

Université de Montréal

**Interactions protéiques et relation dynamique entre
phosphorylation / sumoylation / ubiquitination
des protéines TIF1 α , β et PML:
détection *in vivo* par BRET**

par

Delphine Germain-Desprez

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté des Etudes Supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Biologie Moléculaire

Août, 2007

© Delphine Germain-Desprez, 2007

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Interactions protéiques et relation dynamique
entre phosphorylation / sumoylation / ubiquitination
des protéines TIF1 α , β et PML:
détection *in vivo* par BRET

présentée par :

Delphine Germain-Desprez

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Gerardo Ferbeyre, président-rapporteur

Dr Muriel Aubry, directrice de recherche

Dr Nathalie Grandvaux, membre du jury

Dr Edward Fon, examinateur externe

Dr Annie Angers, représentante du doyen de la FES

Résumé

Trois protéines de la famille TRIM (Motif TRIpartite), TIF1 α , β (Transcriptional Intermediary Factor 1) et PML (ProMyelocytic Leukaemia), font l'objet de cette étude. TIF1 α est connu comme un coactivateur des récepteurs nucléaires et TIF1 β comme le corépresseur universel des protéines KRAB-multidoigt de zinc dont le prototype étudié ici est ZNF74. PML possède divers rôles dont le plus caractérisé est celui d'être l'organisateur principal et essentiel des PML-NBs (PML-Nuclear Bodies), des macrostructures nucléaires très dynamiques regroupant et coordonnant plus de 40 protéines. Il est à noter que la fonction de TIF1 α , β et PML est régulée par une modification post-traductionnelle, la sumoylation, qui implique le couplage covalent de la petite protéine SUMO (Small Ubiquitin like MODifier) à des lysines de ces trois protéines cibles.

Cette thèse propose de développer des méthodes utilisant le BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfert) afin de détecter dans des cellules vivantes et en temps réel des interactions non-covalentes de protéines nucléaires mais aussi leur couplage covalent à SUMO. En effet, le BRET n'a jamais été exploré jusqu'alors pour étudier les interactions non-covalentes et covalentes de protéines nucléaires.

L'étude de l'interaction de protéines transcriptionnellement actives est parfois difficile par des méthodes classiques du fait de leur grande propension à agréger (famille TRIM) ou de leur association à la matrice nucléaire (ZNF74). L'homodimérisation et l'hétérodimérisation de TIF1 α , β ainsi que leur interaction avec ZNF74 sont ici testées sur des protéines entières dans des cellules vivantes de mammifères répondant aux résultats conflictuels de la littérature et démontrant que le BRET peut être avantageusement utilisé comme alternative aux essais plus classiques basés sur la transcription. Du fait de l'hétérodimérisation confirmée de TIF1 α et β , le premier article présenté ouvre la possibilité d'une relation étroite entre les récepteurs nucléaires et les protéines KRAB- multidoigt de zinc.

Des études précédentes ont démontré que la sumoylation de PML est impliquée dans sa dégradation induite par l'As₂O₃ et dépendante de RNF4, une E3 ubiquitine ligase ayant pour substrat des chaînes de SUMO (polySUMO). Dans le second article, grâce au

développement d'une nouvelle application du BRET pour la détection d'interactions covalentes et non-covalentes avec SUMO (BRET^{SUMO}), nous établissons un nouveau lien entre la sumoylation de PML et sa dégradation. Nous confirmons que le recrutement de RNF4 dépend de SUMO mais démontrons également l'implication du SBD (Sumo Binding Domain) de PML dans sa dégradation induite par l'As₂O₃ et/ou RNF4. De plus, nous démontrons que des sérines, au sein du SBD de PML, qui sont connues comme des cibles de phosphorylation par la voie de la kinase CK2, régulent les interactions non-covalentes de ce SBD mettant en évidence, pour la première fois, que les interactions avec un SBD peuvent dépendre d'un évènement de phosphorylation ("SBD phospho-switch"). Nos résultats nous amènent à proposer l'hypothèse que le recrutement de PML sumoylé au niveau des PML-NBs via son SBD, favorise le recrutement d'une autre activité E3 ubiquitine ligase, outre celle de RNF4, PML étant lui-même un potentiel candidat. Ceci suggère l'existence d'une nouvelle relation dynamique entre phosphorylation, sumoylation et ubiquitination de PML. Finalement, il est suggéré que PML est dégradé par deux voies différentes dépendantes de l'ubiquitine et du protéasome; la voie de CK2 et la voie de RNF4.

Enfin une étude sur la sumoylation de TIF1 β est également présentée en annexe. Cette étude caractérise les 6 lysines cibles de SUMO sur TIF1 β et démontre que la sumoylation est nécessaire à l'activité répressive de TIF1 β mais n'est pas impliquée dans son homodimérisation ou son interaction avec la boîte KRAB. La sumoylation est cependant nécessaire au recrutement d'histones déacétylases, dépendante de son homodimérisation et de l'intégrité du domaine PHD. Alors que l'on ne connaît pas de régulateur physiologique de la sumoylation outre les enzymes directement impliquées dans la machinerie de sumoylation, nous mettons en évidence que la sumoylation de TIF1 β est positivement régulée par son interaction avec le domaine KRAB et suggérons que ces facteurs transcriptionnels recrutent TIF1 β à l'ADN au niveau de promoteur et augmentent son activité répressive en favorisant sa sumoylation.

Mots-clés : As₂O₃, CK2, dégradation, E3 UBI ligase, KRAB, multidoigt de zinc, PML, récepteurs nucléaires, SBD, SUMO, TIF1 α , TIF1 β , ZNF74.

Abstract

Three TRIM proteins (TRIpartite Motif), TIF1 α , β (Transcriptional Intermediary Factor 1) and PML (ProMyelocytic Leukaemia), were studied in this thesis. TIF1 α is a nuclear receptor coactivator and TIF1 β is the universal corepressor of the KRAB-zinc finger repressor family of which, ZNF74 is studied here as a prototypic member. PML functions as a tumor suppressor and is the essential organiser of PML-NBs (PML-Nuclear Bodies) which are very dynamic nuclear macrostructures containing more than 40 proteins. The function of these three TRIM proteins is regulated by sumoylation, a post-translational modification involving the covalent linkage of SUMO (Small Ubiqutin like MOdifier) to specific targets lysine.

In this thesis, we propose to develop new methods based on BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) to detect non-covalent nuclear protein interactions but also covalent linkage to SUMO in real time in living cells. To date, BRET was never used to assess non-covalent or covalent nuclear protein interactions.

Studying transcriptionally active protein interactions represents a challenge by classical methods in particular when proteins have a tendency to aggregate (TRIM family) or when characterizing nuclear matrix proteins (ZNF74). In the first article, homo- and heterodimerisation of TIF1 α and β as well as their interaction with ZNF74 was assessed by BRET using full length proteins in living mammalian cells. We ascertained the heterodimerisation of TIF1 α and β . Whereas ZNF74 interacts strongly with TIF1 β , no interaction was detected with TIF1 α . However, we unravelled the existence of ternary complexes involving ZNF74, TIF1 α and TIF1 β . This suggested that a mechanisms for cross-talk between nuclear receptors and KRAB-zinc finger proteins. Thus, we showed that BRET can be advantageously used as a non-transcription-based interaction system for studying transcriptionally active proteins, including nuclear matrix proteins, in living cells.

Previous studies have shown that the sumoylation of PML (a tumour suppressor) is involved in its proteasome degradation that is As₂O₃-inducible and dependent on the

polySUMO E3 ubiquitin ligase, RNF4. In the second article, we describe the development of a new application of the BRET method for the detection of covalent and non-covalent interactions with SUMO. Owing to this SUMO BRET assay, we established that the As_2O_3 / RNF4-mediated degradation of PML, not only depends on PML sumoylation as previously demonstrated, but also on the integrity of its SUMO binding domain. We also demonstrated that As_2O_3 which increases PML sumoylation, also enhances PML / RNF4 interaction. Our study revealed that most PML SBD non covalent interactions with sumoylated proteins required the phosphorylation of serines within PML SBD that were previously described as target sites for CK2 kinase and involved in PML degradation. Despite the involvement of PML SBD in RNF4-mediated degradation, these serines which function as an SBD phospho-switch, were not required for RNF4-mediated degradation. This suggested that CK2- and RNF4-mediated PML degradation represents two distinct pathways triggering PML ubiquitin / proteasome-dependent degradation. At last, our study led to the hypothesis that the recruitment of sumoylated PML at PML-Nuclear Bodies subnuclear structures via the PML SBD and / or possibly an E3 ubiquitin ligase activity other than RNF4 (PML itself being candidate) may favour PML degradation. Our study also stresses the dynamic involvement of three PML post-translational modifications, phosphorylation, sumoylation and ubiquitination in its degradation.

A third article addressing the role of TIF1 β sumoylation is presented in the Appendix. We characterized the 6 SUMO targets lysine of TIF1 β and demonstrated that sumoylation is required for TIF1 β transcriptional repressive activity. This is in part explained by the fact that TIF1 β sumoylation is a pre-requisite for histone deacetylases recruitment since TIF1 β repressive activity is partly dependent on histone deacetylases. We found that TIF1 β sumoylation does not influence its homodimerisation or interaction with the KRAB box of KRAB zinc finger proteins recruiting TIF1 β to promoters. TIF1 β sumoylation is however relying on the integrity of TIF1 β PHD finger and on its self-oligomerisation. Interestingly, we demonstrated that TIF1 β sumoylation is positively regulated by its interaction with KRAB domain. It is thus suggested that KRAB-zinc finger

proteins recruit TIF1 β at DNA promoters where they trigger increase of TIF1 β sumoylation and thus enhance its repressive activity.

Keywords: As₂O₃-induced degradation, CK2, E3 UBI ligase, KRAB, nuclear receptors, PML, SBD, SUMO, TIF1 α , TIF1 β , zinc fingers, ZNF74.

Table des matières

Chapitre 1 : Introduction

1. Introduction générale sur 3 MPTs (modifications post-traductionnelles): la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation.....	36
1.1. La phosphorylation	38
1.1.1. Historique.....	38
1.1.2. Définition générale.....	38
1.1.3. Acides aminés ciblés / enzymes impliquées	39
1.1.3.1. Les acides aminés ciblés	39
1.1.3.2. Les kinases	39
1.1.3.3. Les phosphatases.....	40
1.1.4. Conséquences de la phosphorylation	40
1.1.4.1. Expansion du génome / diversification du protéome.....	40
1.1.4.2. Changement conformationnel.....	41
1.1.4.3. De nouvelles interactions: les domaines de reconnaissances des phosphoprotéines	42
1.1.4.4. La phosphorylation : médiateur vedette des voies de signalisation	43
1.1.4.4.1. La phosphorylation dans les voies de signalisation	43
1.1.4.4.2. Dérégulation et pathologies associées.....	44
1.1.4.4.3. La phosphorylation comme cible thérapeutique	45
1.2. L'ubiquitination et les Ubls.....	46
1.2.1. L'ubiquitination	46
1.2.1.1. Historique.....	46
1.2.1.2. Définition générale.....	47
1.2.1.3. L'ubiquitine (Ub)	47

1.2.1.4.	Acide aminé visé / Enzymes impliquées : E1, E2, E3, DUB.....	49
1.2.1.5.	Conséquences de l'ubiquitination	51
1.2.1.5.1.	Poly versus mono-ubiquitination	51
1.	La poly-ubiquitination.....	51
2.	La mono-ubiquitination.....	54
1.2.1.5.2.	Expansion du génome / Diversification du protéome	54
1.2.1.5.3.	De nouvelles interactions: les domaines de liaison à l'ubiquitine	55
1.2.1.5.4.	La dégradation: le protéasome	56
1.2.1.5.5.	Quelques autres exemples : endocytose et dégradation lysosomiale des protéines membranaires, réparation de l'ADN, implication dans la transduction du signal, régulation de la transcription	57
1.2.1.5.6.	Généralisation: l'ubiquitination, un autre médiateur vedette des voies de signalisation.....	59
1.2.1.5.7.	Dérégulation et pathologies associées.....	60
1.2.1.5.8.	L'ubiquitination comme cible thérapeutique	60
1.2.2.	La SUMOylation.....	61
1.2.2.1.	Historique.....	61
1.2.2.2.	Définition générale.....	62
1.2.2.3.	SUMO 1,2,3,4.....	62
1.2.2.4.	Acide aminé visé / Enzymes impliquées : E1, E2, E3, SUMO-isopeptidases Ulp1.....	63
1.2.2.5.	Conséquences de la sumoylation	66
1.2.2.5.1.	Expansion du génome / Diversification du protéome.....	66
1.2.2.5.2.	De nouvelles interactions : le domaine de liaison à SUMO, SIM ou SBD.....	67
1.2.2.5.3.	Mono versus poly-sumoylation.....	68
1.2.2.5.4.	Généralisation : la sumoylation comme mécanisme d'interaction protéique transitoire, implication dans les voies de signalisation.....	70

1.2.2.5.1.	Dérégulation et pathologies associées.....	70
1.2.2.5.2.	La sumoylation en tant que cible thérapeutique.....	71
2.	Relations entre ces trois MPTs et dynamiques :	71
2.1.	Phosphorylation/ubiquitination ou sumoylation :	72
2.1.1.	Phosphorylation/ubiquitination :	72
2.1.1.1.	La phosphorylation préliminaire et nécessaire à l'ubiquitination	72
2.1.1.1.1.	Portes logiques ET/OU:	73
2.1.1.1.2.	Seuil de phosphorylation induisant l'ubiquitination (nanoswitches by allovalency).....	73
2.1.1.2.	La phosphorylation comme rétrocontrôle négatif de l'ubiquitination	74
2.1.2.	Phosphorylation/sumoylation.....	75
2.1.2.1.	La phosphorylation préliminaire et nécessaire à la sumoylation. Développement de la notion de "phospho-sumoyl switch" avec un motif consensus cible d'une sumoylation phospho-dépendante, (PDSM):	76
2.1.2.2.	La phosphorylation régulant la sumoylation à distance et de façon négative.	77
2.1.2.3.	La sumoylation comme rétrocontrôle de la phosphorylation :	77
2.1.2.4.	Un motif de liaison à SUMO (SIM) régulé par la phosphorylation.....	78
2.2.	Ubiquitination/sumoylation	79
2.2.1.	Ubiquitination /sumoylation sur même lysine cible : bien plus qu'une simple compétition.....	79
2.2.2.	Sumoylation et ubiquitination totalement indépendantes	81
2.2.3.	La sumoylation préliminaire à l'ubiquitination: un motif de liaison à SUMO (SIM) provoquant l'ubiquitination.....	81
2.2.4.	Relations interprotéiques de cause à effet entre ces deux MPTs	81
2.3.	Conclusion : une complexité et une grande interdépendance des relations phosphorylation / ubiquitination / sumoylation intra et inter protéiques	82
3.	Les protéines de la famille TRIM : un domaine conservé tripartite en N^{tal}	85

3.1.	TIF1 α /TRIM 24 et TIF1 β /TRIM 28	87
3.1.1.	Historique.....	87
3.1.2.	Domaines conservés en C ^{tal} des TIF1s: PHD/Bromo, HP1 BD, TSS	88
3.1.2.1.	PHD/Bromo	88
3.1.2.2.	HP1BD: domaine de liaison à HP1	89
3.1.2.3.	TSS: TIF1 Signature Sequence	90
3.1.2.4.	NRID: domaine d'interaction aux récepteurs nucléaires	90
3.1.3.	Fonction du domaine TRIM des TIF1s.....	90
3.1.3.1.	Homo/hétérodimérisation entre les TIF1s.....	90
3.1.3.2.	Interaction de TIF1 β avec le domaine KRAB	91
3.1.3.3.	Activité E3 ubiquitine ligase.....	91
3.1.4.	Fonction du domaine PHD/Bromo des TIF1s.....	92
3.1.5.	Modifications post-traductionnelles des TIF1s.....	93
3.1.6.	Conclusion générale sur les TIF1s:.....	93
3.2.	PML/TRIM 19:	94
3.2.1.	Historique / présentation	94
3.2.2.	Domaine identifié en C ^{tal} de PML : SBD.....	97
3.2.3.	Fonction du domaine TRIM de PML.....	97
3.2.4.	Modifications post-traductionnelles de PML.....	98
3.2.4.1.	La sumoylation de PML.....	98
3.2.4.2.	La phosphorylation de PML	99
3.2.4.3.	L'ubiquitination de PML	100
3.2.5.	Conclusion générale sur PML:.....	101
4.	Le BRET	102
4.1.	La nécessité de nouvelles méthodes pour étudier les MPTs.....	102
4.2.	Historique du BRET.....	103
4.3.	Principe du BRET	104
5.	Objectifs de cette thèse	106

Chapitre 2 : Articles

1. Article 1 (publié dans J. Biol. Chem.) - Préambule	108
1.1. Mise en contexte	108
1.2. Participation	109
1.3. Accord des coauteurs	110
1.4. Permission de l'éditeur de la revue	111
2. Article 1.....	112
Oligomerization of TIF1 transcriptional regulators and interaction with ZNF74 nuclear matrix protein revealed by BRET in living cells.....	111
3. Article 2 (en préparation) - Préambule.....	141
3.1. Mise en contexte	141
3.2. Participation	142
3.3. Accord des coauteurs	144
3.4. Permission de l'éditeur de la revue	145
4. Article 2.....	146
Role of SUMO in RNF4-mediated PML degradation: PML sumoylation and phospho-switch control of its SUMO Binding Domain (SBD) dissected by BRET	146

Chapitre 3 : Discussion / Conclusions / Perspectives

1. Utilisation du BRET pour la détection d'interactions protéiques nucléaires non covalentes: avantages.....	203
2. Utilisation du BRET pour la détection d'interactions covalentes et non-covalentes avec SUMO: Etude pilote avec PML	204
3. Utilisation du BRET pour la détection des interactions de PML avec Ub: limitations actuelles.....	205

4. Modèle issu de notre étude sur la dégradation As₂O₃-induite de PML : importance de la sumoylation de PML par SUMO1 et de son SBD	211
4.1 Modèle du rôle stimulateur de SUMO1 sur l'interaction PML sumoylé / PML SBD : Implication dans la dégradation induite par l'As ₂ O ₃	213
4.2 Un rôle de la phosphorylation des sérines du SBD dans la discrimination de son interaction avec les protéines sumoylées par SUMO1 ou ses paralogues ?.....	216
4.3 Rôle envisageable de PML comme E3 ubiquitine ligase et implication dans la dégradation induite par l'As ₂ O ₃	220
5. Importance de la lysine K160 : un pas plus loin dans notre modèle	222
6. Régulation du SBD par les sérines cibles de phosphorylation (SBD phospho-switch): dégradation différente selon la voie de dégradation empruntée (CK2 versus As₂O₃/RNF4) et/ou l'isoforme de PML (III versus IV) ?	223
7. Relation ubiquitine / SUMO: une synergie mise à jour qui soulève encore beaucoup de questions.....	225
8. Importance d'une mise en évidence d'une relation dynamique entre MPTs:	227

Chapitre 4 : Annexes

1. Article 3 (publié dans J. Biol. Chem.) - Préambule	231
1.1 Mise en contexte / Participation.....	231
1.2 Accord des coauteurs	232
1.3 Permission de l'éditeur de la revue	233
2. Article 3.....	234
Sumoylation of TIF1beta co-repressor of KRAB multifinger proteins is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain.....	233
3. Autres résultats: quelques questions et expériences préliminaires pour y répondre	274

3.1	Perspectives à plus long terme: un suivi de la sumoylation et de l'ubiquitination de PML <i>in vivo</i> en temps réel de façon simultanée	274
3.2	Étude par BRET de l'influence de la sumoylation sur l'interaction entre ZNF74 et TIF1 β :	280
3.2.1	Le mutant de sumoylation de ZNF74 interagit-il avec TIF1 β ?	280
3.2.2	L'augmentation de la sumoylation de ZNF74 ou TIF1 β par surexpression de SUMO1 ou PIASy modifie-t-elle l'interaction ZNF74 / TIF1 β ?	281
3.2.3	L'augmentation de la sumoylation de TIF1 β seule (alors que celle de ZNF74 est abolie) par surexpression de SUMO1 ou PIASy modifie t'elle l'interaction ZNF74 / TIF1 β ?	282
3.3	Étude par BRET de la dimérisation des deux isoformes de ZNF74:	283
3.3.1	Les deux isoformes de ZNF74 homo et hétérodimérisent	283
3.3.2	La spécificité de dimérisation est démontrée par des compétitions similaires à celles réalisées dans l'article # 1	284
3.4	ZNF74-I et ZNF74-II colocalisent et l'interaction ZNF74-II / TIF1 β est nécessaire à cette colocalisation	286
3.5	ZNF74-II et TIF1 α colocalisent et l'interaction ZNF74-II / TIF1 β est nécessaire à cette colocalisation	286
4.	Curriculum Vitae.....	287
5.	Autorisations pour communication personnelle lors du congrès "The Ubiquitin Family" à CSHL, NY, avril 2007.....	292
5.1.	Courriel envoyé afin de demander l'autorisation.....	292
5.2.	Autorisation du Dr. J. Peng.....	292
5.3.	Autorisation du Dr. Keith D. Wilkinson.....	293
5.4.	Autorisation du Dr. N. A. Hathaway	293
5.5.	Autorisation du Dr. D. Skowyra	294
5.6.	Autorisation du Dr. C. B. Carlson.....	294
5.7.	Autorisation du Dr. A. Pichler	294

5.8. Autorisation du Dr. A.C.O. Vertegaal 295

5.9. Autorisation du Dr. T.K. Sixma 295

5.10. Autorisation du Dr. H. Sun 296

5.11. Autorisation du Dr. G. Gill 296

Bibliographie.....297

Liste des tableaux

Tableau 1: Détails de toutes les MPTs recensées sur I κ B α et NEMO (adapté de (315)). 84

Liste des figures

Figure 1: Schéma général de la phosphorylation (extrait de (17)).....	38
Figure 2: Abl possède 11 sites de phosphorylations (extrait de (426)).....	41
Figure 3: Exemple de changement conformationnel local induit par la phosphorylation.	42
Figure 4: Représentation schématique des divers motifs reconnaissant des résidus phosphorylés de façon spécifique (adapté de (308)).....	43
Figure 5: Représentation schématique de voies de signalisation avec en exemple les voies des familles MAPK, GSK3 et PDK1 (extrait de (39)).....	44
Figure 6: Structure en β -grasp de l'Ub et mise en évidence (en rouge) de ses 7 lysines (K) (extrait de (436) et (384)).....	48
Figure 7: Les différents types d'ubiquitination (ou ubiquitylation) (extrait de (436)).	48
Figure 8: Schéma général de la réaction d'ubiquitination (extrait de (426)).....	50
Figure 9: Conformation différente des chaînes de polyubiquitination utilisant la lysine K48 ou K63 (extrait de (325)).	51
Figure 10: Schéma illustrant la complexité possible des chaînes d'ubiquitine avec participation des 7 lysines (extrait de (455)).....	55
Figure 11: Zone hydrophobe L8-I44-V70 (en jaune) reconnue sur l'ubiquitine par les UBDs. Les lysines sont indiquées en rouge (extrait de (325)).....	56
Figure 12: Dégradation d'une protéine polyubiquitinée K48 par le protéasome (extrait de (426)).....	57
Figure 13: Schéma illustrant l'endocytose d'une protéine membranaire (ici GPCR) et son cheminement jusqu'à la dégradation lysosomiale (extrait de (426)).....	58
Figure 14: Représentation en ruban de la superposition de SUMO (en bleu), de l'ubiquitine (en vert) et de NEDD8 (en rouge) (extrait de (436)).	62
Figure 15: Schéma général de la sumoylation (extrait de (157))	65
Figure 16: Illustration de la notion de portes logiques ET/OU (extrait de (318)).	73
Figure 17: Schéma illustrant la notion de nanoswitches by allovalency (extrait de (318))... ..	74

Figure 18: Illustration d'un nanoswitch by allovalency sur la protéine Sic1 (extrait de (371)).	74
Figure 19: MPTs de I κ B α (adapté de (315)).	82
Figure 20 : MPTs de NEMO (adapté de (315)).	83
Figure 21: Structure du RING finger de PML déterminée par RMN (extrait de (49)).	86
Figure 22: Représentation des protéines TIF1 α et β .	88
Figure 23 : Modèle de l'interaction TIF1 β /KRAB (adapté de (311)).	91
Figure 24 : Schéma représentant les diverses activités protéiques recrutées par TIF1 β afin d'induire le "gene silencing".	92
Figure 25: Représentation des PML-NBs avec les protéines associées identifiées (extrait de (182)).	95
Figure 26: Isoformes de PML (extrait de (197)).	96
Figure 27: Illustration du rôle du SBD de PML dans la formation des PML-NBs (extrait de (265)).	97
Figure 28: Représentation schématique de PML III.	101
Figure 29: Représentation schématique du principe du BRET dans la détection d'interaction protéiques (ici entre les protéines X et Y).	105
Figure 30: Principe de la détection de la sumoylation de PML par BRET.	106
Figure 31 : Modèle suggéré par (317) pour la dégradation RNF4 induite (voie du haut représentée en A) ou As ₂ O ₃ / RNF4 induite (voie du bas représentée en B) suite aux résultats de (404) et (231).	212
Figure 32 : Modèle du rôle stimulateur de SUMO1 sur l'interaction PML sumoylé / PML SBD au niveau des PML-NBs et de la phospho-dépendance de cette interaction qui conduit à la dégradation As ₂ O ₃ -induite de PML.	215
Figure 33 : Adaptation du modèle de Pétrie et Zélent (317) (présenté en Figure 31 page 213) suite à nos résultats.	217
Figure 34 (page suivante) : Induction par As ₂ O ₃ du signal BRET entre les paires PML (WT, S560-565A, ou SBD)-Luc / YFP-SUMO (1 ou 2).	218

Figure 35: Relations et dynamiques possibles impliquant les lysines d'une protéine pouvant être ubiquitinée / sumoylée / acétylée / méthylée (extrait de (118)).	229
Figure 36: Évolution du signal BRET ² généré par la paire PML-Luc / GFP-UBI après traitement à l'As ₂ O ₃ .	275
Figure 37: Mise en évidence d'une relation interdépendante entre la sumoylation et le signal B.R.E.T. détecté par PML-Luc / GFP-UBI.	277
Figure 38: La coexpression d'une quantité croissante de GFP-UBI compétitionne pour le signal BRET de sumoylation basal et As ₂ O ₃ -induit.	278

Abréviations

14-3-3	family protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases
Å	xxolubili
a.a.	acide aminé
Abl	abelson protein
ADP	xxolubilis di-phosphate
AF-2	accessory factor 2
Aos1/Uba2	activation of SMT3P / ubiquitin-activating enzyme 2
APC	adenomatosis polyposis Coli
APF-1	ATP-dependent proteolysis factor 1
APL	acute promyelocytic leukaemia
ARN	acide ribo nucléique
As ₂ O ₃	arsenic trioxyde
ATG8	autophagy-related protein 8 precursor
ATM	ataxia-telangiectasia mutated
ATP	xxolubilis tri-phosphate
B-box	boite B
Bcl10	B-Cell cll/lymphoma 10
BRCA1	breast cancer suppressor protein
BRET	bioluminescence resonance energy transfer
C	cystéine
c-Cbl	casitas B-lineage lymphoma.
Cdc4	cell division cycle 4
CDK	cyclin dependant kinase
Cdk2	cyclin dependant kinase 2
c-Fos	FBJ murine osteosarcoma virus

Chk1	checkpoint, <i>S. pombe</i> , homolog of, 1
c-Jun	the name JUN comes from the Japanese ‘‘Ju-nana’’ that means 17
CK2 / p38 MAPK	casein kinase II / p38 mitogen activated protein kinase
CRL	complement receptor lymphocyte
c-Src	transforming gene of rous sarcoma virus
Ctal	extrémité carboxy terminale
cyclin B1	cyclin discovered using using xenopus anti-B-type cyclin antibodies
D	aspartate
DRP1	dynammin-related protein 1
DUBs	deubiquitinases
E	glutamate
E1	enzyme 1
E2	enzyme 2
E2-25K	25 kDa ubiquitin (Ub)-conjugating enzyme E2
E3	enzyme 3
E4	enzyme 4
EGF	epiderm growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELK1	ets-related protein
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinases ½
Ets1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)
e-YFP	yellow fluorescent protein
FACs	fluorescence activated cell sorter technic
FAT10	ubiquitin D
FHA	forkhead-associated
FLIM	fluorescence lifetime imaging microscopy
FRET	fluorescence resonance energy transfer

FUB1	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed
G	glycine
GATA-1	globin transcription factor 1
Gcn4	general control nondepressible 4
GFP	green fluorescent protein
GMP-1	gap modifying protein 1
GPCR	récepteurs couplés aux protéines G
GSK3	glycogène synthase kinase 3
H ² O	eau
HDAC1/Sin3A	histone déacétylase 1 / SIN3 homolog A, transcriptional regulator (yeast)
HDAC3	histone déacétylase 3
HDAC4	histone déacétylase 4
HDACs	histone déacétylases
HECT	homologous to E6AP carboxy terminus
HIPK2	homeodomain interacting protein kinase 2
HIPK3	homeodomain interacting protein kinase 3
HP1	heterochromatin protein-1
HP1BD	heterochromatin protein 1 binding domain
HSF1	heat shock factor 1
HSF4b	heat shock transcription factor 4b
I	isoleucine
IKKs	IkappaB kinases
IKK α	IkappaB kinase alpha
IKK β	IkappaB kinase xxiiolu
Ile	isoleucine
ISG15	IFN-stimulated gene 15

IκBs (IκBα, IκBβ , IκBε , Bcl-3)	
	IkappaB
IκBα	IkappaB alpha
Jnk	Jun N-terminal kinase
K	lysine
KAP1	KRAB-associated protein 1
kDa	kilo Dalton
Kid1	kinase induced by depolarization
KOX1	zinc finger protein 10
KRAB	kruppel-associated box
KRAZ1	kruppel-associated box-containing zinc finger protein 1
KRAZ2	kruppel-associated box-containing zinc finger protein 2
L	leucine
Leu	leucine
Lys	lysine
MAK	male germ cells-associated kinase
MALT	mucosa-associated lymphoid xxiii olubi lymphoma translocation gene 1
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKK2	mitogen-activated protein kinase kinase 2
MDM2	murine double minute clone 2
MEF2A	myocyte enhancer factor 2A
MEF2D	myocyte enhancer factor 2D
MEK1	mitogen-activated protein kinase or extracellular signal-regulated kinase kinase
Mms21	non-SMC xxiii olubil 2, MMS21 homolog (S. cerevisiae)
MPTs	modifications post traductionnelles
multiUb	multiubiquitination
N	asparagine

N-CoR	nuclear hormone receptor corepressor
Nedd8	RUB1 related to ubiquitin 1
NEMO	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma
NF- κ B	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NF- κ B (p105, p100, RelA, RelB, c-Rel)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105), nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100), etc
nm	xxivolubilis
NOD2/RIP2	nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 / nuclear receptor interacting protein 2
NRID	nuclear receptor interacting domain
N ^{tal}	extrémité amino terminale
p27	protein 27
p300	protein 300
p38a/MAPK14	P38 mitogen-activated protein kinases / mitogen-activated protein kinase 14
p53	protein 53
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PDSM	phospho dependant sumoylation motif
Pi	phosphate inorganique
PIAS	protein inhibitor of activated STAT
PIAS α	protein inhibitor of activated STAT, 2
PIC-1	positive clone 1
PML	promyelocytic leukaemia
PML-NBs	PML-nuclear bodies
PODs	PML oncogenic domains

poly-ADP-ribosylation	poly-adénosine-diphosphate-ribosylation
polyUb	polyubiquitin
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor-gamma
PPAR γ 2	peroxisome proliferator-activated receptor γ 2
PTB	phosphotyrosine binding
PTP1B	protein tyrosine phosphatase-1B
Q	glutamine
R	arginine
Rad18	RAD18 homolog (<i>S. cerevisiae</i>), RNF73
RanBP2	RAN binding protein 2
RanGAP1	Ran-GTPase activating protein 1
RAR	retinoic acid receptor
RBCC	RING B-boxes coiled-coil
RING	really interesting new gene
RMN	xxvolubilis magnétique nucléaire
RNF4	ring finger protein 4
RXR	retinoid X receptor
RXR γ	retinoid X receptor gamma
SAE2	SUMO1 activating enzyme subunit 2
SBD	SUMO binding domain
SCFcdc4, fbw7, β TrCP	Skp1-Cullin-1/Cdc53-F-box protein, etc. complexes protéiques E3 UBI ligases
SETDB1	SET domain, bifurcated 1
SH2	Src homology 2
SIM	SUMO interacting motif
Siz/PIAS	protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription

Smad4	SMAD family member 4, SMAD, mothers against DPP homolog 1 (Drosophila)
SMT3	S-adenosyl-methionine-sterol-C-methyltransferase 3
SNIP-1	smad nuclear interacting protein 1
sp100	SP100 nuclear antigen
Srb10	cyclin-dependent kinase also known as Cdk8
SRC	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1
STI571	imatinib
SUMO	small ubiquitin-like modifier
SuPr-1	SUMO-1 protease-1
SUSP4	SUMO-specific protease 4
SV40	Simian vacuolating virus 40 ou Simian virus 40
SWI/SNF	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a
Syk	spleen tyrosine kinase
T	thréonine
TFIIIE α , TAFII28, TAFII55	general transcription factor IIE, polypeptide 1, alpha 56kDa TAF11 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 28kDa TAF7 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 55kDa”
TIF1	transcriptional intermediary factor 1
TIF1 α	transcriptional intermediary factor 1 alpha
TIF1 β	transcriptional intermediary factor 1 beta
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
TRIM	tripartite motif-containing protein

TRIM24	tripartite motif-containing protein 24
TRIM28	tripartite motif-containing protein 28
TSS	TIF signature sequence
TTRAP	TRAF and TNF receptor associated protein
Ub	ubiquitine
UBA	ubiquitin associated
Ubc13 / Mms2	ubiquitin-conjugating enzyme E2N (UBC13 homolog, yeast) / ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
UBC9	ubiquitin-conjugating enzyme E2
UbcH5	ubiquitin-conjugating enzyme E2 D1
UBDs	ubiquitin binding domains
Ubl	ubiquitin-like
UBL1	ubiquitin-like 1
U-box	ubiquitin ligase domain
Ubp1	upstream binding protein 1
Uch-L1	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1
UFD2	U-box containing factor 2
Ufm1	ubiquitin-fold modifier 1
Ulps	ubiquitin like proteins
Urm1	ubiquitin-related modifier 1
V	valine
Val	valine
VEGF	vascular endothelial growth factor
WT	wild type
X	a.a. quelconque
XPC	xeroderma pigmentosum group C
Y	tyrosine

ZNF133	zinc finger protein 133
ZNF140	zinc finger protein 140
ZNF74	zinc finger protein 74
ψKXE	a.a. hydrophobe – lysine – a.a. quelconque – glutamate

A David.

*Tu m'as emmenée sur des chemins
que je n'aurais peut-être pas empruntés sans toi.
Voici 15 ans maintenant que tu es un rayon de soleil de tous les jours.
Notre rencontre nous a amené à tirer le meilleur de nous-mêmes
et la vie n'aurait pas été la même sans ce 11 novembre.*

A mes deux petits pirates, Hugo et Maxime.

*Vous m'avez montré que je pouvais encore aller
plus loin et plus haut dans de nombreux domaines
et chaque jour, vous êtes ma plus belle raison d'avancer toujours et encore.
J'espère, à l'avenir, être aussi inspirante pour vous
que vous ne l'avez été pour moi.*

A Maman.

*Nous avions chacune notre défi à relever
et je n'aurais pas été si loin sans nos encouragements mutuels de chaque jour.
Ton combat est fini mais ton courage et ta détermination
resteront pour moi une intarissable source d'inspiration.*

Remerciements

Cette section est une des plus importantes pour moi. La finalisation du Ph.D est une étape primordiale et ce moment est l'occasion unique de se remémorer les visages, les gestes, les rencontres et les interactions qui, au fil de ces dernières années, ont lentement mais sûrement conduit à l'aboutissement de cette aventure.

*Bien sûr, le visage de **Muriel** me vient en premier lorsque je pense à mon Ph.D. Un grand merci Muriel pour votre direction et vos conseils. Les derniers mois ont été particulièrement riches en interactions stimulantes et en échanges productifs. Merci aussi d'avoir toujours été pleine d'encouragements et de n'être jamais allée à l'encontre de mon besoin d'indépendance et d'autonomie. Un grand merci aussi pour votre confiance en ma volonté et capacité d'avancer. Vous m'avez connue dans une grande période de remise en question à la naissance de mes enfants mais votre bienveillance m'a permis de passer à travers cette étape et je vous en serai toujours reconnaissante. Durant ces 6 années, nous n'avons eu qu'une seule « crotte sur le Canada » (amplement débattue). Je ne veux pas rouvrir ici le débat, qui, pour moi est réellement clos, mais simplement mentionner que rétrospectivement, une seule, c'est bien peu. Elle m'a de plus permis d'avancer en tirant le meilleur de cette situation : après le grand doute et la remise en question qu'elle m'a inspirés, j'ai finalement gardé au cœur une grande fierté de cette indépendance financière bénéfique à tout le laboratoire au complet. Enfin, la meilleure leçon que j'emporte est votre "zen attitude" face à la vie...rétrospectivement, je me félicite réellement pour mon choix de directeur de Ph.D : il aurait été difficile de tomber dans un meilleur environnement. J'espère juste ne jamais faire l'objet de poursuites pour séquestration dans votre bureau le soir avec pour seul réconfort un sandwich : merci de votre grande disponibilité en fin de parcours! Toutes nos "chicanes d'écriture" vont me manquer car cette dynamique nous a permis de tirer le meilleur de l'article. Merci également pour les nombreux congrès où vous m'avez envoyée et qui ont été une source d'enrichissement importante, particulièrement le*

dernier à CSHL. Finalement et de façon plus personnelle, un énorme merci pour vos miles et votre aide personnelle lors de ma période financière difficile voilà deux ans.

Le second visage est celui de **Yann**, mon collaborateur. Yann, cette dernière année n'aurait pas été la même sans toi. Notre collaboration a été des plus fructueuse, stimulante et énergisante. Nous aurions autant de page d'échanges de courriel que cette thèse si nous les regroupions, sans compter nos rendez-vous Skype (Merci Skype simplement d'exister!). Je pense que le projet n'aurait jamais été si loin si nous n'avions été ensemble. Notre échange a de plus été si équilibré. Quand l'un s'essoufflait, l'autre prenait le relais et nous surfions de rebondissements en rebondissements sans jamais stagner. Ce projet a été un vrai bonheur inattendu dans la fin de mon Ph.D : un véritable cadeau. C'est un travail d'équipe aussi complémentaire et équilibré qui, à mon sens, procure tant de satisfactions en recherche...et de résultats! Merci mille fois pour toute ton énergie positive qui a été un véritable catalyseur pour moi.

Le troisième est immanquablement celui de **Martine**. Faire mon Ph.D chez Muriel m'a donné la grande opportunité de faire ta connaissance. Ton professionnalisme sans faille subtilement mêlé à ton détachement contrôlé du travail font de toi une collègue des plus intéressantes et intrigantes : tu es pour moi l'incarnation parfaite de l'art subtil d'équilibrer plaisirs de la vie et travail tout en étant très professionnelle et impliquée. Martine, donne moi le secret d'un tel équilibre! Ta rigueur, ton équilibre, ta discrétion et ton grand respect envers les étudiants sont pour moi les quatre éléments marquants qui m'ont donné tant de plaisir à te côtoyer. Avec ton nouveau rôle de justicière attaché à ton nouvel (déjà 4 ans!!) emploi tu es une des personnalités les plus intéressantes que j'ai rencontrée durant mon Ph.D.

Je ne peux m'empêcher ensuite de penser à **Jean-François Mercier**, aux **Drs. Stéphane Angers, Ali Salahpour et Michel Bouvier**. Un gros merci pour cette première collaboration dans mon Ph.D, source de riches échanges et de mon initiation au BRET. Toute la suite n'aurait pu arriver sans ce premier article que je considère désormais comme

un préliminaire au second, une étape nécessaire de préparation. Merci particulièrement à Jean-François pour nos discussions et échanges importants sur nos résultats. Merci également au Dr. Michel Bouvier plus particulièrement pour m'avoir laissé l'accès au BRETCOUNT dans son laboratoire durant tout le début de mon Ph.D, pour les échanges toujours enrichissants sur les résultats et la façon de les présenter lors de l'écriture du papier.

*Merci au **Dr. Mounira Chelbi-Alix** pour les intéressants échanges par Skype.*

Bien sûr, un Merci à tous les membres du laboratoire passés et présents :

***Patricia**, tu as su prendre ta place et apporter une brise nouvelle de fraîcheur et de légèreté. Merci d'avoir été mon « coach Skype » lors de la rédaction...même si tu n'as pas tenu la longueur, ça a été très stimulant pour décoller au départ.*

***Xavier**, merci pour beaucoup de choses, entre autres notre période très stimulante "Camilla L. / Charlotta M.". Oublions par contre notre période "ophtalmologique" afin de garder bon souvenir de toutes nos interactions. Tous mes vœux pour la suite!!*

***Hamsa** (pour m'avoir fait pratiqué mon anglais), **Imène** (et ses bons petits plats), **Samantha**, **Karl** (si relax), sans oublier **Alexandre** ("la fine équipe"...merci pour ce bel été).*

*Un grand merci au **Dr. Daniel Chevrier**. Les démonstrations ont été pour moi voici 2 ans mon salut financier en plus de toute la stimulation qu'elles m'ont apportées par les nombreux échanges avec les jeunes étudiants. Daniel, tu as compris dans quelle mauvaise situation je me trouvais et à quel point la poursuite et la finalisation de mon Ph.D pouvaient malheureusement y être liées. Je t'adresse pour ceci un merci tout spécial car je ne serais peut-être pas passée à travers cette difficile étape sans ta compréhension et les démos que tu m'as alors octroyées. Merci à **André** également pour ce matin de février et plus récemment pour sa disponibilité pour scanner (je n'ai pas oublié les abricotines).*

*Merci également à tous les divers intervenants croisés à un moment ou un autre et qui m'ont apportés leur aide précieuse : **Monique, Louise, Élane, Sylvie, Vivianne.***

*Merci aux **Drs. André Ferron et Nicole Dubreuil** qui m'ont accordé un délai suffisamment raisonnable pour me permettre de bénéficier de la fin de ma bourse l'an passé.*

*Un Merci spécial au **F.R.S.Q.** et à la **Fondation des Maladie du Cœur** qui m'ont généreusement octroyé une bourse de Ph. D. Un autre Merci au **F.R.S.Q.** pour la bourse de post-doctorat qui m'attend. Merci également à la **F.E.S.** et au **comité du programme de Biologie Moléculaire** pour les diverses bourses auxquelles j'ai pu accéder avant d'avoir mon statut de résidence permanente.*

*Merci au **Dr. Michel Tremblay** pour sa patience dans l'attente de mon arrivée.*

*Merci enfin aux **membres du jury** pour avoir accepté de réviser cette thèse, en espérant que vous aurez plaisir à la lire.*

Sortie de l'Université, la vie de tous les jours et les rencontres en dehors du milieu de travail participent pour beaucoup à l'aboutissement d'un tel projet.

*Je tiens à remercier en premier lieu **David**. Tu as été un soutien de tous les instants...particulièrement à la fin où tout s'est enchaîné et déchaîné à la fois. Tu as été mon roc dans la tempête comme toujours. Comme le sel et le poivre, l'huile et le vinaigre, le noir et le blanc... si différents et pourtant si complémentaires, je ne peux imaginer un instant sans te savoir à mes côtés. Merci d'être toujours là et merci pour tes innombrables et inépuisables idées de détente...*

*Merci à mes petits pimousses, **Hugo et Maxime**. Vous avez su aller chercher le meilleur de moi, me montrer que je pouvais aller encore plus loin et m'avez apporté une joie de chaque instant depuis votre naissance qui ne me quittera plus, je le sais. Hugo, j'adore ta façon de voir les choses et de toujours m'aider à relativiser par ta grande sagesse due à ton regard d'enfant sur la vie. Merci de m'aider à retrouver ce regard neuf que l'on a tendance à mettre de côté en grandissant mais qu'il ne faut pourtant jamais perdre. Maxime, j'ai hâte*

que tu me racontes autant de choses. En attendant, tes « moi aussi », « pourquoi? », et « j'ai rien fait » récurrents et qui m'auront accompagnés tout le long de ma rédaction sont de véritables petites bulles rafraichissantes qui ne peuvent que me faire sourire.

*Merci à **Maman et Papa** pour tout tout tout : aucun mot ne saurait être assez juste et fort pour décrire tout ce que vous avez fait pour moi et vous êtes un inspirant modèle de tous les jours pour mon rôle de parent. Je sais, Maman, que malgré ton absence, tu continues à veiller sur nous tous tel que tu l'as toujours fait.*

*Merci à **tout le reste de ma famille** pour le soutien à tout point de vue en particulier **Marianne et Mémère Malou**.*

*Merci à **Réjane, Sandra, Réginald, Dalinda, Soizic, Déborah, Laurent, Martine** mes amis de toujours.*

*Merci à **A.B.**, qui a été une clé de voûte dans un moment important de ma vie. Si on se fie à la définition stricte de ce terme : « une clé de voûte est un élément unique qui permet de maintenir la cohésion de multiples éléments l'entourant et ce, par sa seule présence, ses seules caractéristiques intrinsèques ». C'est en plein ça!*

*Merci au **Dr. Catherine Montgomery** pour tous ses encouragements journaliers jusqu'au dernier moment. Sa constante bonne humeur et sa grande sérénité sont pour moi un véritable et inspirant modèle à suivre.*

*Enfin, merci à **Annie, Ariane, Diane, Dominic, Dorine, Eric, Florida, Francine, Jacynthe, Louise, Marie-Hélène, Marie-Josée, Vilma, Vivianne**, pour avoir si bien pris soin de Hugo et Maxime pendant que je travaillais. C'est grâce à votre précieux travail que l'université peut jouir d'un si remarquable C.P.E.*

Ce qui ne tue pas rend plus fort

Friedrich Nietzsche

Around here, however, we don't look backwards for very long.

*We **keep moving forward**, opening up new doors and doing new things,*

because we're curious...

and curiosity keeps leading us down new paths.

Walt Disney

Meet the Robinsons

Faire de la Recherche revient à observer le ciel à travers le trou d'une serrure

une nuit de passage d'étoiles filantes :

ce peut être à la fois extrêmement excitant et frustrant.

D.G-D.

Chapitre 1 : Introduction

1. Introduction générale sur 3 MPTs (modifications post-traductionnelles) : la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation.

Lors du séquençage du génome humain une première surprise a été de constater que le génome ne comporte que 25000-30000 gènes (1) (comparativement au 100 000 attendus). La levure, pour sa part, en posséderait 6000 (132, 444) et la souris 30000 (344, 430). La seule façon de diversifier les protéines encodées par ce génome restreint repose sur deux mécanismes principaux qui permettraient ainsi de générer plus de 1 000 000 de protéines différentes chez l'homme (426) :

- l'épissage de l'ARN (41, 257),
- les modifications post-traductionnelles (MPTs) (425).

Les modifications post-traductionnelles des protéines sont un processus essentiel à la vie dynamique de la cellule. Elles sont définies selon deux catégories par :

- l'ajout covalent d'un groupement (chimique, lipidique, glucidique ou polypeptidique) sur la chaîne latérale d'un acide aminé d'une protéine,
- ou le clivage de la chaîne principale d'une protéine.

Il existe plus de 300 modifications post-traductionnelles (425). Parmi elles, et pour n'en citer que quelques exemples, on trouve :

- l'ajout de divers groupements chimiques (acétylation, amidation, biotinylation, carboxylation, hydroxylation, méthylation, phosphorylation, etc.),
- l'ajout d'acides gras (myristoylation, isoprénylation, glypiation, etc),
- l'ajout de glucides (poly-ADP-ribosylation, acétylglucosamination, c-mannosylation etc.),

- l'ajout de polypeptides (ubiquitine, SUMO, Nedd8, ISG15, FAT10, ATG8 etc.).

Quinze des vingt acides aminés sont susceptibles d'être la cible d'une MPT (426). Ces MPTs, catalysées et hydrolysées par des enzymes très spécifiques, sont la plupart du temps très dynamiques, labiles et réversibles. Elles peuvent changer, la taille, la charge, la structure et la conformation de la protéine ciblée, ce qui peut entraîner un changement d'interaction protéine-protéine et mener la protéine cible de MPTs à interagir avec d'autres complexes protéiques. Ceci conduit souvent à une nouvelle localisation, une nouvelle fonction voire une dégradation de la protéine ciblée.

Chaque protéine peut subir différentes MPTs de manière simultanée ou consécutive. Il existe parfois une coopération ou une compétition entre diverses MPTs.

De toutes ces MPTs, certaines se démarquent de par leur implication connue dans des maladies tel que la phosphorylation, l'acétylation, la nitration, la ribosylation (78), l'ubiquitination et ces variantes (180). Très étudiées, ces MPTs sont désormais la possible cible de molécules thérapeutiques.

Dans cette thèse, trois MPTs seront plus particulièrement développées, il s'agit de la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation.

1.1. La phosphorylation

1.1.1. Historique

La phosphorylation est la plus commune et certainement la plus étudiée des MPTs. C'est en 1954 que la toute première activité enzymatique de phosphorylation fut démontrée sur la protéine cible caséine (59). En 1955, on s'aperçut alors que ce processus était réversible (402). Finalement, il fallut attendre 1992 pour que la phosphorylation réversible de protéines soit démontrée comme un mécanisme de régulation, ce qui valut le prix Nobel de Physiologie/Médecine à Edmond H. Fischer and Edwin G. Krebs.

1.1.2. Définition générale

La phosphorylation consiste en l'ajout covalent du groupement phosphate terminal de l'adénosine triphosphate (ATP) sur le groupement hydroxyle d'un acide aminé de la protéine cible (lien phosphoester). Ce processus est une réaction enzymatique rapide et réversible catalysée par une kinase (59). La déphosphorylation de la protéine (hydrolyse du lien phosphoester) est effectuée par une phosphatase (402). Très répandue, cette MPT concerne 30% des protéines cellulaires (27, 187).

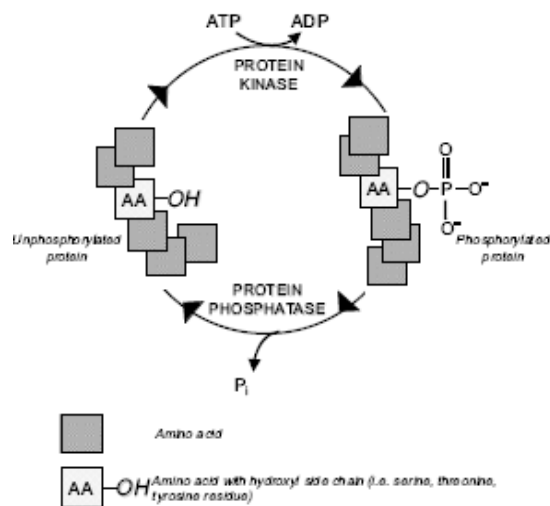


Figure 1 : Schéma général de la phosphorylation (extrait de (17)).

1.1.3. Acides aminés ciblés / enzymes impliquées

1.1.3.1. Les acides aminés ciblés

Les trois acides aminés modifiés par phosphorylation chez les mammifères sont la sérine (S), la thréonine (T) et la tyrosine (Y) avec une proportion de 95% S pour 4% T et moins de 1% Y modifiées (78, 258). Chez les bactéries et les champignons, l'histidine (H) et l'asparagine (B) peuvent également être la cible de la phosphorylation (176, 403). Et de façon moins répandue, on rapporte aussi la possibilité de phosphorylation sur un lipide (408).

1.1.3.2. Les kinases

Les protéines kinases, enzymes responsables de la phosphorylation, sont si nombreuses qu'elles représentent la 3^{ème} plus abondante famille de protéines dans le génome humain. Avec 518 membres, l'ensemble des gènes encodant pour cette superfamille de protéines (1,7% de tous les gènes eucaryotes) a été dénommée le **kinome** (260).

Les kinases sont caractérisées par un domaine catalytique commun retrouvé dans 478 des 518 membres recensés (260). Selon le résidu modifié, on les classe selon 4 principaux groupes (17) :

- les sérine-thréonine kinases : au nombre de 400, elles représentent la plus grande portion des kinases (67% (17)),
- les tyrosine kinases : au nombre de 90 (17% de toutes les kinases), elles sont pourtant responsables de fonctions clés telle que la transduction d'un stimulus externe au noyau de la cellule. Ce groupe est divisé en deux classes : récepteurs tyrosine kinase et tyrosine kinases cytoplasmiques,
- les tyrosine kinases-like (8%),

- les kinases atypiques (où on retrouve les lipides kinases) (8%).

Récemment et de façon plus précise, 17 groupes de kinases ont été classifiés et représentés en dendogramme (260).

1.1.3.3. Les phosphatases

Jusqu'à récemment, les phosphatases ont été moins étudiées que les kinases (la première tyrosine kinase fut purifiée en 1980 (85) alors qu'il fallut attendre près de 10 ans, en 1988 (410) pour la première purification d'une phosphatase et 1990 (141) pour le premier clonage. Désormais, la notion de **phosphatome**, pour désigner la partie du génome consacrée à la synthèse des phosphatases, s'est imposée.

On retrouve 180 phosphatases classées en 3 grands groupes (93) :

- les sérine / thréonine phosphatases (19% de toutes les phosphatases (17)),
- les tyrosine phosphatases (12, 394) : au nombre de 107, divisées également en deux classes (récepteurs tyrosine phosphatases et tyrosine phosphatases cytoplasmique), elles représentent 54% des phosphatases,
- les phosphatases à la spécificité double (déphosphorylant à la fois sérine/thréonine et tyrosine et aussi les phospholipides) (27%).

Il est à noter qu'un mécanisme de phosphorylation non-enzymatique, mais qui reste anecdotique, a été mis en évidence (349).

1.1.4. Conséquences de la phosphorylation

1.1.4.1. Expansion du génome / diversification du protéome

La phosphorylation, tout comme les autres MPTs permet une expansion du génome par diversification du protéome. En effet, à partir d'un seul gène, il peut y avoir un grand

nombre de protéines différentes. Pour s'en convaincre, il suffit de prendre l'exemple souvent illustrateur de la protéine kinase Abl qui est phosphorylée sur 11 différents résidus (sérine/thréonine et tyrosine) (426) : cela donne une possibilité de 2^{11} soit 2048 formes différentes pour cette seule protéine.

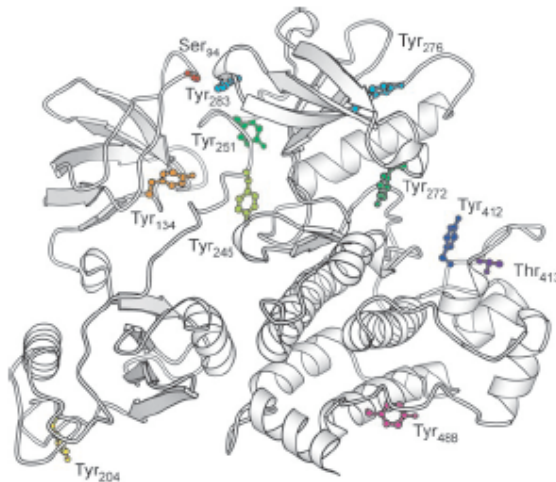


Figure 2 : Abl possède 11 sites de phosphorylations (extrait de (426)).

Il pourrait donc théoriquement exister dans la cellule 2048 phosphoprotéines Abl différentes.

Ajouté à cela, il suffit de se rappeler qu'il existe 518 kinases différentes pour phosphoryler approximativement 10 000 protéines cellulaires sur une grande combinaison de résidus différents : on peine alors à imaginer l'ampleur du phénomène et toutes les régulations fines dynamiques que cela peut impliquer dans la cellule.

Face à ces multiples formes de phosphoprotéines, on comprend pourquoi la phosphorylation et les voies de signalisation associées restent très complexes à étudier d'autant plus que ces modifications sont très labiles et dynamiques.

1.1.4.2. Changement conformationnel

Cette modification par un groupement phosphate entraîne souvent chez la protéine cible un changement conformationnel local de certains domaines (207). En effet,

l'introduction d'une charge négative permet alors une interaction avec les charges positives. Ces réorganisations conformationnelles locales sont la principale conséquence de la phosphorylation et la base essentielle de son rôle dans la signalisation. Une fois déphosphorylée, la protéine reprend sa conformation initiale et la phosphorylation agit ainsi comme un processus réversible permettant d'activer ou de désactiver la protéine cible.

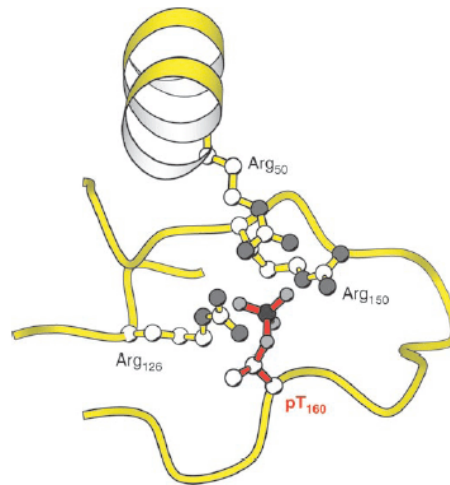


Figure 3 : Exemple de changement conformationnel local induit par la phosphorylation.

La charge anionique amenée par la phosphorylation de la thréonine (T) 160 de la protéine Cdk2 induit une interaction avec les charges cationiques des arginines Canada 50, 126 et 150 provoquant un changement conformationnel local de la protéine permettant de changer sa fonctionnalité (tiré de (426)).

1.1.4.3. De nouvelles interactions : les domaines de reconnaissances des phosphoprotéines

Plusieurs domaines protéiques sont maintenant reconnus comme étant des modules spécifiques de reconnaissance de formes 42olubilised42 de protéines. Ceci entraîne donc de nouvelles interactions entre la protéine 42olubilised et les protéines possédant ces domaines. SH2 fut le premier domaine découvert. Reconnaisant spécifiquement une tyrosine 42olubilised des récepteurs tyrosine kinases activés ou de leur cible, il fut un modèle pour comprendre comment la phosphorylation, induisant une interaction entre deux

protéines, peut ainsi permettre de propager un signal à l'intérieur de la cellule (306, 307). A ce domaine sont venus s'ajouter plusieurs autres depuis 1992 : PTB, WW, FHA, 14-3-3, MH2 etc. Longs de 40 à 150 acides aminés, ces domaines reconnaissent des séquences de 4 à 10 acides aminés contenant un résidu 43olubilised (305).

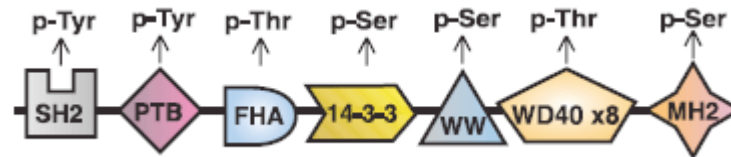


Figure 4 : Représentation schématique des divers motifs reconnaissant des résidus 43olubilised43 de façon spécifique (adapté de (308)).

Ces domaines sont très répandus, par exemple, 115 domaines SH2 sont présents dans le génome humain (308). Bien que très répandus, il apparaît que la diversité de ces domaines régulateurs soit limitée et la cellule exploite en fait ce nombre restreints de domaines en diverses combinaisons afin de générer une vaste gamme de protéines multi-modulaires spécialisées.

1.1.4.4. La phosphorylation : médiateur vedette des voies de signalisation

1.1.4.4.1. La phosphorylation dans les voies de signalisation

La phosphorylation, par une précise orchestration de l'action des kinases et des phosphatases, est au cœur de la médiation de la plupart des signaux de transduction dans les cellules eucaryotes (188). Les kinases et phosphatases sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux tels que la transcription, la progression du cycle cellulaire, les réarrangements du cytosquelette et les mouvements cellulaires, la prolifération, la différenciation, l'apoptose, la communication intercellulaire et intracellulaire etc. Ces processus cellulaires sont essentiels au fonctionnement du système

nerveux, immunitaire etc. et une seule dérégulation d'une de ces voies peut entraîner une pathologie.

Les protéines kinases propagent leur signal en cascade. Elles subissent la phosphorylation, deviennent ainsi actives et phosphorylent à leur tour la protéine en aval propageant ainsi le signal extracellulaire vers le noyau afin d'y répondre (100). Les protéines phosphatases (qui sont elles mêmes cibles de la phosphorylation), maintiennent de leur côté un délicat équilibre avec l'action des protéines kinases. La dérégulation d'une seule protéine kinase ou phosphatase peut donc avoir d'importantes conséquences sur la voie de signalisation au complet.

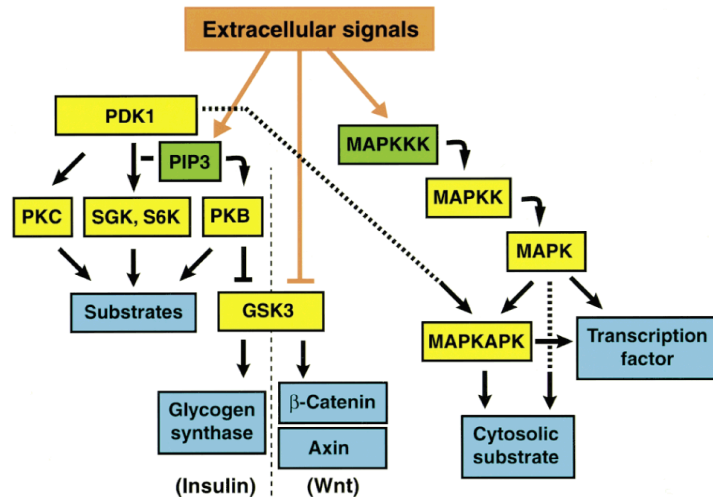


Figure 5 : Représentation schématisée de voies de signalisation avec en exemple les voies des familles MAPK, GSK3 et PDK1 (extrait de (39)).

Chaque flèche représente une activation de la protéine en aval par phosphorylation due à celle en amont.

1.1.4.4.2. Dérégulation et pathologies associées

Plusieurs pathologies sont associées à la dérégulation des voies de phosphorylation. La majorité des études et des intérêts ont ciblé les protéines kinases en premier lieu mais il est désormais évident que les protéines phosphatases sont tout aussi importantes puisqu'au moins une trentaine sont impliquées dans le cancer, en plus d'être impliquées dans des

maladies métaboliques, neurologiques, musculaires et auto immunes (13). Parmi tous les gènes humains, seulement 1% ont été identifiés responsables de cancers (123). Les kinases et phosphatases jouent un rôle important et plusieurs ont été démontrées jouant un rôle important causal dans le développement de cancers. Il a été démontré que 70% des cancers colorectaux ont une mutation dans un gène de kinase ou de phosphatase et bien que le kinome et le phosphatome regroupe 698 membres, seulement quelques uns démontreraient des mutations (8 kinases et 6 phosphatases) (26, 429). La plupart du temps, les kinases le font par gain de fonction (mutation faux sens sur un seul allèle qui augmente l'activité catalytique) et agissent ainsi comme oncogène dominant alors que les phosphatases le font par perte de fonction (mutation non sens sur les deux allèles), agissant comme un gène suppresseur de tumeur (17, 26, 356, 429). Il semble donc qu'un déséquilibre entraînant une trop importante phosphorylation soit la principale cause de dérégulation.

1.1.4.4.3. La phosphorylation comme cible thérapeutique

Au début des années 2000, les protéines kinases sont devenues des cibles majeures pour le développement de nouvelles thérapies, représentant jusqu'à 1/3 des nouvelles cibles thérapeutiques dans l'industrie pharmaceutique (79). Comparativement, les protéines phosphatases commencent seulement à éveiller l'intérêt (12). 75% des recherches cliniques portant sur des inhibiteurs de protéines kinases sont reliées au cancer. Les voies VEGF, EGFR et p38a/MAPK14 sont les trois grandes voies ciblées. 37 protéines sont ciblées mais 16 autres protéines kinases ont démontré une inhibition similaire par les thérapeutiques testées (424). Ce manque de spécificité entraîne une faible utilisation des inhibiteurs de kinases en tant que thérapies malgré leur importante implication dans grand nombre d'étapes de la maladie : seulement moins de 1% des thérapies sur le marché et moins de 3% de celles entrant en essai clinique. Une récente étude estime que deux kinases partageant plus de 60% d'identité ont de grandes probabilités d'être inhibées par le même composé (424). D'autres études pour augmenter la spécificité des produits testés seront nécessaires avant que ces inhibiteurs ne soient utilisés à grande échelle. On note toutefois quelques

succès avec par exemple l'utilisation du STI571, un inhibiteur de la tyrosine kinase Abl dans le traitement de certaines leucémies (266). Ces inhibiteurs de kinases sont utilisés en complément de traitements de chimiothérapie (374).

1.2. L'ubiquitination et les Ubls

1.2.1. L'ubiquitination

1.2.1.1. Historique

Hershko, A. Ciechanover et I. Rose, fondateurs des travaux sur l'ubiquitine (Ub), ont reçu, en 2004, le prix Nobel de Chimie pour leurs travaux sur l'ubiquitine en tant que protéine régulatrice de la dégradation cytosolique. L'Ub fût découverte voilà 30 ans et demeura depuis la cible de nombreuses recherches (165). Les premières études amenant à la découverte de l'Ub furent une démonstration de l'existence d'une dégradation protéique non-lysosomale ATP-dépendante à partir de réticulocytes (107). A. Hershko, accompagné de son étudiant gradué A. Ciechanover analysa ce système de dégradation par fractionnement biochimique (165). I. Rose était un proche collaborateur ayant reçu A. Hershko dans son laboratoire en année sabbatique. Ceci amena à la découverte de APF-1 (l'ATP-dependent proteolysis factor 1) qui fut ensuite nommé, de par sa large distribution, l'ubiquitine (133, 363, 443). Tout d'abord identifié comme mécanisme de dégradation protéique, le rôle de l'Ub a connu ces dernières années de nombreux développements et l'ubiquitination est désormais associée à la réparation de l'ADN, la régulation des histones, l'exportation nucléaire, l'activation de protéines kinases etc. Finalement, il est à noter que des Ubl (Ubiquitine-likes protéines) ont récemment émergés avec d'autres fonctions rendant cette famille encore plus intrigante (SUMO est une Ubl qui sera développée dans 1.2.2).

1.2.1.2. Définition générale

L'ubiquitination (ou plus récemment également nommée, l'ubiquitylation (421)) est une MPT où la glycine C^{tal} de l'ubiquitine se lie par un lien covalent isopeptidique avec une **lysine** de la protéine cible (323). Cette réaction réversible nécessite 3 étapes qui impliquent 3 enzymes (164, 166, 168, 169) (développée dans 1.2.1.4) :

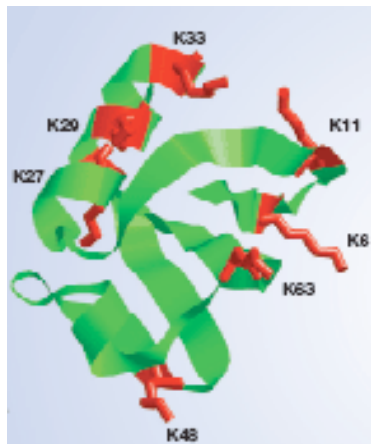
- l'enzyme d'activation E1 (ATP-dépendante),
- l'enzyme de conjugaison E2,
- l'ubiquitine ligase E3.

La réversibilité de cette réaction est dirigée par un processus enzymatique impliquant des enzymes appelées déubiquitinases (DUBs) (167, 442).

Cette MPT est très répandue et les protéines ubiquitinées sont actuellement en cours d'identification grâce aux techniques de protéomique. Une récente approche utilisant une purification par chromatographie d'affinité couplée à la spectrométrie de masse a révélée que 1075 des protéines de la levures sont ubiquitinées (313).

1.2.1.3. L'ubiquitine (Ub)

L'Ub est une petite protéine de 76 a.a. (8 kDa) très conservée chez les eucaryotes (seulement 4 a.a. différents entre la levure, la plante et l'animal (131)).



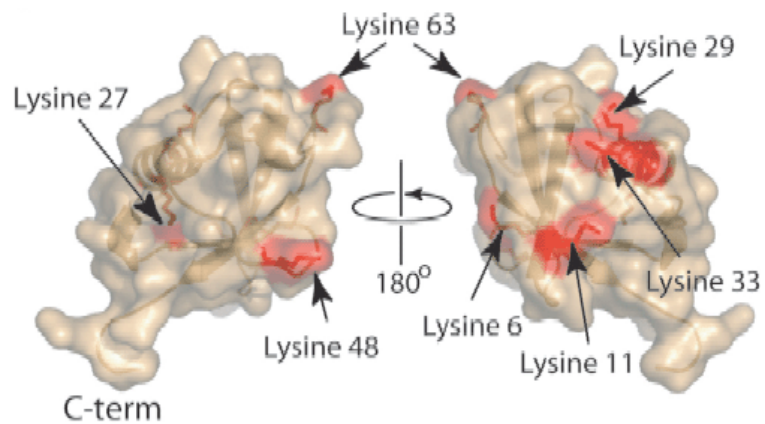


Figure 6 : Structure en β -grasp de l'Ub et mise en évidence (en rouge) de ses 7 lysines (K) (extrait de (436) et (384)).

Du fait de l'existence de lysines sur l'ubiquitine, il est important de mentionner qu'il peut y avoir polyubiquitination tel que représenté below (441). Lors de la polyubiquitination une chaîne se forme entre la glycine 76 et une lysine de l'ubiquitine suivante. Une polyubiquitination due à la lysine **48** de l'ubiquitine a été mise en évidence en premier et a été avidement étudiée : cette polyubiquitination K48 est liée à la dégradation protéique et sera traitée dans la section 1.2.1.5.4. Toutefois, chacune des 7 lysines de l'ubiquitine peut être impliquée dans une chaîne de polyubiquitination (cf. section 1.2.1.5.1, 1.). Finalement, il a été démontré également que parfois, l'ajout de l'ubiquitine pouvait se faire en N^{tal} de la protéine cible (131) : ce processus qui semblait anecdotique au départ démontre un rôle plus important et répandu désormais (268).

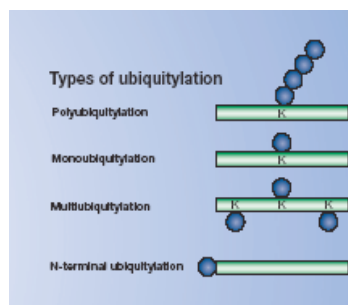


Figure 7 : Les différents types d'ubiquitination (ou ubiquitylation) (extrait de (436)).

1.2.1.4. Acide aminé visé / Enzymes impliquées : E1, E2, E3, DUB

Le NH₂ en ϵ d'une **lysine** est toujours le résidu de la protéine cible visé par l'ubiquitination. Souvent plusieurs lysines d'une même protéine peuvent être modifiées (313).

La réaction d'ubiquitination se passe en 3 étapes et implique 3 enzymes : E1, E2, E3 (169). L'aide d'une E4 a été suggérée pour la formation de chaînes polyubiquitinées (228). Le 76^{ième} acide aminé C^{tal} de l'ubiquitine est une glycine. Son groupement carboxylate (COO⁻, mis en évidence par maturation d'une chaîne de 5Ub grâce à une enzyme C^{tal} hydrolase Uch-L1 (323)), par une réaction ATP dépendante, se retrouve lié au groupement S⁻ de la cystéine catalytique de l'enzyme E1 formant ainsi l'ubiquityl-S-E1 (76, 143, 144). Ce lien thiolester entre le groupe -SH de la cystéine catalytique de la E1 et le groupement -COOH C^{tal} de l'ubiquitine est ensuite transféré sur l'E2. En effet, il y a ensuite transfert de l'ubiquityl entre les deux cystéines actives de E1 et E2 dans une réaction appelée transthioylation (169). Enfin, l'E3 intervient. Il existe trois grands groupes de E3 définis par trois domaines : HECT, RING et U-box. Selon le groupe auquel la E3 appartient, elle agit de deux façons différentes :

1. Elle reçoit à son tour l'ubiquityl pour le transférer à la protéine cible s'il s'agit d'une E3 à domaine HECT (362).
2. Ou, de façon plus répandue tel qu'illustré ci-dessous, l'E3 sert d'adaptateur entre la protéine cible et la E2 permettant ainsi le transfert de l'ubiquityl (E3 avec domaine RING ou U-box (122, 472)). Bien que certaines E3 de type RING puissent agir seules telles que MDM2, Parkin et c-Cbl, d'autres ont besoin pour remplir leur fonction de faire partie d'un très large complexe multiprotéique, tel que par exemple, le complexe APC (16). Les E3 de type RING sont divisées en deux sous-classes : les RIR (RING in between RING-RING) et les complexes multiprotéiques

CRL (Cullin-RING E3 (475)). Beaucoup de E3 de type RING interagissent avec d'autres E3 afin d'augmenter la spécificité et le niveau d'ubiquitination de la protéine cible. Enfin elles sont capables de réguler elle-même leur abondance par autoubiquitination (16).

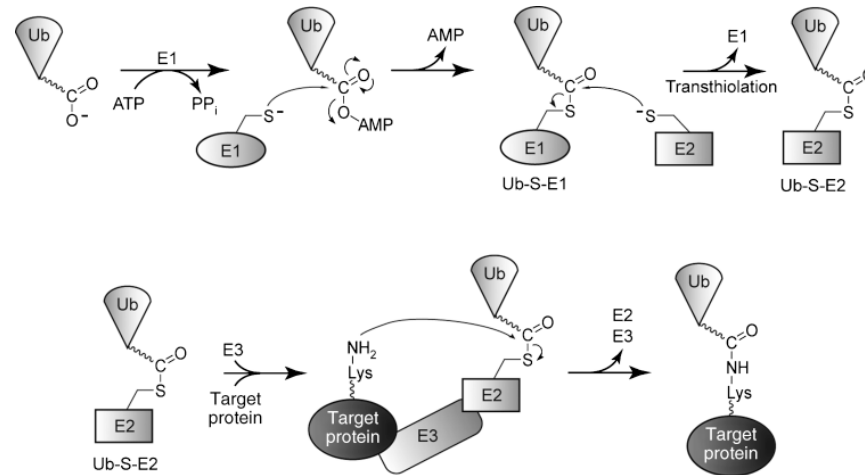


Figure 8 : Schéma général de la réaction d'ubiquitination (extrait de (426)).

Tout comme la phosphorylation, l'ubiquitination est une MPT réversible et la déubiquitination nécessite une autre famille d'enzymes, les DUBs (déubiquitinasés) (442). Les DUBs interagissent souvent avec les E3 ligases (292) et elles peuvent même se trouver ensemble sur une protéine cible (438). Ceci suggère, comme dans le cas de la phosphorylation, que ce n'est pas la MPT en elle-même qui est importante mais le délicat équilibre entre ubiquitination et déubiquitination.

De façon parallèle à la notion de kinome et phosphatome, la notion d'ubiquitome (409) commence tout juste à émerger et on estime qu'il existe chez l'humain 9 gènes dédiés à la synthèse de E1, 34 pour E2, 531 pour E3 et 88 pour les DUBs (84, 253, 267, 292). A travers ces vastes familles, un des défis essentiels est de comprendre la spécificité permettant de trouver la bonne combinaison entre sa protéine cible d'intérêt, son E1, E2, E3 et DUB.

1.2.1.5. Conséquences de l'ubiquitination

1.2.1.5.1. Poly versus mono-ubiquitination

1. La poly-ubiquitination

La polyubiquitination K48 est la plus abondante, la première découverte (69) et la plus étudiée jusqu'ici (313, 324). Son rôle est d'amener la protéine cible au protéasome où elle est ensuite dégradée (69, 138) (traité plus en détails dans 1.2.1.5.4 below).

La polyubiquitination K63 n'a pas de rôle protéolytique lié au protéasome comme initialement envisagé (18, 400). K63 peut subir à la fois de la poly et mono-ubiquitination (364) et avoir un rôle dans la réparation de l'ADN (400), l'activation de protéines kinases (400, 427), l'internalisation des protéines membranaires (364), la réponse inflammatoire (399), et la synthèse de protéines ribosomales (385).

La polyubiquitination en K48 et K63, sont restées jusqu'à ces dernières années, les deux seules polyubiquitinations connues et étudiées. De conformation différente à cause de la lysine impliquée dans le lien isopeptidique (419, 420), la chaîne K63 est aussi plus longue. Ceci entraîne une reconnaissance différente et des fonctions distinctes (325, 419).

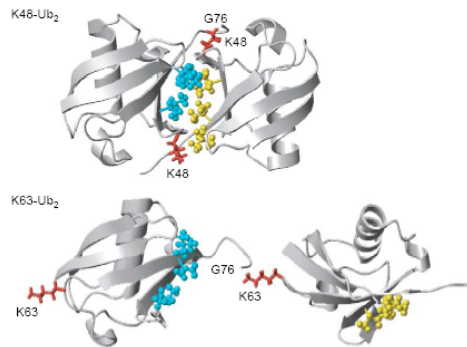


Figure 9 : Conformation différente des chaînes de polyubiquitination utilisant la lysine K48 ou K63 (extrait de (325)).

Alors qu'on pensait récemment encore que la polyubiquitination ne pouvait se produire qu'avec K48 et K63, on sait désormais depuis 2003 que chacune des 7 lysines de l'Ub peut

y participer (313) et (455). En effet, une élégante étude de purification par affinité combinée à de la spectrométrie de masse de haute-résolution a démontré que des polychaînes impliquant chacune des 7 lysines sont détectables dans le protéome de la levure avec par ordre d'abondance K48 > K63 et K11 » K33, K27 et K6 (313). Il est à noter que le nombre de chaînes K29 dans cette étude a été sous-estimé du fait d'un mauvais clivage au niveau du K33 et une nouvelle étude corrigeant ce fait, révèle un ratio de K6 :K11 :K27 :K29 :K33 :K48 :K63 de 40 :120 :20 :15 :5 :100 :40 (communication personnelle du Dr. J. Peng lors du congrès « The Ubiquitin Family » à CSHL, NY, avril 2007). De plus, chaque chaîne de polyUb a montré sa capacité à être reconnue et liée par des protéines liant les polyUb démontrant ainsi leur rôle fonctionnel (communication personnelle du Dr. K. D. Wilkinson lors du congrès « The Ubiquitin Family » à CSHL, NY, avril 2007). Les chaînes K48 et K63 restent donc les plus abondantes avec toutefois une émergence de la chaîne K11 selon les méthodes d'études utilisées.

La polyubiquitination K11 a montré sa capacité à entraîner la dégradation par le protéasome *in vitro* (21) mais n'a encore démontré aucun rôle *in vivo*. Cette chaîne est pourtant la 3^{ième} plus abondante chaîne de polyubiquitination après la chaîne K48 et K63 (313).

La polyubiquitination K6, K11, K27 et K33 n'avait jamais été démontrées *in vivo* avant cette étude (313). Une polyubiquitination K6 a depuis été observée pour l'autoubiquitination de BRCA1 en 2003 (450) et confirmée en 2004 par spectrométrie de masse (295). On ne connaît aujourd'hui toujours aucun rôle *in vivo* pour la polyubiquitination K11, K27 et K33.

La polyubiquitination K29, pour sa part, aurait un rôle protéolytique dépendant du protéasome. Ce rôle a été mis en évidence bien plus tard que celui de K48 (18, 204). Dans une étude récente de J. Peng, seules les chaînes K48 et K29 sont augmentées par l'inhibiteur du protéasome. Ceci met en évidence le rôle de dégradation lié au protéasome par cette sorte de chaîne et suggère des fonctions non protéolytiques pour les autres (communication

personnelle du Dr. J. Peng, lors du congrès « The Ubiquitin Family » à CSHL, NY, avril 2007). Cette chaîne qui s'initierait en K29 (228, 252), semblerait de plus s'allonger ensuite en K48 (228, 348).

Actuellement, le mécanisme de polyubiquitination est en cours d'élucidation (384) et diverses études essaient de déterminer comment fonctionnent les E3 ligases dans ce processus (428, 450). L'intervention d'une E4, UFD2 a été suggérée en 1999 mais ce mécanisme ne s'est pas imposé (228), bien que de très sporadiques articles continuent de défendre cette idée, proposant même p300 comme E4 de p53 (140, 183). Une récente étude démontre que l'interaction non covalente de l'ubiquitine avec la E2 UbcH5 serait impliquée dans la formation de chaînes polyUb K63 sur BRCA1 (58, 243).

Le mécanisme de reconnaissance des différentes chaînes est également en cours d'élucidation. Grâce à une analyse en spectrométrie de masse, 116 candidats protéiques ubiquitinés ont été identifiés et divers types possibles d'ubiquitination ont été mis en évidence de façon spécifique à chaque protéine. Parmi eux, plusieurs candidats ne lient qu'une ubiquitine et non des chaînes, Ubp1 ne lie que des chaînes K11, SAGA ne lie que des chaînes K63 etc. Un grand nombre de protéines liant des chaînes sont toutefois capables de lier divers types de chaînes (communication personnelle du Dr. K. Wilkinson, lors du congrès « The Ubiquitin Family » à CSHL, NY, avril 2007).

