

Université de Montréal

**Régulation dynamique de l'activité du récepteur des  
estrogènes beta (ER $\beta$ ) par la phosphorylation,  
l'ubiquitination et la sumoylation**

par

Nathalie Picard

Département de Biochimie, Université de Montréal

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Docteur en Philosophie (Ph.D) en Biochimie

Août, 2011

© Nathalie Picard, 2011

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Régulation dynamique de l'activité du récepteur des estrogènes beta (ER $\beta$ ) par la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation**

Présentée par :  
Nathalie Picard

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Muriel Aubry, président-rapporteur  
Dr André Tremblay, directeur de recherche  
Dr Pierre Thibault, membre du jury  
Dr Nicolas Gévry, examinateur externe  
Dr Audrey Claing, représentant du doyen de la FES

## Résumé

Les estrogènes jouent un rôle primordial dans le développement et le fonctionnement des tissus reproducteurs par leurs interactions avec les récepteurs des estrogènes ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Ces récepteurs nucléaires agissent comme facteurs de transcription et contrôlent l'expression des gènes de façon hormono-dépendante et indépendante grâce à leurs deux domaines d'activation (AF-1 et AF-2). Une dérégulation de leur activité transcriptionnelle est souvent à l'origine de pathologies telles que le cancer du sein, de l'endomètre et des ovaires. Alors que ER $\alpha$  est utilisé comme facteur pronostic pour l'utilisation d'agents thérapeutiques, l'importance de la valeur clinique de ER $\beta$  est encore controversée. Toutefois, des évidences récentes lui associent un pouvoir anti-tumorigénique en démontrant que sa présence favorise l'inhibition de la progression de ces cancers ainsi que l'efficacité des traitements.

En combinaisons avec d'autres études, ces observations démontrent que bien que les deux isoformes partagent une certaine similitude d'action, les ERs sont en mesure d'exercer des fonctions distinctes. Ces différences sont fortement attribuables au faible degré d'homologie observé entre certains domaines structuraux des ERs, comme le domaine AF-1, ce qui fait en sorte que les différents sites de modifications post-traductionnelles (MPTs) présents sur les ERs sont très peu conservés entre les isoformes. Or, l'activité transcriptionnelle ligand-dépendante et indépendante des ERs est hautement régulée par les MPTs. Elles sont impliquées à tous les niveaux de l'activation des ERs incluant la liaison et la sensibilité au ligand, la localisation cellulaire, la dimérisation, l'interaction avec l'ADN, le recrutement de corégulateurs transcriptionnels, la stabilité et l'arrêt de la transcription. Ainsi, de par leur dissimilitude, les ERs seront différemment régulés par la signalisation cellulaire. Comme un déséquilibre de plusieurs voies de signalisation ont été associées à la progression de tumeurs ER-positives ainsi qu'au développement d'une résistance, une meilleure compréhension de l'impact des MPTs sur la régulation spécifique des ERs s'avère essentielle en vue de proposer et/ou développer des traitements adéquats pour les cancers gynécologiques. Les résultats présentés dans cette thèse ont pour objectif de mieux

comprendre les rôles des MPTs sur l'activité transcriptionnelle de ER $\beta$  qui sont, contrairement à ER $\alpha$ , très peu connus.

Nous démontrons une régulation dynamique de ER $\beta$  par la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation. De plus, toutes les MPTs nouvellement découvertes par mes recherches se situent dans l'AF-1 de ER $\beta$  et permettent de mieux comprendre le rôle capital joué par ce domaine dans la régulation de l'activité ligand-dépendante et indépendante du récepteur. Dans la première étude, nous observons qu'en réponse aux MAPK, l'AF-1 de ER $\beta$  est phosphorylé au niveau de sérines spécifiques et qu'elles jouent un rôle important dans la régulation de l'activité ligand-indépendante de ER $\beta$  par la voie ubiquitine-protéasome. En effet, la phosphorylation de ces sérines régule le cycle d'activation-dégradation de ER $\beta$  en modulant son ubiquitination, sa mobilité nucléaire et sa stabilité en favorisant le recrutement de l'ubiquitine ligase E6-AP. De plus, ce mécanisme d'action semble être derrière la régulation différentielle de l'activité de ER $\alpha$  et ER $\beta$  observée lors de l'inhibition du protéasome. Dans le second papier, nous démontrons que l'activité et la stabilité de ER $\beta$  en présence d'estrogène sont étroitement régulées par la sumoylation phosphorylation-dépendante de l'AF-1, processus hautement favorisé par l'action de la kinase GSK-3. La sumoylation de ER $\beta$  par SUMO-1 prévient la dégradation du récepteur en entrant en compétition avec l'ubiquitination au niveau du même site accepteur. De plus, contrairement à ER $\alpha$ , SUMO-1 réprime l'activité de ER $\beta$  en altérant son interaction avec l'ADN et l'expression de ses gènes cibles dans les cellules de cancers du sein. Également, ces recherches ont permis d'identifier un motif de sumoylation dépendant de la phosphorylation (*p*SuM) jusqu'à lors inconnu de la communauté scientifique, offrant ainsi un outil supplémentaire à la prédiction de nouveau substrat de la sumoylation.

En plus de permettre une meilleure compréhension du rôle des signaux intracellulaires dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de ER $\beta$ . Nos résultats soulignent l'importance des MPTs dans l'induction des différences fonctionnelles

observées entre ER $\alpha$  et ER $\beta$  et apportent des pistes supplémentaires à la compréhension de leurs rôles physiopathologiques respectifs.

**Mots-clés :** Cancers gynécologiques; Récepteurs des estrogènes, ER; Domaine d'activation-1, AF-1; Phosphorylation; MAPK; GSK-3; Ubiquitination; E6-AP; Protéasome; Sumoylation; SUMO-1; Motif de sumoylation phosphorylation dépendant, *p*SuM

## Abstract

Estrogens play a pivotal role in reproductive physiology through direct interaction with the estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ , which belong to the nuclear hormone receptor family of ligand-activated transcription factors. Harboring two activation domains (AF-1 and AF-2), gene expression can be controlled by ERs either in a hormone-dependent and/or independent manner. Disruption of ER transcriptional regulation is associated with pathological events such as breast and endometrial cancers. While ER $\alpha$  is considered a strong predictive factor in endocrine therapy of reproductive cancers, the clinical value of ER $\beta$  is still debated, although greater expression of ER $\beta$  has been associated with a favourable outcome since recent evidence has associated ER $\beta$  with anti-tumorigenic properties and a better response to anti-estrogenic compounds.

