011.33
- Flaig, R., Greschik, H., Peluso-Iltis, C. et Moras, D. (2005). Structural basis for the cell-specific activities of the NGFI-B and the Nurr1 ligand-binding domain. *J Biol Chem*, 280(19), 19250-19258. doi: 10.1074/jbc.M413175200
- Flaig, R., Greschik, H., Peluso-Iltis, C., Moras, D. (2005). Structural basis for the cell-specific activities of the NGFI-B and the Nurr1 ligand-binding domain. *J Biol Chem.*, 280(19), 19250-19258.

- Flotho, A. et Melchior, F. (2013). Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu Rev Biochem*, 82, 357-385. doi: 10.1146/annurev-biochem-061909-093311
- Fondell, J. D., Ge, H. et Roeder, R. G. (1996). Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(16), 8329-8333. doi: 10.1073/pnas.93.16.8329
- Ford, J., McEwan, I. J., Wright, A. P. et Gustafsson, J. A. (1997). Involvement of the transcription factor IID protein complex in gene activation by the N-terminal transactivation domain of the glucocorticoid receptor in vitro. *Mol Endocrinol*, 11(10), 1467-1475. doi: 10.1210/mend.11.10.9995
- Forman, B., Umesono, K., Chen, J., Evans, R.M. (1995). Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell*, 81(4), 541-550.
- Freedman, D. A., Petitti, D. B. et Robins, J. M. (2004). On the efficacy of screening for breast cancer. *Int J Epidemiol*, 33(1), 43-55. doi: 10.1093/ije/dyg275
- Fry, D. C. (2015). Targeting protein-protein interactions for drug discovery. *Methods Mol Biol*, 1278, 93-106. doi: 10.1007/978-1-4939-2425-7_6
- Fuller, P. (1991). The steroid receptor superfamily: mechanisms of diversity. *FASEB J*, 5(15), 3092-3099.
- Gagnon, J., Caron, V., Tremblay, A. (2019). SUN-014 Identification of a New SUMOylation Process Regulating Nuclear Receptor Nor-1 *Journal of the Endocrine Society*, 3(SUN-014).
- Galisson, F., Mahrouche, L., Courcelles, M., Bonneil, E., Meloche, S., Chelbi-Alix, M. K., et al. (2011). A novel proteomics approach to identify SUMOylated proteins and their modification sites in human cells. *Mol Cell Proteomics*, 10(2), M110 004796. doi: 10.1074/mcp.M110.004796
- Galleguillos, D., A. Vecchiola, J. A. Fuentealba, V. Ojeda, K. Alvarez, A. Gomez and M. E. Andres. (2004). PIASgamma Represses the Transcriptional Activation Induced by the Nuclear Receptor Nurr1. *J Biol Chem.* , 279(3), 2005-2011.
- Gao, C., Huang, W., Kanasaki, K. et Xu, Y. (2014). The role of ubiquitination and sumoylation in diabetic nephropathy. *Biomed Res Int*, 2014, 160692. doi: 10.1155/2014/160692
- Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C., Schultz, N. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*, 6(269), pl1. doi: 10.1126/scisignal.2004088
- Gao, W., Bohl, C.E., Dalton, J.T. (2005). Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem Rev.*, 105(9), 3352-3370.
- Gareau, J., Lima, C.D. . (2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 11(12), 861-871.
- Gavrilov, K. et Saltzman, W. M. (2012). Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *Yale J Biol Med*, 85(2), 187-200.
- Geiss-Friedlander, R. et Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(12), 947-956. doi: 10.1038/nrm2293
- Geiss-Friedlander, R., Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8(12), 947-956.
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., Laudet, V. (2006). Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacol Rev*, 58(4), 685-704.
- Giguere, V. (1999). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev*, 20(5), 689-725. doi: 10.1210/edrv.20.5.0378
- Giguère, V. (1999). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev.*, 20(5), 689-725. .
- Giguere, V., Hollenberg, S. M., Rosenfeld, M. G. et Evans, R. M. (1986). Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*, 46(5), 645-652. doi: 10.1016/0092-8674(86)90339-9
- Giguere, V., Ong, E. S., Segui, P. et Evans, R. M. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature*, 330(6149), 624-629. doi: 10.1038/330624a0
- Giguere, V., Yang, N., Segui, P. et Evans, R. M. (1988). Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature*, 331(6151), 91-94. doi: 10.1038/331091a0

- Gilbert, F., Morissette, M., St-Hilaire, M., Paquet, B., Rouillard, C., Di Paolo, T., et al. (2006). Nur77 gene knockout alters dopamine neuron biochemical activity and dopamine turnover. *Biol Psychiatry*, 60(6), 538-547. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.04.023
- Goncearenco, A., Li, M., Simonetti, F. L., Shoemaker, B. A. et Panchenko, A. R. (2017). Exploring Protein-Protein Interactions as Drug Targets for Anti-cancer Therapy with In Silico Workflows. *Methods Mol Biol*, 1647, 221-236. doi: 10.1007/978-1-4939-7201-2_15
- Goodson, M. L., Farboud, B. et Privalsky, M. L. (2007). An improved high throughput protein-protein interaction assay for nuclear hormone receptors. *Nucl Recept Signal*, 5, e002. doi: 10.1621/nrs.05002
- Gronemeyer, H. et Moras, D. (1995). How to finger DNA. . *Nature.*, 375(6528), 190-191.
- Gu, S., Cui, D., Chen, X., Xiong, X. et Zhao, Y. (2018). PROTACs: An Emerging Targeting Technique for Protein Degradation in Drug Discovery. *Bioessays*, 40(4), e1700247. doi: 10.1002/bies.201700247
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguere, V. et Cermakian, N. (2005). Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms*, 20(5), 391-403. doi: 10.1177/0748730405277232
- Guo, D., Li, M., Zhang, Y., Yang, P., Eckenrode, S., Hopkins, D., Zheng, W., Purohit, S., Podolsky, R. H., Muir, A., Wang, J., Dong, Z., Brusko, T., Atkinson, M., Pozzilli, P., Zeidler, A., Raffel, L. J., Jacob, C. O., Park, Y., Serrano-Rios, M., Larrad, M. T., Zhang, Z., Garchon, H. J., Bach, J. F., Rotter, J. I., She, J. X., Wang, C. Y. (2004). A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet*, 36(8), 837-841. doi: 10.1038/ng1391
- Gyorffy, B., Lanczky, A., Eklund, A. C., Denkert, C., Budczies, J., Li, Q., et al. (2010). An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat*, 123(3), 725-731. doi: 10.1007/s10549-009-0674-9
- Haelens, A., Tanner, T., Denayer, S., Callewaert, L. et Claessens, F. (2007). The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor. *Cancer Res.*, 67(9), 4514-4523.
- Hamers, A. A., Argmann, C., Moerland, P. D., Koenis, D. S., Marinkovic, G., Sokolovic, M., de Vos, A. F., de Vries, C. J., van Tiel, C. M. (2016). Nur77-deficiency in bone marrow-derived macrophages modulates inflammatory responses, extracellular matrix homeostasis, phagocytosis and tolerance. *BMC Genomics*, 17, 162. doi: 10.1186/s12864-016-2469-9
- Han, Y.-H., Cao, X., Lin, B., Lin, F., Kolluri, SK., Stebbins, J., Reed, JC., Dawson, MI., Zhang, XK. (2006). Regulation of Nur77 nuclear export by c-Jun N-terminal kinase and Akt. *Oncogene.*, 25(21), 2974-2986.
- Han, Y., Branon, T. C., Martell, J. D., Boassa, D., Shechner, D., Ellisman, M. H., et al. (2019). Directed Evolution of Split APEX2 Peroxidase. *ACS Chem Biol*, 14(4), 619-635. doi: 10.1021/acscchembio.8b00919
- Han, Z. J., Feng, Y. H., Gu, B. H., Li, Y. M. et Chen, H. (2018). The post-translational modification, SUMOylation, and cancer (Review). *Int J Oncol*, 52(4), 1081-1094. doi: 10.3892/ijo.2018.4280
- Hannoun, Z., Greenhough, S., Jaffray, E., Hay, R. T. et Hay, D. C. (2010). Post-translational modification by SUMO. *Toxicology*, 278(3), 288-293. doi: 10.1016/j.tox.2010.07.013
- Hanukoglu, I. (1992). Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 43(8), 779-804. doi: 10.1016/0960-0760(92)90307-5
- Haussler, M. (1986). Vitamin D receptors: nature and function. . *Annu Rev Nutr.*, 6, 527-562.
- Hay, R. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell.*, 18(1), 1-12.
- He, X., Riceberg, J., Soucy, T., Koenig, E., Minissale, J., Gallery, M., Bernard, H., Yang, X., Liao, H., Rabino, C., Shah, P., Xega, K., Yan, Z. H., Sintchak, M., Bradley, J., Xu, H., Duffey, M., England, D., Mizutani, H., Hu, Z., Guo, J., Chau, R., Dick, L. R., Brownell, J. E., Newcomb, J.,

- Langston, S., Lightcap, E. S., Bence, N., Pulukuri, S. M. (2017). Probing the roles of SUMOylation in cancer cell biology by using a selective SAE inhibitor. *Nat Chem Biol*, 13(11), 1164-1171. doi: 10.1038/nchembio.2463
- Hedrick, E., Lee, SO., Doddapaneni, R., Singh, M., Safe, S. (2015). Nuclear receptor 4A1 as a drug target for breast cancer chemotherapy. *Endocr Relat Cancer*, 22(5), 831-840.
- Hedrick, E., Lee, SO., Doddapaneni, R., Singh, M., Safe, S. (2016). NR4A1 Antagonists Inhibit β 1-Integrin-Dependent Breast Cancer Cell Migration. *Mol Cell Biol.*, 36(9), 1383-1394.
- Hedrick, E. et Safe, S. (2017). Transforming Growth Factor beta/NR4A1-Inducible Breast Cancer Cell Migration and Epithelial-to-Mesenchymal Transition Is p38alpha (Mitogen-Activated Protein Kinase 14) Dependent. *Mol Cell Biol*, 37(18). doi: 10.1128/MCB.00306-17
- Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S. et Parker, M. G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, 387(6634), 733-736. doi: 10.1038/42750
- Heideker, J., Perry, JJ., Boddy, MN. (2009). Genome stability roles of SUMO-targeted ubiquitin ligases. *DNA Repair (Amst)*. 8(4), 517-524.
- Henley, J. M., Craig, T. J. et Wilkinson, K. A. (2014). Neuronal SUMOylation: mechanisms, physiology, and roles in neuronal dysfunction. *Physiol Rev*, 94(4), 1249-1285. doi: 10.1152/physrev.00008.2014
- Henriksson, A., Almlöf, T., Ford, J., McEwan, I. J., Gustafsson, J. A. et Wright, A. P. (1997). Role of the Ada adaptor complex in gene activation by the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol*, 17(6), 3065-3073. doi: 10.1128/mcb.17.6.3065
- Hentschke, M., Schulze, C., Susens, U. et Borgmeyer, U. (2003). Characterization of calmodulin binding to the orphan nuclear receptor Errgamma. *Biol Chem*, 384(3), 473-482. doi: 10.1515/BC.2003.053
- Herring, J. A., Elison, W. S. et Tessem, J. S. (2019). Function of Nr4a Orphan Nuclear Receptors in Proliferation, Apoptosis and Fuel Utilization Across Tissues. *Cells*, 8(11). doi: 10.3390/cells8111373
- Hickey, C., Wilson, NR., Hochstrasser, M. (2012). Function and regulation of SUMO proteases. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 13(12), 755-766.
- Hietakangas, V., Anckar, J., Blomster, HA., Fujimoto, M., Palvimo, JJ., Nakai, A., Sistonen, L. (2006). PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(1), 45-50.
- Hilmi, K., N. Hussein, R. Mendoza-Sanchez, M. El-Ezzy, H. Ismail, Bail, M., Rozendaal, MJ., Bouvier, M., Thibault, P., Gleason, JL., Mader, S. (2012). Role of SUMOylation in full antiestrogenicity. *Mol Cell Biol.*, 32(19), 3823-3837.
- Hochstrasser, M. (2001). SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell*, 107(1), 5-8. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00519-0
- Hou, Z., Mao, J., Lu, Y., Li, L. (2018). rApoptin induces apoptosis in human breast cancer cells via phosphorylation of Nur77 and Akt. *Biochem Biophys Res Commun.*, 498(1), 221-227.
- Hsu, H. C., Zhou, T. et Mountz, J. D. (2004). Nur77 family of nuclear hormone receptors. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 3(4), 413-423. doi: 10.2174/1568010042634523
- Hu M, L. Q., Alitongbieke G, Chong S, Xu C, Xie L, Chen X, Zhang D, Zhou Y, Wang Z, Ye X, Cai L, Zhang F, Chen H, Jiang F, Fang H, Yang S, Liu J, Diaz-Meco MT, Su Y, Zhou H, Moscat J, Lin X, Zhang XK. (2017). Celastrol-Induced Nur77 Interaction with TRAF2 Alleviates Inflammation by Promoting Mitochondrial Ubiquitination and Autophagy. *Mol Cell.*, 66(1), 141-153.e146.
- Hu, M., Luo, Q., Alitongbieke, G., Chong, S., Xu, C., Xie, L., et al. (2017). Celastrol-Induced Nur77 Interaction with TRAF2 Alleviates Inflammation by Promoting Mitochondrial Ubiquitination and Autophagy. *Mol Cell*, 66(1), 141-153 e146. doi: 10.1016/j.molcel.2017.03.008
- Hua, G., Ganti, K. P. et Chambon, P. (2016). Glucocorticoid-induced tethered transrepression requires SUMOylation of GR and formation of a SUMO-SMRT/NCoR1-HDAC3 repressing complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(5), E635-643. doi: 10.1073/pnas.1522826113

- Huang, J. D., Schwyster, D. H., Shirokawa, J. M. et Courey, A. J. (1993). The interplay between multiple enhancer and silencer elements defines the pattern of decapentaplegic expression. *Genes Dev*, 7(4), 694-704. doi: 10.1101/gad.7.4.694
- Huang, P., Chandra, V., Rastinejad, F. (2010). Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. *Annu Rev Physiol.*, 72:247-72.
- Hug, B. A., Wesselschmidt, R. L., Fiering, S., Bender, M. A., Epner, E., Groudine, M., et al. (1996). Analysis of mice containing a targeted deletion of beta-globin locus control region 5' hypersensitive site 3. *Mol Cell Biol*, 16(6), 2906-2912. doi: 10.1128/mcb.16.6.2906
- Hung, V., Udeshi, N. D., Lam, S. S., Loh, K. H., Cox, K. J., Pedram, K., Carr, S. A., Ting, A. Y. (2016). Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2. *Nat Protoc*, 11(3), 456-475. doi: 10.1038/nprot.2016.018
- Hunter, T. (2007). The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell.*, 28(5), 730-738.
- Huss, J. M., Kopp, R. P. et Kelly, D. P. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha (PGC-1alpha) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor-alpha and -gamma. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1alpha. *J Biol Chem*, 277(43), 40265-40274. doi: 10.1074/jbc.M206324200
- Huttlin, E., Bruckner, R.J., Paulo, J.A., et al. (2017). Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature*, 545(7655), 505-509.
- Hwang, J. et Espenshade, P. J. (2016). Proximity-dependent biotin labelling in yeast using the engineered ascorbate peroxidase APEX2. *Biochem J*, 473(16), 2463-2469. doi: 10.1042/BCJ20160106
- Imre, G., Berthelet, J., Heering, J., Kehrlöesser, S., Melzer, I. M., Lee, B. I., Thiede, B., Dotsch, V., Rajalingam, K. (2017). Apoptosis inhibitor 5 is an endogenous inhibitor of caspase-2. *EMBO Rep*, 18(5), 733-744. doi: 10.15252/embr.201643744
- Imre, G., Heering, J., Takeda, A. N., Husmann, M., Thiede, B., zu Heringdorf, D. M., Green, D. R., van der Goot, F. G., Sinha, B., Dotsch, V., Rajalingam, K. (2012). Caspase-2 is an initiator caspase responsible for pore-forming toxin-mediated apoptosis. *EMBO J*, 31(11), 2615-2628. doi: 10.1038/emboj.2012.93
- Iniguez-Lluhi, J. A. et Pearce, D. (2000). A common motif within the negative regulatory regions of multiple factors inhibits their transcriptional synergy. *Mol Cell Biol*, 20(16), 6040-6050. doi: 10.1128/mcb.20.16.6040-6050.2000
- Issemann, I. et Green, S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347(6294), 645-650. doi: 10.1038/347645a0
- Jackson, A. L. et Linsley, P. S. (2010). Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov*, 9(1), 57-67. doi: 10.1038/nrd3010
- Jakobs, A., Koehnke, J., Himstedt, F., Funk, M., Korn, B., Gaestel, M., et al. (2007). Ubc9 fusion-directed SUMOylation (UFDS): a method to analyze function of protein SUMOylation. *Nat Methods*, 4(3), 245-250. doi: 10.1038/nmeth1006
- Jankovic, J., Chen, S. et Le, W. D. (2005). The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 77(1-2), 128-138. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.09.001
- Jensen, E. V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumpf, W. E., Jungblut, P. W. et DeSombre, E. R. (1968). A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 59(2), 632-638. doi: 10.1073/pnas.59.2.632
- Johnson, E. S. et Blobel, G. (1999). Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J Cell Biol*, 147(5), 981-994. doi: 10.1083/jcb.147.5.981
- Johnson, E. S. et Gupta, A. A. (2001). An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell*, 106(6), 735-744. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00491-3
- Johnson, L. (2009). The regulation of protein phosphorylation. *Biochem Soc Trans.*, 37(Pt 4), 627-641.
- Kallen, J., Schlaeppli, J. M., Bitsch, F., Filipuzzi, I., Schilb, A., Riou, V., et al. (2004). Evidence for ligand-independent transcriptional activation of the human estrogen-related receptor alpha

- (ERRalpha): crystal structure of ERRalpha ligand binding domain in complex with peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha. *J Biol Chem*, 279(47), 49330-49337. doi: 10.1074/jbc.M407999200
- Kang, S., Na, H., Kang, HJ., Kim, SH., Lee, MH., Lee, MO. (2010). Regulation of Nur77 protein turnover through acetylation and deacetylation induced by p300 and HDAC1. *Biochem Pharmacol.*, 80(6), 867-873.
- Kanzleiter, T., Preston, E., Wilks, D., Ho, B., Benrick, A., Reznick, J., Heilbronn, LK., Turner, N., Cooney, GJ. (2010). Overexpression of the orphan receptor Nur77 alters glucose metabolism in rat muscle cells and rat muscle in vivo. *Diabetologia.*, 53(6), 1174-1183.
- Karimi, M., Goldie, L. C., Cruickshank, M. N., Moses, E. K. et Abraham, L. J. (2009). A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a reassessment of -308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system. *Eur J Hum Genet*, 17(11), 1454-1462. doi: 10.1038/ejhg.2009.80
- Katagiri, Y., Takeda, K., Yu, ZX., Ferrans, VJ., Ozato, K., Guroff, G. (2000). Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B. *Nat Cell Biol.*, 2(7), 435-440.
- Kaur, K., Park, H., Pandey, N., Azuma, Y. et De Guzman, R. N. (2017). Identification of a new small ubiquitin-like modifier (SUMO)-interacting motif in the E3 ligase PIASy. *J Biol Chem*, 292(24), 10230-10238. doi: 10.1074/jbc.M117.789982
- Ke, N., Claassen, G., Yu, DH., et al. (2004). Nuclear hormone receptor NR4A2 is involved in cell transformation and apoptosis. *Cancer Res.*, 64(22), 8208-8212.
- Kelly, S. N., McKenna, T. J. et Young, L. S. (2005). Coregulatory protein-orphan nuclear receptor interactions in the human adrenal cortex. *J Endocrinol*, 186(1), 33-42. doi: 10.1677/joe.1.06005
- Kerscher, O. (2007). SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep*, 8(6), 550-555. doi: 10.1038/sj.embor.7400980
- Khurana, A. et Shafer, D. A. (2019). MDM2 antagonists as a novel treatment option for acute myeloid leukemia: perspectives on the therapeutic potential of idasanutlin (RG7388). *Onco Targets Ther*, 12, 2903-2910. doi: 10.2147/OTT.S172315
- Kim, D., Jensen, SC., Noble, KA., Kc,B., Roux, KH., Motamedchaboki, K., Roux, KJ. (2016). An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Mol Biol Cell.*, 27(8), 1188-1196.
- Kim, S. O., Ono, K., Tobias, P. S. et Han, J. (2003). Orphan nuclear receptor Nur77 is involved in caspase-independent macrophage cell death. *J Exp Med*, 197(11), 1441-1452. doi: 10.1084/jem.20021842
- Kim, Y. S., Keyser, S. G. et Schneekloth, J. S., Jr. (2014). Synthesis of 2',3',4'-trihydroxyflavone (2-D08), an inhibitor of protein sumoylation. *Bioorg Med Chem Lett*, 24(4), 1094-1097. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.01.010
- Kininis, M. et Kraus, W. L. (2008). A global view of transcriptional regulation by nuclear receptors: gene expression, factor localization, and DNA sequence analysis. *Nucl Recept Signal*, 6, e005. doi: 10.1621/nrs.06005
- Koenis, D., Medzikovic, L., van Loenen, PB., et al. (2018). Nuclear Receptor Nur77 Limits the Macrophage Inflammatory Response through Transcriptional Reprogramming of Mitochondrial Metabolism. *Cell Rep.*, 24(8), 2127-2140.e2127.
- Kolluri SK, B.-S. N., Cao X, Lin B, Lin F, Han YH, Dawson MI, Zhang XK. (2003). Mitogenic Effect of Orphan Receptor TR3 and Its Regulation by MEKK1 in Lung Cancer Cells. *Mol Cell Biol.*, (23), 8651-8667.
- König, S., Rissler, V., Terkelsen, T., Lambrughi, M., Papaleo, E. (2019). Alterations of the interactome of Bcl-2 proteins in breast cancer at the transcriptional, mutational and structural level. *PLoS Comput Biol.*, 15(12).
- Kovalevich, J. et Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol*, 1078, 9-21. doi: 10.1007/978-1-62703-640-5_2