Bien qu'aucune étude systématique des différents liens isopeptides n'ait été faite, il était jusqu'ici assumé que les chaînes polyUb étaient homogènes et ne contenaient qu'une seule sorte des 7 possibles liens isopeptidiques (69, 138, 450). Certains auteurs ont récemment spéculé que des chaînes mixtes puissent exister sur la cyclin B1 (223) et une récente étude, en avril 2007, démontre cette possibilité au sein de branchements en fourche (217). Il reste donc beaucoup à comprendre pour connaître le rôle de ces différentes chaînes dont on ne soupçonnait jusqu'ici pas même l'existence.

2. *La mono-ubiquitination*

La mono-ubiquitination, qui semblait au départ toute dédiée à l'endocytose de protéines membranaires et leur subséquente dégradation par le lysosome (171), apparaît maintenant également comme un signal de dégradation par le protéasome tel qu'il l'a été démontré avec la multi-ubiquitination de la cyclin B1 (communication personnelle du Dr. Nathaniel A. Hathaway lors du congrès « The Ubiquitin Family » à CSHL, NY, avril 2007). Ce groupe, propose en fait, que la forte densité en ubiquitine, due à une chaîne polyUb quelque soit la lysine impliquée, ou simplement due à la multiUb, est un signal suffisant pour amener la protéine cible à une dégradation par le protéasome (223).

Aucune règle ne peut donc vraiment être établie en ce qui concerne les rôles respectifs des différentes formes d'ubiquitination. L'explosion récente de nouveaux exemples et de nouvelles formes ces dernières années, démontre que ce domaine est en pleine ébullition et que l'avenir nous réserve encore de nombreuses surprises sur l'élucidation des implications de cette MPT.

1.2.1.5.2. *Expansion du génome / Diversification du protéome*

Étant donné l'existence de mono, multi, poly-Ub impliquant les 7 lysines de Ub, il est à parier qu'une myriade de MPTs par ubiquitination pour chaque protéine cible étudiée sera mise en évidence. Nous ne sommes présentement qu'au début du déchiffrement de ce code d'ubiquitine. Sachant qu'une chaîne de polyUb peut contenir jusqu'à 20 unités, on imagine le degré de complexité possible : avec une Ub, une forme protéique est possible, avec 2 Ubs, 7 formes protéiques sont possibles, avec 3 Ubs, 49 formes protéiques sont possibles avec 21 formes de branchements différents.

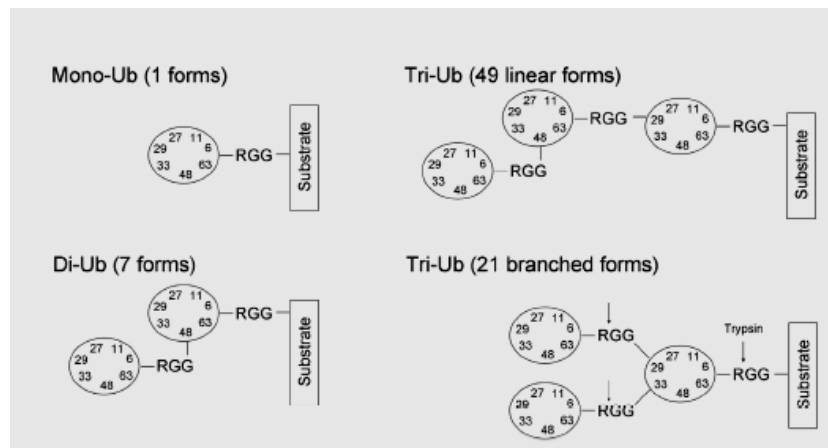


Figure 10 : Schéma illustrant la complexité possible des chaînes d'ubiquitine avec participation des 7 lysines (extrait de (455)).

Tout comme la phosphorylation, l'ubiquitination serait donc également un mécanisme important, (tout autant, si ce n'est plus, vu les innombrables possibilités) de diversification du protéome. On imagine selon la longueur, la composition homogène ou hétérogène et le nombre de chaînes de polyUb, le nombre de monoUb présentes, toutes les variations possibles pour l'ubiquitination d'une seule protéine cible et les innombrables nouvelles interactions que ces ajouts imposeraient à cette protéine.

1.2.1.5.3. De nouvelles interactions : les domaines de liaison à l'ubiquitine

Tout ce code de l'ubiquitine doit être déchiffré par une série de protéines reconnaissant ces modifications. Les UBDs (Ubiquitin Binding domains) regroupent tous les domaines spécialisés dans la reconnaissance des modifications par ubiquitine (189). Le premier UBD identifié fut le domaine UBA, il y a dix ans et depuis ces 5 dernières années 15 autres domaines au moins sont venus s'ajouter (155, 173, 189). Ces nouveaux domaines ont été découverts en parallèle avec les nombreux nouveaux rôles attribués à l'ubiquitination (plus développés dans 1.2.1.5.5 below). Ce champ d'étude est en pleine effervescence avec l'utilisation du RMN (333). Trouver le mécanisme de reconnaissance et

le moyen utilisé par les UBDs pour discriminer entre des monoUb, multiUb et polyUb sont de futurs enjeux importants. Ces UBDs sont classés en 4 grands groupes structuraux différents, reconnaissant l'ubiquitine en 3 zones majeures centrées en N58-I44-G76 (189) ou L8-I44-V70 (325) selon les références. Ces UBDs sont généralement longs de 20 à 150 a.a. (146).

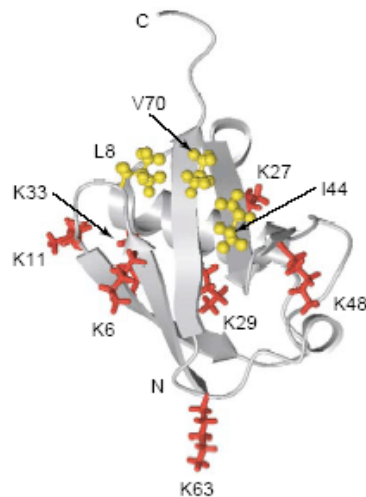


Figure 11 : Zone hydrophobe L8-I44-V70 (en jaune) reconnue sur l'ubiquitine par les UBDs. Les lysines sont indiquées en rouge (extrait de (325)).

1.2.1.5.4. *La 56olubilised: le protéasome*

La principale conséquence connue et la plus étudiée jusqu'ici de l'ubiquitination, est l'envoi de la protéine modifiée par une chaîne polyUb K48 d'au moins 4 unités au protéasome pour dégradation (105, 272, 407). La chaîne polyUb K48 a ce rôle majeur connu et étudié depuis plus de 10 ans (115).

Désormais, il est proposé que seule la haute densité en ubiquitine, (que ce soit par polyubiquitination de chaînes impliquant d'autres K que K48 ou par multi-ubiquitination) soit le véritable signal permettant un ciblage de la protéine au protéasome (223). Il est postulé également que la E3 puisse avoir un rôle et coopérer au recrutement au protéasome

(communication personnelle du Dr. D. Skowyra lors du congrès « The Ubiquitin Family » à CSHL, NY, avril 2007).

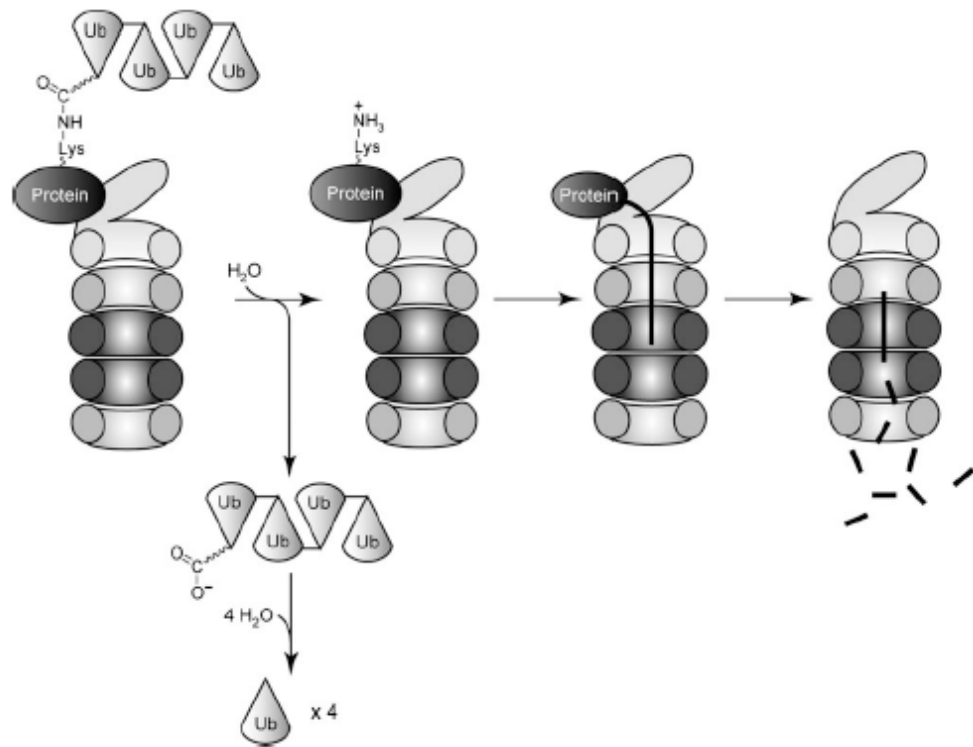


Figure 12 : Dégradation d'une protéine polyubiquitinée K48 par le protéasome (extrait de (426)).

1.2.1.5.5. Quelques autres exemples : endocytose et dégradation lysosomiale des protéines membranaires, réparation de l'ADN, implication dans la transduction du signal, régulation de la transcription

Alors que la dégradation protéasome-dépendante reste la conséquence la plus étudiée de l'ubiquitination, ces dernières années ont amené bien d'autres rôles à cette MPT, en particulier associés à la monoUb (201) tels que :

- L'endocytose des protéines membranaires et leur cheminement jusqu'à la dégradation au lysosome (8, 170, 331, 388) :

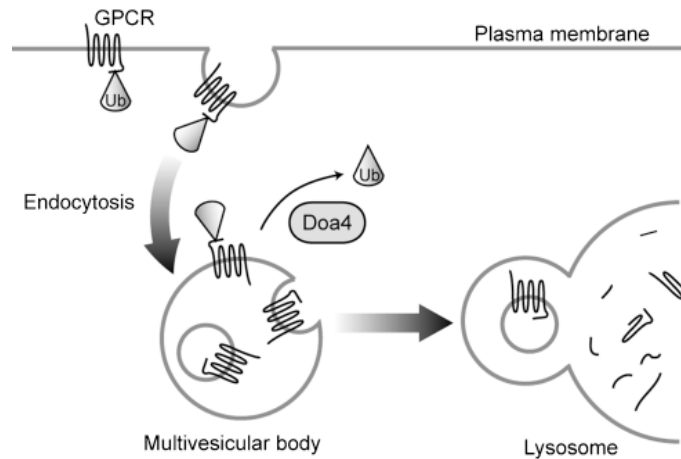


Figure 13 : Schéma illustrant l'endocytose d'une protéine membranaire (ici GPCR) et son cheminement jusqu'à la dégradation lysosomiale (extrait de (426)).

Il est à noter que la polyUb est aussi impliquée. Alors que l'on pensait que la régulation de cette internalisation était monoUb-dépendante (145, 147), un récent article démontre que le ciblage du récepteur EGF au lysosome implique une chaîne polyUb K63 (185). Enfin, 1/3 des 72 protéines dont le site d'ubiquitination a été trouvé lors de l'analyse par spectrométrie de masse sont des protéines transmembranaires (313). Ceci appuie le rôle prépondérant de l'ubiquitination dans le trafic des protéines membranaires.

- Les voies de réponse aux dommages à l'ADN et la réparation de l'ADN (186). Il est à noter que la polyUb est aussi impliquée que ce soit avec l'exemple de PCNA ou XPC (186)
- La signalisation (98, 146, 380, 427).
- Le gene silencing ou la transcription en modifiant soit un histone (H2B (401)) soit directement un facteur transcriptionnel (352).

Ces effets de l'ubiquitination ne sont que quelques exemples illustrateurs représentatifs de la protéine cible impliquée. A un niveau plus général, on peut affirmer que la fonction de l'ubiquitination est de médier, tout comme la phosphorylation, une transduction de signal.

1.2.1.5.6. Généralisation : l'ubiquitination, un autre médiateur vedette des voies de signalisation

En résumé, l'ubiquitination avec sa quantité impressionnante d'enzymes impliquées, sa grande diversité de possibles modifications, sa réversibilité (dans le cas d'une ubiquitination non-liée à la dégradation), sa reconnaissance par des domaines spécifiques permettant la transmission du signal à des effecteurs en aval, pourra devenir, à l'instar de la phosphorylation, un médiateur important des voies de signalisation (126). Il est bien connu qu'un grand nombre de récepteurs membranaires sont ubiquitinés suite à leur stimulation par un ligand extracellulaire (172). On sait également aujourd'hui, que certaines protéines possédant les domaines de reconnaissance de l'ubiquitination d'une protéine cible (UBDs), sont elles même régulées par monoubiquitination (179). Cela rappelle subtilement l'activation en cascade médiée par la phosphorylation et suggère qu'un mécanisme analogue puisse être utilisé par l'ubiquitination. Toutefois, la monoubiquitination des protéines à domaine UBDs auto-inhibe ces protéines par interaction intramoléculaire UBD-ubiquitine. Ceci ne peut permettre une amplification du signal comme avec la phosphorylation qui active en cascade ses protéines cibles. De plus, une dynamique et une dépendance ont été mises en évidence par de nombreux exemples entre ces deux MPTs (développé dans 2.1.1).

Enfin, il semble, de premier abord, que l'ubiquitination soit un phénomène encore plus répandu que la phosphorylation. Une étude par spectrométrie de masse chez la levure voulant déterminer le nombre de protéines ubiquitinées a trouvé 216 protéines ubiquitinées parmi 1000 phosphopeptides (114) contre 1075 protéines ubiquitinées parmi 4210 peptides isolés (313).

1.2.1.5.7. Dérégulation et pathologies associées

La dérégulation de l'ubiquitination est associée à de nombreuses et diverses pathologies (77) : neurodégénératives, immunitaires, inflammatoires et bien sûr, oncologiques (146, 289). Du fait de son implication dans beaucoup de processus cellulaires clés tel que la réparation de l'ADN, la régulation de la transcription etc., l'implication de cette MPT dans le développement du cancer n'est pas surprenante (180). La dégradation abusive de produits de gènes suppresseurs de tumeur (63, 289), le déséquilibre entre ubiquitination et déubiquitination et la dérégulation des DUBs en tant que suppresseurs de tumeur (180) (parallèlement à la situation des phosphatases), la perte de l'équilibre avec d'autres MPTs de protéines clés telles que p53 (44) ont été mis en avant.

1.2.1.5.8. L'ubiquitination comme cible thérapeutique

Alors que la plupart des efforts dans l'identification de nouvelles cibles thérapeutique du cancer ont portés sur l'inhibition de kinases (79), une molécule visant l'ubiquitination a été approuvée pour utilisation dans le traitement de rechutes de myélomes et de certains lymphomes (4, 5). Il s'agit du Bortezomid qui inhibe le site actif d'une des sous-unités du protéasome, cible thérapeutique la plus visée pour cette MPT (5). Il est à parier que les prochaines années verront le développement d'autres molécules agissant à différents niveaux sur ces voies d'ubiquitination (77) et qu'une combinaison d'inhibiteurs de diverses MPTs donnera de meilleures chances de succès. Déjà, certaines compagnies ciblent principalement les E3s (338) et d'autres tentent de cibler les DUBs ((184) et communication personnelle du Dr. Coby B. Carlson lors du congrès « The Ubiquitin Family » à CSHL, NY, avril 2007) (tout comme les déphosphatases pour la phosphorylation) rappelant que ce n'est pas seulement l'ubiquitination (ou la phosphorylation) qui est importante mais le délicat maintien de l'équilibre entre ubiquitination/desubiquitination (ou phosphorylation/déphosphorylation).

1.2.2. La SUMOylation

1.2.2.1. Historique

SUMO est la première protéine ubiquitine-like (Ubl), découverte en 1996 et la plus étudiée depuis. Nommée SUMO-1 (256), Sentrin-1 (299), PIC-1 (43), GMP-1 (264), UBL1 (376), SMT3 (233, 259) par les différents laboratoires qui l'ont découvertes, elle est désormais connue sous l'unique nom de SUMO-1 (Small Ubiquitin-related Modifier). NEDD8, une autre Ubl a été découverte l'année suivante (213). Depuis, 11 autres Ubls sont venus s'ajouter (FAT10, ISG15, Urm1, Ufm1, FUB1 etc.) portant à 13 le nombre de membres connus dans cette famille aujourd'hui (222). SUMO est le plus étudié, suivi de NEDD8 (470) et tout ou presque reste à découvrir pour les autres membres.

La découverte tardive de SUMO et la difficulté à étudier cette MPT est en grande partie attribuable au fait que ce processus est hautement dynamique et que seulement une petite part du protéome (estimée à moins de 1%) est sumoylé *in vivo* (200).

Les Ubls sont caractérisés par le fait qu'ils possèdent tous un repliement en β -grasp (caractéristique de l'ubiquitine (ubiquitin-fold) et qui se définit par une organisation en structure secondaire de succession de feuillets beta-beta-alpha-beta-beta-alpha-beta). Tout comme l'ubiquitine, ils sont conjugués à une protéine cible par leur a.a. C^{tal} par un processus enzymatique en plusieurs étapes (215, 436).

Ce repliement en plus d'être trouvé chez les Ubls a été récemment mis en évidence dans 62 protéines par des études bioinformatiques (418).

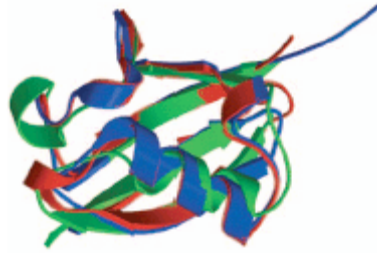


Figure 14 : Représentation en ruban de la superposition de SUMO (en bleu), de l'ubiquitine (en vert) et de NEDD8 (en rouge) (extrait de (436)).

Cette famille se caractérise par la même structure en β -grasp que l'ubiquitine.

1.2.2.2. Définition générale

La SUMOylation consiste donc en l'ajout d'une petite protéine SUMO (101 a.a. sous forme de précurseur et 97 sous forme mature de 11kDa (20kDa sur SDS-page)) par formation d'un lien isopeptidique entre sa glycine C^{taie} et une **lysine** de la protéine cible par un processus enzymatique en deux ou trois étapes. Une maturation de SUMO qui consiste à exposer sa glycine C^{taie} est nécessaire en premier lieu de façon similaire à l'ubiquitine.

Cette réaction est réversible grâce à des enzymes appelées SUMO isopeptidases ou Ulps. Tout d'abord considérée comme exclusivement nucléaire, la SUMOylation possède désormais des substrats cytoplasmiques et membranaires.

1.2.2.3. SUMO 1,2,3,4

A la différence de l'ubiquitination qui se déroule avec une seule ubiquitine, la sumoylation est une MPT qui possède 4 isoformes SUMO dénommées SUMO-1,2,3 et 4 chez l'homme. SUMO-1 fut le premier mis en évidence. Sa structure a été mise en évidence par RMN et ainsi son repliement identique à l'ubiquitine a été démontré malgré leur faible homologie de séquence (18%) (29). SUMO-1 se différencie de l'ubiquitine par un domaine N^{tal} flexible d'une vingtaine d'a.a. (cf. Figure 14). SUMO-1 est 48% identique en a.a. à SUMO-2 et 46% à SUMO-3. SUMO-2 et 3 sont 95% similaires et sont souvent désignés ensemble SUMO-2/3 (350, 405). SUMO-4 a été mis en évidence plus récemment (46) alors qu'il avait précédemment été identifié comme un pseudogène non exprimé (397). Il est très

similaire à SUMO-2 (86%) mais à la différence des autres isoformes, son expression est limitée à certains tissus tels que le rein et la rate (46, 142).

Les deux glycines en C^{tal} sont un autre point commun entre les formes matures de l'ubiquitine et de SUMO. Ce motif est essentiel pour la conjugaison de SUMO à sa protéine cible (205). De ce fait, il semble que l'isoforme SUMO-4 soit une isoforme ne pouvant être maturée afin de dévoiler ses deux glycines C^{tales} 92 et 93 et ceci à cause de la présence d'une proline en 90 empêchant cette réaction de maturation (comparativement à SUMO-1 qui possède une Gln 94 en amont de ses deux glycines 96 et 97). Cette isoforme ne serait donc pas capable de former un lien isopeptidique pour se lier à la protéine cible (303).

SUMO-2/3 sont libres et considérés comme un réservoir pour sumoylation lors de stress cellulaires alors que SUMO-1 est en majorité conjugué à des protéines cibles (205, 264) et sa conjugaison ne semble pas lié à des conditions physiologiques spécifiques (350).

1.2.2.4. Acide aminé visé / Enzymes impliquées : E1, E2, E3, SUMO-isopeptidases Ulps.

Tout comme pour l'ubiquitination, c'est une lysine qui est toujours visée lors de la sumoylation d'une protéine cible. On connaît cependant pour cette MPT une séquence consensus ψ KXE (339) où ψ est un a.a. hydrophobe, souvent V valine, L leucine, ou I isoleucine. Cette séquence est suffisante pour induire une sumoylation *in vitro* mais un signal de localisation nucléaire doit lui être ajouté pour que la sumoylation soit possible *in vivo* (339). Ceci est vrai pour la majorité des cibles connues à l'heure actuelle, toutefois, le fait que de nouvelles protéines non nucléaires soient sumoylées tel que par exemple, la protéine mitochondriale DRP1, ne permet pas de généraliser la nécessité absolue d'un NLS pour être sumoylé (154). Le processus enzymatique est similaire à celui de l'ubiquitination et fait intervenir une E1, E2 et parfois une E3. A la différence de l'ubiquitination, une seule E1 hétérodimérique est connue (Aos1/Uba2 (20)), une seule E2 (UBC9 (95, 159, 202)), et 4 E3 (la famille Siz/PIAS (177, 192, 229, 379), RanBP2 (224, 321), PC2 (210), Mms21 (326,

473)), qui assurent une meilleure spécificité et augmentent la sumoylation de protéines cibles testées *in vitro* (203, 211, 321, 347). La spécificité est d'ailleurs un grand sujet de questionnement puisque une seule E2 a été caractérisée (comparativement à une trentaine pour l'ubiquitination). UBC9, lie directement la séquence consensus ψ KXE (35, 355, 406), mais cette liaison n'est pas assez stable pour le transfert de SUMO d'où la nécessité de l'intervention d'une E3. Comme un grand nombre de protéines possèdent cette séquence consensus courte (1913 protéines sur 5884 dans la levure *S. cerevisiae* contiennent 2799 de ces séquences (200)), on suppose qu'un moyen supplémentaire permet d'assurer une plus grande spécificité de reconnaissance tel qu'une autre surface d'interaction entre la protéine cible et UBC9 (35), l'aide de la E3 (qui sert d'adaptateur entre la E2 et la protéine cible), ou plus récemment mise en évidence, une activation phosphodépendante de ce motif ((136, 174, 175, 373, 461) et communication personnelle du Dr. V. Giguère).

Il est à noter que ce motif consensus n'est pas obligatoire pour la sumoylation bien qu'il soit présent dans beaucoup de protéines cibles (355). 23% de vrais sites de sumoylation testés expérimentalement et confirmés (56/239) ne répondent pas à ce motif consensus (460). Il reste cependant à l'heure actuelle, le seul motif consensus connu de sumoylation (369). Certaines protéines qui ne possèdent pas ce motif ou dont ce motif est muté, sont sumoylées (80, 195, 210, 274, 332, 453) et d'autres le possédant, sont sumoylées également à d'autres endroits (6, 65, 178, 212, 250, 345). Des approches de criblage par spectrométrie de masse telles que celles développées pour trouver les cibles de l'ubiquitination (313) sont en cours (communication personnelle du Dr. J. Peng lors du congrès « The Ubiquitin Family » à CSHL, NY, avril 2007 et (456) pour une revue complète des diverses approches utilisées et des résultats obtenus) et révéleront sûrement dans un avenir proche les différentes cibles de la sumoylation, ce qui permettra d'établir ensuite, de façon plus certaine, les moyens de reconnaissance des protéines cibles et l'étendue de cette MPT. Il est à envisager que la phosphorylation ou d'autres MPTs auront un rôle dans cette reconnaissance. Pour l'instant SUMOplot et désormais SUMOsp (460)

sont deux outils disponibles permettant de rechercher les cibles potentielles de SUMOylation.

Concernant les 4 E3s connues, elles ont toutes une localisation différente (210, 229, 321, 347, 473). PIAS et Mms21 contiennent un motif RING (comme la plus grande famille de E3s ubiquitine ligases) qui est nécessaire à leur activité E3 SUMO ligase (211, 347, 473). D'autres SUMO-E3s ligases seront sûrement découvertes.

La sumoylation est un processus très réversible et les Ulp sont les enzymes impliquées à la fois dans le processus de désumoylation mais aussi dans la maturation permettant de cliver le peptide C^{tal} de SUMO pour dévoiler ses deux glycines. Chez l'humain 8 Ulp caractérisées par un même domaine Ulp C^{tal} catalytique de 200 a.a. (278, 470) ont été recensées (SENP 1 à 8). Elles ont différentes localisations à la fois nucléaires et cytoplasmiques (25, 37, 209, 219, 293, 294). Une activité SUMO isopeptidase a été confirmée pour SENP-1 (23), SENP-2 (37, 209, 293), SENP-3 (134, 294), SENP-5(134), SENP-6 (219).

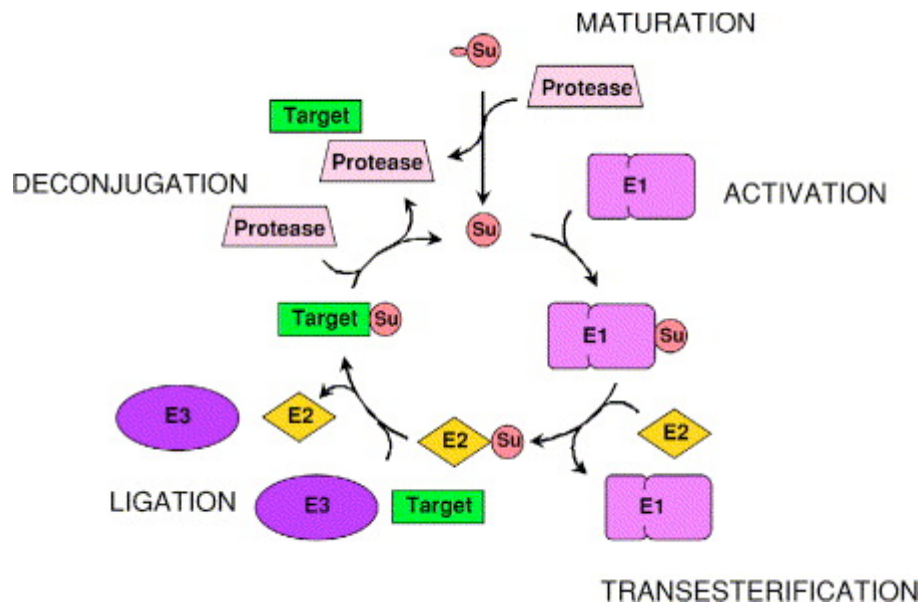


Figure 15 : Schéma général de la sumoylation (extrait de (157)).

1.2.2.5. Conséquences de la sumoylation

1.2.2.5.1. *Expansion du génome / Diversification du protéome*

On ne sait présentement quelle est l'étendue de la sumoylation et combien de protéines sont ciblées par cette MPT mais de nombreuses cibles ont été mises en évidence ces dernières années et leur nombre croît de façon exponentielle. Au moins une cinquantaine de protéines chez le mammifères ont été caractérisées (99). Tout d'abord nucléaires (facteurs et cofacteurs de transcription, protéines impliquées dans l'intégrité du génome, protéines concentrées dans les corps nucléaires, protéines du pore nucléaire etc.), on retrouve désormais des protéines cibles dans le cytoplasme, impliquées dans les voies de signalisation (367) et même membranaires (83). Une approche par spectrométrie de masse est en cours pour quantifier le nombre de protéines sumoylées tel que cela a été fait pour l'ubiquitination (communication personnelle du Dr. J.Peng lors du congrès « The Ubiquitin Family » à CSHL, NY, avril 2007). Gageons que beaucoup de candidats seront identifiés et que la sumoylation sera une MPT aussi répandue que l'ubiquitination. De premières études évaluent à 250 le nombres de protéines cibles de SUMO (92, 448). Avec un grand nombre de protéines cibles et la modification des protéines avec SUMO-1, 2/3, une diversification des protéines importante permettra, tout comme l'ubiquitination, de participer à la diversification du protéome. Cette MPT, avec 3 SUMO différents, qui peut, comme l'ubiquitination, donner lieu à des chaînes de polysumoylation (développé dans 1.2.2.5.3 below) entraîne des nouvelles affinités pour des protéines cibles qui sont alors reconnues par un motif de reconnaissance spécifique, le SIM ou SBD.

1.2.2.5.2. De nouvelles interactions : le domaine de liaison à SUMO, SIM ou SBD.

De 2000 à 2004, de nombreuses études ont suggéré l'existence d'un domaine de liaison à SUMO (SBD ou SIM) après l'observation de la liaison non covalente de SUMO à des protéines (9, 106, 153, 248, 273, 342). En 2004 et 2006 sont enfin sorties les séquences de liaison à SUMO, dénommées SBM (383) et SIM (162). En 2000, il fut proposé par analyse d'un motif commun aux protéines issues d'un criblage double hybride sur p73 sumoylé que la séquence « h-h-X-S-X-[S/T]-a-a-a », (où h est un a.a. hydrophobe et a, un a.a. acide) était la séquence d'interaction avec SUMO-1 (SIM) (273). En 2004, une étude démontra par RMN avec des peptides synthétiques que l'interaction de PIAS, PML, RanBP2, SAE2 avec SUMO-1, 2/3 était médiée par un motif défini comme « [V/I]-X-[V/I]-[V/I] » et présents dans de nombreuses protéines connues pour interagir avec SUMO (383). En 2005, une étude combinant criblage double-hybride et spectrométrie de masse défini un SBD selon la séquence « K-X₃₋₅-[V/I]-[I/L]₂-X₃-[D/E/Q/N]-[D/E]₂ ». Finalement, la dernière étude publiée, regroupant un système de criblage double-hybride, des approches bioinformatiques et l'utilisation du RMN a défini un SIM universel par étude de PIAS et TTRAP dont l'interaction a été détaillée sur SUMO-1 et 2. Cette étude, de plus, démontre que le SIM de PIASx est 67olubilisé *in vivo* et que cette phosphorylation module positivement l'interaction avec SUMO-1 (rendant la conformation plus favorable à l'interaction) alors qu'elle ne change rien à celle avec SUMO-2 (162). Ainsi le SIM ou SBD est de mieux en mieux défini et de plus, une régulation par la phosphorylation permet de moduler l'interaction SIM / protéine cible sumoylée.

Le SIM joue un très grand rôle dans la spécificité de UBC9 pour les protéines cibles de diverses façons. Il a été démontré que UBC9, en plus du lien thiolester avec SUMO sur sa cystéine catalytique, possède un SIM et est autosumoylé :

- Le SIM en N^{tal} de UBC9 est impliqué dans une interaction non covalente avec SUMO-1 et 2 (406). En effet, malgré leurs différences, SUMO-1, 2/3 interagissent de façon non covalente avec la même affinité pour UBC9 (406). Cette interaction est située loin du site catalytique de UBC9 (406), toutefois, si on l'empêche, la formation du lien thiolester UBC9-SUMO et l'activité de conjugaison qui en résulte sont dramatiquement réduits bien que cela n'affecte pas la reconnaissance du substrat ou le transfert de SUMO de UBC9 à la protéine cible (406).
- UBC9 est de plus autosumoylé (sur la lysine 14 chez les mammifères et la lysine 153 chez la levure). SUMO ainsi lié de façon covalente à UBC9 peut interagir avec des SIM d'autres protéines. La sumoylation de UBC9 ne modifie pas la formation du lien thiolester avec SUMO mais i) augmente la sumoylation de certaines cibles possédant un SIM telles que sp100, ii) n'affecte pas la sumoylation d'autres, telles que HDAC4 et E2-25K et enfin, iii) réduit la sumoylation de RanGAP1. Il a été démontré que la spécificité de substrat démontrée par UBC9 relevait d'une combinaison de SIM et de lysine sumoylées : la sumoylation de UBC9 permet la création d'une nouvelle interface d'interaction avec le SIM de sp100 et ainsi une plus forte affinité pour ce substrat (qui est d'habitude apporté par une E3) (communication personnelle du Dr. A. Pichler lors du congrès « The Ubiquitin Family » à CSHL, NY, avril 2007).

1.2.2.5.3. *Mono versus poly-sumoylation*

Dans la levure, une lysine du long domaine N^{tal} a été impliqué dans la formation de chaîne polySUMO (33, 60). La délétion de cette protubérance N^{tal} toute entière chez la levure n'a cependant pas eu de conséquences majeures indiquant que, chez la levure tout au moins, à la différence de l'ubiquitination, la polySUMOylation n'est pas nécessaire à des fonctions essentielles (60). Cependant, la surexpression d'un SUMO-3 ayant son site de

polysumoylation muté ou non régule la production de β -amyloïd démontrant un rôle physiologique de la polysumoylation qui diminue ici cette production (247).

Chez l'humain, seules SUMO-2/3 et 4 possèdent cette lysine au sein de la séquence consensus cible dans leur queue N^{terminale}. SUMO-1 en est dépossédée et de ce fait, il est admis que SUMO-1 ne peut participer qu'à une monosumoylation *in vivo* (405). Toutefois, récemment, un groupe a démontré que SUMO-1 peut participer à une chaîne de polysumoylation en formant un lien isopeptidique en fin de chaîne et qu'ainsi des chaînes mixtes de SUMO-1, 2 et 3 peuvent être formées (communication personnelle du Dr. A.C.O. Vertegaal lors du congrès « The Ubiquitin Family » à CSHL, NY, avril 2007). Il est à noter également que SUMO-1 peut faire des chaînes *in vitro* et que ceci se produit avec trois de ses lysines N^{terminales} (7,16, et 17) (309) ou sur la lys 117 (462). Comme on sait que des protéines peuvent être sumoylées sans la séquence cible consensus (80, 195, 210, 274, 332, 453), on peut imaginer que bien que SUMO-1 ne possède pas cette séquence, la formation de chaîne poly-SUMO-1 puisse exister *in vivo* même si cela n'a pas encore été mis en évidence. SUMO-2/3 pour leur part ont démontré former des polychaînes *in vitro* et *in vivo* (120, 405). Ces chaînes se font par la lys 11 contenue dans la séquence consensus cible de la queue N^{terminale} et joueraient de plus un rôle physiologique déterminant la localisation de la protéine PML (120).

UBC9 a un SIM qui de plus serait impliqué dans la formation de chaînes polySUMO sur les protéines cibles sp100 et HDAC4 (227). Tout comme l'ubiquitination et bien que la plupart des études sur SUMO démontre une monoSUMOylation, il pourrait être d'usage que la polysumoylation soit également physiologiquement utile. Ce parallèle polyUb/polySUMO est d'autant plus probable que l'interaction non covalente SUMO-1/UBC9 ressemble étrangement à celle entre Ub/Ubch5c (une E2 Ub) qui médie la formation de chaîne de polyUb K63 sur BRCA1 ((227) et communication personnelle du Dr. T.K. Sixma lors du congrès « The Ubiquitin Family » à CSHL, NY, avril 2007).

1.2.2.5.4. Généralisation : la sumoylation comme mécanisme d'interaction protéique transitoire, implication dans les voies de signalisation

De par son nombre important de protéines modifiées (50 caractérisées (99) ,150 (151) à 250 estimées par de plus larges approches chez la levure (92, 448)), la sumoylation se retrouve au centre de nombreux processus cellulaires tels que la régulation transcriptionnelle (130, 262, 464), la structure de la chromatine et l'intégrité du génome (283), la transduction du signal (121, 239), la fonction et l'intégrité de compartiments sub-nucléaires (287), l'entrée dans le noyau (321, 322), la réparation et la réplication de l'ADN (178, 391), la protéolyse, la progression du cycle cellulaire (202, 372), la division cellulaire (97), la réponse au stress cellulaire (53), l'infection virale et bactérienne (45, 282, 301, 446), etc. (157, 369). Toutes ces fonctions, bien que différentes de celles induites par l'ubiquitination, semblent reposer sur des mécanismes similaires : une modification de la protéine cible, qui, grâce à des domaines de reconnaissance de cette MPT, présente une nouvelle affinité pour d'autres protéines avec lesquelles la protéine cible non modifiée n'en a aucune. De nouvelles interactions en résultent d'où un changement de localisation, de fonction etc. Les différents exemples illustrant les effets de cette MPT ne sont en fait que le reflet, selon la protéine cible, de ces nouvelles interactions protéiques induites et qui, rappelons le, sont réversibles, permettant ainsi la transmission d'un signal. L'exemple récemment publié de la protéine tyrosine phosphatase PTP1B qui est régulée par la sumoylation ne fait qu'ouvrir la voie à la découverte de nouveaux substrats directement impliqués dans les voies de signalisation (86, 126).

1.2.2.5.1. Dérégulation et pathologies associées

Comme la sumoylation est impliquée dans des mécanismes de prolifération et de différenciation des cellules, de réparation de l'ADN, elle est associée à diverses pathologies telle que des infections virales et bactériennes (45, 282, 301, 446), le cancer (11, 22, 101,

218, 368), des maladies neurodégénératives (327, 378, 390, 413, 415). Encore une fois, comme précédemment vu pour la phosphorylation et l'ubiquitination, ce n'est pas la sumoylation seule qui est importante mais le délicat équilibre entre sumoylation et désomoylation (73).

1.2.2.5.2. La sumoylation en tant que cible thérapeutique

La doxorubicin, utilisée dans le traitement du cancer du sein a déjà démontré un mécanisme d'action impliquant la sumoylation du coregulateur transcriptionnel TIF1 β (242). D'autres agents thérapeutiques utilisés dans le traitement des cancers oropharyngés ont également démontré une action sur la sumoylation (75). Bien que, comme l'illustre ces deux précédents exemples, des thérapies déjà utilisées démontrent des mécanismes d'action impliquant la sumoylation, aucune thérapie n'a encore été spécifiquement développée dans ce but. Il faut dire que nous sommes au tout début d'une nouvelle ère où la sumoylation devient une cible thérapeutique potentielle, en particulier UBC9. UBC9 étant la seule E2 responsable de la sumoylation connue à ce jour, et étant de plus, surexprimée dans un nombre croissant de cancers, devient ainsi le cœur des cibles visées (276).

2. Relations entre ces trois MPTs et dynamiques :

Les relations phosphorylations/ubiquitination/sumoylation ne sont plus à démontrer. Illustrées par de nombreux exemples dont le nombre est sans cesse en expansion, il serait illusoire d'espérer pouvoir les répertorier tous. Ce chapitre ne veut que donner quelques exemples parmi les plus étudiés afin de démontrer que ces trois MPTs ont d'étroites relations interdépendantes. Il est à noter que l'exemple de relations avec d'autres MPTs existe mais nous nous confinerons, pour cette partie, aux trois MPTs qui nous intéressent.

2.1. Phosphorylation/ubiquitination ou sumoylation :

Récemment, un nouveau champ d'étude concernant la phosphorylation a connu un grand engouement : il s'agit de déterminer la coopération ou la compétition de la phosphorylation avec d'autres MPTs au sein des voies de signalisation. Ceci donne un degré supplémentaire de complexité pour l'étude et la compréhension de ces voies mais de nombreux liens ont été démontrés en particulier avec l'ubiquitination et la sumoylation.

2.1.1. Phosphorylation/ubiquitination :

L'ubiquitination est une MPT qui rivalise désormais avec la phosphorylation, à la fois pour son importance fonctionnelle et le nombre de protéines ciblées (407, 436). Leurs nombreuses relations et interactions dynamiques ne sont plus à démontrer et abondamment illustrées d'exemples.

2.1.1.1. La phosphorylation préliminaire et nécessaire à l'ubiquitination

Beaucoup de protéines cytoplasmiques et nucléaires sont ubiquitinées de façon subséquentes à leur phosphorylation : la kinase I κ B α par exemple est polyubiquitinéK48 sur ses lysines 21 et 22 après la phosphorylation de ses sérines 32 et 36 (72, 423, 468). Cette phosphorylation induit une ubiquitination du fait qu'elle permet le recrutement de E2 et E3. En effet, la phosphorylation de I κ B α entraîne le recrutement du complexe SCF ^{β -TrCP} (469), ce qui permet ensuite son ubiquitination. P27 (64), la β -caténine (225) sont d'autres exemples parmi tant d'autres. La phosphorylation de la protéine cible permet donc le recrutement d'une E3 et inversement parfois c'est la phosphorylation de la E3 ligase qui permet le recrutement à la protéine cible non modifiée : inter ou intra-moléculaire, la dynamique phosphorylation-ubiquitination est essentielle à la signalisation.

Ce mécanisme de phosphorylation induisant ensuite une ubiquitination peut se dérouler selon différents scénarios, illustrés ici par plusieurs notions :

2.1.1.1.1. Portes logiques ET/OU :

ET : une protéine a besoin d'être 73olubilised sur deux sites différents par deux kinases différentes pour finalement être ubiquitinée et dégradée. Ceci est illustré par l'exemple de la cycline E qui doit être 73olubilised en T380 par la kinase GSK3 et en S384 par la kinase CDK2 pour recruter SCF^{fbw7} et être efficacement ubiquitinée (395, 437).

OU : une protéine peut être 73olubilised par une kinase sur un site ou l'intervention d'une autre kinase sur un autre site avant d'être ubiquitinée. Gcn4 par exemple peut être 73olubilised soit par la kinase Srb10 (74) soit par la kinase Pho85 (269) pour ensuite recruter SCF^{cdc4} et être ubiquitinée.

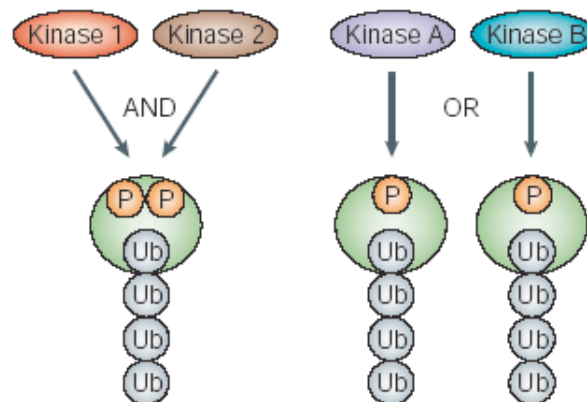


Figure 16 : Illustration de la notion de portes logiques ET/OU (extrait de (318)).

2.1.1.1.2. Seuil de phosphorylation induisant l'ubiquitination (nanoswitches by allovalency)

Cette notion est illustrée par Sic1 qui possède neuf sites de phosphorylation. Quelques soient les sites 73olubilised73 il faut qu'un minimum de 6 sites le soient pour que Sic1 lie Cdc4 (226, 300). Ceci conduit alors à l'ubiquitination et à la dégradation de Sic1. Plus la concentration de la kinase CDK sera importante, plus Sic sera 73olubilised et plus il sera dégradé.

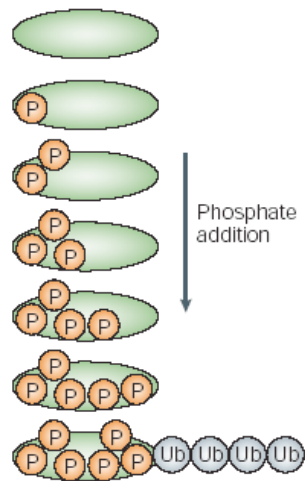


Figure 17 : Schéma illustrant la notion de nanoswitches by allovalency (extrait de (318)).

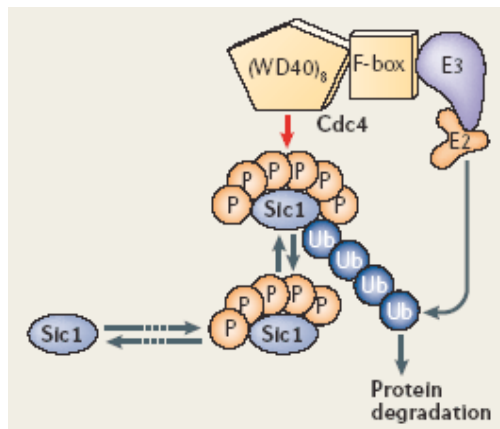


Figure 18 : Illustration d'un nanoswitch by allovalency sur la protéine Sic1 (extrait de (371)).

La phosphorylation de 6 résidus sur 9 permet le recrutement de SCF^{cdc4} et sa subséquente ubiquitination.

2.1.1.2. La phosphorylation comme rétrocontrôle négatif de l'ubiquitination

Récemment, l'étude visant à déterminer le nombre de protéines ubiquitinées (313) a également identifié un grand nombre de protéines à la fois ubiquitinées et ubiquitinées. 125 sites de phosphorylations ont été mis en évidence à partir de 97 phosphopeptides

analysés, provenant de 60 protéines ubiquitinées. Seulement 10 sites soit 7,9% avait été trouvé dans la précédente analyse du phosphoprotéome publié (114). Ceci peut laisser également supposer qu'un grand nombre de protéines puissent être ubiquitinées uniquement de façon concomitante à leur ubiquitination.

La protéine p53 par exemple est ubiquitinée en S20 par la kinase Chk1 et en T81 par la kinase Jnk (56). Ceci empêche l'interaction avec l'E3 ligase Mdm2 et donc l'ubiquitination de p53. Réciproquement, et tel que mentionné plus haut la E3 ligase peut elle aussi être ubiquitinée et ici dans le cas de Mdm2, ceci empêche également son interaction avec p53 et son ubiquitination prolongeant ainsi son temps de demi-vie (245, 286).

Enfin, des protéines impliquées dans la phosphorylation telle que des kinases sont ubiquitinées (382, 427) et réciproquement, des protéines impliquées dans le processus d'ubiquitination telles que la E3 ligase pc2 ou Mdm2 par exemple sont ubiquitinées (341).

L'ubiquitine elle-même est ubiquitinée sur sa sérine 57 (313). Bien que cette sérine n'ait pas été identifiée essentielle à la viabilité lors de mutations (381), on sait par la structure RMN de tetraubiquitine qu'elle est exposée et pourrait intervenir dans la reconnaissance du protéasome (81, 104, 320).

2.1.2. Phosphorylation/sumoylation

La spectrométrie de masse est devenue un outil indispensable pour étudier les MPTs (208). Grâce à cet outil on a pu trouver des protéines à la fois ubiquitinées et sumoylées telles que la protéine-sérine kinase HIPK2 qui est modifiée par SUMO-1 (221). Ceci suggère, de plus que la fonction des protéines kinases peut aussi être modulée par sumoylation. Plusieurs autres exemples de protéines à la fois ubiquitinées et sumoylées ont été documentées, ceci amenant à l'identification d'un PDSM.

2.1.2.1. La phosphorylation préliminaire et nécessaire à la sumoylation. Développement de la notion de « phospho-sumoyl 76olubi » avec un motif consensus cible d'une sumoylation phospho-dépendante, (PDSM) :

Plus récemment, une véritable relation phosphorylation/sumoylation a été renforcée et généralisée par l'observation d'un motif de sumoylation phospho-dépendant, PDSM, $\psi KxExxSP$ (174). Il s'agit en fait de la séquence consensus cible de sumoylation suivie de deux acides aminés quelconques et en troisième position (cette place est importante (175)) d'une sérine ciblée par la phosphorylation, puis une proline. 48 protéines possèdent ce motif (175).

Tout d'abord observé sur HSF1, une protéine impliquée dans la réponse au choc thermique (174), il a été démontré que GATA-1 (175), MEF2A (175, 373), MEF2D (136), HSF4b (175), PPAR γ 2 (461), ERR (communication personnelle du Dr. V. Giguère) sont également sumoylés de façon phosphodépendante, ceci généralisant la notion de sumoylation phosphodépendante à travers le motif $\psi KxExxSP$. Cette sumoylation, dans tous ces cas, entraîne une répression transcriptionnelle. HSF4b, ERR et SNIP-1 sont des protéines sumoylées identifiées grâce au PDSM. Bien que la phosphodépendance de leur sumoylation n'ait pas été encore démontrée (175), il apparaît clairement que le PDSM peut servir également comme un nouvel outil utile à la prédiction des protéines cibles de sumoylation.

Toutefois, plus récemment, une revue propose que la proline n'est ici que pour contrôler la spécificité de la phosphorylation et que beaucoup de protéines sumoylées, peuvent l'être de façon phosphodépendante avec une séquence consensus $\psi KxExxS$ ou même $\psi KxExxS/T$ (136). Une telle séquence existe dans des milliers de protéines mais en ajoutant des critères de sélection tels que i) une conservation à travers l'évolution entre les

paralogues et ii) une conservation du motif en comparaison à sa séquence environnante, alors seulement 80 protéines sont identifiées comme porteuses de ce motif de sumoylation phosphodépendant (467). L'auteur introduit la notion de « phospho-sumoyl 77olubi » définie par la phosphorylation de la S/T du PSDM qui induit positivement la sumoylation de la lysine adjacente. Parmi ces 80 protéines, on retrouve des facteurs de transcription mais également des protéines kinases telles que HIPK2, HIPK3, MAPKK2, MAK. Comme la sumoylation de HIPK2 est déjà documentée (139, 181), les auteurs suggèrent que ce « phospho-sumoyl 77olubi » puisse moduler sa fonction de kinase renforçant encore le lien entre ces deux MPTs.

2.1.2.2. La phosphorylation régulant la sumoylation à distance et de façon négative

Une phosphorylation régulant la sumoylation de façon négative et située plus à distance du site de sumoylation a été également observée sur certaines protéines. MEF2D en est un exemple (137). Alors que la phosphorylation de la sérine 444 de son PSDM régule positivement la sumoylation de la lysine 439 de ce même motif, on observe une régulation négative de cette sumoylation par la phosphorylation de la distante sérine 179. D'autres régulations négatives de la sumoylation par la phosphorylation indépendamment du PSDM ont été documentées pour c-Fos (52), c-Jun (281), p53 (249, 281) et ELK1 (463, 464).

2.1.2.3. La sumoylation comme rétrocontrôle de la phosphorylation :

De façon réciproque, une fois que la phosphorylation a induit une sumoylation, on peut observer un rétrocontrôle de la sumoylation sur la phosphorylation. Certains exemples documentés révèlent en effet un contrôle de la phosphorylation par la sumoylation (467). Ceci est le cas pour STAT1. La sérine en position 708 est supposée entraîner la sumoylation de la lysine en position 703 (417) de son PSDM. Toutefois, cette sumoylation

empêche alors l'interaction avec le domaine de reconnaissance SH2 de la tyrosine 780 ubiquitinylée (701). Ceci permet de réguler le temps de signalisation de cette phosphorylation (466). De plus, la sumoylation provoque la sortie du noyau vers le cytoplasme de STAT1 activé. Même une fois STAT1 désumoylé, il ne pourra rentrer à nouveau dans le noyau sans un signal d'activation (417, 467).

Un exemple similaire est observé avec PPAR γ où un « phospho-sumoyl 780 ubiquitinylé » (467) entre la sérine 112 et la lysine 107 de son PSDM (461) inhibe ensuite l'interaction avec un domaine WW reconnaissant la séquence PPXY en aval de la sérine 112.

La perte des interactions avec des protéines contenant des domaines reconnaissant la phosphorylation (WW, SH2) induite par la sumoylation permettrait peut-être ensuite de recruter des protéines comportant le domaine de reconnaissance de SUMO (SIM) et donc de recruter ainsi de nouvelles activités. En ce sens, bien que n'agissant pas sur un même résidu la phosphorylation et la sumoylation seraient en compétition pour le recrutement de certaines protéines et donc certaines activités (les HDACs qui comportent un SIM et peuvent être recrutées par sumoylation (128) ne sont qu'un exemple. Cet aspect sera plus développé dans la discussion.)

2.1.2.4. Un motif de liaison à SUMO (SIM) régulé par la phosphorylation

Enfin, une autre relation phosphorylation / sumoylation a été établie par une phosphorylation régulatrice du motif SIM de la protéine PIAS α (162). En effet, la SUMO E3 ligase PIAS α est ubiquitinylée *in vivo* dans son motif SIM, **KVDVIDLTISSSDEEEDP**. Ce motif, est défini par la description du SIM universel comme possédant un noyau d'a.a. hydrophobes (en bleu) comportant 3 ou 4 a.a. hydrophobes tels que Ile, Leu ou Val, avec un a.a. acide en position 2 ou 3. Les séquences entourant ce noyau sont désordonnées mais sont caractérisées par une charge négative puisqu'elles sont composées d'a.a. acides (en rouge). Ces séquences de charge négative peuvent se retrouver en amont ou en aval du noyau d'a.a. hydrophobes et en être séparées

par quelques a.a. contenant une thréonine conservée. La plupart des SIM contiennent aussi de potentiels sites de phosphorylation (en vert) (162). La première des trois sérines dans le motif de PIAS α représenté ci-dessus est 79olubilised *in vivo*. Cette phosphorylation induit un changement conformationnel qui favorise une meilleure interaction du SIM avec SUMO-1 mais ne modifie pas l'interaction avec SUMO-2. En effet, par des études structurales en RMN, les auteurs démontrent que la phosphorylation induit une conformation rendant plus favorable et spécifique l'interaction avec SUMO-1 (Lys 39) alors que celle avec SUMO-2 n'y est pas sensible, la lysine correspondante dans SUMO-2 ne participant pas de la même façon à la liaison au SIM (162). Le rôle physiologique de la phosphorylation de sérines du SIM de PIAS α dans son interaction non covalente avec SUMO-1 est renforcé par l'observation d'une perte d'interaction (de 100% à moins de 1%) de mutant sérine/alanine du SIM avec SUMO-1 dans la levure (273). Il est donc suggéré une interaction du SIM de PIAS α préférentielle pour SUMO-1 dans le cas où la sérine est 79olubilised.

2.2. Ubiquitination/sumoylation

2.2.1. Ubiquitination /sumoylation sur même lysine cible : bien plus qu'une simple compétition

Les dynamiques ubiquitination/sumoylation sont différentes comparativement à celles décrites précédemment avec la phosphorylation étant donné que ces deux MPTs se produisent toutes deux sur une lysine. Dès lors, la lysine en question peut être visée par l'une ou l'autre de ces 2 MPTs en compétition. De nombreux exemples illustrent l'existence au sein d'une même protéine d'une lysine cible qui se retrouve ubiquitinée ou sumoylée avec généralement des conséquences opposées. Ceci est très bien documenté dans le « gene silencing » induit par les MPTs de la queue des histones. En général, la sumoylation de facteurs de transcription et d'histones est associée à la répression alors que leur ubiquitination, elle, est associée à l'activation (129).

D'autres exemples cependant démontrent la modification d'une même lysine par SUMO et l'ubiquitine sans que cela n'ait nécessairement des effets opposés. SUMO et l'ubiquitine au contraire peuvent coopérer. PCNA est un exemple de cette dynamique. PCNA est à la fois monoubiquitiné, polyubiquitiné par une chaîne K63 et sumoylé. PCNA est monoubiquitiné sur sa lysine K164 par l'E2 Rad6 et l'E3 Rad18, il est polyubiquitiné par l'E2 Ubc13-Mms2 et l'E3 Rad5 et sumoylé par l'E2 UBC9 sur cette même lysine (178). Ces trois modifications jouent des rôles différents au niveau de divers mécanismes de réparation de l'ADN. Tout d'abord perçue comme une compétition sur une même lysine, l'exemple de PCNA est maintenant vu comme un mécanisme où SUMO et l'ubiquitine contrôlent le choix de réparation de l'ADN durant la réplication où PCNA sumoylé recrute une hélicase Srs2p (304). La modification sur un même résidu par SUMO et Ub (chez la levure comme chez l'humain) affecte donc la résistance aux dommages à l'ADN et cette ubiquitination induite par les dommages est essentielle à la réparation à l'ADN (152, 178, 328, 391). Beaucoup d'autres exemples de modification d'une seule et même lysine par la sumoylation et ubiquitination sont documentés, NEMO en K277 et K309 (315), IκBα en K21 (94, 160), Smad4 en K113 et K159 (240, 250, 251), Huntingtin en K6, 9 et 15 (390).

Si en premier lieu, il a été avancé que SUMO et l'ubiquitine compétitionnait sur une même lysine pour avoir des effets opposés de stabilisation/dégradation, il apparaît clairement maintenant à travers tous les exemples étudiés que cette dynamique ne peut pas simplement se résumer ainsi (414). La sumoylation et l'ubiquitination sur une même lysine agissent tour à tour de manière concertée, chacune ayant ses conséquences spécifiques pour la protéine cible. Aucune règle absolue ne peut être tirée et seul le décodage de tous ces signaux induits par chacune des MPTs d'une protéine pourra nous donner la clé de cette régulation, spécifique à chaque protéine cible. De plus, on sait désormais qu'au sein même d'une MPT (l'ubiquitination par exemple), de nombreuses variantes existent (mono/poly-ubiquitination K63, K48, etc) qui peuvent elles-mêmes se produire sur un même résidu et donner des conséquences bien différentes pour la protéine cible.

2.2.2. Sumoylation et ubiquitination totalement indépendantes

Ceci fut démontré pour Ets1 récemment. Ets1 est sumoylé sur K15 et K227. Il est également polyubiquitinéK48 et dégradé par le protéasome. Cette dégradation est identique pour le WT ou les mutants de sumoylation démontrant ici une indépendance totale entre sumoylation et ubiquitination bien que la protéine cible soit modifiée par ces deux MPTs (198).

2.2.3. La sumoylation préliminaire à l'ubiquitination : un motif de liaison à SUMO (SIM) provoquant l'ubiquitination

Récemment une nouvelle relation SUMO/ubiquitine a été introduite. RNF4, en effet, est doté d'un domaine SIM et d'un domaine RING E3 ubiquitin ligase : ainsi, il peut ubiquitiner les protéines sumoylées qu'il reconnaît et cible grâce à son domaine SIM (communication personnelle du Dr. H. Sun lors du congrès « The Ubiquitin Family » à CSHL, NY, avril 2007). RNF4 représente ainsi une classe d'ubiquitine ligase dirigée par la sumoylation de protéines cibles.

2.2.4. Relations interprotéiques de cause à effet entre ces deux MPTs

MDM2 est une E3 ubiquitin ligase qui peut être sumoylée et polyubiquitinée : lorsqu'elle est sumoylée, elle interagit avec p53 qu'elle ubiquitine et p53 est dégradée. Lorsqu'elle est désumoylée par SUSP4, elle s'autoubiquitine alors elle-même et est dégradée, ceci stabilisant p53 (239).

2.3. Conclusion : une complexité et une grande interdépendance des relations phosphorylation / ubiquitination / sumoylation intra et inter protéiques

Le premier exemple et le plus étudié est celui de I κ B α qui est polyubiquitiné ou monosumoylé sur sa lysine 21 (94). De plus, la polyubiquitination requiert la phosphorylation préalable en S32 et S36 qui permet la reconnaissance de I κ B α par l'ubiquitine ligase SCF^{TRCP} (72, 160, 315). Cette phosphorylation en S32 et S36 est réalisée par la kinase IKK β qui est elle-même ubiquitinée (72). La phosphorylation en S32 et S36 inhibe la sumoylation en K21 puisque cette sumoylation est en compétition avec l'ubiquitination (94, 315).

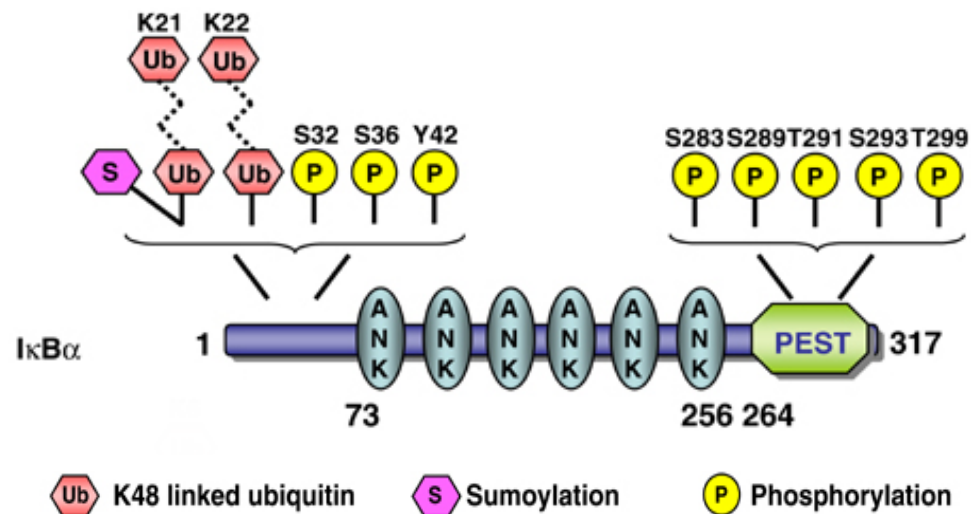


Figure 19 : MPTs de I κ B α (adapté de (315)).

Cet exemple est intéressant car étudié depuis bientôt 10 ans, il peut démontrer la complexité et l'interdépendance des trois MPTs qui nous intéressent ici. Une revue de revues (315) résume le niveau de détail que l'on peut atteindre lors de l'étude des MPTs d'une seule protéine. Pour en donner ici un aperçu, voici à l'heure actuelle, toutes les MPTs recensées sur I κ B α .

Pour ajouter à cette complexité, n'oublions pas que I κ B α fait partie de la voie de signalisation de NF- κ B qui est régulée par des centaines de stimuli à travers l'induction de complexes formés de diverses sous-unités; les IKKs (IKK α , IKK β , NEMO) qui régulent les I κ Bs (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , Bcl-3) qui à leur tour régulent NF- κ B (p105, p100, RelA, RelB, c-Rel) (315). Chacune de ces sous-unités démontre une série de MPTs similairement à I κ -B α et qui sert à l'activation en cascade de cette voie de signalisation.

NEMO est un autre exemple bien étudié au sein de cette famille sur lequel interviennent ces trois MPTs avec de plus, différentes chaînes d'ubiquitine.

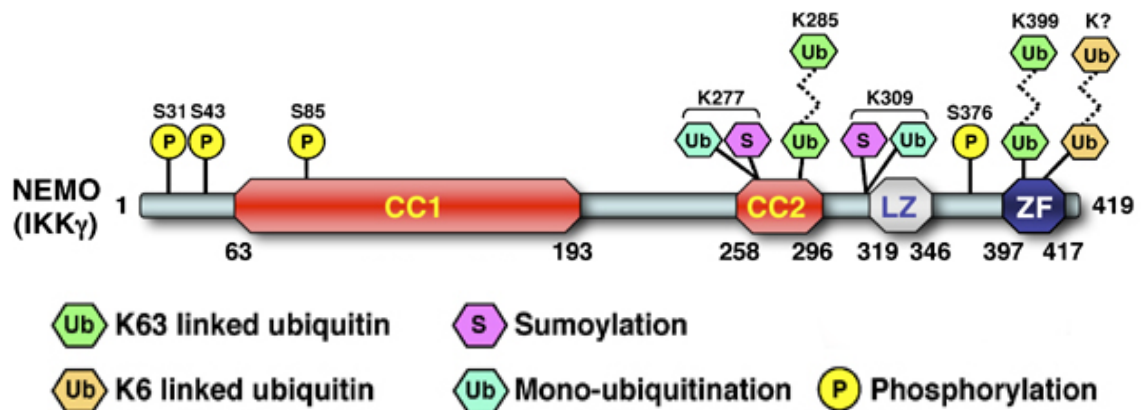


Figure 20 : MPTs de NEMO (adapté de (315)).

<i>Site(s)</i>	<i>Modification</i>	<i>Enzyme(s)</i>	<i>Effet</i>	<i>Référence</i>
IκBα				
S32 et S36	Phosphorylation	IKKβ	Ubiquitination	Revue par Hayden et Ghosh (2004)
K21 et K22	Polyubiquitination K48	βTrCP	Degradation	Revue par Hayden et Ghosh (2004)
S283, S289, T291, S293 et T299	Phosphorylation	CK2	Degradation	Lin <i>et al.</i> (1996), McElhinny <i>et al.</i> (1996), Schwarz <i>et al.</i> (1996)
Y42	Phosphorylation	p56-lck, Syk et c-Src	Degradation ou dissociation de NF-κB	Koong <i>et al.</i> (1994)
K21	Sumoylation	Inconnue	Stabilisation	Desterro <i>et al.</i> (1998)
NEMO (IKKγ)				
S31, S43 et S376	Phosphorylation	IKKβ	Inconnu	Prajapati and Gaynor (2002), Carter <i>et al.</i> (2003)
S85	Phosphorylation	ATM	Activation	Wu <i>et al.</i> (2006b)
K277 et K309	Sumoylation et ubiquitination (mono)	PIASy (sumoylation)	Activation	Huang <i>et al.</i> (2003a)
K285	Polyubiquitination K63	NOD2/RIP2	Activation	Abbott <i>et al.</i> (2004)
K399	Polyubiquitination K63	Bcl10/Malt/TRAF6	Activation	Sun <i>et al.</i> (2004), Zhou <i>et al.</i> (2004)
aa397-417	Polyubiquitination K6	Inconnue	Activation	Tang <i>et al.</i> (2003)

Tableau 1 : Détails de toutes les MPTs recensées sur IκBα et NEMO (adapté de (315)).

La revue de revue mentionnée ici (315) est contrainte de présenter des tableaux afin de répertorier toutes les modifications étudiées, les articles les ayant démontrées voire les revues ayant finalement regroupé ces MPTs.

On se rend compte ainsi de la complexité et de la fine régulation que la combinaison de diverses MPTs peut générer. La phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation sont donc indubitablement liées à la fois dans les modifications d'une seule et même protéine

mais dans une cascade de signalisation inter protéiques visant même leurs propres enzymes de modification. Le temps d'étudier une seule MPT est bel et bien révolu et regarder la dynamique de plusieurs MPTs en ajoutant une dimension temporelle sera le seul moyen désormais pour pouvoir décoder les nombreuses relations des voies de signalisations intracellulaires. Voir toutes ces MPTs comme un moyen d'accéder à d'autres interactions protéiques provoquant de nouvelles fonctions pour la protéine cible grâce à une lecture détaillée de ces MPTs par des domaines d'interactions est la seule règle absolue que l'on puisse appliquer au déchiffrement de tout ce code protéique (371).

3. Les protéines de la famille TRIM : un domaine conservé tripartite en N^{tal}

TIF1 α , TIF1 β et PML sont les trois protéines principales étudiées dans cette thèse. Toutes trois font parties de la grande famille des protéines à motif TRIM (TRI Motif partite) appelé aussi RBCC (Ring Box Coiled-Coiled) regroupant 65 membres chez l'humain. Ce domaine conservé se définit par la succession de trois domaines liant le zinc : un motif RING-finger, suivi d'une ou deux B-box et d'un domaine Coiled-coiled (337, 359). Ce domaine est trouvé presque exclusivement en N^{tal} des protéines le possédant et a un rôle de multimérisation et d'interaction protéique. Il est présent dans plus de 100 protéines (48, 62, 359). Les protéines TRIM possèdent un domaine C^{tal} plus variable contenant divers motifs conservés (271).

1. Le domaine RING est défini par un arrangement de cystéines et d'histidine de type C3HC4 qui lie deux atomes de zinc d'une façon unique dites "cross-brace" (28, 32, 49). La séquence consensus se définit ainsi : **C-x₂-C-x₁₁₋₁₆-C-x-H-x₂-C-x₂-C-x₇₋₇₄-C-x₂-[CD]** (les résidus impliqués dans la liaison au 1^{er} atome de zinc sont en bleu et ceux impliqués dans celle du 2^d sont en rouge (271)). Depuis 2000, il a été démontré que le domaine RING peut agir comme E3 ubiquitine ligase (199). Enfin parmi les 4 E3 SUMO ligases

connues, PIAS et Mms21 présentent un domaine RING (211, 347, 473), laissant supposer que ce domaine pourrait aussi avoir une fonction de E3 SUMO ligase dans certains cas.

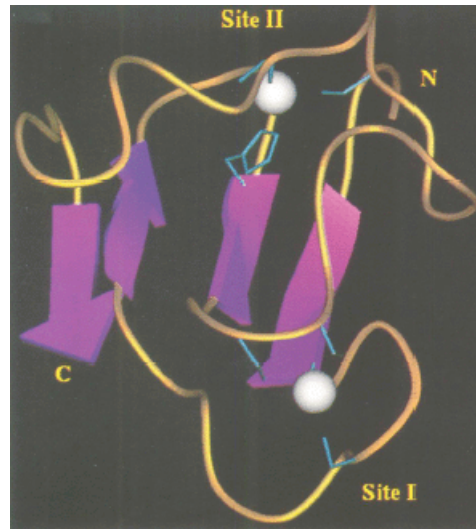


Figure 21 : Structure du RING finger de PML déterminée par RMN (extrait de (49)).
Les 4 régions en feuillet sont représentées en magenta, les chaînes latérales des cystéines et histidines qui lient les deux atomes de zinc (sphères blanches) en bleu.

2. Le domaine B-box est défini par un arrangement de cystéines et d'histidine de type CHC3H2 qui lie le zinc également (411). C'est un domaine globulaire indépendant (334). Il existe des B-box de type 1 et de type 2 de séquence consensus différente qui divergent dans le second site de liaison où une cystéine est présente dans la B-box1 et une histidine dans la B-box2 (50, 337). Quand deux B-box sont présentes dans une protéine la B-box1 précède toujours la 2 et quand une seule B-box est présente, il s'agit toujours de la 2 (337). La B-box lie les phosphoprotéines et peut aussi lier les acides nucléiques (268).
3. La région coiled-coil ne se définit pas par une séquence consensus mais par des résidus hydrophobes, souvent des leucines spécifiquement espacés pour

former des régions en α -hélice afin de former les coiled-coil (255). Ces régions sont impliquées dans des homo interactions (337).

La structure modulaire de ce motif suggère que les protéines TRIM partagent une fonction commune à travers le grand nombre de processus cellulaires où elles sont impliquées. Il devient maintenant très clair que ce motif représente une famille d'E3 ubiquitine ligase à domaine RING dont l'activité a été démontré *in vivo* ou *in vitro* pour une dizaine de protéines TRIM (199, 271). Il est par ailleurs démontré dans un grand nombre de cas que ces protéines agissent sous forme de trimère, que le domaine RING intervient dans l'interaction avec la E2 ubiquitine et que la B-box interagit avec la protéine cible (271).

3.1. TIF1 α /TRIM 24 et TIF1 β /TRIM 28

La famille de protéines TIF1s est donc une famille de protéines TRIMs, caractérisée par un domaine C^{tal} PHD/Bromo. Elle regroupe 4 membres : TIF1 α , β , γ , et δ . TIF1 γ (312, 422), et δ (216) ont été plus récemment découverts et sont moins étudiés du fait de leur distribution tissulaire plus restreinte. TIF1 α , β pour leur part sont sujet de nombreuses investigations.

3.1.1. Historique

TIF1 α fut le premier découvert en 1995 (235, 237) lors de la recherche d'un facteur intermédiaire capable de médier l'activité ligand-dépendante du domaine AF-2 de RXR γ , un récepteur nucléaire. TIF1 α est désormais connu comme un coactivateur transcriptionnel des récepteurs nucléaires.

TIF1 β pour sa part a été isolé en 1996 par 4 groupes simultanément (119, 220, 234, 277). Trois groupes l'ont isolé sur sa capacité à lier la boîte KRAB tandis qu'un autre l'a isolé sur sa capacité à lier les protéines HP1s (234). TIF1 β est maintenant connu comme le corépresseur universel (3, 7, 119, 220, 277) d'une large famille de facteurs transcriptionnels putatifs : les protéines KRAB-multidoigts de zinc (412).

Bien que ces activités respectives de coactivateur et corépresseur soient les plus largement documentées, TIF1 α a été observé de rares fois en tant que corépresseur (291, 312) et TIF1 β , en tant que coactivateur (67, 340). Cette possibilité sera plus largement développée au cours de cette thèse avec un mécanisme possible permettant cette dualité de fonction.

3.1.2. Domaines conservés en C^{tal} des TIF1s : PHD/Bromo, HP1 BD, TSS

Les TIF1s sont des protéines TRIM possédant en C^{tal} un domaine PHD/Bromo, un domaine de liaison à HP1 (HP1BD), un domaine commun aux TIF1s (TSS : TIF1 Signature Sequence). Cette famille présente une forte homologie de séquence entre ses 4 membres qui participent tous à des processus de régulation transcriptionnelle.

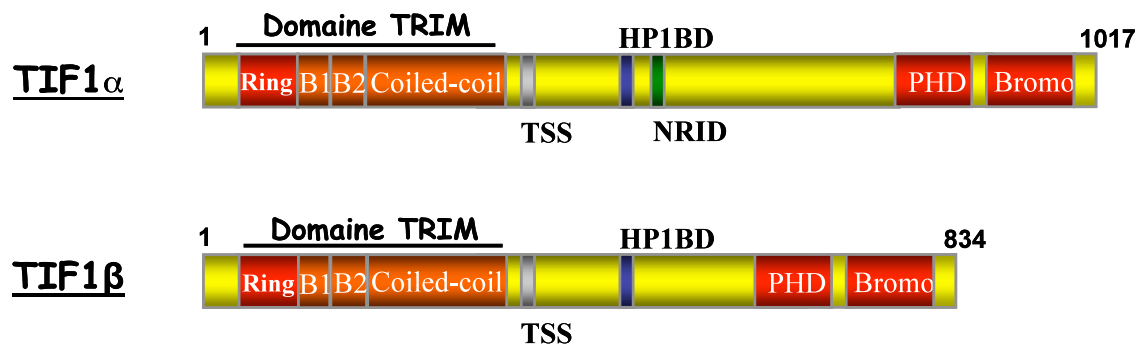


Figure 22 : Représentation des protéines TIF1 α et β .

3.1.2.1. PHD/Bromo

Le domaine PHD (2, 38) ou bromo (161, 196, 447) sont deux motifs très conservés trouvés dans des protéines nucléaires ayant un rôle dans la régulation de la transcription au travers de modifications de la structure chromatique telle que sa formation, sa maintenance

et / ou sa régulation (2). Ces motifs peuvent réprimer ou activer d'eux-mêmes lorsqu'ils sont ciblés à l'ADN (366). La répression médiée par ces domaines pour TIF1 β est dose dépendante, universelle car s'exerçant sur différents promoteurs testés et synergique. Contrairement à TIF1 β , le domaine PHD/bromo de TIF1 α ciblé à l'ADN active la transcription (366).

Le bromodomaine est un domaine d'une centaine d'a.a. qui reconnaît l'acétylation de la queue des histones et des facteurs transcriptionnels (57, 96, 465, 471) et cette interaction est essentielle à son activité de régulation transcriptionnelle *in vivo*. Ce domaine est présent dans presque toutes les protéines connues pour jouer un rôle de coactivation dans la régulation transcriptionnelle et le remodelage de la chromatine liée à l'acétylation des histones (57, 196). En fait, ce domaine, est un module d'interaction protéique qui reconnaît l'acétylation (196, 465).

Très ressemblant au RING domaine avec sa structure C4HC3 de liaison du zinc de type « cross-brace » longue d'une soixantaine d'a.a. (2), le domaine PHD (38) fut d'abord associé à une possible fonction de E3 ubiquitine ligase (82, 254, 261) mais les PHD des protéines impliquées dans ces études ont finalement été redéfinis comme des domaines RING variants (15, 361). Aucune fonction commune aux PHD n'a donc été présentement démontrée mais la principale fonction postulée de ce domaine est maintenant d'amener une protéine cible au nucléosome, ciblant ainsi certaines protéines à la chromatine en servant d'adaptateur (103, 330). Cette fonction est démontrée pour TIF1 α (336).

Ces domaines ont été démontrés comme domaine de répression indépendant et additif au HP1BD pour TIF1 β (366).

3.1.2.2. HP1BD : domaine de liaison à HP1

TIF1 α et β ont tous deux des interactions connues avec des protéines HP1s (234, 291), l'interaction avec TIF1 α n'ayant toutefois été démontrée que *in vitro* (291). Malgré cela, l'un comme l'autre sont capables par leur activité kinase de phosphoryler les HP1s

(291). Une étude plus poussée sur TIF1 β démontre qu'il peut être ciblé à l'euchromatine ou à l'hétérochromatine selon qu'il interagisse respectivement avec hHP1 γ ou hHP1 α (346). Une autre étude démontre que l'activité de répression médiée par les KRAB multidoigt de zinc/TIF1 β est due à un recrutement dynamique par HP1 α des loci cibles à l'hétérochromatine centromérique et ceci dépend d'une activité histone déacétylase (263). Finalement et pour conclure, TIF1 β semble, selon son interaction avec HP1 pouvoir être associé à l'euchromatine ou l'hétérochromatine (19, 61, 238, 386, 432) et selon sa localisation, il pourrait donc avoir dans le noyau une fonction de corépression ou de coactivation.

3.1.2.3. TSS : TIF1 Signature Sequence

Ce motif commun aux TIF1s est composé de 25 a.a. riches en tryptophane et phénylalanine. Il a été défini lors de la découverte de TIF1 γ mais n'a pas de fonction particulière jusqu'ici mise en évidence (422).

3.1.2.4. NRID : domaine d'interaction aux récepteurs nucléaires

Alors que TIF1 β interagit avec les KRAB multidoigt de zinc par son domaine TRIM (310, 311), un domaine d'interaction aux récepteurs nucléaires indépendant du TRIM a été caractérisé pour TIF1 α (234).

3.1.3. Fonction du domaine TRIM des TIF1s

3.1.3.1. Homo/hétérodimérisation entre les TIF1s

Le domaine TRIM est un domaine d'interaction, d'homo et d'hétérodimérisation au sein de cette famille de protéines. L'homo et l'hétérodimérisation de TIF1 α et β a été étudié mais selon la méthode et la longueur des fragments protéiques testés, la littérature rapporte des résultats controversés (277, 311, 312, 422).

3.1.3.2. Interaction de TIF1 β avec le domaine KRAB

Il fut démontré que le domaine RING de TIF1 β est le domaine responsable de l'interaction avec les protéines KRAB multidoigt de zinc et que ce domaine doit se trouver sous forme trimérique pour lier la boîte KRAB (310, 311). Parallèlement, TIF1 α , coactivateur de récepteurs nucléaires, n'interagit pas avec ces récepteurs nucléaires par son domaine RING (234).

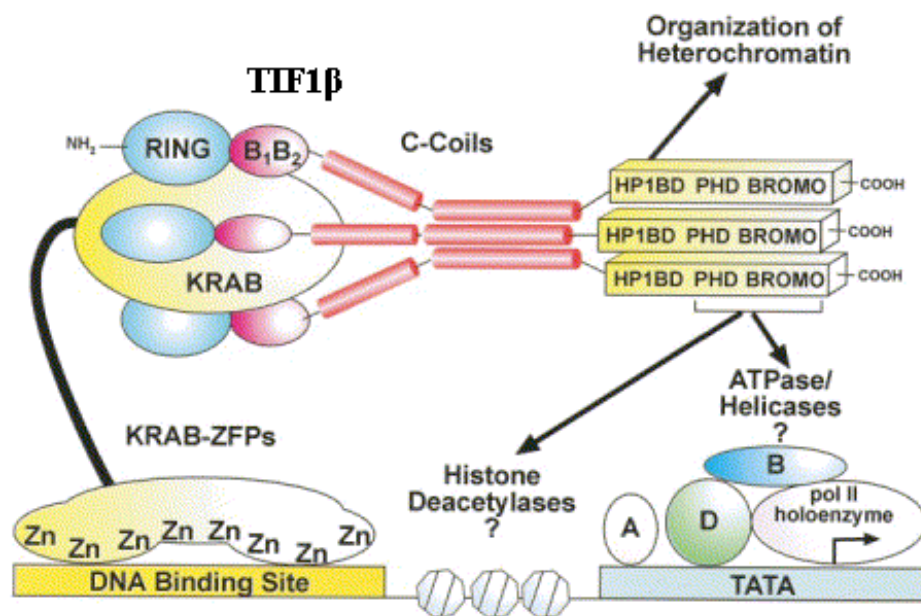


Figure 23 : Modèle de l'interaction TIF1 β /KRAB (adapté de (311)).

3.1.3.3. Activité E3 ubiquitine ligase

L'activité E3 ubiquitine ligase de TIF1 α et β n'a pas encore été démontrée bien qu'il soit formellement reconnu désormais que les protéines TRIM partagent cette fonction (271). De par la présence du domaine RING, une activité E3 SUMO ligase pourrait être soupçonnée puisque deux des trois E3 SUMO ligase ont un domaine RING (211, 347, 473).

3.1.4. Fonction du domaine PHD/Bromo des TIF1s

Le domaine PHD/Bromo de TIF1 β recrute des activités histones déacétylases, telles que HDAC1/Sin3A (358), Mi2- α une protéine du complexe histone déacétylase NuRD (366), HDAC3 dans le complexe histone déacétylases N-CoR-1 qui contient également un complexe remodelleur de la chromatine SWI/SNF (416). La répression médiée à la fois par TIF1 α et β est sensible à la trichostatin A, un inhibiteur des HDAC (291).

Pour compléter cette action, ce domaine recrute également une protéine histone méthyltransférase SETDB1 qui méthyle la lysine 9 de la queue de l'histone H3 (365). Notons que cette méthylation est un site de haute affinité pour le recrutement de la famille HP1 (193, 194).