Along with others studies, those individual outcomes indicate that even though the two receptors can exert similar roles by sharing resemblances in terms of structure and general response to hormone, they can also carry out distinct functions. These variations can be attributed to the fact that most of the structural domains shared by ERs exhibit a low level of homology, especially at the AF-1 domain. Consequently, the majority of the post-translational modifications sites (PTMs) on ERs are not shared between both isoforms. In fact, ligand-induced and ligand-independent activities of ERs are critically influenced by PTMs. PTMs controls the multiple aspects of ER-dependent activation by modulating ERs ligand binding, specificity, cellular localization, dimerization, interaction with their cognate DNA response element, combinatorial recruitment of transcriptional coregulators, stability and transcriptional arrest. Hence, by their discrepancies, ERs will be differently influenced by the cellular environment. Furthermore, as the deregulation of different signalling pathway in cancers is associated with ER-dependant tumour progression and in the acquisition of a therapeutic resistant phenotype, it is crucial to understand the how PTMs affect ERs transactivation in order to eventually propose and/or develop adequate treatment. The results presented in this thesis were carried out with the objective of gaining

a better understanding of PTM's roles on ER $\beta$  transcriptional control which, as opposed to ER $\alpha$ , remain unclear.

We demonstrate here a dynamic regulation of ER $\beta$  by phosphorylation, ubiquitination and sumoylation. Furthermore, as all the newly identified PTM are located within the AF-1 domain of ER $\beta$ , our results highlight the key role of this domain in the regulation of ligand-dependent and independent transcriptional properties of this receptor. The first study shows that in response to MAPK, specific serine residues in the AF-1 of ER $\beta$  are phosphorylated and play an important role in the regulation of ER $\beta$  ligand-independent activity by the ubiquitin-proteasome pathway. In fact, the activation-degradation cycle of ER $\beta$  induced by MAPK is regulated upon phosphorylation of these serines coordinating ER $\beta$  ubiquitination, subnuclear mobility and stability by promoting the recruitment of the ubiquitin ligase E6-AP. Moreover, this molecular process plays part in the differential regulation of ER $\alpha$  and ER $\beta$  activity upon proteasome inhibition. In the second paper, we demonstrate that ER $\beta$  activity and stability in presence of estrogen is closely regulated by the phosphorylation-dependent sumoylation of the AF-1 domain, amplified by GSK-3 action. SUMO-1 attachment prevents ER $\beta$  degradation by competing with ubiquitin at the same acceptor site and dictates ER $\beta$  transcriptional inhibition, as opposed to ER $\alpha$ , by altering estrogen-responsive target promoter occupancy and gene expression in breast cancer cells. Furthermore, these findings uncover a novel phosphorylated sumoylation motif (*pSuM*) and offer a valuable tool to predict novel SUMO substrates under protein kinase regulation.

In combination to our better understanding on how intracellular signals controls ER $\beta$  transcriptional activity, our results highlight the significant role of PTMs in ERs isoforms discrepancies and allows supplementary comprehension of their respective physiopathological roles.

**Keywords** : Reproductive cancers; Estrogen receptor, ER; Activation function-1, AF-1; Phosphorylation; MAPK; GSK-3; Ubiquitination; E6-AP; Proteasome; Sumoylation; SUMO-1; phosphorylated sumoylation motif, *p*SuM



## Table des matières

|  |       |
|--|-------|
| Résumé.....  | i     |
| Abstract.....  | iv    |
| Liste des tableaux.....  | xii   |
| Liste des figures.....   | xiii  |
| Abréviations.....  | xiv   |
| Remerciements.....   | xviii |
| Chapitre 1 : Introduction.....   | 1     |
| 1 – Les estrogènes.....  | 1     |
| 1.1 – Rôles physiopathologiques des estrogènes.....                      | 2     |
| 2 – Les récepteurs des estrogènes.....                                   | 4     |
| 2.1 – Structure des ERs.....   | 4     |
| 2.2 – Mécanisme d’action général des ERs.....                            | 6     |
| 2.2.1 – Activation des ERs.....  | 7     |
| 2.2.2 – Actions génomiques des ERs.....                                  | 10    |
| 2.2.3 – Actions non-génomiques des ERs.....                              | 11    |
| 2.2.3.1 – Récepteur des estrogènes couplé aux protéines G (GPER).....    | 12    |
| 3 – Corégulateurs transcriptionnels.....                                 | 12    |
| 3.1 – Coactivateurs.....   | 13    |
| 3.2 – Corépresseurs.....   | 15    |
| 4 – Deux isoformes pour un même ligand ?.....                            | 16    |
| 4.1 – Études des souris transgéniques.....                               | 17    |
| 4.2 – Profil d’expression génique : reflet des fonctions distinctes..... | 18    |
| 4.3 – Différences structurelles des ERs : impact sur la fonction.....    | 19    |
| 4.3.1 – Le domaine N-terminal.....                                       | 20    |
| 4.3.2 – Le domaine de liaison à l’ADN.....                               | 21    |
| 4.3.3 – La région charnière.....   | 21    |
| 4.3.4 – Le domaine de liaison au ligand.....                             | 22    |