- Krylova, I. N., Sablin, E. P., Moore, J., Xu, R. X., Waitt, G. M., MacKay, J. A., Juzumiene, D., Bynum, J. M. et al. (2005). Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. *Cell*, 120(3), 343-355. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.024
- Kulman, J., Satake, M., Harris, JE. (2007). A versatile system for site-specific enzymatic biotinylation and regulated expression of proteins in cultured mammalian cells. *Protein Expr Purif.*, 52(2), 320-328.
- Kunz, K., Piller, T., Müller, S. (2018). SUMO-specific proteases and isopeptidases of the SENP family at a glance. *J Cell Sci.*, 131(6):jcs211904.
- Kurakula, K., Koenis, D. S., van Tiel, C. M. et de Vries, C. J. (2014). NR4A nuclear receptors are orphans but not lonesome. *Biochim Biophys Acta*, 1843(11), 2543-2555. doi: 10.1016/j.bbamer.2014.06.010
- Kurakula, K., Koenis, DS., van Tiel, CM., de Vries, CJ. (2014). NR4A nuclear receptors are orphans but not lonesome. *Biochim Biophys Acta.*, 1843(11), 2543-2555.
- Kushner, P. J., Agard, D. A., Greene, G. L., Scanlan, T. S., Shiau, A. K., Uht, R. M., et al. (2000). Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 74(5), 311-317. doi: 10.1016/s0960-0760(00)00108-4
- Lai, X., Wang, L. et Witzmann, F. A. (2013). Issues and applications in label-free quantitative mass spectrometry. *Int J Proteomics*, 2013, 756039. doi: 10.1155/2013/756039
- Lalévée, S., Ferry, C., Rochette-Egly, C. (2010). Phosphorylation control of nuclear receptors. *Methods Mol Biol.*, 647, 251-266.
- Lam, S., Martell, JD., Kamer, KJ., Deerinck, TJ., Ellisman, MH., Mootha, VK., Ting, AY. (2015). Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nat Methods.*, 12(1), 51-54.
- Lam, V., Zheng, J., Griffin, PR. (2017). Unique Interactome Network Signatures for Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma (PPAR γ) Modulation by Functional Selective Ligands. *Mol Cell Proteomics.*, 16(12), 2098-2110.
- Latchman, D. S. (1993). Transcription factors: an overview. *Int J Exp Pathol*, 74(5), 417-422.
- Laudet V, H. C., Coll J, Catzeflis F, and Stéhelin D. (1992). Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J*, 11(3), 1003–1013.
- Le Drean, Y., Mincheneau, N., Le Goff, P., Michel, D. (2002). Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation. *Endocrinology.*, 143(9), 3482-3489.
- Leblanc, B. P. et Stunnenberg, H. G. (1995). 9-cis retinoic acid signaling: changing partners causes some excitement. *Genes Dev*, 9(15), 1811-1816. doi: 10.1101/gad.9.15.1811
- Lee, S., Li, X., Khan, S., Safe, S. (2011). Targeting NR4A1 (TR3) in Cancer Cells and Tumors. *Expert Opin Ther Targets.*, 15(2), 195-206.
- Lee, S., Wesselschmidt, RL., Linette, GP., Kanagawa, O., Russell, JH., Milbrandt, J. (1995). Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (Nur77). *Science.*, 269(5223), 532-535.
- Lee, S. O., Abdelrahim, M., Yoon, K., Chintharlapalli, S., Papineni, S., Kim, K., et al. (2010). Inactivation of the orphan nuclear receptor TR3/Nur77 inhibits pancreatic cancer cell and tumor growth. *Cancer Res*, 70(17), 6824-6836. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1992
- Lee, S. Y., Gong, E. Y., Hong, C. Y., Kim, K. H., Han, J. S., Ryu, J. C., et al. (2009). ROS inhibit the expression of testicular steroidogenic enzyme genes via the suppression of Nur77 transactivation. *Free Radic Biol Med*, 47(11), 1591-1600. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.09.004
- Lehrmann, H., Pritchard, L. L. et Harel-Bellan, A. (2002). Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. *Adv Cancer Res*, 86, 41-65. doi: 10.1016/s0065-230x(02)86002-x
- Leo, C., Chen, JD. (2000). The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene.*, 245(1), 1-11.
- Lev, N., Melamed, E. et Offen, D. (2003). Apoptosis and Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 27(2), 245-250. doi: 10.1016/S0278-5846(03)00019-8
- Lévesque, D., Rouillard, C. (2007). Nur77 and retinoid X receptors: critical factors in dopaminerelated neuroadaptation. *Trends Neurosci.*, 30(1), 22–30.

- Levin, A. A., Sturzenbecker, L. J., Kazmer, S., Bosakowski, T., Huselton, C., Allenby, G., et al. (1992). 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature*, 355(6358), 359-361. doi: 10.1038/355359a0
- Li, C., McManus, F. P., Plutoni, C., Pascariu, C. M., Nelson, T., Alberici Delsin, L. E., et al. (2020). Quantitative SUMO proteomics identifies PIAS1 substrates involved in cell migration and motility. *Nat Commun*, 11(1), 834. doi: 10.1038/s41467-020-14581-w
- Li H, K. S., Gu J, Dawson MI, Cao X, Hobbs PD, Lin B, Chen G, Lu J, Lin F, Xie Z, Fontana JA, Reed JC, Zhang X. (2000a). Cytochrome c Release and Apoptosis Induced by Mitochondrial Targeting of Nuclear Orphan Receptor TR3. *SCIENCE*, 289.
- Li H, K. S., Gu J, Dawson MI, Cao X, Hobbs PD, Lin B, Chen G, Lu J, Lin F, Xie Z, Fontana JA, Reed JC, Zhang X. (2000b). Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *SCIENCE*, 289(5482), 1159-1164. doi: 10.1126/science.289.5482.1159
- Li, M., Wang, Y., Liu, M., Lan, X. (2018). Multimodality reporter gene imaging: Construction strategies and application. *Theranostics*, 8(11), 2954-2973. doi: 10.7150/thno.24108
- Li S, C. L., Peng XH, Wang C, Qin BY, Tan D, Han CX, Yang H, Ren XN, Liu F, Xu CH, Zhou XH. (2018). Overview of the reporter genes and reporter mouse models. *Animal Model Exp Med*, 1(1), 29-35. doi: 10.1002/ame2.12008
- Liang, B., Song, X., Liu, G., Li, R., Xie, J., Xiao, L., Du, M., Zhang, Q., Xu, X., Gan, X., Huang, D. (2007). Involvement of TR3/Nur77 translocation to the endoplasmic reticulum in ER stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res.*, 313(13), 2833-2844.
- Liang, J., Li, B. Z., Tan, A. P., Kolodner, R. D., Putnam, C. D. et Zhou, H. (2018). SUMO E3 ligase Mms21 prevents spontaneous DNA damage induced genome rearrangements. *PLoS Genet*, 14(3), e1007250. doi: 10.1371/journal.pgen.1007250
- Liang, Y. C., Lee, C. C., Yao, Y. L., Lai, C. C., Schmitz, M. L. et Yang, W. M. (2016). SUMO5, a Novel Poly-SUMO Isoform, Regulates PML Nuclear Bodies. *Sci Rep*, 6, 26509. doi: 10.1038/srep26509
- Lib, L. J. a. Y. (2011). Structural and functional insights into nuclear receptor signaling. *Adv Drug Deliv Rev.*, 62(13), 1218-1226.
- Lin, B., Kolluri, SK., Lin, F., Liu, W., Han, YH., Cao, X., Dawson, MI., Reed, JC., Zhang, XK. (2004). Conversion of Bcl-2 from Protector to Killer by Interaction with Nuclear Orphan Receptor Nur77/TR3. *Cell*, 116, 527-540.
- Lin DY, H. Y., Jeng JC, Kuo HY, Chang CC, Chao TT, Ho CC, Chen YC, Lin TP, Fang HI, Hung CC, Suen CS, Hwang MJ, Chang KS, Maul GG, Shih HM. (2006). Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Mol Cell*, 24(3), 341-354. doi: 10.1016/j.molcel.2006.10.019
- Little, T., Zhang, Y., Matulis, CK., Weck, J., Zhang, Z., Ramachandran, A., Mayo, KE., Radhakrishnan, I. (2006). Sequence-specific deoxyribonucleic acid (DNA) recognition by steroidogenic factor 1: a helix at the carboxy terminus of the DNA binding domain is necessary for complex stability. *Mol Endocrinol.*, 20(4), 831-843.
- Liu, B., Wu, J., Zhan, Y., Chen, H., Zhang, X., Wu, X. (2007). Regulation of the Orphan Receptor TR3 Nuclear Functions by c-Jun N Terminal Kinase Phosphorylation. *Endocrinology.*, 148(1), 34-44.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D. et Sun, S. C. (2017). NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*, 2. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23
- Liu, W., Gao, Y. et Chang, N. (2017). Nurr1 overexpression exerts neuroprotective and anti-inflammatory roles via down-regulating CCL2 expression in both in vivo and in vitro Parkinson's disease models. *Biochem Biophys Res Commun*, 482(4), 1312-1319. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.034
- Liu, X., Wang, Y., Lu, H., Li, J., Yan, X., Xiao, M., et al. (2019). Genome-wide analysis identifies NR4A1 as a key mediator of T cell dysfunction. *Nature*, 567(7749), 525-529. doi: 10.1038/s41586-019-0979-8
- Liu, Y. Y. et Brent, G. A. (2018). Posttranslational Modification of Thyroid Hormone Nuclear Receptor by Sumoylation. *Methods Mol Biol*, 1801, 47-59. doi: 10.1007/978-1-4939-7902-8_6

- Liu, Z., Chen, O., Wall, J. B. J., Zheng, M., Zhou, Y., Wang, L., et al. (2017). Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. *Sci Rep*, 7(1), 2193. doi: 10.1038/s41598-017-02460-2
- Lopez-Ferrer, D., Capelo, J. L. et Vazquez, J. (2005). Ultra fast trypsin digestion of proteins by high intensity focused ultrasound. *J Proteome Res*, 4(5), 1569-1574. doi: 10.1021/pr050112v
- Luciano F, K. M., Ortiz-Rubio P, Krajewski S, Zhai D, Faustin B, Bruey JM, Bailly-Maitre B, Lichtenstein A, Kolluri SK, Satterthwait AC, Zhang XK, Reed JC. (2007). Nur77 converts phenotype of Bcl-B, an antiapoptotic protein expressed in plasma cells and myeloma. *Blood*, 109(9), 3849-3855. doi: 10.1182/blood-2006-11-056879
- Luciano, F., Krajewska, M., Ortiz-Rubio, P., Krajewski, S., Zhai, D., Faustin, B., et al. (2007). Nur77 converts phenotype of Bcl-B, an antiapoptotic protein expressed in plasma cells and myeloma. *Blood*, 109(9), 3849–3855.
- Luo, J., Gurung, S., Lee, L., Henley, J. M., Wilkinson, K. A. et Guo, C. (2017). Increased SUMO-2/3-ylation mediated by SENP3 degradation is protective against cadmium-induced caspase 3-dependent cytotoxicity. *J Toxicol Sci*, 42(5), 529-538. doi: 10.2131/jts.42.529
- Mabonga, L. et Kappo, A. P. (2019). Protein-protein interaction modulators: advances, successes and remaining challenges. *Biophys Rev*, 11(4), 559-581. doi: 10.1007/s12551-019-00570-x
- Maira, M., Martens, C., Philips, A. et Drouin, J. (1999). Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol Cell Biol*, 19(11), 7549-7557. doi: 10.1128/mcb.19.11.7549
- Makin, G. et Hickman, J. A. (2000). Apoptosis and cancer chemotherapy. *Cell Tissue Res*, 301(1), 143-152. doi: 10.1007/s004419900160
- Malewicz, M., Kadkhodaei, B., Kee, N., Volakakis, N., Hellman, U., Viktorsson, K., et al. (2011). Essential role for DNA-PK-mediated phosphorylation of NR4A nuclear orphan receptors in DNA double-strand break repair. *Genes Dev.*, 25(19), 2031-2040.
- Mangelsdorf, D., Evans, RM. (1995a). The RXR heterodimers and orphan receptors., 83(6), 841-850.
- Mangelsdorf, D., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., et al. (1995b). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83(6), 835-839.
- Martens, C., Bilodeau, S., Maira, M., Gauthier, Y. et Drouin, J. (2005). Protein-protein interactions and transcriptional antagonism between the subfamily of NGFI-B/Nur77 orphan nuclear receptors and glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol*, 19(4), 885-897. doi: 10.1210/me.2004-0333
- Martin, L. J., Boucher, N., Brousseau, C. et Tremblay, J. J. (2008). The orphan nuclear receptor NUR77 regulates hormone-induced StAR transcription in Leydig cells through cooperation with Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I. *Mol Endocrinol*, 22(9), 2021-2037. doi: 10.1210/me.2007-0370
- Martin, L. J. et Tremblay, J. J. (2009). The nuclear receptors NUR77 and SF1 play additive roles with c-JUN through distinct elements on the mouse Star promoter. *J Mol Endocrinol*, 42(2), 119-129. doi: 10.1677/JME-08-0095
- Martínez-González, J., Badimon, L. (2005). The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells. *Cardiovasc Res.*, 65(3), 609-618.
- Maruyama, K., Tsukada, T., Ohkura, N., Bandoh, S., Hosono, T., Yamaguchi, K. (1998). The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily (review). *Int J Oncol.*, 12(6), 1237-1243.
- Matsuno, Y., Hyodo, M., Fujimori, H., Shimizu, A. et Yoshioka, K. I. (2018). Sensitization of Cancer Cells to Radiation and Topoisomerase I Inhibitor Camptothecin Using Inhibitors of PARP and Other Signaling Molecules. *Cancers (Basel)*, 10(10). doi: 10.3390/cancers10100364
- Maxwell, M. A. et Muscat, G. E. (2006). The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl Recept Signal*, 4, e002. doi: 10.1621/nrs.04002
- Mayank, A. K., Sharma, S., Nailwal, H. et Lal, S. K. (2015). Nucleoprotein of influenza A virus negatively impacts antiapoptotic protein API5 to enhance E2F1-dependent apoptosis and virus replication. *Cell Death Dis*, 6, e2018. doi: 10.1038/cddis.2015.360

- Mazaira, G. I., Zgajnar, N. R., Lotufo, C. M., Daneri-Becerra, C., Sivils, J. C., Soto, O. B., Cox, M. B., Galigniana, M. D. (2018). The Nuclear Receptor Field: A Historical Overview and Future Challenges. *Nucl Receptor Res*, 5. doi: 10.11131/2018/101320
- McEvoy, C., de Gaetano, M., Giffney, H. E., Bahar, B., Cummins, E. P., Brennan, E. P., et al. (2017). NR4A Receptors Differentially Regulate NF-kappaB Signaling in Myeloid Cells. *Front Immunol*, 8, 7. doi: 10.3389/fimmu.2017.00007
- McKenna, N. J., Lanz, R. B. et O'Malley, B. W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*, 20(3), 321-344. doi: 10.1210/edrv.20.3.0366
- Meluh, P. B. et Koshland, D. (1995). Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. *Mol Biol Cell*, 6(7), 793-807. doi: 10.1091/mbc.6.7.793
- Michnick, S. W., Ear, P. H., Landry, C., Malleshaiah, M. K. et Messier, V. (2011). Protein-fragment complementation assays for large-scale analysis, functional dissection and dynamic studies of protein-protein interactions in living cells. *Methods Mol Biol*, 756, 395-425. doi: 10.1007/978-1-61779-160-4_25
- Milbrandt, J. (1988). Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron*, 1(3), 183-188. doi: 10.1016/0896-6273(88)90138-9
- Misteli, T. (2001). Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *SCIENCE*, 291(5505), 843-847. doi: 10.1126/science.291.5505.843
- Mitri Z, C. T., and O'Regan R. (2012). The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemotherapy Research and Practice*, 2012.
- Moll, U., Marchenko, N., Zhang, XK. (2006). p53 and Nur77/TR3 – transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene*, 25, 4725–4743.
- Montarolo, F., Martire, S., Perga, S., Bertolotto, A. (2019). NURR1 Impairment in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.*, 20(19), 4858.
- Moras D, G. H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol.*, 10(3), 384-391.
- Mori Sequeiros Garcia, M., Gorostizaga, A., Brion, L., Gonzalez-Calvar, S. I. et Paz, C. (2015). cAMP-activated Nr4a1 expression requires ERK activity and is modulated by MAPK phosphatase-1 in MA-10 Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*, 408, 45-52. doi: 10.1016/j.mce.2015.01.041
- Morris, E. J., Michaud, W. A., Ji, J. Y., Moon, N. S., Rocco, J. W. et Dyson, N. J. (2006). Functional identification of Api5 as a suppressor of E2F-dependent apoptosis in vivo. *PLoS Genet*, 2(11), e196. doi: 10.1371/journal.pgen.0020196
- Moutinho, M., Codocedo, J. F., Puntambekar, S. S. et Landreth, G. E. (2019). Nuclear Receptors as Therapeutic Targets for Neurodegenerative Diseases: Lost in Translation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 59, 237-261. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021807
- Mu, X., Chang, C. (2003). TR3 Orphan Nuclear Receptor Mediates Apoptosis through Up-regulating E2F1 in Human Prostate Cancer LNCaP Cells. *J Biol Chem*, 278(44), 42840-42845.
- Mukherjee, S. et Mani, S. (2010). Orphan nuclear receptors as targets for drug development. *Pharm Res.*, 27(8), 1439-1468. .
- Munnur, D., Somers, J., Skalka, G., Weston, R., Jukes-Jones, R., Bhogadia, M., Dominguez, C., Cain, K., Ahel, I., Malewicz, M. (2019). NR4A Nuclear Receptors Target Poly-ADP-Ribosylated DNA-PKcs Protein to Promote DNA Repair. *Cell Rep*, 26(8), 2028-2036 e2026. doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.083
- Munoz-Tello, P., Lin, H., Khan, P., de Vera, I. M. S., Kamenecka, T. M. et Kojetin, D. J. (2020). Assessment of NR4A Ligands That Directly Bind and Modulate the Orphan Nuclear Receptor Nurr1. *J Med Chem*, 63(24), 15639-15654. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c00894
- Murphy, E. P. et Conneely, O. M. (1997). Neuroendocrine regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis by the nurr1/nur77 subfamily of nuclear receptors. *Mol Endocrinol*, 11(1), 39-47. doi: 10.1210/mend.11.1.9874

- Murphy, E. P. et Crean, D. (2015). Molecular Interactions between NR4A Orphan Nuclear Receptors and NF-kappaB Are Required for Appropriate Inflammatory Responses and Immune Cell Homeostasis. *Biomolecules*, 5(3), 1302-1318. doi: 10.3390/biom5031302
- Muscat, G., Eriksson, NA., Byth, K., Loi, S., Graham, D., Jindal, S., et al. (2013). Research Resource: Nuclear Receptors as Transcriptome: Discriminant and Prognostic Value in Breast Cancer. *Mol Endocrinol*, 27(2), 350–365.
- Muscat GE, E. N., Byth K, Loi S, Graham D, Jindal S, Davis MJ, Clyne C, Funder JW, Simpson ER, Ragan MA, Kuczek E, Fuller PJ, Tilley WD, Leedman PJ, Clarke CL. (2013). Research resource: nuclear receptors as transcriptome: discriminant and prognostic value in breast cancer. *Mol Endocrinol*, 27(2), 350-365. doi: 10.1210/me.2012-1265
- Narayanan, R., Coss, C. et Dalton, J. (2018). Development of selective androgen receptor modulators (SARMs). *Mol Cell Endocrinol.*, 465, 134-142.
- Nassa, G., Tarallo, R., Guzzi, PH., et al. (2011). Comparative analysis of nuclear estrogen receptor alpha and beta interactomes in breast cancer cells. *Mol Biosyst.*, 7(3), 667-676.
- Nayak, A., Müller, S. (2014). SUMO-specific proteases/isopeptidases: SENPs and beyond. *Genome Biol.*, 15(7), 422.
- Nesbeth, D., Williams, SL., Chan, L., Brain, T., Slater, N., Farzaneh, F., Darling, D. (2006). Metabolic biotinylation of lentiviral pseudotypes for scalable paramagnetic microparticle-dependent manipulation. *Mol Ther.*, 13(4), 814-822.
- Nishida, T. et Yasuda, H. (2002). PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J Biol Chem*, 277(44), 41311-41317. doi: 10.1074/jbc.M206741200
- Ohkubo, T., Sugawara, Y., Sasaki, K., Maruyama, K., Ohkura, N. et Makuuchi, M. (2002). Early induction of nerve growth factor-induced genes after liver resection-reperfusion injury. *J Hepatol.*, 36(2), 210-217.
- Ohkura, N., Nagamura, Y. et Tsukada, T. (2008). Differential transactivation by orphan nuclear receptor NOR1 and its fusion gene product EWS/NOR1: possible involvement of poly(ADP-ribose) polymerase I, PARP-1. *J Cell Biochem*, 105(3), 785-800. doi: 10.1002/jcb.21876
- Oikarinen, J. (1991). Histone H1 and the regulation of transcription by nuclear receptors. *FEBS Lett*, 294(1-2), 6-10. doi: 10.1016/0014-5793(91)81330-b
- Okumura, L., Lesch, B. et Page, D. (2013). The ligand binding domain of GCNF is not required for repression of pluripotency genes in mouse fetal ovarian germ cells. *PLoS One.*, 8(6):e66062.
- Orphanides, G., Lagrange, T. et Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev*, 10(21), 2657-2683. doi: 10.1101/gad.10.21.2657
- Ortlund, E. A., Lee, Y., Solomon, I. H., Hager, J. M., Safi, R., Choi, Y., Guan, Z., Tripathy, A., Raetz, C. R., McDonnell, D. P., Moore, D. D., Redinbo, M. R. (2005). Modulation of human nuclear receptor LRH-1 activity by phospholipids and SHP. *Nat Struct Mol Biol*, 12(4), 357-363. doi: 10.1038/nsmb910
- Osborne, C. K. et Schiff, R. (2011). Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med*, 62, 233-247. doi: 10.1146/annurev-med-070909-182917
- Ouyang, J., Shi, Y., Valin, A., Xuan, Y. et Gill, G. (2009). Direct binding of CoREST1 to SUMO-2/3 contributes to gene-specific repression by the LSD1/CoREST1/HDAC complex. *Mol Cell*, 34(2), 145-154. doi: 10.1016/j.molcel.2009.03.013
- Ovaa, H. et Vertegaal, A. C. O. (2018). Probing ubiquitin and SUMO conjugation and deconjugation. *Biochem Soc Trans*, 46(2), 423-436. doi: 10.1042/BST20170086
- Owen, G., Zelent, A. (2000). Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57, 809–827.
- Owerbach, D., McKay, EM., Yeh, ET., Gabbay, KH., Bohren, KM. (2005). A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun.*, 337(2), 517-520.