Reconnaissant l'acétylation (196, 465), recrutant des histones déacétylases (358) et une histone méthyltransférase (365) alors que la méthylation de la lysine 9 de la queue de l'histone H3 présente une forte affinité pour les HP1 (193, 194), ciblant ainsi certaines protéines à la chromatine en servant d'adaptateur (103, 330) et participant à un complexe remodelleur de la chromatine SWI/SNF (416), TIF1 β apparaît comme une plateforme protéique permettant le regroupement de toutes ces activités afin d'induire un « gene silencing » aux loci concernés.

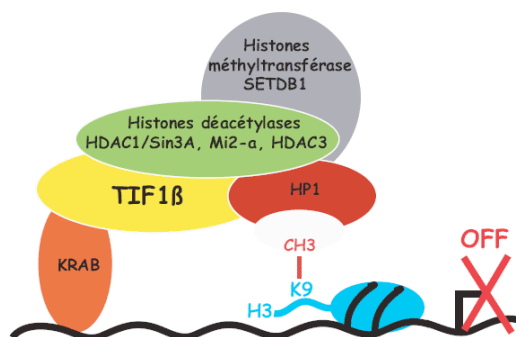


Figure 24 : Schéma représentant les diverses activités protéiques recrutées par TIF1 β afin d'induire le « gene silencing ».

3.1.5. Modifications post-traductionnelles des TIF1s

TIF1 α est une autokinase : elle possède donc une activité kinase et est de plus ubiquitinylée (117). La phosphorylation de TIF1 α est augmentée suite à sa liaison aux récepteurs nucléaires et de plus, TIF1 α phosphoryle certains composants de la machinerie de transcription (TFIIE α , TAF_{II}28, TAF_{II}55) (117), ainsi que des protéines HP1s (291). Alors que TIF1 β phosphoryle des protéines HP1s (291) et possède donc une activité kinase, il est lui-même ubiquitinylé sur sa sérine 824 en C^{tail} et cette phosphorylation induite par radiations ionisantes implique TIF1 β dans un processus de réparation de l'ADN (439).

Aucune étude majeure n'a documenté l'ubiquitination de TIF1 α ou β .

Alors que la sumoylation de TIF1 α a été rapportée en 2001 sur ses lysines 690 et 708 (370), aucune véritable étude subséquente n'a été rapportée et la sumoylation de TIF1 β n'est apparue dans la littérature que cette dernière année (242, 262). Notre laboratoire a notamment démontré que la sumoylation de TIF1 β est requise pour l'activité répressive de ce corégulateur transcriptionnel (cf. article en annexe).

3.1.6. Conclusion générale sur les TIF1s :

De par toutes ces caractéristiques, les TIF1s pourraient en fait avoir un rôle plus général de régulation de la transcription par ciblage entre hétéro et euchromatine pouvant selon les protéines environnantes recrutées par la dynamique de divers MPTs devenir des coactivateurs ou des corépresseurs. Récemment toutefois, il a été démontré par une étude à grande échelle que TIF1 β est majoritairement associé à des gènes cibles dans un environnement où la queue des histones H3 est triméthylée soit dans un environnement connu pour être répressif. 7000 sites potentiels où KAP1 serait ciblé ont ainsi été identifiés dont beaucoup de promoteurs de KRAB-multidoigt de zinc suggérant une autorégulation de la transcription de cette famille de protéine (297). Finalement TIF1 α et β semblent être des protéines permettant le recrutement et l'échafaudage de diverses activités, fonctionnant

comme des recruteurs de larges complexes protéiques aux fonctions diverses avec au cœur le domaine TRIM (47, 386).

3.2. PML/TRIM 19 :

3.2.1. Historique / présentation

PML est un gène suppresseur de tumeur (88, 354) identifié en 1990 du fait de sa participation à une translocation t(15 :17) résultant en la synthèse d'une protéine de fusion PML-RAR α , une oncoprotéine impliquée dans la leucémie promyélocytaire aiguë (APL) (90). PML est la protéine essentielle et organisatrice des structures nucléaires dénommées PML-Nbs pour PML Nuclear Bodies (aussi appelés Kremer bodies, PODs (PML Oncogenic Domains), ND10s) (102, 396). La sumoylation de PML est essentielle à la formation et la maintenance des PML-Nbs (476). Les noyaux des cellules de mammifères contiennent de 10 à 30 PML-Nbs de diamètre de 0,2 à 1 μ m et ce nombre est plus limité dans les cellules tumorales (102, 232, 285, 434, 440). Les PML-Nbs sont des structures associées à la matrice nucléaire regroupant de nombreuses protéines et en constante réorganisation lorsque la cellule est soumise à divers stimuli tels que les infections virales, le stress oxydatif, l'exposition à l'As₂O₃, à l'interféron, et durant la progression du cycle cellulaire (392). Les PML-Nbs sont impliquées dans l'apoptose (182, 459), la sénescence (113), le contrôle de la croissance cellulaire (10, 279), la dégradation protéique (24, 34), la régulation de la transcription (244, 452, 477), la réponse antivirale (108, 335), la réparation de l'ADN (40, 458). Ces fonctions, médiées par l'interaction de PML avec de nombreux partenaires sont concentrées au cœur des PML-Nbs où plus de 40 protéines ont été identifiées.

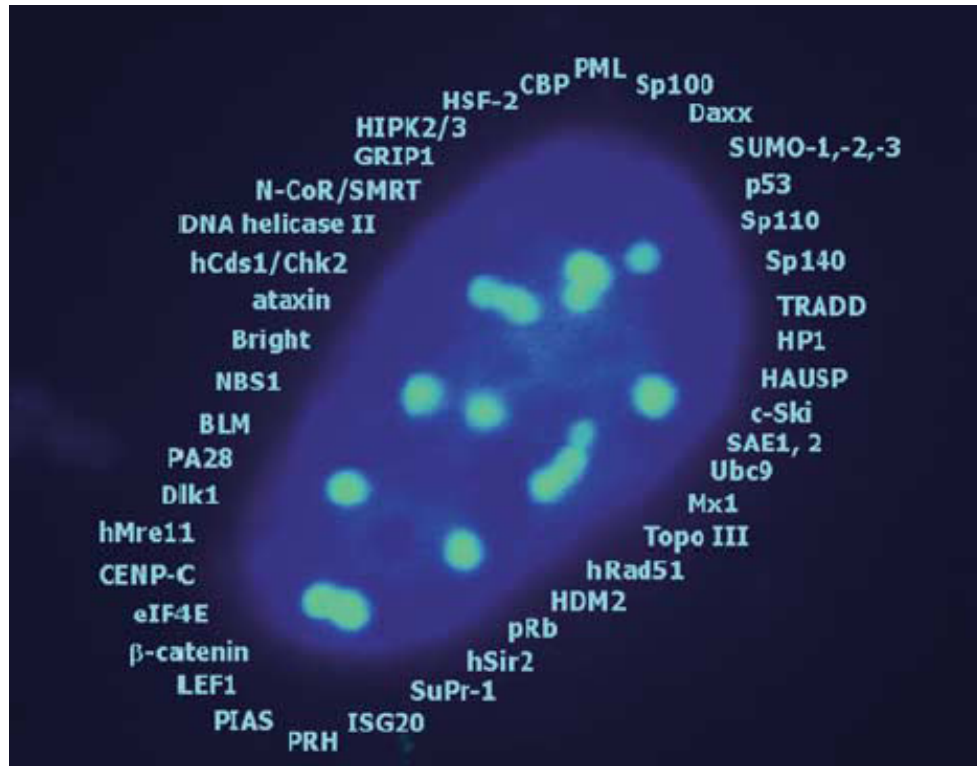


Figure 25 : Représentation des PML-Nbs avec les protéines associées identifiées (extrait de (182)).

Bien que la fonction exacte des PML-Nbs ne soit pas totalement établie, ces corps nucléaires apparaissent de plus en plus comme un réservoir de stockage pour diverses fonctions nucléaires permettant la mise à disposition rapide de diverses protéines lorsque nécessaire. Ceci a été depuis longtemps suggéré (190) mais le mécanisme exact permettant la séquestration et le relâchement de protéines n'avait jusqu'ici pas été élucidé. Deux récents articles démontrent élégamment un possible mécanisme impliquant la sumoylation. En effet PML est une protéine sumoylée, ubiquitinée et également 95olubilised (développé dans 3.2.4) qui apparaît au cœur des processus de sumoylation et d'ubiquitination couplés à une dégradation dépendante du protéasome (24). On remarque d'ailleurs la présence dans les PML-Nbs de la seule E2 SUMO ligase connue, UBC9, de SUMO E3 ligase telle que

PIAS, de SUMO-isopeptidase telle que SuPr-1 ainsi que divers composants de la machinerie d'ubiquitination (354).

Le gène de PML permet la synthèse de 7 différentes isoformes protéiques générées par épissage alternatif avec une extrémité N^{terminale} identique mais des variations en C^{terminal} induisant des localisations et fonctions différentes (197).

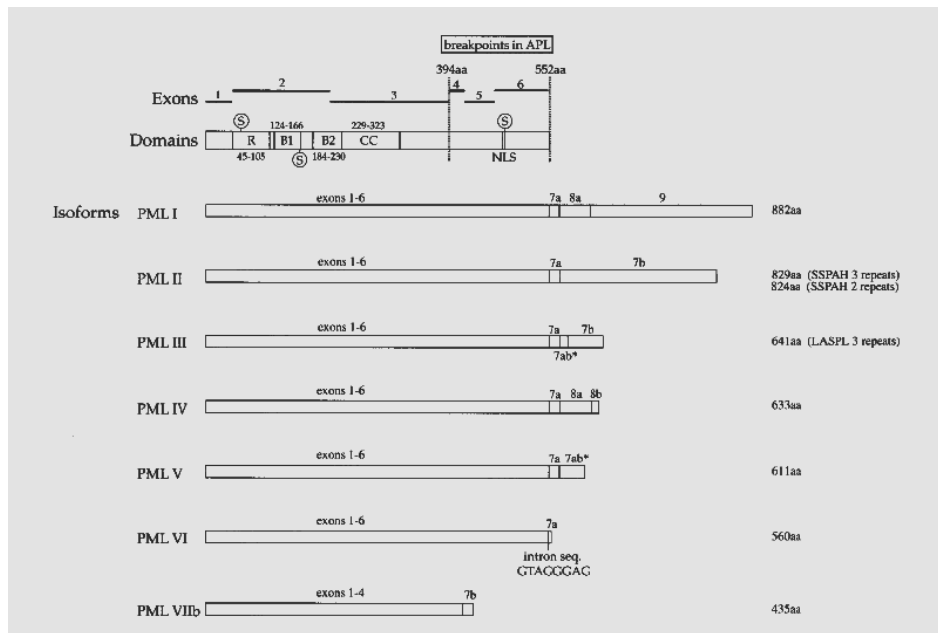


Figure 26 : Isoformes de PML (extrait de (197)).

De nombreuses études étudiant les partenaires de PML sont souvent réalisées sur une seule isoforme et il reste donc à démontrer si les interactions démontrées sont spécifiques à l'isoforme étudiée ou non. En effet, chaque isoforme semble avoir une spécificité d'action tel qu'illustré par PML IV qui interagit avec RNF4 ou p53 mais non PML III (116, 148). De plus, certaines isoformes étant cytoplasmiques et non nucléaires, il devient de plus en plus évident que chaque isoforme doit avoir un rôle bien particulier et unique. Les fonctions cytoplasmiques de PML ont été de plus, historiquement moins étudiées mais un regain d'intérêt ces deux dernières années les remet en lumière (30, 31, 34, 353). Dans notre étude, l'isoforme utilisée est celle de PML III (# d'accèsion S50913 (91)).

3.2.2. Domaine identifié en C^{tal} de PML : SBD

La protéine PML présente un motif TRIM conservé en N^{tal} et aucun motif spécifique en C^{tal} n'avait été jusqu'ici caractérisé. Toutefois, l'année dernière, une étude a rapporté l'existence d'un motif SBD (Sumo Binding Domain) en C^{tal} de PML (375), répondant aux définitions établies (162, 383). Le groupe de Pandolfi propose un modèle selon lequel le SBD de PML serait impliqué dans la formation des PML-Nbs et le recrutement des protéines associées à ces corps nucléaires (375).

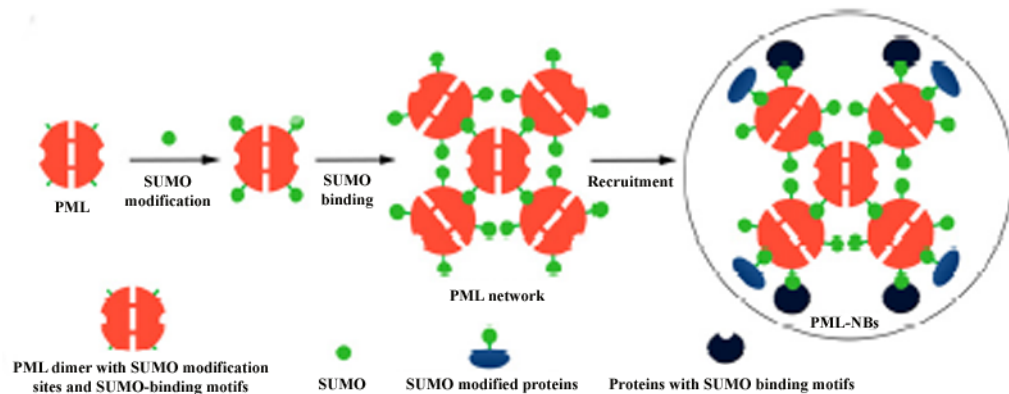


Figure 27 : Illustration du rôle du SBD de PML dans la formation des PML-Nbs (extrait de (265)).

3.2.3. Fonction du domaine TRIM de PML

Le domaine Coiled-coiled de PML a été identifié comme le domaine impliqué dans la dimérisation de PML (42). Divers a.a. du RING ont été documentés comme importants pour la formation des PML-Nbs mais sans toutefois révéler le mécanisme impliqué (42). Le domaine RING du TRIM de PML pourrait en fait avoir une activité E3 UBI (271) ou E3 SUMO ligase (329). Plusieurs E3 UBI ligase présentent un domaine RING (199) et deux des 4 E3 SUMO ligase connues en ont un (211, 347, 473). L'activité E3 SUMO ligase bien qu'elle n'ait pas été véritablement démontrée a été fortement suggérée par un récent article

démontrant que PML promouvoit la conjugaison de SUMO (329). De plus, le RING de PML interagit avec la SUMO E2, UBC9 (43, 101) par ses C57 et 60 tel que pourrait le faire une E3 SUMO ligase. Enfin, la modification de PML par SUMO résulte en la formation des PML-Nbs ou diverses protéines sont recrutées et à leur tour sumoylées (135, 190, 375). Les PML-Nbs apparaissent donc comme un centre important de sumoylation où la présence constitutive d'une E3 SUMO ligase serait importante. PIAS, une des trois E3 SUMO ligase se trouve dans les PML-Nbs (182, 192, 347) mais PML, avec son domaine RING, pourrait également avoir cette activité. Enfin, les PML-Nbs semblent être un carrefour de convergence des voies de sumoylation et d'ubiquitination (24). Il est à noter qu'une nouvelle E3 UBI ligase, RNF4 recrutée par des protéines sumoylées via son domaine SBD (communication personnelle de H. Sun, CSHL meeting, 2007), réside également dans les PML-Nbs et interagit de plus spécifiquement avec l'isoforme IV de PML (148). L'isoforme III ne semble pas recruter cette activité et la coexistence d'autres E3 UBI ligase au sein des PML-Nbs est donc à envisager. PML, avec son domaine RING, pourrait donc, dans un proche avenir, se révéler comme une E3 SUMO ou une E3 UBI ligase.

3.2.4. Modifications post-traductionnelles de PML

3.2.4.1. La sumoylation de PML

PML a été une des premières cibles identifiées de SUMO (101, 212, 214, 284, 393). Il possède trois sites majeurs de sumoylation qui sont les lysines 65, 160 et 490 (212). De nombreuses publications concernant la sumoylation ont depuis été générées. Cet intérêt soutenu pour la sumoylation de PML est relié au fait que les patients souffrant d'APL sont traités par l' As_2O_3 qui induit des changements au niveau de la sumoylation de PML et PML-RAR α . En effet, PML-RAR α est modifié par SUMO1 et le traitement à l'arsenic induit une modification dans le pattern de sumoylation observé en générant des formes de plus hauts poids moléculaires. Ceci est accompagné d'une relocalisation normale des PML-Nbs avec recrutement de SUMO1 (393). Ceci conduit aussi rapidement à la dégradation de PML-RAR α (71, 284, 479). L'implication de SUMO1 dans la dégradation induite par

As₂O₃ de PML a été suggérée dans de rares études (89, 232). Le rôle de SUMO1 est en fait plus généralement relié à une relocalisation ou une stabilisation antagonisant l'ubiquitination et la dégradation (94, 110, 256, 264, 284, 351).

PML est modifié par les trois paralogues de SUMO (214, 393). Alors que les études impliquant SUMO1 sont très nombreuses, le rôle de SUMO3 vient tout juste d'être révélé. En effet, la sumoylation de PML par SUMO3 sur la lysine 160 est essentielle à la formation des PML-Nbs et ne peut être compensée par SUMO1 ou SUMO2 (120). La lysine 160 est de toute importance puisque sa modification par SUMO1 est également impliquée dans la dégradation induite par As₂O₃ (232).

Tel que mentionné précédemment, PML a également possiblement une activité E3 SUMO ligase (329), qui, si elle n'est pas aujourd'hui totalement démontrée, est de plus en plus soupçonnée.

3.2.4.2. La phosphorylation de PML

PML est ubiquitinisé à divers endroits par différentes voies. Deux articles plus récents ressortent particulièrement car ils lient la phosphorylation de PML à sa sumoylation (158) et son ubiquitination / dégradation.

Le premier révèle qu'un traitement à l'As₂O₃ induit la phosphorylation, puis la sumoylation de PML à travers une voie MAP kinase. Il s'agit d'une étude publiée en 2004 qui démontre que l'As₂O₃ induit la phosphorylation de PML à travers la voie MEK1 / ERK1/2 et que cette phosphorylation est associée à une sumoylation augmentée de PML. La T²⁸, S³⁶, S³⁸, S⁴⁰ en N^{tal} et la S⁵²⁷ et S⁵³⁰ en C^{tal} de PML VI sont impliquées (158). De façon surprenante ici, la phosphorylation augmente la sumoylation alors qu'une plus ancienne étude révélait que la phosphorylation régulait négativement la sumoylation puisque un inhibiteur de phosphatase (la calyculin A) entraîne une perte de la sumoylation par SUMO1 de PML (109).

Le second publié récemment (360) démontre que PML est ubiquitinylé par la voie CK2 / p38 MAPK sur les S^{512, 513, 514 et 517} de PML IV (la S⁵¹⁷ étant la principale). Cette phosphorylation est nécessaire pour la polyubiquitination et la dégradation subséquente de PML discuté plus amplement dans le chapitre suivant.

3.2.4.3. L'ubiquitination de PML

L'ubiquitination de PML est de loin beaucoup moins étudiée que sa sumoylation. Il a été démontré et admis que la dégradation de PML est dépendante du protéasome mais le mécanisme conduisant à cette dégradation et les sites d'ubiquitination ne sont pas connus. Malgré l'existence de quelques articles (peu nombreux comparativement à la sumoylation) sur la dégradation dépendante du protéasome de PML (70, 232, 360) et le recrutement du protéasome aux PML-Nbs (24, 111, 232), très peu de groupes se sont intéressés directement à l'ubiquitination de PML. Cette année, le groupe de Pandolfi a réellement abordé l'ubiquitination de PML sans toutefois caractériser les lysines cible de cette ubiquitination. Une séquence C^{terminale} de PML IV ne contenant pas de lysine (360) (a.a. 498-524) est nécessaire et suffisante pour diriger la dégradation protéique dépendante de l'ubiquitine et du protéasome. De façon notable et intéressante, non seulement cette séquence contient des sérines qui sont ubiquitinylées par la voie p38 MAPK / CK2 (360) mais en plus cette séquence est au cœur du SBD de PML IV (a.a. 491 à 520), publié par le même groupe à quelques mois d'intervalle (375) sans qu'aucun des deux articles ne fasse référence à l'autre. Il est pourtant tentant d'avancer l'hypothèse d'un possible régulation du SBD par la phosphorylation des sérines, avec de plus, un lien possible avec la dégradation dépendante du protéasome. L'hypothèse d'une régulation phospho-dépendante du SBD a déjà été avancée (230) et cette question ainsi que celle concernant la dégradation dépendante du protéasome de PML seront abordées dans le second article et la discussion de cette thèse.

N.B. : Au cours de la rédaction de cette thèse, deux articles d'importance axés sur l'ubiquitination et la dégradation de PML sont sortis (231, 404). Les résultats de ces articles sont abordés et mis en perspective avec les nôtres dans la partie « Discussion ».

3.2.5. Conclusion générale sur PML :

L'existence de plusieurs isoformes de PML rend difficile toute conclusion générale sur cette protéine. De plus en plus d'études démontrent que chaque isoforme a des interactions, des MPTs et des fonctions différentes. Par exemple PML III interagit avec RNF4 (116, 148). PML IV est ubiquitinylé par la voie p38 MAPK (360) alors que PML VI ne l'est pas (158). Enfin, des isoformes nucléaires et d'autres cytoplasmiques révèlent des fonctions bien différentes (353).

Notre étude utilise l'isoforme III de PML (# d'accèsion S50913 (91)). La synthèse des différentes études mentionnées ci-dessus révèle une région C^{terminale} de grand intérêt illustrée dans la représentation ci-dessous.

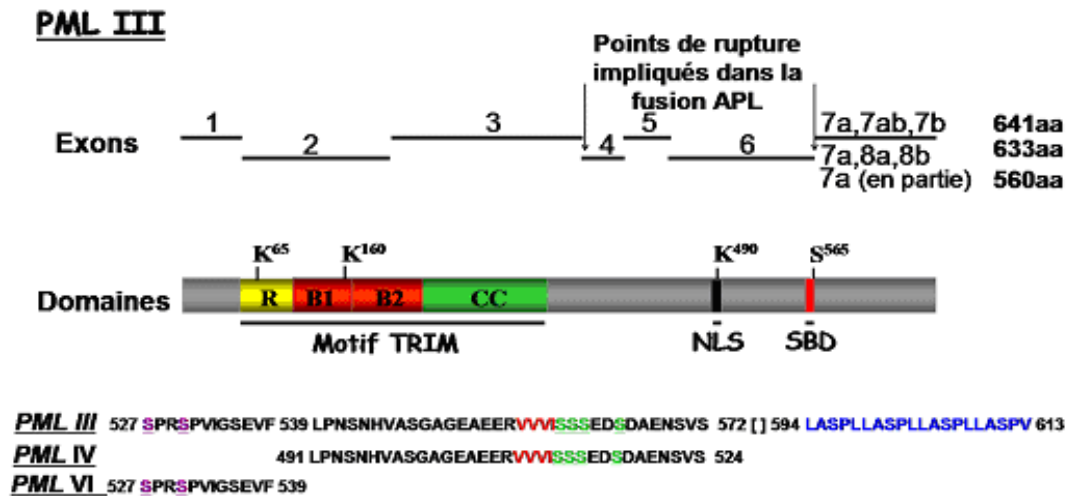


Figure 28 : Représentation schématique de PML III.

Le domaine TRIM de PML III, ses trois lysines cibles de sumoylation et la sérine 565 sont indiqués. Les séquences C^{terminales} des isoformes III, IV et VI sont indiquées en parallèle. La sérine 565 (correspondant à la sérine 517 de PML IV) est la sérine majoritairement ubiquitinylée par la voie CK2 / p38 MAPK selon une étude portant sur l'isoforme IV (360). Quatre sérines, représentées en vert sur les séquences, sont la cible

de cette voie de phosphorylation. Le noyau du SBD (VVVI) identifié initialement dans PML IV (375) est indiqué en rouge. Une séquence importante pour la dégradation de PML III (232) située dans cette région C^{dale} est indiquée en bleu. Il s'agit d'une répétition d'une série LASPL non présente sur PML IV appuyant la possibilité d'une dégradation différemment induite entre les deux isoformes. Enfin, sont indiquées en mauve, les sérines identifiées dans PML VI comme étant 102olubilised102 par la voie MEK1 / ERK1/2 (sérines 527 et 530) (158).

4. Le BRET

4.1. La nécessité de nouvelles méthodes pour étudier les MPTs

Jusqu'ici, la phosphorylation a été étudiée par des méthodes biochimiques classiques. Des méthodes ont été développées plus récemment (revues dans (208)) telles que :

- l'analyse bioinformatique afin de définir le kinome (260) et le phosphatome (12), en 2002 et 2004 respectivement,
- l'utilisation de plus en plus fréquente de la spectrométrie de masse en tandem (389) pour identifier les phosphoprotéines et leurs sites de phosphorylation (114, 258) en 2004 et 2002. Les toutes premières études datent de 2001 (298, 478),
- ainsi que de nouvelles stratégies telles que le FRET (275), le FACS (314) pour étudier la phosphorylation *in vivo* en 2003 et 2002.

Ces nouvelles approches pour étudier la phosphorylation promettent de nouveaux développements excitants dans un proche avenir afin de disséquer de façon plus précise et surtout plus dynamique cette MPT.

La spectrométrie de masse est une des approches les plus prometteuses en ce qui concerne la dissection de toutes les MPTs sur une même protéine. Elle a démontré sont

efficacité récemment pour détecter le pool de protéines ubiquitinées dans la levure en 2003 (313) et 2006 (communication personnelle des Dr. J. Peng et K. Wilkinson lors du congrès « The Ubiquitin Family » à CSHL, NY, avril 2007) et connaîtra sans doute bien des variantes et des adaptations pour continuer à étudier la phosphorylation, l'ubiquitination, mais surtout quantifier également le nombre de protéines modifiées par des Ubl telles que SUMO (92, 448). Une revue des divers articles proposant de détecter l'ubiquitination et la sumoylation par spectrométrie de masse et comparant les diverses stratégies adoptées et les résultats obtenus sous forme de deux tableaux récapitulatifs a été publiée (456).

Des approches de FRET ont commencé à voir le jour afin d'étudier l'ubiquitination (184) et la sumoylation (51). Enfin, le FLIM (86) a été utilisé cette année pour étudier la sumoylation d'une protéine phosphatase.

Toutes ces études essayant de développer de nouvelles méthodes soulignent le besoin de nouvelles approches pour l'étude des MPTs. En effet, les buvardages de type western et autoradiographies utilisées jusqu'ici ont besoin d'être complétés par l'utilisation de nouvelles techniques permettant d'accéder de façon dynamique, quantitative et aussi à grande échelle à ces modifications.

Ici, nous nous proposons d'utiliser et de développer le BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfert) dans ce sens. Le BRET est un essai conduit sur des cellules vivantes de mammifères intactes reposant sur le transfert d'énergie bioluminescente entre la luciférase et la GFP.

4.2. Historique du BRET

Cette technique a en tout premier lieu été développée sur des cellules de bactéries (457), puis a été adaptée dans les cellules de mammifères pour l'étude de la dimérisation de récepteurs couplés aux protéines G (14). Cette thèse présente en premier, un article qui démontre pour la première fois que le BRET peut être utile à la détection d'interactions entre des facteurs transcriptionnels dans le noyau de cellules mammifères (127). Depuis, le

BRET a connu de nombreux développements et applications avec son utilisation chez les plantes (398), afin de cribler de nouvelles molécules actives (163, 191), la dynamique des interactions (319), les changements conformationnels (68) et récemment, les interactions dynamiques avec une protéine phosphatase (296) ou la détection de l'ubiquitination (316).

4.3. Principe du BRET

Le BRET utilise un phénomène naturel (206, 445) soit le transfert d'énergie bioluminescente entre la luciférase et la GFP. La luciférase est une protéine isolée et caractérisée en 1978 chez *Renilla reniformis* (156). La GFP pour sa part a été isolée plus tôt en 1962 chez *Aequorea aequorea* (66, 377). Trois combinaisons de donneur et d'accepteur ont été utilisées dans le BRET, donnant ainsi, la dénomination de BRET¹, BRET² et BRET^{ZS-yellow}. Dans les trois cas, le donneur est toujours la luciférase *Renilla* mais différents substrats et accepteurs sont utilisés. Les articles de cette thèse utilisent le BRET¹ et le BRET². Dans le BRET¹, la E-YFP de *Aequorea victoria* est utilisée avec pour substrat, le substrat naturel de la luciférase *Renilla* (coélectérazine H). Dans le BRET², afin que le pic d'émission de la luciférase et de la GFP soient plus distants, un nouveau substrat de la luciférase a été développé par Perkin Elmer Biosciences à Montréal. Il s'agit de la coélectérazine Deep BlueC. Un mutant GFP est utilisé, nommé GFP² (ou initialement GFP10), qui a un pic d'excitation maximum à 400 nm (36).

Afin de détecter des interactions protéiques entre deux protéines, l'une est donc fusionnée à la luciférase alors que l'autre l'est à la GFP. Dans le cas, par exemple du BRET², lors de l'ajout de la coélectérazine, le substrat de la luciférase, une émission de luminescence à 400nm est générée. Si la GFP est assez proche (entre 50 et 100 Å), elle se trouve excitée par cette émission et émet à son tour à 510nm. Le BRET ratio est le ratio de fluorescence divisé par la luminescence et représente le transfert d'énergie entre la luciférase et la GFP.

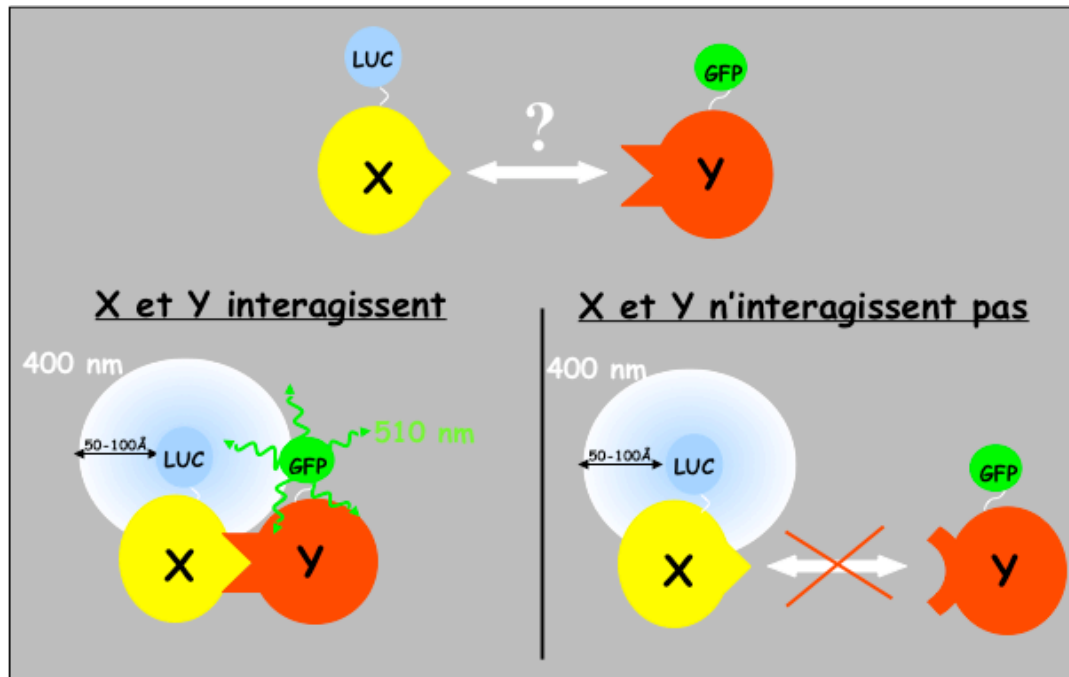


Figure 29 : Représentation schématique du principe du BRET dans la détection d'interaction protéiques (ici entre les protéines X et Y).

Le facteur limitant d'un tel essai est la quantité de fusion GFP exprimée. Une quantité fixe de fusion luciférase est donc transfectée avec une quantité croissante de fusion GFP : dans le cas d'une interaction, on obtient une courbe de saturation en représentant le BRET ratio comme une fonction du ratio de l'expression des deux fusions GFP/Luc.

Dans cette thèse, le second article propose d'utiliser le BRET comme méthode dynamique d'étude de la sumoylation de la protéine PML dans le but d'étudier par la suite les modulateurs de cette MPT *in vivo* et en temps réel.

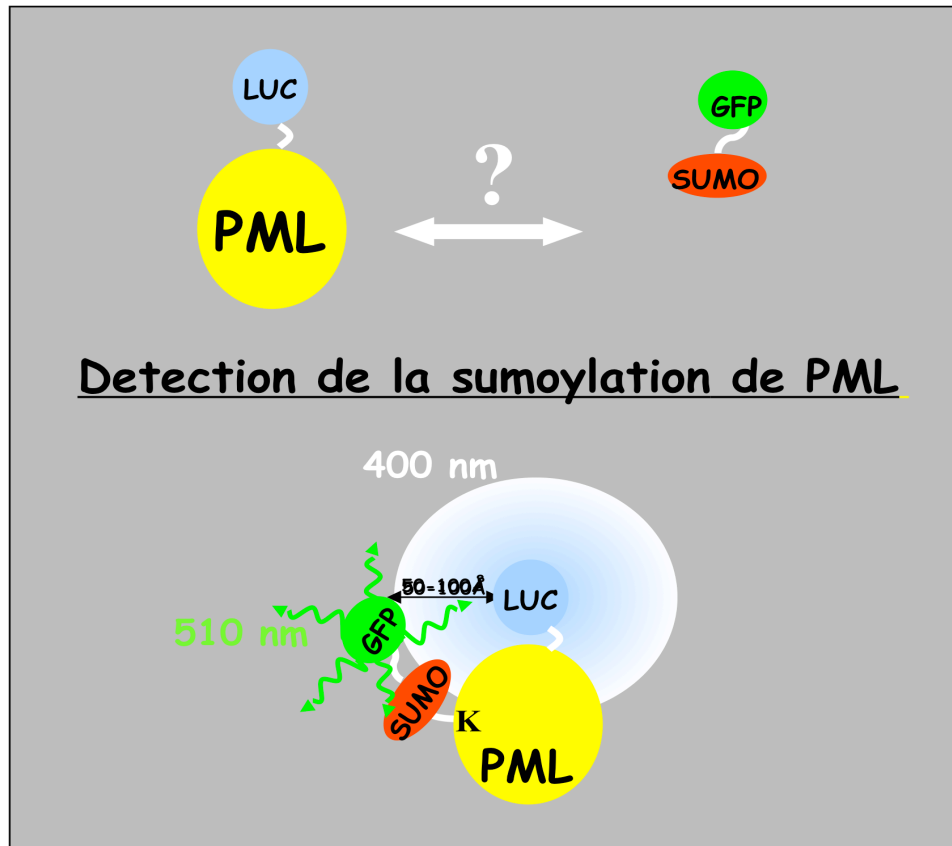


Figure 30 : Principe de la détection de la sumoylation de PML par BRET.

5. Objectifs de cette thèse

L'étude de l'interaction de protéines nucléaires ayant tendance à s'agréger (telles que les TIF1s) ou pouvant être difficilement solubilisées comme les protéines de la matrice nucléaire (tel que ZNF74 et PML) s'avère difficile à réaliser et conduit souvent à des résultats conflictuels selon les méthodes utilisées. D'autre part, l'étude de la dynamique de couplage covalent de petites protéines comme SUMO sur des lysines de protéines cibles est difficile à suivre par les méthodes conventionnelles.

Afin de mieux comprendre le rôle et la régulation de protéines de la famille des TRIMs étudiées au laboratoire (TIF1 α , TIF1 β et PML), cette thèse propose de développer de nouvelles applications du BRET qui permettent de suivre leurs interactions covalentes et non covalentes en temps réel dans des cellules vivantes. Les objectifs de cette thèse sont :

1) d'étudier par BRET l'homo- et l'hétérodimérisation des régulateurs transcriptionnels TIF1 α et TIF1 β et la possible formation de complexe ternaire avec des membres de la famille des KRAB multidoigt de zinc. Ceci devrait permettre de résoudre les informations conflictuelles de la littérature et de confirmer une possible communication croisée entre les récepteurs nucléaires et les KRAB multidoigt de zinc.

2) de déterminer s'il est possible de différencier par BRET les interactions covalentes de SUMO (sumoylation) avec sa protéine cible, des interactions non-covalentes médiées par un domaine de liaison à SUMO (SBD ou SUMO Binding Domain).

3) d'étudier par BRET et par des méthodes conventionnelles le rôle de la sumoylation et/ou des interactions non-covalentes avec SUMO dans la dégradation de PML et celui de la sumoylation dans la régulation transcriptionnelle médiée par TIF1 β .

En plus de valider l'utilisation du BRET pour la première fois dans l'étude d'interactions entre protéines nucléaires et dans l'étude de la sumoylation ainsi que des interactions non-covalentes avec SUMO *in vivo* et en temps réel, cette étude apporte des éléments nouveaux à la compréhension de la régulation des fonctions des protéines TRIMs étudiées qui auraient été difficiles à obtenir par d'autres méthodes.

Chapitre 2 : Publications

1. Article 1 (publié dans J. Biol. Chem.) – Préambule

Oligomerization of TIF1 transcriptional regulators and interaction with ZNF74 nuclear matrix protein revealed by BRET in living cells.

D. Germain-Desprez, M. Bazinet, M. Bouvier, M. Aubry.

Publié dans J Biol Chem.; 278(25) :22367-73; juin 2003

1.1. Mise en contexte

Cet article présente la mise au point et l'utilisation, pour la première fois, du BRET, en tant qu'outil de détection d'interactions entre des protéines nucléaires. Il met en évidence que le BRET permet d'étudier dans les cellules vivantes l'interaction de protéines relativement insolubles comme des protéines de la matrice nucléaire tel le facteur transcriptionnel ZNF74 ou ayant tendance à s'agréger tels les co-régulateurs de la transcription TIF1 α et β . Le BRET n'étant pas basé sur la lecture d'une activité de transcription, comme par exemple les essais classiques de doubles hybrides chez la levure ou dans les cellules de mammifères, il est possible d'étudier par BRET les interactions *in vivo* de protéines transcriptionnellement actives avec des protéines intactes de pleine longueur.

Cet article sert aussi de base méthodologique préliminaire au second article présenté dans cette thèse.

1.2. Participation

Pour cet article, en tant qu'étudiante au Ph.D en charge du projet, j'ai construit tous les vecteurs, développé, mis au point, réalisé et répété les expériences de BRET nécessaires à chaque figure. Au moment de la finalisation de l'article alors que je réalisais la présentation des figures et étant donné mon départ en congé de maternité, j'ai bénéficié de l'assistance technique de Martine Bazinet, assistante de recherche dans notre laboratoire (co-immunoprécipitation de la figure 1c, essai pull-down de la figure 3c ainsi que la confirmation de quelques compétitions de BRET). Ma contribution aux expériences peut être évaluée à 80%.

Le docteur M. Bouvier est notre collaborateur pour les essais de BRET, il nous a donc donné accès dans son laboratoire aux appareils nécessaires et à son expertise dans le cadre de l'utilisation du BRET pour l'étude de récepteurs membranaires.

J'ai participé finalement à la rédaction de cet article avec ma directrice, le docteur M. Aubry, ainsi qu'aux intéressants échanges et discussions que nous avons eus avec le docteur M. Bouvier.

1.3. Accord des coauteurs

1. Identification de l'étudiant:

Delphine Germain-Desprez, DESD17527405

2. Nom de l'unité académique:

Programme de Biologie Moléculaire, Faculté des Études Supérieures

3. Nom du programme :

Ph.D. Biologie Moléculaire. 3-466-1-0

4. Identification de l'article :

Germain-Desprez D, Bazinet M, Bouvier M, and Aubry M. Oligomerization of transcriptional intermediary factor 1 regulators and interaction with ZNF74 nuclear matrix protein revealed by bioluminescence resonance energy transfer in living cells. *J Biol Chem* 278: 22367-22373, 2003. Publié.

5. Déclaration des coauteurs :

A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Delphine Germain-Desprez Canada cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : Interactions protéiques et relation dynamique entre phosphorylation / sumoylation / ubiquitination des protéines TIF1 α , β et PML : détection *in vivo* par BRET.



1.4. Permission de l'éditeur de la revue

1. Identification de la revue et de l'éditeur :

Journal of Biological Chemistry

ISBN/ISSN: 00219258

Publication year(s): 1905 – present

Publisher: American Society for Biochemistry & Molecular Biology

Rightsholder: American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB)

Author/Editor : Tabor, Herbert

2. Identification de l'article

Germain-Desprez D, Bazinet M, Bouvier M, and Aubry M. Oligomerization of transcriptional intermediary factor 1 regulators and interaction with ZNF74 nuclear matrix protein revealed by bioluminescence resonance energy transfer in living cells. *J Biol Chem* 278: 22367-22373, 2003. Publié.

3. Permission

Copyright Permission Policy

ASBMB does not charge for and grants use without requiring your copyright permission request for:

- The Journal of Biological Chemistry is copyrighted by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. ASBMB grants use without requiring your copyright permission request for: Original authors wanting to reproduce figures or tables from their own work to publish in not-for-profit formats or venues, provided that full acknowledgment of the source is provided in the new work.
- Students wanting to reproduce or republish their work for educational purposes.
- Students using other authors' material for their theses.

Use of copyrighted material requires proper citation.

Source : http://www.jbc.org/misc/Copyright_Permission.shtml

2. Article 1

**OLIGOMERIZATION OF
TRANSCRIPTIONAL INTERMEDIARY FACTOR 1 REGULATORS
AND INTERACTION WITH ZNF74 NUCLEAR MATRIX PROTEIN
REVEALED BY
BIOLUMINESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER
IN LIVING CELLS**

Delphine Germain-Desprez, Martine Bazinet, Michel Bouvier and Muriel Aubry *

Department of Biochemistry, Université de Montréal, C.P. 6128,

Succ. Centre-Ville, Montréal, Qc, H3C 3J7, Canada

Running title: Transcriptional regulator oligomers revealed in vivo by BRET

*To whom correspondence and reprints should be addressed:

Muriel Aubry, Ph.D.

Department of Biochemistry

Université de Montréal

C.P. 6128, Succ. Centre-Ville

Montréal, H3C 3J7

Canada

Phone ☎(514) 343-6322, Lab ☎(514) 343-6111 ext :3747

Fax ☎(514) 343-2210

E-mail : Muriel.Aubry@Umontreal.ca

Article publié dans J Biol Chem. 2003 Jun 20;278(25) :22367-73.

SUMMARY

TIF1 α and KAP-1/TIF1 β , two members of the TIF1 family of nuclear cofactors, are ubiquitous co-regulators of nuclear receptors and KRAB motif-containing zinc finger transcription factors, respectively. Despite the functional evidence suggesting a role for TIF1 proteins as modulators of transcription, the study of their interactions with transcriptional machineries in physiologically relevant systems has been difficult. Here, we have developed a Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) biophysical approach to study protein-protein interactions in the nuclear compartment of living mammalian cells. We report that TIF1 α and KAP-1 form homo- and hetero-oligomers in intact mammalian cells. BRET titration experiments indicate that both homo- and hetero-oligomers occur with relatively high affinity suggesting that they could co-exist in cells. Furthermore, we demonstrate that KAP-1 but not TIF1 α interacts with the KRAB multifinger ZNF74 in the nuclear matrix. Splice variants and point mutants of ZNF74 that lack transcriptional activity were found not to interact with KAP-1 confirming the physiological importance of this interaction in living cells. The interaction of ZNF74 with KAP-1 did not prevent KAP-1 homomerization indicating that the oligomers most likely represent the transcriptionally active species. Furthermore, the detection of ternary ZNF74/KAP-1/TIF1 α complexes suggests the existence of cross-talk between KAP-1-interacting KRAB proteins and TIF1 α -interacting nuclear receptors. In addition to providing new insights into the molecular interactions involved in the transcriptional activities of these proteins, this study shows that BRET can be advantageously used as a non-transcription-based oligomerization detection system to study the interaction of transcriptionally active proteins, including nuclear matrix proteins, in living cells.

INTRODUCTION

TIF1 α and KAP-1 (TIF1 β) are ubiquitously expressed members of the Transcriptional Intermediary Factor 1 (TIF1) family. TIF1 α was described as a modulator of ligand-activated transcription mediated by the retinoid nuclear receptors RXR and RAR (1-5). KAP-1, for its part, has been proposed to act as a co-repressor for several KRAB motif-containing zinc finger transcription factors (6) such as human KOX1 (7;8), ZNF133 and ZNF140 (7), rat Kid1 (9) and mouse KRAZ1 and KRAZ2 (10). Although largely distributed in vertebrates, the absence of KRAB motif-containing proteins and TIF1 family members in yeast *Saccharomyces cerevisiae* suggests a late evolutionary apparition and expansion of these two protein families (8;11).

While a few studies have suggested that TIF1 family members can act as homo- or hetero-oligomers (12), the nature of the complexes in which these proteins are engaged remain largely unknown. Indeed, despite the evidence suggesting an important role for TIF1 proteins as modulator of transcription, the study of their interactions with the transcriptional machinery in physiologically relevant systems has been difficult. Studies addressing their physical interactions included *in vitro* assays carried out mainly with soluble fragments (to minimize aggregation) of recombinant proteins (1;3;4;12-16), transcription-based yeast two hybrid assays (1;3;5;8;9;17) and co-immunoprecipitation in over-expression systems (14;18;19). However, results obtained with these various approaches led to conflicting conclusions. For instance, *in vitro* and co-immunoprecipitation studies suggested that TIF1 α and KAP-1 can homo-oligomerize (14) although no such homophilic interaction was detectable in yeast two-hybrid interaction assays (8). Conversely, while heteromerization of TIF1 α with KAP-1 was evidenced by yeast two-hybrid methods (5), it was not detected using *in vitro* and co-immunoprecipitation approaches (14).

The analysis of the interactions involving TIF1 family members is further complicated when considering that the transcriptional activities of TIF1 and KRAB-containing proteins drastically differ between yeast, where these proteins are not normally expressed, and

mammalian cells. In contrast to what is found in mammalian cells, neither TIF1-alpha, KAP-1 nor KRAB domain-containing proteins have transcriptional repressor activity in yeast (8) with the consequence that many functionally relevant interactions may not be found in this system (2).

In one case, a physiologically more appropriate transcription-based mammalian two hybrid system, has been successfully used to demonstrate the interaction of a non repressive KAP-1 fragment with the KRAB domain of KRAZ1 and KRAZ2 (10). However, such assay cannot be used with full length proteins that have intrinsic transcriptional activity, significantly limiting its usefulness. Although co-immunoprecipitation could alleviate this problem, this approach has the inherent drawback of possibly revealing complexes established during or following cell lysis. Furthermore, co-immunoprecipitation could not be readily used with proteins tightly bound to the nuclear matrix such as the KRAB-containing proteins that are resistant to solubilization in non-denaturing detergents. Taken together, the above considerations stress the need for the development of new approaches to study protein-protein interactions involving transcriptional regulators and/or nuclear matrix proteins.

Fluorescence and bioluminescence resonance energy transfer (FRET¹ or BRET) have recently been used to assess protein-protein interactions in living cells (20;21). In particular, BRET was successfully used to study homomerization of the Kai transcription factors, in the nuclear-less bacterial cell *E.coli* (22) and the oligomerization of the membrane-bound G protein-coupled membrane receptors in mammalian cells (23;24). Here, using nuclear and nuclear-matrix targeting sequences as controls, BRET was used for the first time to quantitatively study protein interactions in the nuclear compartments of living mammalian cells.

We report that two TIF1 family members, TIF1 α and KAP-1 can form homo- and hetero-oligomers in intact mammalian cells and that KAP-1, unlike TIF1 α , interacts with the

KRAB multifinger protein ZNF74 in the nuclear matrix. In addition to providing new insights into the molecular interactions involved in the transcriptional activities of the TIF1 and KRAB-containing proteins, our study demonstrate that BRET can advantageously be used as a non-transcription-based detection system to study the interactions of full length transcriptional regulators, including nuclear matrix proteins, in living cells.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Expression vectors.

KAP-1 and TIF-1 α constructs. Full length KAP-1 (Accession No. NM_011588; aa 1-835) was derived from pMFH-Gal4-KAP1 construct (generous gift from Dr J.V. Bonventre) (9;25) and subcloned as an EcoRI-NotI fragment into the EcoRI and EcoRV sites of cytomegalovirus-driven pHRLUC C3 and pGFP10 C2 vectors, respectively (Perkin Elmer BioSignal). Full length TIF-1 α (Accession No. S78219; aa 1-1017) was isolated from pSG5-TIF-1 α (generous gift from Drs R. Losson) (4) and subcloned as a BamHI fragment into pHRLUC C2 and pGFP10 C1 BamHI site. For in phase cloning after an N-terminal HA-tag, full length KAP-1 and TIF1 α were cloned into the blunted BamHI or XbaI sites of cytomegalovirus-driven pCGN vector (26), respectively.

ZNF74 constructs. cDNAs coding for ZNF74-I (Accession No. X71623; aa 1-572) (27), ZNF74-II (Accession No. X92715; aa 1-643) (28) and the zinc finger domain of ZNF74 (ZN) (aa 175-509 when numbered relative to ZNF74-I or aa 246-580 when numbered relative to ZNF74-II) were derived from clones previously obtained and cloned in pCGN (27;28). To construct the KRAB mutant of ZNF74-II (D₄₇V₄₈ → A₄₇A₄₈), substitution of the KRAB domain-conserved DV amino acids (29) to alanine residues was obtained by PCR-mediated mutagenesis (30) and the KRAB-containing region of ZNF74-II was replaced by the corresponding fragment containing the mutation. For BRET constructs, all ZNF74 sequences were subcloned as XbaI fragments into pHRLUC C1 and pGFP10 C3 XbaI site at the C-terminus of luciferase and GFP (pHRLUC C1 Δ XhoI/BamHI blunted, pGFP10 C3 Δ SacI/BamHI blunted). pMal-c vector (New England Biolabs) was used to bacterially express maltose binding protein (MBP) in fusion with ZNF74 proteins as previously described (27).

Rluc-GFP10 and GFP-NLS constructs. Rluc-GFP10 construct corresponding to a fusion of the luciferase to GFP was a gift from Perkin-Elmer BioSignal. To target GFP protein into the nucleus, a nuclear localization signal (NLS) (31) was inserted after the GFP in pGFP10 C2 vector digested with ApaI and BamHI (pGFP10-NLS).

PCR-derived regions as well as blunted cloning regions were sequenced in all constructs.

Cell culture and transfections.

Human embryonic kidney 293T cells (32) maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented by 10 % FBS (GIBCO/BRL), 100 µg/ml penicillin and streptomycin, 1 mM L-glutamine were seeded at a density of 1×10^6 cells per 100-mm dish. Transient transfections of plasmids were performed the following day by using the calcium phosphate precipitation method (30).

BRET assay.

Transient transfections with *Rluc* and/or GFP10 fusion or other constructs were performed in 293T as described above. The total amount of DNA used for transfection was adjusted to 10 µg by adding pGEM4 vector (Promega). Forty-two hours post-transfection (or forty-eight hours for transfections including TIF1 α constructs), cells were detached with 2 mM PBS-EDTA and washed twice with 1 mM PBS-glucose. Cells were resuspended in 1 mM PBS-glucose at approximately 2×10^6 cells/ml and 90 µl (~20µg) were distributed in 96-well microplates (white Optiplate from Packard). Upon the addition of 5µM of the cell permeant luciferase substrate, coelenterazine deep blue (10 µl) (Perkin-Elmer BioSignal), the bioluminescence resulting from its degradation (emission peak 400 nm) was detected using a 370-450 nm-band pass filter (donor emission). The energy transferred to GFP10 (emission peak 510 nm) was detected using a 500-530 nm band pass filter. Readings were collected with a modified topcount apparatus (BRETCount; Packard-Bioscience) that allows sequential integration of the signals detected at 370-450 nm (bioluminescence signal) and at 500-530 nm (fluorescence signal). The BRET signal (BRET ratio) was quantified by calculating the fluorescence/luminescence ratio as previously reported (33). The BRET ratio was found to be stable over several readings performed at different times after addition of the substrate (here evaluated in a 5 to 20 min range) (23). Expression level of each construct was determined by direct measurements of total fluorescence and luminescence on aliquots

of transfected cell samples. The GFP10 total fluorescence was measured using a FluoroCount (Packard Bioscience) with an excitation filter at 400 nm, an emission filter at 510 nm and the following parameters: Gain 1; PMT 1100 V; Time 1.0 sec. After the fluorescence measurement, the same cells were incubated for 10 min with Coelenterazine H (Molecular Probe) at a final concentration of 5 μ M and the total luminescence of cells measured using a LumiCount (Packard Bioscience) with the following parameters: Gain 1; PMT 700 V; Time 0.5 sec. In contrast to deep-blue coelenterazine, coelenterazine H does not lead to energy transfer to GFP10 and thus allows to assess *Rluc* activity without GFP10 emission quenching. The BRET ratios were plotted as a function of the GFP/LUC fusion protein expression ratio, both fusion protein expression being assessed with the same cells as described above, to take into account the potential variations in the expression of individual constructs from transfection to transfection. BRET titration curves were fitted using a non-linear regression equation (GraphPad Prism).

Co-immunoprecipitation.

Cells were lysed with RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 0.5 % NP-40, 1 mM PMSF and 10 μ g/ml aprotinin, pepstatin and leupeptin) at 4° C for 20 min and centrifuged at 15,000 g for 15 minutes. The extracts were precleared over protein A- Sepharose for 1 h at 4° C. Co-immuprecipitations of the precleared extracts were carried out with protein A-Sepharose (50 μ l) and mouse anti-HA monoclonal antibody (12CA5). Washed immunoprecipitates were resuspended in Laemmli buffer and the recovered proteins were analysed by SDS-PAGE and electro-transferred for Western blotting.

MBP pulldown assays.

Pull down assay with MBP and MBP fusions were performed as described by Gebelein et al. (34). Briefly, 293T cells transiently transfected with pCGN-HA-KAP1 (5 μ g) were 119olubilised for 20 min in RIPA buffer (1 ml/ $\sim 10^7$ cells). After centrifugation at 12,000 g

for 10 min, the equivalent of 3×10^6 solubilized cells was first incubated with an equimolar quantity of purified MBP or MBP fusion protein (0.5 to 1 μ g) for 2 h, re-centrifuged to eliminate any potential insoluble material and then incubated with an amylose resin for 1h. Complexes retained by the washed affinity resin were analysed by SDS-polyacrylamide gel and electro-transferred for Western blotting. After the anti-HA immunodetection, the blot was dehybridized and rehybridized with an anti-MBP antibody to confirm the loading of equivalent amount of MBP fusion proteins (data not shown).

Western blotting.

The expression of epitope-tagged and fusion proteins immobilized on nitrocellulose membranes was verified by Western blotting using the 12CA5 mouse anti-HA antibody (35), rabbit polyclonal anti-GFP (Clontech), rabbit anti-MBP (New England Biolabs), rabbit anti-ZNF74 antibody raised against aa 139 to 261 and aa 584 to 643 of ZNF74-II and mouse polyclonal anti-KAP1 raised against aa 381 to 564 (36). Following addition of the appropriate secondary antibody (either a sheep anti-mouse or goat anti-rabbit horseradish peroxidase), a chemiluminescence reagent was used (Renaissance kit, NEN life Science Products).

RESULTS AND DISCUSSION

Oligomerization of TIF1 family members detected in living cells.

Although the presence of interaction motifs such as a Ring finger, B boxes and a coiled-coil domain (RBCC) suggests that members of the TIF1 family could oligomerize, studies assessing such interactions led to conflicting results (5;8;12-14). Here, using a newly developed BRET assay (22;23;33), homo- and heteromerization of KAP-1 and TIF1 α were investigated in living mammalian cells. Since the transfer of energy between a bioluminescence donor luciferase and a fluorophore acceptor GFP occurs with a R_0 of ~ 50 Å and that no transfer would be detected for distances above 100 Å (22), BRET was used to monitor intermolecular interactions between these potential partners. To this end, full length KAP-1 and TIF1 α were tagged at their amino-terminus with either *Renilla Reniformis* luciferase (*Rluc*) or *Aequorea* GFP green variant (GFP10) (Fig. 1A). Homomeric and heteromeric pairs were then co-expressed in 293T cells and the occurrence of BRET was determined by measuring the ratio of the light emitted by the GFP (410 ± 40 nm) and the luciferase (515 ± 15 nm) upon addition of the membrane permeable luciferase substrate coelenterazine. The BRET ratio was plotted as a function of the GFP/LUC fusion protein expression ratio (both fusion protein expression being individually assessed in each sample as described in *Experimental Procedures* section) to take into account the potential variations in the expression of individual constructs from transfection to transfection. As shown in Fig. 1A, significant BRET ratios, indicative of protein proximity, were detected for the *Rluc*-KAP1/GFP10-KAP1, *Rluc*-TIF1 α /GFP10-TIF1 α and *Rluc*-TIF1 α /GFP10-KAP1 pairs. In each case, when a fixed amount of *Rluc* fusion was transfected, the BRET ratio increased as a function of the amount GFP fusion transfected and reached a maximum when the amount of expressed GFP fusion (acceptor) was no longer limiting compared to *Rluc* fusion (donor). Such saturation is indicative of a specific interaction. When considering the heteromeric TIF1 α /KAP1 pair, identical results were obtained for the two possible BRET

orientations (ie: *Rluc-TIF1 α /GFP10-KAP1* and *Rluc-KAP1/GFP10-TIF1*; data not shown). Since as most techniques, BRET cannot distinguish between dimers and higher order oligomeric species, the term oligomers is used to describe the detected interactions with the understanding that some of the complexes may be simple dimers.

To ascertain the specificity of the KAP-1 and TIF1 α oligomers detected, BRET was measured in cells co-expressing *Rluc-KAP1* or *Rluc-TIF1 α* and a construct targeting cytoplasmic GFP to the nucleus by fusion to a nuclear localization signal (GFP10-NLS construct). The efficient nuclear targeting of GFP10-NLS, GFP10-TIF1 α and GFP10-KAP1, was confirmed by immunofluorescence microscopy (not shown). Only marginal BRET, most likely resulting from random collision (“bystander” BRET (33)), was obtained with the *Rluc-KAP1/GFP10-NLS* (Fig. 1A) and *Rluc-TIF1 α /GFP10-NLS* (not shown) negative control pairs.

The specificity and saturability of KAP-1 oligomerization and heteromerization with TIF1 α was further confirmed in competition experiments. Indeed, the addition of competing HA-tagged KAP1 significantly reduced the BRET ratio obtained with *Rluc-KAP1/GFP10-KAP1* and *Rluc-TIF1 α /GFP10-TIF1 α* pairs (Fig. 1B). TIF1 α constructs being consistently expressed at 5-15-fold lower levels than KAP-1 in transfected cells, competition with HA-TIF1 α could not be achieved for the *Rluc-TIF1 α /GFP10-TIF1 α* pairs as the total amount of HA-TIF1 α , *Rluc-TIF1 α* , GFP10-TIF1 α DNA constructs required for the occurrence of the expected competition reached toxic level for the cells.

The saturation curves obtained for the various pairs can be used to estimate the relative affinity of the partners for each other (33). For this purpose, BRET₅₀ values, defined as the relative amount of GFP fusion over Luc fusion – GFP/LUC in arbitrary units – required to obtain half the maximum BRET ratio (BRET_{max}) were determined. Considering these values, it appears that the homomeric pairs (*Rluc-TIF1 α /GFP10-TIF1 α* , BRET₅₀ = 0.32 \pm

0.07, *Rluc*-KAP1/GFP10-KAP1, $BRET_{50} = 0.40 \pm 0.15$) tend to have a slightly higher binding affinity than the heteromeric pair (*Rluc*-TIF1 α /GFP10-KAP1, $BRET_{50} = 0.74 \pm 0.31$). In an attempt to determine the molar ratio of GFP10/*Rluc* constructs needed to reach the $BRET_{50}$, a construct covalently fusing the *Rluc* and the GFP10 (*Rluc*-GFP) was used. The GFP/LUC expression ratio obtained for this fusion, which by definition corresponds to an equimolar concentration of GFP10 and *Rluc*, was 0.125 ± 0.020 arbitrary unit (n=5). Assuming that this value can be used to determine the ratio of the various *Rluc* and GFP10 fusions tested, 2.5-, 3- and 6-times more GFP fusion than *Rluc* fusion was required to reach half the maximum BRET ratio for TIF1 α homomeric, KAP-1 homomeric and TIF1 α /KAP-1 heteromeric pairs, respectively. These data indicate that the affinities between the partners are relatively high and that large excess is not needed for the interactions to occur. Furthermore, since the affinity of the homo- and heteromers are in the same range of magnitude, these complexes can potentially co-exist in living cells.

Co-immunoprecipitation experiments carried in 293T cells co-expressing the differentially tagged full length KAP-1 proteins, GFP10-KAP1 and HA-KAP1, confirmed that KAP-1 oligomers represent stable complexes that resist cell lysis and sample preparation. Indeed, as shown in Fig. 1C, at least 15 % of the total GFP-KAP1 could be co-immunoprecipitated with the HA-KAP-1. The low level of TIF1 α expression did not allow co-immunoprecipitation experiments to be carried out using up to 1mg of cell extract. Starting with larger amount of cell extracts (~4 mg of protein), Peng *et al.* were able to detect TIF1 α homomerization by co-immunoprecipitation but failed to detect interaction between TIF1 α and KAP-1 (14). The detection by BRET of both TIF1 α homo- and heteromerization with KAP-1, using as little as 100,000 cells (~20 μ g of protein) illustrates the high sensitivity of the energy transfer assay. Considering the conflicting results obtained relative to the homo- and heteromerization of TIF1 family members using yeast-two hybrids, *in vitro* studies and co-immunoprecipitation (as pointed out in the introduction),

BRET provides here a unique mean to assess these interactions and unambiguously demonstrates that TIF1 α and KAP-1 form homo- and heteromers in intact mammalian cells.

The functional significance of TIF1 family member oligomerization still remains to be determined. However, it was found that purified fragments of KAP-1 RBCC domain can oligomerize and that such oligomerization is required for interaction with the purified KRAB repressor domain of Kox-1 *in vitro* (13). Assuming that native proteins also depend on KAP-1 oligomerization for interaction, this suggests that the KAP-1 co-repressor oligomerization may be a *sine qua non* condition for KRAB proteins to exert their repressive function. From a study showing that TIF1 γ coimmunoprecipitates with TIF1 α and prevents TIF1 α repression of RXR nuclear receptor-mediated transcription, it was also suggested that the heteromerization of some TIF1 family members may constitute a transcription regulatory mechanism (14). Also, it was recently suggested that proper nuclear targeting of KAP-1 to transcriptionally silent centromeric regions may require its oligomerization (18). Indeed, such targeting was compromised by altering the RBCC domain of KAP-1 but preserved by replacing the RBCC domain with GAL4 DNA binding domain, which has the ability to dimerize. Whether the TIF1 α /KAP1 heteromerization shown in this study affects intranuclear localization of these individual TIF1 family members, or their respective transcriptional activity, remains to be determined.

Interactions between ZNF74, KAP-1 and TIF1 α in living cells.

ZNF74 is a nuclear matrix protein (27) that belongs to the large KRAB domain-containing multifinger family. Two isoforms, a long one (ZNF74-II) containing a full KRAB box and a shorter one (ZNF74-I) with an incomplete KRAB domain, are generated by alternative promoter usage and splicing (28). While ZNF74-I is preferentially located to nuclear speckles enriched in splicing factors and is transcriptionally inactive, ZNF74-II has a more diffuse nuclear localization and its KRAB box has been shown to repress transcription (28). Given that the repressor activity of several KRAB multifinger proteins has been shown

to require an interaction with the co-repressor KAP-1 (7), one could propose that ZNF74-II also mediates repression through a direct interaction with KAP-1. However, because of its tight attachment to the nuclear matrix and its intrinsic repressive activity, the *in vivo* interactions of ZNF74 with KAP-1 (or other candidate protein partners) could not be readily assessed in mammalian cells either by co-immunoprecipitation or by a transcription-based interaction assay. Here thus, BRET was used to assess the interaction between ZNF74-II and KAP-1 in living mammalian cells. As seen in Fig. 2A, significant BRET ratios revealing heteromerization of ZNF74-II and KAP-1 were obtained for the *Rluc-ZNF74-II/GFP10-KAP1* pair. Similar BRET ratios were obtained when the partners were tested in the reverse orientation (*Rluc-KAP1/GFP10-ZNF74-II*; see Fig 3A). In contrast, no heteromerization between ZNF74-II and the related TIF1 α was detected. Indeed, the marginal BRET signals obtained between *Rluc-ZNF74-II* and *GFP10-TIF1 α* (or the reverse pair; not shown) was not different from the background signal observed with the negative control *Rluc-ZNF74-II/GFP10-NLS* pair (Fig. 2A).

The specificity of *Rluc-ZNF74-II/GFP10-KAP1* heteromerization was confirmed by the reduction in the BRET ratio observed upon increasing concentrations of competing HA-KAP (Fig. 2B). Interestingly, no competition occurred when HA-ZNF74-II was added to the *Rluc-KAP1/GFP10-KAP1* pair and thus, the formation of BRET productive homomers of KAP-1 is not impaired by the interaction of ZNF74-II with KAP-1. This indicates that ZNF74-II can bind to oligomers of KAP-1 in intact mammalian cells and suggests that the oligomers most likely represent the transcriptionally active species. Such interaction between ZNF74 and oligomers of KAP-1 is consistent with the previous *in vitro* finding that purified RBCC fragments from KAP-1 interacted as multimers with a KRAB fragment from KOX1 (12;13).

The interaction of one KRAB zinc finger protein, KOX1, with TIF1 α (5;8;17) previously led to the suggestion that cross-talk could exist between KRAB multifinger

proteins and nuclear receptors known to interact with TIF1 α (11;37). However, our data using full length proteins in living mammalian cells suggest that ZNF74 does not interact directly with TIF1 α . Similarly, another study failed to demonstrate TIF1 α interaction with the isolated KRAB domain of five different KRAB zinc finger proteins using yeast two-hybrid systems (17). Thus, for these KRAB zinc finger proteins as well as for ZNF74, a possible cross-talk with nuclear receptors is not likely to occur through a direct interaction with TIF1 α . To test the hypothesis that a cross-talk regulation between TIF1 α and ZNF74 could result from the formation of a ternary complex between TIF1 α , ZNF74 and KAP-1, the ability of KAP-1 to promote a BRET productive interaction between TIF1 α and ZNF74-II was assessed. As shown in Fig. 2C, the background BRET signal detected between TIF1 α and ZNF74-II (see Fig. 2A for titration curve) was significantly potentiated by the addition of the unfused HA-KAP-1. Such increase in the BRET signal was specific for the TIF1 α /ZNF74 pair since it was not observed when GFP10-NLS was used instead of GFP10-ZNF74 (data not shown). This indicated that KAP-1, TIF1 α and ZNF74 are part of a protein complex placing TIF1 α and ZNF74 in close enough proximity for BRET to occur. Thus, we suggest that formation of ternary complexes between the co-regulators KAP-1, TIF1 α and KRAB multifinger proteins such as ZNF74 may allow cross-talk of KRAB multifinger proteins with nuclear receptors.

Differential interaction of KAP1 with ZNF74 isoforms: requirement of an intact KRAB domain.

As indicated above, the BRET signal obtained between KAP1 and ZNF74 was independent of the donor/acceptor orientation considered. Indeed, as seen in Fig. 3A, the BRET saturation curve obtained with the *Rluc*-KAP1/GFP10-ZNF74-II pair ($BRET_{50} = 0.39 \pm 0.16$; $BRET_{max} = 0.31 \pm 0.04$) was indistinguishable from that obtained with the reverse pair presented in Fig.2A ($BRET_{50} = 0.48 \pm 0.12$; $BRET_{max} = 0.35 \pm 0.03$). As previously shown for ZNF74 (27), the GFP10-ZNF74-II fusion was exclusively targeted to the nuclear matrix and was not detected in the soluble fraction of the nucleus including the DNase-

released chromatin (Ns) or in the cytoplasmic-enriched fraction (Cyt) (Fig. 3A). Thus, as a negative control, a minimal nuclear matrix targeting sequence (ZNF74-II^{aa246-580}) (38) fused to GFP was used. As expected, the fusion was exclusively recovered in the nuclear matrix and only a background signal was obtained for the *Rluc*-KAP1/GFP10-ZNF74-II^{aa246-580} pair (Fig. 3A) ruling out that the BRET signal observed between *Rluc*-KAP1 and GFP10-ZNF74-II could represent “bystander” BRET resulting from crowding in the nuclear matrix.

Previous *in vitro* and yeast-two hybrid studies indicated that the KRAB domain of a few KRAB-containing proteins is necessary and sufficient for interaction with KAP-1 co-repressor (7;9;17). Since ZNF74-I isoform encodes an incomplete KRAB domain deleted from its first 31 amino acids, we tested its interaction with KAP-1 in living mammalian cells. In contrast with the results obtained for ZNF74-II, the marginal BRET signal obtained between *Rluc*-KAP1 and GFP10-ZNF74-I (Fig 3A) (or the reverse pair – not shown) was not different from that observed with the nuclear matrix negative control. The importance of the KRAB box integrity for occurrence of the interaction was further assessed by mutating two amino acids highly conserved and proposed to be important for the interaction of KRAB motif-containing proteins with KAP-1 (29). Mutation of aspartate⁴⁷ and valine⁴⁸ to alanine residues, within the ZNF74-II KRAB domain, abrogated the interaction with KAP1 as indicated by the absence of significant BRET between *Rluc*-KAP1 and GFP10-ZNF74-II^{DV→AA} (Fig 3A). The absence of significant BRET was not due to inappropriate expression of GFP-ZNF74 constructs since similar GFP activity were observed (as accounted by the GFP/LUC ratio). The integrity of the fusion protein produced was also confirmed by immunoblot analysis that revealed the appropriate molecular weight for all constructs (Fig. 3B). Pull down assays using bacterially expressed ZNF74 isoforms and the DV→AA mutant were in agreement with the BRET results obtained in intact cells (Fig 3C).

The observation that the transcriptionally active ZNF74-II interacts with the corepressor KAP-1, while the transcriptionally silent ZNF74-I (28) does not, suggests that the repressive

activity of ZNF74-II is mediated by its interaction with KAP-1. This confirms the proposed role of KAP-1 as a universal co-repressor for KRAB zinc finger proteins (39).

CONCLUSION

In this study, BRET is shown for the first time to represent a reliable, quantitative and highly sensitive method to assess the interaction of transcriptionally active nuclear proteins in living cells. We took advantage of this non-transcription-based method to clearly show that two members of the TIF1 family, TIF1 α and KAP-1 co-regulators of transcription can homo- and heteromerize in living mammalian cells. Furthermore, we show that the ZNF74 nuclear matrix protein from the large KRAB multifinger family interacts with homomers of the corepressor KAP-1 but also with heteromers of KAP-1/TIF1 α . This suggests that such heteromers may mediate cross-talk between KRAB multifinger proteins and nuclear receptors known to interact with TIF1 α coregulator. As BRET allows real time kinetic studies to be performed in living cells, it will now be possible to assess such interactions under various conditions affecting cell cycle and transcriptional activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs. J.V. Bonventre and Drs. Régine Losson for generously providing pMFH-Gal4-KAP1 and pSG5-TIF1 α , respectively. We also thank Dr. Stéphane Angers and Jean-François Mercier for their help in setting up the BRET assays. This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (to M.A. and M.B.), Heart and Stroke foundation of Canada (to M.A.) and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (to M.A.). M.A. is supported by a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and M.B holds a Canada Research Chair.

FOOTNOTE 1

FRET: Fluorescence resonance energy transfer

BRET: Bioluminescence resonance energy transfer

REFERENCES

1. Le Douarin, B., Zechel, C., Garnier, J. M., Lutz, Y., Tora, L., Pierrat, P., Heery, D., Gronemeyer, H., Chambon, P., and Losson, R. (1995) *EMBO J.* **14**, 2020-2033
2. Le Douarin, B., Nielsen, A. L., Garnier, J. M., Ichinose, H., Jeanmougin, F., Losson, R., and Chambon, P. (1996) *EMBO J.* **15**, 6701-6715
3. vom, B. E., Zechel, C., Heery, D., Heine, M. J., Garnier, J. M., Vivat, V., Le Douarin, B., Gronemeyer, H., Chambon, P., and Losson, R. (1996) *EMBO J.* **15**, 110-124
4. Nielsen, A. L., Ortiz, J. A., You, J., Oulad-Abdelghani, M., Khechumian, R., Gansmuller, A., Chambon, P., and Losson, R. (1999) *EMBO Journal* **18**, 6385-6395
5. Venturini, L., You, J., Stadler, M., Galien, R., Lallemand, V., Koken, M. H., Mattei, M. G., Ganser, A., Chambon, P., Losson, R., and de The, H. (1999) *Oncogene* **18**, 1209-1217
6. Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C. *et al.* (2001) *Nature* **409**, 860-921
7. Friedman, J. R., Fredericks, W. J., Jensen, D. E., Speicher, D. W., Huang, X. P., Neilson, E. G., and Rauscher III, F. J. (1996) *Genes Dev.* **10**, 2067-2978
8. Moosmann, P., Georgiev, O., Le Douarin, B., Bourquin, J. P., and Schaffner, W. (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**, 4859-4867
9. Kim, S.-S., Chen, Y.-M., O'Leary, E., Witzgall, R., Vidal, M., and Bonventre, J. V. (1996) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **93**, 15299-15304
10. Agata, Y., Matsuda, E., and Shimizu, A. (1999) *J.Biol.Chem.* **274**, 16412-16422

11. Le Douarin, B., You, J., Nielsen, A. L., Chambon, P., and Losson, R. (1998) *J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.* **65**, 43-50
12. Peng, H., Begg, G. E., Harper, S. L., Friedman, J. R., Speicher, D. W., and Rauscher, F. J., III (2000) *J.Biol.Chem.* **275**, 18000-18010
13. Peng, H., Begg, G. E., Schultz, D. C., Friedman, J. R., Jensen, D. E., Speicher, D. W., and Rauscher, F. J., III (2000) *J.Mol.Biol.* **295**, 1139-1162
14. Peng, H., Feldman, I., and Rauscher, F. J., III (2002) *J.Mol.Biol.* **320**, 629-644
15. Lechner, M. S., Begg, G. E., Speicher, D. W., and Rauscher, F. J., III (2000) *Mol.Cell Biol.* **20**, 6449-6465
16. Ryan, R. F., Schultz, D. C., Ayyanathan, K., Singh, P. B., Friedman, J. R., Fredericks, W. J., and Rauscher III, F. J. (1999) *Mol.Cell Biol.* **19**, 4366-4378
17. Abrink, M., Ortiz, J. A., Mark, C., Sanchez, C., Looman, C., Hellman, L., Chambon, P., and Losson, R. (2001) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 1422-1426
18. Matsuda, E., Agata, Y., Sugai, M., Katakai, T., Gonda, H., and Shimizu, A. (2001) *J.Biol.Chem.* **276**, 14222-14229
19. Nielsen, A. L., Ortiz, J. A., You, J., Oulad-Abdelghani, M., Khechumian, R., Gansmuller, A., Chambon, P., and Losson, R. (1999) *EMBO J.* **18**, 6385-6395
20. Eidne, K. A., Kroeger, K. M., and Hanyaloglu, A. C. (2002) *Trends Endocrinol.Metab* **13**, 415-421
21. Boute, N., Jockers, R., and Issad, T. (2002) *Trends Pharmacol.Sci.* **23**, 351-354
22. Xu, Y., Piston, D. W., and Johnson, C. H. (1999) *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.* **96**, 151-156

23. Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilairat, S., Chelsky, D., Dennis, M., and Bouvier, M. (2000) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 3684-3689
24. Bouvier, M. (2001) *Nat.Rev.Neurosci.* **2**, 274-286
25. Witzgall, R., O'Leary, E., and Bonventre, J. V. (1994) *Anal.Biochem.* **223**, 291-298
26. Tanaka, M. and Herr, W. (1990) *Cell* **60**, 375-386
27. Grondin, B., Bazinet, M., and Aubry, M. (1996) *J.Biol.Chem.* **271**, 15458-15467
28. Cote, F., Boisvert, F. M., Grondin, B., Bazinet, M., Goodyer, C. G., Bazett-Jones, D. P., and Aubry, M. (2001) *DNA Cell Biol.* **20**, 159-173
29. Margolin, J. F., Friedman, J. R., Meyer, W. K., Vissing, H., Thiesen, H. J., and Rauscher, F. J. 3. (1994) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 4509-4513
30. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
31. Wolfe, C. L., Hopper, A. K., and Martin, N. C. (1996) *J.Biol.Chem.* **271**, 4679-4686
32. Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **90**, 8392-8396
33. Mercier, J. F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A., and Bouvier, M. (2002) *J.Biol.Chem.* **277**, 44925-44931
34. Gebelein, B. and Urrutia, R. (2001) *Mol.Cell Biol.* **21**, 928-939
35. Niman, H. L., Houghten, R. A., Walker, L. E., Reisfeld, R. A., Wilson, I. A., Hogle, J. M., and Lerner, R. A. (1983) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **80**, 4949-4953
36. Chang, C. J., Chen, Y. L., and Lee, S. C. (1998) *Mol.Cell Biol.* **18**, 5880-5887

37. Losson, R. (1997) *Biol. Chem.* **378**, 579-581
38. Grondin, B., Côté, F., Bazinet, M., Vincent, M., and Aubry, M. (1997) *J.Biol.Chem.* **272**, 27877-27885
39. Schultz, D. C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G. G., and Rauscher, F. J., III (2002) *Genes Dev.* **16**, 919-932

FIGURE LEGENDS

Figure 1

Oligomerization of two members of the TIF1 family, KAP-1 and TIF1 α .

A) KAP-1 and TIF1 α oligomerization assessed by BRET titration in living mammalian cells. Full length KAP1 and TIF1 α were used as fusion proteins with Rluc and GFP10 as schematised. 293T cells were transfected with a fixed amount of Rluc- KAP1 (1 μ g) and variable amounts of GFP10-KAP1 (0.05 to 3 μ g) (•) or negative control GFP10-NLS (0.1 to 3 μ g) (■). Transfections were also performed with a fixed amount of Rluc-TIF1 α (2 μ g) and variable amounts of GFP10-TIF1 α (0.1 to 25 μ g) (O) or GFP10-KAP1 (0,1 to 3 μ g) (Δ). The BRET ratio determined after adding coelenterazine *Deep Blue* is represented as a function of the GFP over Luciferase fusion expression (GFP/LUC), the luciferase donor and GFP10 acceptor expression levels being determined as described in *Experimental Procedures*. The BRET₅₀ and BRET_{max} are 0.40 ± 0.15 and 0.20 ± 0.02 for KAP-1 homophilic fusion pair, 0.32 ± 0.07 and 0.24 ± 0.01 for TIF1 α homophilic pair, and 0.74 ± 0.31 and 0.16 ± 0.03 for TIF1 α /KAP-1 pair, respectively. For each pairs, data of a minimum of 3 independent experiments were pooled.

B) Specificity of the BRET signal obtained with KAP-1 and TIF1 α . 293T cells were transfected either with Rluc-KAP1 (1 μ g) and GFP10-KAP1 (2 μ g) or Rluc-TIF1 α (1 μ g) and GFP10-TIF1 α (5 μ g) to obtain a BRET ratio close to the maximal as determined in (A). Competing amounts of HA-tagged-KAP1 expression vectors were also transfected as indicated; the expression of the HA-tagged protein was assessed by immunoblot (IB) as represented above the bar graph. No significant change in the relative expression level of Rluc and GFP fusions that could account for change in the BRET ratio was observed in the presence of competitor as evaluated by the GFP/LUC ratio indicated. The data shown are representative of three independent experiments.

C) KAP-1 oligomerization detected by co-immunoprecipitation. 293T cells were transfected with GFP10-KAP1 (2.5 μ g) and/or HA-KAP1 (2.5 μ g). Cell lysates and HA antibody immunoprecipitated proteins (IP) were analysed by immunoblotting with anti-HA- and anti-

GFP-specific antibodies. The fractions of the cell lysate (1/100) and of the immunoprecipitated proteins (1/10 or 9/10) used are indicated.

Figure 2

Interactions between ZNF74, KAP-1 and TIF1 α in living mammalian cells.

A) BRET titration curves. Full length KAP-1, TIF1 α and ZNF74- II (an isoform of ZNF74 with a functional repressive KRAB box) were used. 293T cells were transfected with a fixed amount of Rluc-ZNF74-II (1 μ g) and variable amounts of either GFP10-KAP1 (0.05 to 2 μ g) (■), GFP10-TIF1 α (0.5 to 15 μ g) (•) or negative control GFP10-NLS (0.05 to 1 μ g) (□; dotted line). The BRET ratio is represented as a function of the GFP over Luciferase fusion expression. For the ZNF74-II/KAP-1 pair, the BRET₅₀ and BRET_{max} are 0.48 ± 0.12 and 0.35 ± 0.03 , respectively. For each curve, results of at least three independent experiments were pooled.