|  |    |
|--|----|
| 5.3.5 – Le domaine C-terminal .....  | 22 |
| 5 – Régulation des ERs par les MPTs.....                                       | 23 |
| 5.1 – Phosphorylation .....  | 24 |
| 5.1.1 – Rôles de la phosphorylation .....                                      | 25 |
| 5.1.1.1 – La phosphorylation : médiateur des signaux cellulaires .....         | 25 |
| 5.1.2 – Principales voies de signalisation régulant l'activité des ERs .....   | 25 |
| 5.1.2.1 – Impact général de ces voies dans les cancers ER-positifs.....        | 27 |
| 5.1.3 – La phosphorylation sur les ERs.....                                    | 29 |
| 5.1.3.1 – Impacts sur ER $\alpha$ .....  | 30 |
| 5.1.3.2 – Impacts sur ER $\beta$ .....   | 33 |
| 5.2 – L'ubiquitination .....   | 37 |
| 5.2.1 – L'ubiquitine.....  | 37 |
| 5.2.2 – Processus général .....  | 38 |
| 5.2.2.1 – E3 ligases .....   | 40 |
| 5.2.3 – Conséquences de l'ubiquitination .....                                 | 41 |
| 5.2.3.1 – Dégradation protéique.....   | 42 |
| 5.2.3.1.1 – Voie ubiquitine-protéasome .....                                   | 43 |
| 5.2.3.1.1.1 – Signaux ciblant les protéines vers le protéasome.....            | 44 |
| 5.2.3.1.1.2 – Outils permettant l'étude de la voie ubiquitine-protéasome ..... | 45 |
| 5.2.3.1.1.3 – Impacts physiologiques et pathologiques de la voie .....         | 45 |
| 5.2.3.2 – Endocytose .....   | 46 |
| 5.2.3.3 – Transduction de signaux .....  | 47 |
| 5.2.4.1 – Action sur la chromatine et la machinerie transcriptionnelle.....    | 48 |
| 5.2.4.2 – Action sur les récepteurs nucléaires et leurs cofacteurs.....        | 49 |
| 5.2.4.3 – Impact sur la régulation des ERs.....                                | 50 |
| 5.3 – La sumoylation.....  | 53 |
| 5.3.1 – SUMO-1,2,3 et 4 : membres de la grande famille des Ubls .....          | 54 |
| 5.3.2 – La voie de la sumoylation .....  | 55 |
| 5.3.2.1 – Processus général .....  | 55 |

|  |    |
|--|----|
| 5.3.2.2 – La conjugaison/déconjugaison de SUMO en détail .....               | 57 |
| 5.3.3 – Conséquences de la sumoylation .....                                 | 60 |
| 6.3.3.1 – Effets moléculaires et fonctionnels .....                          | 61 |
| 5.3.3.2 – Études des conséquences fonctionnelles : un défi de taille.....    | 63 |
| 5.3.3.3 – Inhibition de la transcription .....                               | 63 |
| 5.3.3.3.1 – Recrutement de corépresseurs.....                                | 64 |
| 5.3.3.3.2 – Altération de l’interaction avec l’ADN.....                      | 65 |
| 5.3.3.3.3 – Relocalisation cellulaire .....                                  | 66 |
| 5.3.3.3.4 – Dégradation protéique.....                                       | 66 |
| 5.3.3.4 – Activation de la transcription.....                                | 67 |
| 5.3.4 – Conséquences de la sumoylation sur l’activité des ERs .....          | 68 |
| 5.3.5 – Pathologies associées .....  | 70 |
| 5.3.5.1 – Implication dans les cancers.....                                  | 71 |
| 5.4 – Autres modifications post-traductionnelles .....                       | 72 |
| 5.4.1 – La méthylation .....   | 72 |
| 5.4.2 – L’acétylation .....  | 73 |
| 5.4.3 – La palmitoylation .....  | 74 |
| 5.4.4 – La glycosylation .....   | 74 |
| 6 – Les ERs dans les cancers : rôle spécifique des isoformes.....            | 75 |
| 6.1 – Effet antiprolifératif de ER $\beta$ .....                             | 76 |
| 6.2 – Variants d’épissage des ERs .....                                      | 78 |
| 6.2.1 – Isoformes de ER $\alpha$ .....                                       | 78 |
| 6.2.2 – Isoformes de ER $\beta$ .....  | 80 |
| 6.3 – Cibler thérapeutiquement l’action des ERs.....                         | 80 |
| 6.3.1 – Modulateur sélectif des ERs (SERM).....                              | 81 |
| 6.3.2 – Régulateur négatif sélectif des ERs (SERD).....                      | 83 |
| 6.3.3 – Agonistes sélectifs spécifiques pour ER $\alpha$ et ER $\beta$ ..... | 84 |
| 6.3.4 – Cibler l’action des ERs autrement que par un ligand.....             | 85 |

|  |     |
|--|-----|
| 6.3.4.1 – Composés interférant avec la liaison à l'ADN ou les cofacteurs.....  | 85  |
| 6.3.4.2 – Inhibiteurs de l'aromatase (AIs).....  | 86  |
| 6.3.4.3 – Inhibiteurs de la transduction des signaux .....   | 87  |
| 7 – Hypothèse et objectifs .....   | 89  |
| <br>   |     |
| Chapitre 2 : Résultats .....   | 91  |
| 1 – 1 <sup>ère</sup> publication .....   | 91  |
| Phosphorylation of Activation Function-1 Regulates Proteasome-dependent Nuclear Mobility and E6-AP Ubiquitin Ligase Recruitment to the Estrogen Receptor $\beta$ ..... | 91  |
| 2 – 2 <sup>ième</sup> publication.....   | 135 |
| Identification of ER $\beta$ as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by GSK3 $\beta$ .....                                  | 135 |
| <br>   |     |
| Chapitre 3 : Discussion générale, perspectives, conclusion.....  | 185 |
| Discussion .....   | 185 |
| 1 – Régulation dynamique de ER $\beta$ par les modifications post-traductionnelles .....   | 185 |
| 2 – Ajout d'un nouveau chapitre à la sumoylation phosphorylation-dépendante.....   | 188 |
| 2.1 – Un peu d'aide de GSK-3 : régulation de l'extension du <i>pSuM</i> .....  | 188 |
| 2.2 – ER $\beta$ potentialise l'action de GSK-3 $\beta$ .....  | 190 |
| 2.3 – Prédiction de nouvelles cibles du <i>pSuM</i> .....  | 190 |
| 3 – SUMO-1 : régulateur négatif de l'activité de ER $\beta$ .....  | 191 |
| 3.1 – Compétition entre SUMO-1 et Ubi au niveau de la lysine 4 .....   | 192 |
| 4 – Rôles du domaine AF-1 de ER $\beta$ .....  | 193 |
| 4.1 – L'AF-1 : principal régulateur de l'action du protéasome sur ER $\beta$ .....   | 194 |
| 4.2 – AF-1 : régule la dynamique intranucléaire de ER $\beta$ .....  | 195 |
| 4.2.1 – Les sérines 94-106 : immobilise ER $\beta$ dans la matrice nucléaire .....   | 196 |
| 4.2.2 – ER $\beta$ sumoylé accumule dans la matrice nucléaire.....   | 196 |
| 4.3 – AF-1 : atténuateur de l'activité transcriptionnelle de ER $\beta$ .....  | 197 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.3.1 – S94 et S106 : signaux atténuateurs de l’activité constitutive de l’AF-1 .....        | 197 |
| 4.3.2 – S94 et S106:signaux atténuateurs de l’activité ligand-indépendante de ER $\beta$     | 198 |
| 4.3.3 – S6 et K4 : signaux atténuateurs de l’activité estrogénique de ER $\beta$ .....       | 198 |
| 4.4 – K4 : « LE » site clé de l’effet atténuateur général de l’AF-1 ? .....                  | 199 |
| Perspectives.....  | 201 |
| 1 – Mécanismes moléculaires régulant l’effet atténuateur de K4.....                          | 202 |
| 1.1.1 – La sérine 6 du <i>p</i> SuM: cible potentielle de la kinase CK2 ? .....              | 202 |
| 1.1.2 – Les E3 ligases PIAS, impliquées dans la sumoylation de ER $\beta$ ?.....             | 203 |
| 1.2 – L’ubiquitination .....   | 205 |
| 1.2.1 – La lysine 4 : cible de quelle E3-ligase ?.....                                       | 205 |
| 2 – Évaluation du rôle anti-prolifératif de ER $\beta$ .....                                 | 206 |
| 2.1 – Un rôle anti-prolifératif pour l’AF-1 de ER $\beta$ ?.....                             | 207 |
| 2.2 – Action non-génomique de ER $\beta$ : régulateur négatif de la voie PI3K/Akt? .....     | 209 |
| 3 – Mécanisme entourant l’amélioration de la réponse cellulaire au tamoxifène par ER $\beta$ | 210 |
| Conclusion .....   | 212 |
| Bibliographie.....   | 213 |