- Panse, V. G., Kressler, D., Pauli, A., Petfalski, E., Gnadig, M., Tollervey, D., et al. (2006). Formation and nuclear export of preribosomes are functionally linked to the small-ubiquitin-related modifier pathway. *Traffic*, 7(10), 1311-1321. doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00471.x
- Paplomata, E. et O'Regan, R. (2014). The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Ther Adv Med Oncol*, 6(4), 154-166. doi: 10.1177/1758834014530023
- Pardridge, W. M. (1981). Transport of protein-bound hormones into tissues in vivo. *Endocr Rev*, 2(1), 103-123. doi: 10.1210/edrv-2-1-103
- Pardridge, W. M. (2012). Drug transport across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32(11), 1959-1972. doi: 10.1038/jcbfm.2012.126
- Park, J., Tsai, SY., Tsai, MJ. (2003). Molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) actions. *Keio J Med.*, 52(3), 174-181.
- Patel, H. K. et Bihani, T. (2018). Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment. *Pharmacol Ther*, 186, 1-24. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.12.012
- Patrone, C., Gianazza, E., Santagati, S., Agrati, P. et Maggi, A. (1998). Divergent pathways regulate ligand-independent activation of ER alpha in SK-N-BE neuroblastoma and COS-1 renal carcinoma cells. *Mol Endocrinol*, 12(6), 835-841. doi: 10.1210/mend.12.6.0114
- Pawlak, A., Strzadala, L. et Kalas, W. (2015). Non-genomic effects of the NR4A1/Nur77/TR3/NGFIB orphan nuclear receptor. *Steroids*, 95, 1-6. doi: 10.1016/j.steroids.2014.12.020
- Pei, L., Waki, H., Vaitheesvaran, B., Wilpitz, DC., Kurland, IJ., Tontonoz, P. (2006). NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism. *Nat Med.*, 12(9), 1048-1055.
- Pekarsky, Y., Hallas, C., Palamarchuk, A., Koval, A., Bullrich, F., Hirata, Y., Bichi, R., Letofsky, J., Croce, CM. (2001). Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98(7), 3690-3694.
- Perkins, J. R., Diboun, I., Dessailly, B. H., Lees, J. G. et Orengo, C. (2010). Transient protein-protein interactions: structural, functional, and network properties. *Structure*, 18(10), 1233-1243. doi: 10.1016/j.str.2010.08.007
- Perlmann, T. et Jansson, L. (1995). A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev*, 9(7), 769-782. doi: 10.1101/gad.9.7.769
- Perlmann, T., Jansson, L. (1995a). A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev.*, 9(7), 769-782.
- Perlmann, T., Jansson, L. . (1995b). A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev.*, 9(7), 769-782.
- Perlmann, T. et Wallen-Mackenzie, A. (2004). Nurr1, an orphan nuclear receptor with essential functions in developing dopamine cells. *Cell Tissue Res*, 318(1), 45-52. doi: 10.1007/s00441-004-0974-7
- Petta I, D. L., Ballegeer M, Lievens S, Tavernier J, De Bosscher K, Libert C. (2016). The Interactome of the Glucocorticoid Receptor and Its Influence on the Actions of Glucocorticoids in Combatting Inflammatory and Infectious Diseases. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 80(2), 495-522.
- Philips, A., Lesage, S., Gingras, R., Maira, M. H., Gauthier, Y., Hugo, P., et al. (1997). Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Mol Cell Biol*, 17(10), 5946-5951. doi: 10.1128/mcb.17.10.5946
- Picard, N., Caron, V., Bilodeau, S., Sanchez, M., Mascle, X., Aubry, M., et al. (2012). Identification of estrogen receptor beta as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3beta. *Mol Cell Biol*, 32(14), 2709-2721. doi: 10.1128/MCB.06624-11
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J. S., Dejean, A. et Melchior, F. (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell*, 108(1), 109-120. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00633-x
- Pols, T. W. et de Vries, C. J. (2008). A shining future for NR4A nuclear receptors in DNA repair. *Pigment Cell Melanoma Res*, 21(3), 342-343. doi: 10.1111/j.1755-148X.2008.00469.x

- Popichak, K., Hammond, S. L., Moreno, J. A., et al. (2018a). Compensatory Expression of Nur77 and Nurr1 Regulates NF- κ B-Dependent Inflammatory Signaling in Astrocytes. *Mol Pharmacol.*, 94(4), 1174-1186.
- Popichak, K. A., Hammond, S. L., Moreno, J. A., Afzali, M. F., Backos, D. S., Slayden, R. D., Safe, S., Tjalkens, R. B. (2018b). Compensatory Expression of Nur77 and Nurr1 Regulates NF-kappaB-Dependent Inflammatory Signaling in Astrocytes. *Mol Pharmacol*, 94(4), 1174-1186. doi: 10.1124/mol.118.112631
- Poukka, H., Karvonen, U., Janne, O. A. et al. (2000). Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(26), 14145-14150. doi: 10.1073/pnas.97.26.14145
- Pranavathiyani, G., Thanmalagan, R. R., Leimarembi Devi, N., Venkatesan, A. (2018). Integrated transcriptome interactome study of oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer. *Genes Dis*, 6(1), 78-87.
- Prelich, G. (2012). Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics*, 190(3), 841-854. doi: 10.1534/genetics.111.136911
- Princz, A. et al. (2020). SUMOylation in Neurodegenerative Diseases. *Gerontology*, 66(2), 122-130. doi: 10.1159/000502142
- Psakhye, I. et al. (2012). Protein group modification and synergy in the SUMO pathway as exemplified in DNA repair. *Cell*, 151(4), 807-820. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.021
- Pungalija, P., Kulkarni, D., Park, H. J., Marshall, H., Zheng, H., Lackland, H., Saleem, A., Rubin, E. H. (2007). TOPORS functions as a SUMO-1 E3 ligase for chromatin-modifying proteins. *J Proteome Res*, 6(10), 3918-3923. doi: 10.1021/pr0703674
- Qi, H., Jiang, Z., Wang, C., et al. (2017). Sensitization of tamoxifen-resistant breast cancer cells by Z-ligustilide through inhibiting autophagy and accumulating DNA damages. *Oncotarget.*, 8(17), 29300-29317.
- Raden, D., Hildebrandt, S., Xu, P., Bell, E., Doyle, F. J., 3rd et al. (2005). Analysis of cellular response to protein overexpression. *Syst Biol (Stevenage)*, 152(4), 285-289. doi: 10.1049/ip-syb:20050048
- Rajan, S., Jang, Y., Kim, C. H., Kim, W., Toh, H. T., Jeon, J., et al. (2020). PGE1 and PGA1 bind to Nurr1 and activate its transcriptional function. *Nat Chem Biol*, 16(8), 876-886. doi: 10.1038/s41589-020-0553-6
- Rajan S, J. Y., Kim CH, Kim W, Toh HT, Jeon J, Song B, Serra A, Lescar J, Yoo JY, Beldar S, Ye H, Kang C, Liu XW, Feitosa M, Kim Y, Hwang D, Goh G, Lim KL, Park HM, Lee CH, Oh SF, Petsko GA, Yoon HS, Kim KS. (2020). PGE1 and PGA1 bind to Nurr1 and activate its transcriptional function. *Nat Chem Biol*, 16(8), 876-886. doi: 10.1038/s41589-020-0553-6
- Rajpal A, C. Y., Yelent B, Koza-Taylor PH, Li D, Chen E, Whang M, Kang C, Turi TG, Winoto A. (2003). Transcriptional activation of known and novel apoptotic pathways by Nur77 orphan steroid receptor. *EMBO J*, 22(24), 6526-6536. doi: 10.1093/emboj/cdg620
- Rambaud, J., Desroches, J., Balsalobre, A. et al. (2009). TIF1beta/KAP-1 is a coactivator of the orphan nuclear receptor NGFI-B/Nur77. *J Biol Chem*, 284(21), 14147-14156. doi: 10.1074/jbc.M809023200
- Rambaud, J., Desroches, J., Balsalobre, A., Drouin, J. (2009). TIF1beta/KAP-1 is a coactivator of the orphan nuclear receptor NGFI-B/Nur77. *J Biol Chem.*, 284(21), 14147-14156.
- Ranhotra, H. (2015a). The NR4A orphan nuclear receptors: mediators in metabolism and diseases. *J Recept Signal Transduct Res.*, 35(2), 184-188.
- Ranhotra, H. S. (2015b). The NR4A orphan nuclear receptors: mediators in metabolism and diseases. *J Recept Signal Transduct Res*, 35(2), 184-188. doi: 10.3109/10799893.2014.948555
- Rao, V. S., Srinivas, K., Sujini, G. N. et al. (2014). Protein-protein interaction detection: methods and analysis. *Int J Proteomics*, 2014, 147648. doi: 10.1155/2014/147648

- Rastinejad, F., Huang, P., Chandra, V. et Khorasanizadeh, S. (2013). Understanding nuclear receptor form and function using structural biology. *J Mol Endocrinol*, 51(3), T1-T21. doi: 10.1530/JME-13-0173
- Ratman, D., Vanden Berghe, W., Dejager, L., Libert, C., Tavernier, J., Beck, I. M., et al. (2013). How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Mol Cell Endocrinol*, 380(1-2), 41-54. doi: 10.1016/j.mce.2012.12.014
- Rhee, H. W., Zou, P., Udeshi, N. D., Martell, J. D., Mootha, V. K., Carr, S. A., et al. (2013). Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *SCIENCE*, 339(6125), 1328-1331. doi: 10.1126/science.1230593
- Rigou, P., Piddubnyak, V., Faye, A., Rain, J. C., Michel, L., Calvo, F., et al. (2009). The antiapoptotic protein AAC-11 interacts with and regulates Acinus-mediated DNA fragmentation. *EMBO J*, 28(11), 1576-1588. doi: 10.1038/emboj.2009.106
- Ring, A. et Dowsett, M. (2004). Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr Relat Cancer*, 11(4), 643-658. doi: 10.1677/erc.1.00776
- Rochette-Egly, C. (2003a). Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal.*, 15(4), 355-366.
- Rochette-Egly, C. (2003b). Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal.*, 15(4), 355-366.
- Rodríguez-Calvo, R., Tajés, M., Vázquez-Carrera, M. (2017). The NR4A subfamily of nuclear receptors: potential new therapeutic targets for the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets.*, 21(3), 291-304.
- Roop, R. P., Ma, C. X. (2012). Endocrine resistance in breast cancer: molecular pathways and rational development of targeted therapies. *Future Oncol*, 8(3), 273-292. doi: 10.2217/fon.12.8
- Rott, R., Szargel, R., Shani, V., Hamza, H., Savyon, M., Abd Elghani, F., Bandopadhyay, R., Engelender, S. (2017). SUMOylation and ubiquitination reciprocally regulate alpha-synuclein degradation and pathological aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(50), 13176-13181. doi: 10.1073/pnas.1704351114
- Rouillard, C., Baillargeon, J., Paquet, B, St-Hilaire, M., Maheux, J., Lévesque, C., Darlix, N., Majeur, S., Lévesque, D. (2018). Genetic disruption of the nuclear receptor Nur77 (Nr4a1) in rat reduces dopamine cell loss and l-Dopa-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 304, 143-153. doi: 10.1016/j.expneurol.2018.03.008
- Roux, K., Kim, DI., Raida, M., Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol.*, 196(6), 801-810.
- Rytinki, M., Kaikkonen, S., Sutinen, P., Paakinaho, V., Rahkama, V. et Palvimo, J. J. (2012). Dynamic SUMOylation is linked to the activity cycles of androgen receptor in the cell nucleus. *Mol Cell Biol*, 32(20), 4195-4205. doi: 10.1128/MCB.00753-12
- Rytinki, M., Kaikkonen, S., Pehkonen, P., Jääskeläinen, T., Palvimo, JJ. . (2009). PIAS proteins: pleiotropic interactors associated with SUMO. *Cell Mol Life Sci.*, 66(18). 3029-3041.
- Sable, R., Jambunathan, N., Singh, S., Pallerla, S., Kousoulas, K. G. et Jois, S. (2018). Proximity ligation assay to study protein-protein interactions of proteins on two different cells. *Biotechniques*, 65(3), 149-157. doi: 10.2144/btn-2018-0049
- Sacchetti, P., Carpentier, R., Segard, P., Olive-Cren, C. et Lefebvre, P. (2006). Multiple signaling pathways regulate the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NURR1. *Nucleic Acids Res*, 34(19), 5515-5527. doi: 10.1093/nar/gkl712
- Safe, S., Jin, U. H., Hedrick, E., Reeder, A. et Lee, S. O. (2014). Minireview: role of orphan nuclear receptors in cancer and potential as drug targets. *Mol Endocrinol*, 28(2), 157-172. doi: 10.1210/me.2013-1291
- Safe, S., Jin, UH., Hedrick, E., Reeder, A., Lee, SO. (2014). Minireview: Role Of Orphan Nuclear Receptors in Cancer and Potential as Drug Targets. *Mol Endocrinol.*, 28(2), 157-172.

- Saijo, K., Winner, B., Carson, CT., Collier, JG., Boyer, L., Rosenfeld, MG., Gage FH and Glass, CK. (2009). A Nurr1/CoREST Pathway in Microglia and Astrocytes Protects Dopaminergic Neurons from Inflammation-Induced Death. *Cell.*, 137(1), 47-59.
- Saitoh, H., Hinchev, J. (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitinrelated protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem.*, 275(9), 6252-6258.
- Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A. P., Donadi, R. S., Bologa, C. G. et al. (2017). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, 16(1), 19-34. doi: 10.1038/nrd.2016.230
- Sarras, H., Alizadeh Azami, S. et McPherson, J. P. (2010). In search of a function for BCLAF1. *ScientificWorldJournal*, 10, 1450-1461. doi: 10.1100/tsw.2010.132
- Sarre, T. F. (1989). The phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2: a principle of translational control in mammalian cells. *Biosystems*, 22(4), 311-325. doi: 10.1016/0303-2647(89)90053-1
- Saucedo-Cardenas O, Q.-H. J., Le WD, Smidt MP, Cox JJ, De Mayo F, Burbach JP, Conneely OM. . (1998). Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(7), 4013-4018. doi: 10.1073/pnas.95.7.4013
- Savkur, R. S. et Burris, T. P. (2004). The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *J Pept Res*, 63(3), 207-212. doi: 10.1111/j.1399-3011.2004.00126.x
- Schiff, C. K. O. a. R. (2011). Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med.*, 62, 233-247.
- Schmidt, D. et Muller, S. (2003). PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci*, 60(12), 2561-2574. doi: 10.1007/s00018-003-3129-1
- Schreiber, S. N., Emter, R., Hock, M. B., Knutti, D., Cardenas, J., Podvinec, M., et al. (2004). The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(17), 6472-6477. doi: 10.1073/pnas.0308686101
- Schwabe, J. (1996). Transcriptional control: How nuclear receptors get turned on. *Curr Biol.*, (4):372-4.
- Seif, F., Khoshmirsafa, M., Aazami, H., Mohsenzadegan, M., Sedighi, G. et Bahar, M. (2017). The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Commun Signal*, 15(1), 23. doi: 10.1186/s12964-017-0177-y
- Shannon, E., Mullican, Zhang, S., Konopleva, M., Ruvolo, V., Andreeff, M., Milbrandt, J., Conneely, OM. (2007). Abrogation of nuclear receptors Nr4a3 and Nr4a1 leads to development of acute myeloid leukemia. *NATURE MEDICINE*, 13(6).
- Shao, A. W., Sun, H., Geng, Y., Peng, Q., Wang, P., Chen, J., Xiong, T., Cao, R., Tang, J. (2016). Bclaf1 is an important NF-kappaB signaling transducer and C/EBPbeta regulator in DNA damage-induced senescence. *Cell Death Differ*, 23(5), 865-875. doi: 10.1038/cdd.2015.150
- Sharma, P. (2016). Biology and Management of Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *Oncologist*, 21(9), 1050-1062. doi: 10.1634/theoncologist.2016-0067
- Sharrocks, A. D. (2006). PIAS proteins and transcriptional regulation--more than just SUMO E3 ligases? *Genes Dev*, 20(7), 754-758. doi: 10.1101/gad.1421006
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M. et Graham, F. L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J*, 16(8), 869-871. doi: 10.1096/fj.01-0995fje
- Shi, Y. (2007). Orphan nuclear receptors in drug discovery. *Drug Discov Today.*, 12(11-12), 440-445.
- Shin, E., Shin, hm., Nam, E., Kim, WS., Kim, JH., Oh, BH., Yun, Y. (2012). DeSUMOylating isopeptidase: a second class of SUMO protease. *EMBO Rep.*, 13(4), 339-346.
- Silver, H. R., Nissley, J. A., Reed, S. H., Hou, Y. M. et Johnson, E. S. (2011). A role for SUMO in nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)*, 10(12), 1243-1251. doi: 10.1016/j.dnarep.2011.09.013
- Sims AH, H. A., Howell SJ, Clarke RB. (2007). Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Oncol.*, 4(9), 516-525.