B) Specificity of the interaction of ZNF74-II with KAP-1. 293T cells were transfected with Rluc-ZNF74-II (1 μ g)/GFP10-KAP1 (2 μ g) pair or Rluc-KAP1 (1 μ g)/GFP10-KAP1 (2 μ g) pair in the presence or absence of competitor. For competition, expression vectors for either HA-KAP1 or HA-ZNF74-II were used at indicated amounts. In addition to the BRET ratios, GFP/LUC ratios were measured to control that the change in BRET ratios did not result from alterations in the relative expression level of Rluc and GFP fusions. Immunoblot analysis further confirmed the equivalent expression levels of fusion proteins. For immunoblots (IB), HA-KAP or HA-ZNF74 competitor expression was detected with anti-HA, GFP10 fusion with anti-GFP and Rluc fusions either with anti-ZNF74 or anti-KAP1. **C) BRET signal induction by formation of ternary complexes involving ZNF74-II/ KAP-1/TIF1 α .** 293T cells were transfected with Rluc-TIF1 α (2 μ g) and GFP10-ZNF74-II (3 μ g) in the presence or absence of HA-KAP1. Immunoblots for HA-tagged KAP1 and GFP/LUC ratios are shown. For **B)** and **C)**, the data shown are representative of three independent experiments.

Figure 3

Differential interaction of KAP-1 with ZNF74 isoforms and mutants.

A) BRET titration curves in living mammalian cells. Full length isoforms of ZNF74 and ZNF74 mutants were used. *Rluc*-KAP1 (1 μ g) was transfected together with 0.1 to 3 μ g of GFP10-ZNF74-II (\blacktriangle), GFP10-ZNF74-II^{aa246-580} (\triangle), GFP10-ZNF74-I (\times) or GFP10-ZNF74-II^{DV-AA} (\square ; dotted line). GFP10-ZNF74-II^{aa246-580}, corresponding to the zinc finger domain of ZNF74 fused to GFP, was used as a negative control. The anti-GFP immunoblot of subcellular fractions shows that this GFP negative control is targeted to the insoluble nuclear matrix (NM) as GFP-ZNF74-II and is not detectable in the soluble part of the nucleus (Ns) or the cytoplasm (Cyt). The BRET ratio is represented as a function of the GFP over Luciferase fusion expression. For the KAP-1/ZNF74-II pair, the BRET₅₀ and BRET_{max} are 0.39 ± 0.16 and 0.31 ± 0.04 . For each curve, results of at least three independent experiments were pooled.

B) Expression of ZNF74 isoforms and mutants assessed by immunoblot. GFP fusions were detected with an anti-GFP antibody. The GFP/LUC ratios and the BRET ratios obtained for these samples are indicated. Arrowheads point to ZNF74 isoforms (105 kDa and 95 kDa) and mutants (105 kDa and 62 kDa) and position of the molecular weight markers in kDa are indicated.

C) In vitro pull-down assays. MBP and MBP-ZNF74 fusions immobilized on an amylose resin were incubated with HA-KAP1 transfected cell extracts. Complexes were separated by SDS gel electrophoresis and revealed with an anti-HA antibody.

FIGURE 1

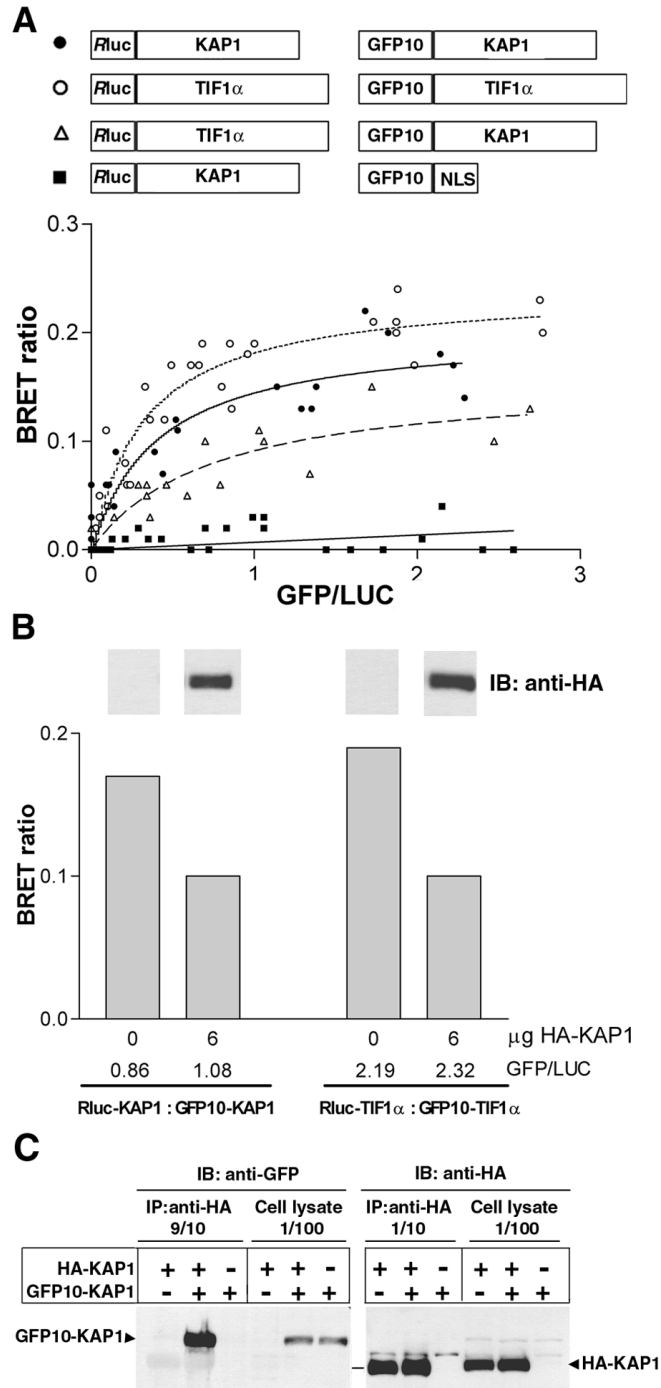


FIGURE 2

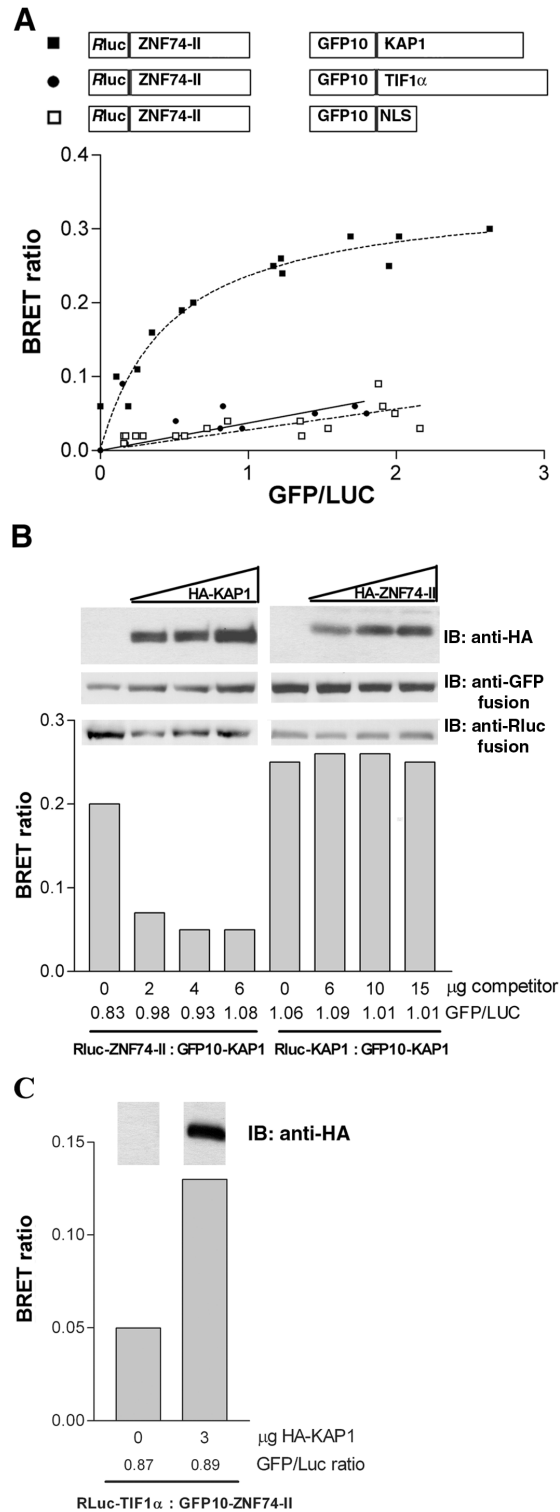
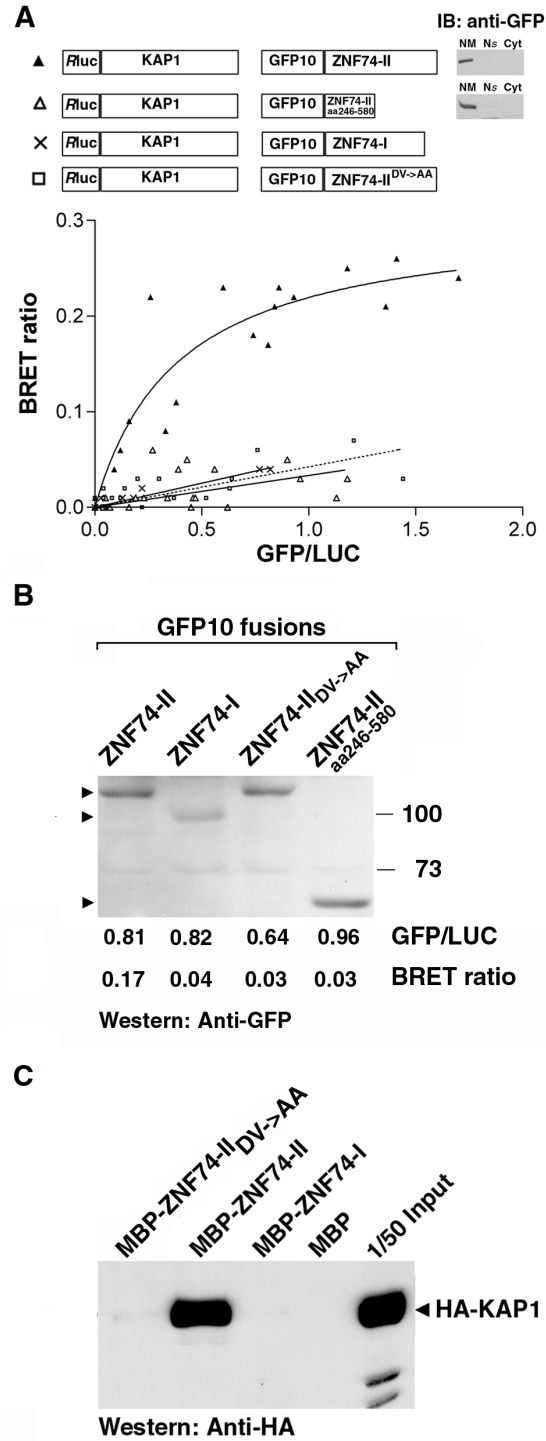


FIGURE 3



3. Article 2 (en préparation) - Préambule

Role of SUMO in RNF4-mediated PML degradation: PML sumoylation and phospho-switch control of its SUMO Binding Domain (SBD) dissected by BRET
Yann Percherancier*, Delphine Germain-Desprez*, Frédéric Galisson, Xavier Mascle, Laurent Dianoux, Patricia Estephan, Mounira Chelbi-Alix and Muriel Aubry
* equal contributors **En préparation.**

3.1. Mise en contexte

Cet article présente la mise au point, et l'utilisation, pour la première fois, du BRET, en tant qu'outil de détection d'interactions (covalentes et non-covalentes) entre SUMO et une protéine cible, ici PML.

Le fait que la sumoylation de PML puisse être modulée de façon spécifique par un agent pharmacologique connu (As_2O_3) nous a amené à utiliser cette protéine comme prototype pour la mise au point d'un essai de BRET^{SUMO}. De plus, étant donné qu'un domaine liant SUMO de façon non covalente a été identifiée récemment dans la séquence de PML (SBD : SUMO Binding Domain) (375), nous avons voulu déterminer s'il était possible de discriminer, avec cet essai, les contributions relatives de la sumoylation (interaction covalente de SUMO avec PML) et de l'interaction non covalente avec SUMO. En plus de fournir une validation de cette méthode cet article fournit des informations importantes relatives au rôle de SUMO dans la dégradation de PML induite par l' As_2O_3 et la E3 ubiquitine ligase RNF4.

3.2. Participation

Le second papier a été le résultat d'une collaboration entre notre laboratoire et le laboratoire du Dr. Mounira Chelbi-Alix (France). Le Dr. Yann Percherancier du laboratoire du Dr Chelbi-Alix et moi-même sommes les co-premiers auteurs de cet article en préparation et notre contribution est de 40 % chacun. Cet article propose de détecter la sumoylation et l'ubiquitination de PML par BRET à la fois par utilisation du BRET¹ et du BRET². Dans ce papier, je suis responsable de toutes les expériences de BRET² (détectant à la fois la sumoylation et l'ubiquitination), des résultats combinant le BRET^{1/2} pour étudier la dynamique sumoylation/ubiquitination de PML (présentés en annexe de cette thèse : chapitre 3.1 page 274), de l'idée d'étudier la sumoylation et l'ubiquitination du phosphomutant de PML (PML_{S560-565A}), de l'étude de l'ubiquitination / dégradation de ce phosphomutant. Une fois l'essai de BRET^{SUMO} mis au point pour le BRET¹ (Yann) et BRET² (moi), Yann a poursuivi l'étude de la sumoylation par BRET¹. De mon côté, ma partie consistait alors à détecter l'ubiquitination de PML par BRET et ultimement combiner BRET¹ et BRET² pour suivre ces deux modifications dans les mêmes cellules. Je pense pouvoir dire que ce travail de co-premiers auteurs a été des plus équilibré, dynamique, stimulant et intéressant. Alors que j'ai préparé et monté toutes les figures du papier en plus d'en écrire le premier jet afin de déposer ma thèse, Yann a réalisé toutes les expériences avec RNF4 pour finaliser le papier. En résumé notre participation peut être réellement et exactement évaluée à 40% - 40%.

Frédéric Galisson est un technicien dans le laboratoire de Mounira qui a notamment aidé Yann dans les expériences avec RNF4 et également lors d'expériences de purification sur l'ubiquitination.

Xavier Mascle, étudiant au doctorat au laboratoire, a initialement construit certains vecteurs, réalisé des western blots préparatoires et recueilli des échantillons au cours de mes expériences de BRET pour congélation et réalisation de futurs western blots au besoin.

Laurent Dianoux est chercheur au grade de chargé de recherche de première classe dans le laboratoire de Mounira. Il a aidé Yann pour les expériences d'immuno-fluorescences au début de l'étude ainsi que lors de grosses expériences et dans la réalisation de constructions.

Patricia Estephan, assistante de recherche, a réalisé des expériences de western blots en plus d'avoir réalisé quelques expériences de BRET au début et en fin de projet durant ma rédaction.

Les Drs Muriel Aubry et Mounira Chelbi-Alix en tant que directrices de laboratoires ont bien sûr supervisé ce projet du début à la fin, apporté leurs idées et contributions positives tout au long du projet par d'intéressantes et enrichissantes discussions et suggestions de développements lors de réunions en ligne grâce à Skype.

Au cours des derniers mois, Muriel et moi avons corrigé et amélioré notablement le premier jet en intégrant également les commentaires et corrections de Yann et Mounira. Cette version présentée sera soumise sous peu.

3.3. Accord des coauteurs

1. Identification de l'étudiant:

Delphine Germain-Desprez, DESD17527405

2. Nom de l'unité académique:

Programme de Biologie Moléculaire, Faculté des Études Supérieures

3. Nom du programme:

Ph.D. Biologie Moléculaire. 3-466-1-0

4. Identification de l'article:

Role of SUMO in RNF4-mediated PML degradation: PML sumoylation and phospho-switch control of its SUMO Binding Domain (SBD) dissected by BRET
Yann Percherancier*, Delphine Germain-Desprez*, Frédéric Galisson, Xavier Mascle, Laurent Dianoux, Patricia Estephan, Mounira Chelbi-Alix and Muriel Aubry
* equal contributors **En préparation.**

5. Déclaration des coauteurs :

A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Delphine Germain-Desprez inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre: Interactions protéiques et relation dynamique entre phosphorylation / sumoylation / ubiquitination des protéines TIF1 α , β et PML: détection *in vivo* par BRET.



3.4. Permission de l'éditeur de la revue

Article en préparation pour soumission.

4. Article 2

Role of SUMO in RNF4-mediated PML degradation: PML sumoylation and phospho-switch control of its SUMO Binding Domain (SBD) dissected by BRET

Yann Percherancier*¹, Delphine Germain-Desprez*²,
Frédéric Galisson¹, Xavier Mascle², Laurent Dianoux¹, Patricia Estephan²,
Mounira K Chelbi-Alix^{#1} and Muriel Aubry^{#2}

¹CNRS FRE2937, Institut André Lwoff, 7, rue Guy Moquet
94801 Villejuif Cedex, France

²Département de Biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville,
Montréal, Qc H3C 3J7, Canada

* Equal contributors

Authors to whom correspondance should be addressed:

Muriel Aubry, Ph.D.
Département de biochimie
Université de Montréal
C.P. 6128, Succ. Centre-Ville
Montréal, H3C 3J7
Canada
Phone: (514) 343-6322, Lab: (514) 343-6111 ext: 3747
Fax: (514) 343-2210
E-mail: muriel.aubry@umontreal.ca

Mounira Chelbi-Alix
CNRS FRE2937
Institut André Lwoff
7, rue Guy Moquet
94801, Villejuif Cedex
France
Phone: (33) 1 49583351
Fax: (33) 1 49583348
mchelbi@vjf.cnrs.fr

Running Title :

**Role of PML/SUMO interactions in RNF4-mediated PML degradation
and PML SBD phospho-switch dissected by BRET**

Key words : PML, NBs, SUMO, BRET, RNF4

ABSTRACT

PML is a tumor suppressor acting as organizer of subnuclear structures called PML-nuclear bodies (PML-NBs). Both covalent modification of PML by the Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) and non covalent binding of SUMO to PML SUMO Binding Domain (SBD) are necessary to PML-NB formation. Here, we established a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assay to monitor PML/SUMO1 interactions in living cells. We showed that both covalent and non-covalent PML/SUMO interactions can be quantitatively dissected and dynamically followed upon addition of As_2O_3 (a therapeutic agent inducing PML sumoylation and subsequent proteasome-dependent degradation by the SUMO-specific E3 ubiquitin ligase RNF4). Owing to a mutant disrupting PML SBD core (VVVI), we found that the non-covalent interactions of SUMO1-modified proteins with PML SBD are dispensable for basal and As_2O_3 -induced PML sumoylation but critical for As_2O_3 -mediated degradation. Most of the PML SBD core-dependent interactions were lost by mutating a stretch of serines, located within the SBD and acting as CK2 phosphorylation target sites. Since a phosphomimetic mutant restored PML SBD interactions, this establishes the existence of a phospho-regulation of PML SBD ('SBD phospho-switch'). Interestingly, both PML and its serine mutant exhibited a similar PML-NB subcellular localization and sensitivity to As_2O_3 and/or RNF4 degradation that differed from PML SDB core mutant (more diffuse and resistant to degradation). This was not due to a different RNF4 binding since basal and As_2O_3 -reinforced interaction of RNF4 with PML or its two mutants were comparable as shown by BRET. Thus, we suggest that PML localisation to PML-NBs and possibly the binding of sumoylated PML to PML SBD are critical for efficient As_2O_3 and/or RNF4-mediated degradation through a pathway differing from CK2-mediated degradation. Finally, the development of this sensitive SUMO BRET assay paves the way toward high-throughput screening for new therapeutic agents modulating sumoylation.

INTRODUCTION

ProMyelocytic Leukaemia protein (PML) is a tumor suppressor (12, 54) which gene was initially identified as translocated in cases of acute promyelocytic leukemia (APL) (13). Also known as TRIM19, PML belongs to a family of proteins defined by the presence of the RBCC/TRIM (TRI-partite Motif) motif including a C3HC4 zinc finger (RING finger), B boxes and a coiled-coiled region. This N-terminal motif is found in all the isoforms of PML (PMLI-VII) (30) that only differ in their C-terminal region. The RBCC/TRIM motif mediates homo/hetero PML-protein interactions and is required for the localization of PML to nuclear and matrix-associated structures, known as Nuclear Bodies (NBs) (8, 30, 38).

PML functions as the organizer of PML-NBs which are dynamic structures harboring numerous transiently and permanently localized proteins (46). The mammalian cell nucleus contains 10 to 30 PML-NBs, from 0,2 to 1 μm of diameter. PML-NBs increase in size and number in response to interferon (11) and are reorganized upon diverse stimuli such as viral infections, oxidative stress and arsenic trioxide (As_2O_3) exposure as well as during cell cycle progression (17, 37, 52, 57). The importance of the structural integrity of PML-NBs for cell growth was first identified in APL since, in this malignancy, the abnormal fusion protein PML/RAR α leads to the disruption of these structures. Patient treatment with As_2O_3 induces the reversion of the APL phenotype as well as PML/RAR α degradation and PML-NB reformation (72, 73). PML and PML-NBs are implicated in different cellular process such as apoptosis (28, 66), senescence (19), cell proliferation (1, 43), antiviral response (16, 17, 52), transcriptional regulation (39, 64, 71), DNA repair (14) and protein degradation (4, 7, 37, 48).

PML is a target for the post-translational modification by SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier), an ubiquitin-like protein of 11 kDa which is covalently coupled to its lysine 65, 160 and 490 via a process called sumoylation (33). To date, four SUMO paralogs have been identified that are SUMO1, 2, 3 and 4 (5, 9, 53, 58, 61) but only SUMO 1, 2 and 3 can

be conjugated to target proteins (47). The conjugation step first requires the maturation by cleavage of SUMO precursor exposing its C-terminal diglycine motif. It then involves an enzymatic cascade for the transfer of the mature SUMO and the formation of an isopeptide bond between the COOH group of SUMO C-terminal glycine and the ϵ -NH₂ group of a lysine from the target protein (25). This includes an E1 activating complex (SAE1/SAE2 heterodimer), the conjugating enzyme UBC9 (E2) and an E3 SUMO ligase. The sumoylation is a reversible process due to the existence of several deconjugating enzymes referred to as members of the SENP (senp1-5) family (25).

PML sumoylation is essential to PML-NB integrity (20, 29, 70). Noticeably, As₂O₃ or poliovirus, the only agents known to enhance PML sumoylation *in vivo*, lead to an increase in the size of PML-NBs (26, 37, 45, 48). Besides PML, several proteins belonging to the SUMO machinery such as SUMO, the universal E2 SUMO conjugating enzyme UBC9, some SUMO E3 ligases such as PIAS family members and a SUMO-isopeptidase SENP2 (also called SuPr-1) are among the growing number of PML-NBs-associated proteins (28, 46). Finally, it was recently suggested that both covalent linkage (sumoylation) and non-covalent interaction of SUMO with PML regulates PML-NBs based on the identification of a SUMO Binding Domain (SBD) within PML essential for PML-NB formation (56). Interestingly, PML SBD contains some serines which are targeted by CK2 kinase and are implicated in PML ubiquitination and degradation (55). The phosphorylation status of these serines could thus regulate the function of the SBD as recently proposed (35).

Because the sumoylation of proteins is a dynamic and reversible process, the analysis of this post-translational modification has been difficult to follow *in vivo* and mainly relies on the identification of sumoylated protein species by Western blots following cell lysis. Recently, our group used Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) to detect another post-translational modification, ubiquitination, in living mammalian cells and in real time (50). This proved that BRET detects non covalent interactions as initially shown for membrane (2) or nuclear proteins (21) but also covalent

interactions. In brief, BRET allows us to monitor and quantify the interaction between a protein fused to a luciferase and a protein fused to either YFP (B.R.E.T.¹) or GFP (B.R.E.T.²) upon addition of a luciferase substrate. BRET is a proximity-based assay which required that the donor of energy (luciferase-fusion) and the acceptor YFP- or GFP-fusions) are within 50 to 100 Å for an efficient energy transfer (65). Based on this described characteristics, BRET may thus provide a method of choice to follow the sumoylation of proteins in living cells.

Here, we developed a sensitive and quantitative SUMO BRET assay for the detection of PML interactions with SUMO in living cells. For this purpose, we used PMLIII, one of the most studied isoform of PML. It is known that the As₂O₃-induced PMLIII sumoylation triggers a proteasome-dependent PMLIII degradation by a process requiring covalent modification of PML by SUMO (37) and then SUMO ubiquitination by the poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase RNF4 (36, 60). Using the SUMO BRET assay, we studied covalent and non-covalent PML/SUMO interactions as well as the enhancement of PML sumoylation by As₂O₃ in relation with its degradation. Altogether our results indicate that, like PML-NB formation, As₂O₃ and/or RNF4-mediated PML degradation are dependent on the integrity of both PML sumoylation target sites and PML SBD core sequence and not on the CK2 serine phosphorylation sites within the SBD which, in contrast, were previously described as involved in PML CK2 degradation pathway (55). Furthermore, we report that the phosphorylation of these serines is required for most PML SBD-dependent non covalent interactions establishing the phospho-regulation of PML SBD ('SBD phospho-switch') and another link between the phosphorylation and SUMO, different from the phospho-sumoyl switch (67).

MATERIEL AND METHODS

Constructs and Expression vectors

The sequence of all cDNA constructs was confirmed by DNA sequencing.

BRET constructs- YFP-SUMO1, YFP-SUMO1G, YFP-SUMO2 and YFP-SUMO3 (all cloned in pEYFP (C1), BD Biosciences Clontech) are kind gift of Dr Dasso M. (N.I.H., Bethesda, U.S.A.) (3). GFP-SUMO1, and GFP-UBI were previously described respectively in (40) and (50). The myc-tagged SUMO1 construct used was subcloned as an XhoI fragment in the XhoI site of a Myc tagged version of pcDNA3.1 vector. UBC9 (Accession Number: U45328) was cloned in the SacI/KpnI site of pGFP10 C3 (Perkin Elmer Life Sciences). The NLS used for Luc-NLS construct was already described (21) and Luc-NLS was generated by inserting the NLS sequence within the ApaI/BamHI site of pHRLuc-C3 (Perkin Elmer Life Sciences).

To generate the other *Renilla* Luciferase (Luc) and Yellow Fluorescent protein (YFP) BRET constructs, Luc or YFP were cloned together with the cDNA of interest by a three-piece-ligation in the BamHI/XhoI or BamHI/XbaI site of pcDNA3.1(+) (Invitrogen). Luc was amplified by PCR from pcDNA3-CXCR4-Luc vector (49) and cloned either at the C-terminal of the cDNA of interest as an EcoRI-XhoI fragment (primers used: “Luc_EcoRI_ATG_C-term sens” and “Luc_STOP_XhoI_C-term antisens” primers) or at the N-terminal as a BamHI-EcoRI fragment (primers used: “Luc_BamHI_ATG_N-term sens” and “Luc_noSTOP_EcoRI_N-term antisens”). YFP was amplified by PCR from pcDNA3-CXCR4-YFP (49), digested with EcoRI and XhoI, and cloned at the C-terminal of the cDNA of interest (primers used: “YFP_EcoRI_ATG_C-term sens” and “YFP_STOP_XhoI_C-term antisens”). The cDNA of interest was amplified by PCR for cloning in phase either at the N-terminal of the fusion clone as a BamHI-EcoRI fragment or at the C-terminal as an EcoRI-XhoI or EcoRI-XbaI fragment. In each case, the sequence

joining the cDNA of interest and either Luc or YFP sequence encodes VPVNSGGGGS as a linker.

PML mutants- PML III point mutations were generated using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) starting with PML III (PML_{WT}) cDNA (accession number: S50913) cloned in pBluescript SK⁺ and the appropriate oligonucleotides (see list of primers: only sense oligonucleotides are described). PML_{3KR} was obtained by mutating sequentially K65, K160 and K490 to R residues to generate PML_{K65R}, PML_{K65,160R} and PML_{K65,160,490R} (PML_{3KR}). Then, PML_{3KR}, PML_{3KR-SBD} and PML_{3KR-S560-565A} mutants were obtained using PML_{3KR} as a matrix by mutating either the four hydrophobic residues from the SBD (VVVI) (56) or the four serines serving as target for CK2 kinase which are within the sequence encompassing amino acid 560 to 565 (55).

PML_{ACC} was constructed by replacing a 411 bp fragment coding for PML III coiled-coiled domain (nucleotides 669 to 1069 of PML III coding sequence) by a short unrelated 18 bp sequence which includes a NotI site. The PML_{ACC} sequence was generated by PCR amplification of 5'- and 3'-overlapping fragments which both include the NotI site from the 18 bp sequence; the 5'-PCR fragment includes the initiator ATG of PML III and an upstream BamHI cloning site and the 3'-PCR fragment includes PML III stop codon and a downstream XhoI cloning site. The 5'- and 3'-PCR fragments (BamHI-NotI and NotI-XhoI fragments, respectively) were ligated together in a three-piece-ligation reaction in the BamHI/XhoI site of pcDNA3.1(+) (primers used: "PML_BamHI_ATG sense" and "PML_ACC1_NotI antisense" for the 5'-fragment and "PML_ACC2_NotI sense" and "PML_STOP_XhoI antisense" for the 3'-fragment).

PML expression constructs- PML_{WT} and mutants were amplified by PCR from pBluescript SK⁺ for subcloning in appropriate vectors. To generate untagged expression constructs, PML PCR fragments digested with BamHI and XhoI were cloned into the BamHI/XhoI site of either pcDNA3.1 (+) for transient expression or HIV-1-based lentiviral

pTRIP vector for stable expression (a gift from Dr. P. Charneau, Groupe de Virologie moléculaire et de Vectorologie, Institut Pasteur, Paris) (primers used: “PML_BamHI_ATG sens” and “PML_STOP_XhoI antisense”). To generate Luc and YFP BRET constructs, PML PCR fragments digested with BamHI and EcoRI were cloned N-terminal to Luc or YFP in the BamHI/XhoI site of pcDNA3.1 (+) as part of a tree-piece-ligation (primers used: “PML_BamHI_ATG sens” and “PML_NoSTOP_EcoRI_Nterm” antisens).

RNF4 constructs- pFLAG-RNF4 is a kind gift from F.J. Kaiser and B. Horsthemke (32). To generate Luc-RNF4 BRET construct, RNF4 was PCR amplified from pFLAG-RNF4 and cloned in phase, as an EcoRI-XbaI fragment, C-terminal to Luc in the BamHI/XbaI site of pcDNA3.1 owing to a tree-piece-ligation (primers used: “RNF4_EcoRI_ATG_C-term sens” and a “RNF4-STOP_XbaI antisens”).

Primers

Luc and YFP primers-

Luc_EcoRI_ATG_C-term sens:

5'CCGGTGAATTCTGGTGGAGGCGGATCTATGACCAGCAAGGTGTACGACCCCG
3';

Luc_STOP_XhoI_C-term antisens:

5'TCTAGACTCGAGCGGCCGCAATTCTTACTGCTCGTTCTTCAGCACTCTCTCCA
CG3';

Luc_BamHI_ATG_N-term sens:

5'CTGTGCTAGCGGATCCATAATGACCAGCAAGGTGTACGACCCCGAGC-3';

Luc_noSTOP_EcoR1_N-term antisens:

5'TCCACCAGAATTCACCGGTACCTGCTCGTTCTTCAGCACTCTCTCCACG3';

YFP_EcoRI_ATG_C-term sens:

5'ACCGGTGAATTCTGGTGGAGGCGGATCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT
G3';

YFP_STOP_XhoI_C-term antisens:

5'CTCTAGACTCGAGCGGCCGCTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG3';

PML and RNF4 primers-

PML_{K65R} (silent BssHII): 5'GCCAGGCGGAAGCGCGCTGCCCGAAGCTGCTGC3';

PML_{K160R} (silent AflII):

5'CACCAGTGGTTCTTAAGACACGAGGCCCGGCC3';

PML_{K490R} (silent PsiI):

5'GCCCCAGGAAGGTTATAAGAATGGAGTCTGAGGAGGGG3';

PML_{SBD}(silent NotI):

5'GCAGAGGAACGCGCGGCCGCGAGCAGCAGCTCGG3';

PML_{S560-565A} (silent NotI):

5'CGCGTTGTGGTGATCGCGGCCGCGGAAGACGCAGATGCCGAAAACCTCGG3';

PML_{S560-565D} (silent ClaI):

5'CGCGTTGTGGTGATCGATGACGACGAAGACGATGATGCCGAAAACCTCG3';

PML_{C57,60AA} (silent BssHII):

5'GAGTTCCAGTTTCTGCGCGCCCAGCAAGCCCAGGCGGAAGCC3';

PML_BamHI_ATG sens:

5'TGTCTAAGCTTGCTAGCGGATCCACACCATGGAGCCTGCACCCGCCCGATCTC
CG3'

PML_ΔCC1_NotI antisens :

5'TGCTTGGCGGCCGCATATACTGTGGCTGCTGTCAAGGAGCGCGCACG3';

PML_ΔCC2_NotI sens :

5'ATATGCGGCCGCCAAGCACAGGAGGAGCCCCAGAGCCTGCAAGC3';

PML_STOP_XhoI antisens :

5'ATCCGCCTCGAGCAGAATCAGCGGGCTGGTGGGGAGGCCAAGC3';

PML_NoSTOP_EcoRI_N-term antisens:

5'CACCAGAATTCACCGGTACGCGGGCTGGTGGGGAGGCCAAGC3';

RNF4_EcoRI_ATG_C-term sens:

5'ATACGTACCGGTGAATTCTGGTGGAGGCCGGATCTATGAGTACAAGAAAGCGT
CGTGGTGG-3';

RNF4_STOP_XbaI antisens:

5'ATCCGCCTCGAGGCTAGCGTCGACTCATATATAAATGGGGTGGTACCGTTTGT
GG3'

Antibodies

The following antibodies were used: mouse monoclonal anti-PML (clone PGM3) (used for immunofluorescence microscopy), rabbit polyclonal anti-PML (clone H-238) (used for the Western), goat polyclonal anti-RNF4 (clone C-15), rabbit polyclonal anti-actin (clone C-11), all from Santa-Cruz Biotechnology and mouse monoclonal anti-FLAG (clone M2) from Sigma.

Arsenic and Epoxomycin treatments

As₂O₃ (Sigma-Aldrich # A1010, solution stock 330 mM resuspended in 1 N NaOH) and Epoxomycin (Sigma-Aldrich # E3652, solution stock 100 μM resuspended in DMSO) were used at the concentrations and for the time indicated in the text.

Stable transduction, transient transfection and cell culture

Stable transduction - A stable expression of PML constructs was obtained by a lentiviral-based strategy as described (68). The efficiency of the HIV-1 based lentiviral pTRIP vector, in which PML constructs are subcloned, relies on the presence of a triple-stranded DNA structure that acts as a cis-determinant of HIV-1 DNA import. The stable integration of the transgenes into the host DNA allows efficient and long term transgene expression without clone selection. Virus stock production and infection were as described in (68) to transduce and express PML variants (WT, 3KR, C57/60A, SBD, S560-565A,

3KR-SBD and 3KR-S560-565A) in the HEK293T cell line. Briefly, virus particles were produced after transient co-transfection of HEK293T cells, with the p8.91 encapsidation plasmid, the pHCMV-G vector encoding the vesicular stomatitis virus envelope and the pTRIP vector encoding PML_{WT} and its mutants, using a standard calcium phosphate method.

BRET¹ transient transfections- HEK293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with GLUTAmax (Gibco), 10 % fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin and streptomycin, 1 mM Sodium Pyruvate (all from Gibco BRL). Cells were seeded at a density of 5×10^5 cells per well in 6-well dishes, 24 h before transfection. Transient transfections were performed using PEI (Polyethylenimine, linear, MW: 25,000; cat. No.23966 Polysciences, Inc., Warrington, PA) in Optimem medium (Gibco BRL). PEI powder was dissolved in water to a concentration of 1 mg/ml in water which has been heated to 80 °C. Usually, 0,1 µg of PML-Luc construct was transfected alone or with increasing quantities of YFP-tagged SUMO1. The amount of transfected DNA was completed to a total of 2 µg with pcDNA3.1(+) empty vector. PEI (10 µg in 100 µl of Optimem medium) was added on the DNA and the samples were incubated for 20 min at room temperature. The PEI-DNA suspension was then added to the attached cells in 2 ml of fresh culture media. Following an overnight incubation, the transfection medium was replaced with fresh Dulbecco's modified Eagle's medium for three hours to allow cell recovery. Transfected cells (8×10^4) were then detached and replated in 96-wells white plates with clear bottom (Costar) pre-treated with D-polylysine (Sigma) and left in culture for 24 h before being processed for BRET¹ assay. When required, the plated cells were treated with As₂O₃ for the appropriate time within this 24 h.

BRET² transient transfections- HEK293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 1 mM L-glutamine, 10% fetal bovine serum (Wisent) and 100 µg/ml penicillin and streptomycin. Cells were seeded at a density of 1×10^6 cells per 100-mm dish, 24 h before transfection. Transient transfections of plasmids

were performed using the calcium phosphate precipitation method. Usually, 1 μg of PML-Luc construct was transfected alone or with increasing quantities of GFP-tagged SUMO1. The amount of transfected DNA was completed to a total of 10 μg with pGEM empty vector as already described in (21). The transfection medium was replaced with the supplemented Dulbecco's modified Eagle's medium after 26 h and cells were left in culture for an additional 22 h before being processed for BRET² assay. When required, the As₂O₃ treatment was done on the cells in suspension (see BRET² detection assay).

BRET detection assays

BRET¹ assay- BRET¹ measurement was done on attached cells as previously described (49). Before measurement, culture media was replaced by PBS. Coelenterazine H (Nanolight Technology) was then added to a final concentration of 5 μM in PBS. Readings were then collected using a multi-detector plate reader MITHRAS LB940 (Berthold) allowing the sequential integration of the signals detected in the 480 \pm 20 nm and 530 \pm 20 nm windows, for Luciferase and YFP light emissions, respectively. The BRET¹ signal is determined by calculating the ratio of the light intensity emitted by the YFP fusion over the light intensity emitted by the Luc fusion. The values were corrected by subtracting the background BRET¹ signal detected when the Luc fusion construct was expressed alone.

For BRET¹ titration experiments, BRET¹ ratios were expressed as a function of the [acceptor]/[donor] expression ratio (YFP/Luc). Total fluorescence and luminescence were used as a relative measure of total expression of the acceptor and donor proteins, respectively. Total fluorescence was determined with MITHRAS using an excitation filter at 485 nm and an emission filter at 535 nm. Total luminescence was measured in the MITHRAS, 10 min after the addition of coelenterazine H and the reading was taken in the absence of emission filter.

BRET² assay- The BRET² assays were conducted on cells in suspension as we previously described in (21). In brief, transiently transfected cells were resuspended in PBS. Cells were then distributed in 96-well microplates (white Optiplate from Packard) (20

μg corresponding to $\sim 1\text{-}2 \times 10^5$ cells). When required, cells were treated with $10 \mu\text{M As}_2\text{O}_3$ or vehicle for the appropriate time at 37°C . For the BRET² assay, upon addition of the cell permeant luciferase substrate (coelenterazine Deep Blue, PerkinElmer Life Sciences), the bioluminescence signal resulting from the degradation of the substrate was detected using a 370–450 nm band pass filter (donor emission peak 400 nm). The transferred energy resulted in a fluorescence signal emitted by the GFP acceptor (excitation peak 400 nm and emission peak 510 nm) that was detected using a 500–530 nm band pass filter. The BRET² signal was quantified by calculating the acceptor fluorescence /donor bioluminescence ratio as previously reported. Expression level of each construct was determined by direct measurements of total fluorescence and luminescence on aliquots of transfected cell samples. The GFP total fluorescence was measured using a FluoroCount (PerkinElmer Life Sciences) with an excitation filter at 400 nm and an emission filter at 510 nm. The total luminescence was measured using the same cells incubated with coelenterazine H for 10 min (Molecular Probes) (emission peak 485 nm). The BRET² was plotted as a function of the GFP/Luc fusion protein expression ratio, both fusion proteins expression being assessed with the same cells as described above, to take into account the potential variations in the expression of individual constructs from transfection to transfection. The values were corrected by subtracting the background BRET² signal detected when the Luc fusion construct was expressed alone.

All the BRET¹ and BRET² results presented are derived from two to ten independent experiments done in duplicate.

Confocal microscopy

For confocal microscopy, 3×10^5 HEK293T cells were seeded 24 h after their transfection onto glass cover slips pre-treated with poly-D-lysine (Sigma Chemical, Co) placed within 6-well plates. Cells were then washed three times in PBS 24 h later and fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. Following several washes, cells

were permeabilised with blocking buffer (PBS containing 0.3% Triton X-100 and 2% BSA (w/v)). Monoclonal anti-PML (1/250) and anti-RNF4 (1/100) were then added for 2 h in blocking buffer. Cells were washed twice and incubated for 1 h with the appropriate Alexa-Fluor 488- or 594-conjugated secondary antibody (1/500 dilution, Molecular Probe, Inc). Coverslips were mounted using vectashield (Vector laboratory). Confocal images were obtained on a Leica TCS-NT/SP inverted confocal laser-scanning microscope using an Aplanachromat x 63/1.32 oil-immersion objective. Co-localization was performed by overlay of the images using the Leica Confocal Software LCS (Heidelberg, Germany). Excitation and emission filters for the different labelled dyes were as follows: YFP (green): $\lambda_{ex}=488$ nm, $\lambda_{em}=540/25$ nm; Texas red (red): $\lambda_{ex}=568$ nm, $\lambda_{em}=610/30$ nm.

Western blot analysis

For total cell extracts, cells were washed in cold PBS, lysed in hot Laemmli buffer, and boiled for 10 min. Proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes (Optitran BA-S 83 NC, Schleicher and Schuell). The membranes were blocked in 5% gelatine from cold water fish (Sigma) for 2 h and then incubated overnight at 4°C with the first antibody (H-238 anti-PML, anti-FLAG or anti-Actin). Following washes, the membranes were incubated for 1 h with the appropriate Alexa Fluor 680-coupled secondary antibody (Molecular probe) that was then revealed by an Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

RESULTS AND DISCUSSION

PML / SUMO1 interactions are detected by BRET

In order to better understand the role of SUMO in PML function and its involvement in the dynamic of PML-NB formation, we here developed a BRET assay for the detection of PML interactions with SUMO in living cells. For this purpose, PMLIII, one of the most studied PML isoform, was tagged at its carboxy-terminus with *Renilla reniformis* luciferase (PML_{WT}-Luc) whereas SUMO1 was tagged at his amino-terminus with *Aequorea victoria* YFP or its GFP green variant. We conducted a classic BRET titration assay (2, 21) by co-transfecting HEK293T cells with a constant amount of PML_{WT}-Luc and increasing amounts of either YFP-SUMO1 (BRET¹, Fig. 1A) or GFP-SUMO1 (BRET², Fig. 1B). We tested both types of fluorescent protein acceptors since differences in the sensitivity of the two versions of the BRET assay, BRET¹ and BRET², were previously described (24). In each case, the occurrence of BRET was determined by measuring the ratio of the light emitted by the acceptor (YFP or GFP) and the luciferase donor upon addition of a membrane permeable luciferase substrate coelenterazine. This BRET ratio was plotted as a function of the YFP/Luc or GFP/Luc fusion proteins expression to take into account the potential variations in the expression of individual constructs.

As shown in Fig. 1A or B, a strong BRET signal occurred between PML_{WT}-Luc / YFP-SUMO1 or PML_{WT}-Luc / GFP-SUMO1 BRET pairs and increased as a hyperbolic function. Observation of such a saturation curve (42) is characteristic of a specific interaction between PML and SUMO. To ascertain this specificity, negative controls were used. They included: i) a donor construct targeting Luc to the nucleus by fusion to a nuclear localization signal (Luc-NLS, Fig. 1B) and ii) a RING finger PML mutant (PML_{C57,60A}-Luc, Fig. 1A) that has altered SUMO binding properties (56) (Fig. 5C) and is unable to interact with the only known SUMO E2 ligase UBC9 (15). As expected, they exhibited a linear non-specific BRET signal resulting from random collision (“bystander” BRET (21, 42)). For a validation of our fusion constructs, we confirmed that they have the expected PML

homodimerisation and UBC9 interaction properties characteristics of the un-tagged proteins (15, 56) (Fig. S1, A and B).

Altogether, these results validate the use of BRET to detect PML / SUMO1 interaction.

Both covalent and non covalent PML/SUMO1 interactions are detected by BRET

Since BRET is a proximity based assay, we suggest that the BRET signal observed with the PML_{WT} / SUMO1 pair results not only from the covalent (sumoylation) but also from the non-covalent interaction between PML and SUMO. While the covalent modification of PML by SUMO on three lysines 65, 160 and 490 has been clearly established (33), the non-covalent interaction of PML with SUMO was only recently reported based on the identification of a SUMO binding-domain (SBD, Fig. 4A) on PML (56). In an attempt to evaluate the contribution of the covalent linkage of SUMO to PML_{WT}-Luc relative to its non-covalent interactions with SUMO, we compared the BRET titration curve obtained with PML_{WT}-Luc with that of its sumoylation-less mutant (33), PML_{3KR}-Luc (where the three known SUMO target lysines are mutated to arginine), in pairs with YFP- or GFP-SUMO1 (Fig. 2A and 2B); it was initially verified that the luciferase fusions of PML_{WT} and PML_{3KR} have the same nuclear localization profile as their untagged versions (Fig. S1C). Since the covalent-linkage of SUMO is abrogated within the PML_{3KR} mutant (model in Fig. 4B), the difference in the BRET signal between the PML_{WT} and PML_{3KR} saturation curves depends on "PML-Luc sumoylation" as annotated in Fig. 2A. Furthermore, the PML_{3KR} saturation curve mainly revealed the contribution of "non covalent interactions" to the BRET signal (Fig. 2A). Thus, it appears that non covalent interactions represent a major part of the BRET signal in BRET¹ (Fig. 2A) and BRET² (Fig. 2B) assays. Strikingly, a linear and low non-specific BRET signal was obtained with PML_{WT}-Luc and YFP-SUMO1G, a SUMO construct with a single glycine residue at its C-terminus that is unable to be covalently conjugated to proteins (3, 31) (Fig. 2A and 1A).

Interestingly, this shows that in its free form, SUMO1 does not non-covalently interact *in vivo* with PML. Thus, the non covalent PML/SUMO1 interactions detected in our BRET assay involve SUMO1-modified proteins recruited by PML-Luc as illustrated in Fig. 4B.

As previously reported, PML sumoylation is enhanced by As₂O₃ (45, 73, 74), a chemotherapeutic agent known to induce remission of APL patients (69). In Fig. S1D, a confirmation of the enhanced sumoylation of PML in the presence of As₂O₃ was obtained by Western blot using stably transfected PML_{WT}-Luc and its sumoylation deficient mutant PML_{3KR}-Luc, as a negative control. To further establish the capacity of our BRET assay to detect variations in the sumoylation status of PML in living cells, we tested PML_{WT}-Luc or PML_{3KR}-Luc / YFP(or GFP)-SUMO1 pairs in the presence of As₂O₃. Clearly, a significant increase in the BRET signal was obtained with PML_{WT} upon As₂O₃ treatment as seen in titration (Fig. 2A and B), time course (Fig. 2C) and dose response (Fig. 2D) experiments. In contrast, no or very limited change in the BRET signal was observed with PML_{3KR} as revealed by the saturation curves (Fig. 2A and 2B) and confirmed by the dose-response curve (Fig. 2D). Consequently, the As₂O₃-enhanced PML_{WT}-Luc BRET signal was concluded to be dependent on PML sumoylation (annotated "As₂O₃-induced PML-Luc sumoylation" in Fig. 2A). To evaluate the relative contribution of the three PML sumoylation target lysines, we compared the As₂O₃-induced sumoylation of each single PML K→R mutant. While K490R and K65R single mutants exhibit a partially reduced As₂O₃-induced sumoylation compared to PML_{WT}, mutation of K160 alone was sufficient to prevent the As₂O₃-induced sumoylation of PML to the same extent as the triple 3KR mutant (Fig. 2E). Thus, we can conclude that K160 is a prerequisite for SUMO1 As₂O₃-induced PML sumoylation. These results are in agreement with previous Western blot data (37). Additional experiments revealed that As₂O₃ exhibits a similar potency to induce PML sumoylation with SUMO1 (Log EC₅₀ = -6,430 +/- 0,181 M), SUMO2 (Log EC₅₀ = -6,618 +/- 0,203 M) or SUMO3 (Log EC₅₀ = -6,626 +/- 0,272 M) as shown by comparing the EC₅₀ in dose response curves (Fig. 6A). Thus, both BRET¹ (Fig. 2A, C-E) and BRET² (Fig. 2B-C) assay conditions, which differ as described in *Material and Methods* (amount of DNA

transfected, luciferase substrate and number of cells used, attached cells vs cells in suspension, dose, timing and medium for As₂O₃ treatment), allowed us to evaluate changes in PML sumoylation in living cells.

Altogether, these results validate the use of BRET as a new tool to follow kinetics of protein sumoylation in living cells in the presence of pharmacological agents. BRET also emerged as the only available quantitative method that differentiates SUMO covalent-linkage from SUMO non-covalent interactions, as illustrated here with PML. Furthermore, in contrast with data obtained *in vitro* (56), we show that the non-covalent PML / SUMO1 interaction occurring in intact living cells involves SUMO1-modified proteins but not free SUMO1.

PML SUMO Binding Domain (SBD) is not required for As₂O₃-induced PML sumoylation.

A recent study demonstrated that PML SBD is involved in the non-covalent recruitment of sumoylated proteins, among them PML itself, as demonstrated by co-immunoprecipitation studies (56). To evaluate the contribution of PML SBD in the non-covalent PML / SUMO1 interactions detected by BRET, we compared the BRET¹ signal of PML_{WT} with that of PML_{SBD} that is mutated on its SBD core (hydrophobic amino acids in red in Fig. 4A) (56). As seen in Fig. 3A, a significant decrease in the BRET signal was obtained with PML_{SBD} relative to PML_{WT} indicating that non-covalent PML / SUMO1 interactions are largely dependent on PML SBD. Upon As₂O₃ treatment, the increase in the BRET signal was however similar with both PML_{WT} and PML_{SBD} as shown by the saturation and dose response curves (Fig. 3A-B). This is demonstrating that the SBD-dependent non-covalent PML/SUMO interactions are not required for As₂O₃-induced PML sumoylation. The three possible components of the SBD-dependent non-covalent interactions detectable by BRET are illustrated in Fig. 4C (signal components #2 to 4). The non-covalent interactions occurring with the SBD of the PML_{WT}-Luc energy donor could include not only the non-covalent recruitment of YFP-SUMO1-modified form of PML_{WT}-

Luc itself (Fig. 4C, #2) but also of YFP-SUMO1-modified endogenous proteins (Fig. 4C, #3-4), including endogenous PML and other endogenous proteins named X. The contribution of sumoylated endogenous proteins to the non-covalent BRET signal can be estimated using the PML_{3KR}-Luc fusion (Fig. 2A) which is able to interact with endogenous sumoylated proteins via its intact SBD (components #3-4 in Fig. 4C) but cannot recruit itself in an SBD-dependent manner since it is not sumoylated (component #2 in Fig. 4C). Interestingly, As₂O₃ induces a slight increase in PML_{3KR}-Luc BRET signal (Fig. 2A, BRET¹ assay) likely resulting from the enhanced sumoylation of endogenous PML by YFP-SUMO1 (As₂O₃-inducible component #3 in Fig. 4C). In contrast, the BRET signal observed with PML_{3KR}-Luc is not increased by As₂O₃ in the BRET² assay (Fig. 2B), consistent with the fact that the sensitivity of the BRET² requires a much higher level of expression of the donor luciferase fusion than the BRET¹ assay (24) rendering the contribution of the YFP-SUMO1-modified endogenous PML negligible. In the absence of As₂O₃, the small but detectable contribution of endogenous PML to the BRET¹ signal was evidenced by comparing the difference in signal between PML_{WT}-Luc and PML_{3KR}-Luc in pairs with YFP-SUMO1 in cells expressing endogenous PML (HEK293T) relative to mouse embryo fibroblasts derived from knockout PML mice (MEF PML^{-/-}) (62) (Fig. 3C). Clearly, the signal obtained with PML_{3KR}-Luc was lower in cells devoid of endogenous PML; the remaining BRET signal also revealed that, in MEF PML^{-/-}, the contribution of other endogenous sumoylated proteins to the non covalent BRET signal represents a large portion of the non-covalent signal (component #4 in Fig. 4C). Finally, it was initially surprising to find that a very slight increase in the As₂O₃-induced BRET signal was still obtained with the PML_{3KR}-SBD-Luc double mutant in which both covalent and SBD-dependent non-covalent interactions are abolished (Fig. 3B). Actually, this is most likely accounted by the fact that PML is a dimerizing protein that could lead to a minor SBD-independent intermolecular BRET between PML_{3KR}-SBD-Luc and As₂O₃-induced YFP-SUMO1-modified endogenous PML (As₂O₃-inducible component #6 in Fig. 4D). Clearly, SBD-independent non-covalent interactions of PML-Luc with YFP-endogenous

sumoylated proteins (components #6-7 in Fig. 4D) represents a negligible signal close to the background as revealed by the titration curve of PML_{3KR}-SBD-Luc/YFP-SUMO1 (data not shown).

A summary of all the major and minor components of the BRET signal obtained with PML-Luc and YFP-SUMO1 in the presence or absence of As₂O₃ as deduced from PML-Luc mutants is recapitulated in Fig. 4E and Fig. S2. In brief, in the absence of a sumoylation inducer, such as As₂O₃, most of the PML-Luc/YFP-SUMO1 BRET signal is accounted by the SBD-dependent non covalent interaction of endogenous sumoylated proteins with the PML-Luc donor whereas in the presence of the inducer, the change in the BRET signal reflects mainly a change in the sumoylation of PML-Luc.

Altogether, our results indicate that BRET can be used to differentiate the sumoylation of a protein of interest from the non-covalent interactions with SUMO-modified proteins occurring via its SUMO-binding domain, if any. The assessment of PML/SUMO interactions by the SUMO BRET assay revealed that, in basal conditions, PML sumoylation represents a minor component of the BRET signal compared to the non-covalent interaction of sumoylated proteins with PML. Upon the specific induction of PML sumoylation by As₂O₃, the large increase in the BRET signal is only accounted by the enhanced PML sumoylation. Our data also indicates that the As₂O₃-induced PML sumoylation does not required the non-covalent interaction of SUMO1-modified proteins with PML SBD.

Serine phosphorylation sites within the SBD regulate PML SBD interactions with SUMO-modified proteins

Recently, Scaglioni *et al.* identified CK2-mediated serine phosphorylation sites on PML IV (55) which are conserved in PMLIII, the isoform studied here (Fig. 4A). Interestingly, these serines (S560, S561, S562, S565 indicated in green in Fig. 4A) are located within PML SBD (56). It is thus tempting to speculate that these serine

phosphorylation sites could functionally regulate the interaction properties of PML SBD as recently proposed (35).

To determine to what extent these serines may affect the binding of SUMO1-modified proteins to PML SBD, a mutant of these serines (PML_{S560-565A}-Luc) was tested by BRET in pair with YFP-SUMO1 (Fig. 5A). Based on the titration curves (Fig. 5A, left panel), the BRET signals calculated for PML_{WT}, PML_{S560-565A} and PML_{SBD} at an identical YFP/Luc ratio are presented as a bar graph (Fig. 5A, right panel). Interestingly, a similar reduction in the BRET signal was observed with PML_{SBD} and PML_{S560-565A} when compared to PML_{WT}. This indicates that the serines within the SBD are important determinants for the SBD-dependent non covalent interactions of PML with most its SUMO-modified protein partners (if not all). Consistent with the hypothesized involvement of the phosphorylation of these serines in these interactions (35), a BRET signal comparable to that of PML_{WT} is restored when PML_{S560-565D}, a serine phosphomimetic mutant, is used (Fig. 5B). Altogether, these results show that serine phosphorylation sites within the SBD regulate PML SBD-dependent interactions with SUMO1-modified proteins.

It is noteworthy that, like for PML_{SBD}, the sumoylation of PML_{S560-565A} mutant remains As₂O₃-inducible (Fig. 5A). Similar As₂O₃-induced signals were obtained for PML_{WT} and PML_{S560-565A} indicating that the integrity of the poly-serine motif is dispensable for As₂O₃-induced PML sumoylation. This is consistent with the sumoylation profile obtained by Western blot using cell extracts from HEK293T cells stably expressing PML_{WT} or its mutants (Fig. 5C). An increase in the sumoylation of PML_{WT}, PML_{SBD} and PML_{S560-565A} is detected upon the addition of As₂O₃ by a change in the sumoylation pattern towards higher molecular weight SUMO-modified species (as expected, no SUMO1-modified forms could be detected with PML_{3KR}, PML_{C57/60} and the sumoylation-deficient double mutants, PML_{3KR/SBD} and PML_{3KR/S560-565A}).

Interestingly, confocal microscopy showed (Fig. 5D) that the serine phosphorylation deficient mutant, PML_{S560-565A} is localized in multiple and dense nuclear dots in contrast with PML_{SBD}, known to be distributed in large and diffuse aggregates with disruption of

PML-NBs (56). The subnuclear distribution of PML_{S560-565A} resembles more that of PML_{WT}, found in characteristics PML-NBs. This result most likely indicates that the serine residues (S560-565) are not required for the formation of dense subnuclear structures in contrast to the VVVI core residues of the SBD. It also suggests that some non covalent interaction(s) required for the integrity of PML-NBs are lost in PML_{SBD} but maintained in PML_{S560-565}.

As suggested by Hecker et al (2006), negative charges imposed either by a stretch of neighbouring acidic amino acids and/or phosphorylated serine residues within the SBD of some proteins favours the recruitment of SUMO1 but not SUMO2 (27). We thus used the SUMO BRET assay to determine if differential SBD-dependent non covalent recruitment of sumoylated proteins by PML could be evidenced with the three SUMO paralogues. Hyperbolic curves of a similar range of amplitudes were obtained with PML_{WT} and the three SUMO paralogues as evidenced by BRET titration experiments (Fig. 6B). Furthermore, the BRET signal was drastically and similarly decreased with all SUMO paralogues for PML_{S560-565A} mutant to level close to those obtained with PML_{SBD} mutant, as evidenced by BRET titration curves or corresponding bar graphs (Fig. 6B-C). This indicates that comparable binding of the three SUMO paralogues occurred with PML SBD and that this binding depends on PML S560-565 residues and their phosphorylation.

PML SBD and PML sumoylation target sites are both critical for the As₂O₃-induced PML degradation

It is now known that PML is polyubiquitinated and degraded in a proteasome-dependent manner, a process that requires the K160 sumoylation site (10, 36, 37, 60, 73). Consequently, we studied the possible link between PML sumoylation, ubiquitination and the As₂O₃-enhanced PML degradation.

In an attempt to follow the ubiquitination of PML and its mutants in basal conditions and upon exposure to As₂O₃, we conducted a ubiquitin BRET² assay, as we previously described (50), using PML-Luc fusions in pairs with GFP-UBI. As seen in Fig.

7C, the BRET titration curves obtained with PML_{SBD}, PML_{3KR} and PML_{3KR-SBD} were similar in the presence or absence of As₂O₃ and shows that the BRET signal increased as a function of the amount of GFP-UBI transfected. In contrast, with PML_{WT} and PML_{S560-565A}, a clear shift of the BRET curves to the right was seen upon As₂O₃ treatment (Fig. 7A). This is indicative of a change in the expression of the fusions in the presence of As₂O₃ since BRET ratios are plotted as a function of the GFP/Luc fusion protein expression. To directly assess how the BRET ratio varies in relation to the expression of PML_{WT}-Luc and GFP-Ubi fusions, the BRET ratio, Luc expression and GFP expression are presented as separate bar graphs for each samples (11 samples) analyzed with the ubiquitin BRET assay in the presence or absence of As₂O₃ (Fig. 7B). Clearly, neither the BRET signal nor the GFP-SUMO fusion expression are significantly changed upon As₂O₃ addition whereas a 3-7 fold decrease in the PML_{WT}-Luc expression was observed. While similar results were obtained with PML_{S560-565A} mutant (data not shown), no significant difference in PML_{SBD}-Luc, PML_{3KR}-Luc and PML_{3KR-SBD}-Luc expression was detected upon As₂O₃ treatment (Fig. 7D and data not shown). The significant decrease in PML_{WT}-Luc and PML_{S560-565A}-Luc expression, seen very shortly (35 min) after the addition of As₂O₃ (10 μM), is not normally seen in cells where GFP-UBI is not overexpressed. This indicates that the overexpression of ubiquitin accelerates the kinetics of As₂O₃-induced PML degradation.

Consistent with the results obtained with the ubiquitin BRET assay in transiently transfected cells, PML_{3KR} and PML_{SBD} stably expressed in HEK293T cells were shown to be resistant to degradation whereas PML_{WT} and PML_{S560-565A} are sensitive, as revealed by Western blot after a long (16 h) As₂O₃ (1 μM) treatment (Fig. 7E).

Altogether these results indicate that, like the PML-NBs formation, the As₂O₃-induced PML degradation is not dependent on the serine phosphorylation sites within the SBD but requires the integrity of both PML sumoylation target sites and PML SBD core sequence. Thus, these results importantly demonstrate that, in addition to PML sumoylation (36, 37, 60), the recruitment of sumoylated protein(s) by PML SBD core sequence is determinant for As₂O₃-induced PML degradation. Such sumoylated protein(s) recruited by

PML SBD could be protein(s) favoring the recruitment of PML to PML-NBs where components of the ubiquitin/proteasome degradation machinery are present (4, 18, 34, 37) and/or E3 ubiquitin ligase(s) facilitating PML degradation (23).

Both the interaction of PML with RNF4 and its RNF4-mediated degradation are reinforced by As₂O₃.

Recent studies reported that RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase (59) involved in the control of PML stability (60) and implicated in As₂O₃-induced PML degradation (36, 60). As₂O₃ which enhances PML sumoylation was also suggested to favor PML SUMO-dependent polyubiquitination and proteasome-mediated degradation (36, 60).

To further study the mechanisms involved in PML degradation, we assessed the effect of RNF4 on PML_{WT} and its mutants exhibiting a differential sensitivity to the degradation induced by As₂O₃ as described above (Fig. 7). First, we overexpressed RNF4 in HEK293T transiently transfected with PML_{WT}. Clearly, RNF4 alone induced a decrease in PML expression (Fig. 8C, lanes 1 and 4), a process accelerated by As₂O₃ and observed as early as 1 h after addition of this agent (Fig. 8C, lane 4-6) whereas no change in PML level was observed in the absence of overexpressed RNF4 upon a similar As₂O₃ treatment (Fig. 8C, lanes 1-3). Then, we compared the fate of PML_{WT}, PML_{S560-S565A}, PML_{3KR} or PML_{SBD} expressed in HEK293T cells in the presence or absence of overexpressed RNF4 and proteasome inhibitor epoxomicin. As shown in Fig. 8D (lanes 1, 5 and 7), RNF4-induced decrease in PML_{WT} level is inhibited by epoxomicin, indicating that RNF4 alone leads to PML degradation via the proteasome pathway. Similar experiments indicated that RNF4 induces also PML_{S560-565A} degradation but did not alter the level of PML_{3KR} and PML_{SBD} (Fig. 8D, lanes 1, 5 and 7). However, in some experiments where the RNF4/PML ratio was further increased, a degradation of PML_{SBD} and to some extent PML_{3KR} was also seen but this process is never enhanced by As₂O₃ confirming their resistance to the degradation by this agent (data not shown). Taken together, our results show first that RNF4 mediates PML_{WT} and PML_{S560-565A} degradation in a proteasome-dependent manner while PML_{SBD}

and PML_{3KR} are much more resistant to RNF4-mediated degradation and second that As₂O₃-induced PML degradation necessitates its covalent and non covalent binding to SUMO.

To determine whether the ability of PML mutants to interact with RNF4 can explain their differential sensitivity to RNF4-induced degradation, we first assess their potential colocalization with the endogenous RNF4 in HEK293T cells transfected with PML or its mutants. As seen in Fig. 8A, endogenous RNF4 colocalized with PML_{WT} in multiple dots characteristics of PML-NBs. Interestingly, this colocalization is also observed with PML_{S560-565A}, which like PML_{WT}, is sensitive to the degradation induced by RNF4 and As₂O₃. In contrast, no colocalization was observed with PML_{3KR} and PML_{SBD}. Then, we tested these interactions by a BRET¹ assay with Luc versions of PML_{WT} and its mutants used in a limiting concentration in pair with increasing and saturating concentrations of RNF4-YFP. Clearly, BRET titration curves indicated that PML_{WT}, PML_{S560-565A} and unexpectedly PML_{SBD}, interact with RNF4 and that their interaction is strongly increased by As₂O₃, indicating that this drug enhances the affinity of PML and its mutants for RNF4 (Fig. 8B). In contrast, low BRET signals indicative of weak or no interaction were obtained with PML_{3KR} and these signals were only slightly increased by As₂O₃ (Fig. 8B) possibly due to the heterodimeric interaction of PML_{3KR} with endogenous PML as previously noted (Fig. 2A). Interestingly, the differential sensitivity of PML and its mutants to RNF4-mediated degradation was also evidenced by the clear shift of the BRET curves to the right seen upon As₂O₃ treatment with PML, PML_{S560-565A} and PML_{SBD}. Analysis of each individual samples treated or not by As₂O₃ confirmed that these curve shifts were due in each case to a decrease in the level of expression of the Luc fusions upon As₂O₃ exposure; in the conditions used, no change in the expression of PML_{3KR} was seen after As₂O₃ treatment at any of the RNF4/PML_{3KR} ratio used. It was not expected to find that the interaction of PML_{WT} and PML_{SBD} with RNF4 are similarly increased by As₂O₃ considering that PML_{SBD} did not colocalize with RNF4 in conditions where the endogenous RNF4 was limiting (Fig. 8A) and that it was not degraded upon As₂O₃ exposure (Fig. 7 and

Fig. 8D). Thus, it appears that the capacity to interact with RNF4 is not the only determinant in the differential sensitivity of PML and its mutants to RNF4 proteasome-mediated degradation. The recruitment by PML SBD of protein(s) other than RNF4 and yet to be identified probably participates in the As_2O_3 -mediated PML degradation. Considering the involvement of both PML sumoylation target sites and PML SBD in RNF4-mediated degradation and as discussed below, sumoylated PML could be, itself, such a candidate protein which recruitment via a functional PML SBD onto PML-NBs (56) might be a prerequisite for efficient RNF4-mediated PML degradation.

Concluding remarks

Altogether, our results indicate that stimulation of the sumoylation or ubiquitination machinery through overexpression of SUMO1, ubiquitin or the poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase RNF4 enhances PML degradation; the regulation of PML level is thus dependent on the relative abundance of the various components of the SUMO and UBI machineries. Our results also demonstrate that RNF4 constitutively interacts with PML and regulates its steady-state level by participating in its degradation in a PML sumoylation- and SBD-dependent dependent manner. This confirms the link existing between SUMO and ubiquitin pathways in PML degradation (36, 60). Since RNF4 shows a significant higher affinity *in vitro* for poly-SUMO chains over monomeric SUMO (60), we suggest that As_2O_3 favors the interaction of PML with RNF4 by enhancing the formation of higher molecular weights poly-SUMO chains onto PML (Fig S1D and data not shown). It was suggested that both SUMO2/3 and SUMO1 are required for As_2O_3 -induced PML degradation (36). Thus, SUMO2/3 inactivation, by preventing the formation of polymeric sumoylation chain onto PML (36), most likely impairs PML/RNF4 interaction and thus the As_2O_3 -induced PML degradation. While As_2O_3 increases the ratio of SUMO1 over SUMO2/3 incorporated in the sumoylated PML (36), it is not yet clear how SUMO1 participates to the As_2O_3 -induced PML degradation. This may involve SUMO1 non covalent binding to PML SBD, the coupling of SUMO1 directly to one of the PML target

lysines or its linking at the end of poly-SUMO2/3 chains to terminate chain growth (41). Compared to poly-SUMO2/3 chains, SUMO1-terminated polySUMO2/3 chains may regulate the As₂O₃-enhanced RNF4-mediated degradation by exhibiting a different substrate specificity for the cellular isopeptidases involved in depolymerizing/dismanteling poly-SUMO chains (22, 44, 51) or for polySUMO-dependent RNF4 ubiquitination activity even if this E3 ubiquitin ligase does not apparently discriminate between SUMO1 and SUMO2/3 for its interaction with PML polySUMO chains (60).

In addition to function as a poly-SUMO-specific E3 ubiquitinase ligase (60), RNF4 also catalyses the ubiquitination of several PML C-terminal lysines *in vitro* and possibly the ubiquitination of PML lysine 401 *in vivo* (36). This could explain that a PML sumoylation-deficient mutant (PML_{3KR}) which is normally resistant to RNF4 degradation can be downregulated at very high level of RNF4 overexpression but that this degradation is not accelerated by As₂O₃ (data not shown) .

Interestingly, we have demonstrated that, in addition to the integrity of the hydrophobic motif within the SBD (56) (mutated in PML_{SBD}), the phosphorylation of some serines previously identified as targets for CK2 (55) (mutated in PML_{S560-S565A}) is required for most PML SBD-dependent non covalent interactions with sumoylated proteins. It is noteworthy that obtaining these quantitative data by available methods in alternative to the novel SUMO BRET assay would have been more of a challenge. To our knowledge, despite the fact that it was previously hypothesized for PIAS α SBD (27), this is the first example where a phospho-regulation of the SUMO Binding Domain ('SBD phospho-switch') is shown to be determinant for the interaction of a SBD with its SUMO-modified protein partners. It is significant that PML_{S560-S565A} localisation and its sensitivity to As₂O₃- and RNF4- mediated degradation were similar to that of PML_{WT} but differs from that of PML_{SBD}. This suggests that some non covalent interaction(s) required for the localisation of PML into NBs and for PML degradation are preserved in PML_{S560-S565A} and lost in PML_{SBD}. Interestingly, we consistently observed that the increase in BRET signal induced by As₂O₃ with PML_{WT} in pair with SUMO1 was similar to the one of PML_{S560-S565A} and always

slightly higher to that of PML_{SBD} (Fig 5). It was thus tempting to speculate that the interaction of SUMO-modified PML with PML SBD was preserved in PML_{S560-565A} (Fig 4., As₂O₃-inducible components # 2-3). According to the nucleation model of PML-NB formation proposed by Pandolfi (56), the non covalent binding of sumoylated PML to PML SBD is determinant for the nucleation event triggering the subsequent recruitment of proteins containing SUMO binding motifs or SUMO-modified to PML-NBs. A preservation of this interaction could account for PML_{S560-565A} localisation to PML-NBs. Since it was recently shown that ATP depletion results in an immobilization of PML at NBs which could involve a decrease in PML phosphorylation status (63), it remained to be determined if a dephosphorylation of the serines within the SBD is a prerequisite for the nucleation of PML at the NBs. Furthermore, it is possible that the localisation of PML to the NBs facilitates its RNF4-mediated degradation; this would explain that PML_{S560-565A} is more sensitive to RNF4 degradation than PML_{SBD} despite the fact that both interact similarly with RNF4. Further studies could determine if the suggested E3 ubiquitin ligase activity (6) of PML is at work in PML-NBs, where all components of the ubiquitin machinery are concentrated (4, 7, 37, 48), and reinforces RNF4-mediated degradation.

Clearly, our study demonstrates that the stretch of serine acting as targets for CK2 kinase (55) is not required in the RNF4-mediated PML degradation. Since CK2 kinase was previously found to promote an ubiquitin-mediated degradation that is dependent on the direct phosphorylation of a serine from the SBD serine stretch (55), this suggests that the RNF4-dependent and CK2-dependent PML degradation represent two independent pathways involved in the negative regulation of PML tumor suppressor level in oncogenic and physiological conditions.

This study took advantage of the development of a sensitive and quantitative SUMO BRET assay for the molecular dissection of both sumoylation and non covalent interactions with SUMO in living cells. It is shown that this assay can be used to follow kinetics of sumoylation in the presence of various pharmacological agents. Protein sumoylation is classically examined by Western blot assay with the drawback that

quantitative studies are not easily performed (cleavage of SUMO by endogenous isopeptidases after cell lysis, inconsistent electrotransfer of high molecular weight species etc.). Since it was previously shown that BRET can be used in high throughput screening (24), the development of a quantitative SUMO BRET assay paves the way toward large scale screening for therapeutic agents which could modulate PML sumoylation. In search for effective alternatives to As_2O_3 treatment of APL patients, initial screens with the PML_{SBD} mutant should be the most appropriate to address change in PML sumoylation in the presence of various agents from chemical libraries.

Acknowledgements

We thank Drs. Mary Dasso, Patrick Charneau, Frank J. Kaiser, Bernard Horsthemke and Michel Bouvier for their generous gifts of reagents. This work was supported by a grant from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (to M.A.) and the Ligue Nationale Contre le Cancer (to M. K C.-A.). D. G.-D. was supported by a studentship from Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). M.A is a Chercheur National of FRSQ.

1. Ahn MJ, Nason-Burchenal K, Moasser MM, and Dmitrovsky E. Growth suppression of acute promyelocytic leukemia cells having increased expression of the non-rearranged alleles: RAR alpha or PML. *Oncogene* 10: 2307-2314, 1995.
2. Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairet S, Chelsky D, Dennis M, and Bouvier M. Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3684-3689, 2000.
3. Ayaydin F and Dasso M. Distinct in vivo dynamics of vertebrate SUMO paralogues. *Mol Biol Cell* 15: 5208-5218, 2004.
4. Bailey D and O'Hare P. Comparison of the SUMO1 and ubiquitin conjugation pathways during the inhibition of proteasome activity with evidence of SUMO1 recycling. *Biochem J* 392: 271-281, 2005.
5. Bayer P, Arndt A, Metzger S, Mahajan R, Melchior F, Jaenicke R, and Becker J. Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280: 275-286, 1998.
6. Bernardi R and Pandolfi PP. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 1006-1016, 2007.
7. Bernassola F, Salomoni P, Oberst A, Di Como CJ, Pagano M, Melino G, and Pandolfi PP. Ubiquitin-dependent degradation of p73 is inhibited by PML. *J Exp Med* 199: 1545-1557, 2004.
8. Boddy MN, Duprez E, Borden KL, and Freemont PS. Surface residue mutations of the PML RING finger domain alter the formation of nuclear matrix-associated PML bodies. *J Cell Sci* 110 (Pt 18): 2197-2205, 1997.
9. Bohren KM, Nadkarni V, Song JH, Gabbay KH, and Owerbach D. 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: 27233-27238, 2004.

10. Boutell C, Orr A, and Everett RD. PML residue lysine 160 is required for the degradation of PML induced by herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0. *J Virol* 77: 8686-8694, 2003.
11. Chelbi-Alix MK, Pelicano L, Quignon F, Koken MH, Venturini L, Stadler M, Pavlovic J, Degos L, and de The H. Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells. *Leukemia* 9: 2027-2033, 1995.
12. de Stanchina E, Querido E, Narita M, Davuluri RV, Pandolfi PP, Ferbeyre G, and Lowe SW. PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell* 13: 523-535, 2004.
13. de The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, and Dejean A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* 347: 558-561, 1990.
14. Dellaire G and Bazett-Jones DP. PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* 26: 963-977, 2004.
15. Duprez E, Saurin AJ, Desterro JM, Lallemand-Breitenbach V, Howe K, Boddy MN, Solomon E, de The H, Hay RT, and Freemont PS. SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J Cell Sci* 112 (Pt 3): 381-393, 1999.
16. Everett RD. DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene* 20: 7266-7273, 2001.
17. Everett RD and Chelbi-Alix MK. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* 89: 819-830, 2007.
18. Fabunmi RP, Wigley WC, Thomas PJ, and DeMartino GN. Interferon gamma regulates accumulation of the proteasome activator PA28 and immunoproteasomes at nuclear PML bodies. *J Cell Sci* 114: 29-36, 2001.
19. Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido E, Baptiste N, Prives C, and Lowe SW. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 14: 2015-2027, 2000.

20. Fu C, Ahmed K, Ding H, Ding X, Lan J, Yang Z, Miao Y, Zhu Y, Shi Y, Zhu J, Huang H, and Yao X. Stabilization of PML nuclear localization by conjugation and oligomerization of SUMO-3. *Oncogene* 24: 5401-5413, 2005.
21. Germain-Desprez D, Bazinet M, Bouvier M, and Aubry M. Oligomerization of transcriptional intermediary factor 1 regulators and interaction with ZNF74 nuclear matrix protein revealed by bioluminescence resonance energy transfer in living cells. *J Biol Chem* 278: 22367-22373, 2003.
22. Gong L and Yeh ET. Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *J Biol Chem* 281: 15869-15877, 2006.
23. Hakli M, Karvonen U, Janne OA, and Palvimo JJ. SUMO-1 promotes association of SNURF (RNF4) with PML nuclear bodies. *Exp Cell Res* 304: 224-233, 2005.
24. Hamdan FF, Audet M, Garneau P, Pelletier J, and Bouvier M. High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *J Biomol Screen* 10: 463-475, 2005.
25. Hay RT. SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18: 1-12, 2005.
26. Hayakawa F and Privalsky ML. Phosphorylation of PML by mitogen-activated protein kinases plays a key role in arsenic trioxide-mediated apoptosis. *Cancer Cell* 5: 389-401, 2004.
27. Hecker CM, Rabiller M, Haglund K, Bayer P, and Dikic I. Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem* 281: 16117-16127, 2006.
28. Hofmann TG and Will H. Body language: the function of PML nuclear bodies in apoptosis regulation. *Cell Death Differ* 10: 1290-1299, 2003.
29. Ishov AM, Sotnikov AG, Negorev D, Vladimirova OV, Neff N, Kamitani T, Yeh ET, Strauss JF, 3rd, and Maul GG. PML is critical for ND10 formation and

recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* 147: 221-234, 1999.

30. Jensen K, Shiels C, and Freemont PS. PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20: 7223-7233, 2001.

31. Johnson ES and Blobel G. Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J Biol Chem* 272: 26799-26802, 1997.

32. Kaiser FJ, Moroy T, Chang GT, Horsthemke B, and Ludecke HJ. The RING finger protein RNF4, a co-regulator of transcription, interacts with the TRPS1 transcription factor. *J Biol Chem* 278: 38780-38785, 2003.

33. Kamitani T, Kito K, Nguyen HP, Wada H, Fukuda-Kamitani T, and Yeh ET. Identification of three major sentrinization sites in PML. *J Biol Chem* 273: 26675-26682, 1998.

34. Lafarga M, Berciano MT, Pena E, Mayo I, Castano JG, Bohmann D, Rodrigues JP, Tavanez JP, and Carmo-Fonseca M. Clastosome: a subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome. *Mol Biol Cell* 13: 2771-2782, 2002.

35. Lallemand-Breitenbach V and de The H. CK2 and PML: regulating the regulator. *Cell* 126: 244-245, 2006.

36. Lallemand-Breitenbach V, Jeanne M, Benhenda S, Nasr R, Lei M, Peres L, Zhou J, Zhu J, Raught B, and de The H. Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol* 10: 547-555, 2008.

37. Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Puvion F, Koken M, Honore N, Doubeikovsky A, Duprez E, Pandolfi PP, Puvion E, Freemont P, and de The H. Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J Exp Med* 193: 1361-1371, 2001.

38. Le XF, Yang P, and Chang KS. Analysis of the growth and transformation suppressor domains of promyelocytic leukemia gene, PML. *J Biol Chem* 271: 130-135, 1996.
39. Li H, Leo C, Zhu J, Wu X, O'Neil J, Park EJ, and Chen JD. Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol Cell Biol* 20: 1784-1796, 2000.
40. Mascle XH, Germain-Desprez D, Huynh P, Estephan P, and Aubry M. Sumoylation of the transcriptional intermediary factor 1beta (TIF1beta), the Co-repressor of the KRAB Multifinger proteins, is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain. *J Biol Chem* 282: 10190-10202, 2007.
41. Matic I, van Hagen M, Schimmel J, Macek B, Ogg SC, Tatham MH, Hay RT, Lamond AI, Mann M, and Vertegaal AC. In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy. *Mol Cell Proteomics* 7: 132-144, 2008.
42. Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A, and Bouvier M. Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 277: 44925-44931, 2002.
43. Mu ZM, Chin KV, Liu JH, Lozano G, and Chang KS. PML, a growth suppressor disrupted in acute promyelocytic leukemia. *Mol Cell Biol* 14: 6858-6867, 1994.
44. Mukhopadhyay D, Ayaydin F, Kolli N, Tan SH, Anan T, Kametaka A, Azuma Y, Wilkinson KD, and Dasso M. SUSP1 antagonizes formation of highly SUMO2/3-conjugated species. *J Cell Biol* 174: 939-949, 2006.
45. Muller S, Matunis MJ, and Dejean A. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *Embo J* 17: 61-70, 1998.