## Liste des tableaux

|   |    |
|---|----|
| Tableau 1 : Exemples de différents types d'ubiquitine ligases (E3).....           | 41 |
| Tableau 2 : Effet de la sumoylation sur l'activité de corégulateurs des ERs ..... | 70 |

## Liste des figures

|  |     |
|--|-----|
| Figure 1 : Synthèse des hormones stéroïdiennes.....                                      | 1   |
| Figure 2 : Structure des ERs et éléments de réponses aux estrogènes .....                | 5   |
| Figure 3 : Mécanismes d'actions généraux des ERs .....                                   | 8   |
| Figure 4 : Les corégulateurs transcriptionnels .....                                     | 14  |
| Figure 5 : Distribution des ERs dans l'organisme .....                                   | 16  |
| Figure 6 : Pourcentage d'homologie entre les différents domaines des ERs.....            | 19  |
| Figure 7 : Résumé des principales voies de signalisation ciblant les ERs .....           | 26  |
| Figure 8 : Représentation schématique des sites de phosphorylation sur ER $\alpha$ ..... | 30  |
| Figure 9 : Représentation schématique des sites de phosphorylation sur ER $\beta$ .....  | 34  |
| Figure 10 : L'ubiquitine et les types d'ubiquitination .....                             | 38  |
| Figure 11 : Schématisation du processus d'ubiquitination .....                           | 39  |
| Figure 12 : Conséquences de l'ubiquitination .....                                       | 42  |
| Figure 13 : Schématisation du mode d'action du protéasome 26S .....                      | 44  |
| Figure 14: Régulation de la transcription par la voie ubiquitine-protéasome.....         | 48  |
| Figure 15 : Représentation du repliement ubiquitine caractéristique aux Ubls .....       | 54  |
| Figure 16 : La voie de la sumoylation.....   | 56  |
| Figure 17 : Mécanismes entourant la conjugaison de SUMO.....                             | 58  |
| Figure 18 : Conséquences moléculaires de la sumoylation des substrats .....              | 62  |
| Figure 19 : Mécanismes liés à la répression transcriptionnelle induite par SUMO.....     | 64  |
| Figure 20 : Variants d'épissage des ERs .....  | 79  |
| Figure 21 : Résumé des MPTs associées au domaine AF-1 de ER $\beta$ .....                | 186 |

## Abréviations

|                |   |
|----------------|---|
| A              | Alanine   |
| a.a.           | Acide aminé                                       |
| ACTH           | Hormone corticotrope                              |
| ADN            | Acide désoxyribonucléique                         |
| ADP            | Adénosine diphosphate                             |
| AF             | Fonction d'activation ou domaine d'activation     |
| AP-1           | Protéine activatrice-1                            |
| AR             | Récepteur des androgènes                          |
| ARN            | Acide ribonucléique                               |
| ATP            | Adénosine triphosphate                            |
| $\beta$ -grasp | $\beta$ -Golgi reassembly stacking protein        |
| BARD           | BRCA1 associated RING domain                      |
| BRCA1          | Breast cancer supressor protein                   |
| C              | Cystéine  |
| CARM1          | Coactivator-associated arginine methyltransferase |
| CBP            | Protéine se fixant à CREB                         |
| CK2            | Casein kinase II                                  |
| CtBP           | Protéine fixant le C-terminal                     |
| D              | Aspartate ou acide aspartique                     |
| DBD            | Domaine de liaison à l'ADN                        |
| E              | Glutamate ou acide glutamique                     |
| E1             | Enzyme activatrice                                |
| E <sub>2</sub> | Estrogène   |
| E2             | Conjugase   |
| E3             | Ligases   |
| E4             | Enzyme 4  |
| E6-AP          | Potéine associée à E6                             |



|                |   |
|----------------|---|
| EGF            | Facteur de croissance épidermique   |
| EGFR           | Récepteur des facteurs de croissance épidermique (HER/ErbB)               |
| ER             | Récepteurs des estrogènes   |
| ERE            | Élément de réponse aux estrogènes   |
| ERK            | Kinase régulée par des signaux extracellulaires                           |
| FRAP           | Fluorescence recovery after photobleaching                                |
| FSH            | Hormone folliculostimulante   |
| G              | Glycine   |
| GPCR           | Récepteur couplé aux protéines G  |
| GPER           | Récepteur des estrogènes couplé aux protéines G                           |
| GR             | Récepteur des glucocorticoïdes  |
| GSK-3          | Kinase Glycogène synthase 3   |
| HRE            | Éléments de réponse aux hormones  |
| HRG            | Héréguline  |
| HSP            | Protéine de choc thermique  |
| IGF            | Facteur de croissance apparenté à l'insuline                              |
| IGFR           | Récepteur des facteurs de croissance apparenté à l'insuline               |
| K              | Lysine  |
| KO             | N'exprimant pas un gène cible (Knockout)                                  |
| LBD            | Domaine de liaison du ligand  |
| LH             | Hormone lutéinisante  |
| MAPK           | Protéine kinase activée par un mitogène                                   |
| Mdm2           | Murine double minute 2  |
| MEK            | Mitogen-activated/extracellular signal regulated kinase (MAPKK)           |
| MPT            | Modification post-traductionnelle   |
| MR             | Récepteur des minéralocorticoïdes   |
| N-CoR          | Corépresseur des récepteurs nucléaires                                    |
| NDSM           | Motif de sumoylation dépendant de la présence d'a.a. chargés négativement |
| NF- $\kappa$ B | Facteur nucléaire-kappa B   |