- Sims, A. H., Howell, A., Howell, S. J. et Clarke, R. B. (2007). Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Oncol*, 4(9), 516-525. doi: 10.1038/nponc0908
- Sinclair, J. et Timms, J. F. (2011). Quantitative profiling of serum samples using TMT protein labelling, fractionation and LC-MS/MS. *Methods*, 54(4), 361-369. doi: 10.1016/j.ymeth.2011.03.004
- Sladek, F. (2003). Nuclear receptors as drug targets: new developments in coregulators, orphan receptors and major therapeutic areas. *Expert Opin Ther Targets.*, 7(5), 679-684.
- Smith, J., Figeys, D. (2008). Recent developments in mass spectrometry-based quantitative phosphoproteomics. *Biochem Cell Biol.*, 86(2), 137-148.
- Sohn, Y., Kwak, E., Na, Y., Lee, J.W., Lee, S.K. (2001). Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors and activating signal cointegrator-2 as transcriptional coregulators of the orphan nuclear receptor Nur77. *J Biol Chem.*, 276(47), 43734-43739.
- Sohn, Y. C., Kwak, E., Na, Y., Lee, J. W. et Lee, S. K. (2001). Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors and activating signal cointegrator-2 as transcriptional coregulators of the orphan nuclear receptor Nur77. *J Biol Chem*, 276(47), 43734-43739. doi: 10.1074/jbc.M107208200
- Song, J., Durrin, L. K., Wilkinson, T. A., Krontiris, T. G. et Chen, Y. (2004). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(40), 14373-14378. doi: 10.1073/pnas.0403498101
- Song, K. H., Cho, H., Kim, S., Lee, H. J., Oh, S. J., Woo, S. R., Hong, S. O., Jang, H. S., Noh, K. H., Choi, C. H., Chung, J. Y., Hewitt, S. M., Kim, J. H., Son, M., Kim, S. H., Lee, B. I., Park, H. C., Bae, Y. K., Kim, T. W. (2017). API5 confers cancer stem cell-like properties through the FGF2-NANOG axis. *Oncogenesis*, 6(1), e285. doi: 10.1038/oncsis.2016.87
- Sporn, M., Suh, N., Mangelsdorf, DJ. . (2001). Prospects for prevention and treatment of cancer with selective PPARgamma modulators (SPARMs). *Trends Mol Med.*, 7(9), 395-400.
- St-Hilaire, M., Bourhis, E., Lévesque, D., Rouillard, C. (2006). Impaired behavioural and molecular adaptations to dopamine denervation and repeated L-DOPA treatment in Nur77-knockout mice. *Eur J Neurosci.*, 24(3), 795-805.
- Stark, C., Breitkreutz, B. J., Reguly, T., Boucher, L., Breitkreutz, A. et Tyers, M. (2006). BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res*, 34(Database issue), D535-539. doi: 10.1093/nar/gkj109
- Stenoien, D. L., Nye, A. C., Mancini, M. G., Patel, K., Dutertre, M., O'Malley, B. W., et al. (2001). Ligand-mediated assembly and real-time cellular dynamics of estrogen receptor alpha-coactivator complexes in living cells. *Mol Cell Biol*, 21(13), 4404-4412. doi: 10.1128/MCB.21.13.4404-4412.2001
- Stepanenko, A. A. et Dmitrenko, V. V. (2015). HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene*, 569(2), 182-190. doi: 10.1016/j.gene.2015.05.065
- Steward, L., Conant, L., Gao, F. et Margenthaler, J. A. (2014). Predictive factors and patterns of recurrence in patients with triple negative breast cancer. *Ann Surg Oncol*, 21(7), 2165-2171. doi: 10.1245/s10434-014-3546-4
- Stewart, II, Thomson, T. et Figeys, D. (2001). 18O labeling: a tool for proteomics. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 15(24), 2456-2465. doi: 10.1002/rcm.525
- Stocco, D. M. (2001). StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol*, 63, 193-213. doi: 10.1146/annurev.physiol.63.1.193
- Stram, A., Payne, RM. (2016). Post-translational modifications in mitochondria: protein signaling in the powerhouse. *Cell Mol Life Sci.*, 73(21), 4063-4073.
- Stynen, B., Tournu, H., Tavernier, J. et Van Dijck, P. (2012). Diversity in genetic in vivo methods for protein-protein interaction studies: from the yeast two-hybrid system to the mammalian split-luciferase system. *Microbiol Mol Biol Rev*, 76(2), 331-382. doi: 10.1128/MMBR.05021-11

- Subramaniam, S., Mealer, R. G., Sixt, K. M., Barrow, R. K., Usiello, A. et Snyder, S. H. (2010). Rhes, a physiologic regulator of sumoylation, enhances cross-sumoylation between the basic sumoylation enzymes E1 and Ubc9. *J Biol Chem*, 285(27), 20428-20432. doi: 10.1074/jbc.C110.127191
- Sun, Z., Cao, X., Jiang, MM., Qiu, Y., Zhou, H., Chen, L., et al. (2012a). Inhibition of β -catenin signaling by nongenomic action of orphan nuclear receptor Nur77. *Oncogene*, 31(21), 2653-2667.
- Sun, Z., Cao, X., Jiang, MM., Qiu, Y., Zhou, H., Chen, L., et al. (2012b). Inhibition of beta-catenin signaling by nongenomic action of orphan nuclear receptor Nur77. *Oncogene*, 31(21), 2653-2667. doi: 10.1038/onc.2011.448
- Sutherland, J. D., Kozlova, T., Tzertzinis, G. et Kafatos, F. C. (1995). Drosophila hormone receptor 38: a second partner for Drosophila USP suggests an unexpected role for nuclear receptors of the nerve growth factor-induced protein B type. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(17), 7966-7970. doi: 10.1073/pnas.92.17.7966
- Szostakowska, M., Trebinska-Stryjewska, A., Grzybowska, E. A. et Fabisiewicz, A. (2019). Resistance to endocrine therapy in breast cancer: molecular mechanisms and future goals. *Breast Cancer Res Treat*, 173(3), 489-497. doi: 10.1007/s10549-018-5023-4
- Takahashi, Y., Kahyo, T., Toh, E. A., Yasuda, H. et Kikuchi, Y. (2001). Yeast Ull1/Siz1 is a novel SUMO1/Smt3 ligase for septin components and functions as an adaptor between conjugating enzyme and substrates. *J Biol Chem*, 276(52), 48973-48977. doi: 10.1074/jbc.M109295200
- Tata, J. (2002). Signalling through nuclear receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 3(9), 702-710.
- Tatham, M., Kim, S., Jaffray, E., Song, J., Chen, Y. et Hay, R. (2005). Unique binding interactions among Ubc9, SUMO and RanBP2 reveal a mechanism for SUMO paralog selection. *Nat Struct Mol Biol.*, 12(1), 67-74.
- ten Have, S., Boulon, S., Ahmad, Y. et Lamond, A. I. (2011). Mass spectrometry-based immunoprecipitation proteomics - the user's guide. *Proteomics*, 11(6), 1153-1159. doi: 10.1002/pmic.201000548
- Tewari, M., Yu, M., Ross, B., Dean, C., Giordano, A. et Rubin, R. (1997). AAC-11, a novel cDNA that inhibits apoptosis after growth factor withdrawal. *Cancer Res*, 57(18), 4063-4069.
- Thomas, P. et Smart, T. G. (2005). HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 51(3), 187-200. doi: 10.1016/j.vascn.2004.08.014
- Thompson, E., Kumar, R. (2003). DNA binding of nuclear hormone receptors influences their structure and function. *Biochem Biophys Res Commun.*, 306(1), 1-4.
- To, S. K., Zeng, J. Z. et Wong, A. S. (2012). Nur77: a potential therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 16(6), 573-585. doi: 10.1517/14728222.2012.680958
- Tolsma, T., Hansen, JC. (2019). Post-translational modifications and chromatin dynamics. *Essays Biochem.*, 63(1), 89-96.
- Traboulsi, T., El Ezzy, M., Dumeaux, V., Audemard, E., Mader, S. (2019). Role of SUMOylation in differential ER α transcriptional repression by tamoxifen and fulvestrant in breast cancer cells. *Oncogene.*, 38(7), 1019-1037.
- Tremblay, A. M., Wilson, B. J., Yang, X. J. et Giguere, V. (2008). Phosphorylation-dependent sumoylation regulates estrogen-related receptor-alpha and -gamma transcriptional activity through a synergy control motif. *Mol Endocrinol*, 22(3), 570-584. doi: 10.1210/me.2007-0357
- Tremblay, G. B., Tremblay, A., Labrie, F. et Giguere, V. (1999). Dominant activity of activation function 1 (AF-1) and differential stoichiometric requirements for AF-1 and -2 in the estrogen receptor alpha-beta heterodimeric complex. *Mol Cell Biol*, 19(3), 1919-1927. doi: 10.1128/mcb.19.3.1919
- Trinkle-Mulcahy, L. (2019). Recent advances in proximity-based labeling methods for interactome mapping. *F1000Res.*, 8:F1000 Faculty Rev-135.
- Tsai, C. C. et Fondell, J. D. (2004). Nuclear receptor recruitment of histone-modifying enzymes to target gene promoters. *Vitam Horm*, 68, 93-122. doi: 10.1016/S0083-6729(04)68003-4
- Tsujimoto, Y. (1998). Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells*, 3(11), 697-707. doi: 10.1046/j.1365-2443.1998.00223.x

- Tzukerman, M. T., Esty, A., Santiso-Mere, D., Danielian, P., Parker, M. G., Stein, R. B., et al. (1994). Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol*, 8(1), 21-30. doi: 10.1210/mend.8.1.8152428
- Uemura, H. et Chang, C. (1998). Antisense TR3 orphan receptor can increase prostate cancer cell viability with etoposide treatment. *Endocrinology*, 139(5), 2329-2334. doi: 10.1210/endo.139.5.5969
- Valenta, T., Hausmann, G., Baslera, K. (2012). The many faces and functions of β -catenin. *EMBO J*, 31(12), 2714–2736.
- Van den Berghe, L., Laurell, H., Huez, I., Zanibellato, C., Prats, H. et Bugler, B. (2000). FIF [fibroblast growth factor-2 (FGF-2)-interacting-factor], a nuclear putatively antiapoptotic factor, interacts specifically with FGF-2. *Mol Endocrinol*, 14(11), 1709-1724. doi: 10.1210/mend.14.11.0556
- van der Merwe, P. A. et Barclay, A. N. (1994). Transient intercellular adhesion: the importance of weak protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci*, 19(9), 354-358. doi: 10.1016/0968-0004(94)90109-0
- Varejao, N., Ibars, E., Lascorz, J., Colomina, N., Torres-Rosell, J. et Reverter, D. (2018). DNA activates the Nse2/Mms21 SUMO E3 ligase in the Smc5/6 complex. *EMBO J*, 37(12). doi: 10.15252/embj.201798306
- Vassilev, L. T., Vu, B. T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., Fotouhi, N., Liu, E. A. (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *SCIENCE*, 303(5659), 844-848. doi: 10.1126/science.1092472
- Venne, A., Kollipara, L., Zahedi, RP. (2014). The next level of complexity: crosstalk of posttranslational modifications. *Proteomics*, 14(4-5), 513-524.
- Verma, D. K., Ghosh, A., Ruggiero, L., Cartier, E., Janezic, E., Williams, D., Jung, E. G., Moore, M., Seo, J. B., Kim, Y. H. (2020). The SUMO Conjugase Ubc9 Protects Dopaminergic Cells from Cytotoxicity and Enhances the Stability of alpha-Synuclein in Parkinson's Disease Models. *eNeuro*, 7(5). doi: 10.1523/ENEURO.0134-20.2020
- Vidal, M., Cusick, ME., Barabási, AL. (2011). Interactome Networks and Human Disease. *Cell*, 144(6), 986-998.
- Volakakis, N., Malewicz, M., Kadkhodai, B., Perlmann, T. et Benoit, G. (2006). Characterization of the Nurr1 ligand-binding domain co-activator interaction surface. *J Mol Endocrinol*, 37(2), 317-326. doi: 10.1677/jme.1.02106
- Voyksner, R. D. et Lee, H. (1999). Investigating the use of an octupole ion guide for ion storage and high-pass mass filtering to improve the quantitative performance of electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 13(14), 1427-1437. doi: 10.1002/(SICI)1097-0231(19990730)13:14<1427::AID-RCM662>3.0.CO;2-5
- Wallen-Mackenzie, A., Mata de Urquiza, A., Petersson, S., Rodriguez, F. J., Friling, S., Wagner, J., Ordentlich, P., Lengqvist, J., Heyman, R. A., Arenas, E., Perlmann, T. (2003). Nurr1-RXR heterodimers mediate RXR ligand-induced signaling in neuronal cells. *Genes Dev*, 17(24), 3036-3047. doi: 10.1101/gad.276003
- Wang, C., Yang, P., Li, M., Gong, F. (2009). Characterization of a negative feedback network between SUMO4 expression and NFkappaB transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 381(4), 477-481.
- Wang, L., Wansleben, C., Zhao, S., Miao, P., Paschen, W. et Yang, W. (2014). SUMO2 is essential while SUMO3 is dispensable for mouse embryonic development. *EMBO Rep*, 15(8), 878-885. doi: 10.15252/embr.201438534
- Wang, Q., Gun, M. et Hong, X. Y. (2019). Induced Tamoxifen Resistance is Mediated by Increased Methylation of E-Cadherin in Estrogen Receptor-Expressing Breast Cancer Cells. *Sci Rep*, 9(1), 14140. doi: 10.1038/s41598-019-50749-1
- Wang, Y., Jiang, X., Feng, F., Liu, W. et Sun, H. (2020). Degradation of proteins by PROTACs and other strategies. *Acta Pharm Sin B*, 10(2), 207-238. doi: 10.1016/j.apsb.2019.08.001

- Wang, Z., Benoit, G., Liu, J., Prasad, S., Aarnisalo, P., Liu, X., Xu, H., Walker, N. P., Perlmann, T. (2003). Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature*, 423(6939), 555-560. doi: 10.1038/nature01645
- Wansa, K., Harris, JM., Muscat, GE. (2002). The activation function-1 domain of Nur77/NR4A1 mediates trans-activation, cell specificity, and coactivator recruitment. *J Biol Chem.*, 277(36), 33001-33011.
- Warnmark, A., Treuter, E., Wright, A. P. et Gustafsson, J. A. (2003). Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol*, 17(10), 1901-1909. doi: 10.1210/me.2002-0384
- Wärnmark, A., Treuter, E., Wright, A.P., Gustafsson, J.A. (2003). Activation Functions 1 and 2 of Nuclear Receptors: Molecular Strategies for Transcriptional Activation. *Mol Endocrinol.*, (10), 1901-1909.
- Warnmark, A., Wikstrom, A., Wright, A. P., Gustafsson, J. A. et Hard, T. (2001). The N-terminal regions of estrogen receptor alpha and beta are unstructured in vitro and show different TBP binding properties. *J Biol Chem*, 276(49), 45939-45944. doi: 10.1074/jbc.M107875200
- Watanabe, S., Tani, T., Watanabe, S. et Seno, M. (1991). Transport of steroid hormones facilitated by serum proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1073(2), 275-284. doi: 10.1016/0304-4165(91)90132-z
- Watt, A., Garrison, WD., Duncan, SA. (2003). HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function. *Hepatology.*, 37(6), 1249-1253.
- Weigel, N. L. et Zhang, Y. (1998). Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *J Mol Med (Berl)*, 76(7), 469-479. doi: 10.1007/s001090050241
- Weikum, E., Tuntland, ML., Murphy, MN., Ortlund, EA. (2016). A Structural Investigation into Oct4 Regulation by Orphan Nuclear Receptors, Germ Cell Nuclear Factor (GCNF), and Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1). *J Mol Biol.*, 428(24 Pt B), 4981-4992.
- Weikum, E. R., Liu, X. et Ortlund, E. A. (2018). The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Sci*, 27(11), 1876-1892. doi: 10.1002/pro.3496
- Wertz, I. E. et Wang, X. (2019). From Discovery to Bedside: Targeting the Ubiquitin System. *Cell Chem Biol*, 26(2), 156-177. doi: 10.1016/j.chembiol.2018.10.022
- Westman, B. J. et Lamond, A. I. (2011). A role for SUMOylation in snoRNP biogenesis revealed by quantitative proteomics. *Nucleus*, 2(1), 30-37. doi: 10.4161/nucl.2.1.14437
- Wilkinson, K. A. et Henley, J. M. (2010). Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J*, 428(2), 133-145. doi: 10.1042/BJ20100158
- Wilkinson, K. A., Nakamura, Y. et Henley, J. M. (2010). Targets and consequences of protein SUMOylation in neurons. *Brain Res Rev*, 64(1), 195-212. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.04.002
- Wilson, A., Arango, D., Mariadason, JM., Heerd, BG., Augenlicht, LH. (2003). TR3/Nur77 in Colon Cancer Cell Apoptosis. *Cancer Res.*, 63(17), 5401-5407.
- Wilson, T., Paulsen, RE., Padgett, KA., Milbrandt, J. (1992). Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. *Science.*, 256(5053), 107-110.
- Wilson, T. E., Fahrner, T. J., Johnston, M. et Milbrandt, J. (1991). Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *SCIENCE*, 252(5010), 1296-1300. doi: 10.1126/science.1925541
- Wilson, V. G. et Heaton, P. R. (2008). Ubiquitin proteolytic system: focus on SUMO. *Expert Rev Proteomics*, 5(1), 121-135. doi: 10.1586/14789450.5.1.121
- Wingfield, P. T. (2015). Overview of the purification of recombinant proteins. *Curr Protoc Protein Sci*, 80, 6 1 1-6 1 35. doi: 10.1002/0471140864.ps0601s80
- Wong, K. A., Kim, R., Christofk, H., Gao, J., Lawson, G. et Wu, H. (2004). Protein inhibitor of activated STAT Y (PIASy) and a splice variant lacking exon 6 enhance sumoylation but are not essential for embryogenesis and adult life. *Mol Cell Biol*, 24(12), 5577-5586. doi: 10.1128/MCB.24.12.5577-5586.2004
- Woo, C. H. et Abe, J. (2010). SUMO--a post-translational modification with therapeutic potential? *Curr Opin Pharmacol*, 10(2), 146-155. doi: 10.1016/j.coph.2009.12.001

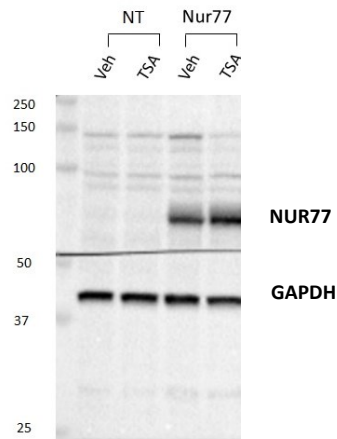
- Woronicz, J., Calnan, B., Ngo, V., Winoto, A. (1994). Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature.*, 367(6460), 277-281.
- Wrange, O., Gustafsson, J.A. (1978). Separation of the hormone- and DNA-binding sites of the hepatic glucocorticoid receptor by means of proteolysis. *J Biol Chem*, 253(3), 856-865.
- Wu, H., Bi, J., Peng, Y., Huo, L., Yu, X., Yang, Z., et al. (2017). Nuclear receptor NR4A1 is a tumor suppressor down-regulated in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*, 8(33), 54364-54377.
- Wu H, B. J., Peng Y, Huo L, Yu X, Yang Z, Zhou Y, Qin L, Xu Y, Liao L, Xie Y, Conneely OM, Jonkers J, Xu J. (2017). Nuclear receptor NR4A1 is a tumor suppressor down-regulated in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*, 8(33), 54364-54377. doi: 10.18632/oncotarget.17532
- Wu, H., Lin, Y., Li, W., Sun, Z., Gao, W. et al. (2011). Regulation of Nur77 expression by beta-catenin and its mitogenic effect in colon cancer cells. *The FASEB Journal*, 25(1), 192–205.
- Wu, L. et Chen, L. (2018). Characteristics of Nur77 and its ligands as potential anticancer compounds (Review). *Mol Med Rep*, 18(6), 4793-4801. doi: 10.3892/mmr.2018.9515
- Wu, Q., Wu, W., Jacevic, V., Franca, T. C. C., Wang, X. et Kuca, K. (2020). Selective inhibitors for JNK signalling: a potential targeted therapy in cancer. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 35(1), 574-583. doi: 10.1080/14756366.2020.1720013
- Xicoy, H., Wieringa, B. et Martens, G. J. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener*, 12(1), 10. doi: 10.1186/s13024-017-0149-0
- Xie L, J. F., Zhang X, Alitongbieke G, Shi X, Meng M, Xu Y, Ren A, Wang J, Cai L, Zhou Y, Xu Y, Su Y, Liu J, Zeng Z, Wang G, Zhou H, Chen QC, Zhang XK. . (2016). Honokiol sensitizes breast cancer cells to TNF-alpha induction of apoptosis by inhibiting Nur77 expression. *Br J Pharmacol*, 173(2), 344-356. doi: 10.1111/bph.13375
- Xu, Y., Fan, X. et Hu, Y. (2021). In vivo interactome profiling by enzyme-catalyzed proximity labeling. *Cell Biosci*, 11(1), 27. doi: 10.1186/s13578-021-00542-3
- Yang PB, H. P., Liu FY, Hong WB, Chen HZ, Sun XY, Li P, Zhang Y, Ju CY, Luo LJ, Wu SF, Zhou JX, Wang ZJ, He JP, Li L, Zhao TJ, Deng X, Lin T, Wu Q. (2020). Blocking PPARgamma interaction facilitates Nur77 interdiction of fatty acid uptake and suppresses breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(44), 27412-27422. doi: 10.1073/pnas.2002997117
- Yang, S. H., Sharrocks, A. D. (2010). The SUMO E3 ligase activity of Pc2 is coordinated through a SUMO interaction motif. *Mol Cell Biol*, 30(9), 2193-2205. doi: 10.1128/MCB.01510-09
- Yau, T. Y., Molina, O. et Courey, A. J. (2020). SUMOylation in development and neurodegeneration. *Development*, 147(6). doi: 10.1242/dev.175703
- Ye Xf, W. Q., Liu S, Lin Xf, Zhang B, Wu Jf, Cai Jh, Zhang Mq, Su Wj. (2004). Distinct role and functional mode of TR3 and RARalpha in mediating ATRA-induced signalling pathway in breast and gastric cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(1), 98-113. doi: 10.1016/s1357-2725(03)00143-2
- Yin K, C. Y., Tropée R, Lim YC, Fane M, Dray E, Sturm RA, Smith AG. (2017). NR4A2 Promotes DNA Double-strand Break Repair Upon Exposure to UVR. *Mol Cancer Res*, 15(9), 1184-1196. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0002
- Yin, K., Sturm, R. A. et Smith, A. G. (2014). MC1R and NR4A receptors in cellular stress and DNA repair: implications for UVR protection. *Exp Dermatol*, 23(7), 449-452. doi: 10.1111/exd.12420
- Yu, H., Kumar, SM., Fang, D., Acs, G., Xu, X. (2007). Nuclear orphan receptor TR3/Nur77 mediates melanoma cell apoptosis. *Cancer Biol Ther.*, 6(3), 405-412.
- Yunus, A. A. et Lima, C. D. (2009). Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 ligase Siz1 and determinants required for SUMO modification of PCNA. *Mol Cell*, 35(5), 669-682. doi: 10.1016/j.molcel.2009.07.013
- Zárraga-Granados G, M.-H. G., Sánchez-Carbente MR, Villamizar-Gálvez W, Peñas-Rincón A, Arredondo C, Andrés ME, Wood C, Covarrubias L, Castro-Obregón S. (2020). The nuclear receptor NR4A1 is regulated by SUMO modification to induce autophagic cell death. *PLoS One*, 15(3), e0222072. doi: 10.1371/journal.pone.0222072