46. Negorev D and Maul GG. Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene* 20: 7234-7242, 2001.
47. Owerbach D, McKay EM, Yeh ET, Gabbay KH, and Bohren KM. A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun* 337: 517-520, 2005.
48. Pampin M, Simonin Y, Blondel B, Percherancier Y, and Chelbi-Alix MK. Cross talk between PML and p53 during poliovirus infection: implications for antiviral defense. *J Virol* 80: 8582-8592, 2006.
49. Percherancier Y, Berchiche YA, Slight I, Volkmer-Engert R, Tamamura H, Fujii N, Bouvier M, and Heveker N. Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J Biol Chem* 280: 9895-9903, 2005.
50. Perroy J, Pontier S, Charest PG, Aubry M, and Bouvier M. Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nat Methods* 1: 203-208, 2004.
51. Petrie K and Zelent A. Marked for death. *Nat Cell Biol* 10: 507-509, 2008.
52. Regad T and Chelbi-Alix MK. Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene* 20: 7274-7286, 2001.
53. Saitoh H and Hinchey J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* 275: 6252-6258, 2000.
54. Salomoni P and Pandolfi PP. The role of PML in tumor suppression. *Cell* 108: 165-170, 2002.
55. Scaglioni PP, Yung TM, Cai LF, Erdjument-Bromage H, Kaufman AJ, Singh B, Teruya-Feldstein J, Tempst P, and Pandolfi PP. A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell* 126: 269-283, 2006.
56. Shen TH, Lin HK, Scaglioni PP, Yung TM, and Pandolfi PP. The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol Cell* 24: 331-339, 2006.

57. Sternsdorf T, Grotzinger T, Jensen K, and Will H. Nuclear dots: actors on many stages. *Immunobiology* 198: 307-331, 1997.
58. Su HL and Li SS. Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. *Gene* 296: 65-73, 2002.
59. Sun H, Leverson JD, and Hunter T. Conserved function of RNF4 family proteins in eukaryotes: targeting a ubiquitin ligase to SUMOylated proteins. *EMBO J* 26: 4102-4112, 2007.
60. Tatham MH, Geoffroy MC, Shen L, Plechanovova A, Hattersley N, Jaffray EG, Palvimo JJ, and Hay RT. RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat Cell Biol* 10: 538-546, 2008.
61. Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA, Desterro JM, Botting CH, Naismith JH, and Hay RT. Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* 276: 35368-35374, 2001.
62. Wang ZG, Ruggero D, Ronchetti S, Zhong S, Gaboli M, Rivi R, and Pandolfi PP. PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet* 20: 266-272, 1998.
63. Weidtkamp-Peters S, Lenser T, Negorev D, Gerstner N, Hofmann TG, Schwanitz G, Hoischen C, Maul G, Dittrich P, and Hemmerich P. Dynamics of component exchange at PML nuclear bodies. *J Cell Sci*, 2008.
64. Wu WS, Vallian S, Seto E, Yang WM, Edmondson D, Roth S, and Chang KS. The growth suppressor PML represses transcription by functionally and physically interacting with histone deacetylases. *Mol Cell Biol* 21: 2259-2268, 2001.
65. Xu Y, Piston DW, and Johnson CH. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 151-156, 1999.
66. Xu ZX, Zhao RX, Ding T, Tran TT, Zhang W, Pandolfi PP, and Chang KS. Promyelocytic leukemia protein 4 induces apoptosis by inhibition of survivin expression. *J Biol Chem* 279: 1838-1844, 2004.

67. Yang XJ and Gregoire S. A recurrent phospho-sumoyl switch in transcriptional repression and beyond. *Mol Cell* 23: 779-786, 2006.
68. Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhbass U, Montagnier L, and Charneau P. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101: 173-185, 2000.
69. Zhang TD, Chen GQ, Wang ZG, Wang ZY, Chen SJ, and Chen Z. Arsenic trioxide, a therapeutic agent for APL. *Oncogene* 20: 7146-7153, 2001.
70. Zhong S, Muller S, Ronchetti S, Freemont PS, Dejean A, and Pandolfi PP. Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 95: 2748-2752, 2000.
71. Zhong S, Salomoni P, and Pandolfi PP. The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol* 2: E85-90, 2000.
72. Zhu J, Gianni M, Kopf E, Honore N, Chelbi-Alix M, Koken M, Quignon F, Rochette-Egly C, and de The H. Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and oncogenic RARalpha fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14807-14812, 1999.
73. Zhu J, Koken MH, Quignon F, Chelbi-Alix MK, Degos L, Wang ZY, Chen Z, and de The H. Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3978-3983, 1997.
74. Zhu Q, Zhang JW, Zhu HQ, Shen YL, Flexor M, Jia PM, Yu Y, Cai X, Waxman S, Lanotte M, Chen SJ, Chen Z, and Tong JH. Synergic effects of arsenic trioxide and cAMP during acute promyelocytic leukemia cell maturation subtends a novel signaling cross-talk. *Blood* 99: 1014-1022, 2002.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1- PML / SUMO1 interactions are detected by BRET.

A, B) Detection of PML /SUMO1 interactions by BRET¹ (A) or BRET² (B) titration assays using HEK293T cells transfected with increasing amounts of YFP-SUMO1 (BRET¹) or GFP-SUMO1 (BRET²) and a fixed amount of PML_{WT}-Luc (•). BRET pairs including PML_{C57,60A}-Luc (a PML mutant not sumoylated) (★) or YFP-SUMO1G (a SUMO1 that cannot be processed) (o, dotted line) (A) and Luc fused to a nuclear localisation signal (NLS) (o, dotted line) (B) were used as negative controls.

FIGURE 2- BRET reveals both covalent and non covalent PML/SUMO1 interactions as well as As₂O₃-induced PML sumoylation in living cells.

A) and B) Detection of covalent and non covalent PML/SUMO1 interactions by BRET¹ (A) or BRET² (B) titration assays in the presence (dotted lines, empty symbols) or absence (solid lines and symbols) of As₂O₃ in HEK293T cells transfected with a fixed amount of PML_{WT}-Luc (o or •) or its sumoylation deficient mutant PML_{3K}-Luc (green symbols: ∇ or ▼) and increasing concentrations of either YFP-SUMO1 (BRET¹) or GFP-SUMO1 (BRET²). PML_{WT}-Luc in pair with YFP-SUMO1G (*) was used as a background negative control.

C) Kinetics of As₂O₃-induced PML_{WT}-Luc sumoylation revealed by BRET¹ (□, assay on attached cells) and BRET² (o, assay on cells in suspension).

D) Dose-response curve to As₂O₃ treatment for PML_{WT}-Luc (o) or PML_{3KR}-Luc (green symbol: ∇) / YFP-SUMO1 BRET¹ pairs. PML_{C57,60A}-Luc / YFP-SUMO1 (*) was used as a negative control.

E) Comparison of As₂O₃-induced sumoylation of PML_{WT}, PML_{3KR} and its single lysine mutants assessed by BRET¹ at an identical YFP acceptor/Luc donor expression ratio (400 arbitrary units) as derived from titration curves.

As₂O₃ treatment (A-E): 5 μM, 4 h exposure for BRET¹ and Western Blot or 10 μM, 70 min exposure for BRET².

FIGURE 3- PML SUMO Binding Domain (SBD) is responsible for non-covalent PML/SUMO1 interactions detected by BRET but is not required for As₂O₃-induced PML sumoylation.

A) Detection of the non-covalent SBD-dependent PML/SUMO1 interactions by BRET¹ titration assay in the presence (dotted lines, empty symbols) or absence (solid lines and symbols) of As₂O₃ in HEK293T cells transfected with a fixed amount of PML_{WT}-Luc (○ or ●) or its SUMO Binding Domain deficient mutant PML_{SBD}-Luc (red symbols: ◇ or ◆) and increasing concentrations of YFP-SUMO1. PML SUMO Binding Domain is not required for As₂O₃-induced PML sumoylation.

B) Dose-response curves to As₂O₃ treatment for PML_{WT}-Luc (○) or PML_{SBD}-Luc (red symbol: ◇) / YFP-SUMO1 BRET¹ pairs. PML_{3KR-SBD}-Luc / YFP-SUMO1 (purple symbol: ◊) was used as a negative control.

C) Comparison of the difference in the BRET¹ signal between PML_{WT}-Luc (● or ○) and PML_{3KR}-Luc (▼ or ▽) in pair with YFP-SUMO1 in HEK293T cells (expressing endogenous PML) (black solid symbols and lines) or MEF PML^{-/-} (devoid of endogenous PML) (green empty symbol and lines). The variation in signal obtained in HEK293T (black vertical bar on the right) as compared to MEF PML^{-/-} (green bar on the left) revealed that YFP-sumoylated endogenous PML participates to the BRET¹ signal.

FIGURE 4- Schematic representation of PML and illustration of the components of the PML-Luc/YFP-SUMO BRET signal

A) Schematic representation of PML III (used in this study) and PML IV isoforms. The three sumoylation target lysines (K), the conserved RBCC/TRIM motif (RING finger, B box 1, B box 2, coiled-coil region), the nuclear localization signal (NLS) and the recently

published SUMO Binding Domain (SBD) (56) are illustrated. The whole sequence defining the SBD with its core hydrophobic amino acids (VVVI, in red) (56) and a region including adjacent phosphorylated serines (green) (55) are represented

B) Covalent (sumoylation) and SBD-dependent non-covalent interactions are illustrated as two BRET components discriminated using PML_{WT}-Luc donor and its PML_{3KR} and PML_{SBD} mutants in pair with YFP-SUMO acceptor. The black arrow indicates the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) occurring between the Luc donor and YFP acceptor. The loss of transfer of energy resulting from the mutation of the sumoylation target lysine or of the SBD is highlighted by red dashed arrows.

C) SBD-dependent non covalent interactions detectable by BRET using PML_{WT}-Luc / YFP-SUMO pair. The SBD of PML_{WT}-Luc fusion can recruit PML_{WT}-Luc fusion, endogenous PML or other endogenous proteins ("X endo") sumoylated by YFP-SUMO; these three components are annotated #2, #3, #4 as in the table in E.

D) SBD-independent non covalent interactions detectable by BRET (minor components) using PML_{WT}-Luc / YFP-SUMO pair. PML_{WT}-Luc can recruit in an SBD-independent manner PML_{WT}-Luc fusion, endogenous PML or other endogenous proteins ("X endo") sumoylated by YFP-SUMO (annotated #5, #6, #7) respectively as in the table in E.

E) Summary of the contribution of covalent and non covalent interactions to the BRET signal generated by PML_{WT}-Luc in pair with YFP-SUMO1 and components of the signal lost using PML mutants.

FIGURE 5- Serine phosphorylation sites within the SBD regulate PML SBD-dependent interactions with SUMO1-modified proteins.

A) Disruption of the non-covalent SBD-dependent PML/SUMO1 interactions in HEK293T cells transfected with a fixed amount of either PML_{WT}-Luc (○ or ●), PML_{SBD}-Luc (red symbols: ◇ or ◆) or PML_{S560-565A}-Luc phosphorylation deficient mutant (blue

symbols: □ or ■) and increasing amounts of YFP-SUMO1 in the presence (dotted lines, empty symbols) or absence of As₂O₃ (solid lines and symbols) (left panel). Data derived from the BRET¹ titration assay (left panel) at an identical YFP acceptor/Luc donor expression ratio are presented in a bar graph (right panel).

B) Comparison of the BRET¹ signal between PML_{WT}-Luc and PML_{S560-565D}-Luc phosphomimetic mutant in pair with YFP-SUMO1 at a fixed YFP acceptor/Luc donor expression ratio.

C) Western blot on total cell extracts from HEK293T cells, stably expressing PML_{WT} or its various mutants, submitted or not to As₂O₃ treatment (5 μg, 4 h). PML and its SUMO-modified species are revealed by an anti-PML antibody.

D) Localization by confocal microscopy of PML_{WT}-Luc or its various mutants fused to Luciferase transiently transfected in HEK293T cells.

FIGURE 6- PML covalent and non-covalent interactions detected by BRET with the different SUMO paralogs.

A) Dose-response curves to As₂O₃ treatment for PML_{WT}-Luc in pairs with YFP-SUMO1 (black ■), YFP-SUMO2 (blue ●) or YFP-SUMO3 (red ▼).

B-C) Comparison of the BRET signal between PML_{WT}-Luc and its mutants in pairs with YFP-SUMO1 (black), YFP-SUMO2 (blue) and YFP-SUMO3 (red) as assessed by a BRET¹ titration assay for PML_{WT} and PML_{S560-565A} (B) and illustrated with a bar graph derived from titration curves at an identical YFP acceptor/Luc donor expression ratio (400 arbitrary units) for PML_{WT} and its mutants (C).

FIGURE 7- Both PML SBD and PML sumoylation target sites are critical for the As₂O₃-induced PML degradation

A-D) Detection of a differential degradation of PML_{WT} and its mutants induced by As₂O₃ (10 μM, 35 min exposure) in HEK293T cells transfected with a fixed amount PML_{WT}-Luc and its mutants in pairs with increasing concentrations of GFP-UBI. PML-Luc

fusions are divided in two groups depending on their response to As_2O_3 treatment: degradation (A-B) and no degradation (C-D). BRET² titration curves are in A and C). As confirmed by the bar graphs in B), a shift of the BRET² curves to the right seen in the presence of As_2O_3 in A) is indicative of a change in the expression of the Luc-fusions (change in the GFP/Luc expression ratio upon As_2O_3 treatment). Bar graphs for PML_{WT}-Luc (B) and PML_{SDB}-luc (D) in pairs with GFP-UBI as derived from the data presented in A) and C), respectively. For each sample treated with As_2O_3 (black bar) or not (grey bar), the BRET² and the expression level of the PML-Luc fusion are presented (B and D); the expression level of GFP-UBI which essentially remains unchanged upon addition As_2O_3 for all pairs tested is also shown in B) for PML_{WT}-Luc.

E) Western blot on total cell extracts from HEK293T cells stably expressing untagged PML_{WT}, PML_{3KR}, PML_{SBD} or PML_{S560-565A} and submitted or not to a 16 h treatment with 1 μM As_2O_3 .

FIGURE 8- RNF4 interacts with PML and is involved in its constitutive and As_2O_3 -induced degradation.

A) Localization by confocal microscopy of endogenous RNF4 relative to untagged PML_{WT} or its mutants stably transfected in HEK293T cells.

B) Interaction of RNF4 with PML_{WT} and its mutants assessed by BRET¹ in HEK293T cells transiently transfected with PML-Luc or its various mutants in pairs with increasing amounts of RNF4-YFP and submitted or not to an As_2O_3 treatment (1 μM , 16 h).

C-D) Western blots of total cell extracts from HEK293T cells expressing PML_{WT} (C and D), PML_{3KR}, PML_{SBD} and PML_{S560-565A} (D) alone or with Flag-RNF4, were treated or not either with 5 μM As_2O_3 for 6 h or the indicated time (C-D) or with 1 μM Epoxomycin for 16 h (D). PML, RNF4 and endogenous actin were revealed by anti-PML, anti-Flag and anti-actin antibodies, respectively.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Figure Legends

FIGURE S1- Dimerisation, interaction with UBC9, nuclear localization and sumoylation of PML-Luc fusions used in the SUMO BRET assay.

A) Dimerisation of PML_{WT}-Luc (●, solid line) or PML_{C57,60A}-Luc (★, dotted line) / PML_{WT}-YFP pairs as confirmed by BRET¹. PML_{ΔCC}-Luc (a mutant deleted of its Coiled-coiled dimerisation domain) (▲) was used as a negative control.

B) Interaction of PML_{WT}-Luc (○ or ●) and PML_{3KR}-Luc (▼ or ▽) with GFP-UBC9 in the presence (dotted line, empty symbols) and absence (solid lines and symbols) of As₂O₃ detected by BRET² assay. PML_{3KR}-Luc was used as a negative control.

C) Localization by confocal microscopy of PML transfected in HEK293T cells as untagged versions (PML_{WT} and PML_{3KR}) or fused to luciferase (PML_{WT}-Luc and PML_{3KR}-Luc).

D) Western blot on total cell extracts from HEK293T cells stably expressing PML_{WT}-Luc or PML_{3KR}-Luc and submitted or not to As₂O₃ treatment (5 μM, 4 h). PML and its SUMO-modified species are revealed by an anti-PML antibody. The As₂O₃ treatment induced the apparition of a ladder of SUMO-modified high molecular weight species migrating above the unmodified PML (arrow head) and the concomitant decrease in the amount of this unmodified form (lane 3). As expected, none of these high molecular weight species were seen with the sumoylation deficient PML_{3KR} mutant (lane 4 and 5). The basally sumoylated PML was detected in the untreated sample (lane 2) as a very weak high molecular weight species.

FIGURE S2- Identification of the components of the BRET signal due to covalent and non-covalent (SBD-dependent and SBD-independent) interactions of PML with SUMO1.

The seven possible components of the BRET signal resulting from PML/SUMO1 interaction (numbered from 1 to 7) as summarized in Fig. 4E and are indicated on a schematic representation of the BRET titration curves obtained with PML_{WT}-Luc, PML_{3KR}-Luc and PML_{SBD}-Luc in the presence (dotted lines) or absence (solid lines) of As₂O₃. '+' indicates an increase in the intensity of the BRET signal in the presence of As₂O₃. Components # 5,6,7 are negligible. Component # 1 is minor in the absence but major in the presence of As₂O₃.

Figure 1

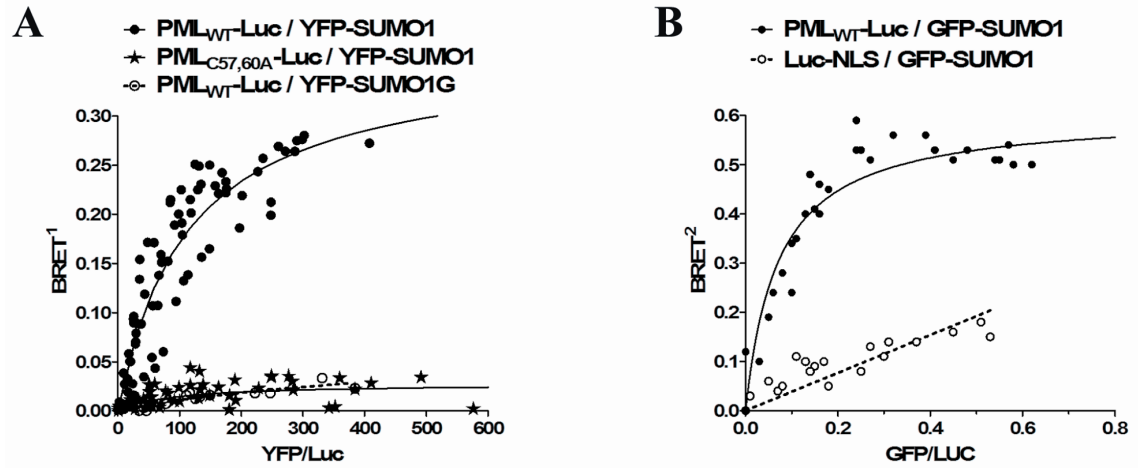


Figure 2

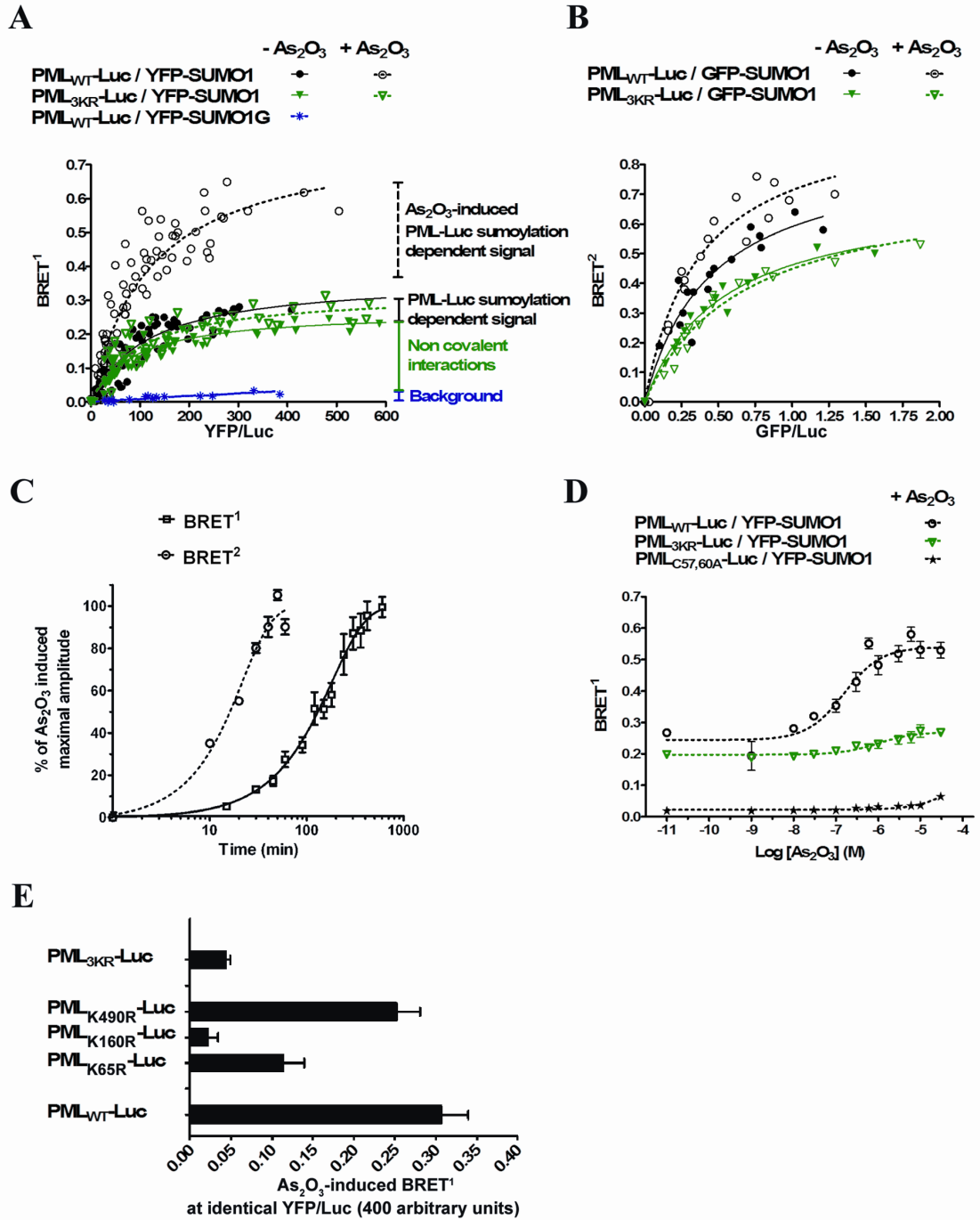


Figure 3

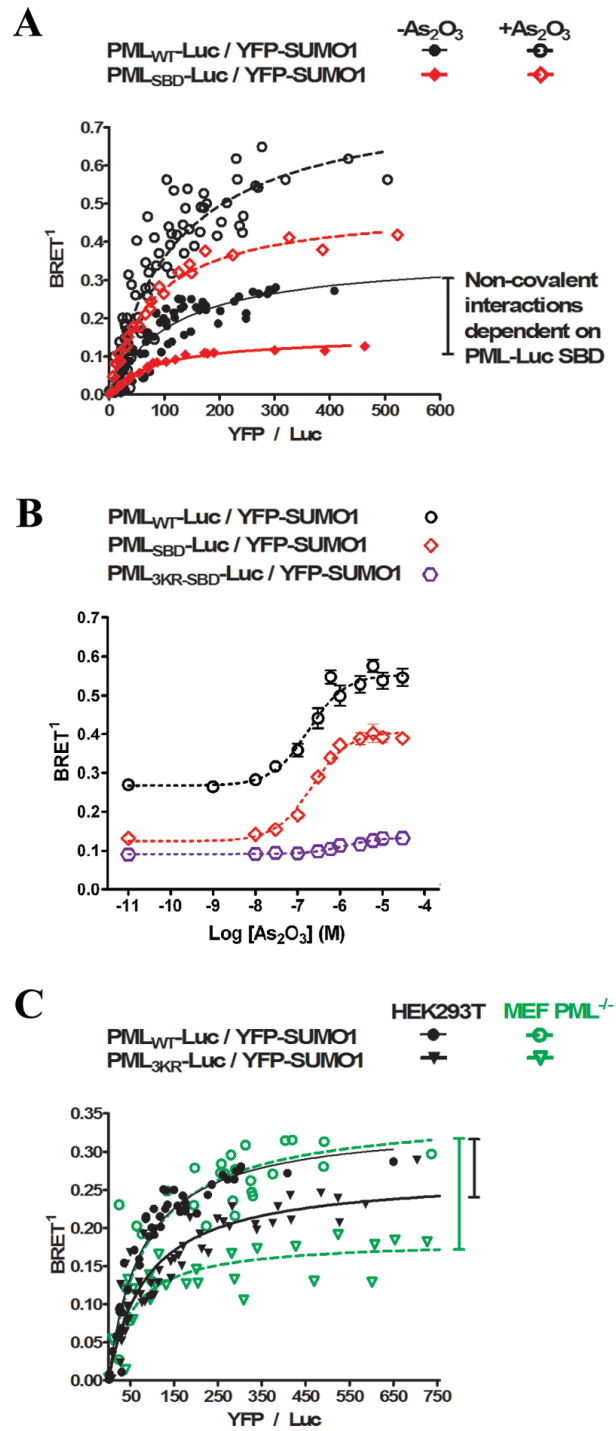
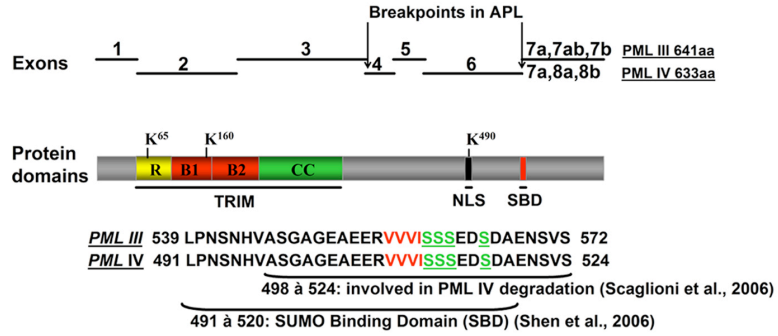
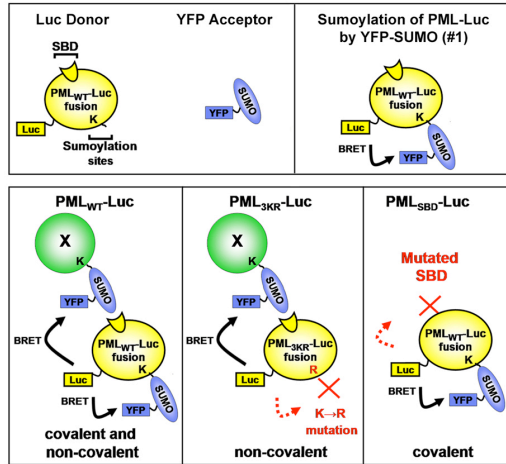


Figure 4

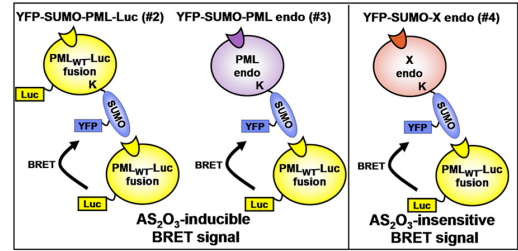
A



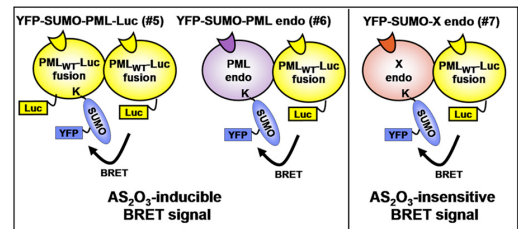
B Components of the PML-Luc / YFP-SUMO BRET signal revealed by PML-Luc mutants



C SBD-dependent non covalent BRET signal for PML-Luc / YFP-SUMO



D Minor SBD-independent non covalent BRET signal for PML-Luc / YFP-SUMO



E

	#	YFP acceptor	PML-Luc donor						
			WT		3KR	SBD	3KR-SBD		
			- As ₂ O ₃	+ As ₂ O ₃					
PML-Luc sumoylation (covalent)			1	YFP-SUMO1	minor	MAJOR ↑	lost		lost
PML-Luc non covalent interactions	SBD-dependent	2	YFP-SUMO1-PML-Luc	minor	minor ↑	lost	lost	lost	lost
		3	YFP-SUMO1-Endogenous PML	minor	minor ↑		lost	lost	lost
		4	YFP-SUMO1-Endogenous proteins	MAJOR	minor ↑ if any		lost	lost	lost
		5	YFP-SUMO1-PML-Luc	minor	minor ↑	lost		lost	
	SBD-independent	6	YFP-SUMO1-Endogenous PML	minor	minor ↑				
		7	YFP-SUMO1-Endogenous proteins	minor	minor ↑ if any				

Figure 5

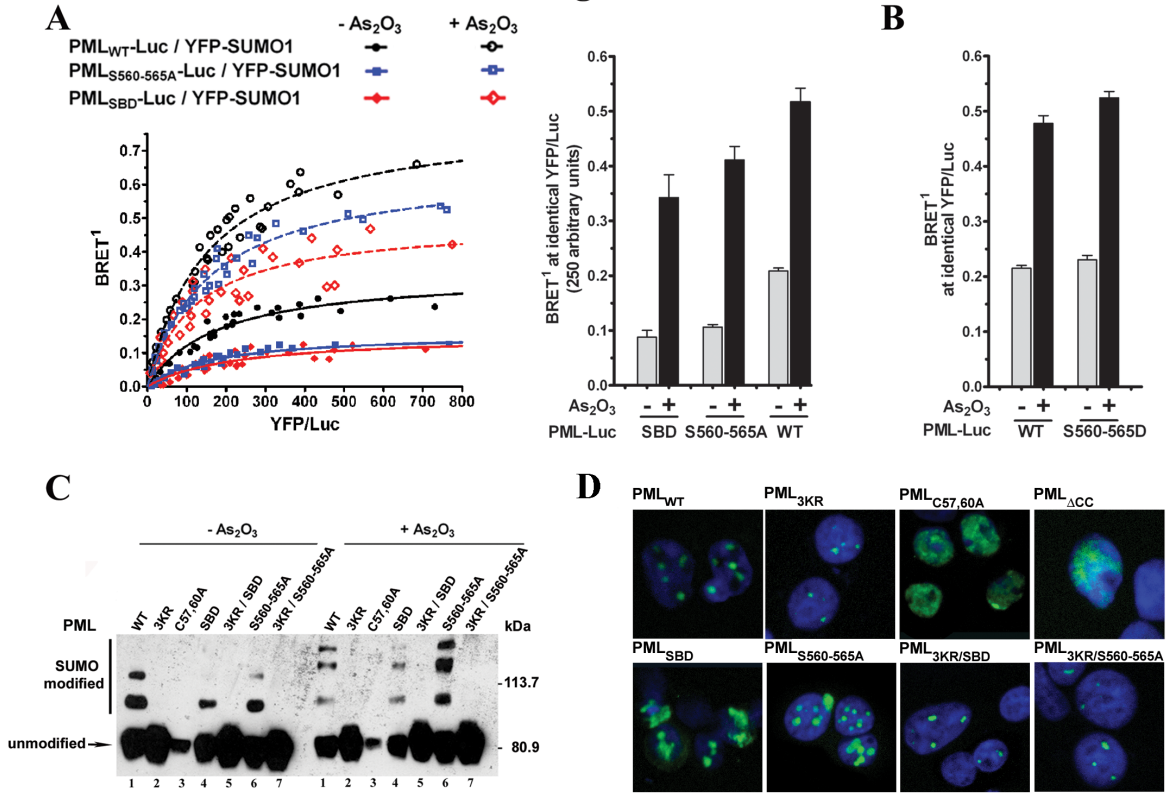


Figure 6

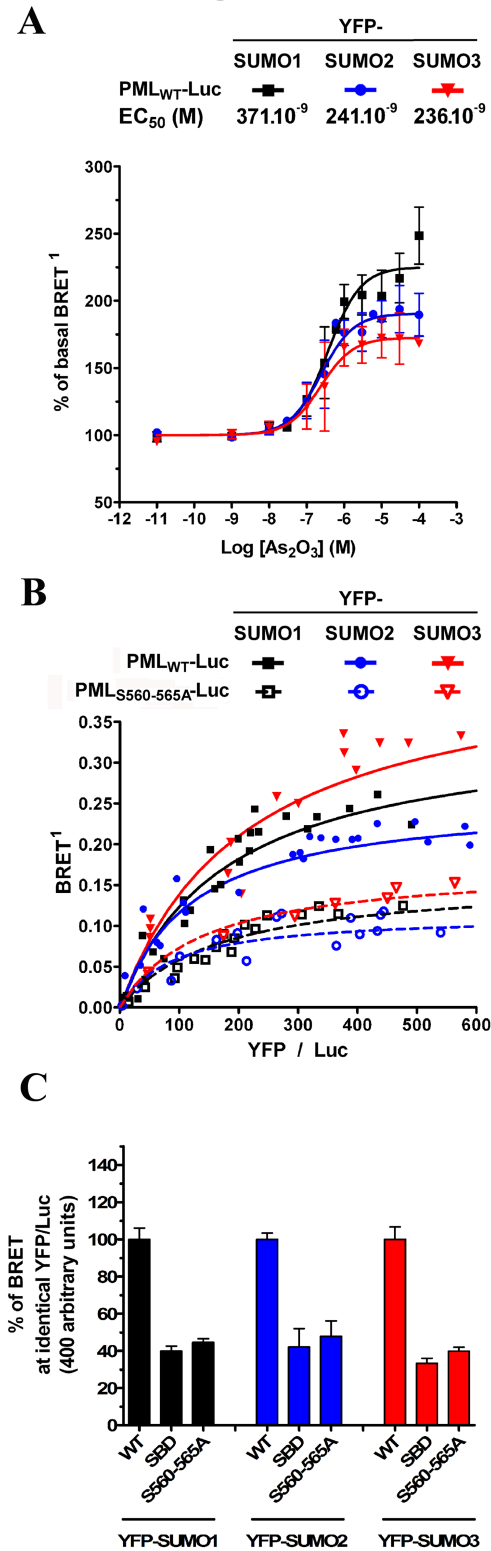


Figure 7

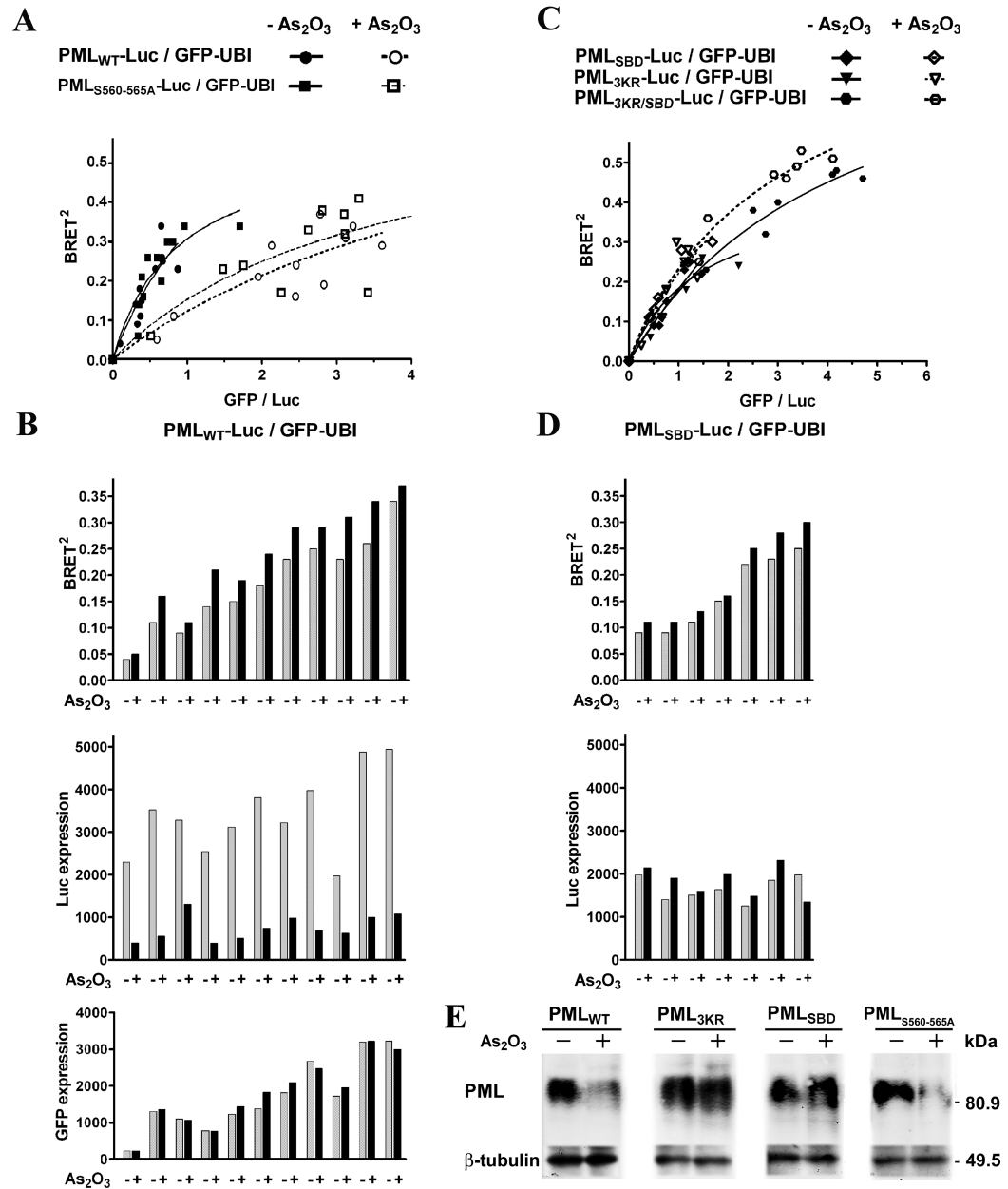
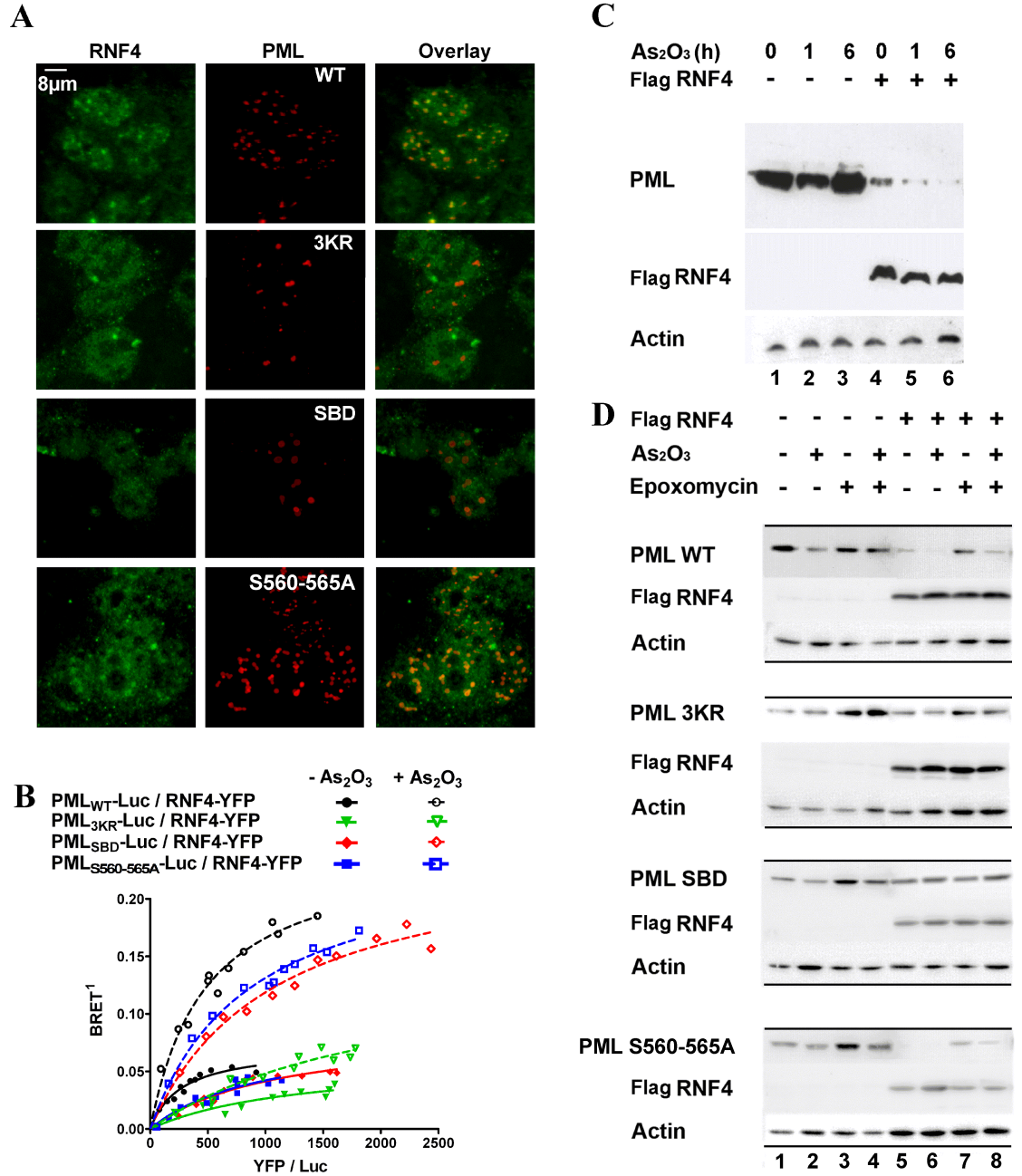
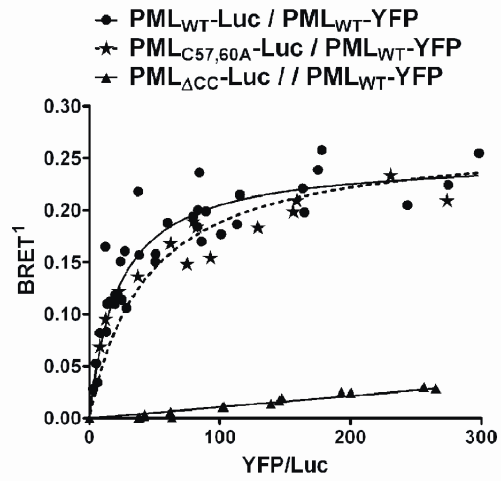


Figure 8

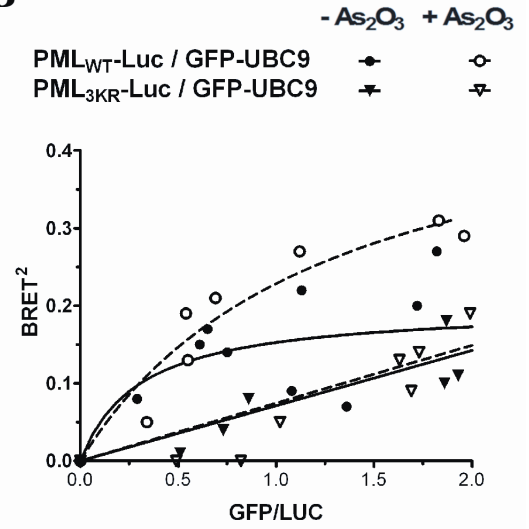


S1

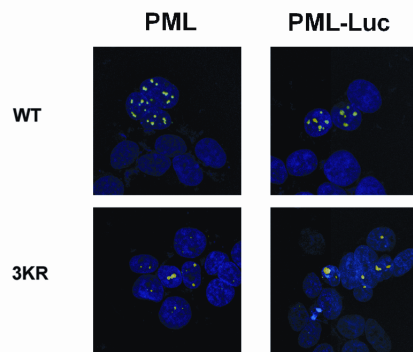
A



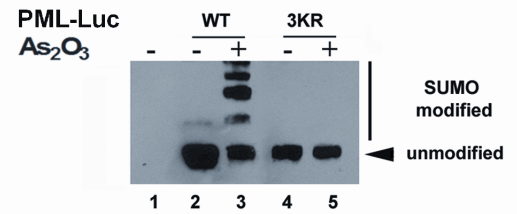
B



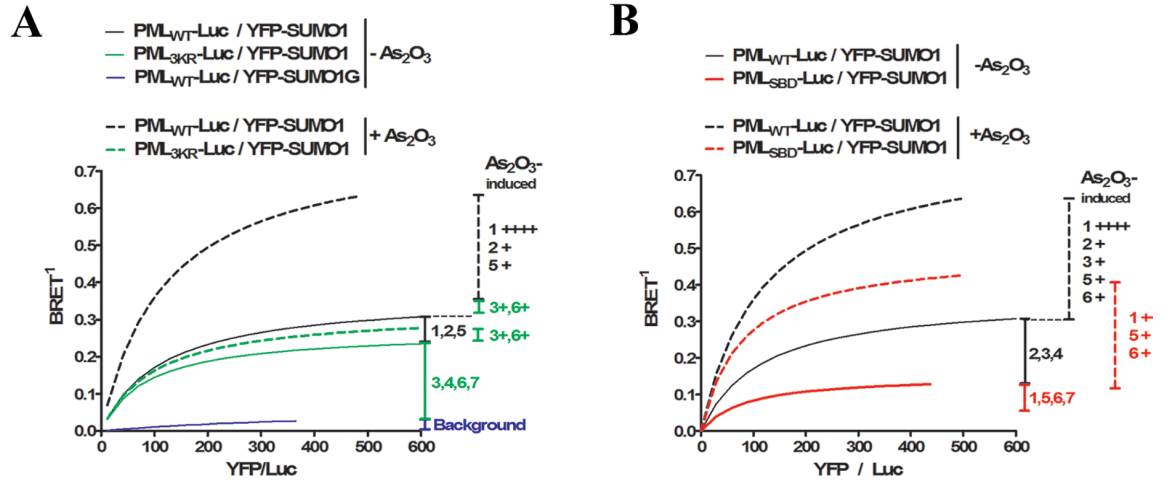
C



D



S2



Chapitre 3: Discussion / Conclusions / Perspectives

Cette thèse, en plus de présenter le développement d'une nouvelle technique permettant l'étude de la sumoylation et des interactions non covalentes avec SUMO dans des cellules vivantes de mammifères (essai BRET^{SUMO}), apporte de nouveaux éléments sur la dégradation RNF4 et/ou As₂O₃-induite de PML, un suppresseur de tumeur dont le gène est transloqué dans la leucémie promyélocytique aiguë (APL). Nos résultats démontrent pour la première fois une implication du domaine de liaison à SUMO (SBD ou SUMO Binding Domain) de PML dans sa dégradation induite par l'As₂O₃ et médiée notamment par RNF4 ainsi qu'une régulation phospho-dépendante des interactions de protéines sumoylées avec ce SBD (SBD phospho-switch). La mise en évidence de cette régulation aurait été très difficile voire impossible, par les méthodes classiques (230). L'essai de BRET^{SUMO} a permis une analyse fine de l'effet de l'As₂O₃ (utilisé dans le traitement des patients APL) sur chacune des interactions PML / SUMO. La sensibilité de cet essai permet d'envisager le criblage à grande échelle (150) d'autres composants pharmacologiques régulant des interactions PML / SUMO et donc l'identification de composés potentiellement thérapeutiques.

1. Utilisation du BRET pour la détection d'interactions protéiques nucléaires non covalentes: avantages

Le premier article présenté dans cette thèse (127) démontre pour la première fois que le BRET peut être utilisé pour la détection d'interactions de protéines appartenant au compartiment nucléaire. Cette étude est réalisée sur des protéines de la famille TRIM (TIF1 α et β), connues pour leur forte propension à agréger. Nous mettons ainsi un terme aux résultats conflictuels de la littérature concernant leur dimérisation (277, 311, 312, 422) puisque le BRET démontre ces interactions dans des cellules vivantes et intactes de

mammifères avec des protéines entières. Les interactions entre TIF1 β et le répresseur putatif ZNF74 de la famille des protéines KRAB-multidoigt de zinc sont également étudiées démontrant que le BRET peut servir à l'étude de facteurs transcriptionnels associés à la matrice nucléaire. Enfin, n'étant pas basé sur la lecture d'une activité de transcription, (comme par exemple les essais classiques de doubles hybrides chez la levure ou dans les cellules de mammifères), le BRET permet l'étude d'interactions *in vivo* de protéines transcriptionnellement actives. Finalement, l'hétérodimérisation entre TIF1 α (le coactivateur de récepteurs nucléaires) et TIF1 β (le corépresseur universel des KRAB-multidoigt de zinc) enfin confirmée, relance le débat d'une possible relation entre ces deux familles de facteurs transcriptionnels importantes, débat timidement soulevé voici une dizaine d'année et malheureusement resté sans autres développements depuis (234, 236).

Cette étude peut être considérée comme un préliminaire à celle présentée dans le second article puisqu'il fallait en tout premier lieu démontrer la validité de l'utilisation du BRET dans le compartiment nucléaire avant de vouloir l'appliquer à la détection des interactions avec SUMO.

2. Utilisation du BRET pour la détection d'interactions covalentes et non-covalentes avec SUMO: Etude pilote avec PML

Alors que l'étude de la sumoylation de TIF1 β était en cours dans le laboratoire (262), nous avons décidé d'appliquer le BRET à l'étude des interactions avec SUMO. Le BRET est principalement utilisé pour détecter des interactions non covalentes, mais une première étude a permis de mettre en évidence le couplage covalent de Ub (ubiquitination) sur des protéines dans des cellules vivantes (316). Similairement, nous avons décidé, par la mise au point d'un essai de BRET^{SUMO}, de détecter *in vivo* le couplage covalent de SUMO à une protéine cible. Nous avons choisi de faire initialement cette étude sur la protéine PML, une protéine appartenant comme les TIF1s à la famille TRIM. En effet, PML est la seule

protéine connue dont la sumoylation peut être induite rapidement, fortement et spécifiquement par un agent pharmacologique, l'As₂O₃ (284, 481) et les 3 lysines cibles de cette sumoylation sont caractérisées (212). De plus, PML possède un domaine de liaison à SUMO (Sumo Binding Domain ou SBD) (375). Le BRET étant un essai basé sur la proximité entre le donneur (Luc) et l'accepteur (YFP ou GFP), nous souhaitons donc valider la possibilité que le BRET permette de détecter à la fois les interactions covalentes (sumoylation) et non-covalentes (dépendantes du SBD) entre PML et SUMO en présence et en absence d'inducteur de la sumoylation.

Le second article de cette thèse présente, en effet, une élégante décomposition du signal BRET généré entre SUMO et PML (respectivement fusionné à YFP/GFP et Luc), étudie l'effet de l'As₂O₃ sur les composantes covalentes et non covalentes du signal et démontre que les sérines cibles de la phosphorylation de PML par CK2 (360) permettent une régulation phospho-dépendante du SBD de PML (SBD phospho-switch). Enfin, un lien important est également établi entre le SBD et la dégradation As₂O₃ et/ou RNF4-induite de PML. Ce lien confirme la participation de la sumoylation de PML à sa dégradation (55, 231, 232, 404). Comme application de l'essai de BRET^{SUMO}, l'identification de nouveaux composés pharmacologiques capable d'induire la sumoylation de PML (potentiellement utilisables chez les patients APL) est actuellement en cours. Enfin, cet essai s'avère très séduisant pour tester les interactions d'autres protéines avec SUMO ainsi que les possibles inducteurs de ces interactions.

3. Utilisation du BRET pour la détection des interactions de PML avec Ub: limitations actuelles

Si la détection des interactions de PML avec SUMO par BRET s'est ici révélée un véritable succès permettant d'importantes avancées sur l'implication du SBD de PML dans sa dégradation As₂O₃ et/ou RNF4-induite et sur la régulation phospho-dépendante de ce SBD (SBD phospho-switch), la détection des interactions de PML avec Ub a rencontré

d'importants obstacles. En effet, la spécificité du signal obtenu entre PML et Ub n'a pu être confirmée de façon rigoureuse, même si la courbe de saturation obtenue suggère une interaction spécifique (résultat non montré). La confirmation de la spécificité et l'identification de la contribution des interactions covalentes et/ou non-covalentes de Ub avec PML au signal détecté n'a pu être obtenue par manque d'un véritable contrôle négatif et du mutant d'ubiquitination de PML (non documenté au moment de nos essais) : voir détails ci-dessous. D'autre part, nous n'avons pu mettre en évidence tel que souhaité initialement le lien séquentiel (ou de compétition) qui pourrait exister entre sumoylation et ubiquitination de PML : des essais préliminaires présentés en annexe (chapitre 3.1 page 274) démontrent une relation entre la sumoylation et le signal BRET détecté entre PML-Luc et GFP-UBI mais nous ne pouvons conclure faute d'avoir totalement caractérisé ce signal. Par contre, cet essai de BRET^{Ubi}, entre PML-Luc et GFP-UBI a constitué un révélateur de la dégradation différentielle existant entre PML et son mutant PML_{SBD} lors d'un traitement par l'As₂O₃ connu pour augmenter la sumoylation de PML (Figure 7 article #2). Dans cet essai, la surexpression de GFP-UBI a probablement accéléré la dégradation induite par l'As₂O₃, rendant la dégradation de PML évidente au moment de la lecture du signal de BRET. En présence de PML-Luc et GFP-SUMO1, aucune dégradation n'était détectable à de si courts temps, même si une augmentation de la sumoylation était clairement évidente.

Pour valider notre essai BRET^{Ubi} avec PML, nous avons prévu l'utilisation de plusieurs contrôles négatifs qui se sont révélés finalement inadéquats. Ces contrôles devaient inclure:

1-Un mutant non ubiquitiné de PML.

Un mutant de serines faisant partie du SBD de PMLIV avait été décrit comme non-ubiquitiné et résistant à la dégradation dépendante de CK2 telle qu'induite par un

choc osmotique ou un traitement aux UV (360). Ce mutant nommé PML_{S560-565A} dans notre étude donne cependant le même signal que PML_{WT} avec GFP-UBI, apparaît ubiquitiné lors de purifications sur colonne de Ni (résultat non montré) et se retrouve dégradé de manière équivalente au WT en présence d'As₂O₃ (Figure 7 article #2). Ce mutant n'a donc pas pu nous servir de contrôle négatif d'ubiquitination comme prévu. Ceci apparaît comme un obstacle dans notre contexte mais apporte également un nouvel élément sur la régulation différente selon la voie d'induction (As₂O₃ / RNF4 versus CK2) et/ou l'isoforme de PML étudiée (discuté ci-dessous chapitre 6 page 223).

Il est maintenant connu que la lysine 401 de PML est un site majeur d'ubiquitination (231) tandis que d'autres lysines ubiquitinables de PML ont été identifiées *in vitro* (K380, K400 et K476) (404). Un mutant de ces lysines cibles de l'ubiquitine pourrait être généré pour servir de contrôle négatif pour l'ubiquitination de PML. Ce mutant n'affecterait cependant probablement pas l'ubiquitination pouvant survenir sur des chaînes de poly-SUMO présentes sur les lysines sumoylables de PML (404) à moins qu'une relation interdépendante existe entre l'ubiquitination de la (des) lysine(s) cible(s) sur PML et celle des chaînes de poly-SUMO. Enfin, ce mutant (similairement au mutant PML_{3KR} dans le cas du BRET^{SUMO}) pourrait conserver un signal BRET provenant d'une interaction non-covalente avec Ub.

2-La construction Luc-NLS.

Une construction Luc-NLS donnait un faible signal non spécifique linéaire avec GFP-SUMO (Figure 1B article #2). Un signal élevé et non linéaire a été cependant obtenu avec la paire Luc-NLS / GFP-UBI (résultat non montré). Sachant que la Luc seule n'est pas ciblée par l'ubiquitination (316), il est possible que le NLS utilisé (celui de SV40 (449)) qui contient plusieurs lysines soit une cible pour

l'ubiquitination. Les lysines situées au sein d'un NLS peuvent être ciblées par diverses MPTs : on sait par exemple qu'une lysine du NLS de PML (K490) correspond à un site de sumoylation (212). Luc-NLS ne constitue donc pas un contrôle négatif d'ubiquitination adéquat.

3-Le mutant non conjugable de l'ubiquitine.

Similairement à la sumoylation, l'ubiquitination nécessite tout d'abord la maturation de l'ubiquitine pour dévoiler les deux glycines C^{tales} impliquées dans la liaison avec la lysine cible (323). Donc, nous avons testé le mutant UBI_{AA}, qui, de façon similaire à SUMO1G dans l'étude de la sumoylation, ne peut plus être mûri et conjugué (316). Malheureusement, le signal généré par la paire PML-Luc / GFP-UBI_{AA} est très élevé et donne une courbe de saturation telle qu'habituellement typique d'une interaction spécifique (résultat non montré). Ce résultat suggère la présence d'un UBD (Ubiquitin Binding Domain) sur PML (155, 173, 189). Comme il existe une quinzaine d'UBDs différents sans séquence consensus et que ce chiffre ne cesse de croître, nous n'avons pas essayé de caractériser ce possible UBD mais il sera intéressant de l'identifier dans l'avenir afin notamment de permettre de différencier ubiquitination et interaction non covalente avec Ub dans l'essai BRET^{Ubi}. A la différence du SBD de PML qui interagit *in vivo* avec des protéines sumoylées mais non avec SUMO libre (Figure 1A article #2), il semble que le possible UBD de PML puisse se lier à une ubiquitine libre et non conjuguée. Il est à noter que nous avons également remarqué par microscopie confocale que ce mutant GFP-UBI_{AA} à la différence de GFP-UBI se trouve relocalisé fortement dans les PML-NBs (résultat non montré). Cette concentration de GFP-Ubi_{AA} aux sites riches en PML peut expliquer que GFP-UBI_{AA} donne un signal supérieur avec PML-Luc à celui de GFP-UBI. Toutefois, un UBD doit être impliqué car ce signal donne

véritablement le profil d'une courbe de saturation du à une interaction spécifique (et non linéaire du à un bystander BRET).

Il est à noter que lors de cette étude, nous avons utilisé la même construction GFP-UBI que celle utilisée par Perroy *et al.* (316) en 2004 soit la construction contenant une ubiquitine dont les lysines K48 et K63 sont mutées (par opposition au GFP-UBI_{WT}). Cette construction avait été alors utilisée pour tester par BRET l'ubiquitination d'une protéine membranaire monoubiquitinée. Les lysines K48 et K63 ont été mutées car à l'époque, ces lysines étaient considérées comme les lysines majoritairement (si ce n'est exclusivement) impliquées dans la formation des chaînes de polyubiquitination (cf. chapitre **1.2.1.5.1** page 51). On sait par contre maintenant que toutes les lysines de Ub (excepté K63 (178, 186)) peuvent être impliquées dans la formation de chaînes de polyubiquitination et participer à une dégradation protéasome-dépendante (313) et (455). D'autre part, la construction GFP-UBI_{WT} avait été testée et donnait des signaux de BRET faibles probablement du au 'quenching' résultant de la quantité trop importante de GFP-UBI_{WT} à proximité de la fusion Luc lors de la formation de chaînes de polyubiquitination.

Nous souhaitions donc initialement détecter le signal provenant d'une monoubiquitination de PML avec GFP-UBI. Cependant, clairement, les Western-blots obtenus à partir d'extraits de cellules transfectées avec la paire PML-Luc / GFP-UBI montrent au minimum 5 bandes de poids moléculaire supérieur à celui de PML-Luc non modifié (résultat non montré). Ceci suggère que PML est mono-ubiquitinée sur plusieurs lysines (multi-ubiquitinée) et/ou polyubiquitinée (par des chaînes n'impliquant pas les lysines K48 et K64 ou ayant intégré de l'ubiquitine endogène. Quoiqu'il en soit, la surexpression de cette construction GFP-UBI accélère la dégradation induite par l'As₂O₃ de PML. Bien qu'il ait été montré très récemment qu'une concentration importante de mono-ubiquitination sur une protéine peut être un signal de dégradation (223), il apparaît probable que certaines formes de haut poids moléculaires correspondent à des formes de poly-

ubiquitination. Récemment, une étude par spectrométrie de masse a démontré que PML est modifiée par des chaînes d'ubiquitine impliquant principalement les lysines 48,63 mais aussi la lysine 11 qui est intacte dans notre construction GFP-UBI (404). Il sera intéressant de tester un mutant de l'ubiquitine qui a ses 7 lysines mutées afin de déterminer si PML est monoubiquitinée, si sa monoubiquitination peut être induite par l' As_2O_3 et peut participer à sa dégradation. La place de la polyubiquitination dans ce processus de dégradation pourra être testée par des mutants de lysines (K48, K63, et K11) individuelles ou combinées. Enfin la relation sumoylation / ubiquitination de PML pourra être investie en combinant des essais de BRET¹ et BRET² de façon similaire à ceux présentés en annexe chapitre 3.1 page 274.

En conclusion, pour tirer le maximum d'information de l'étude des interactions de PML et UBI par BRET, il est requis de poursuivre le développement de cet essai en générant notamment comme mentionnée ci-dessus, les contrôles qui vont nous permettre :

1) d'évaluer la contribution relative de l'ubiquitination (interaction covalente) et de l'interaction non covalente PML/Ub (de voir comment évoluent chacune de ces composantes après traitement à l' As_2O_3) et,

2) de distinguer la monoubiquitination et la polyubiquitination. Il sera alors possible de poursuivre l'étude de l'ubiquitination et de la sumoylation de façon simultanée en temps réel dans des cellules exprimant PML-Luc, GFP-UBI (détectable par BRET²) et YFP-SUMO (détectable par BRET¹) tel qu'amorcé durant cette thèse à titre de preuve de concept dans le chapitre 3.1 de l'annexe page 274.

4. Modèle issu de notre étude sur la dégradation As₂O₃- induite de PML : importance de la sumoylation de PML par SUMO1 et de son SBD

Jusqu'à récemment, la sumoylation de PML par la paraforme SUMO1 a été la seule bien caractérisée. Valérie Lallemand-Breitenbach dans son étude de 2001 avance que la modification de PML par SUMO1 participe à sa dégradation As₂O₃-induite (232), le mutant PML_{3KR} résistant à cette dégradation. Ce n'est qu'en 2005, qu'il a été démontré que la modification de PML par SUMO2 et 3 existe et que SUMO3 est de plus nécessaire au maintien des PML-NBs. SUMO1 ou SUMO2 ne peuvent compenser la perte de SUMO3 (par action d'un siRNA) conférant ainsi un rôle unique à cette paraforme (120). Malheureusement cet article ne teste pas l'effet de l'As₂O₃ sur cette sumoylation par SUMO3. Plus récemment deux articles étudiant la dégradation induite par l'As₂O₃ et/ou RNF4 ont démontré que SUMO1 et SUMO2/3 sont essentiels à cette dégradation tout comme l'intégrité de la lysine 160 (siRNA contre les différentes paraformes de SUMO et études de spectrométrie de masse combinées à des observations des simples mutants de lysines de sumoylation de PML) (231, 404).

Il apparaît maintenant que RNF4 reconnaît grâce à ses quatre SBDs des chaînes de polySUMO2/3 sur la lysine K160 ce qui lui permet par la suite d'ubiquitiner la polychaîne de SUMO et possiblement la lysine 401 de PML grâce à son activité E3 UBI ligase entraînant ainsi la dégradation de PML (404). L'As₂O₃ stimule cette dégradation induite par RNF4 en augmentant le ratio de polychaînes SUMO2/3 et en induisant une sumoylation par SUMO1 des lysines K160 et K65 (peu ou non détectable avant traitement à l'As₂O₃; (231) et nos résultats Figure 2E, 2A, 2B article #2).

Bien que le rôle des polychaînes de SUMO2 sur PML dans le recrutement de la E3 UBI ligase RNF4 par ses 4 SBDs aît été démontré dans ces articles, le rôle de la sumoylation par SUMO1 induite par l'As₂O₃ n'a pas été défini. Selon le groupe de De Thé

(231), la dégradation As_2O_3 / RNF4 dépendante serait médiée par la modification par SUMO2 de la lysine 160 avec une modification par SUMO1 de la lysine 65 qui aiderait au processus de dégradation. Selon le groupe de Hay (404), la dégradation serait médiée par une terminaison de chaîne par SUMO1 sur une polychaîne SUMO2/3 sur la lysine 160. Cette capacité de SUMO1 à terminer des polychaînes de SUMO2/3 a récemment été mise en évidence (communication personnelle du Dr. A.C.O. Vertegaal lors du congrès "The Ubiquitin Family" à CSHL, NY, avril 2007) et on peut penser que l' As_2O_3 pourrait stimuler ce processus.

Ces deux possibilités sont simultanément représentées dans la Figure 31 below extraite de (317) :

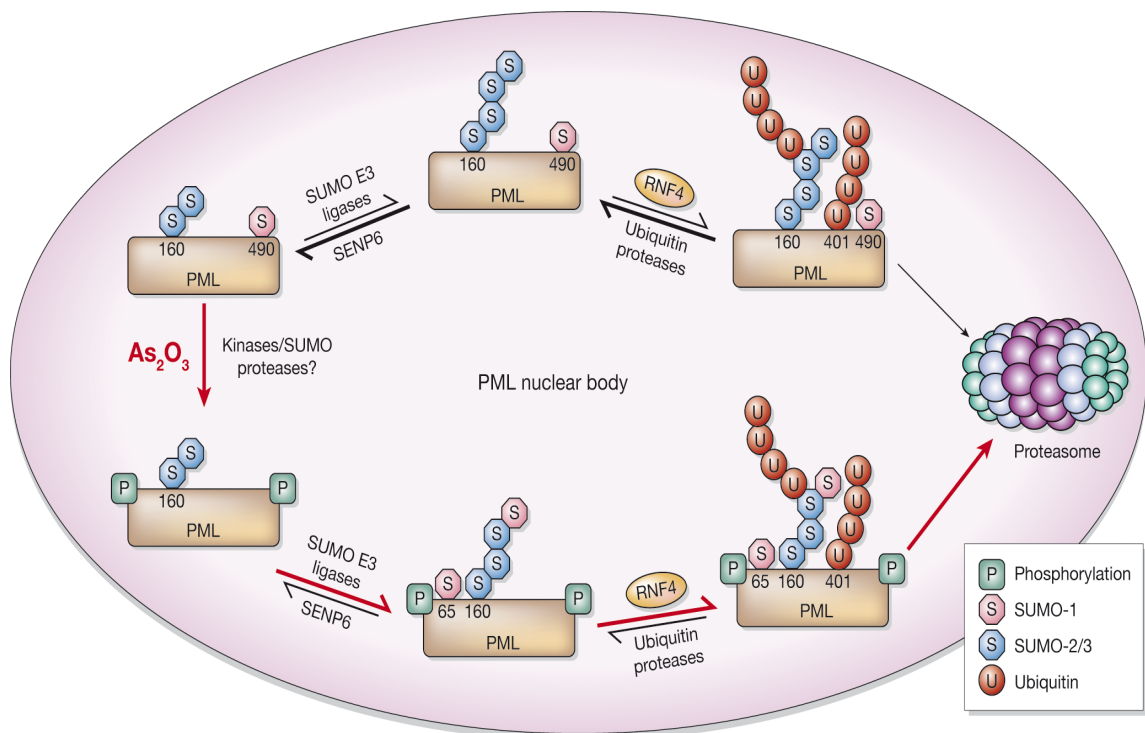


Figure 31 : Modèle suggéré par (317) pour la dégradation RNF4 induite (voie du haut représentée en A) ou As_2O_3 / RNF4 induite (voie du bas représentée en B) suite aux résultats de (404) et (231).

4.1 Modèle du rôle stimulateur de SUMO1 sur l'interaction PML sumoylé / PML SBD : Implication dans la dégradation induite par l'As₂O₃

Tel que souligné par Petrie et Zelent (317), étant donné qu'une terminaison de polychaînes SUMO2 par un SUMO1 n'est pas requise pour l'interaction avec les 4 SBDs de RNF4 afin d'ubiquitiner PML, cette terminaison de chaîne par SUMO1 doit servir un autre but (317).

Nous suggérons (voir modèle Figure 32 page 215) :

1) que la modification de PML par SUMO1 induite par l'As₂O₃ favorise son interaction avec le SBD de PML au niveau des PML-NBs au détriment de l'interaction avec d'autres protéines sumoylées et,

2) que cette interaction est impliquée dans la dégradation de PML induite par l'As₂O₃ et/ou RNF4.

Cette hypothèse se base sur l'intégration de plusieurs de nos observations et des conclusions tirées de nos résultats soit :

- la démonstration de la participation du SBD de PML à la dégradation induite par l'As₂O₃ et RNF4 (figures 7 et 8 article #2) puisque le mutant PML_{SBD} (tout comme PML_{3K}) est résistant à cette dégradation.

- le fait que la résistance de PML_{SBD} à la dégradation ne s'explique pas par une interaction diminuée avec RNF4 puisqu'elle est comparable à PML_{S560-565A} et PML_{WT} qui dégradent efficacement (Figure 8B de l'article #2).

- la mise en évidence que PML_{WT} et PML_{S560-565A} ont un profil de localisation semblable, où l'intégrité des PML-NBs est conservée, qui est différent de celui de PML_{SBD} et PML_{3K} où l'intégrité des PML-NBs est compromise (Figure 8A et 5D de l'article #2). Etant donné que l'interaction PML sumoylé / PML SBD est importante dans le maintien de

l'intégrité des PML-NBs (375), nous suggérons que la capacité de lier PML sumoylé est préservé chez le mutant PML_{S560-565A} mais pas chez le mutant PML_{SBD} ce qui expliquerait que ce dernier ne soit pas localisé aux PML-NBs et ne soit pas dégradé même s'il est capable d'interagir avec RNF4 (Figure 8B de l'article #2). Nous suggérons que la dégradation induite par l'As₂O₃ et/ou RNF4 requiert une localisation de PML au sein des PML-NBs.

- l'observation que PML_{WT} et PML_{S560-565A} présentent sur gel un profil de sumoylation (basale et As₂O₃-induite) semblable mais différente de celle de PML_{SBD} et PML_{3K} (Figure 5C de l'article #2). En effet, il nous apparaît important de relever que selon les profils de BRET^{SUMO} le mutant PML_{S560-565A} semble préserver une interaction inductible par l'As₂O₃ de façon tout à fait identique à PML_{WT} alors qu'il perd la plus grande partie de ses interactions SBD-dépendantes (Figure 5A de l'article #2). La différence d'amplitude du signal d'induction de PML_{WT} et PML_{S560-565A} avec PML_{SBD} est faible mais tout à fait reproductible, et significative car d'amplitude attendue (composantes #2 et 3 de notre signal BRET). Ceci est en faveur de l'hypothèse que l'interaction de PML sumoylé avec le SBD de PML est préservée chez le mutant PML_{S560-565A}.

Ce mutant conserve certaines interactions SBD dépendantes inductibles par As₂O₃ qui lui permettent d'avoir un profil de localisation (Figure 8A et 5D article #2), une sumoylation (Figure 5C article #2) ainsi qu'une dégradation As₂O₃-induite (Figure 7A article #2) similaires à PML_{WT}. Le mutant PML_{S560-565A} perdrait en fait possiblement toutes ses interactions SBD-dépendantes mais conserverait son interaction SBD dépendante avec PML sumoylé par SUMO1.

- la mise en évidence que la sumoylation de PML par SUMO1 est détectable seulement en présence d'As₂O₃ par spectrométrie de masse (231). Dans notre essai de BRET^{SUMO}, le niveau de sumoylation de PML par SUMO1 augmente de 16 fois après l'addition d'As₂O₃ alors que la sumoylation de PML ne représente qu'une composante

mineure du signal de BRET en l'absence d'As₂O₃ (Figure 2A, 2B, composante #1 Figure 4E et S2A).

- le fait qu'une dégradation de PML par simple surexpression de SUMO1 a été observée lors de certains de nos essais (résultats non montrés).

En bref, alors qu'il avait été démontré que la modification de PML par SUMO1 participe à sa dégradation (232), nos études suggèrent que le recrutement de PML sumoylé par SUMO1 via le SBD de PML aux PML-NBs est aussi requis pour la dégradation induite par l'As₂O₃ et/ou RNF4. Des études de dimérisation de PML et ses mutants avec coexpression de SUMO1 et traitement à l'As₂O₃ sont actuellement en cours pour mieux appuyer ce modèle.

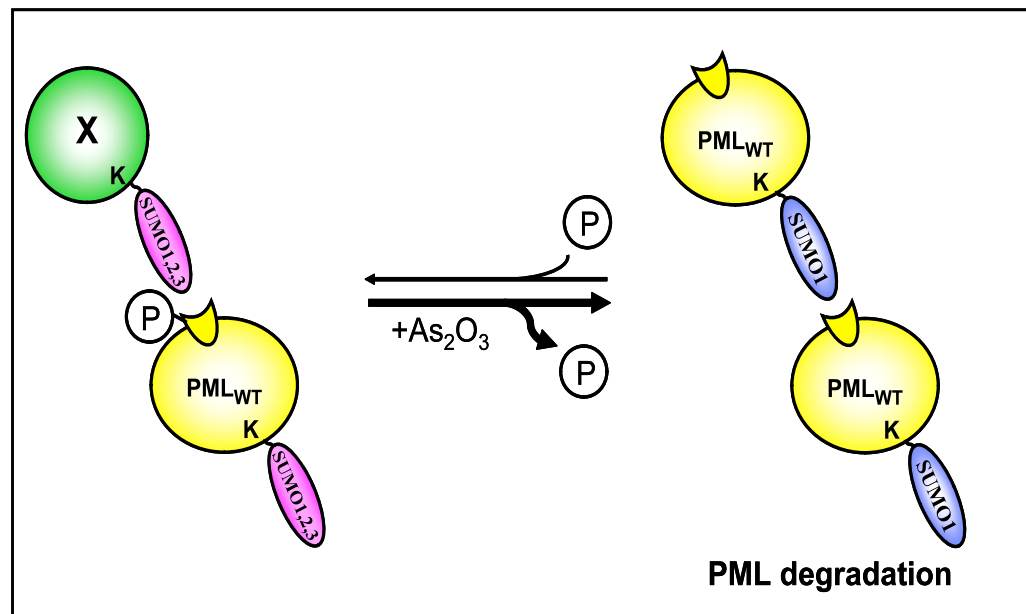


Figure 32 : Modèle du rôle stimulateur de SUMO1 sur l'interaction PML sumoylé / PML SBD au niveau des PML-NBs et de la phospho-dépendance de cette interaction qui conduit à la dégradation As₂O₃-induite de PML

Le SBD de PML interagit similairement avec un ensemble de protéines sumoylées par SUMO1, 2, 3 (Figure 6B article #2). L'As₂O₃ induit une sumoylation de PML par SUMO1 (au bout d'une polychaîne SUMO2/3 et/ou directement sur une lysine de PML, la K160 étant particulièrement déterminante dans ce processus) qui favorise l'interaction de PML sumoylé avec le SBD de PML au niveau des PML-NBs au détriment des interactions avec d'autres protéines sumoylées. Cette interaction conduit à une dégradation As₂O₃ induite possiblement parce qu'elle est déterminante pour le recrutement d'une E3 UBI ligase telle RNF4 ou que PML exerce lui-même cette activité. La dégradation pourrait aussi être dépendante du statut de phosphorylation du SBD de PML ('SBD phospho-switch') via une régulation de l'interaction préférentielle du SBD avec SUMO1.

4.2 Un rôle de la phosphorylation des sérines du SBD dans la discrimination de son interaction avec les protéines sumoylées par SUMO1 ou ses paralogues ?

Il apparaît que l'état de phosphorylation des sérines mutés chez PML_{S560-565A} puisse réguler les interactions non covalentes de protéines sumoylées avec le SBD de PML (SBD phospho-switch). En effet, un mutant phosphomimétique retrouve les interactions non-covalentes abolies chez le mutant PML_{S560-565A} (Figure 5A et B de l'article #2). Des études sur l'état de phosphorylation de ces sérines sous l'effet de l'As₂O₃ devront être menées afin de vérifier si une déphosphorylation est observable sous l'effet de cette drogue (modèle Figure 32 page 215).

Une étude RMN démontre que le SBD de la SUMO E3 ligase PIASxα lie SUMO1 et SUMO2 avec la même force (similairement à PML qui lie de façon comparable SUMO1,2 et 3 par son SBD: Figure 6C article #2) mais que la liaison à SUMO1 peut-être influencée par la phosphorylation et le stretch d'acides aminés situés à l'intérieur du SBD (162). Ainsi à la fois la phosphorylation des sérines et le stretch d'acides aminés acides seraient importants pour favoriser l'interaction avec SUMO1 alors que l'interaction avec SUMO2 ne serait pas influencée. Dans cette étude, une protéine, TTRAP, qui ne contient pas de stretch d'acides aminés acides interagit de façon prédominante avec SUMO2. PML ne présente pas de véritable stretch d'acides aminés acides tel qu'existant dans

PIAS1,2,3,4,sp100 etc. mais seulement quelques acides aminés acides tel que TTRAP (162). Avec ces informations, il serait vraiment intéressant de savoir si les autres protéines sumoylées interagissant avec le SBD de PML sont majoritairement modifiées par SUMO2. Suite au traitement à l'As₂O₃, la phosphorylation du SBD pourrait changer et une interaction avec SUMO1 pourrait être favorisée. Combinée à l'importante induction de la sumoylation de PML par SUMO1 sous As₂O₃ (les autres protéines n'ont jamais eu de sumoylation induite par As₂O₃ documentée), cette interaction PML sumoylée par SUMO1 / PML SBD pourrait être favorisée par l'état de phosphorylation du SBD et donc le SBD phospho-switch serait directement impliqué dans la dégradation As₂O₃ induite.

Nous proposons que bien que le SBD de PML puisse interagir similairement avec les 3 paralogues de SUMO (Figure 6C article #2), le traitement par As₂O₃ résulte en une stimulation très importante de la sumoylation de PML par SUMO1, favorisant ainsi son interaction avec le SBD de PML et sa subséquente dégradation.

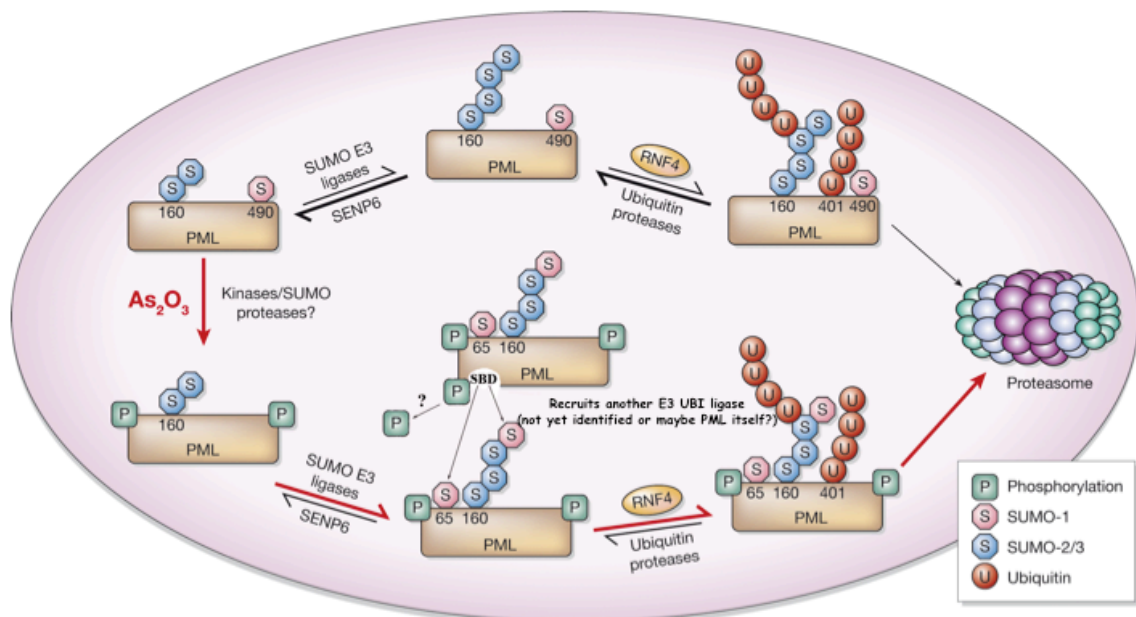
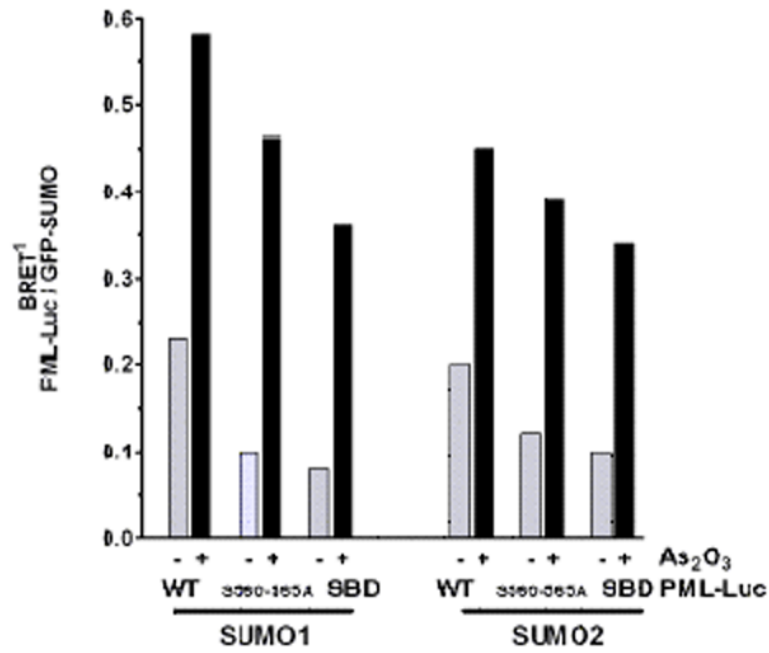
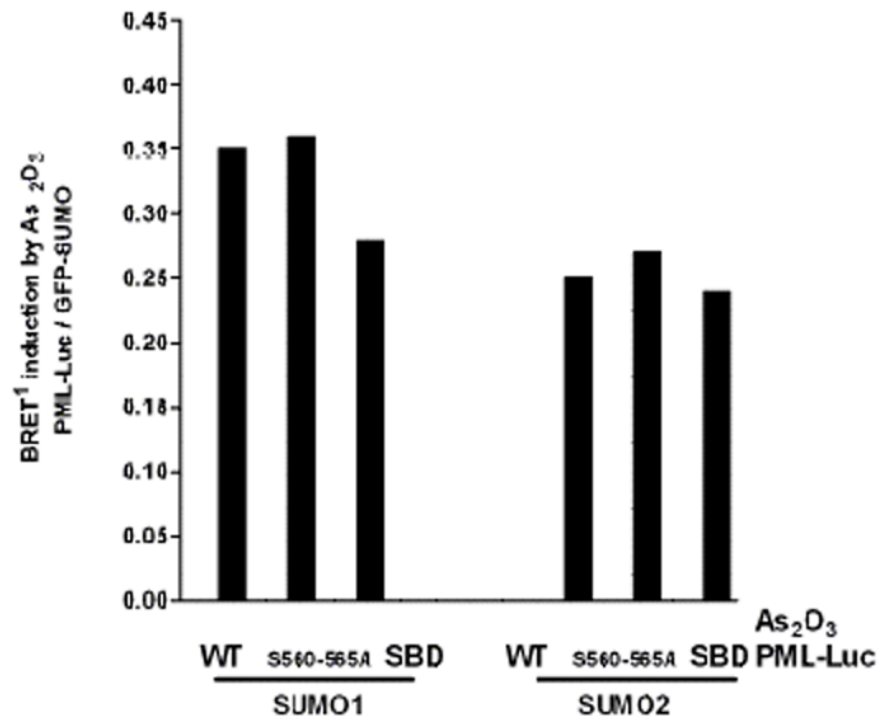


Figure 33 : Adaptation du modèle de Pétrie et Zélent (317) (présenté en Figure 31 page 212) suite à nos résultats.