|           |  |
|-----------|--|
| OHT       | Hydroxy-tamoxifène   |
| Pc2       | Hologue de la protéine Polycomb 2  |
| PDSM      | Motif de sumoylation dépendant de la phosphorylation                     |
| PIAS      | Inhibiteur des protéines STAT activées                                   |
| PI3K      | Kinase phosphoinositol 3   |
| PKA       | Protéine kinase A  |
| PKB       | Protéine kinase B  |
| PKC       | Protéine kinase C  |
| PML       | Promyelocytic leukaemia  |
| PR        | Récepteur de la progestérone   |
| PRMT      | Protéine arginine méthyltransférase                                      |
| R         | Arginine   |
| RanGap    | Protéine activatrice de la GTPase Ran                                    |
| RING      | Really interesting new gene  |
| RTK       | Récepteur tyrosine kinase  |
| RXR       | Récepteur X des rétinoïdes   |
| SAE1/SAE2 | Enzyme activatrice de la sumoylation 1 and 2                             |
| SENP      | Protéase spécifique pour Sentrin/SUMO                                    |
| SERM      | Modulateur sélectif des récepteurs des estrogènes                        |
| SIM       | Motif d'interaction avec SUMO  |
| SMRT      | Méiateur de la répression des récepteurs aux rétinoïdes et thyroïdiens   |
| Src       | Tyrosine kinase  |
| SRC       | Coactivateur des récepteurs stéroïdiens                                  |
| SUG1      | Suppresseur de Gal1  |
| STUbL     | Ubiquitine-ligase reconnaissant la SUMO                                  |
| SUMO      | Petite protéine similaire à l'ubiquitine (Small Ubiquitin-like MOdifier) |
| TBP       | Protéine fixant la séquence TATA   |
| Ubc9      | Ubiquitin-conjugating enzyme 9   |
| Ubl       | Protéines similaire à l'ubiquitine (Ubiquitin-like protein)              |

*À tous ceux que j'aime !*

En science, la phrase la plus excitante que l'on peut entendre, celle qui annonce de nouvelles découvertes, ce n'est pas "Eureka" mais c'est "Tiens, ça c'est drôle..."

Isaac Asimov

Chaque découverte scientifique est passionnante parce qu'elle ouvre un univers de questions. Si les questions vous angoissent, ne soyez pas scientifique.

Boris Cyrulnik

## Remerciements

Mon doctorat est de loin l'expérience où j'ai rencontré le plus de défis ! La science c'est magnifique, stimulant, passionnant, mais le parcours est également rempli de plusieurs épreuves, déceptions et ça requiert une bonne dose de patience, courage, d'optimisme et de foi en ses aptitudes !!! J'en ressors, sans conteste, grandie et prête à affronter la nouvelle étape qui m'attend. Il est certain qu'une grande part de ma réussite est attribuable aux personnes de mon entourage et je tiens à leur exprimer toute ma gratitude.

Premièrement, j'aimerais remercier mon superviseur, André Tremblay, qui m'a donné l'opportunité de faire mes études dans son laboratoire, études qui m'ont permis de développer et d'entretenir ma passion pour la recherche. Merci pour votre direction et vos conseils. Vous m'avez guidée et enseigné votre savoir, contribuant inévitablement au développement de mon autonomie scientifique et à la personne que je suis aujourd'hui. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir donné une grande latitude dans le choix et le déroulement de mes projets, notamment durant les dernières années. Merci également de m'avoir laissé la chance d'assister à plusieurs congrès qui ont été une source d'enrichissement importante. Bref, merci pour tout !

Je tiens également à remercier les « miss », « pitoune », « bella », « mamzelle », bref les filles du labo ! Sans vous, ça n'aurait pas été pareil et j'y ai découvert des personnes exceptionnelles ! Plus particulièrement, j'aimerais remercier les « long lasting ladies » Mélanie, Amélie, Annie, Karine, Véro et plus dernièrement Stéphanie et Meryl. Merci pour toutes les discussions traitant de près ou de très très loin à la science, nos sorties de groupe, le partage de nos joies et nos peines, qui ont fait que la vie au labo fût hautement agréable et stimulante. Vous avez mis la barre haute et je crains de ne pas retrouver un tel environnement de travail un jour ! Merci également pour votre support et votre amitié durant toutes ces années et plus particulièrement durant les périodes qui m'ont été plus difficiles. Et merci d'avoir endurer mes chansons plates !

Merci à mes amis proches qui ont été à mes côtés durant toutes ces années. Et oui, j'ai finalement terminé ! Vous ne m'entendrez plus dire chaque année que j'en ai encore seulement pour deux ans environ !!! Merci à tous de m'avoir épaulée et d'avoir partagé ma vie. Merci pour les temps off du labo et de la thèse, mes sorties avec vous m'ont été salutaires !

Annie Dou, je t'adore ! J'aurais besoin d'une thèse au complet pour te dire tous les remerciements qui te reviennent, alors je résume, merci pour tout !!! Tu m'es très chère ! Geneviève, merci pour ton amitié, nos soupers/sorties me font toujours le plus grand bien ! Tu es une personne merveilleuse et je suis heureuse que tu fasses partie de ma vie. Émilie, notre amitié est plus récente, mais j'y ai découvert une personne formidable que j'affectionne beaucoup. Je me rappelle particulièrement de notre souper, durant lequel on n'a pas vu le temps passé ! Annie Miron, on a peu eu l'occasion de se voir ces derniers temps, mais je tiens à te dire que tu es très importante pour moi et j'ai fini, alors on va pouvoir aller cruiser ! Mia, nos discussions sont toujours aussi profondes et intéressantes, merci d'être mon amie ! Sarah-Jane, comment t'oublier ! Bien que je jalouse ta rapidité à pouvoir écrire une thèse, je t'apprécie beaucoup et je remercie Fred de m'avoir permis de te rencontrer. Émilie, Karine, Mélan et Annick, mes chères amies du secondaire, je vais enfin pouvoir aller vous voir plus souvent ! On se fait un souper de filles la semaine prochaine ? Ah oui, j'oubliais, il faut se prendre presque un an en avance!