- Zárraga-Granados, G., Muciño-Hernández, G., Sánchez-Carbente, MR., Villamizar-Gálvez, W., Peñas-Rincón, A., Arredondo, C., et al. (2020). The nuclear receptor NR4A1 is regulated by SUMO modification to induce autophagic cell death. *PLoS One*, *15*(3):e0222072.
- Zechel, C. (2005). The germ cell nuclear factor (GCNF). *Mol Reprod Dev.*, *72*(4), 550-556.
- Zetterstrom, R. H., Solomin, L., Mitsiadis, T., Olson, L. et Perlmann, T. (1996). Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Mol Endocrinol*, *10*(12), 1656-1666. doi: 10.1210/mend.10.12.8961274
- Zhan, Y., Du, X., Chen, H., Liu, J., Zhao, B., Huang, D., et al. (2008). Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77. *Nat Chem Biol.*, *4*(9), 548-556.
- Zhan Y, D. X., Chen H, Liu J, Zhao B, Huang D, Li G, Xu Q, Zhang M, Weimer BC, Chen D, Cheng Z, Zhang L, Li Q, Li S, Zheng Z, Song S, Huang Y, Ye Z, Su W, Lin SC, Shen Y, Wu Q. (2008). Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77. *Nat Chem Biol*, *4*(9), 548-556. doi: 10.1038/nchembio.106
- Zhan YY, C. Y., Zhang Q, Zhuang JJ, Tian M, Chen HZ, Zhang LR, Zhang HK, He JP, Wang WJ, Wu R, Wang Y, Shi C, Yang K, Li AZ, Xin YZ, Li TY, Yang JY, Zheng ZH, Yu CD, Lin SC, Chang C, Huang PQ, Lin T, Wu Q. (2012). The orphan nuclear receptor Nur77 regulates LKB1 localization and activates AMPK. *Nat Chem Biol*, *8*(11), 897-904. doi: 10.1038/nchembio.1069
- Zhang, L., Xie, F., Zhang, J., Dijke, P. et Zhou, F. (2017). SUMO-triggered ubiquitination of NR4A1 controls macrophage cell death. *Cell Death Differ.*, *24*(9), 1530-1539.
- Zhang, X., Smits, A. H., van Tilburg, G. B., Ova, H., Huber, W. et Vermeulen, M. (2018). Proteome-wide identification of ubiquitin interactions using UbIA-MS. *Nat Protoc*, *13*(3), 530-550. doi: 10.1038/nprot.2017.147
- Zhang, Y., Li, H. L., Wang, D. L., Liu, S. J. et Wang, J. Z. (2006). A transitory activation of protein kinase-A induces a sustained tau hyperphosphorylation at multiple sites in N2a cells-imply a new mechanism in Alzheimer pathology. *J Neural Transm (Vienna)*, *113*(10), 1487-1497. doi: 10.1007/s00702-005-0421-2
- Zhang, Z. (2016). Introduction to machine learning: k-nearest neighbors. *Ann Transl Med*, *4*(11), 218. doi: 10.21037/atm.2016.03.37
- Zhao, B., Chen, HZ., Du, XD., Luo, J., He, JP., Wang, RH., Wang, Y., Wu, R., Hou, RR., Hong, M., Wu, Q. (2011). Orphan receptor TR3 enhances p53 transactivation and represses DNA double-strand break repair in hepatoma cells under ionizing radiation. *Mol Endocrinol.*, *25*(8), 1337-1350.
- Zhao, B., Chen, HZ., Lei, NZ., Li, GD., Zhao, WX., Zhan, YY., Liu, B., Lin, SC., Wu, Q. (2006). p53 mediates the negative regulation of MDM2 by orphan receptor TR3. *The EMBO Journal*, *25*, 5703-5715.
- Zhao BX, C. H., Du XD, Luo J, He JP, Wang RH, Wang Y, Wu R, Hou RR, Hong M, Wu Q. (2011). Orphan receptor TR3 enhances p53 transactivation and represses DNA double-strand break repair in hepatoma cells under ionizing radiation. *Mol Endocrinol*, *25*(8), 1337-1350. doi: 10.1210/me.2011-0081
- Zhao, J. (2007). Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell Mol Life Sci.*, *64*(23), 3017-3033.
- Zhao, L., Zhou, S. et Gustafsson, J. A. (2019). Nuclear Receptors: Recent Drug Discovery for Cancer Therapies. *Endocr Rev*, *40*(5), 1207-1249. doi: 10.1210/er.2018-00222
- Zhao, Q., Xie, Y., Zheng, Y., Jiang, S., Liu, W., Mu, W., Liu, Z., Zhao, Y., Xue, Y., & Ren, J. (2014). GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic Acids Res*, *42*(Web Server issue), W325-330. doi: 10.1093/nar/gku383
- Zhao, X., Sternsdorf, T., Bolger, T. A., Evans, R. M. et Yao, T. P. (2005). Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4- and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications. *Mol Cell Biol*, *25*(19), 8456-8464. doi: 10.1128/MCB.25.19.8456-8464.2005
- Zhao, Y. et Bruemmer, D. (2010a). NR4A Orphan Nuclear Receptors: Transcriptional Regulators of Gene Expression in Metabolism and Vascular Biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, *30*(8), 1535-1541.

- Zhao, Y. et Bruemmer, D. (2010b). NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(8), 1535-1541. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.191163
- Zhao, Y., Liu, Y. et Zheng, D. (2008). Alpha 1-antichymotrypsin/SerpinA3 is a novel target of orphan nuclear receptor Nur77. *FEBS J*, 275(5), 1025-1038. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06269.x
- Zhou F, D. Y., Dekker TJ, de Vinuesa AG, Li Y, Hawinkels LJ, Sheppard KA, Goumans MJ, Luwor RB, de Vries CJ, Mesker WE, Tollenaar RA, Devilee P, Lu CX, Zhu H, Zhang L, Dijke PT. (2014). Nuclear receptor NR4A1 promotes breast cancer invasion and metastasis by activating TGF- β signalling. *Nature Communications volume*, 3388.
- Zhou, X. Z., Lu, P. J., Wulf, G. et Lu, K. P. (1999). Phosphorylation-dependent prolyl isomerization: a novel signaling regulatory mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 56(9-10), 788-806. doi: 10.1007/s000180050026
- Zhu, L. N., Qiao, H. H., Chen, L., Sun, L. P., Hui, J. L., Lian, Y. L., et al. (2018). SUMOylation of Alpha-Synuclein Influences on Alpha-Synuclein Aggregation Induced by Methamphetamine. *Front Cell Neurosci*, 12, 262. doi: 10.3389/fncel.2018.00262
- Zhu, W., Smith, J. W. et Huang, C. M. (2010). Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 840518. doi: 10.1155/2010/840518
- Zou Z, Y. Y., Shu Y, Gao R, Sun Y, Li X, Ju X, Liang Z, Liu Q, Zhao Y, Guo F, Bai T, Han Z, Zhu J, Zhou H, Huang F, Li C, Lu H, Li N, Li D, Jin N, Penninger JM, Jiang C. (2014). Angiotensin-converting enzyme 2 protects from lethal avian influenza A H5N1 infections. *Nat Commun.*, 5:3594. .

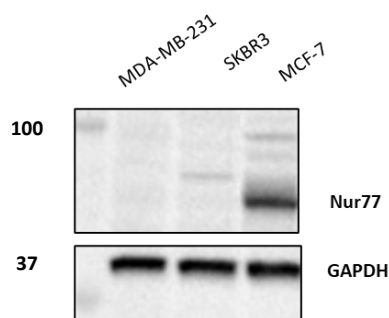
Annexes

1. Figures supplémentaires



Annexe 1 : Niveaux protéiques de NUR77 dans les cellules HEK293

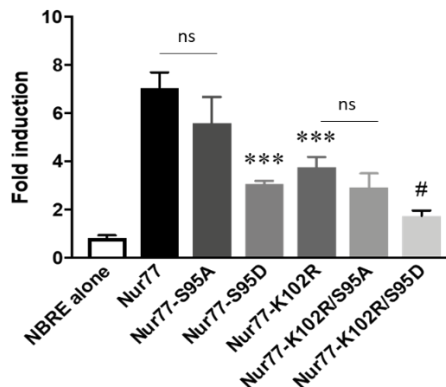
Les niveaux de protéines de NUR77 ont été évalués en Western Blot après la lyse des cellules HEK293. Le plasmide codant pour NUR77 a été transfecté (condition NUR77) ou non (NT : Non transfecté). Les cellules ont été traitées ou non avec la TSA, qui induit NUR77 (Kang, 2010). Le marqueur GAPDH a été utilisé comme contrôle de la quantité de protéines évaluée.



Annexe 2 – Niveaux protéiques de NUR77 dans 3 lignées cellulaires du cancer du sein

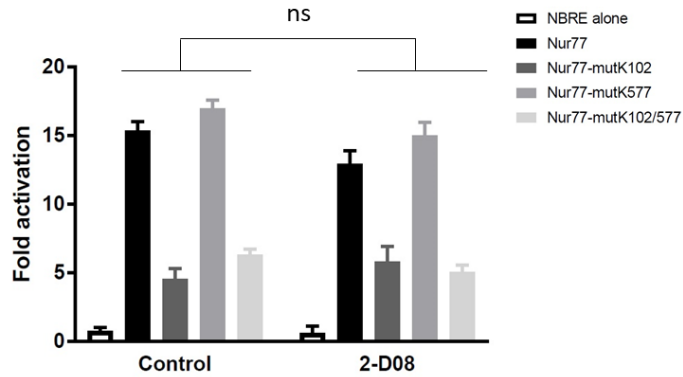
Les niveaux de protéines de NUR77 ont été évalués en Western Blot après la lyse des cellules MDA-MB-231, SKBR3 et MCF-7, représentatives du cancer du sein triple négatif, HER2+ et ER+

respectivement. Le marqueur GAPDH a été utilisé comme contrôle de la quantité de protéines évaluée.



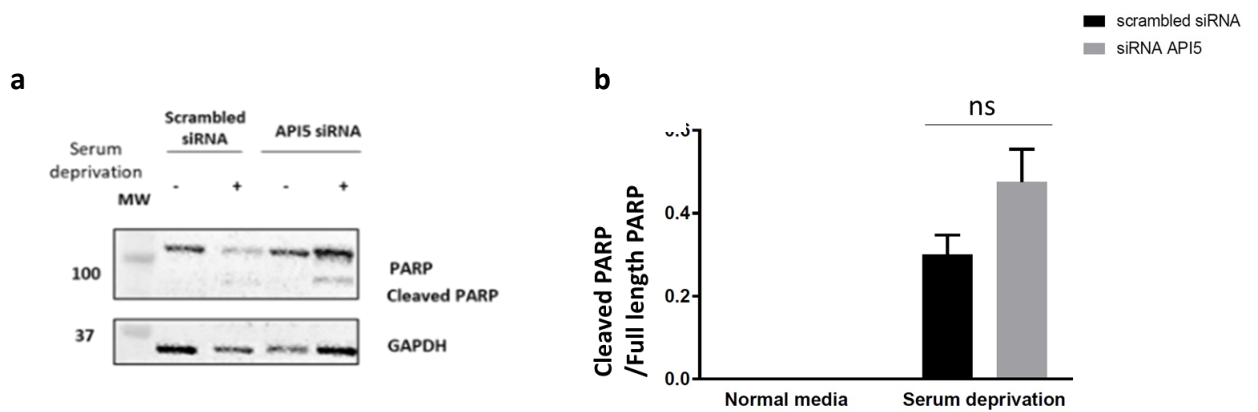
Annexe 3 – La mutation phospho-mimétique du résidu Sérine 95 (S95D) module l’activité transcriptionnelle de NUR77

Des cellules HEK293T ont été transfectées de manière transitoire avec des mutants 3xNBRE-Fluc (300 ng) et NUR77 ou NUR77 (K102R, S95A, S95D, K102R / S95A et K102R / S95D). Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été récoltées et les extraits testés pour l'activité luciférase. Les barres de l'histogramme représentent la moyenne \pm écart-type. Les données présentées sont représentatives de 3 expériences indépendantes (N = 2 ou les résultats sont représentatifs de 2 expériences réalisées indépendamment). L'analyse ANOVA à un facteur suivie d'un test post-hoc de comparaison multiple de Tukey a été appliquée pour déterminer la significativité statistique entre les groupes (*** $p < 0,001$ vs NUR77; # $p < 0,05$ vs mutant NUR77-K102R) (Dodat, Cotnoir-White, Mader and Lévesque - résultats non publiés).



Annexe 4 – L’inhibiteur de la SUMOylation 2-D08 ne modifie pas l’activité transcriptionnelle de NUR77

Les cellules HEK293T ont été transfectées de manière transitoire avec 3xNBRE-Fluc (300 ng), avec le vecteur de type sauvage NUR77 (100 ng) ou les mutants NUR77-K102R (200 ng), NUR77-K577R (150 ng) ou NUR77-K102R/K577R (150 ng). Les cellules ont été traitées 2h avec du 2-D08 (10 μ M) ou du DMSO (Contrôle). Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été récoltées et les extraits testés pour l'activité luciférase. La condition contrôle contient la construction NBRE seule. Les barres d'histogramme représentent la moyenne \pm écart-type ($N = 3$ expériences réalisées indépendamment avec 3 répétitions techniques dans chaque expérience). Une analyse ANOVA à un facteur suivie du test post-hoc de comparaison multiple de Tukey a été appliquée pour déterminer la significativité statistique entre le groupe traité versus non traité.

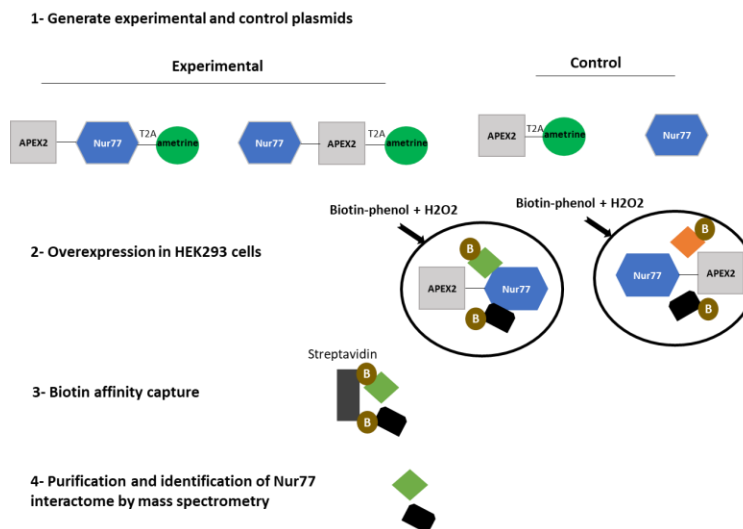


Annexe 5 – Évaluation du clivage de PARP après KD de API5 et privation de sérum

(a) Le clivage du marqueur apoptotique PARP a été évalué après KD de API5 et privation de sérum, en parallèle de l'évaluation de NUR77 et de API5 – voir **Figure 21**). La quantification de PARP clivé/PARP intégral est présentée en (b).

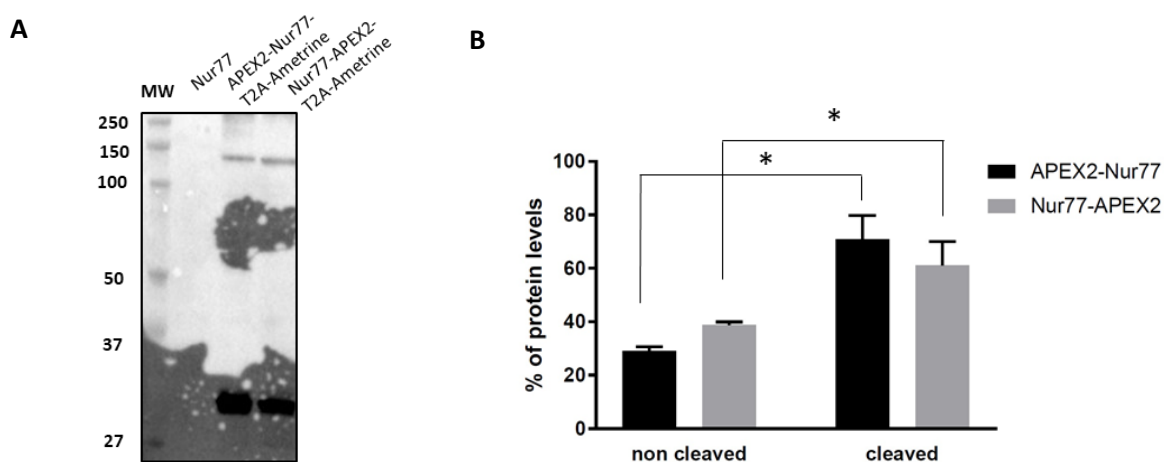
2. L'approche APEX2 : Données supplémentaires

Lors de notre étude décrite au chapitre 3, l'approche APEX2 a été développée en générant la protéine de fusion APEX2-NUR77-T2A-ametrine, utilisée pour identifier les protéines situées à proximité de NUR77. Deux protéines de fusion ont été générées au début du projet, APEX2 placée du côté soit N-, soit C-terminal de NUR77 (APEX2-NUR77-T2A-ametrine et NUR77-APEX2-T2A-ametrine) (**Annexe 5**). Ceci permettait d'optimiser nos chances d'identifier des protéines qui interagiraient avec NUR77 par différentes régions, les protéines recombinantes pouvant influencer la conformation et l'activité d'une protéine donnée (Federici, 2003; Wingfield, 2015). Les conditions expérimentales relatives aux deux protéines de fusion ont été optimisées. Dans les deux cas, l'amétrine est clivée efficacement (~70%) mais pas entièrement (**Annexe 6**). Ceci pose des limites dans l'identification des protéines d'interaction. En effet, des protéines interagissant avec la protéine au complète qui aurait une conformation différentes de celle de APEX2-NUR77 et NUR77-APEX2 pourraient être capturées.



Annexe 5 – Représentation schématique de l'approche APEX2 et protocole expérimental

Des cellules HEK293 ont été transfectées de manière transitoire avec les plasmides NUR77, APEX2-T2A-amétrine, NUR77-APEX2-T2A-amétrine et APEX2-NUR77-T2A-amétrine. Trente-six heures après la transfection, les cellules ont été traitées avec de la biotine-phénol pendant 30 min et du H₂O₂ pendant 1 min, puis lysées. La capture d'affinité de la biotine a été réalisée à l'aide de billes de streptavidine et les protéines ont été analysées par LC-MS/MS après le clivage par la trypsine.

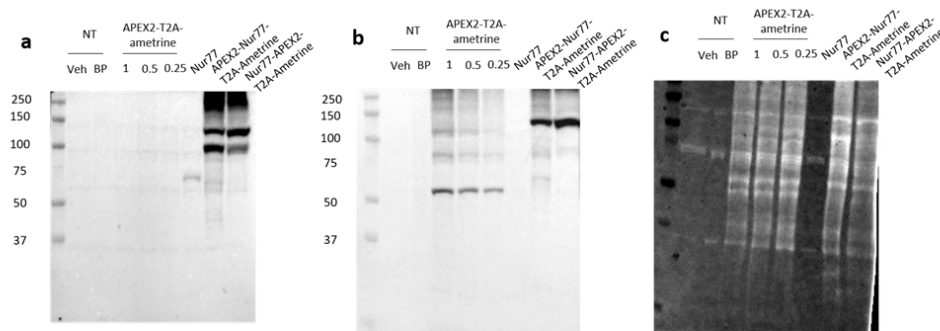


Annexe 6 – Les protéines APEX2-NUR77-T2A-amétrine et NUR77-APEX2-T2A-amétrine sont clivées de manière efficaces dans les cellules HEK293

Des cellules HEK293 ont été transfectées de manière transitoire avec NUR77, NUR77-APEX2-T2A-amétrine et APEX2-NUR77-T2A-amétrine. Trente-six heures après la transfection, les cellules ont été récoltées et lysées. (A) Les extraits totaux ont été migrés dans SDS-PAGE et le transfert Western a été réalisé avec un anticorps anti-GFP. (B) Analyse densitométrique du pourcentage de protéine clivée (amétrine) versus non clivée (APEX2-NUR77-T2A-amétrine et NUR77-APEX2-T2A-amétrine).

Afin de transfecter la même quantité de protéines pour le contrôle APEX2-T2A-amétrine et les conditions expérimentales, une titration de ce plasmide a été réalisée avec 3 concentrations testées

(10µg, 5µg, 2.5 µg pour 5 millions de cellulesensemencées au Jour 1) (**Annexe 7**). Les niveaux de protéines de APEX2-T2A-ametrine et le niveau de biotinylation sont sensiblement similaires quelle que soit la concentration transfectée. Pour obtenir le moins de bruit de fond possible, la plus petite quantité (2.5µg) du contrôle APEX2-T2A-ametrine a donc été utilisée pour les analyses de spectrométrie de masse.