Si tel est le cas, l'interaction non-covalente du SBD de PML avec PML sumoylé devrait augmenter en présence d' As_2O_3 dans le cas où PML est sumoylé par SUMO1 mais pas quand PML est sumoylé par SUMO2. Ceci devrait pouvoir être mis en évidence en comparant l'accroissement du signal de BRET après ajout d' As_2O_3 pour PML_{WT} et son mutant PML_{SBD} en paires avec d'une part SUMO1 et d'autre part SUMO2. Effectivement, comme montré dans la Figure 34 page 218, l'interaction inductible par l' As_2O_3 est supérieure pour les mutants PML_{WT} et $\text{PML}_{\text{S560-565A}}$ comparativement au mutant PML_{SBD} quand SUMO1, mais non SUMO2, est utilisé. Cela suggère une interaction accrue de PML sumoylé par SUMO1 avec le SBD de PML et ce, en absence de phosphorylation des sérines du SBD.

Figure 34 (page suivante) : Induction par As_2O_3 du signal BRET entre les paires PML (WT, S560-565A, ou SBD)-Luc / YFP-SUMO (1 ou 2).

Le graphe A est réalisé à partir de données de courbes de saturation à un même rapport YFP/Luc. Le graphe B est dérivé du graphe A; il représente la différence entre le signal obtenu en absence d' As_2O_3 et celui obtenu en présence d' As_2O_3 . Contrairement au résultat obtenu avec SUMO2, avec le paralogue SUMO1, l'interaction inductible par l' As_2O_3 est supérieure pour les mutants PML_{WT} et $\text{PML}_{\text{S560-565A}}$ comparativement au mutant PML_{SBD} . Cela suggère une interaction accrue de PML sumoylé par SUMO1 avec le SBD de PML et ce, en absence de phosphorylation des sérines du SBD.

A**B**

4.3 Rôle envisageable de PML comme E3 ubiquitine ligase et implication dans la dégradation induite par l'As₂O₃

Pour expliquer l'importance de l'interaction entre PML sumoylé par SUMO1 et le SBD de PML dans la dégradation As₂O₃ / RNF4 induite de PML, deux possibilités non exclusives peuvent alors être envisagées:

- 1) l'interaction PML sumoylé par SUMO1 / PML SBD permet de maintenir l'intégrité des PML-NBs (tel que récemment démontré (375)) nécessaire au recrutement d'une autre E3 UBI ligase,
- 2) l'interaction PML sumoylé par SUMO1 / PML SBD permet à PML d'exercer lui-même directement une possible activité E3 auto UBI ligase.

Si l'ubiquitination intervient pour conduire à la dégradation, il est logique de supposer que cette interaction si importante entre PML sumoylé par SUMO1 et le SBD de PML permette le recrutement d'une activité E3 UBI ligase responsable de l'ubiquitination puis de la dégradation protéasome-dépendante de PML. Toutefois, bien que PML possède un domaine RING connu pour avoir cette possible fonction, l'activité E3 UBI ligase de PML n'a jamais été investie. Étant donné que PML_{SBD} et PML_{S560-565A} recrutent de façon similaire RNF4 et que ces interactions sont similairement modulées par l'As₂O₃ (Figure 8B, article#2), qu'il est de plus documenté que la sumoylation de PML par SUMO1 n'est pas impliquée dans le recrutement de RNF4 (404), la piste du recrutement (supplémentaire à celui de RNF4) d'une autre E3 UBI ligase ou celle de PML agissant directement comme E3 UBI ligase devront être sérieusement investies.

Le profil de sumoylation de la figure 5C de l'article #2 pourrait également appuyer cette hypothèse:

Les deux bandes annotées "SUMO-modified" visibles sans induction par As_2O_3 pour PML_{WT} et $PML_{S560-565A}$ (piste 1 et 6) représentent la sumoylation sans induction. L'induction par As_2O_3 permet de visualiser ces mêmes bandes avec un poids moléculaire légèrement plus élevé, ce qui peut être attribuable à l'ajout de SUMO1 (au bout d'une chaîne polySUMO2/3 selon le modèle de Pétrie et Zérent, Figure 31 page 212), une troisième bande de poids moléculaire très élevée apparaît également. Dans le cas de PML_{3KR} aucune bande n'est visible avec et sans induction, ce qui est attendu puisque aucune sumoylation n'est possible, les trois sites cibles de sumoylation étant mutés. De façon intéressante, la sumoylation basale de PML est compromise lors de l'absence de son SBD. En effet, PML_{SBD} présente une sumoylation basale défailante (une seule bande au lieu de deux sans induction piste 4), ce qui peut être attribuable au fait que la SUMO E2 (UBC9) ou la SUMO E3 ait besoin d'une interaction SBD dépendante avec le SBD de PML pour le sumoyler totalement (ce qui a déjà été observé entre le SBD de sp100 et UBC9 sumoylé : communication personnelle du Dr. A. Pichler lors du congrès "The Ubiquitin Family" à CSHL, NY, avril 2007). Récemment, la liaison SBD dépendante à SUMO d'une protéine cible a été documentée comme permettant la reconnaissance du substrat et même la sélection du paralogue pour la sumoylation (480) : il se peut donc que cette sumoylation basale soit partiellement déficiente à cause de l'absence du SBD. L'induction par As_2O_3 et donc la sumoylation par SUMO1 est toutefois non compromise par l'absence de SBD : on remarque que les deux bandes présentes lors de la sumoylation induite par As_2O_3 sont comparables à PML_{WT} et $PML_{S560-565A}$ (piste 4 versus 1 et 6). Ceci a été également observé avec nos courbes de saturation de BRET (Figure 3A de l'article #2). Toutefois, de façon remarquable, la bande de plus haut poids moléculaire est très faiblement détectée voire absente. Ceci appuie la possibilité que PML soit une auto UBI E3 ligase dont l'activité requiert un recrutement par son SBD de PML sumoylé par SUMO1. Cette possible activité auto E3 UBI ligase sera difficile à démontrer car pour se faire, le

RING doit être muté mais la mutation du domaine RING (mutant PML_{C57,60A}) altère aussi la dimérisation de PML, sa localisation, la destructuration des PML-NBs, la perte de la sumoylation de PML etc. D'autres études sont requises pour tester cette activité de PML et son rôle possible dans la dégradation induite par l'As₂O₃.

En conclusion, le SBD de PML déjà impliqué dans la formation des PML-NBs (375), se retrouve donc ici également impliqué au cœur de la dégradation RNF4 et As₂O₃ induite. Il est aujourd'hui important de savoir si une activité E3 UBI ligase de PML est en jeu ou si seule l'intégrité des PML-NBs est importante pour cette induction de la dégradation de PML à la fois dépendante de sa sumoylation par SUMO1 et de son SBD.

5. Importance de la lysine K160 : un pas plus loin dans notre modèle

K160 et K490 semblent avoir un rôle unique et important dans la sumoylation et la dégradation de PML (55, 120, 232). Il est intéressant de noter que SENP5, une protéase SUMO spécifique, peut enlever les chaînes polySUMO2/3 de K160 ou K490. Toutefois, SENP5 ne peut enlever SUMO1 de ces mêmes lysines. Par contre SENP5 peut enlever SUMO1, 2 ou 3 de la lysine K65 de PML (134). Ainsi, il est envisageable que l'As₂O₃ induise une sumoylation par SUMO1 sur K160 et/ou K490 à la fin d'une polychaîne SUMO2/3 ou directement sur K160 et/ou K490 (la polychaîne SUMO2/3 sur K160 (231) pourrait éventuellement être enlevée par une protéase SUMO spécifique telle que SENP5). Ce type d'équilibre entre la conjugaison SUMO1 et SUMO2/3 sur PML régulable par des protéases SUMO-spécifiques a aussi été documenté pour une autre protéase SUMO spécifique : SUSP1 aussi appelée SENP6, qui semble de plus, impliquée dans la maintenance des PML-NBs ((280) et modèle extrait de (317)).

De façon remarquable, la lysine 160 semble au cœur du processus de dégradation de PML induit par l'As₂O₃. Dès 2001, Valérie Lallemand-Breitenbach souligne son

importance en démontrant que la perte de ce site empêche la réponse à l'As₂O₃ (232). Ce même groupe a publié récemment une étude par spectrométrie de masse démontrant que la sumoylation de la lysine 160 est essentielle à la dégradation induite par l'As₂O₃ (231). De notre côté, il est clairement démontré que cette lysine est essentielle à la sumoylation par SUMO1 après traitement à l'As₂O₃ (Figure 2E de l'article #2).

K160 apparaît donc essentielle pour l'organisation des PML-NBs ((55, 231, 232) et nos résultats) : elle est impliquée dans la dégradation de PML et donc la probable désagrégation des PML-NBs lorsqu'associée à SUMO1 et dans le maintien des PML-NBs lorsque associée à SUMO3 (120). Ainsi SUMO1 et SUMO3 pourraient entretenir une unique relation antagoniste au niveau de cette lysine.

L'importance des différentes lysines cibles pour la sumoylation de PML dans la dégradation induite par l'As₂O₃ pourra être disséquée par l'étude de combinaisons de simples ou doubles mutants de ces lysines avec les trois paralogues de SUMO par BRET. Il est désormais clair que la modification par SUMO1 de la lysine K160 est impliquée dans la dégradation de PML ((55, 232) et nos résultats) soit pour son rôle unique soit pour une modification nécessaire et précédente à celles subséquentes sur K490 et/ou K65 tel que suggéré dans l'article #2.

6. Régulation du SBD par les sérines cibles de phosphorylation (SBD phospho-switch): dégradation différente selon la voie de dégradation empruntée (CK2 versus As₂O₃/RNF4) et/ou l'isoforme de PML (III versus IV) ?

Scaglioni *et al.* ont démontré que la phosphorylation de PML IV sur les sérines 517 (et 512,513,514) est requise pour la dégradation CK2-induite de PML (360). Ici, nos

études, réalisées avec l'isoforme PMLIII, démontrent que ces sérines (565 et 560,561,562) ne sont pas nécessaires pour la dégradation As_2O_3 / RNF4-induite (Figures 7 et 8 article #2).

Ces études nous ont amené à suggérer que la phosphorylation des sérines du SBD est essentielle pour la dégradation par la voie de CK2 mais non pour la dégradation par la voie de l' As_2O_3 et/ou RNF4 (article # 2). Afin de conclure de façon définitive, il serait important de vérifier que ces différences ne sont pas dues au fait que des isoformes différentes de PML ont été utilisées dans l'étude avec CK2 et dans notre étude avec l' As_2O_3 / RNF4. En effet, il est déjà connu que les diverses isoformes de PML peuvent présenter des différences fonctionnelles (116, 148, 197, 433). Par exemple, il a tout d'abord été documenté que PMLIV recrute RNF4 du nucléoplasme aux PML-NBs alors que PMLIII ne modifie pas sa distribution (148). La dégradation de PMLIII et de ses mutants (utilisés dans notre étude) devra être étudiés dans les conditions d'activation de la voie CK2 tandis que la dégradation de PMLIV et de ses mutants devra être testée en présence d' As_2O_3 . Ces études permettront de confirmer si la participation des sérines S517 et 512-513-514 (isoforme IV) / S565 et 560-561-562 (isoforme III) est différenciellement impliquée dans la dégradation de PML selon l'isoforme et/ou selon la voie de dégradation testée.

Bien que nos résultats aient mis en évidence la participation du SBD de PML à la dégradation As_2O_3 / RNF4 induite, ainsi que la régulation phosphodépendante du SBD, nous n'avons pu confirmer si la déphosphorylation des sérines est requise pour la dégradation induite par l' As_2O_3 et ou RNF4. Comme mentionné à la section 4.2 page 215, il reste au préalable à déterminer si l' As_2O_3 modifie l'état de phosphorylation de ces sérines. Il peut s'avérer utile d'effectuer ses expériences autant avec l'isoforme PMLIII que l'isoforme PMLIV. Nous saurons ainsi si le traitement à l' As_2O_3 entraîne un SBD phospho-switch de PMLIV ou si l'induction de la voie CK2 entraîne un SBD phospho-switch de PMLIII lié à leur subséquente dégradation.

7. Relation ubiquitine / SUMO: une synergie mise à jour qui soulève encore beaucoup de questions

Le lien très étroit de collaboration entre sumoylation et ubiquitination vient tout juste d'émerger. Auparavant, dans le contexte littéraire récent, les exemples démontraient plutôt un effet stabilisant de SUMO antagonisant la dégradation amenée par Ub. Le très largement documenté modèle de I κ B α , par exemple, montre que cette protéine est sumoylée et ubiquitinée et que la sumoylation entraîne une résistance à la dégradation (94). La possibilité que la sumoylation amène la dégradation est un concept très récent apparu en même temps que la découverte de RNF4, une E3 UBI ligase ayant une forte affinité pour les chaînes sumoylées (148, 149). Le lien direct entre la sumoylation de PML et son ubiquitination / dégradation vient tout juste d'être établi ((231, 404, 435) et nos résultats). Toutefois, les liens sumoylation / ubiquitination semblent plus complexes qu'initialement prévu et mériteront de futures investigations car :

- une chaîne minimale de 4 SUMOs est nécessaire à l'ubiquitination par RNF4 et la dégradation efficaces de PML. Les 4 SBDs de RNF4 sont impliqués dans la reconnaissance de cette polychaîne SUMO2/3 (404). Si 4 SUMOs sont nécessaires pour la reconnaissance par les 4 SBDs de la E3 UBI ligase RNF4 pour conduire à l'ubiquitination, comment expliquer qu'une monosumoylation entraîne une monoubiquitination ? Quel est le mécanisme exact de reconnaissance de SUMO, de subséquente ubiquitination et dégradation ?
- cette nécessité de 4 unités SUMOs pour entraîner le processus de dégradation rappelle étrangement le fait qu'une chaîne polyUb K48 d'au moins 4 unités est nécessaire à l'envoi de la protéine modifiée au protéasome pour dégradation (105, 272, 407). Ces chaînes polySUMOs

ou polyUbs entraînent-elles la protéine cible au protéasome par un mécanisme identique ?

- il existe des chaînes mixtes SUMO / Ub tel que récemment proposé suite à des études de spectrométrie de masse (231, 317). Quel est le rôle exact de ces chaînes mixtes pour amener la protéine cible au protéasome ?
- Enfin, il est à noter que le profil révélé avec un anti-SUMO1 et un anti-Ub est strictement similaire suite aux essais de purification d'affinité de 6His-PML dans le récent article de De Thé (231), renforçant le lien étroit et encore non totalement expliqué entre ces deux MPTs de PML.

La sumoylation seule pourrait-elle entraîner une dégradation protéasome-dépendante parallèlement à celle entraînée par ubiquitination ? Quel est le mécanisme de reconnaissance des chaînes mixtes SUMO / Ub comparativement aux chaînes Ub pour amener au protéasome ? Les divers mécanismes impliqués et le véritable lien SUMO / Ub dans la dégradation méritent encore de nombreuses investigations.

D'autres Ubls ont déjà démontré des points communs avec Ub. En effet, NEDD8 (une autre Ubl) et Ub partagent le domaine d'interaction UBA (222) et l'enzyme E3 ligase, MDM2 (431, 454). De plus NEDD8 entretient une proche relation avec Ub puisqu'il est considéré comme un régulateur des E3 UBI ligases, plusieurs étant neddylées (302, 431, 454). Enfin, SENP8 qui fut d'abord identifiée comme SUMO protéase agit sur NEDD8 (124, 270, 451). Gageons que l'avenir et la disposition de nouveaux outils d'analyse nous apporterons encore bien des surprises sur les relations Ubls et Ub.

Afin d'étudier les dynamiques et l'interdépendance entre sumoylation et ubiquitination, nous avons amorcé des études permettant d'évaluer la sumoylation de façon simultanée avec l'ubiquitination. Pour cela, nous avons combiné un essai BRET^{1,SUMO} et BRET^{2,UBI} en transfectant simultanément dans des cellules PML-Luc, YFP-SUMO et GFP-UBI. L'essai se base sur les caractéristiques spectrales différentes des fluorophores, YFP

utilisé en BRET¹ et GFP utilisé en BRET 2, qui permettent d'évaluer séparément la sumoylation et l'ubiquitination. Quoique des résultats clairs aient été obtenus sur l'interdépendance des deux signaux BRET (Annexe chapitre 3.1 page 274), l'obstacle majeur rencontré réside dans le fait que nous n'avons pas totalement caractérisé et disséqué la provenance du signal généré par PML-Luc / GFP-UBI. Toutefois, dès que des outils seront disponibles ou qu'il sera possible par des expériences supplémentaires de mieux définir ce signal tel que discuté à la section 3 de cette discussion page 205, les relations sumoylation / ubiquitination pourront être disséquées.

8. Importance d'une mise en évidence d'une relation dynamique entre MPTs:

Cette étude proposait d'établir une relation phosphorylation / sumoylation / ubiquitination sur la protéine PML. Nous avons démontré que :

- l'absence de sérines cibles de la phosphorylation par CK2 entraînait une régulation du SBD de PML (relation phospho. / SUMO)
- le traitement par As₂O₃ entraîne une augmentation de la sumoylation qui conduit à un meilleur recrutement de la E3 UBI ligase RNF4 (relation UBI / SUMO)
- la coexpression d'UBI entraîne une perte de signal BRET de sumoylation de PML (relation UBI / SUMO)

Ces dynamiques entre MPTs seront dans les prochaines années la cible d'intensives recherches car la combinaison de diverses MPTs ainsi que leur relation dynamique sont de toute importance dans la détermination du destin de chaque protéine. De nouveaux outils, tels que le BRET, la spectrométrie de masse, le FRET etc. seront nécessaires et auront besoin de nouveaux développements pour totalement déchiffrer ces dynamiques. De plus, la phosphorylation / sumoylation / ubiquitination, bien qu'étant des MPTs très étudiées et

documentées ne sont pas les seules à intervenir. Le rôle des lysines semble central dans la dynamique de plusieurs MPTs puisque outre la sumoylation et l'ubiquitination, elle servent de cible pour la N-acylation (par acétyl, biotynil, lipoyl, ubiquityl, sumoyl...), la N-méthylation et la C-hydroxylation (426) (118).

L'acétylation prend une place de plus en plus importante et des dynamiques acétylation / sumoylation ont été déjà documentées. Très récemment il a démontré que la sumoylation de PML pouvait être induite par l'histone deacétylase 7 (125). Le concept d'une possible compétition entre sumoylation et acétylation a tout d'abord été documenté sur Sp3 (357) puis sur p300 (54), MEF2A et MEF2D (474). Un lien entre phosphorylation / sumoylation / acétylation a aussi été établi pour MEF2A : en effet, la déphosphorylation de sa sérine 408 située dans son PDSM induit un changement entre sumoylation / acétylation sur sa lysine 403 (373). Récemment une relation acétylation / sumoylation a été également démontrée sur le suppresseur de tumeur HIC1 (387) et les auteurs proposent que la séquence ΨKXEP soit un motif impliqué dans cette relation (définition d'un acétylation / sumoylation switch motif où la présence d'une proline serait nécessaire (à noter que ce motif est absent sur PMLIII)). Les histones eux-mêmes ont récemment été documentés comme cibles de ces quatre MPTs (290). Il est à noter que l'acétylation des histones a été très documentée contrairement à l'acétylation des substrats non-histones dont la documentation est en pleine expansion (118). Toutes ces MPTs sont reconnues par des domaines modulaires spécifiques qui déterminent ainsi des interactions protéiques recrutant de nouvelles activités et permettent de lire et propager le signal de ces MPTs. Cette notion est de plus en plus établie pour l'histone code (87) mais devrait s'élargir à toutes les protéines cibles de MPTs et à toutes les dynamiques protéiques dans la cellule. Enfin, la méthylation, qui intervient également sur une lysine peut cibler les histones mais également d'autres protéines telles que le coactivateurs CBP/p300 (241) et certains membres de la famille SRC (112, 288). Certaines protéines sont donc cibles de phosphorylation / ubiquitination / sumoylation / acétylation / méthylation et ces modifications constituent un complexe réseau d'événements régulateurs à déchiffrer avec au cœur, les lysines cibles

visées. Seule la phosphorylation se produit sur d'autres résidus mais cette MPT est discutée ici car ses relations avec les 4 autres sont étroites et largement documentées.

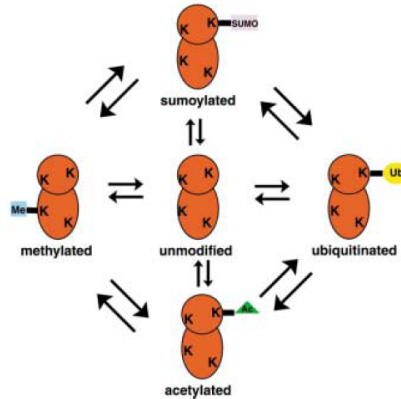


Figure 35: Relations et dynamiques possibles impliquant les lysines d'une protéine pouvant être ubiquitinée / sumoylée / acétylée / méthylée (extrait de (118)).

Ces MPTs peuvent donner lieu à de complexes signaux dynamiques à déchiffrer. La phosphorylation, qui ne se produit pas sur une lysine, a également de nombreux liens documentés avec ces 4 MPTs complexifiant encore plus le niveau fin de régulation dont une protéine peut faire l'objet. Rappelons aussi qu'un nombre croissant d'Ubls pourrait participer à ces dynamiques. De plus, plusieurs MPTs peuvent affecter la protéine cible de façon simultanée.

La famille SRC est remarquable de ce point de vue car beaucoup de MPTs sont documentées au sein de cette famille et une très récente revue essaie d'intégrer les interactions possibles entre phosphorylation / ubiquitination / sumoylation / acétylation / méthylation dans la famille SRC (246).

Dans notre laboratoire, des études subséquentes sont en cours sur le corépresseur TIF1 β , qui selon le contexte et les MPTs subies pourrait donc s'avérer un corépresseur ou un coactivateur tel que cela a été démontré pour Sp3 (343, 357). La dynamique de diverses MPTs doit être, pour sûre, impliquée dans cette dualité.

Il est à parier que le BRET jouera un rôle important dans le déchiffrement de toute cette dynamique entre diverses MPTs qui déterminent les interactions, les fonctions et donc le destin des protéines. Bien sûr, seules les modifications par Ub et Ubls pourront

directement être accessibles par fusion avec GFP dans un essai BRET mais l'utilisation d'inhibiteurs de kinases / de phosphatases, d'acétyl-tranfèreses / de déacétylases, de méthyl-tranfèreses / de déméthylases spécifiques, permettra de suivre l'interdépendance dynamiques entre ces diverses MPTs *in vivo* et en temps réel tout en dissociant les interactions covalentes et non covalentes des Ub et Ubls tel qu'il l'a été ici possible pour les interactions de PML avec SUMO. L'étude présentée ici donne un aperçu des possibilités que le BRET peut offrir dans la dissection de la dynamique de diverses MPTs et gageons que dans l'avenir cette puissante technique fera l'objet d'importants développements dans ce but.

En plus de valider l'utilisation du BRET pour la première fois dans l'étude d'interactions entre protéines nucléaires et dans l'étude de la sumoylation et d'interactions non covalentes avec SUMO *in vivo* et en temps réel, cette étude apporte de nouveaux éléments importants sur les trois protéines TRIM présentées, leurs interactions et une relation étroite voire une possible dynamique entre trois des MPTs de PML. Enfin, elle implique le SBD de PML dans sa dégradation As_2O_3 -induite par un mécanisme dépendant le plus probablement de SUMO1 : ce mécanisme pourrait être plus général puisqu'il a été récemment documenté que l'interaction de Parkin avec SUMO1 est également un élément clé conduisant à son autoubiquitination et sa dégradation (415).

Chapitre 4 : Annexes

1. Article 3 (publié dans J. Biol. Chem.) - Préambule

Sumoylation of TIF1beta co-repressor of KRAB multifinger proteins is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain.

Masclé XH, Germain-Desprez D, Huynh P, Estéphan P, and Aubry M.

Publié dans J Biol Chem., 282:10190-202, 2007.

1.1 Mise en contexte / Participation

Ce papier pour lequel je suis second auteur porte sur le projet de recherche d'un étudiant au doctorat du laboratoire (Xavier Masclé) soit la sumoylation de TIF1 β , un co-répresseur dont j'ai étudié quelques interactions dans mon premier papier. Outre ma participation à titre de guide (j'ai introduit et mis au point les essais transcriptionnels par gène rapporteur luciférase dans le laboratoire) pour les expériences impliquant des études de transcription (2 figures sur 6), j'ai effectué les expériences de BRET rapportées dans les figures 4B et 6A. Ma participation est estimée à 20 %.

J'ai également participé aux réflexions sur les possibles implications de la sumoylation de TIF1 β dans son interaction avec ZNF74 (en rapport direct avec les études d'interaction que j'avais effectuées pour mon premier article). Pour tester les diverses hypothèses que nous avons formulées avec Xavier, j'ai réalisé plusieurs études d'interaction par BRET, présentées ici en annexe (cf. 3.2 page 280) mais qui malheureusement, n'ont eu de suite, du fait qu'aucune différence dans les courbes de saturation de BRET n'ait été observée.

Phuong est une étudiante au premier cycle, en stage dans notre laboratoire pour apporter une aide et participer au projet de Xavier, également secondé par Patricia, assistante de recherche au laboratoire.

1.2 Accord des coauteurs

1. Identification de l'étudiant:

Delphine Germain-Desprez, DESD17527405

2. Nom de l'unité académique:

Programme de Biologie Moléculaire, Faculté des Études Supérieures

3. Nom du programme:

Ph.D. Biologie Moléculaire. 3-466-1-0

4. Identification de l'article:

Masclé XH, Germain-Desprez D, Huynh P, Estephan P, and Aubry M. Sumoylation of TIF1beta co-repressor of KRAB multifinger proteins is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain. *J Biol Chem*, 282:10190-202, 2007. Publié.

5. Déclaration des coauteurs :

A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Delphine Germain-Desprez inclue cet article en annexe de sa thèse de doctorat qui a pour titre: Interactions protéiques et relation dynamique entre phosphorylation / sumoylation / ubiquitination des protéines TIF1 α , β et PML: détection *in vivo* par BRET.



1.3 Permission de l'éditeur de la revue

4. Identification de la revue et de l'éditeur:

Journal of Biological Chemistry

ISBN/ISSN: 00219258

Publication year(s): 1905 - present

Publisher: American Society for Biochemistry & Molecular Biology

Rightsholder: American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB)

Author/Editor : Tabor, Herbert

5. Identification de l'article

Masclé XH, Germain-Desprez D, Huynh P, Estéphan P, and Aubry M. Sumoylation of TIF1beta co-repressor of KRAB multifinger proteins is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain. *J Biol Chem*, 282:10190-202, 2007. Publié.

6. Permission

Copyright Permission Policy

ASBMB does not charge for and grants use without requiring your copyright permission request for:

- The Journal of Biological Chemistry is copyrighted by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. ASBMB grants use without requiring your copyright permission request for: Original authors wanting to reproduce figures or tables from their own work to publish in not-for-profit formats or venues, provided that full acknowledgment of the source is provided in the new work.
- Students wanting to reproduce or republish their work for educational purposes.
- Students using other authors' material for their theses.

Use of copyrighted material requires proper citation.

Source : http://www.jbc.org/misc/Copyright_Permission.shtml

2. Article 3

**SUMOYLATION OF THE
TRANSCRIPTIONAL INTERMEDIARY FACTOR 1BETA (TIF1 β),
THE CO-REPRESSOR
OF THE KRAB MULTIFINGER PROTEINS,
IS REQUIRED FOR ITS TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY
AND IS MODULATED BY THE KRAB DOMAIN**

Masclé, X. H., Germain-Desprez, D., Huynh, P., Estéphan, P., and Aubry, M

From the Department of Biochemistry, Université de Montréal,

Montréal, Qc, Canada

Running Title: KRAB-regulated TIF1 β sumoylation is required for repression

Address correspondence to:

Muriel Aubry, Département de biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montréal, Qc, H3C 3J7, Canada.

E-mail: muriel.aubry@umontreal.ca,

Telephone: 514-343-6322, Fax: 514-343-2210

Article publié dans J Biol Chem. 2007 Apr;282(14):10190-202.

ABSTRACT

Small ubiquitin-related modifier (SUMO) has emerged as a key posttranslational modulator of protein functions. Here we show that TIF1 β , a developmental regulator proposed to act as a universal co-repressor for the large family of KRAB domain-containing zinc finger proteins, is a heavily SUMO-modified substrate. A combined analysis of deletion and punctual mutants identified TIF1 β as a multi-lysine acceptor for SUMO which specifically targets six lysine residues (Lys⁵⁵⁴, Lys⁵⁷⁵, Lys⁶⁷⁶, Lys⁷⁵⁰, Lys⁷⁷⁹ and Lys⁸⁰⁴) within TIF1 β carboxy-terminal repressive region. Reporter gene assays indicate that TIF1 β requires SUMO-modification for its repressive activity. Indeed, sumoylation-less mutants failed to recapitulate TIF1 β -dependent repression. TIF1 β homo-dimerization properties and interaction with the KRAB domain are preserved in the mutants with lysine to arginine substitutions as confirmed by *in vivo* bioluminescence resonance energy transfer (BRET). Using histone deacetylase (HDAC) inhibitors, we also demonstrate that TIF1 β sumoylation is a pre-requisite for the recruitment of HDAC and that TIF1 β SUMO-dependent repressive activity involves both HDAC-dependent and HDAC-independent components. Finally, we report that, in addition to rely on the integrity of its PHD finger and on its self-oligomerization, TIF1 β sumoylation is positively regulated by its interaction with KRAB domain-containing proteins. Altogether, our results provide new mechanistic insights into TIF1 β transcriptional repression and suggest that KRAB multifinger proteins not only recruit TIF1 β co-repressor to target genes but also increase its repressive activity through enhancement of its sumoylation.

INTRODUCTION

TIF1 β (KRIP-1, KAP-1, TRIM 28) is an essential developmental regulator belonging to the TIF1 (Transcription intermediary factors 1) family and is believed to act as the universal transcriptional co-repressor for the large family of vertebrate-specific Krüppel-associated box (KRAB) domain-containing zinc finger transcription factors (1-7). All TIF1 family members (TIF1 α , β , γ , δ and bonus) are characterized by an amino-terminal Tri-partite Motif (named TRIM or RBCC) composed of a RING (Really Interesting New Genes) finger followed by 2 B-boxes and a coiled-coil domain as well as a carboxy-terminal bi-partite motif encompassing a PHD (Plant HomeoDomain) finger and a bromo-domain (2,8-11). The RBCC motif of TIF1 β is known to homo-dimerize and to specifically interact with the KRAB domain of KRAB multifinger proteins (12-14). The TIF1 β PHD finger and bromo-domain were reported to cooperate in transcriptional repression via recruitment of repressive enzymatic activities such as histone deacetylase complexes (NurD/Mi2- α) and a methyltransferase protein (SETDB1) (15,16). Moreover, TIF1 β (like all TIF1 family members) displays the canonical amino acid motif, PxVxL, interacting with HP1 heterochromatin proteins (HP1 α , β and γ) involved in gene silencing (17-19). Recently, the TIF1 β /HP1 interaction was shown to be essential for histone modifications associated with transcriptional repression and progression through cellular differentiation (20-23).

In attempts to unveil other determinants involved in the strong repressive activity mediated by TIF1 β , we found that this co-repressor is a SUMO target protein. Recent studies have demonstrated that post-translational modification of transcription factors and their co-regulators by the small ubiquitin-related modifier protein, SUMO, can modulate their transcriptional activity (24-28). The four mammalian SUMO, SUMO1, -2, -3 and -4, all resemble ubiquitin in terms of tertiary structure and their mechanism of conjugation to protein substrate. However, unlike ubiquitination, the main known functional consequences of SUMO modification appear not to be degradation (29-33). Several reports illustrate the direct involvement of SUMO modification in gene regulation and in particular in gene

repression (34-44). To explain the transcriptional repression induced by SUMO modified proteins, some studies have suggested that SUMO proteins display intrinsic repressive activity, whereas others have proposed that SUMO modified transcription factors can recruit HDAC proteins or HDAC-containing complexes (35,40,42,45-50).

SUMO proteins form an isopeptide bond between their carboxy-terminal glycine and a ϵ -NH₂-amino group of a lysine residue on their target proteins (51). The target lysine to which SUMO is conjugated is usually contained within a short consensus sequence, ψ KXE/D (where ψ represents a large hydrophobic residue) (52). The SUMO conjugation process, so called sumoylation, involves SUMO-activating E1 enzyme (SAE1/SAE2 hetero-dimer) and a SUMO-conjugating E2 enzyme (UBC9) (53). Furthermore, SUMO-specific E3 ligases that enhance SUMO conjugation have also been described. The known E3 ligases belong to three structurally independent protein classes represented by RanBP2, Pc2 and PIAS family members (protein inhibitor of activated STAT) (54-57). SUMO E3 ligases display limited substrate specificity and are reported to stabilize the interaction between the E2 conjugating enzyme, UBC9, and the target substrates to be sumoylated (53,58-60). Like ubiquitination, sumoylation is a dynamic and reversible process due to the existence of several SUMO-specific proteases, referred to as members of the SENP (Sentrin proteases) family. These proteases are involved both in the maturation of SUMO as carboxy-terminal hydrolases and in the removal of SUMO from its target protein as isopeptidases (58).

In this study, we report that TIF1 β is a strong substrate for SUMO modification exhibiting several sumoylation sites clustered in its carboxy-terminal repressive region. Prevention of TIF1 β sumoylation by using sumoylation-deficient mutants abrogates its repressive activity both as a protein artificially targeted to DNA or indirectly recruited to DNA via a KRAB domain-containing protein. Furthermore, we demonstrate that TIF1 β SUMO modification is required for recruitment of HDAC-containing complexes. Finally, this study indicates that TIF1 β sumoylation can be positively regulated by its homo-dimerization and its interaction with KRAB domain-containing multifinger proteins thereby recruiting this co-repressor to target genes.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Expression vectors:

TIF1 β constructs: Full-length TIF1 β (GenBank Accession Number NM_011588; aa 1–834) was derived from pMFH-Gal4-TIF1 β construct (generous gift from Dr. J. V. Bonventre) (3,61). It was subcloned as an EcoRV-NotI fragment into the blunted BamHI site of pCGN (62) (HA-TIF1 β), as an EcoRI-NotI fragment into pBluescript SK+ (SK+-TIF1 β) and as an EcoRI-NotI blunted fragment into the EcoRI-SmaI sites of the yeast pGBT9 vector (encoding the first 1-147 amino acids of the yeast transcription factor Gal4, that corresponds to the DNA binding domain) (Clontech) (Gal4DBD-TIF1 β). To generate myc-tagged TIF1 β , a ClaI-NotI blunted fragment was transferred from SK+-TIF1 β into the blunted XbaI site of pcDNA3.1-myc (pcDNA3.1-myc-TIF1 β). Flag-HA-TIF1 β was obtained by subcloning an EcoRV-NotI fragment from SK+-TIF1 β into pcDNA3-Flag-HA (pcDNA3-Flag-HA-TIF1 β). pcDNA3.1-Gal4DBD-TIF1 β construct was obtained by subcloning Gal4DBD-TIF1 β as an HindIII-SalI fragment from pGBT9 vector (Clontech) into the HindIII-XhoI sites of pcDNA3.1 (Invitrogen). Carboxy-terminal deletion mutants Gal4DBD-TIF1 β aa1-735 (Δ 1) or Gal4DBD-TIF1 β aa1-675 (Δ 2) were generated from pcDNA3.1-Gal4DBD-TIF1 β owing to the removal of the KpnI-XbaI or EcoNI-XbaI carboxy-terminal fragments, respectively. Gal4DBD-TIF1 β aa1-563 (Δ 3) or Gal4DBD-TIF1 β aa1-482 (Δ 4) were obtained by subcloning a HindIII-SacI or HindIII-AflII fragments from pGBT9-TIF1 β into the HindIII-EcoRV sites of pcDNA3.1, respectively. TIF1 β devoid of the N-terminal homo-dimerization RBCC motif and encoding the HP1 binding domain, the PHD finger and the bromo-domain (Δ N-TIF1 β ; from nucleotides 1806 to the stop codon of TIF1 β at position 3063) was amplified by PCR and cloned in phase as a BamHI fragment into the BamHI site of pCGN and as a BamHI-SalI fragment into pGBT9 to generate pGBT9 Δ N-TIF1 β . A Gal4DBD- Δ N-TIF1 β construct was obtained by subcloning the HindIII-SalI fragment from pGBT9 Δ N-TIF1 β into the HindIII-XhoI sites of pcDNA3.1. TIF1 β point mutations were generated using the QuickChange site-directed

mutagenesis kit (Stratagene) starting with fragments of the wild type cDNA cloned in pBluescript SK⁺. Only the sens oligonucleotides are indicated here for L271P (5'gggacaagcatgccacacctcagaaaaac3' where a silent *SphI* restriction enzyme site is incorporated), L307P (5'tcatgaaggagccgaataagcggg3'), K554R (5'cctggcatggcaattgtcagggaagaagag3' where a silent *MunI* restriction enzyme site is incorporated), K575R (5'cgagggtccggaaccaggcctgtgttc3' where a silent *BspEI* restriction enzyme site is incorporated), K676R (5'gtgctcccggacctaagggaggaagatgg3' where a silent *PfoI* restriction enzyme site is incorporated), K750R (5'cgtgctcgtctccaagagaggctgtcacc3' where a silent *BsmBI* restriction enzyme site is incorporated), K779R (5'ctgaggacagggcagatgtacagtccatc3' where a silent *BsRGI* restriction enzyme site is incorporated) and K804R (5'ggtgacaccaggttttcagctgtgtc3' where a *PvuII* restriction enzyme site is incorporated), H,C648,651A,A (5'atgttgcctcgcctggatgccacctcc3') mutations. All mutants were verified by DNA sequencing and mutated fragments were subcloned in replacement of the wild type fragment in appropriate vectors containing the full length or truncated TIF1 β cDNA.

KRAB domain-containing protein constructs: The 75 amino-acid repressive KRAB domain from ZNF74-II isoform was used as a prototype for the conserved KRAB domain (63). A 43 amino acid truncated and non-repressive domain (KRAB tr) derived from another ZNF74 isoform (ZNF74-I) (63) was used as a control which does not interact with TIF1 β (14). KRAB domains in fusion with Gal4DBD aa1-147 (which encodes a nuclear localization signal) were cloned as XbaI fragments in pRSV (63) or as a BsrGI-BamHI fragment in pcDNA3.1-Gal4DBD. The Myc tagged ZNF74 constructs were obtained by cloning the cDNAs coding for ZNF74-I (GenBank Accession Number X71623 ; aa 1–572) (64) or ZNF74-II (GenBank Accession Number X92715; aa 1–643) (63) as an XbaI fragment into the XbaI site of the Myc tagged version of pcDNA3.1 vector.

BRET² constructs: Rluc-TIF1 β , GFP-TIF1 β and GFP-NLS, which target GFP to the nucleus via a nuclear localization signal (NLS), were previously described in (14). TIF1 β 4KR, TIF1 β L271P and TIF1 β L307P were subcloned as an EcoRI-PmeI fragment from pcDNA3.1Gal4DBD into the EcoRI-EcoRV sites of pRluc and pGFP10 (Perkin Elmer

Life Sciences). The GFP-KRAB-NLS construct, targeted to the nucleus by a NLS, was prepared by subcloning a SacI-ApaI fragment from pBleuscript SK⁺ in phase into the SacI-ApaI sites of pGFP10.

Other constructs: The FLAG epitope-tagged PIASy is described in (65) (generous gift from Dr. R. Grosschedl). The FLAG epitope-tagged wild type SENP1 and catalytically inactive SENP1C603S (generous gift from Dr. D. Bailey) are described in (66). SUMO1 (GenBank Accession Number U67122) cloned in pcDNA3.1-myc (myc-SUMO1) (generous gift from Dr. F-M. Boisvert) was subcloned as an XhoI fragment in pGFP10 (Perkin Elmer Life Sciences). SUMO2 was subcloned as a BstY1-NotI fragment from the pGEX4T-1 vector containing EGFP-SUMO2 (generous gift from Dr. M. Dasso) into the BglII-NotI site of pGFP10.

Antibodies:

The following mouse monoclonal antibodies 12CA5 anti-HA (67), 9E10 anti-myc 9E10 (68), M2 anti-flag (Sigma), anti-GFP (Roche), anti-Gal4 (Santa Cruz) and polyclonal antibody anti-TIF1 β (amino acid 381 to 564) were used (14).

Cell culture and transfection:

Human embryonic kidney 293T cells (HEK 293T) maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent), 100 μ g/ml penicillin and streptomycin, 1 mM L-glutamine were seeded at a density of 3×10^5 cells per 60-mm dish for cell extracts and immunoprecipitation experiments, 1×10^6 cells per 100-mm dish for BRET experiments and 2×10^5 in 6-well plates for transcriptional assays. Transient transfections of plasmids were performed on the following day using the calcium phosphate precipitation method except for transcription assays where Fugene transfection reagent (3 μ l/1 μ g DNA) (Roche) was used. The total amount of transfected DNA was kept constant (10 μ g for 100-mm dishes, 6 μ g for 60-mm dishes and 1-1.3 μ g for 6-well plates).

Cells extracts and immunoprecipitations:

For preparing whole cell extracts to be separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, cells were lysed in denaturing Laemmli buffer (400-600 μ l/dish) containing 20 mM NEM (N-ethylmaleimide), a cysteine protease inhibitor usually used to preserve the sumoylation of cellular proteins. DNA was immediately sheared using a 1 ml syringes with a 26G $\frac{1}{2}$ needles or sonificated to reduce sample viscosity. For immunoprecipitation, cells were lysed in SDS solubilizing buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.8% SDS, 20 mM NEM) (1.5 ml/ dish) completed with a mixed proteases inhibitors. The following steps were done at 4°C. Extracts were passed through a 26G $\frac{1}{2}$ needle to reduce viscosity and centrifuged at 15,000 x 2 min. Extracts were then precleared with protein A-Sepharose (1 ml/ 10-20 μ l stacked beads) (Sigma) for 1 h. Immunoprecipitations of the precleared extracts (1 ml) were then carried out for 16 h using 10 μ l of the appropriate antibody and 40-50 μ l of protein A-Sepharose. The protein A-sepharose beads were washed 3 times with 1 ml washing buffer (50 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.4% SDS, 2% Triton, 20 mM NEM). Washed immunoprecipitates were resuspended in Laemmli buffer. Whole cell extracts and immunoprecipitates were separated on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and electrotransferred for Western blotting. Following probing of the nitrocellulose membranes with the relevant antibodies, a chemiluminescence reagent was used (Renaissance kit, NEN).

BRET² experiments:

The BRET assays were conducted as we previously described in (14). In brief, transiently transfected cells were resuspended and distributed in 96-well microplates (white Optiplate from Packard). Upon addition of the cell permeant luciferase substrate (coelenterazine deep blue, PerkinElmer Life Sciences), the bioluminescence signal resulting from its degradation was detected using a 370–450-nm band pass filter (donor emission peak 400 nm). The energy transferred resulted in a fluorescence signal emitted by the GFP10 acceptor (excitation peak 400 nm and emission peak 510 nm) that was detected using a 500–530-nm band pass filter. The BRET signal (BRET ratio) was quantified by

calculating the acceptor fluorescence /donor bioluminescence ratio as previously reported. Expression level of each construct was determined by direct measurements of total fluorescence and luminescence on aliquots of transfected cell samples. The GFP10 total fluorescence was measured using a FluoroCount (PerkinElmer Life Sciences) with an excitation filter at 400 nm, an emission filter at 510 nm. The total luminescence was measured using the same cells incubated with coelenterazine H for 10 min (Molecular Probes) (emission peak 485 nm). The BRET ratios were plotted as a function of the GFP/LUC fusion protein expression ratio, both fusion proteins expression being assessed with the same cells as described above, to take into account the potential variations in the expression of individual constructs from transfection to transfection. As a negative control, the Rluc-TIF1 β /GFP-NLS BRET pair evaluating random collision was used as in (14).

Transcriptional assays:

Transient transfections were done as described above. The firefly luciferase reporter plasmid pGL3-5xGal4 corresponds to pGL3 vector under the control of the SV40 promoter (Promega) and a multimerized Gal4 DNA binding sequence (AGGGTATATAATG) x5. The Renilla luciferase vector phRluc-C1 (Perkin Elmer) (20 ng) was co-transfected to normalize for transfection efficiency. The effector plasmid corresponds to pcDNA3.1 (Invitrogen) in which Gal4DBD aa1-147 was cloned and fused to TIF1 β , the KRAB domain or their mutants (see description above). The total amount of transfected DNA was kept constant by addition of the pcDNA3.1 empty vector. Histone deacetylase inhibitor treatments were done 24 h post-transfection either with 5 mM sodium butyrate (NaBut) (from a 3 M stock solution resuspended in PBS pH 7.5) or with 200 nM trichostatin A (from a 300 mM stock solution resuspended in ethanol). Cell lysates were prepared 48 h after transfection and split into two samples for determination of the luciferase activity and assessment of the level of protein expression by Western blotting. The equivalent of 35 μ g of cell lysates was processed for the luciferase activity using the Dual Glo™ luciferase assay kit (Promega).

RESULTS

SUMO modification of TIF1 β in vivo.

Considering that sumoylation is often associated with a change in the activity of transcriptional regulators, we wondered if TIF1 β co-repressor could be a target of SUMO protein as previously shown for TIF1 α , another member of the TIF1 family (69). To determine whether TIF1 β could be covalently modified by SUMO in mammalian cells, human 293T cells were transfected with HA-tagged TIF1 β in the presence or absence of GFP-SUMO1, considering that free SUMO-1 is limited in the cells (70). Western blot using anti-TIF1 β revealed that the addition of GFP-SUMO1 results in the appearance of several bands migrating above the unmodified TIF1 β (Figure 1A, lanes 3 and 4). These bands of reduced mobility are predicted to correspond to TIF1 β species covalently linked to GFP-SUMO1. Accordingly, these SUMO modified forms were lost in cells co-transfected with a SUMO specific isopeptidase, SENP1 that cleaves SUMO from its protein substrate, but not in cells expressing its catalytically inactive form, SENP1C603S (Figure 1B, lanes 3 and 4) (66). Further confirmation was obtained in immunoprecipitation experiments where five slow migrating Flag-HA-tagged TIF1 β species revealed by an anti-Flag antibody were also detected by an anti-GFP antibody recognizing the GFP-SUMO1-modified TIF1 β (Figure 1D, lane 6 in left and right panels).

We then obtained evidence that endogenous TIF1 β was a substrate for SUMO. Endogenous TIF1 β sumoylation was detected with a specific anti-TIF1 β antibody only when we overexpressed either myc-SUMO1 or GFP-SUMO1, or when endogenous SUMO-modification of TIF1 β was enhanced by using the E3 ligase, PIASy (Figure 1E, lanes 2, 4 and 6). This suggests that only a small percentage of TIF1 β is normally covalently linked by SUMO at steady state as also reported for other sumoylated proteins (71).

Altogether, these results clearly demonstrate that TIF1 β is strongly sumoylated in mammalian cells overexpressing SUMO1 and that co-expression of components of the SUMO pathway can regulate TIF1 β SUMO modification.

Identification of TIF1 β SUMO modification sites.

Depending mostly on the exposure times, four to five sumoylated species were easily detected in cells co-transfected with TIF1 β and either GFP-SUMO1 or GFP-SUMO2 (Figure 1C). Thus, at least four main sumoylated sites are predicted to be present on TIF1 β . SUMO1 is less likely to give rise to poly-sumoylation chain formation *in vivo* than SUMO2 since its sequence does not include a bona fide SUMO acceptor lysine involved in SUMO chain formation (30). Accordingly, even if the sumoylation patterns obtained with SUMO1 and SUMO2 were similar (Figure 1C), our studies to identify TIF1 β sumoylation sites were done with SUMO1. TIF1 β primary sequence encodes 42 lysine residues with only two being part of a classical sumoylation consensus (K554 and K676). In an attempt to delimit the TIF1 β region(s) subjected to sumoylation, carboxy-terminal deletion mutants were generated and subjected to sumoylation *in vivo* either in cells co-transfected with GFP-SUMO1 or not (Figure 2A-B). To ensure that all deletion mutants are efficiently targeted to the nucleus, deletion constructs were all fused to Gal4 DNA binding domain (Gal4DBD) which includes a nuclear localization signal. The sumoylation pattern of deletion mutants was compared to that of wild type TIF1 β also fused to Gal4DBD. Analysis of the number and intensity of sumoylated species observed for each deletion mutant suggest that sumoylation sites are progressively lost from $\Delta 1$ to $\Delta 4$ deletion mutants (Figure 2A-B). Only the unmodified TIF1 β was detected with the $\Delta 4$ mutant suggesting that all sumoylation sites are located in the carboxy-terminal part of TIF1 β between amino acids 482 and 834. This region of around 350 amino acids contains 13 lysine residues, including K554 and K676 (Figure 2C).

To determine which of the 13 carboxy-terminal lysine residues of TIF1 β serve as a substrate for sumoylation, each of them were mutated to arginine residue (R) individually or in combination. A detailed analysis of the sumoylation profile of these mutants suggested that the first two bands migrating above the unmodified TIF1 β correspond to mono-sumoylated forms exhibiting different apparent molecular weight as also reported for other sumoylated proteins (38,72). Accordingly, as seen in Figure 2D (compare lanes 1 and

2), the second band above the unmodified TIF1 β was strongly reduced by mutating K554 and the faint remaining signal was completely abolished in the double K554,575R mutant (Figure 2D, lane 3). This suggests that two distinct populations of mono-sumoylated species comigrate, one being monosumoylated on K554 and one on K575. Considering the relative abundance of these mono-sumoylated species, K554 appears as a major sumoylation site compared to K575. Two additional major sumoylation sites were evidenced with the use of K779R and double K779,804R mutants (compare lane 4 with lanes 5 and 6). These mutants led to significant reduction in the first sumoylation band migrating just above the unmodified TIF1 β . Only a faint doublet of bands closely migrating with the species mono-sumoylated on K779 or K804 were seen with the K779, 804R mutant (lane 6). These remaining bands (less than 5% of the sumoylation detected with wild type TIF1 β) are likely to correspond respectively to the mono-sumoylation of K750 (lower band) and K676 (higher band) as demonstrated with mutants containing five (5KR mutant) and six (6KR mutant) mutated lysines (Figure 2D, lanes 7-9). The above results demonstrate that TIF1 β includes six SUMO acceptor sites. Our deletion and punctual mutant results also suggest that the bands migrating above the mono-sumoylated species correspond to multi-sumoylated forms of TIF1 β with potentially two to six SUMO moieties linked to any of the different acceptor lysines (schema on Figure 2D). The TIF1 β species expected to contain five SUMO moieties was seen on longer exposure of some gels. However, we have never observed the one predicted to contain six SUMO moieties presumably because this modified species represents a very minor product not detectable at the level of sensitivity of our assay and/or because the sumoylation of some lysine residues is mutually exclusive. Consistent with the multi-sumoylation of TIF1 β , the removal of any sumoylation site by mutation of one target lysine leads to a decrease in the intensity or in the disappearance of the highest migrating band. Altogether, our results show that among the six potential sumoylation sites, three of them are major sumoylation sites (K554, K779, K804) and three are minor sumoylation sites (K575, K676 and K750).

Regulation of TIF1 β transcriptional repression by sumoylation.

Knowing that TIF1 β is a strong transcriptional co-repressor involved in gene silencing, we assessed the potential impact of TIF1 β sumoylation on its transcriptional repressive properties. We used a gene reporter assay to compare the transcriptional repressive activity of wild type TIF1 β with that of various sumoylation-deficient mutants containing target lysines mutated to arginines. Since TIF1 β needs to be recruited to DNA to repress transcription (2-4), both wild type and SUMO deficient mutant TIF1 β effectors were fused to Gal4DBD. This fusion protein recognizes the Gal4 response element (5xGal4UAS) placed in front of the SV40 strong promoter that drives the expression of the luciferase reporter gene (Figure 3A). As seen in Figure 3C, the repressive activity of wild type TIF1 β is dose-dependent, reaching a maximum of approximately 20-fold. At comparable maximal doses, TIF1 β 4KR (K554,575,779,804R), that includes mutations of the three major sumoylation sites, represses transcription 4- to 5-fold less than wild type TIF1 β . At doses of transfected TIF1 β varying in the 10-fold range, a change limited to ~1.5-fold was observed in the repressive activity elicited by TIF1 β 4KR in contrast to ~4-fold increase obtained with the wild type. This suggests that the TIF1 β sumoylation deficient mutant is unable to fully repress the luciferase reporter in our assay. A comparison of the transcriptional repression activity of various mutants that impair sumoylation was also carried out (Figure 3B). Interestingly, TIF1 β repressive activity was progressively lost by increasing the number of mutated sumoylation sites as observed in conditions where all sumoylation deficient mutants are expressed at comparable levels. These above results strongly suggest a correlation between TIF1 β repressive activity and its sumoylation capacity.

While controversial, some studies suggested that the repressive activity of TIF1 β was partially sensitive to histone deacetylase (HDAC) inhibitors (15,17,73). Our results using wild type TIF1 β or a deletion mutant (Δ N-TIF1 β), containing the previously characterized repressive region of TIF1 β including the six SUMO-targeted lysines (schema on Figure 2 B), confirmed that treatment with sodium butyrate (Figure 3D) and another

inhibitor for class I and II HDAC, Trichostatin A (data not shown), reduces the repressive activity of TIF1 β by approximately 30-50% (HDAC-dependent repression) (Figure 3D). In order to investigate if there is a potential functional link between HDAC recruitment and TIF1 β sumoylation, we compared the sodium butyrate sensitivity of Δ N-TIF1 β and its 6KR derivative that is refractory to sumoylation. Clearly, the residual 1.5-fold repressive activity of the Δ N-TIF1 β 6KR mutant was not modulated by the HDAC inhibitor suggesting that the recruitment of HDAC is SUMO-dependent (Figure 3D - left panel). Furthermore, comparative analysis of the repression of Δ N-TIF1 β with that of the Δ N-TIF1 β 6KR sumoylation-less mutant in the presence of HDAC inhibitor revealed that the SUMO-related repression (see arrow on Figure 3D) involves both HDAC-dependent and HDAC-independent components (see dotted arrows on Figure 3D).

Since TIF1 β acts as a co-repressor indirectly recruited to DNA via DNA-binding KRAB multifinger proteins (2,23), we also compared the co-repressive activity of wild type TIF1 β and its sumoylation-deficient mutant following its indirect recruitment to DNA using a Gal4-KRAB fusion protein (Figure 4A). Interestingly, in the presence of Gal4-KRAB, the co-repressive activity elicited by the endogenous TIF1 β was enhanced by up to 30% by adding increasing amounts of wild type TIF1 β (Figure 4A). In contrast, the co-repressive activity was decreased by 10% in the presence of comparable amounts of 4KR mutant suggesting that this sumoylation deficient mutant exerts a dominant negative effect over the repression induced by endogenous TIF1 β proteins (Figure 4A). Thus, TIF1 β co-repressor activity is clearly impaired by mutation of its major sumoylation sites. This loss of co-repressive activity of the 4KR mutant is not due to a change in its sub-cellular localization since TIF1 β sumoylation deficient mutants display the same nuclear localization patterns as the wild-type TIF1 β (observed by immunolocalization with Flag-HA- or GFP-tagged constructs - data not shown) nor to an impaired interaction with the KRAB domain as shown by a BRET interaction assay in living cells (Figure 4B) (14,74). This is evidenced by the fact that similar BRET saturation curves were obtained when a fixed amount of Rluc-TIF1 β or -TIF1 β 4KR was co-expressed with increasing amount of GFP-KRAB-NLS (Figure 4B). As typically seen when specific interactions occur, these

curves showed an increase in the energy transfer (BRET² ratio) between the RLuc fusion donor and GFP fusion acceptor until a plateau is reached when the amount of acceptor is no longer limiting compared to the donor. Noticeably, the BRET² ratio of RLuc-TIF1 β or -TIF1 β 4KR at the maximal dose of GFP-KRAB-NLS is 4-fold higher than the one obtained with the negative control BRET pair RLuc-TIF1 β L307P/GFP-KRAB-NLS. The TIF1 β L307P mutant was previously shown to have an abrogated interaction with a KRAB domain in an *in vitro* experiment using the RBCC fragment of TIF1 β (12). We also ruled out that the differential co-repressive activity elicited by TIF1 β and its 4KR mutant was due to an impaired homo-dimerization since they exhibit similar BRET saturation curves (Figure 6A)

Noticeably, the increased repression observed when over-expressing wild type TIF1 β in the presence of Gal4-KRAB correlated with the appearance of a higher molecular weight band characteristic of TIF1 β sumoylated by endogenous SUMO (Figure 4A). This result suggests that the Gal4-KRAB fusion favours TIF1 β sumoylation as explored in detail below (Figure 5). In contrast, the endogenous sumoylation of TIF1 β transfected alone remains undetectable in our transcriptional assays (Figure 3).

Regulation of TIF1 β sumoylation by the KRAB domain of multifinger proteins.

Based on observations mentioned above, we investigated the possibility that the KRAB domain could modulate the sumoylation of TIF1 β . Strikingly, co-transfection of wild type TIF1 β together with a prototypical KRAB domain (derived from ZNF74 zinc finger protein) significantly boosts the sumoylation level of TIF1 β in condition in which GFP-SUMO was limiting (Figure 5A, left panel compare lanes 1 and 2). Such enhancement was neither observed using a non-repressive truncated version of this KRAB domain (KRAB tr) which does not interact *in vivo* with TIF1 β (14,63) nor with the TIF1 β L307P mutant which failed to bind the KRAB domain as shown *in vitro* (12) and confirmed here in living cells by BRET (Figures 4B and 5A, left and middle panels). Importantly also, in the presence of Gal4-KRAB, a higher molecular weight band characteristic of TIF1 β

sumoylated by endogenous SUMO appeared above the endogenous TIF1 β (Figure 5B). These results suggest that the sumoylation of TIF1 β co-repressor is favoured by its interaction with the KRAB domain. To confirm that such a domain can regulate sumoylation of TIF1 β in the context of a full length KRAB multifinger protein, we used two isoforms of a prototypical KRAB multifinger protein, ZNF74, that include the full length repressive KRAB domain (ZNF74-II isoform) and the non-repressive truncated KRAB domain (ZNF74-I isoform) used above (63). Only ZNF74-II interacts with TIF1 β as previously shown in living cells by BRET (14). Clearly also, only ZNF74-II repressive isoform increases TIF1 β sumoylation (Figure 5A, right panel).

Taken together, our results strongly suggest that the interaction of TIF1 β with KRAB domain-containing zinc finger proteins positively regulates its SUMO modification and consequently its repressive activity.

Requirement RBCC oligomerization motif and PHD finger integrity for efficient TIF1 β sumoylation.

TIF1 β and other members of the TRIM family are suggested to function as oligomers homo-dimerizing via their RBCC motif (13,14,75-77). Interestingly, we noticed that the sumoylation of TIF1 β RBCC punctual mutants, L271P and L307P, was significantly reduced compared to that of the wild type TIF1 β (Figure 6A). These mutants were previously found to be deficient for homo-dimerization *in vitro* and to exhibit a reduced homo-dimerization in cell extracts while only L307P was found to be deficient for interaction with the KRAB domain as shown by Peng et al. (12). Since our BRET studies also indicate altered homo-dimerization properties of the RBCC mutants compared to the wild type TIF1 β (or the 4KR mutant) (Figure 6A), we suspected that efficient sumoylation of TIF1 β may require its oligomerization. In agreement with this, a HA-tagged deletion mutant lacking the RBCC dimerization motif, Δ N-TIF1 β , did not show any significant sumoylation despite the presence of the six possible SUMO-acceptor sites (Figure 6B, left panel). In contrast, a version of Δ N-TIF1 β fused to the heterologous Gal4 dimerization domain exhibits a ladder of sumoylated bands (Figure 6B, lane 1 in middle panel) as

typically observed for the wild type protein. Considering these results and the fact that HA- Δ N-TIF1 β retains a nuclear localization (data not shown), this suggests that homodimerization of TIF1 β is required for its sumoylation.

As demonstrated here, the RBCC motif of TIF1 β appears dispensable for its sumoylation when replaced by a heterologous dimerization domain. Recently however, sumoylation of another RBCC motif-containing protein, PML, was found to depend on the integrity of part of its RBCC motif, the RING finger (78,79). Interestingly, Capili et al. suggested structure similarity between PML RING finger and TIF1 β PHD finger which are both cysteine-rich, zinc-binding domains (80). To assess the potential involvement of the PHD finger in the sumoylation of TIF1 β , we generated mutants where the PHD finger structure was disrupted by mutating two amino acids responsible for zinc-binding (H648A,C651A) (80). Interestingly, the intensity of sumoylated species was strongly reduced when the PHD finger mutations were introduced either in the Gal4- Δ N-TIF1 β or in the full length TIF1 β (Figure 6B, middle and right panels, lanes 1 and 2).

The above results indicate that the oligomerization of TIF1 β via its RBCC motif and the structural integrity of its PHD finger domain are essential for TIF1 β efficient sumoylation.

DISCUSSION

This study identified TIF1 β , the universal co-repressor of KRAB multifinger proteins as a sumoylation substrate which can be either mono-sumoylated on one of its six targeted lysines or multi-sumoylated on a combination of these lysine residues. Our results indicate that the sumoylation of TIF1 β is an essential determinant for the repressive activity of this co-regulator of transcription and is a pre-requisite for recruitment of histone deacetylase complexes. Interestingly, TIF1 β sumoylation is shown to be dependent on its ability to homo-dimerize. Furthermore, it can be positively modulated by its interaction with KRAB domain-containing proteins. These results lead us to suggest that KRAB multifinger proteins not only recruit TIF1 β co-repressor to target genes but also increase its repressive activity through enhancement of its sumoylation.

TIF1 β , a substrate rich in lysine residues targeted by SUMO.

Using TIF1 β lysine-acceptor and carboxy-terminal deletion mutants, we provided evidences that TIF1 β possesses six SUMO-acceptor sites involved in multi-sumoylation events. Noticeably, in the conditions of our assays using SUMO1, we ruled out that TIF1 β is poly-sumoylated through the formation of SUMO chains on individual lysine residues. While the vast majority of SUMO target proteins were described to contain one or two SUMO modification sites, TIF1 β appears as a multi-acceptor protein for SUMO such as PML, Daxx and N-CoR (44,81,82). Interestingly, all TIF1 β sumoylation sites are positioned in its repressive region which contains a PHD finger and a bromo-domain. As it has been observed for several transcription factors, SUMO modification frequently occurs within inhibitory or repression domains (83-85).

Only two of the six TIF1 β sumoylation sites are part of the classic sumoylation consensus sequence (ψ KXE/D). Among these two sites, one is characterized here as a major (K554) and one as a minor sumoylation site (K676). No specific consensus motif could be identified surrounding the four other SUMO acceptor sites, characterized as two major (K779, K804) and two minor (K575, K750) sumoylation targets. During the

completion of this manuscript, three of the six sumoylation sites characterized here were also identified by others (86).

Analysis of sumoylation profiles revealed that the position of the targeted lysine within TIF1 β primary sequence strongly influences the migration of each TIF1 β mono-sumoylated species on denaturing polyacrylamide gel. Noticeably, closer the target lysine is to the terminal end of the protein, the smaller is the apparent molecular weight of the mono-sumoylated species (Figure 2D, schema).

TIF1 β appears as a substrate heavily sumoylated in conditions where it is over-expressed in the presence of SUMO. As for most sumoylated proteins, it was difficult to obtain evidence of the sumoylation of endogenous TIF1 β by endogenous SUMO. However, we revealed such endogenous modification in cells transfected with either a SUMO E3 ligase, PIASy, or a KRAB domain reported here to enhance TIF1 β sumoylation.

TIF1 β sumoylation, a pre-requisite for transcriptional repression.

Our functional assays strongly suggest that the transcriptional repression mediated by TIF1 β requires its post-translational modification by SUMO, an observation also made for other transcriptional regulators such as Sp3, Elk-1 and BKLf transcription factors (38,46,49) or co-regulators such as p300, CtBP and N-CoR (34,44,87). Reducing the number of TIF1 β SUMO acceptor sites by mutating single, double and multiple sumoylation target lysine residues progressively decreased TIF1 β -dependent transcriptional repression to near a basal repressive level. Remarkably, a TIF1 β sumoylation deficient mutant in which all the target lysine residues were mutated to arginine residues prevents almost completely the TIF1 β -dependent repression activity. This is suggesting that the TIF1 β repressive ability is mostly dependent on its capacity to be covalently modified by SUMO proteins.

Since no obvious difference has been observed in the sub-cellular localization of wild type TIF1 β and its various sumoylation deficient mutants (TIF1 β 4KR and -6KR) (data not shown), it is unlikely that a variation in their sub-cellular distribution contributes to their differential transcriptional repressive activity. Previous studies trying to decipher

the mechanisms involved in the repressive activity of sumoylated proteins have suggested that SUMO displays an intrinsic repressive activity when directly targeted to DNA as a Gal4-SUMO fusion (49,50). Furthermore, it was shown that the covalent attachment of SUMO promotes recruitment of HDAC complexes and thus inhibition of transcription both in conditions where SUMO is fused with transcriptional regulators to generate a chimera (35,49) or is conjugated to the ϵ -NH₂ group of a lysine residue from target proteins (34,40,46). Importantly, we found that the SUMO-dependent repressive activity of TIF1 β is accounted both by HDAC-dependent and HDAC-independent mechanisms. This is consistent with the recent results of Lee et al. showing that TIF1 β sumoylation correlates with both an attenuation of histone H3 acetylation (H3-K9, -K14) and with an enhancement of histone H3 di-methylation (H3-K9) at a specific TIF1 β targeted promoter (86). Since TIF1 β is known to interact with Mi2- α , a zinc finger helicase which is part of NuRD histone deacetylase complexes, as well as with the SETDB1 methyltransferase (15,16), it is tempting to speculate that the recruitment of these repressive enzymatic activities is modulated by TIF1 β sumoylation status. This may occur as a result of a differential interaction of the sumoylated and un-sumoylated forms of TIF1 β with these enzymatic complexes. Interestingly, a recent paper identified SETDB1 as a protein which directly interacts with SUMO2 (47). Since the interaction of TIF1 β and SETDB1 has been previously characterized by yeast-two hybrid and co-immunoprecipitation experiments (16), it remains to be determined whether this interaction is direct or indirect and if it requires TIF1 β sumoylation.

TIF1 β sumoylation is regulated by its interaction with KRAB-containing proteins and requires TIF1 β oligomerization.

TIF1 β , a ubiquitous and abundant protein, is believed to function as the obligate co-repressor for KRAB multifinger proteins which are mostly expressed in stage-specific and tissue-specific manner during vertebrate's development (3). In the present study, we demonstrate that KRAB domain-containing proteins positively modulate TIF1 β sumoylation, owing to their direct interaction with TIF1 β RBCC motif. Thus, the

recruitment of TIF1 β to gene promoters regulated by KRAB multifinger proteins and its subsequent KRAB-induced sumoylation may represent a specific and unique way to enhance the repressive activity of TIF1 β at selected promoters. This could explain why only a small proportion of endogenous TIF1 β is SUMO modified at a steady state. It must be acknowledged that most of our work was done with transient transfections and Gal4-based systems. Thus, further studies should confirm the importance of TIF1 β sumoylation in gene repression and its regulation by KRAB-containing proteins at promoters in chromatinized and natural chromatin contexts.

While it is generally recognized that TIF1 β can repress gene transcription when targeted to DNA through KRAB domain interaction, a few studies have found that TIF1 β could also behave as a transcriptional co-activator (88,89). More specifically, TIF1 β has been characterized as a co-activator when recruited by transcriptional regulators such as C/EBP β , the glucocorticoid nuclear hormone receptor and the TRIP-Br family members (88,89). Thus, one could propose that specific protein interactors such as KRAB multifinger proteins may regulate TIF1 β repressive activity by stimulating its sumoylation, a pre-requisite for efficient recruitment of repressive enzymatic complexes. In contrast, other protein complexes, such those described above, may prevent TIF1 β sumoylation and switch this co-regulator into a co-activator with the capacity to recruit activating enzymatic complexes. In such case, sumoylation may represent a critical determinant by which TIF1 β is regulated.

At least two hypotheses, not mutually exclusive, can be proposed to explain how the KRAB domain increases TIF1 β sumoylation. First, it could induce a TIF1 β conformational change favouring its interaction with the sumoylation machinery and/or a better accessibility of TIF1 β sumoylation sites. We ruled out however the possibility that the KRAB domain itself recruits UBC9, the E2 conjugating enzyme for SUMO (data not shown). Second, since the present study demonstrates that efficient sumoylation of TIF1 β requires its oligomerization, an attractive possibility, is that KRAB domains may enhance TIF1 β sumoylation by reinforcing its oligomerization. Consistent with this hypothesis, an

other group suggested that KRAB domain can stabilize TIF1 β homo-oligomers formation *in vitro* (12). Our previous results also demonstrated that a KRAB domain-containing protein, ZNF74, can bind to TIF1 β oligomers in living cells suggesting that oligomers represent the transcriptionally active species (14). Interestingly, a dimerization-dependent sumoylation has also been reported for at least two other proteins, namely HDAC4 and PML (90,91). In the case of PML, it was recently suggested that its dimerization favours its auto-sumoylation, a process requiring the presumed intrinsic SUMO E3 ligase activity of the PML RING finger (78,79). Since we found here that TIF1 β efficient sumoylation also requires the integrity of its PHD finger, a domain reported to be structurally related to the RING finger of PML (80), further studies will determine if the TIF1 β PHD finger may exhibit a SUMO E3 ligase activity allowing the auto-sumoylation of this strong co-repressor of transcription.

While the number of SUMO target proteins is still growing, the physiological determinants regulating their specific sumoylation remain unknown. We report here that members of a family of transcription factors recruiting specifically the co-repressor TIF1 β can modulate its sumoylation and consequently its repressive activity. Further studies will determine if sumoylation may antagonize other post-translational modifications of TIF1 β co-regulator.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Drs. Benoit Grondin and André Tremblay for critical reading of the manuscript and Drs. Mary Dasso, Sylvie Mader, Daniel Bailey, Francois-Michel Boisvert, Joseph V. Bonventre, Michel Bouvier and Rudolf Grosschedl for their generous gifts of reagents. This work was supported by a grant from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (to M.A.) and a studentship from Fonds de la recherche en Santé du Québec (FRSQ) (to DG-D). M.A. is a Chercheur National from FRSQ.

The abbreviations used are: aa, amino acid(s); BRET, bioluminescence resonance energy; GFP, green fluorescent protein; transfer; HA, hemagglutinin; HDAC, histone deacetylases. Keywords: Sumoylation, TIF1 β , KAP-1, KRIP-1, TRIM 28, KRAB domain, Transcriptional repression, BRET.

REFERENCES

1. Bellefroid, E. J., Poncelet, D. A., Lecocq, P. J., Revelant, O., and Martial, J. A. (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(9), 3608-3612
2. Friedman, J. R., Fredericks, W. J., Jensen, D. E., Speicher, D. W., Huang, X. P., Neilson, E. G., and Rauscher, F. J., 3rd. (1996) *Genes Dev* **10**(16), 2067-2078
3. Kim, S. S., Chen, Y. M., O'Leary, E., Witzgall, R., Vidal, M., and Bonventre, J. V. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(26), 15299-15304
4. Moosmann, P., Georgiev, O., Le Douarin, B., Bourquin, J. P., and Schaffner, W. (1996) *Nucleic Acids Res* **24**(24), 4859-4867
5. Cammas, F., Mark, M., Dolle, P., Dierich, A., Chambon, P., and Losson, R. (2000) *Development* **127**(13), 2955-2963
6. Looman, C., Abrink, M., Mark, C., and Hellman, L. (2002) *Mol Biol Evol* **19**(12), 2118-2130
7. Urrutia, R. (2003) *Genome Biol* **4**(10), 231
8. Le Douarin, B., Nielsen, A. L., Garnier, J. M., Ichinose, H., Jeanmougin, F., Losson, R., and Chambon, P. (1996) *Embo J* **15**(23), 6701-6715
9. Venturini, L., You, J., Stadler, M., Galien, R., Lallemand, V., Koken, M. H., Mattei, M. G., Ganser, A., Chambon, P., Losson, R., and de The, H. (1999) *Oncogene* **18**(5), 1209-1217
10. Beckstead, R., Ortiz, J. A., Sanchez, C., Prokopenko, S. N., Chambon, P., Losson, R., and Bellen, H. J. (2001) *Mol Cell* **7**(4), 753-765
11. Khetchoumian, K., Teletin, M., Mark, M., Lerouge, T., Cervino, M., Oulad-Abdelghani, M., Chambon, P., and Losson, R. (2004) *J Biol Chem* **279**(46), 48329-48341
12. Peng, H., Begg, G. E., Schultz, D. C., Friedman, J. R., Jensen, D. E., Speicher, D. W., and Rauscher, F. J., 3rd. (2000) *J Mol Biol* **295**(5), 1139-1162
13. Peng, H., Feldman, I., and Rauscher, F. J., 3rd. (2002) *J Mol Biol* **320**(3), 629-644

14. Germain-Desprez, D., Bazinet, M., Bouvier, M., and Aubry, M. (2003) *J Biol Chem* **278**(25), 22367-22373
15. Schultz, D. C., Friedman, J. R., and Rauscher, F. J., 3rd. (2001) *Genes Dev* **15**(4), 428-443
16. Schultz, D. C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G. G., and Rauscher, F. J., 3rd. (2002) *Genes Dev* **16**(8), 919-932
17. Nielsen, A. L., Ortiz, J. A., You, J., Oulad-Abdelghani, M., Khechumian, R., Gansmuller, A., Chambon, P., and Losson, R. (1999) *Embo J* **18**(22), 6385-6395
18. Lechner, M. S., Begg, G. E., Speicher, D. W., and Rauscher, F. J., 3rd. (2000) *Mol Cell Biol* **20**(17), 6449-6465
19. Lechner, M. S., Schultz, D. C., Negorev, D., Maul, G. G., and Rauscher, F. J., 3rd. (2005) *Biochem Biophys Res Commun* **331**(4), 929-937
20. Cammas, F., Oulad-Abdelghani, M., Vonesch, J. L., Huss-Garcia, Y., Chambon, P., and Losson, R. (2002) *J Cell Sci* **115**(Pt 17), 3439-3448
21. Ayyanathan, K., Lechner, M. S., Bell, P., Maul, G. G., Schultz, D. C., Yamada, Y., Tanaka, K., Torigoe, K., and Rauscher, F. J., 3rd. (2003) *Genes Dev* **17**(15), 1855-1869
22. Cammas, F., Herzog, M., Lerouge, T., Chambon, P., and Losson, R. (2004) *Genes Dev* **18**(17), 2147-2160
23. Sripathy, S. P., Stevens, J., and Schultz, D. C. (2006) *Mol Cell Biol*
24. Gill, G. (2003) *Curr Opin Genet Dev* **13**(2), 108-113
25. Verger, A., Perdomo, J., and Crossley, M. (2003) *EMBO Rep* **4**(2), 137-142
26. Girdwood, D. W., Tatham, M. H., and Hay, R. T. (2004) *Semin Cell Dev Biol* **15**(2), 201-210
27. Ohshima, T., Koga, H., and Shimotohno, K. (2004) *J Biol Chem* **279**(28), 29551-29557
28. Sentis, S., Le Romancer, M., Bianchin, C., Rostan, M. C., and Corbo, L. (2005) *Mol Endocrinol* **19**(11), 2671-2684

29. Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., and Becker, J. (1998) *J Mol Biol* **280**(2), 275-286
30. Tatham, M. H., Jaffray, E., Vaughan, O. A., Desterro, J. M., Botting, C. H., Naismith, J. H., and Hay, R. T. (2001) *J Biol Chem* **276**(38), 35368-35374
31. Bohren, K. M., Nadkarni, V., Song, J. H., Gabbay, K. H., and Owerbach, D. (2004) *J Biol Chem* **279**(26), 27233-27238
32. Gill, G. (2004) *Genes Dev* **18**(17), 2046-2059
33. Huang, W. C., Ko, T. P., Li, S. S., and Wang, A. H. (2004) *Eur J Biochem* **271**(20), 4114-4122
34. Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thain, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N. D., and Hay, R. T. (2003) *Mol Cell* **11**(4), 1043-1054
35. Shiiio, Y., and Eisenman, R. N. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23), 13225-13230
36. Long, J., Wang, G., He, D., and Liu, F. (2004) *Biochem J* **379**(Pt 1), 23-29
37. Nakagawa, K., and Kuzumaki, N. (2005) *Genes Cells* **10**(8), 835-850
38. Perdomo, J., Verger, A., Turner, J., and Crossley, M. (2005) *Mol Cell Biol* **25**(4), 1549-1559
39. Fernandez-Lloris, R., Osses, N., Jaffray, E., Shen, L. N., Vaughan, O. A., Girwood, D., Bartrons, R., Rosa, J. L., Hay, R. T., and Ventura, F. (2006) *FEBS Lett* **580**(5), 1215-1221
40. Gong, Z., Brackertz, M., and Renkawitz, R. (2006) *Mol Cell Biol* **26**(12), 4519-4528
41. Hsu, Y. H., Sarker, K. P., Pot, I., Chan, A., Netherton, S. J., and Bonni, S. (2006) *J Biol Chem*
42. Motohashi, H., Katsuoka, F., Miyoshi, C., Uchimura, Y., Saitoh, H., Francastel, C., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (2006) *Mol Cell Biol* **26**(12), 4652-4663

43. Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D. E., Bylebyl, G. R., Dokmanovic, M., Dorsey, J. A., Whelan, K. A., Krsmanovic, M., Lane, W. S., Meluh, P. B., Johnson, E. S., and Berger, S. L. (2006) *Genes Dev* **20**(8), 966-976
44. Tiefenbach, J., Novac, N., Ducasse, M., Eck, M., Melchior, F., and Heinzl, T. (2006) *Mol Biol Cell* **17**(4), 1643-1651
45. Binda, O., Roy, J. S., and Branton, P. E. (2006) *Mol Cell Biol* **26**(5), 1917-1931
46. Yang, S. H., and Sharrocks, A. D. (2004) *Mol Cell* **13**(4), 611-617
47. Rosendorff, A., Sakakibara, S., Lu, S., Kieff, E., Xuan, Y., DiBacco, A., Shi, Y., Shi, Y., and Gill, G. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(14), 5308-5313
48. Gill, G. (2005) *Curr Opin Genet Dev* **15**(5), 536-541
49. Ross, S., Best, J. L., Zon, L. I., and Gill, G. (2002) *Mol Cell* **10**(4), 831-842
50. Chupreta, S., Holmstrom, S., Subramanian, L., and Iniguez-Lluhi, J. A. (2005) *Mol Cell Biol* **25**(10), 4272-4282
51. Saitoh, H., Pu, R. T., and Dasso, M. (1997) *Trends Biochem Sci* **22**(10), 374-376
52. Melchior, F. (2000) *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 591-626
53. Okuma, T., Honda, R., Ichikawa, G., Tsumagari, N., and Yasuda, H. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **254**(3), 693-698
54. Kagey, M. H., Melhuish, T. A., and Wotton, D. (2003) *Cell* **113**(1), 127-137
55. Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O. A., and Palvimo, J. J. (2002) *Mol Cell Biol* **22**(14), 5222-5234
56. Azuma, Y., and Dasso, M. (2002) *Dev Cell* **2**(2), 130-131
57. Pichler, A., Knipscheer, P., Saitoh, H., Sixma, T. K., and Melchior, F. (2004) *Nat Struct Mol Biol* **11**(10), 984-991
58. Melchior, F., Schergaut, M., and Pichler, A. (2003) *Trends Biochem Sci* **28**(11), 612-618
59. Reverter, D., and Lima, C. D. (2005) *Nature* **435**(7042), 687-692
60. Matunis, M. J., and Pickart, C. M. (2005) *Nat Struct Mol Biol* **12**(7), 565-566
61. Witzgall, R., O'Leary, E., Leaf, A., Onaldi, D., and Bonventre, J. V. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(10), 4514-4518

62. Tanaka, M., and Herr, W. (1990) *Cell* **60**(3), 375-386
63. Cote, F., Boisvert, F. M., Grondin, B., Bazinet, M., Goodyer, C. G., Bazett-Jones, D. P., and Aubry, M. (2001) *DNA Cell Biol* **20**(3), 159-173
64. Grondin, B., Bazinet, M., and Aubry, M. (1996) *J Biol Chem* **271**(26), 15458-15467
65. Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., and Grosschedl, R. (2001) *Genes Dev* **15**(23), 3088-3103
66. Bailey, D., and O'Hare, P. (2004) *J Biol Chem* **279**(1), 692-703
67. Niman, H. L., Houghten, R. A., Walker, L. E., Reisfeld, R. A., Wilson, I. A., Hogle, J. M., and Lerner, R. A. (1983) *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(16), 4949-4953
68. Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G., and Bishop, J. M. (1985) *Mol Cell Biol* **5**(12), 3610-3616
69. Seeler, J. S., Marchio, A., Losson, R., Desterro, J. M., Hay, R. T., Chambon, P., and Dejean, A. (2001) *Mol Cell Biol* **21**(10), 3314-3324
70. Saitoh, H., and Hinchey, J. (2000) *J Biol Chem* **275**(9), 6252-6258
71. Hay, R. T. (2006) *Ernst Schering Res Found Workshop* (57), 173-192
72. Long, J., Zuo, D., and Park, M. (2005) *J Biol Chem* **280**(42), 35477-35489
73. Lorenz, P., Koczan, D., and Thiesen, H. J. (2001) *Biol Chem* **382**(4), 637-644
74. Mercier, J. F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A., and Bouvier, M. (2002) *J Biol Chem* **277**(47), 44925-44931
75. Borden, K. L. (2000) *J Mol Biol* **295**(5), 1103-1112
76. Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., Guffanti, A., Minucci, S., Pelicci, P. G., and Ballabio, A. (2001) *Embo J* **20**(9), 2140-2151
77. Cao, T., Borden, K. L., Freemont, P. S., and Etkin, L. D. (1997) *J Cell Sci* **110** (Pt **14**), 1563-1571
78. Quimby, B. B., Yong-Gonzalez, V., Anan, T., Strunnikov, A. V., and Dasso, M. (2006) *Oncogene* **25**(21), 2999-3005
79. Shen, T. H., Lin, H. K., Scaglioni, P. P., Yung, T. M., and Pandolfi, P. P. (2006) *Mol Cell* **24**(3), 331-339

80. Capili, A. D., Schultz, D. C., Rauscher, I. F., and Borden, K. L. (2001) *Embo J* **20**(1-2), 165-177
81. Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H. P., Wada, H., Fukuda-Kamitani, T., and Yeh, E. T. (1998) *J Biol Chem* **273**(41), 26675-26682
82. 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) *Mol Cell* **24**(3), 341-354
83. Bies, J., Markus, J., and Wolff, L. (2002) *J Biol Chem* **277**(11), 8999-9009
84. Kim, J., Cantwell, C. A., Johnson, P. F., Pfarr, C. M., and Williams, S. C. (2002) *J Biol Chem* **277**(41), 38037-38044
85. Yang, S. H., Jaffray, E., Hay, R. T., and Sharrocks, A. D. (2003) *Mol Cell* **12**(1), 63-74
86. Lee, Y. K., Thomas, S. N., Yang, A. J., and Ann, D. K. (2006) *J Biol Chem*
87. Lin, X., Sun, B., Liang, M., Liang, Y. Y., Gast, A., Hildebrand, J., Brunicardi, F. C., Melchior, F., and Feng, X. H. (2003) *Mol Cell* **11**(5), 1389-1396
88. Hsu, S. I., Yang, C. M., Sim, K. G., Hentschel, D. M., O'Leary, E., and Bonventre, J. V. (2001) *Embo J* **20**(9), 2273-2285
89. Chang, C. J., Chen, Y. L., and Lee, S. C. (1998) *Mol Cell Biol* **18**(10), 5880-5887
90. Kirsh, O., Seeler, J. S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F., and Dejean, A. (2002) *Embo J* **21**(11), 2682-2691
91. Kim, Y. E., Kim, D. Y., Lee, J. M., Kim, S. T., Han, T. H., and Ahn, J. H. (2005) *Biochem Biophys Res Commun* **330**(3), 746-754

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1- SUMO modification of TIF1 β *in vivo*.