Jeff, Fred, Karl, Richard et Greg merci les gars ! Merci de votre présence à mes côtés, de nos conversations, de votre vision masculine des choses et événements. Dans mon entourage hautement féminin, c'est une bouffée d'air frais ! Jeff, on sera toujours là l'un pour l'autre, je te le garantie ! Fred, on a eu nos hauts et nos bas, mais au final, j'en ressors avec un ami fidèle qui m'a appuyée durant toutes ces années et sur qui je vais toujours pouvoir compter. Merci ! Merci également à Marie-Christine, JF, JP et Steve ma « gang » du taekwondo. Je suis vraiment choyée de vous avoir rencontrés et de voir que notre amitié à su passer outre ma blessure. Grâce à vous, j'ai pu me défouler dans les cours, mais aussi durant nos interminables partys !

À vous tous, mes chers et nombreux amis (je suis vraiment choyée !), je dis encore une fois merci et j'espère que notre amitié va durer jusqu'à nos vieux jours. Je m'imagine déjà vous téléphonant pour potiner ! Haaa, les potins !!!

Merci également à ma famille. Papa, merci pour tout, tout, tout ! Merci d'avoir cru en moins et en ma carrière. Nos discussions sont plus intéressantes les unes que les autres et votre sagesse m'a été d'un grand recours à plusieurs occasions ! À mes sœurs, Véro, la sage et la calme de la famille, Amélie, celle qui a parlé tard, mais qui se reprend à 400% miles à l'heure, et mon frère, le merveilleux homme en devenir qui fait tourner les têtes, je vous remercie d'avoir fait preuve de patience à mon égard, je sais que je n'ai pas toujours été facile à gérer ! Merci de votre écoute, de vos conseils, de votre aide, de vos rires, de vos joies et vos peines, bref, de tous les moments que nous avons partagés, partageons et partagerons ! Merci également à ma cousine et amie Marie-Claude. Nos traditionnelles soirées sushi sont toujours appréciées et je ne sais pas ce que j'aurais fait sans toi ! Merci à vous tous de m'avoir épaulée durant mes études et plus dernièrement de m'avoir aidée à gérer mes petits moments de panique ! Je vous aime !!!

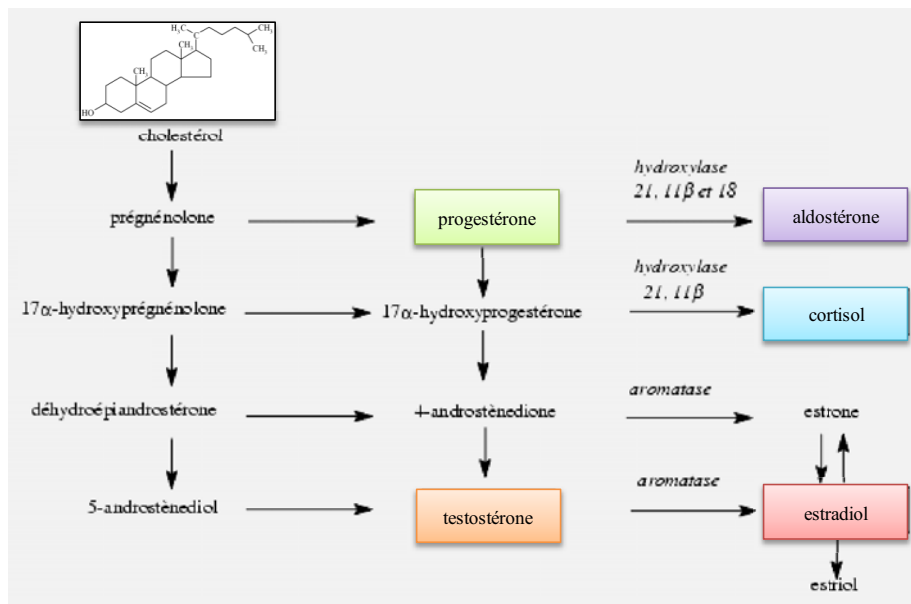
La dernière, mais non la moindre, Maman. Très chère maman, c'est grâce à toi que je suis en science. Je ne savais pas quoi faire après le secondaire et tu as su découvrir en moi mon potentiel pour la recherche, et tu m'as soutenue tout au long de mes études. Tu m'as beaucoup appris et tu as su faire de moi la femme fière, forte et confiante que je suis aujourd'hui. Un conseil que tu m'as donné un jour quand j'étais toute petite me sert encore: « Chaque journée de la vie compte et tu y apprends quelque chose. Si tu penses ne rien avoir appris de nouveau aujourd'hui, ouvre le dictionnaire et trouves y un mot que tu ne connais pas encore ! ». Tu me manques énormément et j'ose espérer que tu auras été fière de moi !!!

Merci à tous !

# Chapitre 1 : Introduction

## 1 – Les œstrogènes

Les trois œstrogènes naturels sont l'œstradiol, l'œstriol et l'œstrone. Membres de la famille des hormones stéroïdiennes, ces molécules lipidiques sont synthétisées à partir du cholestérol (Figure 1). Leur biosynthèse est sous le contrôle de diverses enzymes et est initié par la sécrétion d'ACTH (hormone corticotrope), de LH (hormone lutéinisante) et de FSH (hormone folliculostimulante) au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire (1). Leurs principaux lieux de synthèse sont les ovaires, au niveau des follicules ovariens et du corps jaune, ainsi que le placenta (2).