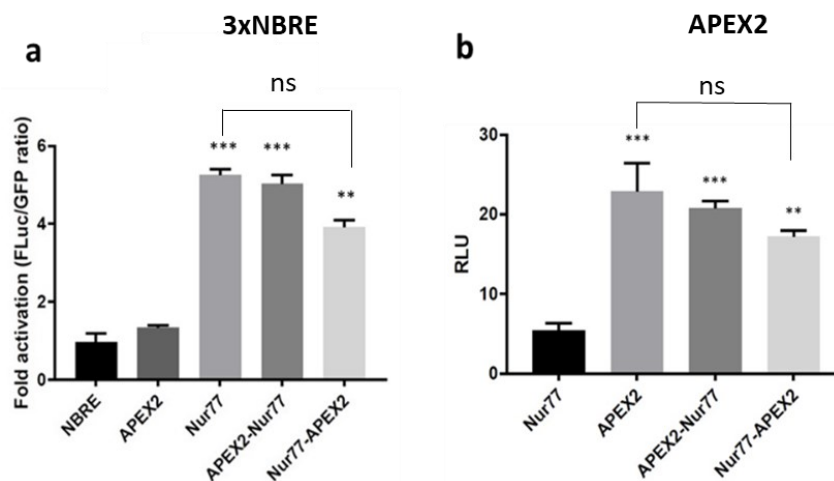
Annexe 7 – Titration de APEX2-T2A-ametrine et comparaison des expressions protéiques dans les cellules HEK293

Les extraits protéiques ont été migrés sur SDS-PAGE et des transferts Western réalisés avec (a) un anticorps anti-NUR77, (b) un anticorps anti-GFP et (c) un anticorps streptavidine conjugué à l’Alexa fluor488.

Les plasmides APEX2-NUR77-T2A-ametrine et NUR77-APEX2-T2A-ametrine ont été transfectés dans les cellules HEK293 et les culots protéiques issus de la purification ont été envoyés pour analyse de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) (**Annexe 5**). Les protéines ont été identifiées par la présence d’un ion détecté avec un rapport masse sur charge (m/z) spécifique, dont l’intensité peut être enregistrée (DeSouza et Siu, 2013). Comme souligné dans l’introduction, les technologies utilisant la biotine peuvent bénéficier de procédés de marquages protéiques qui apportent plus de fiabilité aux résultats (Aggarwal et al., 2006; Deng et al., 2019; DeSouza et Siu, 2013; Sinclair et Timms, 2011; Stewart et al., 2001). Toutefois, les procédés de quantification nécessitent une plus grande concentration d’échantillons et un coût supérieur en matériel, ainsi que des logiciels de quantifications spécifiques (DeSouza et Siu, 2013). Pour notre étude, nous avons opté pour une quantification par spectrométrie de masse, sans marquage, afin d’obtenir des résultats plus rapides (Zhu et al., 2010). En contrepartie, les

expériences ont été menées à chaque fois avec répliques biologiques et techniques, afin d’assurer la reproductibilité et de détecter des différences significatives d’abondance entre protéines entre les différentes conditions (DeSouza et Siu, 2013).

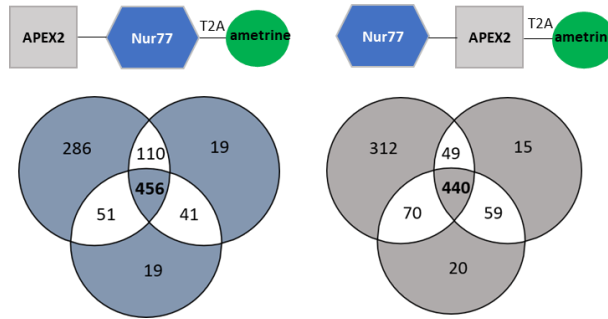
La mesure par LC-MS/MS nous a permis d’extraire deux types de données, à savoir la mesure des changements d’intensité des protéines et le comptage spectral. Dans le chapitre 3, la mesure des changements d’abondance des protéines situées à proximité de NUR77 est issue de la comparaison entre l’intensité des protéines dans la condition APEX2-NUR77-T2A-ametrine et les conditions contrôles (Zhang et al., 2018). La combinaison des conditions expérimentales NUR77-APEX2-T2A-ametrine et APEX2-NUR77-T2A-ametrine diminuait en effet considérablement la quantité de protéines identifiées de manière significative dans les conditions tests en comparaison avec les conditions contrôles. L’ajout de la protéine de fusion APEX2, susceptible d’engendrer des modifications de la conformation de NUR77 et/ou de son interaction avec des protéines pourrait expliquer en partie cette variabilité entre les deux constructions (Federici, 2003; Wingfield, 2015). Cette hypothèse est soutenue par les résultats des essais rapporteurs évaluant l’activité transcriptionnelle de NUR77 sur l’élément de réponse en monomère NBRE et les essais de luminescence évaluant l’activité de APEX2 (**Annexe 8**). Ces résultats révèlent que les activités transcriptionnelle et de luminescence de NUR77-APEX2-T2A-ametrine ont tendance à être diminuées, en comparaison à NUR77 et APEX2, de manière respective.



Annexe 8 – L’activité transcriptionnelle de NUR77 et l’activité de luminescence de APEX2 sont maintenues dans les cellules HEK293

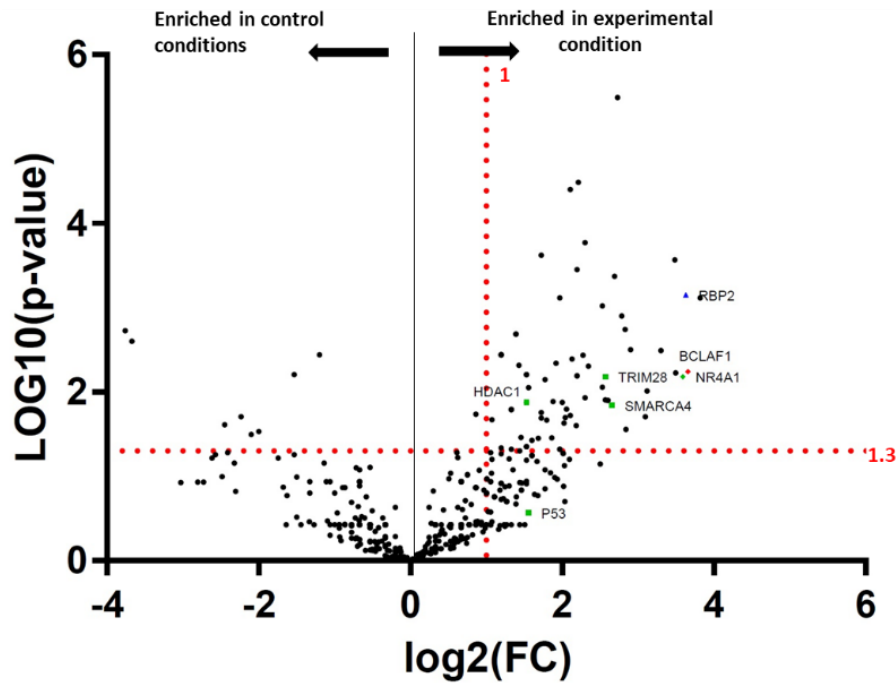
(a) Des cellules HEK293 ont été transfectées de manière transitoire à l'aide du PEI avec les plasmides 3xNBRE-Fluc (300 ng), NUR77, APEX2-T2A-ametrine, NUR77-APEX2-T2A-ametrine et APEX2-NUR77T2A-ametrine (100 ng). Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été récoltées et lysées, et les échantillons ont été testés pour l'activité luciférase. Les barres de l'histogramme représentent la moyenne \pm écart-type ($N = 3$). Un résultat représentatif est représenté ici. Une analyse ANOVA à un facteur suivie du test post-hoc de comparaison multiple de Tukey a été appliquée pour déterminer la significativité statistique entre le contrôle 3xNBRE et 3xNBRE+NUR77 ou 3xNBRE+APEX2 ou 3xNBRE+APEX2-NUR77 ou 3xNBRE+NUR77-APEX2 (** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$). **(b)** Des cellules HEK293 ont été transfectées de manière transitoire avec des plasmides NUR77, APEX2-T2A-amétrine, NUR77-APEX2-T2A-amétrine et APEX2-NUR77-T2A-amétrine (100 ng). Trente-six heures après la transfection, les cellules ont été récoltées et lysées, et les échantillons ont été dosés pour l'activité lumineuse après l'addition de réactif peroxyde et de luminol. Les barres de l'histogramme représentent la moyenne \pm écart-type ($N = 3$). Une analyse ANOVA à un facteur suivie du test post-hoc de comparaison multiple de Tukey a été appliquée pour déterminer la significativité statistique entre le contrôle APEX2 et APEX2 ou NUR77 APEX2-NUR77 ou NUR77-APEX2 (** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$).

En parallèle de notre étude menée dans le chapitre 3, nous avons mesuré les changements d'abondance de l'interactome de NUR77 entre les conditions expérimentales combinées (APEX2-NUR77-T2A-ametrine et NUR77-APEX2-T2A-ametrine) et les conditions contrôles combinées basés sur le comptage spectral. Cette quantification a identifié 456 et 440 protéines communes aux trois répliques de spectrométries de masse dans les conditions expérimentales APEX2-NUR77-T2A-ametrine et NUR77-APEX2-T2A-ametrine respectivement (**Annexe 9**). La comparaison des conditions expérimentales et contrôles révèle 148 protéines qui présentent un FC ≥ 2 et une p -value ≤ 0.05 (Figure 30). Les 25 premières protéines de cette analyse sont présentées dans l'**annexe 11**.



Annexe 9 - Nombre total de protéines enrichies dans les conditions expérimentales APEX2-NUR77-T2A-ametrine et NUR77-APEX2-T2A-ametrine.

La superposition des trois expériences de spectrométrie de masse apparaît en gras.



Annexe 10 – Changements d’abondance de l’interactome de NUR77 entre les conditions expérimentales combinées et les conditions contrôles combinées estimés par le nombre spectral de protéine.

Le graphique affiche les protéines en fonction de leur fold change et de leur p-value calculés par une analyse différentielle entre les interactome de APEX2-NUR77-T2A-amétrine et de NUR77-APEX2-T2A-amétrine combinés et de APEX2-T2A-amétrine et de NUR77 combinés. Les protéines à droite de la barre rouge affichent un changement d’au moins 2 fois dans les trois répliques des conditions expérimentales par rapport aux contrôles. Les protéines affichant un $\log_2(FC) \geq 1$ (FC

≥ 2) et $-\log_{10}(p\text{-value}) \geq 1,3$ ($p\text{-value} < 0,05$) ont été considérées comme significatives et sont situées dans la partie supérieure droite du graphique. Certaines des protéines déjà connues pour interagir avec NUR77 sont symbolisées par un carré vert et la protéine BCLAF1 est identifiée par un losange rouge.

Protein name	Gene name	Log2(FC)	$-\log_{10}(p\text{-value})$	Main cellular compartment
Splicing factor 3B subunit 1	SF3B1	3,82	3,12	nucleus
Bcl-2-associated transcription factor	BCLF1	3,66	2,24	nucleus
E3 SUMO-protein ligase RanBP2	RBP2	3,63	3,15	nucleus, cytosol
Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1	NR4A1	3,59	2,18	nucleus, cytosol
Far upstream element-binding protein 2	FUBP2	3,50	2,23	nucleus, cytosol
Far upstream element-binding protein 1	FUBP1	3,49	3,57	nucleus
U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	U520	3,30	2,49	nucleus
Thyroid Hormone Receptor Associated Protein	TR150	3,12	2,01	nucleus
Nuclear mitotic apparatus protein 1	NUMA1	3,10	1,71	plasma membrane, cytoskeleton, nucleus
rRNA biogenesis protein RRP5	RRP5	2,90	2,50	nucleus, cytosol
Serrate RNA effector molecule homolog	SRRT	2,84	1,56	nucleus
Tubulin beta chain	TBB5	2,83	2,74	cytoskeleton, nucleus
Filamin-A	FLNA	2,79	2,90	plasma membrane, cytoskeleton, nucleus
Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase	SYEP	2,73	5,49	cytosol
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	U5S1	2,69	3,37	nucleus, cytosol
SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator	SMCA4	2,66	1,84	nucleus
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	CHD4	2,60	1,90	cytoskeleton, nucleus
RNA Binding Motif Protein 26	RBM26	2,60	1,90	nucleus
Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein R	HNRPR	2,57	1,91	nucleus

Tripartite Motif Containing 28	TIF1B	2,57	2,18	nucleus
Treacle Ribosome Biogenesis Factor 1	TCOF	2,53	2,06	nucleus, cytosol
SPT5 Homolog, DSIF Elongation Factor Subunit	SPT5H	2,53	3,02	nucleus
Polyadenylate-binding protein 1	PABP1	2,35	2,31	nucleus, cytosol
Structural maintenance of chromosomes protein 3	SMC3	2,30	1,93	cytoskeleton, nucleus, cytosol
Splicing factor 3B subunit 1	SF3B1	3,82	3,12	nucleus

Annexe 11 - Liste des 25 premières protéines affichant le plus grand *fold change* dans les changements d'abondance de l'interactome de NUR77 entre les conditions expérimentales combinées et les conditions contrôles combinées estimés par le nombre spectral de protéine.

Les 25 premières protéines enrichies plus de 2 fois (fold change > 2) de manière significative (p-value < 0,05) dans les cellules HEK293 en comparant les conditions expérimentales combinées (APEX2-NUR77-T2A-ametrine et NUR77-APEX2-T2A-ametrine) par rapport aux conditions contrôles combinées (APEX2-T2A-ametrine et NUR77).

Même si ces deux approches (intensité de peptides et comptage spectral) ne permettent pas de quantifier de manière absolue la concentration d'une protéine, il est possible d'effectuer une quantification relative et d'estimer l'expression différentielle de cette protéine en comparant l'abondance d'une protéine donnée entre la ou les conditions tests (APEX2-NUR77 et NUR77-APEX2) et les conditions contrôles (APEX2-T2A-ametrine et NUR77) (DeSouza et Siu, 2013). Ces approches sont notamment utilisées dans la détection des biomarqueurs pour certaines maladies et cancers ou dans l'évaluation des changements des protéomes dans certains processus biologiques (Lai et al., 2013). Dans les deux quantifications, NUR77 et des protéines – principalement nucléaires (Annexe 10 et 11) – identifiées dans la littérature comme interacteurs de NUR77 ont été retrouvées abondamment et de manière significative (**Figure 19** et **Annexe 10**), confirmant que nos essais ont fonctionné. Si certaines protéines identifiées sont similaires dans les deux approches comme TRIM28, HDAC1 et SMARCA4 (Hamers, 2016; Kang, 2010; Rambaud, 2009), d'autres sont différentes selon la quantification utilisée. La quantification basée sur l'intensité de peptides a identifié l'interacteur de NUR77 déjà connu SMARCC2 (**Figure 19**) (Hamers, 2016) alors que celle basée sur le comptage spectral a identifié P53 (**Annexe 10**) (Zhao, 2006).

3. Revue de littérature: What is known about SUMOylation among NR4A family members?

Statut: *soumis à Journal of Molecular Biology*

Auteurs: Fatéma Dodat^{1,2*}, Sylvie Mader² and Daniel Lévesque¹

Affiliations: ¹*Faculté de Pharmacie, Université de Montréal* and ²*Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie (IRIC), Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada*

* : Auteur correspondant de l'article

3.1 Abstract

NR4A receptors, including Nur77 (NR4A1), Nurr1 (NR4A2) and NOR-1 (NR4A3), form a family of nuclear receptors that act as transcription factors to regulate many physiological and pathological processes such as cell cycle and apoptosis, lipid metabolism, inflammation, carcinogenesis, vascular and neuronal functions. In the absence of known endogenous ligand modulating their physiological functions, the NR4A family of receptors still remains a class of orphan receptors. However, several post-translational modifications (PTMs), including SUMOylation, regulate the expression and/or activity of these receptors. Addition of small ubiquitin-like Modifier (SUMO) proteins is a dynamic and reversible enzymatic process that regulates multiple essential functions of proteins, including nuclear receptors. This review aims at summarizing what is known about the impact of SUMOylation on NR4A family member transcriptional activities and physiological functions.

Key words: Post-translational modification, Small ubiquitin-like modifier protein, NUR77, NURR1, NOR-1.

3.2 Introduction

NUR77 (NR4A1, NGFI-B, TR3), NURR1 (NR4A2) and NOR-1 (NR4A3), members of the NR4A subfamily of nuclear receptors (Davis, 1994; Milbrandt, 1988; Ohkubo et al., 2002), are transcription factors that participate in multiple essential cellular functions such as cell cycle and

apoptosis, lipid metabolism, inflammation, carcinogenesis, vascular and neuronal functions, among others (Boylan, 1996; Ke, 2004; Koenis, 2018; Martínez-González, 2005; Zou Z, 2014). Due to their key roles in physiology and disease, they have been suggested as potential therapeutic targets in several pathologies (Deutsch, 2012; Herring et al., 2019; Liu, Gao et Chang, 2017; Pols et de Vries, 2008; Ranhotra, 2015b; Rodríguez-Calvo, 2017; Safe, 2014). NR4A receptors are thought to function without a functional canonical ligand binding pocket since structural studies revealed that NUR77 and NURR1 ligand binding pockets lack a cavity to accommodate a ligand (Flaig et al., 2005; Wang, 2003). Some groups have identified potential ligand-induced Nr4a activities (Munoz-Tello et al., 2020; Rajan et al., 2020; Safe, 2014; Zhan, 2008) but the mechanism of action of these ligands remains unclear. Therefore, understanding the impact of post-translational modifications (PTMs) such as SUMOylation in this particular nuclear receptor subfamily is important to better understand their physiological regulation and, potentially, how to target them in specific pathological contexts.

PTMs play crucial roles in regulating levels and activity of multiple proteins, including nuclear receptors (Anbalagan, 2012). They can modify protein-protein interactions, impacting subcellular localization, functional properties or protein stability (Stram, 2016; Tolsma, 2019; Venne, 2014). Importantly, physiological consequences can vary depending not only on the nature, but also on the localization of the PTMs on the target protein (Lalevée, 2010). To date more than 450 different types of protein modifications have been identified (Venne, 2014). PTMs include phosphorylation, acetylation, methylation, ubiquitination and SUMOylation (addition of Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) proteins), among many others (Hunter, 2007).

PTMs can be divided into two main classes. The first class includes PTMs that add or remove a functional group on specific amino acid residues of target proteins. The second class of modifications involves the addition of a protein or peptide (Rochette-Egly, 2003a). SUMOylation, which belongs to the second class, has increasingly gained attention since its initial discovery in 1995 in *Saccharomyces cerevisiae* by Meluh and Koshland (Meluh et Koshland, 1995). SUMOylation can interfere with multiple aspects of the protein, including its stability, subcellular localization and functional properties (Wilkinson et Henley, 2010). This pathway exists in all eukaryotes and has been identified as essential for the regulation of signal transduction, transcriptional regulation, chromatin structure and DNA repair (Zhao, 2007). Also, mutations

affecting components of the SUMO pathway were revealed to be either lethal or to have strong pleiotropic phenotypes (Geiss-Friedlander et Melchior, 2007). SUMOylation is therefore an important process in protein regulation and its perturbation contributes to the development of multiple diseases (Zhao, 2007) such as cancer (Bergink et Jentsch, 2009; Han, Feng, Gu, Li et Chen, 2018), diabetes (Davey, Carmichael et Craig, 2019; Gao, Huang, Kanasaki et Xu, 2014) and neurodegenerative disorders (Alzheimer, Parkinson and Huntington diseases) (Henley et al., 2014), among others. SUMOylation has specially been revealed as an essential regulatory mechanism for different nuclear receptors (Anbalagan, 2012; Le Drean, 2002; Traboulsi, 2019).

3.3. The SUMOylation process

SUMOylation consists of the reversible covalent attachment of one or multiple SUMO proteins to one or several lysine residues of a target protein (Dohmen, 2004). Four SUMO proteins have been studied to date, named as SUMO-1 to -4. The first three types are present in mammals and widely expressed in human tissues, SUMO-4 being less characterized (Owerbach, 2005; Wang, 2009). Recently, a novel SUMO isoform, SUMO-5 present in primates has been described (Liang et al., 2016). Since the sequences of SUMO-2 and SUMO-3 are very similar, they are not easily distinguished by antibodies and often described together as SUMO-2/3 (Ayaydin, 2004). SUMO-1 seems to be the most active isoform in basal conditions, whereas SUMO-2/3 conjugation appears to be induced by triggering events such as cellular stresses (Saitoh, 2000). For example, exposing COS-7 cells to a heat shock stress induces a decrease of the pool of free SUMO-2/3 and an accumulation of high molecular mass SUMO-2/3 signals, suggesting that SUMO-2/3 conjugate to proteins after heat elevation. In addition, the ratio between free SUMO-2/3 and high molecular mass conjugates was returned to the basal state after 60 min when cells were switched back to the regular culture temperature (37°C), implying a dynamic and fast modification process (Saitoh, 2000).