A-C) Sumoylation of tagged-TIF1 β (2 μ g) in the presence or absence of GFP-SUMO1 (0,5 -1 μ g), GFP-SUMO2 (3 μ g), SENP1 (3 μ g) and SENPC603S (1 μ g) revealed by immunoblot (IB) of 293T whole cell extracts. **D)** Sumoylation of immunoprecipitated Flag-HA-tagged-TIF1 β (2 μ g) in the presence or absence of GFP-SUMO1 (2 μ g) revealed by anti-Flag and anti-GFP immunoblots. The input lanes correspond to 1.25% of the whole cell extracts used for the immunoprecipitation (IP). With the anti-GFP antibody, the signal obtained is proportional to TIF1 β concentration and the number of GFP-SUMO molecules linked to TIF1 β sumoylated species. **E)** Sumoylation of endogenous TIF1 β in the presence or absence of transfected myc-SUMO1 (6 μ g), GFP-SUMO (2 μ g) or Flag-PIASy (1,5 μ g) revealed by immunoblot of 293T whole cell extracts. Arrow heads point to the unmodified TIF1 β . On panel D, arrows point to the SUMO-modified TIF1 β species. On panel A to C, the star identifies TIF1 β modified by endogenous SUMO. NS, signifies a non specific cross-reacting band. The calibrated molecular mass of prestained marker proteins is indicated in kDa.

FIGURE 2- Identification of TIF1 β sumoylation sites.

A) Sumoylation profiles of Gal4DBD-TIF1 β and C-terminal deletion mutants (Δ 1- Δ 4) (3 μ g) co-transfected (left) or not (right) with GFP-SUMO1 (3 μ g) revealed by immunoblot of 293T whole cell extracts; the faster migrating dark band corresponds to the unmodified TIF1 β . For the GFP sumoylation, a longer exposure is shown for Δ 1 and Δ 2 mutants (last two lanes). For the wild type protein and C-terminal deletion mutants (lane 1-5, right panel), stars identify TIF1 β species modified by endogenous SUMO. **B)** Schematic representation of the full length 834 amino acids TIF1 β and mutants. The characterized domains represented are the RING finger, B box 1, B box 2, coiled-coil domain, HP1BD (HP1 Binding Domain), PHD (Plant-Homeo Domain) finger and Bromo-domain. Mutated residues used in this study are indicated. **C)** Illustration of the amino acid context

surrounding TIF1 β sumoylation target lysines. Target lysine residues are in bold and those that are part of a classical ψ KXE consensus sequence are underlined. **D)** Sumoylation profiles of lysine to arginine mutants of Gal4DBD-TIF1 β (2-3 μ g) in the presence of GFP-SUMO1 (2 μ g) revealed by immunoblot of 293T whole cell extracts. Arrow head points to the unmodified TIF1 β . Arrows point to the bands containing mono-sumoylated species and the modified lysine is indicated. A schematization of the sumoylation profile is provided on the right. Brackets identify mono- and multi-sumoylated species and bands in parentheses correspond to TIF1 β species containing potentially five (observed on some blots) or six SUMOs (never detected).

FIGURE 3- Regulation of TIF1 β transcriptional repression by sumoylation.

A) Schematic drawing of luciferase reporter and Gal4-effector plasmids. The luciferase reporter is under the control of the strong SV40 promoter, five consensus Gal4 UAS (5xGal4UAS) and the SV40 enhancer sequence (SV40 E). Effectors proteins correspond to wild type TIF1 β , its lysine to arginine mutants or KRAB domain. **B-C)** Transcriptional activity of TIF1 β wild type and sumoylation-less mutants directly recruited to the luciferase reporter. All transient transfections were done in 293T cells using 200 ng of reporter plasmid and a fixed amount of Gal4DBD-TIF1 β effectors as indicated in (B) or increasing amounts of either Gal4DBD-TIF1 β WT or K554,575,779,804R (4KR) mutant (from 25 to 300 ng) (C). Fold repression represents the ratio of luciferase activity measured for the reporter alone to the activity measured in the presence of the indicated effector proteins after normalization for transfection efficiency. Error bars represent the standard deviation for at least three independent experiments performed in duplicate or triplicate. **D)** Effect of sodium butyrate, a class I and II HDAC inhibitor, on the transcriptional activity of TIF1 β wild type and its sumoylation-less mutant. Transfections were done using 200 ng of reporter with 500 ng of the Gal4DBD- Δ TIF1 β or 100 ng of the Gal4DBD-TIF1 β constructs for untreated cells. Considering the observed \sim five-fold increase in the expression of TIF1 β and the normalizing *Renilla* luciferase in sodium butyrate treated cells, the amount of Gal4DBD-effectors (Gal4DBD- Δ TIF1 β 100 ng or Gal4DBD-TIF1 β 20 ng)

was adjusted to obtain similar protein expression in treated and untreated cells. Expression of the reporter plasmid was unaffected by the sodium butyrate treatment as seen on the figure. Cells were treated with sodium butyrate 24 h post-transfection and recovered 24 h later for transcriptional assays. Error bars represent the standard deviation for at least three independent experiments performed in duplicate. SUMO-related repression (arrow) is composed of HDAC-dependent and HDAC-independent components (dotted arrows). For all assays (B-D), the expression level of TIF1 β was assessed by immunoblots of 293T whole cell extracts from pooled duplicate or triplicate samples derived from one independent experiment.

FIGURE 4- Regulation of TIF1 β transcriptional co-repression by sumoylation.

A) Co-repressor activity of TIF1 β wild type and sumoylation-less mutant recruited to the luciferase reporter by a KRAB domain. Transfections were done in conditions where the endogenous TIF1 β becomes limiting using 600 ng of luciferase reporter, 200 ng of Gal4DBD-KRAB and increasing amounts of wild type or 4KR Flag-HA-TIF1 β (up to 480 ng). The percentage of change in repression due to the transfected TIF1 β and KRAB domain constructs was evaluated relative to the observed 10-fold repression of the reporter luciferase activity elicited by the KRAB domain construct alone. A typical experiment out of three performed in duplicate is presented. The duplicate are within 5,5%. The expression level of TIF1 β or KRAB domain proteins was assessed by immunoblots of 293T whole cell extracts from pooled duplicate samples derived from one independent experiment.). Stars identify TIF1 β species modified by endogenous SUMO. **B)** BRET² titration curves showing interaction in living mammalian cells between the KRAB domain and full length wild type TIF1 β and mutants. The BRET² pairs tested were Rluc-TIF1 β (•), Rluc-TIF1 β 4KR (O) or Rluc-TIF1 β L271P (◊) used in fixed amount (in the range of 1-2 μ g) with increasing amounts of GFP-KRAB-NLS (from 0,2 to 8 μ g). Rluc-TIF1 β L307P/GFP-KRAB-NLS BRET² pair (Δ) was used as negative control. For each pair, data of three independent experiments performed in duplicate were pooled. The data were represented as described in EXPERIMENTAL PROCEDURES.

FIGURE 5- Regulation of TIF1 β sumoylation by KRAB domain-containing proteins.

A) KRAB domain-containing proteins promote TIF1 β sumoylation. Sumoylation profiles of wild type HA-tagged-TIF1 β (2 μ g) (left panel) and HA-TIF1 β -L307P deficient for KRAB domain interaction (2 μ g) (middle panel) with limiting amount of GFP-SUMO1 (1 μ g) in the presence or absence of either the full-length KRAB domain (Gal4-KRAB, 1 μ g) or a truncated KRAB domain (Gal4-KRAB tr) as revealed by immunoblot of 293T whole cell extracts. In the right panel, either the myc-tagged KRAB domain-containing ZNF74-II isoform (7 μ g) or its KRAB domain truncated isoform, ZNF74-I (7 μ g) were used instead of Gal4-KRAB constructs. Similar expression level of Gal4DBD-fusion, ZNF74 isoforms and GFP-SUMO1 were ascertained by immunoblot and total fluorescence measurement, respectively. **B)** The endogenous sumoylation of endogenous TIF1 β is enhanced in the presence of a full-length KRAB domain (Gal4-KRAB 6 μ g). Arrow heads point to the unmodified TIF1 β . A star identifies the endogenous TIF1 β species modified by endogenous SUMO.

FIGURE 6- TIF1 β sumoylation status depends on the integrity of its homo-dimerization domain and of its PHD finger domain.

A) TIF1 β optimal sumoylation requires an intact RBCC motif. Sumoylation profiles of wild type HA-tagged-TIF1 β (1,5 μ g) and coiled-coil mutants (L271P or L307P, 2,5 μ g) in the presence of GFP-SUMO1 (1 μ g) revealed by immunoblot of 293T whole cell extracts. BRET² titration analysis showing homo-dimeric interaction of TIF1 β wild type, its coiled-coil domain mutants or its sumoylation-less mutant in living 293T cells. The BRET² pairs tested were Rluc-TIF1 β /GFP-TIF1 β (•), Rluc-TIF1 β L271P/GFP-TIF1 β L271P (◊), Rluc-TIF1 β L307P/GFP-TIF1 β L307P (Δ), Rluc-TIF1 β 4KR/GFP-TIF1 β 4KR (O) and the negative control pair Rluc-TIF1 β /GFP-NLS (*). Briefly, 293T cells were transfected with fixed amount of Rluc fusion protein (in the range of 1-2 μ g) and increasing amounts of GFP fusion protein (from 0,05 to 6 μ g). For each pair, data of at least three independent

experiments performed in duplicate were pooled. The data were represented as described in EXPERIMENTAL PROCEDURES. **B)** TIF1 β sumoylation depends on its homo-dimerization and on the integrity of the PHD finger domain. Comparison of the sumoylation profiles obtained in 293T cell extracts between wild type HA-tagged-TIF1 β (2 μ g) and an HA-tagged- Δ N-TIF1 β mutant devoid of the RBCC homo-dimerization motif (2 μ g) (left panel), Gal4- Δ N-TIF1 β (10 μ g) and its derivative mutated in the PHD finger (middle panel) as well as Gal4-TIF1 β and its derivative mutated in the PHD finger combined as shown in the right panel. GFP-SUMO1 (1 μ g in right panel or 2 μ g) was co-transfected with TIF1 β constructs. For each experiment, the total GFP fluorescence was measured to confirm equivalent GFP-SUMO1 expression level. Arrow heads point to the unmodified TIF1 β .

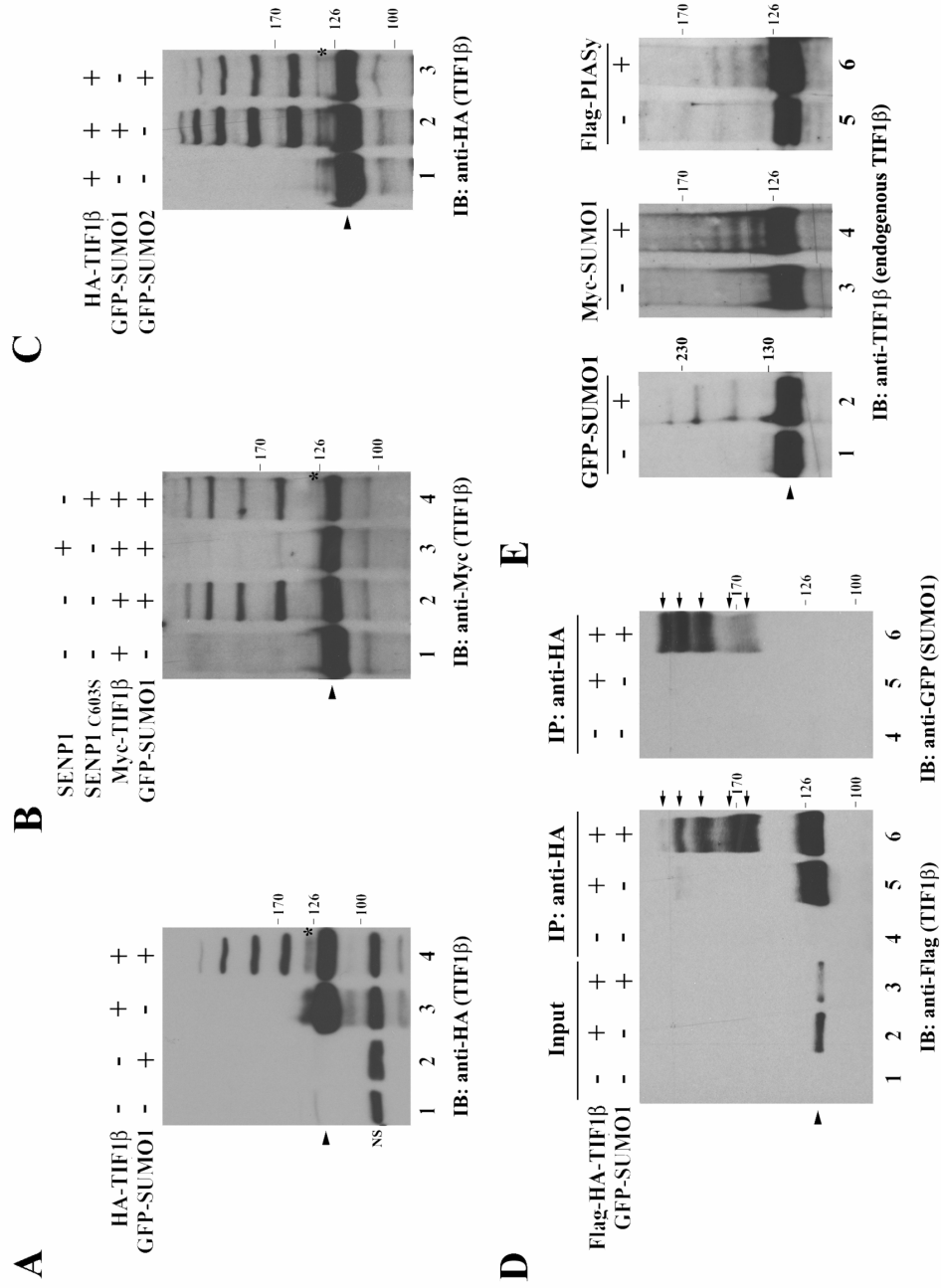
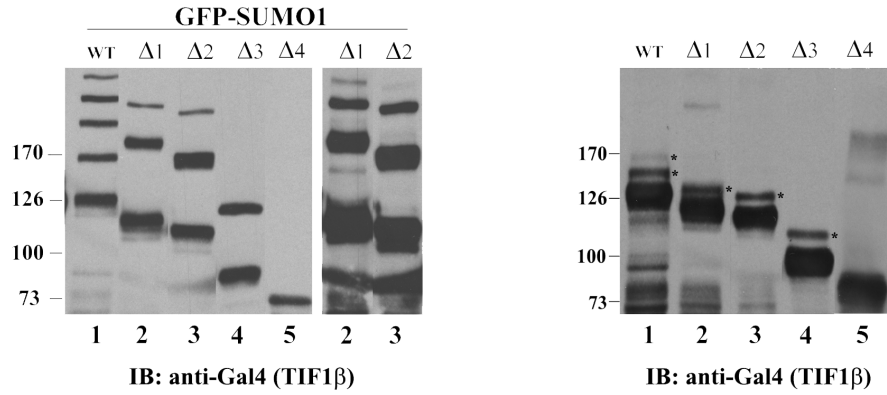


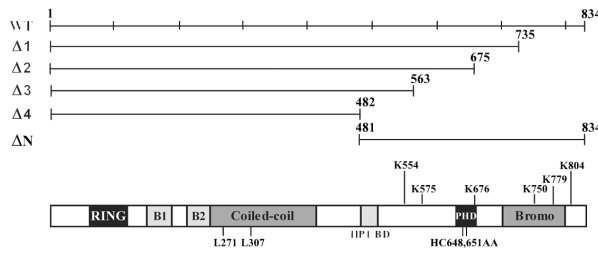
FIGURE 1

A



B

Gal4-TIF1β constructs :



C

544 APPLPGMAIVK⁵⁵⁴EEETEAAIGA 564
 565 PPAAPEGPETK⁵⁷⁵PVLMPLTEGP 585
 666 CSLCHVLPDLK⁶⁷⁶EEDGSLSLDG 686
 760 LTLIRARLQEK⁷⁵⁰LSPPPYSSPQE 770
 769 FKQFNKLTEDK⁷⁷⁹ADVQSIIGLQ 789
 794 TRMNDAFGDTK⁸⁰⁴FSAVLVEPPP 814

D

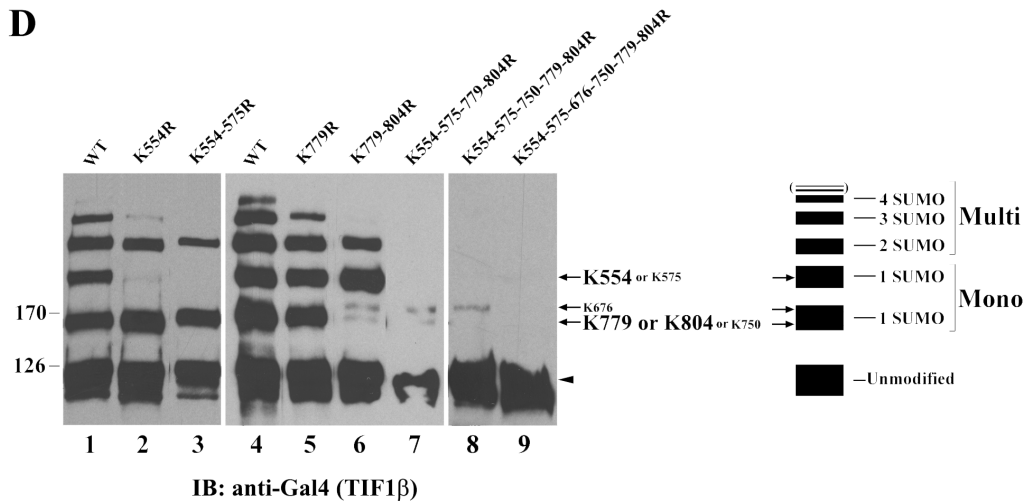


FIGURE 2

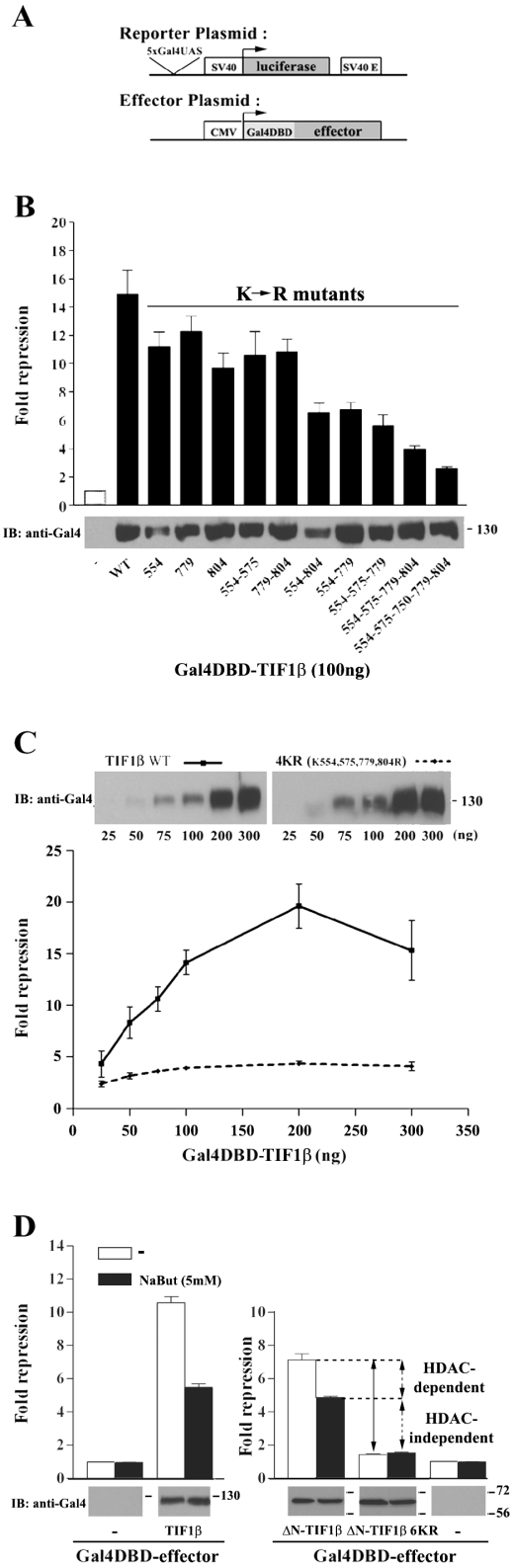


FIGURE 3

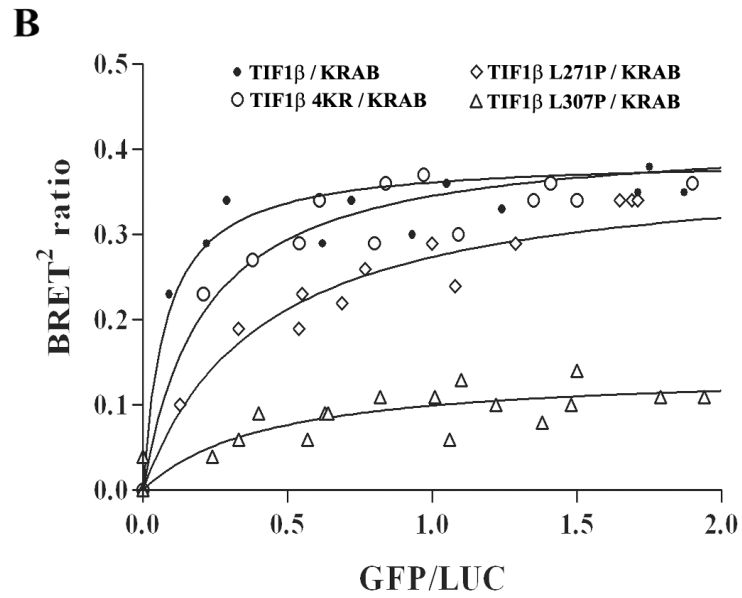
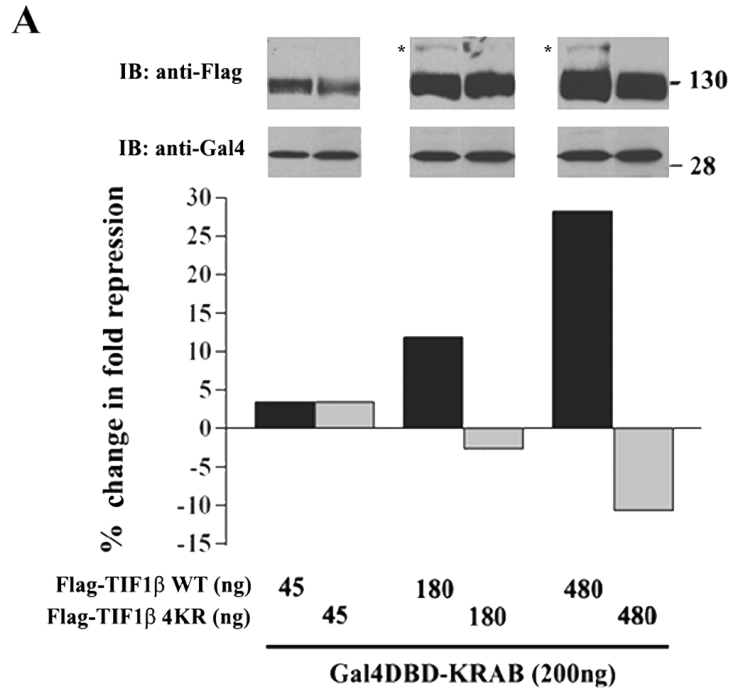


FIGURE 4

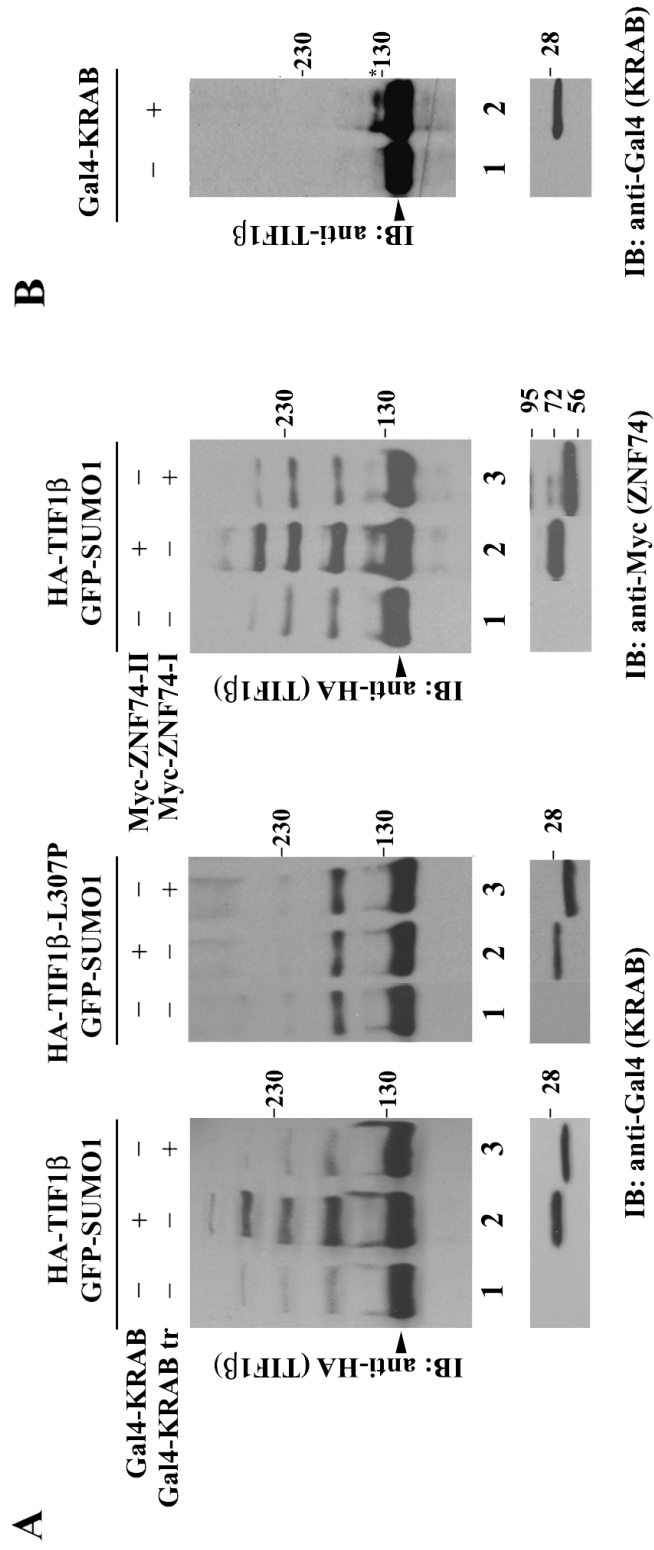


FIGURE 5

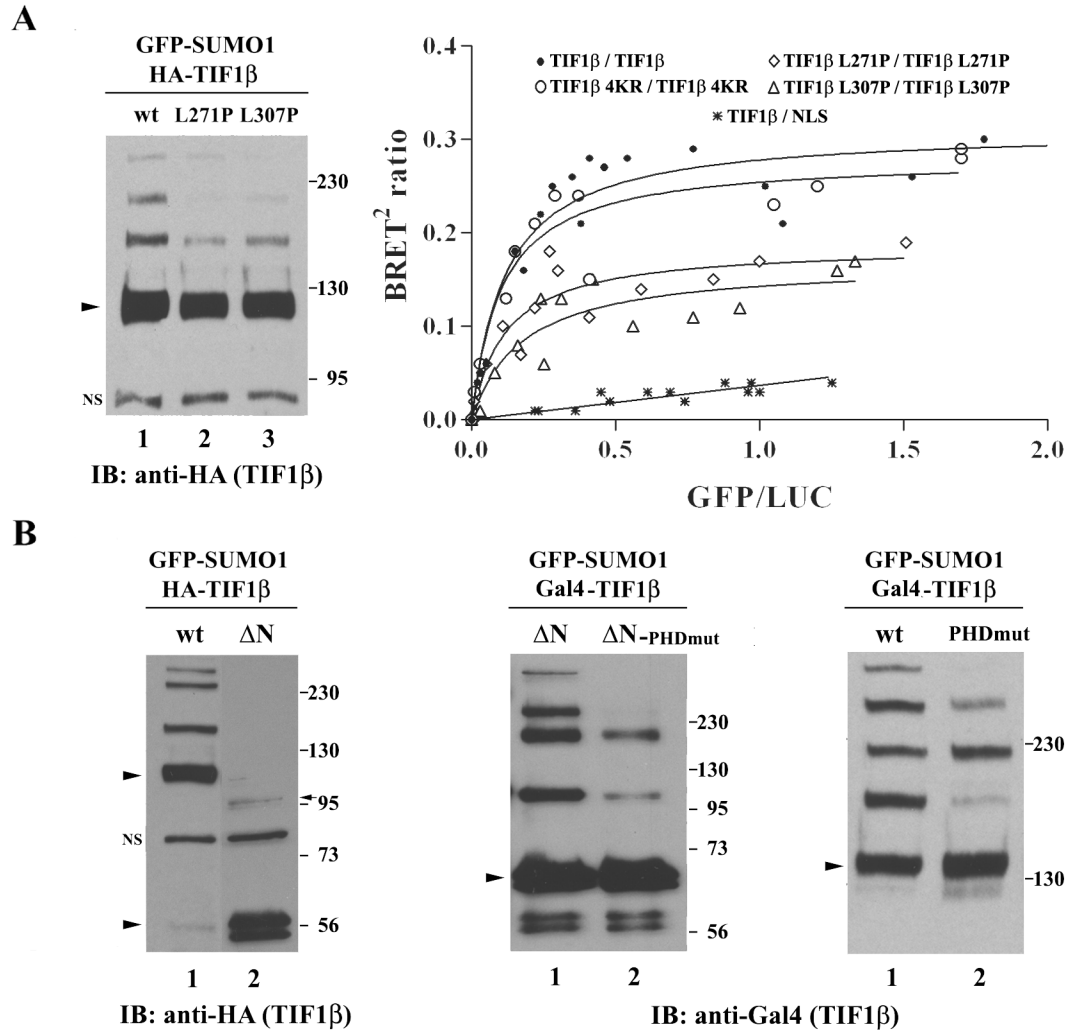


FIGURE 6

3. Autres résultats: quelques questions et expériences préliminaires pour y répondre

3.1 Perspectives à plus long terme: un suivi de la sumoylation et de l'ubiquitination de PML *in vivo* en temps réel de façon simultanée

Les expériences présentées dans l'article # 2 ont été réalisées à la fois en BRET¹ et en BRET². Le BRET¹ utilise la YFP alors que le BRET² utilise la GFP. Les caractéristiques spectrales de ces deux fluorophores peuvent être dissociées permettant ainsi d'envisager la possibilité de détecter à la fois la sumoylation et l'ubiquitination de PML en temps réel, *in vivo* de manière simultanée. Alors que nous cherchions à pleinement caractériser notre signal de BRET^{UBI}, simultanément, des expériences préliminaires ont été réalisées et donnent d'encourageants résultats sur une possible détection par BRET d'interdépendance entre ces deux MPTs sur PML. L'obstacle majeur rencontré réside dans le fait que nous n'avons pas totalement caractérisé et disséqué la provenance du signal généré par PML-Luc / GFP-UBI. Toutefois, dès que des outils seront disponibles ou qu'il sera possible par des expériences supplémentaires (suggérées ci-dessus) de mieux définir ce signal, une relation sumoylation / ubiquitination pourra être définie.

En effet, nous avons observé que lors du traitement à l'As₂O₃, une augmentation du signal généré entre PML-Luc et YFP (ou GFP)-SUMO1 (reflétant l'interaction covalente de PML avec SUMO1 tel que démontré dans la Fig. 3 de l'article # 2) est observée et cette augmentation est maximale à 70 minutes (Fig. 2 de l'article # 2). Le signal généré par la paire PML-Luc / GFP-UBI, quant à lui, augmente rapidement dans un premier temps pour ensuite rapidement diminuer (cf. Figure 36 ci-dessous). L'observation simultanée de ces deux signaux en cotransfectant PML-Luc / YFP-SUMO1 et GFP-UBI permet de voir que l'As₂O₃ induit toujours une augmentation du signal de sumoylation alors que la diminution de celui d'ubiquitination est moins visible (cf. Figure 37 A et B). Ceci suggère une relation et une interdépendance entre ces deux MPTs. Il reste toutefois à déchiffrer le signal obtenu

avec GFP-UBI avant de véritablement conclure. Ces résultats sont cependant des préliminaires encourageants pour déchiffrer la relation sumoylation / ubiquitination de PML.

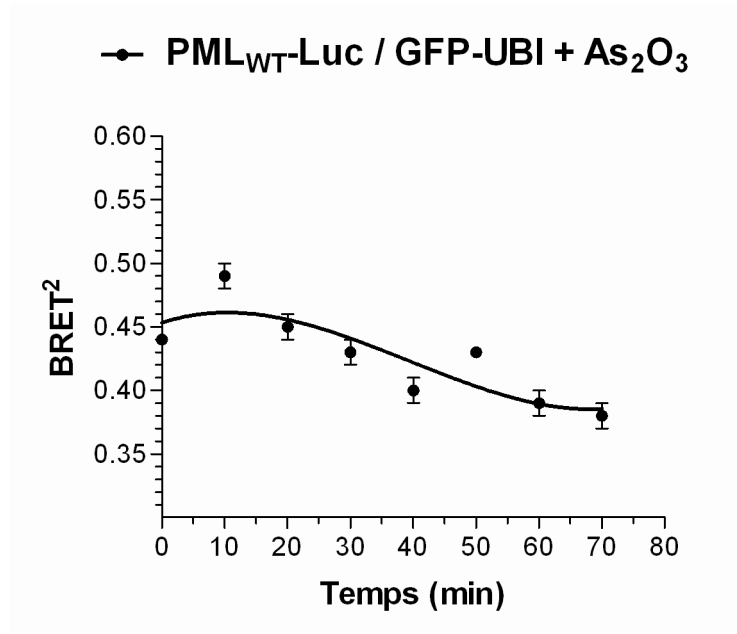


Figure 36: Évolution du signal BRET² généré par la paire PML-Luc / GFP-UBI après traitement à l'As₂O₃.

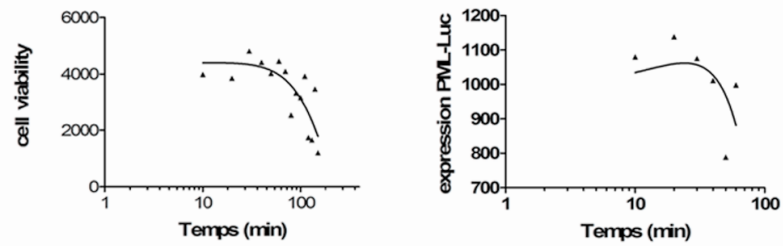
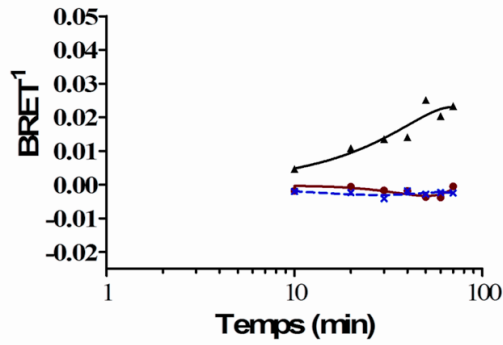
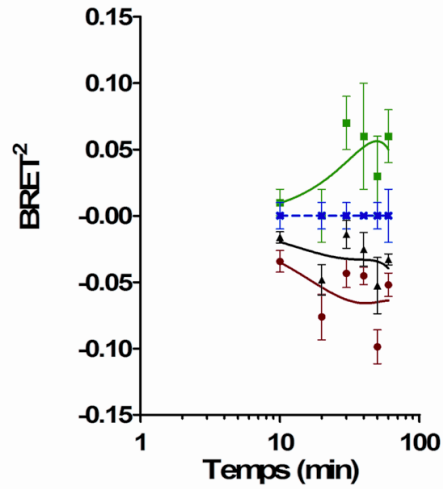
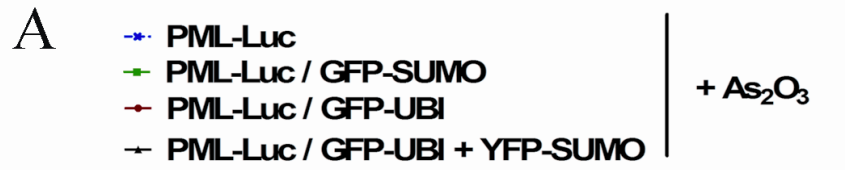


Figure 37: Mise en évidence d'une relation interdépendante entre la sumoylation et le signal B.R.E.T. détecté par PML-Luc / GFP-UBI.

- A. *Évolution du signal BRET² généré par la paire PML-Luc / GFP- UBI lors de la coexpression de YFP-SUMO1 après traitement à l'As₂O₃. Les autres paires sont indiquées à titre de référence.*
- B. *Évolution du signal BRET¹ généré par la paire PML-Luc / YFP- SUMO1 lors de la coexpression de GFP-UBI. Les autres paires sont indiquées à titre de référence. Les mesures pour les graphes A. et B. ont été effectuées sur les mêmes cellules.*
- C. *Viabilité suite au traitement à l'As₂O₃ des cellules coexprimant PML-Luc / YFP- SUMO1 / GFP- UBI.*
- D. *Quantification de la quantité de PML-Luc suite au traitement à l'As₂O₃ dans les cellules coexprimant PML-Luc / YFP- SUMO1 / GFP- UBI.*

Afin de confirmer une influence sur la sumoylation de PML par la coexpression de GFP-UBI, d'autres expériences préliminaires ont été réalisées. Un suivi en temps réel du signal BRET^{1,SUMO1} et BRET^{2,UBI} sur des cellules ayant été cotransfectées par PML-Luc + YFP-SUMO1 (en quantité fixe) + GFP-UBI (en quantité croissante) ± As₂O₃ démontre que l'ajout de GFP-UBI en quantité croissante diminue le signal de sumoylation généré en BRET¹ par YFP-SUMO1.

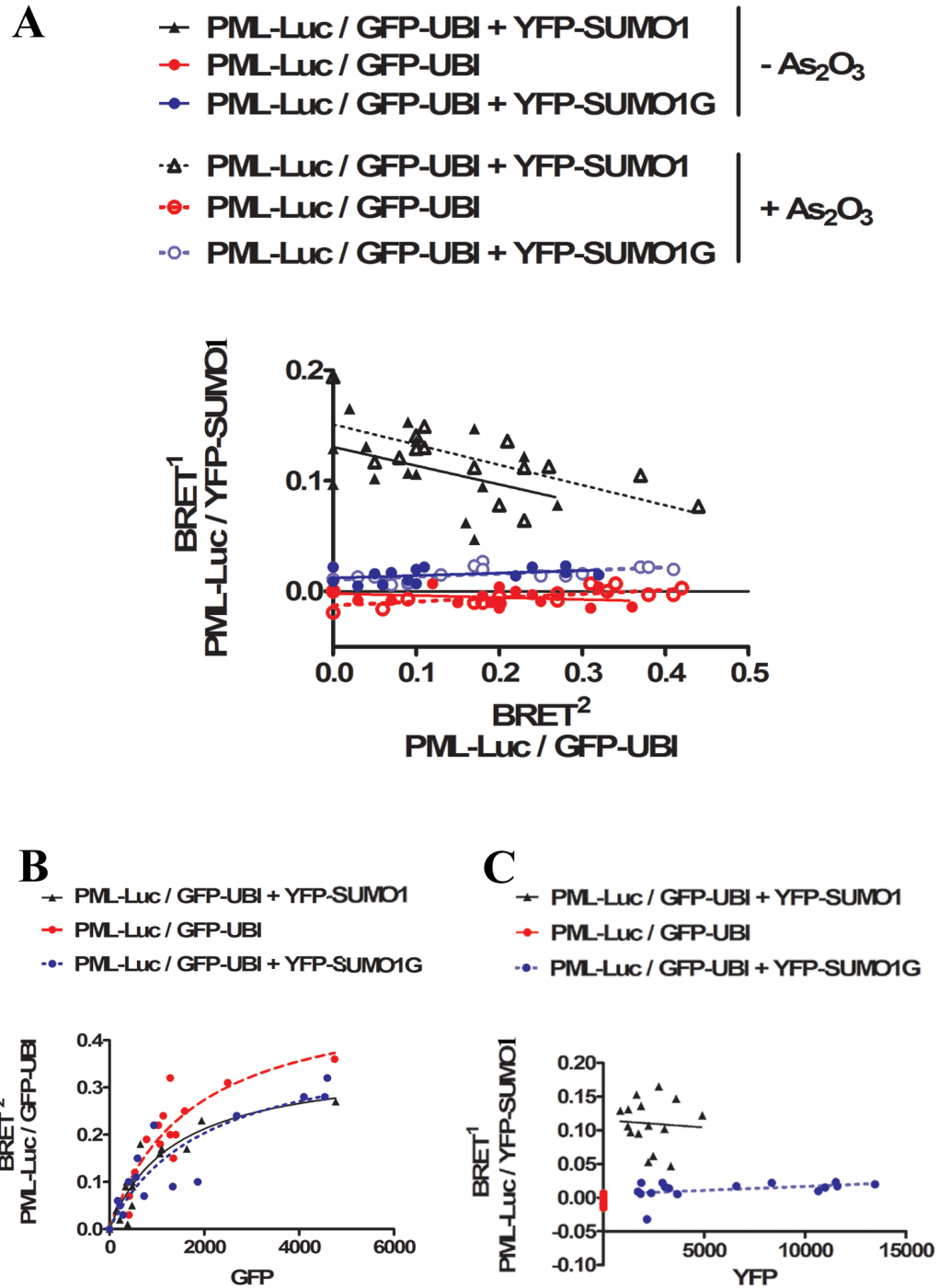


Figure 38: La coexpression d'une quantité croissante de GFP-UBI compétitionne pour le signal BRET de sumoylation basal et As₂O₃-induit.

- A. *Le signal de sumoylation basal ou As₂O₃-induit (PML-Luc / YFP-SUMO1; BRET¹) est compétitionné lorsque GFP-UBI est coexprimé en quantité croissante (PML-Luc / GFP-UBI; BRET²). Les paires PML-Luc / GFP-UBI et PML-Luc / GFP-UBI + YFP-SUMO1G sont utilisées comme contrôle négatif.*
- B. *Signal BRET² selon la quantité de GFP-UBI exprimé.*
- C. *Signal BRET¹ selon la quantité de YFP-SUMO1 ou SUMO1G exprimée. Les figures A, B et C sont produites à partir de mesures réalisées au cours de la même expérience sur les mêmes cellules.*

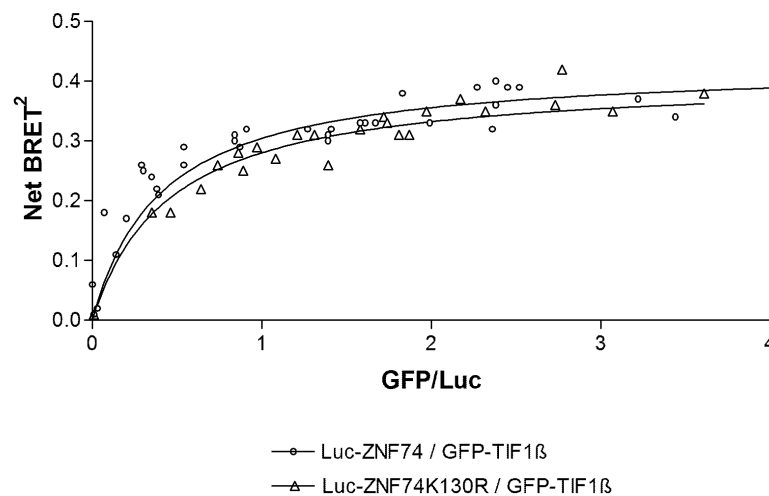
Ces résultats préliminaires sont des plus encourageants, toutefois, il est évident que, pour définitivement conclure, nous devons tout d'abord mieux comprendre le signal généré par la fusion GFP-UBI. Ceci est actuellement en cours d'investigation. De plus, il est évident désormais, suite aux résultats présentés en Fig. 5 de l'article #2, que cette expérience devra être répétée avec YFP-SUMO2 ou 3 au lieu de YFP-SUMO1G. Puisque la dégradation As₂O₃ de PML est principalement reliée à sa sumoylation par SUMO1 (très inductible sous l'effet de l'As₂O₃), il est probable que SUMO2 ou 3 ne démontrent pas de relation avec le signal généré par GFP-UBI. YFP-SUMO2/3 se révélera donc un bien meilleur contrôle dans cette expérience que YFP-SUMO1G puisqu'il générera un signal BRET¹ différent de zéro (puisque PML est modifié par SUMO2/3 (120)) mais qui restera insensible à la coexpression croissante de GFP-UBI (puisque cette modification de PML par SUMO2/3 ne devrait être impliquée que minoritairement dans la dégradation As₂O₃-dépendante de PML). Diverses futures expériences permettront de confirmer cette hypothèse.

3.2 Étude par BRET de l'influence de la sumoylation sur l'interaction entre ZNF74 et TIF1 β :

3.2.1 Le mutant de sumoylation de ZNF74 interagit-il avec TIF1 β ?

Le mutant non sumoylable de ZNF74 (ZNF74K130R) est testé afin de déterminer s'il interagit avec TIF1 β et si la sumoylation de ZNF74 pourrait réguler son interaction. Son interaction est similaire à celle de ZNF74 non muté. Ce dernier n'est pas contre pas sumoylé maximalement sans surexpression de SUMO ou d'enzyme de la machinerie de sumoylation. Il est donc difficile de conclure sur la base de cette expérience à l'influence de la sumoylation de ZNF74 sur l'interaction avec TIF1 β d'où l'expérience suivante.

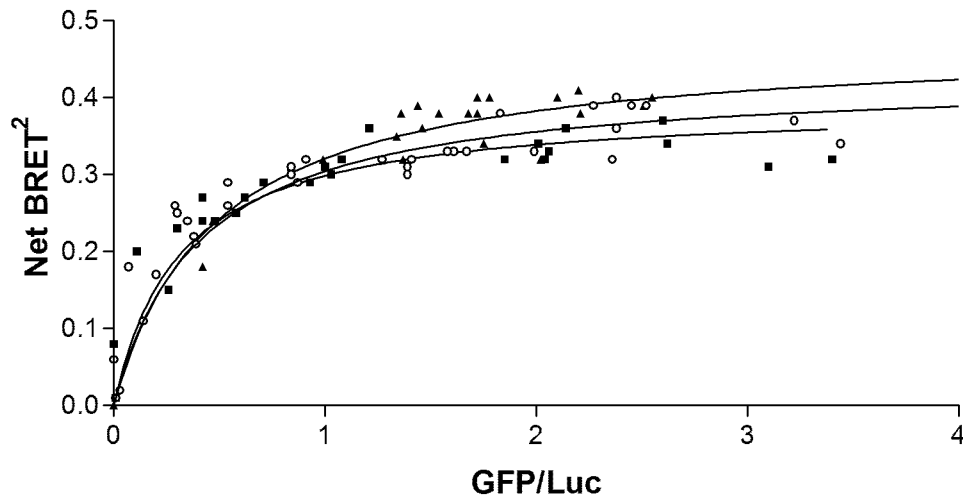
**Abolishing
ZNF74 endogenous sumoylation
does not change
ZNF74 / TIF1 β interaction**



3.2.2 L'augmentation de la sumoylation de ZNF74 ou TIF1 β par surexpression de SUMO1 ou PIASy modifie-t-elle l'interaction ZNF74 / TIF1 β ?

Enhancing sumoylation by overexpressing SUMO1 or PIASy does not change the KRAB / TIF1 β interaction

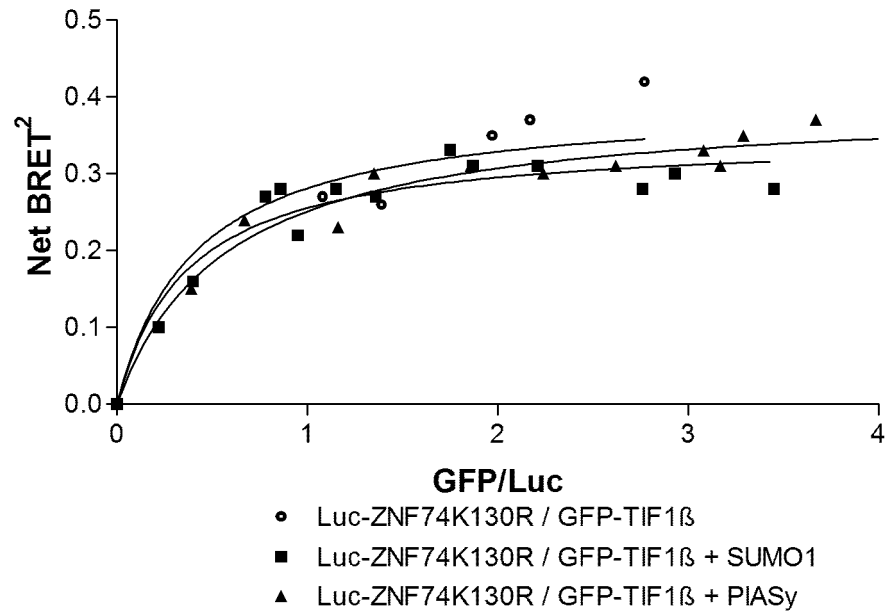
KRAB/TIF1 β interaction was assessed by BRET using a full length KRAB containing protein, ZNF74 (Germain-Desprez et al. 2003). Overexpressing SUMO1 or PIASy does not change this interaction whereas an increased TIF1 β sumoylation is observed by western blotting on BRET samples.



- Luc-ZNF74 / GFP-TIF1 β
- Luc-ZNF74 / GFP-TIF1 β + SUMO1
- ▲ Luc-ZNF74 / GFP-TIF1 β + PIASy

3.2.3 L'augmentation de la sumoylation de TIF1 β seule (alors que celle de ZNF74 est abolie) par surexpression de SUMO1 ou PIASy modifie t'elle l'interaction ZNF74 / TIF1 β ?

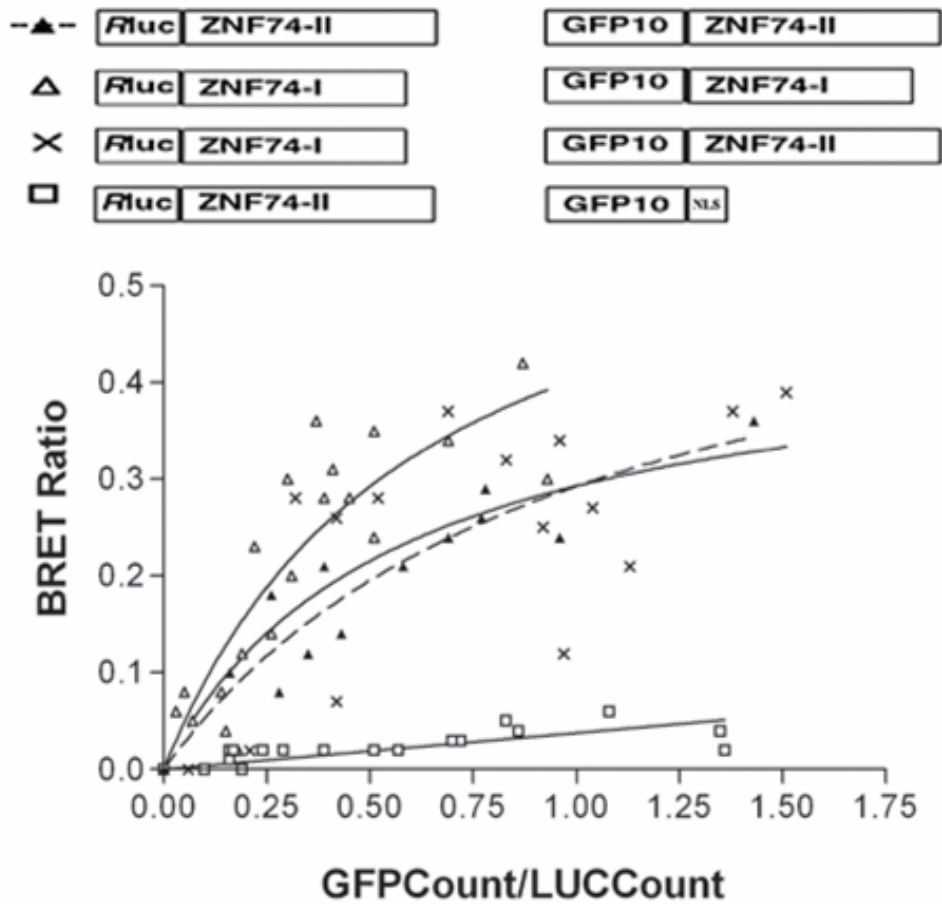
Enhancing TIF1 β sumoylation while ZNF74 sumoylation is abolished does not change ZNF74 / TIF1 β interaction



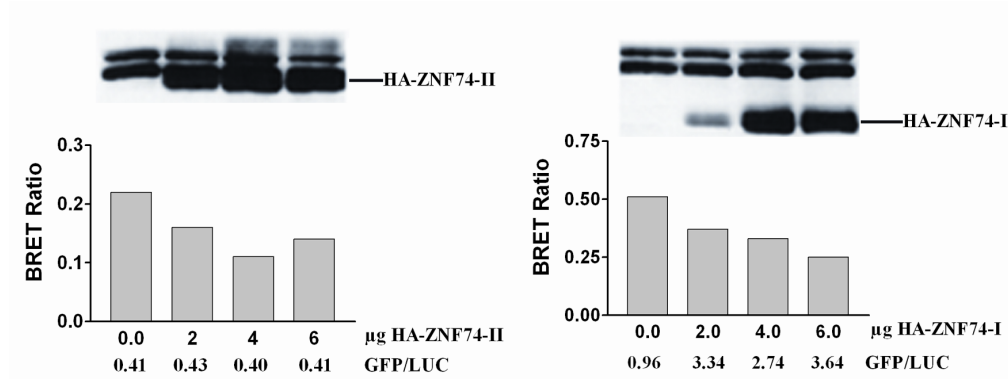
N.B.: pour toutes les expériences décrites dans la section 3.2, l'augmentation des niveaux de sumoylation de chaque protéine concernée lors de la surexpression de SUMO1 ou PIASy a été vérifiée (résultat non montré).

3.3 Étude par BRET de la dimérisation des deux isoformes de ZNF74:

3.3.1 Les deux isoformes de ZNF74 homo et hétérodimérisent



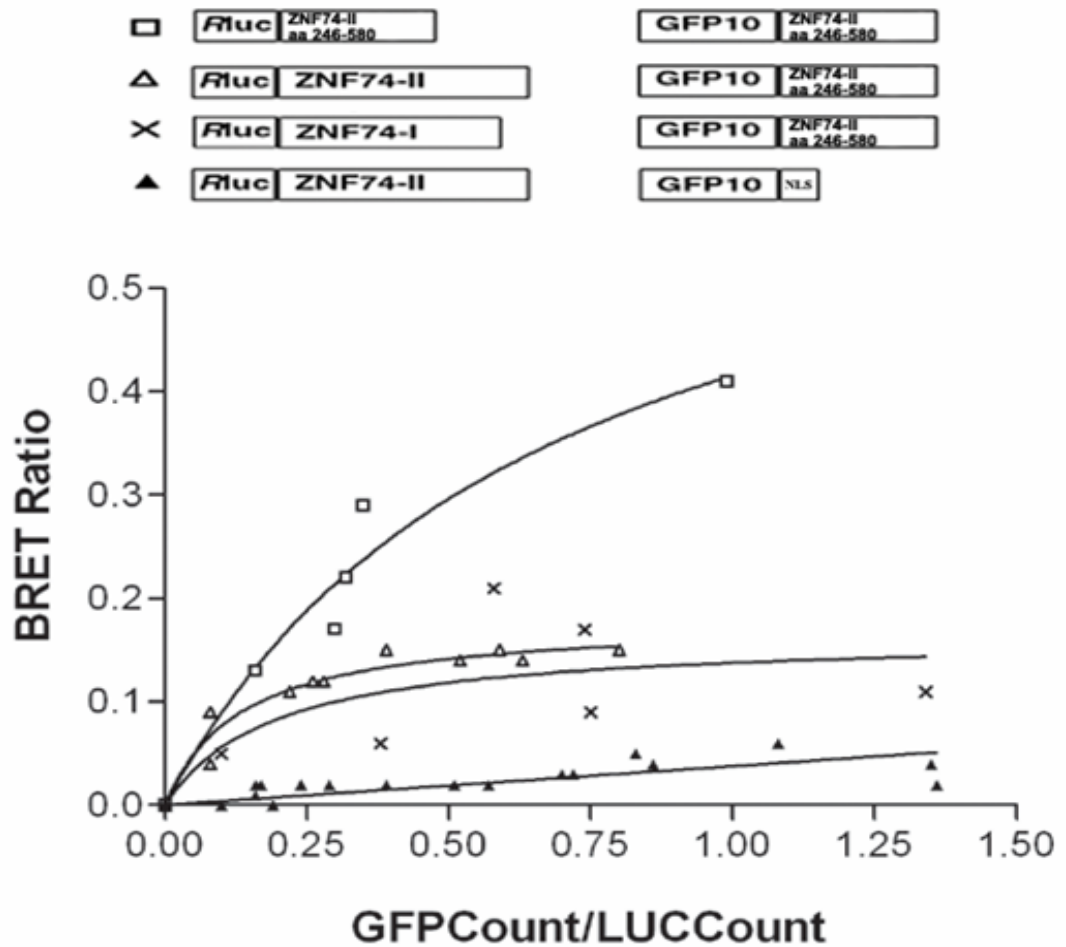
3.3.2 La spécificité de dimérisation est démontrée par des compétitions similaires à celles réalisées dans l'article # 1



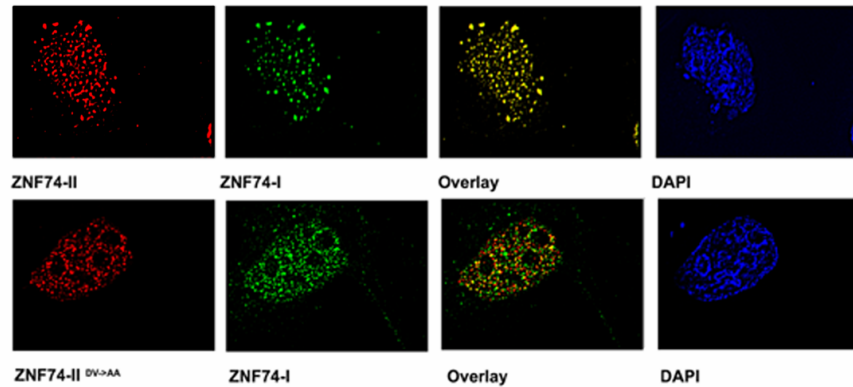
Le panneau de gauche présente la compétition faite avec HA-ZNF74-II sur la paire Luc-ZNF74-II / GFP-ZNF74-II. Le panneau de droite présente la compétition faite avec HA-ZNF74-I sur la paire Luc-ZNF74-I / GFP- ZNF74-I. Le niveau d'expression du compétiteur portant une étiquette HA est vérifié (Voir Western-blot au dessus de chaque graphe).

3.3.3 Le domaine multidoigt de zinc (a.a. 246-580) est suffisant pour induire la dimérisation de ZNF74

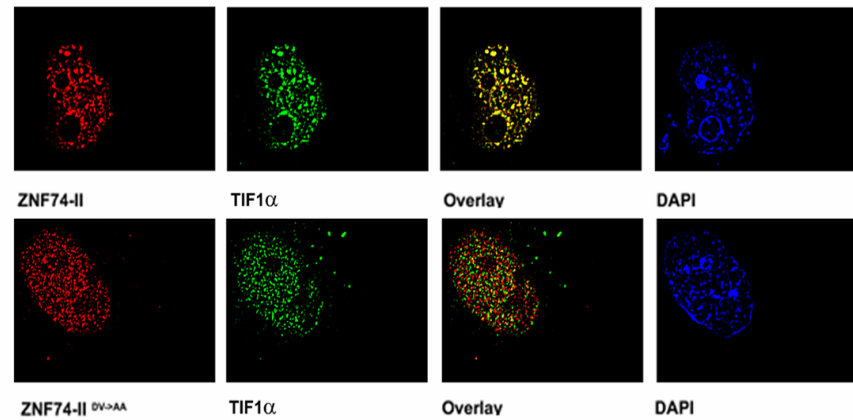
Le domaine multidoigt de zinc (a.a. 246-580) est suffisant pour induire la dimérisation de ZNF74



3.4 ZNF74-I et ZNF74-II colocalisent et l'interaction ZNF74-II / TIF1 β est nécessaire à cette colocalisation



3.5 ZNF74-II et TIF1 α colocalisent et l'interaction ZNF74-II / TIF1 β est nécessaire à cette colocalisation



4. Curriculum Vitae

Delphine GERMAIN-DESPREZ

Département de Biochimie, Université de Montréal

C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, QC H3C 3J7, CANADA

Téléphone: (514) 343-6111 ext:3747, Fax: (514) 343-2210,

delphine.desprez@umontreal.ca, delphine.desprez@videotron.ca

Domaine de recherche

Biologie Moléculaire – Biochimie – Modifications post traductionnelles (ubiquitination, sumoylation, phosphorylation) – Protéines TRIM (PML, TIF1 α et β) – Régulation transcriptionnelle – BRET.

Parcours académique

2001-présent Ph.D. Biologie Moléculaire

Université de Montréal, Département de Biochimie, Montréal, *Canada*
Laboratoire du Dr M. Aubry.

Congés de maternité Février - Juillet 2005

Mai - Octobre 2002

2001 M.Sc. Biologie Moléculaire

Université de Montréal, Hôpital Sainte-Justine, Montréal, *Canada*
Laboratoire du Dr L. Simard.

1999 Maitrise Biologie Cellulaire et Physiologie

Faculté des Sciences Exactes et Naturelles à Reims-51- *France*

1998 Licence Biologie Cellulaire et Physiologie (Licence)- Faculté des Sciences Exactes et Naturelles à Reims-51 *France*

1997 DEUG Biologie Biochimie (Diplôme d'Etudes Universitaires Générales)

Faculté des Sciences Exactes et Naturelles à Reims-51 *France*

Publications

Percherancier Y. *, Germain-Desprez D.*, Galisson F., Mascle XH., Dianoux L., Estephan P., Chelbi-Alix M.K.#, Aubry M#.

Role of SUMO in RNF4-mediated PML degradation: PML sumoylation and phospho-switch control of its SUMO Binding Domain (SBD) dissected by BRET

En préparation.

*, # Contribution égale

Mascle XH, Germain-Desprez D, Huynh P, Estephan P, and Aubry M.

Sumoylation of TIF1beta co-repressor of KRAB multifinger proteins is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain.

J Biol Chem, [Epub ahead of print], **2007**.

Germain-Desprez D, Bazinet M, Bouvier M, and Aubry M.

Oligomerization of transcriptional intermediary factor 1 regulators and interaction with ZNF74 nuclear matrix protein revealed by bioluminescence resonance energy transfer in living cells.

J Biol Chem 278: 22367-22373, **2003**.

Germain-Desprez D, Brun T, Rochette C, Semionov A, Rouget R, and Simard LR.

The SMN genes are subject to transcriptional regulation during cellular differentiation. *Gene* 279: 109-117, **2001**.

Présentations à des congrès nationaux et internationaux

BRET as a sensitive assay to dynamically detect covalent and non-covalent PML/SUMO interactions in living cells.

D Germain-Desprez*, Y Percherancier*, XH Mascle, F Galisson, P Estephan, L Dianoux, MK Chelbi-Alix#, M Aubry#.

Février 2008. Ubiquitin, Ubiquitin-like proteins and Cancer 4th International Conference, Texas, U.S.A. – Poster

The dynamics of PML sumoylation/ubiquitination in the light of the BRET.

Y Percherancier.*, D Germain-Desprez.*, XH Mascle., P Estephan., M Aubry#, M.K Chelbi-Alix#.

Septembre 2007. 50th Anniversary of the discovery of Interferons, Oxford, England-Poster

The sumoylation of TIF1β, a prerequisite for its repressive activity, depends on its PHD finger and is modulated by KRAB domain-containing proteins.

Mascle XH, Germain-Desprez D, Huynh P, Estephan P, and Aubry M.

Juin 2007. Biochemical society, Regulation of protein function by SUMO modification, Manchester, UK - Poster

The dynamics of PML sumoylation/ubiquitination in the light of the BRET.

Y Percherancier.*, D. Germain-Desprez.*, XH Mascle., P Estephan., M Aubry[#], M.K Chelbi-Alix[#].

Avril 2007. 50th Anniversary of Interferon, Paris, France - Poster

Dynamics of PML sumoylation/ubiquitination detected in living cells by BRET.

D. Germain-Desprez.*, Y Percherancier.*, XH Mascle., P Estephan., M.K Chelbi-Alix[#], M Aubry[#].

Avril 2007. CSHL Meeting, NY, USA - Poster

PIASy and PIAS1 E3 ligases differentially enhance the sumoylation of the two isoforms of the KRAB Multifinger protein ZNF74.

X Mascle., S Abenhaim., D. Germain-Desprez., P Estephan., and M Aubry.

Novembre 2004. Abcam, Chromatin Structure and Function Meeting, Cancun-Mexique - Poster

Tif1 α and β oligomerization and interaction with the nuclear matrix multifinger protein, ZNF74, detected in living cells by Bioluminescence Resonance Energy Transfer

D. Germain-Desprez, M. Bazinet, M. Bouvier, M. Aubry,

Décembre 2002. 42nd American Society For Cell Biology Annual Meeting, San Francisco, USA- Poster

L'importance de *SMN1* peut-elle s'expliquer par son activité promotrice ?

D. Germain-Desprez, T. Brun, L. Fan, A. Semionov, L.R. Simard,

Septembre 2000. Club de Recherches Cliniques du Québec, Bromont, Québec, CA- Oral

Caractérisation des gènes *SMN* (Survival Motor Neuron) : L'acquisition de *SMN2* est un événement récent dans l'évolution et *SMN1* et *SMN2* sont tous deux régulés au niveau développemental.

L.R. Simard, D. Germain-Desprez, T. Brun, C.F. Rochette, S. Meilleur

Mai 2000. Journées génétique 2000. RGMA, Montreal, CA- Oral

Etude de l'activité promotrice des deux copies du gène *SMN* (Survival Motor Neuron) : modulation de cette activité selon la copie et selon le stade de différenciation cellulaire.

D. Germain-Desprez, T. Brun, L.R. Simard.

Mai 2000. Congrès de l'A.C.F.A.S, Montréal, CA- Oral

Prix de présentation

- Mai 2003** Département de Biochimie – Meilleure présentation orale – Journée de Biologie Moléculaire –
\$ 500
- Janvier 2002** Pfizer – Meilleur poster – Catégorie Biologie Moléculaire –
\$500
- Janvier 2000** Astra/Zeneca – Meilleur poster – Catégorie Biologie Moléculaire –
\$500

Bourses de mérite

Bourses de Post-Doctorat:

- F.R.S.Q. (Fonds de Recherche en Santé du Québec), septembre 2007-2009
\$ 30000/année

Bourses de Doctorat:

- Bourse de participation à un congrès international du programme de Biologie Moléculaire, Université de Montréal, Mai 2007
\$ 1000
- Université de Montréal, Juin 2006-Mai 2007
\$ 11000
- F.R.S.Q. (Fonds de Recherche en Santé du Québec), Mai 2004-Août 2007
\$ 20000/année (Congé de maternité inclus Février-Juillet 2005)
- H.S.F.C. (Heart and Stroke foundation of Canada), Juillet 2004-Juillet 2006
\$ 20000/année (Refusée)
- Bourse d'Excellence du Programme de Biologie Moléculaire, U de M, Mai 2003-Mai 2004
\$ 8000
- Bourse d'Excellence du Programme de Biologie Moléculaire, U de M, Janvier 2003-Mai 2003
\$ 4000
- Bourse de participation à un congrès international du programme de Biologie Moléculaire, Université de Montréal, Octobre 2002
\$ 500
- Bourse de congé de maternité de l'Université de Montréal, Mai 2002-Août 2002
\$ 3000
- Bourse d'Excellence du Programme de Biologie Moléculaire, U de M, Mai 2001-Mai 2002
\$ 7500

Bourses de Maîtrise:

- Bourse d'Excellence du Programme de Biologie Moléculaire, U de M, Mai 1999-Mai 2000

\$ 3250

Cours suivis et notes obtenues

PBC6085	Cancérologie (3 crédits)	B+
BIM6030	Biologie Moléculaire-Sujets d'actualité (3 crédits)	A
SMC6041 / BIM 6025 / 516-604D	Biologie Cellulaire et Moléculaire (5 crédits)	A
BCM6023	Régulation de l'Expression Génétique I (3 crédits)	A
BIM7020	Lectures en Biologie Moléculaire (1 crédits)	A-

Enseignement

Poste de démonstrateur pour le département de Biochimie.

BCM3531 Purification et caractérisation de la β -galactosidase.

Hiver 2002-Automne 2005, 2006 et 2007.

BCM2958 Transformation et minipréparations d'ADN.

Hiver 2006.

BCM1521 Phosphatase alcaline.

Hiver 2007.

Compétences

Biologie moléculaire: Transformation de bactéries, sous clonage, préparation d'ADN, digestion enzymatique, ligation, PCR, mutagenèse, séquençage.

Biologie cellulaire: microscopie optique et à fluorescence, transfection.

Biochimie: Fractionnement cellulaire, Western Blot, quantification de protéines, essais transcriptionnels par essai luciférase, BRET.

Divers: Culture cellulaire en milieu stérile.

Informatique: Word, Excel, Powerpoint, Graphpad Prism, Adobe Photoshop, Adobe Illustrator.

Langues: Français, Anglais.

5. Autorisations pour communication personnelle lors du congrès "The Ubiquitin Family" à CSHL, NY, avril 2007

5.1. Courriel envoyé afin de demander l'autorisation

On Jun 28, 2007, at 10:10 PM, Delphine Germain-Desprez wrote:

Hello,

I was at the CSHL meeting in April where I attended to your presentation. Presently, I'm writing my Ph.D thesis and I request your consent to cite your abstract as personal communication in my thesis, as precised on page iv of the abstract book.

Thank you in advance for your answer.

Best regards,

Delphine Germain-Desprez
Étudiante au Ph. D

Laboratoire du Dr. Muriel Aubry
Département de Biochimie, C-319
Université de Montréal
Pavillon Roger-Gaudry
C.P. 6128 Succursale Centre-Ville
Montréal, QC H3C 3J7, Canada
Tél.: (514) 343-6111 # 3747
Fax: (514) 343-2210
E-mail: delphine.desprez@umontreal.ca

5.2. Autorisation du Dr. J. Peng

From: Junmin Peng
To: Delphine Germain-Desprez
Sent: Friday, June 29, 2007 2:42 PM
Subject: RE: consent for citation of CSHL meeting 2007 content

You may use the paper attached. But some of the MS data in the paper and in the published extract was not correct because of technical issues. We now know all linkages except K63 are increased after proteasomal inhibition.

Junmin

Junmin Peng, PhD, Assistant Professor
 Dept. of Human Genetics, Center for Neurodegenerative Diseases, Emory University
 505D (office) or 525 (lab) Whitehead Building, 615 Michael Street, Atlanta, GA 30322
 Tel: (404) 712-8510 (office), (404) 712-8589 (lab), FAX: (404) 727-3728
 e-mail: jpeng@genetics.emory.edu

5.3. Autorisation du Dr. Keith D. Wilkinson

From: [Keith Wilkinson](#)
To: [Delphine Germain-Desprez](#)
Sent: Friday, June 29, 2007 5:30 AM
Subject: Re: consent for citation of CSHL meeting 2007 content

No problem. Good luck.

Keith

Keith D. Wilkinson, Ph.D.
 Professor of Biochemistry
 Director Graduate Division of Biological and Biomedical Sciences
 Emory University
 Atlanta, Georgia 30322

Biochemistry phone: (404) 727-5980 **GDBBS phone:** (404) 727-2545
E-Mail: Keith.Wilkinson@emory.edu

5.4. Autorisation du Dr. N. A. Hathaway

From: [Hathaway, Nathaniel Alling](#)
To: [Delphine Germain-Desprez](#)
Sent: Tuesday, July 03, 2007 12:10 AM
Subject: RE: consent for citation of CSHL meeting 2007 content

Hello Delphine,

Of course, you have my consent, sorry for the delay in response was away on vacation,

warm regards,

--nate

nathaniel_hathaway@student.hms.harvard.edu

5.5. Autorisation du Dr. D. Skowrya

From: skowyrad@slu.edu
To: [Delphine Germain-Desprez](mailto:Delphine.Germain-Desprez)
Sent: Friday, June 29, 2007 10:15 AM
Subject: Re: consent for citation of CSHL meeting 2007 content

Sure. Good luck with your thesis!

D.

5.6. Autorisation du Dr. C. B. Carlson

From: Carlson, Coby
To: [Delphine Germain-Desprez](mailto:Delphine.Germain-Desprez)
Sent: Friday, June 29, 2007 1:14 PM
Subject: RE: consent for citation of CSHL meeting 2007 content

Hi Delphine - Go ahead and cite the work. Thank you for asking. Good luck at thesis defense.

Coby

5.7. Autorisation du Dr. A. Pichler

From: "Pichler Andrea" <andrea.pichler@meduniwien.ac.at>
To: <delphine.desprez@umontreal.ca>
Sent: Saturday, June 30, 2007 10:11 AM
Subject: RE: consent for citation of CSHL meeting 2007 content

Dear Delphine,

Yes, of course you can cite it in your thesis- thanks for the interest in our work!

Good luck,

Andrea

Dr. Andrea Pichler
 Max F. Perutz Laboratories
 Medical University of Vienna

Department of Medical Biochemistry
 Dr. Bohr-Gasse 9
 A-1030 Vienna
 Austria
 Phone: +43-1-4277-61710

5.8. Autorisation du Dr. A.C.O. Vertegaal

From: A.C.O.Vertegaal@lumc.nl
To: delphine.desprez@umontreal.ca
Sent: Friday, June 29, 2007 8:36 AM
Subject: RE: consent for citation of CSHL meeting 2007 content

Dear Delphine,

That is fine with me.

best regards,
 Alfred Vertegaal

 Alfred Vertegaal, Ph.D.
 Molecular Cell Biology
 Leiden University Medical Center
 Room S-01-034
 Phone: +31-71-5269212
 Fax: +31-71-5268270
 Email: vertegaal@lumc.nl

Regular mail:
 LUMC
 Mailzone S-1-P
 P.O. Box 9600
 2300 RC Leiden
 the Netherlands

5.9. Autorisation du Dr. T.K. Sixma

From: <t.sixma@nki.nl>
To: <delphine.desprez@umontreal.ca>
Sent: Saturday, July 28, 2007 1:21 AM
Subject: RE: consent for citation of CSHL meeting 2007 conten

Yes, you can do this

Titia

5.10. Autorisation du Dr. H. Sun

From: [Huaiyu Sun](#)
To: [Delphine Germain-Desprez](#)
Sent: Friday, June 29, 2007 12:14 PM
Subject: Re: consent for citation of CSHL meeting 2007 conten

You are welcome to cite my abstract as personal communication. If you don't mind, I would like to know the context in your research where you need to cite my abstract.