**Figure 1 : Synthèse des hormones stéroïdiennes**

Les minéralocorticoïdes et les glucocorticoïdes sont synthétisés au niveau du cortex surrénalien, alors que la progestérone est d'origine ovarienne. Les androgènes et les œstrogènes sont majoritairement produits par les testicules et les ovaires, respectivement. *Adaptation d'une image provenant de <http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Androgene>.*

Les œstrogènes sont également produits en plus faible quantité dans plusieurs autres organes, incluant le foie, les surrénales, les seins, les tissus adipeux, les testicules, les os, les muscles, les cellules endothéliales et le cerveau, car ces tissus expriment tous l'aromatase P450, encodé par le gène *CYP19*, qui est l'enzyme nécessaire à l'étape finale

de la biosynthèse des estrogènes à partir des androgènes. Le pouvoir estrogénique de l'estradiol est de 10 et 80 fois plus élevé que l'estrone et l'estriol, respectivement, et en recherche c'est principalement l'estradiol (17 $\beta$ -estradiol ou E<sub>2</sub>) qui est utilisé.

## 1.1 – Rôles physiopathologiques des estrogènes

Le rôle fondamental et incontestable des estrogènes est d'assurer le développement et le fonctionnement adéquat des tissus reproducteurs féminins. L'action des estrogènes est assurée par leur association avec leurs récepteurs stéroïdiens respectifs, soit les récepteurs des estrogènes (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ). Grâce à l'avancement de la science et l'étude de ces récepteurs, on sait aujourd'hui que les estrogènes jouent également un rôle prépondérant dans la croissance et le développement de nombreux tissus non-reproducteurs, dans le développement et l'intégrité osseuse, dans la régulation du métabolisme, du système cardiovasculaire, du système immunitaire et du système nerveux central. De plus, on sait que l'absence ou la surexposition aux estrogènes peut induire plusieurs pathologies (3).

Par exemple, après la ménopause ou suite à une chirurgie ovarienne, l'absence d'estrogènes chez ces femmes peut occasionner de nombreux symptômes indésirables ainsi qu'augmenter leurs risques de problèmes cardiaques et d'ostéoporose (4,5). Chez les hommes, l'absence d'une production d'estrogènes, dû à une aromatasé dysfonctionnelle, occasionne, en plus de l'ostéoporose, une résistance à l'insuline et des déficiences reproductrices (6). Ces effets peuvent être partiellement contrés par une thérapie de remplacement d'hormones. Par contre, l'hormonothérapie n'apporte pas que des bénéfices et les études tendent à démontrer que les femmes supplémentées en estrogènes sont particulièrement plus à risques de développer un cancer du sein, une maladie cardiaque ou un accident vasculaire cérébral (7,8). De plus, des évidences cliniques et expérimentales démontrent que l'exposition prolongée à l'estrogène et/ou à des composés estrogéniques durant toute notre vie constitue un facteur de risque majeur pour le développement de cancers du sein et des ovaires (9,10). Ces observations concordent avec le fait que le cancer



du sein, cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez la femme avec près de 2300 nouveaux cas par année et qui se classe au deuxième rang sur le plan de la mortalité, frappe surtout les femmes de plus de 50 ans (81% des cas diagnostiqués) (11,12).

En fait, les estrogènes possèdent un fort pouvoir mitogénique et les tissus du sein, des ovaires et du corps de l'utérus (endomètre) y sont particulièrement sensibles. L'action des estrogènes sur la prolifération cellulaire est le résultat de leur liaison à leurs récepteurs hormonaux respectifs, soit les récepteurs des estrogènes (ERs). Au moins 70% des cas de cancers du sein sont ERs-positifs et ER $\alpha$  est considéré comme le sous-type dominant à cette prolifération et est utilisé comme facteur pronostic (13,14). Dans de telles conditions, les médecins préconisent la polychimiothérapie en combinaison avec l'utilisation de modulateurs sélectifs des ERs (anti-estrogènes), qui influence négativement la prolifération tumorale en entrant en compétition avec la liaison de l'estrogène sur le récepteur, et/ou l'utilisation d'inhibiteurs de l'aromatase, qui empêche ainsi la synthèse d'estrogène (15).

Malheureusement, entre 40% et 50% des patientes recevant ce type de traitement ne répondent pas au traitement ou développent éventuellement une résistance, diminuant ainsi considérablement les chances de guérison (14,16). Les mécanismes derrière cette insensibilité à l'inhibition des ERs sont complexes et plus ou moins bien compris. Ils impliquent majoritairement une dérégulation des autres voies de signalisation cellulaire impliquées dans la prolifération cellulaire et/ou dans l'activation hormono-indépendante des ERs (17). En outre, l'activation de la voie des MAPKs (mitogen-activated protein kinase) et la surexpression des récepteurs HER/ErbB (human epidermal growth factor receptor) dans les cancers du sein sont associés au développement d'une résistance aux anti-estrogènes (18,19). Face au développement de telles résistances et afin de donner le traitement le plus approprié possible et/ou développer des alternatives thérapeutiques, il est primordial de bien comprendre le rôle des ERs dans ces cancers ainsi que les mécanismes cellulaires impliqués dans leurs régulations hormono-dépendantes et indépendantes.