3.3.1 Reversible SUMOylation cycle

There are five main steps in the SUMOylation cycle, every one of them being enzymatically controlled (Figure 1). The first step is a maturation step in which SUMO proteins are cleaved by Sentrin-Specific Proteases (SENPs). These enzymes remove the last four amino acids at the C-terminus of SUMO proteins, revealing the diglycine (GG) motif (Desterro et al., 1999). The second

step, called activation, is catalyzed by a unique E1 activating enzyme, a heterodimer of SAE1 and SAE2 subunits (SUMO-activating enzyme subunits 1 and 2 respectively) in mammals (Fig. 1). This activation is ATP-dependent and connects the C-terminal carboxyl group of the SUMO protein to the cysteine residue of SAE2 through a thioester bond (Desterro et al., 1999). SUMO conjugation is the third step and is mediated by the E2 enzyme, the only one characterized in mammals so far being Ubc9 (Fig. 1). The SUMO protein is transferred first to cysteine 93 of Ubc9, which results in an E2-SUMO thioester complex (Bernier-Villamor, 2002). Ubc9 can then directly conjugate the SUMO protein to the lysine residue of a target protein through an isopeptide bond. In addition, an E3 ligase can also intervene to promote SUMO conjugation to target proteins (Fig. 1). This ligation step stabilizes the substrate and SUMO-E2 complex interaction, facilitating the transfer of the SUMO protein to the substrate. They also reduce the distance between the E2 enzyme-SUMO complex and the lysine of the substrate. The better characterized E3 ligases so far are the Protein inhibitors of activated STAT (PIAS 1, 2, 3 and 4 or γ) and Ran binding protein 2 (RanBP2) in mammals (Rytinki, 2009; Tatham et al., 2005). Other less characterized SUMO E3 ligases have been identified in mammals and other species (Table 1) (Hochstrasser, 2001; Johnson et Gupta, 2001; Liang et al., 2018; Pichler, Gast, Seeler, Dejean et Melchior, 2002; Pungaliya, 2007; Subramaniam et al., 2010; Varejao et al., 2018; Yang, 2010; Zhao, Sternsdorf, Bolger, Evans et Yao, 2005). Finally, a deconjugation step, catalyzed by one of the 6 SENPs (SEN1, SEN2, SEN3, SEN5, SEN6, SEN7), removes SUMO tags from the lysine residue(s) of the target protein (Fig. 1). Thus, SENPs exert two important roles in the cycle, maturation and deconjugation. Each SENP has its own specificity for different SUMO protein isoforms, with SEN1 preferring SUMO1 over SUMO2, and SUMO3 and SEN2 being most active on SUMO2. Data are still lacking for SEN3 processing activity, but SEN5 seems to have a pronounced preference for SUMO2 cleavage and SEN6 and SEN7 to be almost inactive during SUMO maturation step (Kunz, 2018; Nayak, 2014).

3.3.2 SUMO attachments sites

Typically, lysine residue subjects to SUMO modification are located within a SUMO consensus Ψ KX(E/D) motif (where Ψ is a hydrophobic residue, K a lysine residue, X any residue and E/D are either a glutamic acid or an aspartic acid respectively). To note, not all proteins containing this

consensus sequence is conjugated by SUMO, suggesting the involvement of other factors that can modulate protein structure and thus facilitate the presentation of the sequence to the substrate protein (Hay, 2005).

Proteomic studies have also revealed alternative motifs, including the PDSM (Phosphorylation Dependent SUMOylation Motif) and the V/I-X-V/I-V/I (Hay, 2005; Hietakangas, 2006; Song, Durrin, Wilkinson, Krontiris et Chen, 2004). In addition, SUMO proteins can non-covalently interact with other proteins through targeting specific SUMO-interacting motifs (SIMs) which can be crucial for regulating their activity (Zhao, 2014). Indeed, SIM within Daxx receptor revealed to be essential for trans-repression of several SUMOylated transcription factors, including glucocorticoid receptor (Lin DY, 2006) and the non-covalent binding of SUMO2 and CoREST1, but not the SUMOylation, is necessary for organizing the transcriptional corepressor complex of LSD1/CoREST1/HDAC (Ouyang, Shi, Valin, Xuan et Gill, 2009).

3.3.3 SUMOylation and protein group modification

Another striking difference between SUMOylation and other PTMs lies in its operating system. Whereas most PTMs provide new properties to selected individual proteins through specificity, SUMOylation appears to target a protein group rather than an individual protein. Initially shown for DNA repair like homologous recombination proteins, multiple repair proteins are synchronously modified by a SUMOylation wave (Psakhye et Jentsch, 2012). Besides, these proteins are SUMOylated at multiple sites. Similar results were observed for protein groups involved in nucleotide excision repair (Silver, Nissley, Reed, Hou et Johnson, 2011), ribosomal proteins (Finkbeiner, Haindl et Muller, 2011; Panse et al., 2006), proteins of small nucleolar RNPs (Westman et Lamond, 2011) and yeast septins (Johnson et Blobel, 1999; Johnson et Gupta, 2001; Takahashi, Kahyo, Toh, Yasuda et Kikuchi, 2001). Taking together, this suggest that modifying protein group is a typical feature of the SUMO pathway.

As NR4A members belong to same protein family and are involved in DNA repair (Munnur, 2019; Pols et de Vries, 2008; Yin K, 2017; Yin, Sturm et Smith, 2014), it is legitimate to interrogate if similar process could be observed in these nuclear receptors and how it would affect their activity.

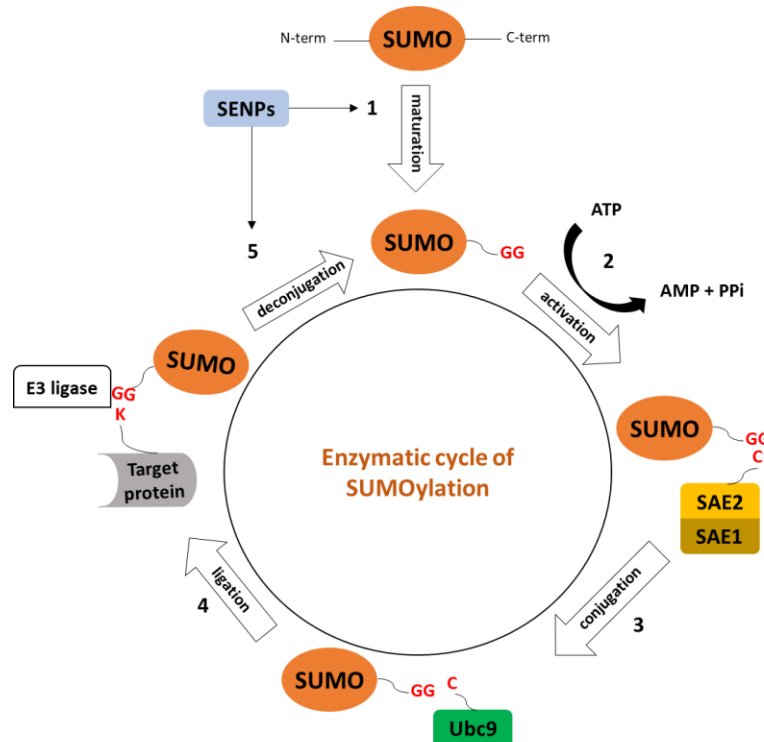


Figure 1: The SUMOylation enzymatic cycle

The process of SUMOylation occurs in 5 enzymatically controlled steps. The first step consists in the maturation of the SUMO protein by the SENPs (Sentrin-Specific Protease protein), revealing the C-terminal diglycine motif. The second step, which is ATP dependent, activates the SUMO protein by the E1 enzymatic complex SAE1/SAE2. The third step transfers the SUMO to the E2 Ubc9 enzyme, which leads to the conjugation of SUMO to the target protein. Another class of enzymes, the E3 ligases (including RanBP2 and PIAS proteins) can increase the efficacy of the conjugation step and/or the diversity of target sites. The SUMO tags are ultimately deconjugated from the target protein by SENP proteins, regenerating the pool of unconjugated SUMO proteins (Inspired from Hay et al, 2005 (Hay, 2005)).

Species	SUMO E3 ligase	Subcellular localization	References
Fruit fly	Siz/PIAS RING	-	(Hochstrasser, 2001; Rytinki et al., 2012)
<i>C. elegans</i>	Siz/PIAS RING	-	(Hochstrasser, 2001; Rytinki et al., 2012)

Yeast	Nse2, pli1 SIZ1, SIZ2/NFII, MMS21	-	(Hochstrasser, 2001; Liang et al., 2018; Rytinki et al., 2012; Varejao et al., 2018)
Mammals	Protein Inhibitor of STAT (PIAS): PIAS1, PIAS2a, PIAS2b, PIAS3, PIAS4	Nucleoplasm, bodies	nuclear (Rytinki et al., 2012)
	Ran Binding Protein 2 (RanBP2)	Nuclear pore Nucleus, cytoplasm	(Pichler et al., 2002) (Yang, 2010) (Zhao et al., 2005)
	Human Polycomb homolog (PC2)	2 Nucleus	(Pungaliya, 2007)
	Histone Deacetylase (HDAC4)	4 Cytoplasm	(Subramaniam et al., 2010)
	Topoisomerase I-binding RING finger protein (TOPORS)		
	Ras homolog enriched in striatum (RHES)		

Table 1: SUMO E3-ligase identified among species and their subcellular localization

3.4 SUMOylation in NR4As family members

As NR4A members are orphan nuclear receptors with no endogenous ligands discovered so far, PTMs and in particular SUMOylation, could be of crucial importance for the regulation and activity of these NR. Since NR4As often exert redundant activities (Lee, 1995), it is legitimate to interrogate if these nuclear receptors are targeted and regulated by SUMOylation in a similar manner.

3.4.1 NURR1 SUMOylation

The first evidence of SUMOylation in NR4A members was obtained in NURR1 (NR4A2). The isoform 4 of PIAS (PIAS γ) has been shown to interact with NURR1 in COS-1 and HEK293 cells using GST pulldown assay and immunoprecipitation, respectively. This interaction decreased NURR1 transcriptional activity on the monomer response element of the NR4A subfamily (NBRE, 5'-AAAGGTCA-3'). Moreover, two putative consensus SUMOylation sites have been investigated in NURR1, lysine 91 and 577 (Arredondo, 2013). Mutations of lysine 91 or 577 into arginine - abrogating the ability to be modified by SUMO proteins - increased or decreased NURR1 transcriptional activity, respectively. Modulation of SUMOylation has therefore a crucial impact on the activity of this transcription factor (Galleguillos, 2004). However, PIAS γ repression of NURR1 transcriptional activity did not involve its E3 activity on those sites (Arredondo, 2013). These authors showed that PIAS γ could repress NURR1 by two different mechanisms. Indeed, NURR1 is SUMOylated by SUMO2 on lysine 91 in COS-7 cells (Galleguillos, 2004). Interestingly, PIAS γ increased the addition of SUMO2 protein on NURR1, but a mutant of PIAS γ lacking the SUMO ligase activity was not able to do so, suggesting that PIAS γ is important for SUMOylation on this residue (Arredondo, 2013). In addition, this mutant could still repress NURR1 transcriptional activity and interacts with the receptor through its LXXLL motif, a well characterized interaction motif with NR (Chang, 1999; Heery et al., 1997). These observations reveal a dual role for PIAS γ as a NURR1 modulator, one through its E3 ligase activity and another that still needs to be further characterized, but most likely as a transcriptional corepressor. SUMOylation on lysine 91 of NURR1 did not change NURR1 localization in the cell nor its stability (Arredondo, 2013).

However, NURR1 SUMOylation can have other physiological consequences (Saijo, 2009). As previously demonstrated (Galleguillos, 2004), NURR1 can also be SUMOylated in its C-terminal

part by SUMO-2/3 in HeLa cells. Mutations of lysine 558 (belonging to a putative SUMOylation site) and 576 in mouse (equivalent of lysine 577 in human) of NURR1 induce a decrease and an increase in NURR1 transcriptional activity when it binds, respectively, to the monomer response element NBRE and to the direct response element 5 (DR-5). NURR1 can bind to DR5 in heterodimer with its partner Retinoid X Receptor (RXR) (Perlmann, 1995b), supporting a role for SUMOylation in NURR1 activity in a response element-specific manner. This SUMOylation event is necessary for NURR1 to recruit the corepressor CoREST to NF- κ B target genes, which reduces the expression of proinflammatory genes such as the one encoding Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) (Saijo, 2009). Since NURR1 is known to counteract inflammation, especially in the brain, this mechanism could be relevant to understand its involvement in neuroinflammatory processes (Montarolo, 2019; Popichak, 2018a). However, another study showed that mutation of lysine 558 into arginine did not modify the SUMOylation pattern of NURR1 (Arredondo, 2013). This study suggests that this site might not be a target of SUMOylation, but rather that the mutation could modify the recruitment of cofactors by NURR1 and therefore, induce change in NURR1 transcriptional activity. A summary of the impact of the main SUMO sites on NURR1 transcriptional activity is presented in Table 2. It is important to note that all those experiments have been conducted by overexpressing NURR1, SUMO-2 and PIAS γ , which could affect endogenous SUMOylation mechanisms and result in nonphysiological effects. Also, mutations of acceptor sites can influence receptor activity independently from SUMOylation, complicating interpretation of results.

3.4.2 NUR77 SUMOylation

Another member of the NR4A family, NUR77, has also been shown to be SUMOylated in HEK-293T and HeLa cells (Popichak, 2018b). SUMO-2/3, which modifies NURR1, can also be conjugated to NUR77. However, the E3 ligase promoting SUMOylation can be different, as it has been shown that PIAS3 increases NUR77 SUMOylation (Zhang et al., 2017). This in turn induces NUR77 polyubiquitination by the ubiquitin ligase RNF4, which recognizes and ubiquitinates poly-SUMOylated proteins, leading to their degradation by the proteasome (Heideker, 2009). NUR77 SUMOylation is also important for rapid degradation of NUR77 upon stress as well as regulating NUR77 inhibition of proinflammatory genes such as TNF α and Interleukin-1 β in macrophages (Zhang et al., 2017). Two putative consensus SUMOylation sites have been identified in the study, lysine 101 and lysine 577. Mutations of both lysines to arginines led to an increase in NUR77 stability as demonstrated with Western blot at different time points performed after cycloheximide treatment (Zhang et al., 2017). These observations suggest that SUMOylation would decrease NUR77 half-life, as observed for other nuclear receptors (Druker, 2013; Rytinki et al., 2012; Traboulsi, 2019).

Recently, another study linked NUR77 SUMO modification to cell death (Zárraga-Granados G, 2020). Indeed, NUR77 SUMOylation by SUMO-1 and SUMO-2/3 was increased in HEK-293 cells after substance P administration, which is known to induce autophagic cell death via NUR77 (Castro-Obregón, 2002). NUR77 SUMOylation happens subsequently to phosphorylation at threonine 143 residue in this context (Zárraga-Granados G, 2020). Moreover, NUR77 SUMOylation appears to induce the export of NUR77 out of the nucleus, whereas phosphorylation would be necessary to retain it. Using the viral protein GAM1, which degrades SUMOylation enzymes SAE1/SAE2 and Ubc9, the authors showed that SUMOylation increased NUR77 basal stability (Zárraga-Granados G, 2020). SUMO acceptor sites at lysines 102, 558 and 577, and

potentially other consensus and SIM sites at lower levels are associated with this signaling event (Zárraga-Granados G, 2020). The use of a triple mutant (K102R/ K558R/K577R) of NUR77 that cannot be SUMOylated at its main consensus sites suggested that NUR77 SUMOylation is essential for substance P-induced autophagic cell death (Zárraga-Granados G, 2020).

Since K91 and K577 SUMO acceptor sites found in NURR1 showed opposite effects on the transcriptional activity of this nuclear receptor (Arredondo, 2013; Galleguillos, 2004) and only double or triple mutants of NUR77 had been investigated, our group evaluated the impact of individual K102R and K577R mutations on NUR77 activity (Dodat et al., 2021). Interestingly, phylogenetic analyses of these putative SUMO acceptor sites revealed that lysine 577 is fully conserved across different species (human, macaque, rat, mouse, birds and drosophila) in NUR77, NURR1 and NOR-1, whereas lysine 102 appeared later in mammals, suggesting that this site might represent a more recent adaptation of the gene (Dodat et al., 2021). Mutations of these sites in NUR77 did not affect the stability of the receptor in HEK-293T cells, contrary to previous works reporting that NUR77 SUMOylation could lead to increased degradation of the receptor (Zárraga-Granados G, 2020; Zhang et al., 2017). Of note, experimental designs such as the quantity of transfected plasmids, cellular contexts (HeLa cells in Zhang et al. study (Zhang et al., 2017) and HEK-293T cells in our study (Dodat et al., 2021)) and the use of single mutant in our study compared to double or triple mutants in other two studies (Zárraga-Granados G, 2020; Zhang et al., 2017), were different. These mutations differently modulated NUR77 activity, as K102R and K577R induced a decrease and an increase, respectively, in transcriptional activity of NUR77 bound to the monomeric response element NBRE or to the homodimeric response element NurRE (Dodat et al., 2021), opposite to what had been observed for NURR1 (Arredondo, 2013; Galleguillos, 2004). Interestingly, overexpressing NUR77-K577R in HEK-293T cells induced a

significant increase in the expression of a natural NUR77 target gene *GLUT4* (Chao, 2007b), as compared to wild type NUR77 (Dodat et al., 2021), in keeping with the effect of the K577R mutation in reporter assays. As for NURR1 (Galleguillos, 2004), overexpression of the SUMO E3-ligase PIAS γ decreased NUR77 transcriptional activity (Dodat et al., 2021). This repression was rescued by SENP1 and potentiated by SUMO-2, supporting a mechanism whereby PIAS γ elicits its action through NUR77 SUMOylation. A summary of the impact of mutations of the main SUMO sites on NUR77 transcriptional activity is presented in Table 2.

3.4.3 NOR-1 SUMOylation

Little is known about NOR-1 (NR4A3) SUMOylation so far. One study pointed out the presence of an atypical SUMOylation motif in NOR-1 termed pSuM (Picard et al., 2012), that requires phosphorylation, as previously evidenced in estrogen nuclear receptor ER β and bile acid receptor FXR (Bilodeau, Caron, Gagnon, Kuftedjian et Tremblay, 2017; Picard et al., 2012). A preliminary report revealed that NOR-1 can be SUMOylated at the pSuM motif as well as at another consensus SUMOylation motif by SUMO-1 and SUMO-2 (Gagnon, 2019). Phosphorylation of the pSuM motif appeared to be necessary for pSuM activation and SUMO conjugation in NOR-1. Furthermore, phosphorylation of adjacent residues to this atypical SUMOylation motif potentiated NOR-1 conjugation with SUMO, suggesting the involvement of specific kinase pathways in SUMOylation.

Interestingly, lysine residues at position 85 and 605 in Transactivation Domain-1 and Ligand Binding Domain (LBD) of NOR-1, respectively, are conserved in NURR1 and NUR77 (K91/K102 and K577/K577 respectively for NURR1/NUR77) (Figure 2). However, lysine residue at position 558, which is present in NURR1 and NUR77, is not conserved in NOR-1. Of note, this residue is located in the region involved in heterodimerization of NURR1 and NUR77 with RXR (Aarnisalo,

Kim, Lee et Perlmann, 2002; Lévesque, 2007; Perlmann, 1995a), and NOR-1 does not interact with RXR (Zetterstrom, Solomin, Mitsiadis, Olson et Perlmann, 1996). Since the NURR1-K558R mutant increases NURR1 transcriptional activity on DR5 response element (Saijo, 2009), on which NURR1 and NUR77 bind to with RXR (Saijo, 2009), SUMOylation could also influence dimerization with RXR. A summary of the main SUMO sites impact on NR4A members transcriptional activity is presented in Table 2.

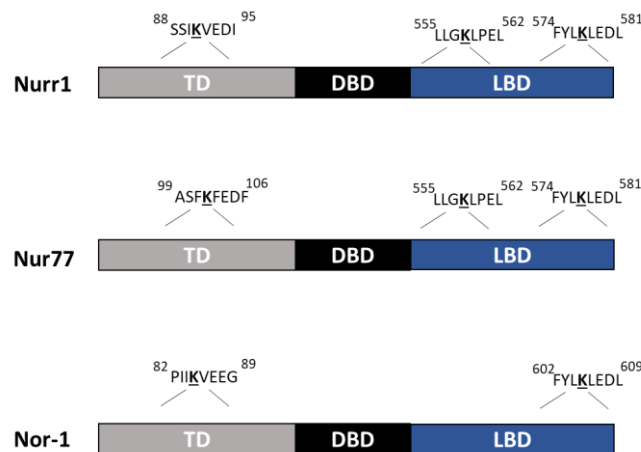


Figure 2: Consensus SUMO acceptor sites in NR4A members investigated so far.

Main SUMO acceptor sites that have been studied so far and contained in Transactivation Domain (TD) and Ligand Binding Domain (LBD) in human NURR1, NUR77 and NOR-1. NURR1 contains the K91, K558 and K577 sites. NUR77 contains the K102, K558 and K577 sites. NOR-1 contains the K85 and K605 sites.

Receptor	Mutation	Effect on receptor transcriptional activity	Response element	References
NURR1	K91R	Increase	NBRE	(Arredondo, 2013; Galleguillos, 2004) (Saijo, 2009)
	K558R	Increase	NBRE,	
	K577R	Decrease	DR5 NBRE	

				(Galleguillos, 2004)
NUR77	K102R	Decrease	NBRE,	(Dodat et al., 2021)
	K577R	Increase	NurRE	(Dodat et al., 2021)
	K102R/K577R	Decrease	NBRE,	(Dodat et al., 2021)
	K101R/K577R	Increase	NurRE	(Dodat et al., 2021)
	K102R/K558R/K577R	Increase	NBRE, NurRE NBRE NurRE	(Zhang et al., 2017) (Zárraga-Granados G, 2020)
NOR-1	K85R	?		
	K605R	?		

Table 2: Impact of SUMO acceptor sites on receptor transcriptional activity at monomer response element NBRE, homodimer response element NurRE and heterodimer response element DR5, that have been evidenced so far.

3.5 Concluding remarks

Studies on SUMOylation of NR4A family members have increased knowledge about the way these transcription factors are regulated. So far, investigation of SUMOylation events in NURR1 and NUR77 has suggested that mutation of each of the multiple SUMO acceptor sites in a single NR4A receptor leads to different, and sometime opposite, effects on transcriptional activity. Another important observation is that the impact of SUMOylation of conserved residues can vary between NURR1 and NUR77 and may be sensitive to the cellular context. This might explain why the two receptors have opposite roles, like in midbrain dopamine neurons, where NURR1 acts as a

neuroprotective factor contrary to NUR77 that seems to increase dopaminergic cell death (Rouillard, 2018; Wallen-Mackenzie, 2003). This is particularly interesting since these two receptors exert their transcriptional activity via binding to similar responsive elements. Since NR4As are known to be early response genes that respond to many stimuli, the regulation of their activity by SUMOylation process, which is also triggered by multiple cellular stresses, could combine to amplify or attenuate regulation of target genes.