Best wishes,

Huaiyu

Huaiyu Sun
MCBL-H
Salk Institute
858-453-4100x1387
hsun@salk.edu

5.11. Autorisation du Dr. G. Gill

From: "Grace Gill" <grace.gill@tufts.edu>
To: "Delphine Germain-Desprez" <delphine.desprez@umontreal.ca>
Sent: Wednesday, August 08, 2007 9:51 AM
Subject: Re: consent for citation of CSHL meeting 2007 content

Dear Delphine,
yes, you have my permission to cite my CSH meeting Abstract as "personal communication" in your thesis.
Good luck finishing up your PhD.
Grace Gill

Bibliographie

1. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931-945, 2004.
2. **Aasland R, Gibson TJ, and Stewart AF.** The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* 20: 56-59, 1995.
3. **Abrink M, Ortiz JA, Mark C, Sanchez C, Looman C, Hellman L, Chambon P, and Losson R.** Conserved interaction between distinct Kruppel-associated box domains and the transcriptional intermediary factor 1 beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1422-1426, 2001.
4. **Adams J.** The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell* 5: 417-421, 2004.
5. **Adams J and Kauffman M.** Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest* 22: 304-311, 2004.
6. **Adamson AL and Kenney S.** Epstein-barr virus immediate-early protein BZLF1 is SUMO-1 modified and disrupts promyelocytic leukemia bodies. *J Virol* 75: 2388-2399, 2001.
7. **Agata Y, Matsuda E, and Shimizu A.** Two novel Kruppel-associated box-containing zinc-finger proteins, KRAZ1 and KRAZ2, repress transcription through functional interaction with the corepressor KAP-1 (TIF1beta/KRIP-1). *J Biol Chem* 274: 16412-16422, 1999.
8. **Aguilar RC and Wendland B.** Ubiquitin: not just for proteasomes anymore. *Curr Opin Cell Biol* 15: 184-190, 2003.
9. **Ahn JH, Xu Y, Jang WJ, Matunis MJ, and Hayward GS.** Evaluation of interactions of human cytomegalovirus immediate-early IE2 regulatory protein with small ubiquitin-like modifiers and their conjugation enzyme Ubc9. *J Virol* 75: 3859-3872, 2001.
10. **Ahn MJ, Nason-Burchenal K, Moasser MM, and Dmitrovsky E.** Growth suppression of acute promyelocytic leukemia cells having increased expression of the non-rearranged alleles: RAR alpha or PML. *Oncogene* 10: 2307-2314, 1995.
11. **Alarcon-Vargas D and Ronai Z.** SUMO in cancer--wrestlers wanted. *Cancer Biol Ther* 1: 237-242, 2002.
12. **Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, and Mustelin T.** Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117: 699-711, 2004.
13. **Andersen JN, Jansen PG, Echwald SM, Mortensen OH, Fukada T, Del Vecchio R, Tonks NK, and Moller NP.** A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *Faseb J* 18: 8-30, 2004.
14. **Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairat S, Chelsky D, Dennis M, and Bouvier M.** Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3684-3689, 2000.

15. **Aravind L, Iyer LM, and Koonin EV.** Scores of RINGS but no PHDs in ubiquitin signaling. *Cell Cycle* 2: 123-126, 2003.
16. **Ardley HC and Robinson PA.** E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem* 41: 15-30, 2005.
17. **Arena S, Benvenuti S, and Bardelli A.** Genetic analysis of the kinome and phosphatome in cancer. *Cell Mol Life Sci* 62: 2092-2099, 2005.
18. **Arnason T and Ellison MJ.** Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. *Mol Cell Biol* 14: 7876-7883, 1994.
19. **Ayyanathan K, Lechner MS, Bell P, Maul GG, Schultz DC, Yamada Y, Tanaka K, Torigoe K, and Rauscher FJ, 3rd.** Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation. *Genes Dev* 17: 1855-1869, 2003.
20. **Azuma Y, Tan SH, Cavenagh MM, Ainsztein AM, Saitoh H, and Dasso M.** Expression and regulation of the mammalian SUMO-1 E1 enzyme. *Faseb J* 15: 1825-1827, 2001.
21. **Baboshina OV and Haas AL.** Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2EPF and RAD6 are recognized by 26 S proteasome subunit 5. *J Biol Chem* 271: 2823-2831, 1996.
22. **Baek SH.** A novel link between SUMO modification and cancer metastasis. *Cell Cycle* 5: 1492-1495, 2006.
23. **Bailey D and O'Hare P.** Characterization of the localization and proteolytic activity of the SUMO-specific protease, SENP1. *J Biol Chem* 279: 692-703, 2004.
24. **Bailey D and O'Hare P.** Comparison of the SUMO1 and ubiquitin conjugation pathways during the inhibition of proteasome activity with evidence of SUMO1 recycling. *Biochem J* 392: 271-281, 2005.
25. **Bailey D and O'Hare P.** Herpes simplex virus 1 ICP0 co-localizes with a SUMO-specific protease. *J Gen Virol* 83: 2951-2964, 2002.
26. **Bardelli A and Velculescu VE.** Mutational analysis of gene families in human cancer. *Curr Opin Genet Dev* 15: 5-12, 2005.
27. **Barford D.** Protein phosphatases. *Curr Opin Struct Biol* 5: 728-734, 1995.
28. **Barlow PN, Luisi B, Milner A, Elliott M, and Everett R.** Structure of the C3HC4 domain by 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. A new structural class of zinc-finger. *J Mol Biol* 237: 201-211, 1994.
29. **Bayer P, Arndt A, Metzger S, Mahajan R, Melchior F, Jaenicke R, and Becker J.** Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280: 275-286, 1998.
30. **Bellodi C, Kindle K, Bernassola F, Cossarizza A, Dinsdale D, Melino G, Heery D, and Salomoni P.** A cytoplasmic PML mutant inhibits p53 function. *Cell Cycle* 5: 2688-2692, 2006.
31. **Bellodi C, Kindle K, Bernassola F, Dinsdale D, Cossarizza A, Melino G, Heery D, and Salomoni P.** Cytoplasmic function of mutant promyelocytic leukemia (PML) and PML-retinoic acid receptor-alpha. *J Biol Chem* 281: 14465-14473, 2006.

32. **Bellon SF, Rodgers KK, Schatz DG, Coleman JE, and Steitz TA.** Crystal structure of the RAG1 dimerization domain reveals multiple zinc-binding motifs including a novel zinc binuclear cluster. *Nat Struct Biol* 4: 586-591, 1997.
33. **Bencsath KP, Podgorski MS, Pagala VR, Slaughter CA, and Schulman BA.** Identification of a multifunctional binding site on Ubc9p required for Smt3p conjugation. *J Biol Chem* 277: 47938-47945, 2002.
34. **Bernassola F, Salomoni P, Oberst A, Di Como CJ, Pagano M, Melino G, and Pandolfi PP.** Ubiquitin-dependent degradation of p73 is inhibited by PML. *J Exp Med* 199: 1545-1557, 2004.
35. **Bernier-Villamor V, Sampson DA, Matunis MJ, and Lima CD.** Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* 108: 345-356, 2002.
36. **Bertrand L, Parent S, Caron M, Legault M, Joly E, Angers S, Bouvier M, Brown M, Houle B, and Menard L.** The BRET2/arrestin assay in stable recombinant cells: a platform to screen for compounds that interact with G protein-coupled receptors (GPCRS). *J Recept Signal Transduct Res* 22: 533-541, 2002.
37. **Best JL, Ganiatsas S, Agarwal S, Changou A, Salomoni P, Shirihai O, Meluh PB, Pandolfi PP, and Zon LI.** SUMO-1 protease-1 regulates gene transcription through PML. *Mol Cell* 10: 843-855, 2002.
38. **Bienz M.** The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem Sci* 31: 35-40, 2006.
39. **Biondi RM and Nebreda AR.** Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem J* 372: 1-13, 2003.
40. **Bischof O, Kim SH, Irving J, Beresten S, Ellis NA, and Campisi J.** Regulation and localization of the Bloom syndrome protein in response to DNA damage. *J Cell Biol* 153: 367-380, 2001.
41. **Black DL.** Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72: 291-336, 2003.
42. **Boddy MN, Duprez E, Borden KL, and Freemont PS.** Surface residue mutations of the PML RING finger domain alter the formation of nuclear matrix-associated PML bodies. *J Cell Sci* 110 (Pt 18): 2197-2205, 1997.
43. **Boddy MN, Howe K, Etkin LD, Solomon E, and Freemont PS.** PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene* 13: 971-982, 1996.
44. **Bode AM and Dong Z.** Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 4: 793-805, 2004.
45. **Boggio R, Passafaro A, and Chiocca S.** Targeting SUMO E1 to Ubiquitin Ligases: A VIRAL STRATEGY TO COUNTERACT SUMOYLATION. *J Biol Chem* 282: 15376-15382, 2007.
46. **Bohren KM, Nadkarni V, Song JH, Gabbay KH, and Owerbach D.** 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: 27233-27238, 2004.

47. **Borden KL.** RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol* 295: 1103-1112, 2000.
48. **Borden KL.** RING fingers and B-boxes: zinc-binding protein-protein interaction domains. *Biochem Cell Biol* 76: 351-358, 1998.
49. **Borden KL, Boddy MN, Lally J, O'Reilly NJ, Martin S, Howe K, Solomon E, and Freemont PS.** The solution structure of the RING finger domain from the acute promyelocytic leukaemia proto-oncoprotein PML. *Embo J* 14: 1532-1541, 1995.
50. **Borden KL, Martin SR, O'Reilly NJ, Lally JM, Reddy BA, Etkin LD, and Freemont PS.** Characterisation of a novel cysteine/histidine-rich metal binding domain from *Xenopus* nuclear factor XNF7. *FEBS Lett* 335: 255-260, 1993.
51. **Bossis G, Chmielarska K, Gartner U, Pichler A, Stieger E, and Melchior F.** A fluorescence resonance energy transfer-based assay to study SUMO modification in solution. *Methods Enzymol* 398: 20-32, 2005.
52. **Bossis G, Malnou CE, Farras R, Andermarcher E, Hipkind R, Rodriguez M, Schmidt D, Muller S, Jariel-Encontre I, and Piechaczyk M.** Down-regulation of c-Fos/c-Jun AP-1 dimer activity by sumoylation. *Mol Cell Biol* 25: 6964-6979, 2005.
53. **Bossis G and Melchior F.** Regulation of SUMOylation by reversible oxidation of SUMO conjugating enzymes. *Mol Cell* 21: 349-357, 2006.
54. **Bouras T, Fu M, Sauve AA, Wang F, Quong AA, Perkins ND, Hay RT, Gu W, and Pestell RG.** SIRT1 deacetylation and repression of p300 involves lysine residues 1020/1024 within the cell cycle regulatory domain 1. *J Biol Chem* 280: 10264-10276, 2005.
55. **Boutell C, Orr A, and Everett RD.** PML residue lysine 160 is required for the degradation of PML induced by herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0. *J Virol* 77: 8686-8694, 2003.
56. **Brooks CL and Gu W.** Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 15: 164-171, 2003.
57. **Brownell JE and Allis CD.** Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* 6: 176-184, 1996.
58. **Brzovic PS, Lissounov A, Christensen DE, Hoyt DW, and Klevit RE.** A UbcH5/ubiquitin noncovalent complex is required for processive BRCA1-directed ubiquitination. *Mol Cell* 21: 873-880, 2006.
59. **Burnett G and Kennedy EP.** The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem* 211: 969-980, 1954.
60. **Bylebyl GR, Belichenko I, and Johnson ES.** The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast. *J Biol Chem* 278: 44113-44120, 2003.
61. **Cammas F, Oulad-Abdelghani M, Vonesch JL, Huss-Garcia Y, Chambon P, and Losson R.** Cell differentiation induces TIF1beta association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction. *J Cell Sci* 115: 3439-3448, 2002.
62. **Cao T, Borden KL, Freemont PS, and Etkin LD.** Involvement of the rfp tripartite motif in protein-protein interactions and subcellular distribution. *J Cell Sci* 110 (Pt 14): 1563-1571, 1997.
63. **Cardozo T and Pagano M.** The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 739-751, 2004.

64. Carrano AC, Eytan E, Hershko A, and Pagano M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* 1: 193-199, 1999.
65. Chakrabarti SR, Sood R, Nandi S, and Nucifora G. Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13281-13285, 2000.
66. Chalfie M and Kain S. *Green fluorescent protein properties, applications, and protocols*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2006.
67. Chang CJ, Chen YL, and Lee SC. Coactivator TIF1beta interacts with transcription factor C/EBPbeta and glucocorticoid receptor to induce alpha1-acid glycoprotein gene expression. *Mol Cell Biol* 18: 5880-5887, 1998.
68. Charest PG, Terrillon S, and Bouvier M. Monitoring agonist-promoted conformational changes of beta-arrestin in living cells by intramolecular BRET. *EMBO Rep* 6: 334-340, 2005.
69. Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK, and Varshavsky A. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243: 1576-1583, 1989.
70. Chelbi-Alix MK and de The H. Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene* 18: 935-941, 1999.
71. Chen GQ, Shi XG, Tang W, Xiong SM, Zhu J, Cai X, Han ZG, Ni JH, Shi GY, Jia PM, Liu MM, He KL, Niu C, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Paul P, Naoe T, Kitamura K, Miller W, Waxman S, Wang ZY, de The H, Chen SJ, and Chen Z. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As₂O₃ exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood* 89: 3345-3353, 1997.
72. Chen ZJ, Parent L, and Maniatis T. Site-specific phosphorylation of IκappaBα by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell* 84: 853-862, 1996.
73. Cheng J, Bawa T, Lee P, Gong L, and Yeh ET. Role of desumoylation in the development of prostate cancer. *Neoplasia* 8: 667-676, 2006.
74. Chi Y, Huddleston MJ, Zhang X, Young RA, Annan RS, Carr SA, and Deshaies RJ. Negative regulation of Gcn4 and Msn2 transcription factors by Srb10 cyclin-dependent kinase. *Genes Dev* 15: 1078-1092, 2001.
75. Chung V, Zhou B, Liu X, Zhu L, Boo LM, Nguyen HV, Ann DK, Song J, Chen Y, and Yen Y. SUMOylation plays a role in gemcitabine- and bortezomib-induced cytotoxicity in human oropharyngeal carcinoma KB gemcitabine-resistant clone. *Mol Cancer Ther* 5: 533-540, 2006.
76. Ciechanover A, Elias S, Heller H, and Hershko A. "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* 257: 2537-2542, 1982.
77. Ciechanover A and Iwai K. The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. *IUBMB Life* 56: 193-201, 2004.
78. Clark RS, Bayir H, and Jenkins LW. Posttranslational protein modifications. *Crit Care Med* 33: S407-409, 2005.
79. Cohen P. Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* 1: 309-315, 2002.

80. **Comerford KM, Leonard MO, Karhausen J, Carey R, Colgan SP, and Taylor CT.** Small ubiquitin-related modifier-1 modification mediates resolution of CREB-dependent responses to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 986-991, 2003.
81. **Cook WJ, Jeffrey LC, Kasperek E, and Pickart CM.** Structure of tetraubiquitin shows how multiubiquitin chains can be formed. *J Mol Biol* 236: 601-609, 1994.
82. **Coscoy L and Ganem D.** PHD domains and E3 ubiquitin ligases: viruses make the connection. *Trends Cell Biol* 13: 7-12, 2003.
83. **Coussen F and Choquet D.** Neuroscience: wrestling with SUMO. *Nature* 447: 271-272, 2007.
84. **Crosetto N, Bienko M, and Dikic I.** Ubiquitin hubs in oncogenic networks. *Mol Cancer Res* 4: 899-904, 2006.
85. **Czernilofsky AP, Levinson AD, Varmus HE, Bishop JM, Tischler E, and Goodman HM.** Nucleotide sequence of an avian sarcoma virus oncogene (src) and proposed amino acid sequence for gene product. *Nature* 287: 198-203, 1980.
86. **Dadke S, Cotteret S, Yip SC, Jaffer ZM, Haj F, Ivanov A, Rauscher F, 3rd, Shuai K, Ng T, Neel BG, and Chernoff J.** Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by sumoylation. *Nat Cell Biol* 9: 80-85, 2007.
87. **de la Cruz X, Lois S, Sanchez-Molina S, and Martinez-Balbas MA.** Do protein motifs read the histone code? *Bioessays* 27: 164-175, 2005.
88. **de Stanchina E, Querido E, Narita M, Davuluri RV, Pandolfi PP, Ferbeyre G, and Lowe SW.** PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell* 13: 523-535, 2004.
89. **de The H and Chelbi-Alix MK.** APL, a model disease for cancer therapies? *Oncogene* 20: 7136-7139, 2001.
90. **de The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, and Dejean A.** The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* 347: 558-561, 1990.
91. **de The H, Lavau C, Marchio A, Chomienne C, Degos L, and Dejean A.** The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66: 675-684, 1991.
92. **Denison C, Rudner AD, Gerber SA, Bakalarski CE, Moazed D, and Gygi SP.** A proteomic strategy for gaining insights into protein sumoylation in yeast. *Mol Cell Proteomics* 4: 246-254, 2005.
93. **Denu JM, Stuckey JA, Saper MA, and Dixon JE.** Form and function in protein dephosphorylation. *Cell* 87: 361-364, 1996.
94. **Desterro JM, Rodriguez MS, and Hay RT.** SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol Cell* 2: 233-239, 1998.
95. **Desterro JM, Thomson J, and Hay RT.** Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS Lett* 417: 297-300, 1997.
96. **Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, and Zhou MM.** Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399: 491-496, 1999.
97. **Di Bacco A, Ouyang J, Lee HY, Catic A, Ploegh H, and Gill G.** The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division. *Mol Cell Biol* 26: 4489-4498, 2006.

98. **Di Fiore PP, Polo S, and Hofmann K.** When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 491-497, 2003.
99. **Dohmen RJ.** SUMO protein modification. *Biochim Biophys Acta* 1695: 113-131, 2004.
100. **Downward J.** The ins and outs of signalling. *Nature* 411: 759-762, 2001.
101. **Duprez E, Saurin AJ, Desterro JM, Lallemand-Breitenbach V, Howe K, Boddy MN, Solomon E, de The H, Hay RT, and Freemont PS.** SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J Cell Sci* 112 (Pt 3): 381-393, 1999.
102. **Dyck JA, Maul GG, Miller WH, Jr., Chen JD, Kakizuka A, and Evans RM.** A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* 76: 333-343, 1994.
103. **Eberharter A, Vetter I, Ferreira R, and Becker PB.** ACF1 improves the effectiveness of nucleosome mobilization by ISWI through PHD-histone contacts. *Embo J* 23: 4029-4039, 2004.
104. **Eddins MJ, Varadan R, Fushman D, Pickart CM, and Wolberger C.** Crystal structure and solution NMR studies of Lys48-linked tetraubiquitin at neutral pH. *J Mol Biol* 367: 204-211, 2007.
105. **Elsasser S and Finley D.** Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines. *Nat Cell Biol* 7: 742-749, 2005.
106. **Engelhardt OG, Boutell C, Orr A, Ullrich E, Haller O, and Everett RD.** The homeodomain-interacting kinase PKM (HIPK-2) modifies ND10 through both its kinase domain and a SUMO-1 interaction motif and alters the posttranslational modification of PML. *Exp Cell Res* 283: 36-50, 2003.
107. **Etlinger JD and Goldberg AL.** A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 54-58, 1977.
108. **Everett RD.** DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene* 20: 7266-7273, 2001.
109. **Everett RD, Lomonte P, Sternsdorf T, van Driel R, and Orr A.** Cell cycle regulation of PML modification and ND10 composition. *J Cell Sci* 112 (Pt 24): 4581-4588, 1999.
110. **Everett RD, Orr A, and Preston CM.** A viral activator of gene expression functions via the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* 17: 7161-7169, 1998.
111. **Fabunmi RP, Wigley WC, Thomas PJ, and DeMartino GN.** Interferon gamma regulates accumulation of the proteasome activator PA28 and immunoproteasomes at nuclear PML bodies. *J Cell Sci* 114: 29-36, 2001.
112. **Feng Q, Yi P, Wong J, and O'Malley BW.** Signaling within a coactivator complex: methylation of SRC-3/AIB1 is a molecular switch for complex disassembly. *Mol Cell Biol* 26: 7846-7857, 2006.
113. **Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido E, Baptiste N, Prives C, and Lowe SW.** PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 14: 2015-2027, 2000.

114. **Ficarro SB, McClelland ML, Stukenberg PT, Burke DJ, Ross MM, Shabanowitz J, Hunt DF, and White FM.** Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* 20: 301-305, 2002.
115. **Finley D, Sadis S, Monia BP, Boucher P, Ecker DJ, Crooke ST, and Chau V.** Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. *Mol Cell Biol* 14: 5501-5509, 1994.
116. **Fogal V, Gostissa M, Sandy P, Zacchi P, Sternsdorf T, Jensen K, Pandolfi PP, Will H, Schneider C, and Del Sal G.** Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO J* 19: 6185-6195, 2000.
117. **Fraser RA, Heard DJ, Adam S, Lavigne AC, Le Douarin B, Tora L, Losson R, Rochette-Egly C, and Chambon P.** The putative cofactor TIF1alpha is a protein kinase that is hyperphosphorylated upon interaction with liganded nuclear receptors. *J Biol Chem* 273: 16199-16204, 1998.
118. **Freiman RN and Tjian R.** Regulating the regulators: lysine modifications make their mark. *Cell* 112: 11-17, 2003.
119. **Friedman JR, Fredericks WJ, Jensen DE, Speicher DW, Huang XP, Neilson EG, and Rauscher FJ, 3rd.** KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes Dev* 10: 2067-2078, 1996.
120. **Fu C, Ahmed K, Ding H, Ding X, Lan J, Yang Z, Miao Y, Zhu Y, Shi Y, Zhu J, Huang H, and Yao X.** Stabilization of PML nuclear localization by conjugation and oligomerization of SUMO-3. *Oncogene* 24: 5401-5413, 2005.
121. **Fuchs SY, Lee CG, Pan ZQ, and Ronai Z.** SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell* 110: 531, 2002.
122. **Furukawa M, Ohta T, and Xiong Y.** Activation of UBC5 ubiquitin-conjugating enzyme by the RING finger of ROC1 and assembly of active ubiquitin ligases by all cullins. *J Biol Chem* 277: 15758-15765, 2002.
123. **Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, Rahman N, and Stratton MR.** A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 4: 177-183, 2004.
124. **Gan-Erdene T, Nagamalleswari K, Yin L, Wu K, Pan ZQ, and Wilkinson KD.** Identification and characterization of DEN1, a deneddylase of the ULP family. *J Biol Chem* 278: 28892-28900, 2003.
125. **Gao C, Ho CC, Reineke E, Lam M, Cheng X, Stanya KJ, Liu Y, Chakraborty S, Shih HM, and Kao HY.** Histone deacetylase 7 promotes PML sumoylation and is essential for PML nuclear body (NB) formation. *Mol Cell Biol*, 2008.
126. **Gao M and Karin M.** Regulating the regulators: control of protein ubiquitination and ubiquitin-like modifications by extracellular stimuli. *Mol Cell* 19: 581-593, 2005.
127. **Germain-Desprez D, Bazinet M, Bouvier M, and Aubry M.** Oligomerization of transcriptional intermediary factor 1 regulators and interaction with ZNF74 nuclear matrix protein revealed by bioluminescence resonance energy transfer in living cells. *J Biol Chem* 278: 22367-22373, 2003.
128. **Gill G.** Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* 15: 536-541, 2005.

129. **Gill G.** SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* 18: 2046-2059, 2004.
130. **Girdwood D, Bumpass D, Vaughan OA, Thain A, Anderson LA, Snowden AW, Garcia-Wilson E, Perkins ND, and Hay RT.** P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* 11: 1043-1054, 2003.
131. **Glickman MH and Ciechanover A.** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82: 373-428, 2002.
132. **Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, and Oliver SG.** Life with 6000 genes. *Science* 274: 546, 563-547, 1996.
133. **Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, and Boyse EA.** Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 11-15, 1975.
134. **Gong L and Yeh ET.** Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *J Biol Chem* 281: 15869-15877, 2006.
135. **Gostissa M, Hengstermann A, Fogal V, Sandy P, Schwarz SE, Scheffner M, and Del Sal G.** Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J* 18: 6462-6471, 1999.
136. **Gregoire S, Tremblay AM, Xiao L, Yang Q, Ma K, Nie J, Mao Z, Wu Z, Giguere V, and Yang XJ.** Control of MEF2 transcriptional activity by coordinated phosphorylation and sumoylation. *J Biol Chem* 281: 4423-4433, 2006.
137. **Gregoire S and Yang XJ.** Association with class IIa histone deacetylases upregulates the sumoylation of MEF2 transcription factors. *Mol Cell Biol* 25: 2273-2287, 2005.
138. **Gregori L, Poosch MS, Cousins G, and Chau V.** A uniform isopeptide-linked multiubiquitin chain is sufficient to target substrate for degradation in ubiquitin-mediated proteolysis. *J Biol Chem* 265: 8354-8357, 1990.
139. **Gresko E, Moller A, Roscic A, and Schmitz ML.** Covalent modification of human homeodomain interacting protein kinase 2 by SUMO-1 at lysine 25 affects its stability. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 1293-1299, 2005.
140. **Grossman SR, Deato ME, Brignone C, Chan HM, Kung AL, Tagami H, Nakatani Y, and Livingston DM.** Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* 300: 342-344, 2003.
141. **Guan KL, Haun RS, Watson SJ, Geahlen RL, and Dixon JE.** Cloning and expression of a protein-tyrosine-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1501-1505, 1990.
142. **Guo D, Li M, Zhang Y, Yang P, Eckenrode S, Hopkins D, Zheng W, Purohit S, Podolsky RH, Muir A, Wang J, Dong Z, Brusko T, Atkinson M, Pozzilli P, Zeidler A, Raffel LJ, Jacob CO, Park Y, Serrano-Rios M, Larrad MT, Zhang Z, Garchon HJ, Bach JF, Rotter JI, She JX, and Wang CY.** A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet* 36: 837-841, 2004.
143. **Haas AL and Rose IA.** The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis. *J Biol Chem* 257: 10329-10337, 1982.

144. **Haas AL, Warms JV, Hershko A, and Rose IA.** Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* 257: 2543-2548, 1982.
145. **Haglund K, Di Fiore PP, and Dikic I.** Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci* 28: 598-603, 2003.
146. **Haglund K and Dikic I.** Ubiquitylation and cell signaling. *Embo J* 24: 3353-3359, 2005.
147. **Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore PP, and Dikic I.** Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 5: 461-466, 2003.
148. **Hakli M, Karvonen U, Janne OA, and Palvimo JJ.** SUMO-1 promotes association of SNURF (RNF4) with PML nuclear bodies. *Exp Cell Res* 304: 224-233, 2005.
149. **Hakli M, Lorick KL, Weissman AM, Janne OA, and Palvimo JJ.** Transcriptional coregulator SNURF (RNF4) possesses ubiquitin E3 ligase activity. *FEBS Lett* 560: 56-62, 2004.
150. **Hamdan FF, Audet M, Garneau P, Pelletier J, and Bouvier M.** High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *J Biomol Screen* 10: 463-475, 2005.
151. **Hannich JT, Lewis A, Kroetz MB, Li SJ, Heide H, Emili A, and Hochstrasser M.** Defining the SUMO-modified proteome by multiple approaches in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280: 4102-4110, 2005.
152. **Haracska L, Torres-Ramos CA, Johnson RE, Prakash S, and Prakash L.** Opposing effects of ubiquitin conjugation and SUMO modification of PCNA on replicational bypass of DNA lesions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 24: 4267-4274, 2004.
153. **Hardeland U, Steinacher R, Jiricny J, and Schar P.** Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *Embo J* 21: 1456-1464, 2002.
154. **Harder Z, Zunino R, and McBride H.** Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. *Curr Biol* 14: 340-345, 2004.
155. **Harper JW and Schulman BA.** Structural complexity in ubiquitin recognition. *Cell* 124: 1133-1136, 2006.
156. **Hart RC, Matthews JC, Hori K, and Cormier MJ.** Renilla reniformis bioluminescence: luciferase-catalyzed production of nonradiating excited states from luciferin analogues and elucidation of the excited state species involved in energy transfer to Renilla green fluorescent protein. *Biochemistry* 18: 2204-2210, 1979.
157. **Hay RT.** SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18: 1-12, 2005.
158. **Hayakawa F and Privalsky ML.** Phosphorylation of PML by mitogen-activated protein kinases plays a key role in arsenic trioxide-mediated apoptosis. *Cancer Cell* 5: 389-401, 2004.
159. **Hayashi T, Seki M, Maeda D, Wang W, Kawabe Y, Seki T, Saitoh H, Fukagawa T, Yagi H, and Enomoto T.** Ubc9 is essential for viability of higher eukaryotic cells. *Exp Cell Res* 280: 212-221, 2002.

160. **Hayden MS and Ghosh S.** Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18: 2195-2224, 2004.
161. **Haynes SR, Dollard C, Winston F, Beck S, Trowsdale J, and Dawid IB.** The bromodomain: a conserved sequence found in human, Drosophila and yeast proteins. *Nucleic Acids Res* 20: 2603, 1992.
162. **Hecker CM, Rabiller M, Haglund K, Bayer P, and Dikic I.** Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem* 281: 16117-16127, 2006.
163. **Heding A.** Use of the BRET 7TM receptor/beta-arrestin assay in drug discovery and screening. *Expert Rev Mol Diagn* 4: 403-411, 2004.
164. **Hershko A.** Lessons from the discovery of the ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* 21: 445-449, 1996.
165. **Hershko A.** The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death Differ* 12: 1191-1197, 2005.
166. **Hershko A and Ciechanover A.** The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67: 425-479, 1998.
167. **Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, and Rose IA.** Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 1783-1786, 1980.
168. **Hershko A, Ciechanover A, and Rose IA.** Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 3107-3110, 1979.
169. **Hershko A, Heller H, Elias S, and Ciechanover A.** Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* 258: 8206-8214, 1983.
170. **Hicke L.** A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* 106: 527-530, 2001.
171. **Hicke L.** Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 195-201, 2001.
172. **Hicke L and Dunn R.** Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 141-172, 2003.
173. **Hicke L, Schubert HL, and Hill CP.** Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 610-621, 2005.
174. **Hietakangas V, Ahlskog JK, Jakobsson AM, Hellesuo M, Sahlberg NM, Holmberg CI, Mikhailov A, Palvimo JJ, Pirkkala L, and Sistonen L.** Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol* 23: 2953-2968, 2003.
175. **Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A, and Sistonen L.** PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 45-50, 2006.
176. **Hoch JA and Silhavy TJ.** *Two-component signal transduction*. Washington, D.C.: ASM Press, 1995.
177. **Hochstrasser M.** SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* 107: 5-8, 2001.

178. **Hoegge C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, and Jentsch S.** RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419: 135-141, 2002.
179. **Hoeller D, Crosetto N, Blagoev B, Raiborg C, Tikkanen R, Wagner S, Kowanetz K, Breitling R, Mann M, Stenmark H, and Dikic I.** Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination. *Nat Cell Biol* 8: 163-169, 2006.
180. **Hoeller D, Hecker CM, and Dikic I.** Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 6: 776-788, 2006.
181. **Hofmann TG, Jaffray E, Stollberg N, Hay RT, and Will H.** Regulation of homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) effector function through dynamic small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification. *J Biol Chem* 280: 29224-29232, 2005.
182. **Hofmann TG and Will H.** Body language: the function of PML nuclear bodies in apoptosis regulation. *Cell Death Differ* 10: 1290-1299, 2003.
183. **Hoppe T.** Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci* 30: 183-187, 2005.
184. **Horton RA, Strachan EA, Vogel KW, and Riddle SM.** A substrate for deubiquitinating enzymes based on time-resolved fluorescence resonance energy transfer between terbium and yellow fluorescent protein. *Anal Biochem* 360: 138-143, 2007.
185. **Huang F, Kirkpatrick D, Jiang X, Gygi S, and Sorkin A.** Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol Cell* 21: 737-748, 2006.
186. **Huang TT and D'Andrea AD.** Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 323-334, 2006.
187. **Hunter T.** Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225-236, 1995.
188. **Hunter T.** Signaling--2000 and beyond. *Cell* 100: 113-127, 2000.
189. **Hurley JH, Lee S, and Prag G.** Ubiquitin-binding domains. *Biochem J* 399: 361-372, 2006.
190. **Ishov AM, Sotnikov AG, Negorev D, Vladimirova OV, Neff N, Kamitani T, Yeh ET, Strauss JF, 3rd, and Maul GG.** PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* 147: 221-234, 1999.
191. **Issad T, Boute N, Boubekour S, Lacasa D, and Pernet K.** Looking for an insulin pill? Use the BRET methodology! *Diabetes Metab* 29: 111-117, 2003.
192. **Jackson PK.** A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev* 15: 3053-3058, 2001.
193. **Jacobs SA and Khorasanizadeh S.** Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science* 295: 2080-2083, 2002.
194. **Jacobs SA, Taverna SD, Zhang Y, Briggs SD, Li J, Eisenberg JC, Allis CD, and Khorasanizadeh S.** Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *Embo J* 20: 5232-5241, 2001.
195. **Jang MS, Ryu SW, and Kim E.** Modification of Daxx by small ubiquitin-related modifier-1. *Biochem Biophys Res Commun* 295: 495-500, 2002.

196. **Jeanmougin F, Wurtz JM, Le Douarin B, Chambon P, and Losson R.** The bromodomain revisited. *Trends Biochem Sci* 22: 151-153, 1997.
197. **Jensen K, Shiels C, and Freemont PS.** PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20: 7223-7233, 2001.
198. **Ji Z, Degerny C, Vintonenko N, Deheuninck J, Foveau B, Leroy C, Coll J, Tulasne D, Baert JL, and Fafeur V.** Regulation of the Ets-1 transcription factor by sumoylation and ubiquitinylation. *Oncogene* 26: 395-406, 2007.
199. **Joazeiro CA and Weissman AM.** RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102: 549-552, 2000.
200. **Johnson ES.** Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73: 355-382, 2004.
201. **Johnson ES.** Ubiquitin branches out. *Nat Cell Biol* 4: E295-298, 2002.
202. **Johnson ES and Blobel G.** Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J Biol Chem* 272: 26799-26802, 1997.
203. **Johnson ES and Gupta AA.** An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* 106: 735-744, 2001.
204. **Johnson ES, Ma PC, Ota IM, and Varshavsky A.** A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem* 270: 17442-17456, 1995.
205. **Johnson ES, Schwienhorst I, Dohmen RJ, and Blobel G.** The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *Embo J* 16: 5509-5519, 1997.
206. **Johnson FH, Shimomura O, and Saiga Y.** Action of cyanide on Cypridina luciferin. *J Cell Comp Physiol* 59: 265-272, 1962.
207. **Johnson LN and Lewis RJ.** Structural basis for control by phosphorylation. *Chem Rev* 101: 2209-2242, 2001.
208. **Johnson SA and Hunter T.** Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nat Methods* 2: 17-25, 2005.
209. **Kadoya T, Yamamoto H, Suzuki T, Yukita A, Fukui A, Michiue T, Asahara T, Tanaka K, Asashima M, and Kikuchi A.** Desumoylation activity of Axam, a novel Axin-binding protein, is involved in downregulation of beta-catenin. *Mol Cell Biol* 22: 3803-3819, 2002.
210. **Kagey MH, Melhuish TA, and Wotton D.** The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* 113: 127-137, 2003.
211. **Kahyo T, Nishida T, and Yasuda H.** Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell* 8: 713-718, 2001.
212. **Kamitani T, Kito K, Nguyen HP, Wada H, Fukuda-Kamitani T, and Yeh ET.** Identification of three major sentrinization sites in PML. *J Biol Chem* 273: 26675-26682, 1998.
213. **Kamitani T, Kito K, Nguyen HP, and Yeh ET.** Characterization of NEDD8, a developmentally down-regulated ubiquitin-like protein. *J Biol Chem* 272: 28557-28562, 1997.
214. **Kamitani T, Nguyen HP, Kito K, Fukuda-Kamitani T, and Yeh ET.** Covalent modification of PML by the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *J Biol Chem* 273: 3117-3120, 1998.

215. **Kerscher O, Felberbaum R, and Hochstrasser M.** Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 159-180, 2006.
216. **Khetchoumian K, Teletin M, Mark M, Lerouge T, Cervino M, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, and Losson R.** TIF1delta, a novel HP1-interacting member of the transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) family expressed by elongating spermatids. *J Biol Chem* 279: 48329-48341, 2004.
217. **Kim HT, Kim KP, Lledias F, Kisselev AF, Scaglione KM, Skowyra D, Gygi SP, and Goldberg AL.** Certain E2-E3 pairs synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *J Biol Chem*, 2007.
218. **Kim KI and Baek SH.** SUMOylation code in cancer development and metastasis. *Mol Cells* 22: 247-253, 2006.
219. **Kim KI, Baek SH, Jeon YJ, Nishimori S, Suzuki T, Uchida S, Shimbara N, Saitoh H, Tanaka K, and Chung CH.** A new SUMO-1-specific protease, SUSP1, that is highly expressed in reproductive organs. *J Biol Chem* 275: 14102-14106, 2000.
220. **Kim SS, Chen YM, O'Leary E, Witzgall R, Vidal M, and Bonventre JV.** A novel member of the RING finger family, KRIP-1, associates with the KRAB-A transcriptional repressor domain of zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 15299-15304, 1996.
221. **Kim YH, Choi CY, and Kim Y.** Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12350-12355, 1999.
222. **Kirkin V and Dikic I.** Role of ubiquitin- and Ubl-binding proteins in cell signaling. *Curr Opin Cell Biol* 19: 199-205, 2007.
223. **Kirkpatrick DS, Hathaway NA, Hanna J, Elsasser S, Rush J, Finley D, King RW, and Gygi SP.** Quantitative analysis of in vitro ubiquitinated cyclin B1 reveals complex chain topology. *Nat Cell Biol* 8: 700-710, 2006.
224. **Kirsh O, Seeler JS, Pichler A, Gast A, Muller S, Miska E, Mathieu M, Harel-Bellan A, Kouzarides T, Melchior F, and Dejean A.** The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *Embo J* 21: 2682-2691, 2002.
225. **Kitagawa M, Hatakeyama S, Shirane M, Matsumoto M, Ishida N, Hattori K, Nakamichi I, Kikuchi A, and Nakayama K.** An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin. *Embo J* 18: 2401-2410, 1999.
226. **Klein P, Pawson T, and Tyers M.** Mathematical modeling suggests cooperative interactions between a disordered polyvalent ligand and a single receptor site. *Curr Biol* 13: 1669-1678, 2003.
227. **Knipscheer P, van Dijk WJ, Olsen JV, Mann M, and Sixma TK.** Noncovalent interaction between Ubc9 and SUMO promotes SUMO chain formation. *Embo J*, 2007.
228. **Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, and Jentsch S.** A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96: 635-644, 1999.
229. **Kotaja N, Karvonen U, Janne OA, and Palvimo JJ.** PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol Cell Biol* 22: 5222-5234, 2002.

230. **Lallemand-Breitenbach V and de The H.** CK2 and PML: regulating the regulator. *Cell* 126: 244-245, 2006.
231. **Lallemand-Breitenbach V, Jeanne M, Benhenda S, Nasr R, Lei M, Peres L, Zhou J, Zhu J, Raught B, and de The H.** Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol* 10: 547-555, 2008.
232. **Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Puvion F, Koken M, Honore N, Doubeikovsky A, Duprez E, Pandolfi PP, Puvion E, Freemont P, and de The H.** Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J Exp Med* 193: 1361-1371, 2001.
233. **Lapenta V, Chiurazzi P, van der Spek P, Pizzuti A, Hanaoka F, and Brahe C.** SMT3A, a human homologue of the *S. cerevisiae* SMT3 gene, maps to chromosome 21qter and defines a novel gene family. *Genomics* 40: 362-366, 1997.
234. **Le Douarin B, Nielsen AL, Garnier JM, Ichinose H, Jeanmougin F, Losson R, and Chambon P.** A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *Embo J* 15: 6701-6715, 1996.
235. **Le Douarin B, Pierrat B, vom Baur E, Chambon P, and Losson R.** A new version of the two-hybrid assay for detection of protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res* 23: 876-878, 1995.
236. **Le Douarin B, You J, Nielsen AL, Chambon P, and Losson R.** TIF1alpha: a possible link between KRAB zinc finger proteins and nuclear receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65: 43-50, 1998.
237. **Le Douarin B, Zechel C, Garnier JM, Lutz Y, Tora L, Pierrat P, Heery D, Gronemeyer H, Chambon P, and Losson R.** The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *Embo J* 14: 2020-2033, 1995.
238. **Lechner MS, Begg GE, Speicher DW, and Rauscher FJ, 3rd.** Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interaction is essential. *Mol Cell Biol* 20: 6449-6465, 2000.
239. **Lee MH, Lee SW, Lee EJ, Choi SJ, Chung SS, Lee JI, Cho JM, Seol JH, Baek SH, Kim KI, Chiba T, Tanaka K, Bang OS, and Chung CH.** SUMO-specific protease SUSP4 positively regulates p53 by promoting Mdm2 self-ubiquitination. *Nat Cell Biol* 8: 1424-1431, 2006.
240. **Lee PS, Chang C, Liu D, and Derynck R.** Sumoylation of Smad4, the common Smad mediator of transforming growth factor-beta family signaling. *J Biol Chem* 278: 27853-27863, 2003.
241. **Lee YH, Coonrod SA, Kraus WL, Jelinek MA, and Stallcup MR.** Regulation of coactivator complex assembly and function by protein arginine methylation and demethylination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3611-3616, 2005.
242. **Lee YK, Thomas SN, Yang AJ, and Ann DK.** Doxorubicin down-regulates Kruppel-associated box domain-associated protein 1 sumoylation that relieves its

- transcription repression on p21WAF1/CIP1 in breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem* 282: 1595-1606, 2007.
243. **Lewis MJ, Saltibus LF, Hau DD, Xiao W, and Spyrapoulos L.** Structural basis for non-covalent interaction between ubiquitin and the ubiquitin conjugating enzyme variant human MMS2. *J Biomol NMR* 34: 89-100, 2006.
244. **Li H, Leo C, Zhu J, Wu X, O'Neil J, Park EJ, and Chen JD.** Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol Cell Biol* 20: 1784-1796, 2000.
245. **Li M, Luo J, Brooks CL, and Gu W.** Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem* 277: 50607-50611, 2002.
246. **Li S and Shang Y.** Regulation of SRC family coactivators by post-translational modifications. *Cell Signal* 19: 1101-1112, 2007.
247. **Li Y, Wang H, Wang S, Quon D, Liu YW, and Cordell B.** Positive and negative regulation of APP amyloidogenesis by sumoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 259-264, 2003.
248. **Lin J, Johannsen E, Robertson E, and Kieff E.** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C putative repression domain mediates coactivation of the LMP1 promoter with EBNA-2. *J Virol* 76: 232-242, 2002.
249. **Lin JY, Ohshima T, and Shimotohno K.** Association of Ubc9, an E2 ligase for SUMO conjugation, with p53 is regulated by phosphorylation of p53. *FEBS Lett* 573: 15-18, 2004.
250. **Lin X, Liang M, Liang YY, Brunicardi FC, and Feng XH.** SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem* 278: 31043-31048, 2003.
251. **Lin X, Liang M, Liang YY, Brunicardi FC, Melchior F, and Feng XH.** Activation of transforming growth factor-beta signaling by SUMO-1 modification of tumor suppressor Smad4/DPC4. *J Biol Chem* 278: 18714-18719, 2003.
252. **Lindsten K, de Vrij FM, Verhoef LG, Fischer DF, van Leeuwen FW, Hol EM, Masucci MG, and Dantuma NP.** Mutant ubiquitin found in neurodegenerative disorders is a ubiquitin fusion degradation substrate that blocks proteasomal degradation. *J Cell Biol* 157: 417-427, 2002.
253. **Liu YC.** Ubiquitin ligases and the immune response. *Annu Rev Immunol* 22: 81-127, 2004.
254. **Lu Z, Xu S, Joazeiro C, Cobb MH, and Hunter T.** The PHD domain of MEKK1 acts as an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2. *Mol Cell* 9: 945-956, 2002.
255. **Lupas A.** Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods Enzymol* 266: 513-525, 1996.
256. **Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L, and Melchior F.** A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88: 97-107, 1997.
257. **Maniatis T and Tasic B.** Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* 418: 236-243, 2002.

258. **Mann M, Ong SE, Gronborg M, Steen H, Jensen ON, and Pandey A.** Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol* 20: 261-268, 2002.
259. **Mannen H, Tseng HM, Cho CL, and Li SS.** Cloning and expression of human homolog HSMT3 to yeast SMT3 suppressor of MIF2 mutations in a centromere protein gene. *Biochem Biophys Res Commun* 222: 178-180, 1996.
260. **Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, and Sudarsanam S.** The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-1934, 2002.
261. **Mansouri M, Bartee E, Gouveia K, Hovey Nerenberg BT, Barrett J, Thomas L, Thomas G, McFadden G, and Fruh K.** The PHD/LAP-domain protein M153R of myxomavirus is a ubiquitin ligase that induces the rapid internalization and lysosomal destruction of CD4. *J Virol* 77: 1427-1440, 2003.
262. **Masclé XH, Germain-Desprez D, Huynh P, Estéphan P, and Aubry M.** Sumoylation of the transcriptional intermediary factor 1beta (TIF1beta), the Co-repressor of the KRAB Multifinger proteins, is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain. *J Biol Chem* 282: 10190-10202, 2007.
263. **Matsuda E, Agata Y, Sugai M, Katakai T, Gonda H, and Shimizu A.** Targeting of Kruppel-associated box-containing zinc finger proteins to centromeric heterochromatin. Implication for the gene silencing mechanisms. *J Biol Chem* 276: 14222-14229, 2001.
264. **Matunis MJ, Coutavas E, and Blobel G.** A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 135: 1457-1470, 1996.
265. **Matunis MJ, Zhang XD, and Ellis NA.** SUMO: the glue that binds. *Dev Cell* 11: 596-597, 2006.
266. **Mauro MJ and Druker BJ.** Chronic myelogenous leukemia. *Curr Opin Oncol* 13: 3-7, 2001.
267. **Mayer RJ.** Ubiquitons: past, present and future. In: *Ubiquitons et zomes (product guide)*, edited by Biomol IL, 2006.
268. **Mayer RJ, Ciechanover AJ, and Rechsteiner M.** *Protein degradation*. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.
269. **Meimoun A, Holtzman T, Weissman Z, McBride HJ, Stillman DJ, Fink GR, and Kornitzer D.** Degradation of the transcription factor Gcn4 requires the kinase Pho85 and the SCF(CDC4) ubiquitin-ligase complex. *Mol Biol Cell* 11: 915-927, 2000.
270. **Mendoza HM, Shen LN, Botting C, Lewis A, Chen J, Ink B, and Hay RT.** NEDP1, a highly conserved cysteine protease that deNEDDylates Cullins. *J Biol Chem* 278: 25637-25643, 2003.
271. **Meroni G and Diez-Roux G.** TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays* 27: 1147-1157, 2005.
272. **Miller J and Gordon C.** The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins. *FEBS Lett* 579: 3224-3230, 2005.
273. **Minty A, Dumont X, Kaghad M, and Caput D.** Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J Biol Chem* 275: 36316-36323, 2000.

274. **Miyauchi Y, Yogosawa S, Honda R, Nishida T, and Yasuda H.** Sumoylation of Mdm2 by protein inhibitor of activated STAT (PIAS) and RanBP2 enzymes. *J Biol Chem* 277: 50131-50136, 2002.
275. **Miyawaki A.** Visualization of the spatial and temporal dynamics of intracellular signaling. *Dev Cell* 4: 295-305, 2003.
276. **Mo YY and Moschos SJ.** Targeting Ubc9 for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 9: 1203-1216, 2005.
277. **Moosmann P, Georgiev O, Le Douarin B, Bourquin JP, and Schaffner W.** Transcriptional repression by RING finger protein TIF1 beta that interacts with the KRAB repressor domain of KOX1. *Nucleic Acids Res* 24: 4859-4867, 1996.
278. **Mossessova E and Lima CD.** Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol Cell* 5: 865-876, 2000.
279. **Mu ZM, Chin KV, Liu JH, Lozano G, and Chang KS.** PML, a growth suppressor disrupted in acute promyelocytic leukemia. *Mol Cell Biol* 14: 6858-6867, 1994.
280. **Mukhopadhyay D, Ayaydin F, Kolli N, Tan SH, Anan T, Kametaka A, Azuma Y, Wilkinson KD, and Dasso M.** SUSP1 antagonizes formation of highly SUMO2/3-conjugated species. *J Cell Biol* 174: 939-949, 2006.
281. **Muller S, Berger M, Lehembre F, Seeler JS, Haupt Y, and Dejean A.** c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 275: 13321-13329, 2000.
282. **Muller S and Dejean A.** Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *J Virol* 73: 5137-5143, 1999.
283. **Muller S, Ledl A, and Schmidt D.** SUMO: a regulator of gene expression and genome integrity. *Oncogene* 23: 1998-2008, 2004.
284. **Muller S, Matunis MJ, and Dejean A.** Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *Embo J* 17: 61-70, 1998.
285. **Muratani M, Gerlich D, Janicki SM, Gebhard M, Eils R, and Spector DL.** Metabolic-energy-dependent movement of PML bodies within the mammalian cell nucleus. *Nat Cell Biol* 4: 106-110, 2002.
286. **Murray JK and Gellman SH.** Targeting protein-protein interactions: Lessons from p53/MDM2. *Biopolymers*, 2007.
287. **Nacerddine K, Lehembre F, Bhaumik M, Artus J, Cohen-Tannoudji M, Babinet C, Pandolfi PP, and Dejean A.** The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell* 9: 769-779, 2005.
288. **Naeem H, Cheng D, Zhao Q, Underhill C, Tini M, Bedford MT, and Torchia J.** The activity and stability of the transcriptional coactivator p/CIP/SRC-3 are regulated by CARM1-dependent methylation. *Mol Cell Biol* 27: 120-134, 2007.
289. **Nakayama KI and Nakayama K.** Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 369-381, 2006.
290. **Nathan D, Ingvarsdottir K, Sterner DE, Bylebyl GR, Dokmanovic M, Dorsey JA, Whelan KA, Krsmanovic M, Lane WS, Meluh PB, Johnson ES, and Berger SL.** Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows

- dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev* 20: 966-976, 2006.
291. **Nielsen AL, Ortiz JA, You J, Oulad-Abdelghani M, Khechumian R, Gansmuller A, Chambon P, and Losson R.** Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *Embo J* 18: 6385-6395, 1999.
292. **Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, and Bernards R.** A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123: 773-786, 2005.
293. **Nishida T, Kaneko F, Kitagawa M, and Yasuda H.** Characterization of a novel mammalian SUMO-1/Smt3-specific isopeptidase, a homologue of rat axam, which is an axin-binding protein promoting beta-catenin degradation. *J Biol Chem* 276: 39060-39066, 2001.
294. **Nishida T, Tanaka H, and Yasuda H.** A novel mammalian Smt3-specific isopeptidase 1 (SMT3IP1) localized in the nucleolus at interphase. *Eur J Biochem* 267: 6423-6427, 2000.
295. **Nishikawa H, Ooka S, Sato K, Arima K, Okamoto J, Klevit RE, Fukuda M, and Ohta T.** Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 279: 3916-3924, 2004.
296. **Nouaille S, Blanquart C, Zilberfarb V, Boute N, Perdereau D, Burnol AF, and Issad T.** Interaction between the insulin receptor and Grb14: a dynamic study in living cells using BRET. *Biochem Pharmacol* 72: 1355-1366, 2006.
297. **O'Geen H, Squazzo SL, Iyengar S, Blahnik K, Rinn JL, Chang HY, Green R, and Farnham PJ.** Genome-Wide Analysis of KAP1 Binding Suggests Autoregulation of KRAB-ZNFs. *PLoS Genet* 3: e89, 2007.
298. **Oda Y, Nagasu T, and Chait BT.** Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome. *Nat Biotechnol* 19: 379-382, 2001.
299. **Okura T, Gong L, Kamitani T, Wada T, Okura I, Wei CF, Chang HM, and Yeh ET.** Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J Immunol* 157: 4277-4281, 1996.
300. **Orlicky S, Tang X, Willems A, Tyers M, and Sicheri F.** Structural basis for phosphodependent substrate selection and orientation by the SCFCdc4 ubiquitin ligase. *Cell* 112: 243-256, 2003.
301. **Orth K, Xu Z, Mudgett MB, Bao ZQ, Palmer LE, Bliska JB, Mangel WF, Staskawicz B, and Dixon JE.** Disruption of signaling by Yersinia effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* 290: 1594-1597, 2000.
302. **Oved S, Mosesson Y, Zwang Y, Santonico E, Shtiegman K, Marmor MD, Kochupurakkal BS, Katz M, Lavi S, Cesareni G, and Yarden Y.** Conjugation to Nedd8 instigates ubiquitylation and down-regulation of activated receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 281: 21640-21651, 2006.

303. **Owerbach D, McKay EM, Yeh ET, Gabbay KH, and Bohren KM.** A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun* 337: 517-520, 2005.
304. **Papouli E, Chen S, Davies AA, Huttner D, Krejci L, Sung P, and Ulrich HD.** Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Mol Cell* 19: 123-133, 2005.
305. **Pawson T.** Protein modules and signalling networks. *Nature* 373: 573-580, 1995.
306. **Pawson T and Gish GD.** SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* 71: 359-362, 1992.
307. **Pawson T, Gish GD, and Nash P.** SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol* 11: 504-511, 2001.
308. **Pawson T and Nash P.** Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* 300: 445-452, 2003.
309. **Pedrioli PG, Raught B, Zhang XD, Rogers R, Aitchison J, Matunis M, and Aebersold R.** Automated identification of SUMOylation sites using mass spectrometry and SUMOn pattern recognition software. *Nat Methods* 3: 533-539, 2006.
310. **Peng H, Begg GE, Harper SL, Friedman JR, Speicher DW, and Rauscher FJ, 3rd.** Biochemical analysis of the Kruppel-associated box (KRAB) transcriptional repression domain. *J Biol Chem* 275: 18000-18010, 2000.
311. **Peng H, Begg GE, Schultz DC, Friedman JR, Jensen DE, Speicher DW, and Rauscher FJ, 3rd.** Reconstitution of the KRAB-KAP-1 repressor complex: a model system for defining the molecular anatomy of RING-B box-coiled-coil domain-mediated protein-protein interactions. *J Mol Biol* 295: 1139-1162, 2000.
312. **Peng H, Feldman I, and Rauscher FJ, 3rd.** Hetero-oligomerization among the TIF family of RBCC/TRIM domain-containing nuclear cofactors: a potential mechanism for regulating the switch between coactivation and corepression. *J Mol Biol* 320: 629-644, 2002.
313. **Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G, Roelofs J, Finley D, and Gygi SP.** A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* 21: 921-926, 2003.
314. **Perez OD and Nolan GP.** Simultaneous measurement of multiple active kinase states using polychromatic flow cytometry. *Nat Biotechnol* 20: 155-162, 2002.
315. **Perkins ND.** Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* 25: 6717-6730, 2006.
316. **Perroy J, Pontier S, Charest PG, Aubry M, and Bouvier M.** Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nat Methods* 1: 203-208, 2004.
317. **Petrie K and Zelent A.** Marked for death. *Nat Cell Biol* 10: 507-509, 2008.
318. **Petroski MD and Deshaies RJ.** Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 9-20, 2005.
319. **Pfleger KD and Eidne KA.** New technologies: bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the detection of real time interactions involving G-protein coupled receptors. *Pituitary* 6: 141-151, 2003.
320. **Phillips CL, Thrower J, Pickart CM, and Hill CP.** Structure of a new crystal form of tetraubiquitin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57: 341-344, 2001.

321. **Pichler A, Gast A, Seeler JS, Dejean A, and Melchior F.** The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108: 109-120, 2002.
322. **Pichler A and Melchior F.** Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic* 3: 381-387, 2002.
323. **Pickart CM.** Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70: 503-533, 2001.
324. **Pickart CM.** Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* 25: 544-548, 2000.
325. **Pickart CM and Fushman D.** Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* 8: 610-616, 2004.
326. **Potts PR and Yu H.** Human MMS21/NSE2 is a SUMO ligase required for DNA repair. *Mol Cell Biol* 25: 7021-7032, 2005.
327. **Pountney DL, Huang Y, Burns RJ, Haan E, Thompson PD, Blumbergs PC, and Gai WP.** SUMO-1 marks the nuclear inclusions in familial neuronal intranuclear inclusion disease. *Exp Neurol* 184: 436-446, 2003.
328. **Prakash S, Sung P, and Prakash L.** DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 27: 33-70, 1993.
329. **Quimby BB, Yong-Gonzalez V, Anan T, Strunnikov AV, and Dasso M.** The promyelocytic leukemia protein stimulates SUMO conjugation in yeast. *Oncogene* 25: 2999-3005, 2006.
330. **Ragvin A, Valvatne H, Erdal S, Arskog V, Tufteland KR, Breen K, AM OY, Eberharter A, Gibson TJ, Becker PB, and Aasland R.** Nucleosome binding by the bromodomain and PHD finger of the transcriptional cofactor p300. *J Mol Biol* 337: 773-788, 2004.
331. **Raiborg C, Rusten TE, and Stenmark H.** Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol* 15: 446-455, 2003.
332. **Rangasamy D, Woytek K, Khan SA, and Wilson VG.** SUMO-1 modification of bovine papillomavirus E1 protein is required for intranuclear accumulation. *J Biol Chem* 275: 37999-38004, 2000.
333. **Ranjani V, Assfalg M, and Fushman D.** Using NMR spectroscopy to monitor ubiquitin chain conformation and interactions with ubiquitin-binding domains. *Methods Enzymol* 399: 177-192, 2005.
334. **Reddy BA and Etkin LD.** A unique bipartite cysteine-histidine motif defines a subfamily of potential zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Res* 19: 6330, 1991.
335. **Regad T and Chelbi-Alix MK.** Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene* 20: 7274-7286, 2001.
336. **Remboutsika E, Yamamoto K, Harbers M, and Schmutz M.** The bromodomain mediates transcriptional intermediary factor 1alpha -nucleosome interactions. *J Biol Chem* 277: 50318-50325, 2002.
337. **Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzi L, Riganeli D, Zanaria E, Messali S, Cainarca S, Guffanti A, Minucci S, Pelicci PG, and Ballabio A.** The tripartite motif family identifies cell compartments. *Embo J* 20: 2140-2151, 2001.
338. **Robinson PA and Ardley HC.** Ubiquitin-protein ligases--novel therapeutic targets? *Curr Protein Pept Sci* 5: 163-176, 2004.

339. **Rodriguez MS, Dargemont C, and Hay RT.** SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* 276: 12654-12659, 2001.
340. **Rooney JW and Calame KL.** TIF1beta functions as a coactivator for C/EBPbeta and is required for induced differentiation in the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev* 15: 3023-3038, 2001.
341. **Roscic A, Moller A, Calzado MA, Renner F, Wimmer VC, Gresko E, Ludi KS, and Schmitz ML.** Phosphorylation-dependent control of Pc2 SUMO E3 ligase activity by its substrate protein HIPK2. *Mol Cell* 24: 77-89, 2006.
342. **Rosendorff A, Illanes D, David G, Lin J, Kieff E, and Johannsen E.** EBNA3C coactivation with EBNA2 requires a SUMO homology domain. *J Virol* 78: 367-377, 2004.
343. **Ross S, Best JL, Zon LI, and Gill G.** SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell* 10: 831-842, 2002.
344. **Rossant J and Scherer SW.** The mouse genome sequence--the end of the tail, or just the beginning? *Genome Biol* 4: 109, 2003.
345. **Rui HL, Fan E, Zhou HM, Xu Z, Zhang Y, and Lin SC.** SUMO-1 modification of the C-terminal KVEKVD of Axin is required for JNK activation but has no effect on Wnt signaling. *J Biol Chem* 277: 42981-42986, 2002.
346. **Ryan RF, Schultz DC, Ayyanathan K, Singh PB, Friedman JR, Fredericks WJ, and Rauscher FJ, 3rd.** KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* 19: 4366-4378, 1999.
347. **Sachdev S, Bruhn L, Sieber H, Pichler A, Melchior F, and Grosschedl R.** PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* 15: 3088-3103, 2001.
348. **Saeki Y, Tayama Y, Toh-e A, and Yokosawa H.** Definitive evidence for Ufd2-catalyzed elongation of the ubiquitin chain through Lys48 linkage. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 840-845, 2004.
349. **Saiardi A, Bhandari R, Resnick AC, Snowman AM, and Snyder SH.** Phosphorylation of proteins by inositol pyrophosphates. *Science* 306: 2101-2105, 2004.
350. **Saitoh H and Hinchey J.** Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* 275: 6252-6258, 2000.
351. **Saitoh H, Pu RT, and Dasso M.** SUMO-1: wrestling with a new ubiquitin-related modifier. *Trends Biochem Sci* 22: 374-376, 1997.
352. **Salghetti SE, Caudy AA, Chenoweth JG, and Tansey WP.** Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* 293: 1651-1653, 2001.
353. **Salomoni P and Bellodi C.** New insights into the cytoplasmic function of PML. *Histol Histopathol* 22: 937-946, 2007.
354. **Salomoni P and Pandolfi PP.** The role of PML in tumor suppression. *Cell* 108: 165-170, 2002.

355. **Sampson DA, Wang M, and Matunis MJ.** The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 276: 21664-21669, 2001.
356. **Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, and Velculescu VE.** High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 304: 554, 2004.
357. **Sapetschnig A, Rischitor G, Braun H, Doll A, Schergaut M, Melchior F, and Suske G.** Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *Embo J* 21: 5206-5215, 2002.
358. **Satou A, Taira T, Iguchi-Arigo SM, and Ariga H.** A novel transrepression pathway of c-Myc. Recruitment of a transcriptional corepressor complex to c-Myc by MM-1, a c-Myc-binding protein. *J Biol Chem* 276: 46562-46567, 2001.
359. **Saurin AJ, Borden KL, Boddy MN, and Freemont PS.** Does this have a familiar RING? *Trends Biochem Sci* 21: 208-214, 1996.
360. **Scaglioni PP, Yung TM, Cai LF, Erdjument-Bromage H, Kaufman AJ, Singh B, Teruya-Feldstein J, Tempst P, and Pandolfi PP.** A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell* 126: 269-283, 2006.
361. **Scheel H and Hofmann K.** No evidence for PHD fingers as ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* 13: 285-287; author reply 287-288, 2003.
362. **Scheffner M, Nuber U, and Huibregtse JM.** Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 373: 81-83, 1995.
363. **Schlesinger DH, Goldstein G, and Niall HD.** The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry* 14: 2214-2218, 1975.
364. **Schnell JD and Hicke L.** Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* 278: 35857-35860, 2003.
365. **Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, and Rauscher FJ, 3rd.** SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev* 16: 919-932, 2002.
366. **Schultz DC, Friedman JR, and Rauscher FJ, 3rd.** Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD. *Genes Dev* 15: 428-443, 2001.
367. **Schwartz DC and Hochstrasser M.** A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem Sci* 28: 321-328, 2003.
368. **Seeler JS, Bischof O, Nacerddine K, and Dejean A.** SUMO, the three Rs and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 313: 49-71, 2007.
369. **Seeler JS and Dejean A.** Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 690-699, 2003.
370. **Seeler JS, Marchio A, Losson R, Desterro JM, Hay RT, Chambon P, and Dejean A.** Common properties of nuclear body protein SP100 and TIF1alpha chromatin factor: role of SUMO modification. *Mol Cell Biol* 21: 3314-3324, 2001.

371. **Seet BT, Dikic I, Zhou MM, and Pawson T.** Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 473-483, 2006.
372. **Seufert W, Futcher B, and Jentsch S.** Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* 373: 78-81, 1995.
373. **Shalizi A, Gaudilliere B, Yuan Z, Stegmuller J, Shirogane T, Ge Q, Tan Y, Schulman B, Harper JW, and Bonni A.** A calcium-regulated MEF2 sumoylation switch controls postsynaptic differentiation. *Science* 311: 1012-1017, 2006.
374. **Sharma V, Hupp CD, and Tepe JJ.** Enhancement of chemotherapeutic efficacy by small molecule inhibition of NF-kappaB and checkpoint kinases. *Curr Med Chem* 14: 1061-1074, 2007.
375. **Shen TH, Lin HK, Scaglioni PP, Yung TM, and Pandolfi PP.** The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol Cell* 24: 331-339, 2006.
376. **Shen Z, Pardington-Purtymun PE, Comeaux JC, Moyzis RK, and Chen DJ.** UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics* 36: 271-279, 1996.
377. **Shimomura O, Johnson FH, and Saiga Y.** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol* 59: 223-239, 1962.
378. **Shinbo Y, Niki T, Taira T, Ooe H, Takahashi-Niki K, Maita C, Seino C, Iguchi-Ariga SM, and Ariga H.** Proper SUMO-1 conjugation is essential to DJ-1 to exert its full activities. *Cell Death Differ* 13: 96-108, 2006.
379. **Shuai K.** Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* 19: 2638-2644, 2000.
380. **Sigismund S, Polo S, and Di Fiore PP.** Signaling through monoubiquitination. *Curr Top Microbiol Immunol* 286: 149-185, 2004.
381. **Sloper-Mould KE, Jemc JC, Pickart CM, and Hicke L.** Distinct functional surface regions on ubiquitin. *J Biol Chem* 276: 30483-30489, 2001.
382. **Sobko A, Ma H, and Firtel RA.** Regulated SUMOylation and ubiquitination of DdMEK1 is required for proper chemotaxis. *Dev Cell* 2: 745-756, 2002.
383. **Song J, Durrin LK, Wilkinson TA, Krontiris TG, and Chen Y.** Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14373-14378, 2004.
384. **Sowa ME and Harper JW.** From loops to chains: unraveling the mysteries of polyubiquitin chain specificity and processivity. *ACS Chem Biol* 1: 20-24, 2006.
385. **Spence J, Gali RR, Dittmar G, Sherman F, Karin M, and Finley D.** Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* 102: 67-76, 2000.
386. **Sripathy SP, Stevens J, and Schultz DC.** The KAP1 corepressor functions to coordinate the assembly of de novo HP1-demarcated microenvironments of heterochromatin required for KRAB zinc finger protein-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 26: 8623-8638, 2006.
387. **Stankovic-Valentin N, Deltour S, Seeler J, Pinte S, Vergoten G, Guerardel C, Dejean A, and Leprince D.** An acetylation/deacetylation-SUMOylation switch through a

- phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor HIC1 regulates transcriptional repression activity. *Mol Cell Biol* 27: 2661-2675, 2007.
388. **Staub O and Rotin D.** Role of ubiquitylation in cellular membrane transport. *Physiol Rev* 86: 669-707, 2006.
389. **Steen H and Mann M.** The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 699-711, 2004.
390. **Steffan JS, Agrawal N, Pallos J, Rockabrand E, Trotman LC, Slepko N, Illes K, Lukacsovich T, Zhu YZ, Cattaneo E, Pandolfi PP, Thompson LM, and Marsh JL.** SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* 304: 100-104, 2004.
391. **Stelter P and Ulrich HD.** Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* 425: 188-191, 2003.
392. **Sternsdorf T, Grotzinger T, Jensen K, and Will H.** Nuclear dots: actors on many stages. *Immunobiology* 198: 307-331, 1997.
393. **Sternsdorf T, Puccetti E, Jensen K, Hoelzer D, Will H, Ottmann OG, and Ruthardt M.** PIC-1/SUMO-1-modified PML-retinoic acid receptor alpha mediates arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia. *Mol Cell Biol* 19: 5170-5178, 1999.
394. **Stone RL and Dixon JE.** Protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* 269: 31323-31326, 1994.
395. **Strohmaier H, Spruck CH, Kaiser P, Won KA, Sangfelt O, and Reed SI.** Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature* 413: 316-322, 2001.
396. **Stuurman N, de Graaf A, Floore A, Josso A, Humbel B, de Jong L, and van Driel R.** A monoclonal antibody recognizing nuclear matrix-associated nuclear bodies. *J Cell Sci* 101 (Pt 4): 773-784, 1992.
397. **Su HL and Li SS.** Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. *Gene* 296: 65-73, 2002.
398. **Subramanian C, Xu Y, Johnson CH, and von Arnim AG.** In vivo detection of protein-protein interaction in plant cells using BRET. *Methods Mol Biol* 284: 271-286, 2004.
399. **Sun L and Chen ZJ.** The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol* 16: 119-126, 2004.
400. **Sun L, Deng L, Ea CK, Xia ZP, and Chen ZJ.** The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell* 14: 289-301, 2004.
401. **Sun ZW and Allis CD.** Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 418: 104-108, 2002.
402. **Sutherland EW, Jr. and Wosilait WD.** Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature* 175: 169-170, 1955.
403. **Swanson RV, Alex LA, and Simon MI.** Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology. *Trends Biochem Sci* 19: 485-490, 1994.

404. **Tatham MH, Geoffroy MC, Shen L, Plechanovova A, Hattersley N, Jaffray EG, Palvimo JJ, and Hay RT.** RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat Cell Biol* 10: 538-546, 2008.
405. **Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA, Desterro JM, Botting CH, Naismith JH, and Hay RT.** Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* 276: 35368-35374, 2001.
406. **Tatham MH, Kim S, Yu B, Jaffray E, Song J, Zheng J, Rodriguez MS, Hay RT, and Chen Y.** Role of an N-terminal site of Ubc9 in SUMO-1, -2, and -3 binding and conjugation. *Biochemistry* 42: 9959-9969, 2003.
407. **Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, and Pickart CM.** Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J* 19: 94-102, 2000.
408. **Toker A.** The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Cell Biol* 10: 254-261, 1998.
409. **Tomlinson E, Palaniyappan N, Tooth D, and Layfield R.** Methods for the purification of ubiquitinated proteins. *Proteomics* 7: 1016-1022, 2007.
410. **Tonks NK, Diltz CD, and Fischer EH.** Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J Biol Chem* 263: 6722-6730, 1988.
411. **Torok M and Etkin LD.** Two B or not two B? Overview of the rapidly expanding B-box family of proteins. *Differentiation* 67: 63-71, 2001.
412. **Tupler R, Perini G, and Green MR.** Expressing the human genome. *Nature* 409: 832-833, 2001.
413. **Ueda H, Goto J, Hashida H, Lin X, Oyanagi K, Kawano H, Zoghbi HY, Kanazawa I, and Okazawa H.** Enhanced SUMOylation in polyglutamine diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 307-313, 2002.
414. **Ulrich HD.** Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest. *Trends Cell Biol* 15: 525-532, 2005.
415. **Um JW and Chung KC.** Functional modulation of parkin through physical interaction with SUMO-1. *J Neurosci Res* 84: 1543-1554, 2006.
416. **Underhill C, Qutob MS, Yee SP, and Torchia J.** A novel nuclear receptor corepressor complex, N-CoR, contains components of the mammalian SWI/SNF complex and the corepressor KAP-1. *J Biol Chem* 275: 40463-40470, 2000.
417. **Ungureanu D, Vanhatupa S, Gronholm J, Palvimo JJ, and Silvennoinen O.** SUMO-1 conjugation selectively modulates STAT1-mediated gene responses. *Blood* 106: 224-226, 2005.
418. **Upadhyaya SC and Hegde AN.** A potential proteasome-interacting motif within the ubiquitin-like domain of parkin and other proteins. *Trends Biochem Sci* 28: 280-283, 2003.
419. **Varadan R, Assfalg M, Haririnia A, Raasi S, Pickart C, and Fushman D.** Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling. *J Biol Chem* 279: 7055-7063, 2004.
420. **Varadan R, Walker O, Pickart C, and Fushman D.** Structural properties of polyubiquitin chains in solution. *J Mol Biol* 324: 637-647, 2002.
421. **Varshavsky A.** The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* 22: 383-387, 1997.

422. **Venturini L, You J, Stadler M, Galien R, Lallemand V, Koken MH, Mattei MG, Ganser A, Chambon P, Losson R, and de The H.** TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene* 18: 1209-1217, 1999.
423. **Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, and Miyamoto S.** Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 9: 2723-2735, 1995.
424. **Vieth M, Sutherland JJ, Robertson DH, and Campbell RM.** Kinomics: characterizing the therapeutically validated kinase space. *Drug Discov Today* 10: 839-846, 2005.
425. **Walsh C.** *Posttranslational modification of proteins : expanding nature's inventory.* Englewood, Colo.: Roberts and Co. Publishers, 2006.
426. **Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, and Gatto GJ, Jr.** Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl* 44: 7342-7372, 2005.
427. **Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, and Chen ZJ.** TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412: 346-351, 2001.
428. **Wang M, Cheng D, Peng J, and Pickart CM.** Molecular determinants of polyubiquitin linkage selection by an HECT ubiquitin ligase. *Embo J* 25: 1710-1719, 2006.
429. **Wang Z, Shen D, Parsons DW, Bardelli A, Sager J, Szabo S, Ptak J, Silliman N, Peters BA, van der Heijden MS, Parmigiani G, Yan H, Wang TL, Riggins G, Powell SM, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, and Velculescu VE.** Mutational analysis of the tyrosine phosphatome in colorectal cancers. *Science* 304: 1164-1166, 2004.
430. **Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyraas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigo R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, et al.** Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520-562, 2002.
431. **Watson IR, Blanch A, Lin DC, Ohh M, and Irwin MS.** Mdm2-mediated NEDD8 modification of TAp73 regulates its transactivation function. *J Biol Chem* 281: 34096-34103, 2006.
432. **Weber P, Cammas F, Gerard C, Metzger D, Chambon P, Losson R, and Mark M.** Germ cell expression of the transcriptional co-repressor TIF1beta is required for the maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Development* 129: 2329-2337, 2002.

433. **Weidtkamp-Peters S, Lenser T, Negorev D, Gerstner N, Hofmann TG, Schwanitz G, Hoischen C, Maul G, Dittrich P, and Hemmerich P.** Dynamics of component exchange at PML nuclear bodies. *J Cell Sci* 121: 2731-2743, 2008.
434. **Weis K, Rambaud S, Lavau C, Jansen J, Carvalho T, Carmo-Fonseca M, Lamond A, and Dejean A.** Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell* 76: 345-356, 1994.
435. **Weisshaar SR, Keusekotten K, Krause A, Horst C, Springer HM, Gottsche K, Dohmen RJ, and Praefcke GJ.** Arsenic trioxide stimulates SUMO-2/3 modification leading to RNF4-dependent proteolytic targeting of PML. *FEBS Lett*, 2008.
436. **Welchman RL, Gordon C, and Mayer RJ.** Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 599-609, 2005.
437. **Welcker M, Singer J, Loeb KR, Grim J, Bloecher A, Gurien-West M, Clurman BE, and Roberts JM.** Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation. *Mol Cell* 12: 381-392, 2003.
438. **Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, Wu P, Wiesmann C, Baker R, Boone DL, Ma A, Koonin EV, and Dixit VM.** De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* 430: 694-699, 2004.
439. **White DE, Negorev D, Peng H, Ivanov AV, Maul GG, and Rauscher FJ, 3rd.** KAP1, a novel substrate for PIKK family members, colocalizes with numerous damage response factors at DNA lesions. *Cancer Res* 66: 11594-11599, 2006.
440. **Wiesmeijer K, Molenaar C, Bekeer IM, Tanke HJ, and Dirks RW.** Mobile foci of Sp100 do not contain PML: PML bodies are immobile but PML and Sp100 proteins are not. *J Struct Biol* 140: 180-188, 2002.
441. **Wilkinson KD.** Roles of ubiquitylation in proteolysis and cellular regulation. *Annu Rev Nutr* 15: 161-189, 1995.
442. **Wilkinson KD.** Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* 11: 141-148, 2000.
443. **Wilkinson KD, Urban MK, and Haas AL.** Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* 255: 7529-7532, 1980.
444. **Williams N.** Yeast genome sequence ferments new research. *Science* 272: 481, 1996.
445. **Wilson T and Hastings JW.** Bioluminescence. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 197-230, 1998.
446. **Wilson VG and Rangasamy D.** Viral interaction with the host cell sumoylation system. *Virus Res* 81: 17-27, 2001.
447. **Winston F and Allis CD.** The bromodomain: a chromatin-targeting module? *Nat Struct Biol* 6: 601-604, 1999.
448. **Wohlschlegel JA, Johnson ES, Reed SI, and Yates JR, 3rd.** Global analysis of protein sumoylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279: 45662-45668, 2004.
449. **Wolfe CL, Hopper AK, and Martin NC.** Mechanisms leading to and the consequences of altering the normal distribution of ATP(CTP):tRNA nucleotidyltransferase in yeast. *J Biol Chem* 271: 4679-4686, 1996.

450. **Wu-Baer F, Lagrazon K, Yuan W, and Baer R.** The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin. *J Biol Chem* 278: 34743-34746, 2003.
451. **Wu K, Yamoah K, Dolios G, Gan-Erdene T, Tan P, Chen A, Lee CG, Wei N, Wilkinson KD, Wang R, and Pan ZQ.** DEN1 is a dual function protease capable of processing the C terminus of Nedd8 and deconjugating hyper-neddylated CUL1. *J Biol Chem* 278: 28882-28891, 2003.
452. **Wu WS, Vallian S, Seto E, Yang WM, Edmondson D, Roth S, and Chang KS.** The growth suppressor PML represses transcription by functionally and physically interacting with histone deacetylases. *Mol Cell Biol* 21: 2259-2268, 2001.
453. **Xirodimas DP, Chisholm J, Desterro JM, Lane DP, and Hay RT.** P14ARF promotes accumulation of SUMO-1 conjugated (H)Mdm2. *FEBS Lett* 528: 207-211, 2002.
454. **Xirodimas DP, Saville MK, Bourdon JC, Hay RT, and Lane DP.** Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell* 118: 83-97, 2004.
455. **Xu P, Cheng D, Duong DM, Rush J, Roelofs J, Finley D, and Peng J.** A proteomic strategy for quantifying polyubiquitin chain topologies. *Israel Journal of Chemistry* 46: 171-182, 2006.
456. **Xu P and Peng J.** Dissecting the ubiquitin pathway by mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 1764: 1940-1947, 2006.
457. **Xu Y, Piston DW, and Johnson CH.** A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 151-156, 1999.
458. **Xu ZX, Timanova-Atanasova A, Zhao RX, and Chang KS.** PML colocalizes with and stabilizes the DNA damage response protein TopBP1. *Mol Cell Biol* 23: 4247-4256, 2003.
459. **Xu ZX, Zhao RX, Ding T, Tran TT, Zhang W, Pandolfi PP, and Chang KS.** Promyelocytic leukemia protein 4 induces apoptosis by inhibition of survivin expression. *J Biol Chem* 279: 1838-1844, 2004.
460. **Xue Y, Zhou F, Fu C, Xu Y, and Yao X.** SUMOsp: a web server for sumoylation site prediction. *Nucleic Acids Res* 34: W254-257, 2006.
461. **Yamashita D, Yamaguchi T, Shimizu M, Nakata N, Hirose F, and Osumi T.** The transactivating function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is negatively regulated by SUMO conjugation in the amino-terminal domain. *Genes Cells* 9: 1017-1029, 2004.
462. **Yang M, Hsu CT, Ting CY, Liu LF, and Hwang J.** Assembly of a polymeric chain of SUMO1 on human topoisomerase I in vitro. *J Biol Chem* 281: 8264-8274, 2006.
463. **Yang SH, Jaffray E, Hay RT, and Sharrocks AD.** Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol Cell* 12: 63-74, 2003.
464. **Yang SH, Jaffray E, Senthinathan B, Hay RT, and Sharrocks AD.** SUMO and transcriptional repression: dynamic interactions between the MAP kinase and SUMO pathways. *Cell Cycle* 2: 528-530, 2003.

465. **Yang XJ.** Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays* 26: 1076-1087, 2004.
466. **Yang XJ.** Multisite protein modification and intramolecular signaling. *Oncogene* 24: 1653-1662, 2005.
467. **Yang XJ and Gregoire S.** A recurrent phospho-sumoyl switch in transcriptional repression and beyond. *Mol Cell* 23: 779-786, 2006.
468. **Yaron A, Gonen H, Alkalay I, Hatzubai A, Jung S, Beyth S, Mercurio F, Manning AM, Ciechanover A, and Ben-Neriah Y.** Inhibition of NF-kappa-B cellular function via specific targeting of the I-kappa-B-ubiquitin ligase. *Embo J* 16: 6486-6494, 1997.
469. **Yaron A, Hatzubai A, Davis M, Lavon I, Amit S, Manning AM, Andersen JS, Mann M, Mercurio F, and Ben-Neriah Y.** Identification of the receptor component of the I-kappaB-alpha-ubiquitin ligase. *Nature* 396: 590-594, 1998.
470. **Yeh ET, Gong L, and Kamitani T.** Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* 248: 1-14, 2000.
471. **Zeng L and Zhou MM.** Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* 513: 124-128, 2002.
472. **Zhang M, Windheim M, Roe SM, Peggie M, Cohen P, Prodromou C, and Pearl LH.** Chaperoned ubiquitylation--crystal structures of the CHIP U box E3 ubiquitin ligase and a CHIP-Ubc13-Uev1a complex. *Mol Cell* 20: 525-538, 2005.
473. **Zhao X and Blobel G.** A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4777-4782, 2005.
474. **Zhao X, Sternsdorf T, Bolger TA, Evans RM, and Yao TP.** Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4- and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications. *Mol Cell Biol* 25: 8456-8464, 2005.
475. **Zheng N, Schulman BA, Song L, Miller JJ, Jeffrey PD, Wang P, Chu C, Koepf DM, Elledge SJ, Pagano M, Conaway RC, Conaway JW, Harper JW, and Pavletich NP.** Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* 416: 703-709, 2002.
476. **Zhong S, Muller S, Ronchetti S, Freemont PS, Dejean A, and Pandolfi PP.** Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 95: 2748-2752, 2000.
477. **Zhong S, Salomoni P, and Pandolfi PP.** The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol* 2: E85-90, 2000.
478. **Zhou H, Watts JD, and Aebersold R.** A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation. *Nat Biotechnol* 19: 375-378, 2001.
479. **Zhu J, Koken MH, Quignon F, Chelbi-Alix MK, Degos L, Wang ZY, Chen Z, and de The H.** Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3978-3983, 1997.
480. **Zhu J, Zhu S, Guzzo CM, Ellis NA, Sung KS, Choi CY, and Matunis MJ.** Sumo binding determines substrate recognition and paralog-selective sumo modification. *J Biol Chem*, 2008.
481. **Zhu Q, Zhang JW, Zhu HQ, Shen YL, Flexor M, Jia PM, Yu Y, Cai X, Waxman S, Lanotte M, Chen SJ, Chen Z, and Tong JH.** Synergic effects of arsenic

trioxide and cAMP during acute promyelocytic leukemia cell maturation subtends a novel signaling cross-talk. *Blood* 99: 1014-1022, 2002.