Of note, the strategy to evaluate the impact of SUMOylation by mutating lysine residue into arginine and overexpression of NR4A members that have been used so far might affect other PTMs than SUMOylation and other functions of the protein in addition to impacting the cellular context. Additional studies are still needed to better understand the physiological impact of SUMOylation by SUMO1, or SUMO-2/3 on signaling by these nuclear receptors. Proteomic approaches, overexpressing either a tagged or a C-terminal mutant SUMO isoform that leaves an identifying mark on its substrates (Galisson et al., 2011; Li et al., 2020), constitute interesting strategies to further characterize PTMs and SUMOylation, in addition to molecular pathways involved in NR4As regulation (Rhee et al., 2013; Roux, 2012).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could influence the work reported in this paper.

3.6 References

1. Milbrandt, J. (1988) Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* 1, 183-188
2. Davis, I., Lau, LF. (1994) Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurr-1 in the adrenal glands. *Mol Cell Biol.* 14(5), 3469-3483.
3. Ohkubo, T., Sugawara, Y., Sasaki, K., Maruyama, K., Ohkura, N., and Makuuchi, M. (2002) Early induction of nerve growth factor-induced genes after liver resection-reperfusion injury. *J Hepatol.* 36(2), 210-217
4. Ke, N., Claassen, G., Yu, DH., et al. (2004) Nuclear hormone receptor NR4A2 is involved in cell transformation and apoptosis. *Cancer Res.* 64(22), 8208-8212.
5. Boylan, M., Athanassiou, M., Houle, B., Wang, Y., Zarbl, H. (1996) Activation of tumor suppressor genes in nontumorigenic revertants of the HeLa cervical carcinoma cell line. *Cell Growth Differ.* 7(6), 725-735.
6. Koenis, D., Medzikovic, L., van Loenen, PB., et al. (2018) Nuclear Receptor Nur77 Limits the Macrophage Inflammatory Response through Transcriptional Reprogramming of Mitochondrial Metabolism. *Cell Rep.* 24(8), 2127-2140.e2127.
7. Martínez-González, J., Badimon, L. (2005) The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells. *Cardiovasc Res.* 65(3), 609-618.
8. Zou Z, Y. Y., Shu Y, Gao R, Sun Y, Li X, ..., Jiang C. (2014) Angiotensin-converting enzyme 2 protects from lethal avian influenza A H5N1 infections. *Nat Commun.* 5:3594.
9. Rodríguez-Calvo, R., Tajés, M., Vázquez-Carrera, M. (2017) The NR4A subfamily of nuclear receptors: potential new therapeutic targets for the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets.* 21(3), 291-304.
10. Safe, S., Jin, UH., Hedrick, E., Reeder, A., Lee, SO. (2014) Minireview: Role Of Orphan Nuclear Receptors in Cancer and Potential as Drug Targets. *Mol Endocrinol.* 28(2), 157-172.
11. Flaig, R., Greschik, H., Peluso-Iltis, C., and Moras, D. (2005) Structural basis for the cell-specific activities of the NGFI-B and the Nurr1 ligand-binding domain. *J Biol Chem* 280, 19250-19258

12. Wang, Z., Benoit, G., Liu, J., Prasad, S., Aarnisalo, P., Liu, X., Xu, H., Walker, N. P., and Perlmann, T. (2003) Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 423, 555-560
13. Zhan, Y., Du, X., Chen, H., Liu, J., Zhao, B., Huang, D., et al. (2008) Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77. *Nat Chem Biol.* 4(9), 548-556.
14. Anbalagan, M., Huderson, B., Murphy, L., Rowan, BG. (2012) Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nucl Recept Signal.* 10:e001.
15. Venne, A., Kollipara, L., Zahedi, RP. (2014) The next level of complexity: crosstalk of posttranslational modifications. *Proteomics.* 14(4-5), 513-524.
16. Stram, A., Payne, RM. (2016) Post-translational modifications in mitochondria: protein signaling in the powerhouse. *Cell Mol Life Sci.* 73(21), 4063-4073.
17. Tolsma, T., Hansen, JC. (2019) Post-translational modifications and chromatin dynamics. *Essays Biochem.* 63(1), 89-96
18. Lalevée, S., Ferry, C., Rochette-Egly, C. (2010) Phosphorylation control of nuclear receptors. *Methods Mol Biol.* 647, 251-266.
19. Hunter, T. (2007) The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell.* 28(5), 730-738.
20. Rochette-Egly, C. (2003) Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal.* 15(4), 355-366.
21. Meluh, P. B., and Koshland, D. (1995) Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. *Mol Biol Cell* 6, 793-807
22. Wilkinson, K. A., and Henley, J. M. (2010) Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J* 428, 133-145
23. Zhao, J. (2007) Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell Mol Life Sci.* 64(23), 3017-3033.
24. Geiss-Friedlander, R., and Melchior, F. (2007) Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 947-956
25. Bergink, S., and Jentsch, S. (2009) Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature* 458, 461-467

26. Han, Z. J., Feng, Y. H., Gu, B. H., Li, Y. M., and Chen, H. (2018) The post-translational modification, SUMOylation, and cancer (Review). *Int J Oncol* 52, 1081-1094
27. Davey, J. S., Carmichael, R. E., and Craig, T. J. (2019) Protein SUMOylation regulates insulin secretion at multiple stages. *Sci Rep* 9, 2895
28. Gao, C., Huang, W., Kanasaki, K., and Xu, Y. (2014) The role of ubiquitination and sumoylation in diabetic nephropathy. *Biomed Res Int* 2014, 160692
29. Henley, J. M., Craig, T. J., and Wilkinson, K. A. (2014) Neuronal SUMOylation: mechanisms, physiology, and roles in neuronal dysfunction. *Physiol Rev* 94, 1249-1285
30. Traboulsi, T., El Ezzy, M., Dumeaux, V., Audemard, E., Mader, S. (2019) Role of SUMOylation in differential ER α transcriptional repression by tamoxifen and fulvestrant in breast cancer cells. *Oncogene*. 38(7), 1019-1037.
31. Le Drean, Y., Mincheneau, N., Le Goff, P., Michel, D. (2002) Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation. *Endocrinology*. 143(9), 3482-3489.
32. Dohmen, R. (2004) SUMO protein modification. *Biochim Biophys Acta*. 1695(1-3), 113-131.
33. Wang, C., Yang, P., Li, M., Gong, F. (2009) Characterization of a negative feedback network between SUMO4 expression and NF κ B transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 381(4), 477-481.
34. Owerbach, D., McKay, EM., Yeh, ET., Gabbay, KH., Bohren, KM. (2005) A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 337(2), 517-520.
35. Liang, Y. C., Lee, C. C., Yao, Y. L., Lai, C. C., Schmitz, M. L., and Yang, W. M. (2016) SUMO5, a Novel Poly-SUMO Isoform, Regulates PML Nuclear Bodies. *Sci Rep* 6, 26509
36. Ayaydin, F., Dasso, M. (2004) Distinct in vivo dynamics of vertebrate SUMO paralogues. *Mol Biol Cell*. 15(12), 5208-5218.
37. Saitoh, H., Hinchey, J. (2000) Functional heterogeneity of small ubiquitinrelated protein modifiers SUMO-1 versus SUMO2/3. *J Biol Chem*. 275(9), 6252-6258.
38. Desterro, J., Rodriguez, M., Kemp, G., and Hay, R. (1999) Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *J Biol Chem*. 274(15), 10618-10624.

39. Bernier-Villamor, V., Sampson, DA., Matunis, MJ., Lima, CD. (2002) Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. . *Cell*. 108(3), 345-356.
40. Tatham, M., Kim, S., Jaffray, E., Song, J., Chen, Y., and Hay, R. (2005) Unique binding interactions among Ubc9, SUMO and RanBP2 reveal a mechanism for SUMO paralog selection. . *Nat Struct Mol Biol*. 12(1), 67-74
41. Rytinki, M., Kaikkonen, S., Pehkonen, P., Jääskeläinen, T., Palvimo, JJ. . (2009) PIAS proteins: pleiotropic interactors associated with SUMO. *Cell Mol Life Sci*. 66(18). 3029-3041.
42. Johnson, E. S., and Gupta, A. A. (2001) An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* 106, 735-744
43. Hochstrasser, M. (2001) SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* 107, 5-8
44. Liang, J., Li, B. Z., Tan, A. P., Kolodner, R. D., Putnam, C. D., and Zhou, H. (2018) SUMO E3 ligase Mms21 prevents spontaneous DNA damage induced genome rearrangements. *PLoS Genet* 14, e1007250
45. Varejao, N., Ibars, E., Lascorz, J., Colomina, N., Torres-Rosell, J., and Reverter, D. (2018) DNA activates the Nse2/Mms21 SUMO E3 ligase in the Smc5/6 complex. *EMBO J* 37
46. 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
47. Yang, S. H., and Sharrocks, A. D. (2010) The SUMO E3 ligase activity of Pc2 is coordinated through a SUMO interaction motif. *Mol Cell Biol* 30, 2193-2205
48. Zhao, X., Sternsdorf, T., Bolger, T. A., Evans, R. M., and Yao, T. P. (2005) Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4- and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications. *Mol Cell Biol* 25, 8456-8464
49. Pungaliya, P., Kulkarni, D., Park, H. J., Marshall, H., Zheng, H., Lackland, H., Saleem, A., and Rubin, E. H. (2007) TOPORS functions as a SUMO-1 E3 ligase for chromatin-modifying proteins. *J Proteome Res* 6, 3918-3923
50. Subramaniam, S., Mealer, R. G., Sixt, K. M., Barrow, R. K., Usiello, A., and Snyder, S. H. (2010) Rhes, a physiologic regulator of sumoylation, enhances cross-sumoylation between the basic sumoylation enzymes E1 and Ubc9. *J Biol Chem* 285, 20428-20432

51. Nayak, A., Müller, S. (2014) SUMO-specific proteases/isopeptidases: SENPs and beyond. *Genome Biol.* 15(7), 422
52. Kunz, K., Piller, T., Müller, S. (2018) SUMO-specific proteases and isopeptidases of the SENP family at a glance. *J Cell Sci.* 131(6):jcs211904.
53. Hay, R. (2005) SUMO: a history of modification. *Mol Cell.* 18(1), 1-12.
54. Hietakangas, V., Anckar, J., Blomster, HA., Fujimoto, M., Palvimo, JJ., Nakai, A., Sistonen, L. (2006) PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. . *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(1), 45-50.
55. Song, J., Durrin, L. K., Wilkinson, T. A., Krontiris, T. G., and Chen, Y. (2004) Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14373-14378
56. Zhao, Q., Xie, Y., Zheng, Y., Jiang, S., Liu, W., Mu, W., Liu, Z., Zhao, Y., Xue, Y., and Ren, J. (2014) GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic Acids Res* 42, W325-330
57. Lin, D. Y., Huang, Y. S., Jeng, J. C., Kuo, H. Y., Chang, C. C., Chao, T. T., Ho, C. C., Chen, Y. C., Lin, T. P., Fang, H. I., Hung, C. C., Suen, C. S., Hwang, M. J., Chang, K. S., Maul, G. G., and Shih, H. M. (2006) Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Mol Cell* 24, 341-354
58. Ouyang, J., Shi, Y., Valin, A., Xuan, Y., and Gill, G. (2009) Direct binding of CoREST1 to SUMO2/3 contributes to gene-specific repression by the LSD1/CoREST1/HDAC complex. *Mol Cell* 34, 145-154
59. Wilson, V., Heaton, PR. . (2008) The Ubiquitin Proteolytic System - A Focus on SUMO: A review. *Expert Rev Proteomics.* 5(1), 121-135.
60. Wilson, V. G., and Heaton, P. R. (2008) Ubiquitin proteolytic system: focus on SUMO. *Expert Rev Proteomics* 5, 121-135
61. Gareau, J., Lima, CD. . (2010) The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. . *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(12), 861-871.
62. Cartier, E., Garcia-Olivares, J., Janezic, E., Viana, J., Moore, M., Lin, M. L., Caplan, J. L., Torres, G., and Kim, Y. H. (2019) The SUMO-Conjugase Ubc9 Prevents the Degradation of the Dopamine Transporter, Enhancing Its Cell Surface Level and Dopamine Uptake. *Front Cell Neurosci* 13, 35

63. Psakhye, I., and Jentsch, S. (2012) Protein group modification and synergy in the SUMO pathway as exemplified in DNA repair. *Cell* 151, 807-820
64. Silver, H. R., Nissley, J. A., Reed, S. H., Hou, Y. M., and Johnson, E. S. (2011) A role for SUMO in nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* 10, 1243-1251
65. Finkbeiner, E., Haindl, M., and Muller, S. (2011) The SUMO system controls nucleolar partitioning of a novel mammalian ribosome biogenesis complex. *EMBO J* 30, 1067-1078
66. Panse, V. G., Kressler, D., Pauli, A., Petfalski, E., Gnadig, M., Tollervey, D., and Hurt, E. (2006) Formation and nuclear export of preribosomes are functionally linked to the small-ubiquitin-related modifier pathway. *Traffic* 7, 1311-1321
67. Westman, B. J., and Lamond, A. I. (2011) A role for SUMOylation in snoRNP biogenesis revealed by quantitative proteomics. *Nucleus* 2, 30-37
68. Johnson, E. S., and Blobel, G. (1999) Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J Cell Biol* 147, 981-994
69. Takahashi, Y., Kahyo, T., Toh, E. A., Yasuda, H., and Kikuchi, Y. (2001) Yeast Ull1/Siz1 is a novel SUMO1/Smt3 ligase for septin components and functions as an adaptor between conjugating enzyme and substrates. *J Biol Chem* 276, 48973-48977
70. Rytinki, M., Kaikkonen, S., Sutinen, P., Paakinaho, V., Rahkama, V., and Palvimo, J. J. (2012) Dynamic SUMOylation is linked to the activity cycles of androgen receptor in the cell nucleus. *Mol Cell Biol* 32, 4195-4205
71. Yin, K., Sturm, R. A., and Smith, A. G. (2014) MC1R and NR4A receptors in cellular stress and DNA repair: implications for UVR protection. *Exp Dermatol* 23, 449-452
72. Munnur, D., Somers, J., Skalka, G., Weston, R., Jukes-Jones, R., Bhogadia, M., Dominguez, C., Cain, K., Ahel, I., and Malewicz, M. (2019) NR4A Nuclear Receptors Target Poly-ADP-Ribosylated DNA-PKcs Protein to Promote DNA Repair. *Cell Rep* 26, 2028-2036 e2026
73. Pols, T. W., and de Vries, C. J. (2008) A shining future for NR4A nuclear receptors in DNA repair. *Pigment Cell Melanoma Res* 21, 342-343
74. Yin, K., Chhabra, Y., Tropee, R., Lim, Y. C., Fane, M., Dray, E., Sturm, R. A., and Smith, A. G. (2017) NR4A2 Promotes DNA Double-strand Break Repair Upon Exposure to UVR. *Mol Cancer Res* 15, 1184-1196

75. Lee, S., Wesselschmidt, RL., Linette, GP., Kanagawa, O., Russell, JH., Milbrandt, J. (1995) Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (Nur77). *Science*. 269(5223), 532-535.
76. Galleguillos, D., A. Vecchiola, J. A. Fuentealba, V. Ojeda, K. Alvarez, A. Gomez and M. E. Andres. (2004) PIASgamma Represses the Transcriptional Activation Induced by the Nuclear Receptor Nurr1. *J Biol Chem*. 279(3), 2005-2011.
77. Arredondo, C., Orellana, M., Vecchiola, A., Pereira, LA., Galdames, L., Andrés, ME. . (2013) PIAS γ enhanced SUMO2 modification of Nurr1 activation-function-1 domain limits Nurr1 transcriptional synergy. . *PLoS One* 8(1):e55035.
78. Saijo, K., Winner, B., Carson, CT., Collier, JG., Boyer, L., Rosenfeld, MG., Gage FH and Glass, CK. (2009) A Nurr1/CoREST Pathway in Microglia and Astrocytes Protects Dopaminergic Neurons from Inflammation-Induced Death. *Cell*. 137(1), 47-59
79. Perlmann, T., Jansson, L. . (1995) A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev*. 9(7), 769-782.
80. Montarolo, F., Martire, S., Perga, S., Bertolotto, A. (2019) NURR1 Impairment in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 20(19), 4858.
81. Popichak, K., Hammond, SL., Moreno, JA., et al. (2018) Compensatory Expression of Nur77 and Nurr1 Regulates NF- κ B-Dependent Inflammatory Signaling in Astrocytes. *Mol Pharmacol*. 94(4), 1174-1186.
82. Dodat, F., Cotnoir-White, D., Dianati, E., Vallet, A., Mader, S., and Levesque, D. (2021) Complex regulation of orphan nuclear receptor Nur77 (Nr4a1) transcriptional activity by SUMO2 and PIASgamma. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 118908
83. Zhang, L., Xie, F., Zhang, J., Dijke, P., and Zhou, F. (2017) SUMO-triggered ubiquitination of NR4A1 controls macrophage cell death. . *Cell Death Differ*. 24(9), 1530-1539
84. Zarraga-Granados, G., Mucino-Hernandez, G., Sanchez-Carbente, M. R., Villamizar-Galvez, W., Penas-Rincon, A., Arredondo, C., Andres, M. E., Wood, C., Covarrubias, L., and Castro-Obregon, S. (2020) The nuclear receptor NR4A1 is regulated by SUMO modification to induce autophagic cell death. *PLoS One* 15, e0222072
85. Popichak, K. A., Hammond, S. L., Moreno, J. A., Afzali, M. F., Backos, D. S., Slayden, R. D., Safe, S., and Tjalkens, R. B. (2018) Compensatory Expression of Nur77 and Nurr1 Regulates NF-kappaB-Dependent Inflammatory Signaling in Astrocytes. *Mol Pharmacol* 94, 1174-1186

86. Heideker, J., Perry, J.J., Boddy, M.N. (2009) Genome stability roles of SUMO-targeted ubiquitin ligases. *DNA Repair (Amst)*. 8(4), 517-524.
87. Druker, J., Liberman, A. C., Antunica-Noguerol, M., Gerez, J., Paez-Pereda, M., Rein, T., Iniguez-Lluhi, J. A., Holsboer, F., and Arzt, E. (2013) RSUME enhances glucocorticoid receptor SUMOylation and transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 33, 2116-2127
88. Castro-Obregón, S., Del Rio, G., Chen, S.F., et al. (2002) A ligand-receptor pair that triggers a non-apoptotic form of programmed cell death. *Cell Death Differ*. 9(8), 807-817
89. Chao, L., Zhang, Z., Pei, L., Saito, T., Tontonoz, P., Pilch, P.F. . (2007) Nur77 coordinately regulates expression of genes linked to glucose metabolism in skeletal muscle. *Mol Endocrinol*. 21(9), 2152-2163.
90. Picard, N., Caron, V., Bilodeau, S., Sanchez, M., Mascle, X., Aubry, M., and Tremblay, A. (2012) Identification of estrogen receptor beta as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3beta. *Mol Cell Biol* 32, 2709-2721
91. Bilodeau, S., Caron, V., Gagnon, J., Kuftejian, A., and Tremblay, A. (2017) A CK2-RNF4 interplay coordinates non-canonical SUMOylation and degradation of nuclear receptor FXR. *J Mol Cell Biol* 9, 195-208
92. Gagnon, J., Caron, V., Tremblay, A. (2019) SUN-014 Identification of a New SUMOylation Process Regulating Nuclear Receptor NOR-1 *Journal of the Endocrine Society* 3
93. Aarnisalo, P., Kim, C. H., Lee, J. W., and Perlmann, T. (2002) Defining requirements for heterodimerization between the retinoid X receptor and the orphan nuclear receptor Nurr1. *J Biol Chem* 277, 35118-35123
94. Lévesque, D., Rouillard, C. (2007) Nur77 and retinoid X receptors: critical factors in dopaminerelevant neuroadaptation. *Trends Neurosci*. 30(1), 22–30.
95. Perlmann, T., Jansson, L. (1995) A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev*. 9(7), 769-782.
96. Zetterstrom, R. H., Solomin, L., Mitsiadis, T., Olson, L., and Perlmann, T. (1996) Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Mol Endocrinol* 10, 1656-1666
97. Rouillard, C., Baillargeon, J., Paquet, B., St-Hilaire, M., Maheux, J., Levesque, C., Darlix, N., Majeur, S., and Levesque, D. (2018) Genetic disruption of the nuclear receptor Nur77 (Nr4a1)

in rat reduces dopamine cell loss and 1-Dopa-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease. *Exp Neurol* 304, 143-153

98. Wallen-Mackenzie, A., Mata de Urquiza, A., Petersson, S., Rodriguez, F. J., Friling, S., Wagner, J., Ordentlich, P., Lengqvist, J., Heyman, R. A., Arenas, E., and Perlmann, T. (2003) Nurr1-RXR heterodimers mediate RXR ligand-induced signaling in neuronal cells. *Genes Dev* 17, 3036-3047

99. Rhee, H. W., Zou, P., Udeshi, N. D., Martell, J. D., Mootha, V. K., Carr, S. A., and Ting, A. Y. (2013) Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science* 339, 1328-1331

100. Roux, K., Kim, D.I., Raida, M., Burke, B. (2012) A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol.* 196(6), 801-810.