## 2 – Les récepteurs des estrogènes

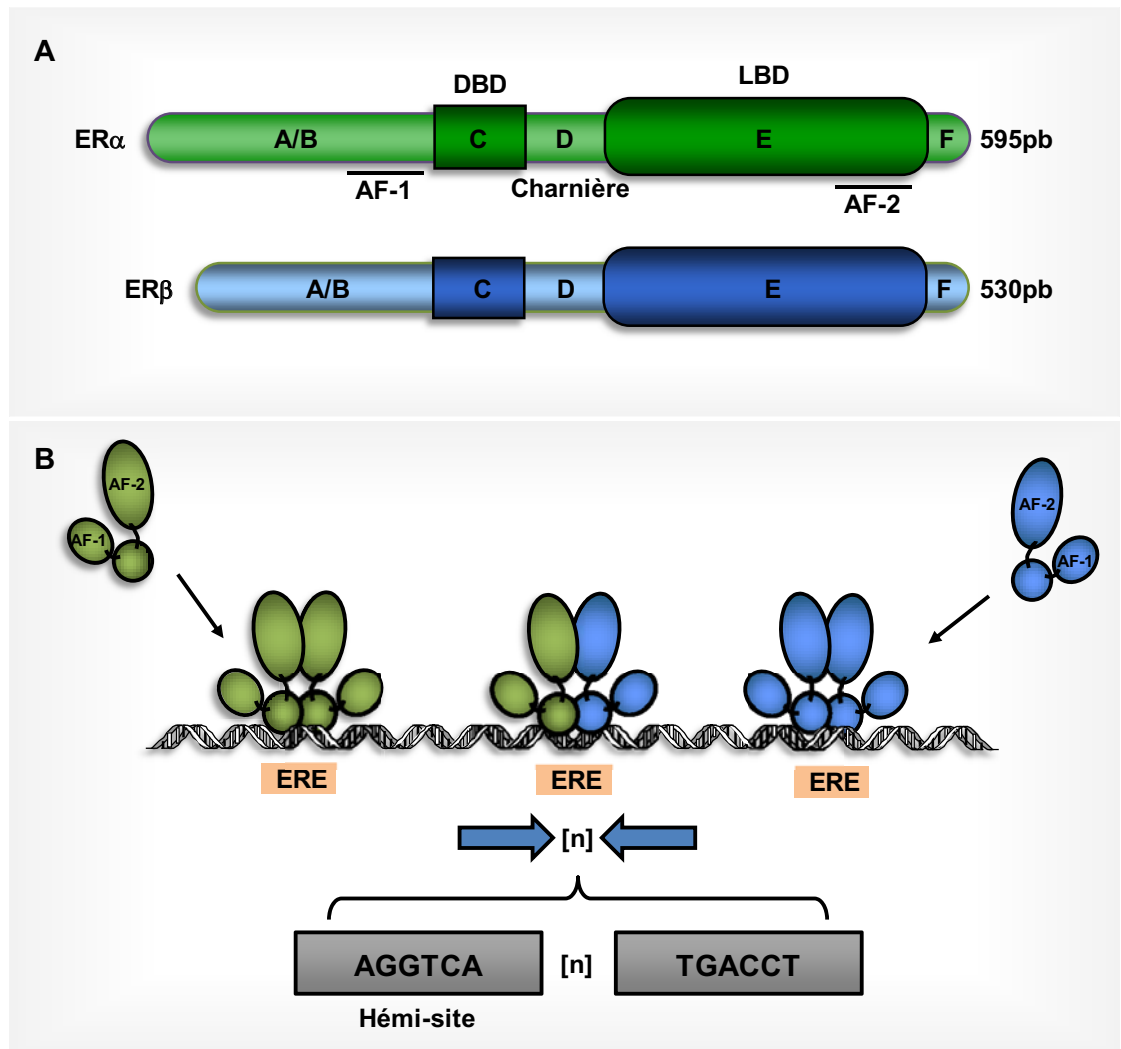
L'existence des estrogènes est connue depuis le début du 20<sup>ième</sup> siècle, mais ce n'est qu'au début des années 1960 que l'hypothèse de l'existence d'un récepteur pour ces hormones a été émise grâce aux travaux des Dr. Edwood V. Jensen et Herbert I. Jacobson qui ont démontrés, par l'utilisation d'estradiol tritié, que cette hormone était retenue dans ses tissus cibles (20,21). Peu de temps après, cette hypothèse a été confirmée par l'identification et l'isolation du récepteur des estrogènes (aujourd'hui nommé ER $\alpha$ ) par les Dr. Toft et Gorski (22) et, vingt ans plus tard, par son clonage dans le laboratoire du Dr. Pierre Chambon (23). Puis, en 1996, un deuxième récepteur des estrogènes, ER $\beta$ , a été identifié et cloné dans le laboratoire du Dr. Jan-Ake Gustafsson à partir de tissus prostatiques et ovariens de rat (24). Le clonage de ER $\beta$  chez de nombreuses espèces, incluant l'humain (25) et la souris (26), a rapidement suivi.

### 2.1 – Structure des ERs

Les récepteurs des estrogènes, ER $\alpha$  et ER $\beta$  font parti de la grande famille des récepteurs nucléaires. Cette superfamille, qui compte 48 membres chez l'humain, est composée de facteurs de transcription et ses membres, phylogénétiquement reliés, se distinguent par une structure et un mode d'action similaire (27). Chez l'humain, ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont encodés par deux gènes distincts (*ESR1* et *ESR2*) situés sur le chromosome 6 et le chromosome 14 respectivement (28,29). Les gènes *ESR1* et *ESR2* sont formés de 8 exons qui encodent pour les différents domaines structuraux caractéristiques des récepteurs nucléaires, soit les domaines A à F (30) (Figure 2A).

Le domaine NH<sub>2</sub>-terminal (A/B) est une région très variable entre les récepteurs autant en taille qu'en séquence. On y retrouve le domaine d'activation 1 (AF-1) qui contribue à l'activation ligand-indépendante des récepteurs via le recrutement de cofacteurs transcriptionnels et dont l'activité est principalement modulée par la phosphorylation. La structure de ce domaine est très instable et les études suggèrent que la phosphorylation

stabiliserait l'AF-1 ce qui permettrait conséquemment le recrutement des corégulateurs transcriptionnels (31,32).



**Figure 2 : Structure des ERs et éléments de réponses aux estrogènes**

**A.** Schématisation de la structure des ERs. **B.** Description et orientation des éléments de réponses aux estrogènes (ERE) et exemples des associations dimériques possibles des ERs.

Le domaine de liaison à l'ADN (DBD ou domaine C) est la région qui permet l'interaction du récepteur avec l'ADN. Ce domaine est composé de deux doigts de zinc qui vont s'intercaler dans l'ADN pour permettre l'encrage du récepteur au niveau d'une

séquence spécifique, soit son élément de réponse aux hormones (HRE). Les HREs sont des séquences situées sur l'ADN qui ont de quatre à une vingtaine de paires de bases et généralement composées de deux parties distinctes (hémi-site) et chaque hémi-site est reconnu par le DBD d'un monomère du facteur de transcription (30). Les ERs vont interagir sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère avec leurs éléments de réponse aux estrogènes (ERE). Un ERE parfait est composé d'une séquence (hémi-site) répétée inversée séparée par trois nucléotides : AGGTCAnnnTGACCT (33) (Figure 2B).

Le domaine D est une région charnière qui confère une flexibilité à la structure permettant ainsi aux récepteurs de bien positionner leurs domaines afin de faciliter l'interaction avec l'ADN, la dimérisation ainsi que la synergie d'action entre les domaines d'activations (AF) (34).

Le domaine de liaison du ligand (LBD ou domaine E) est un domaine multifonctionnel qui permet la liaison du ligand, l'homo- ou l'hétéro-dimérisation, l'interaction avec les protéines de choc thermique (HSP) et plusieurs coactivateurs transcriptionnels. Il est le siège du domaine d'activation 2 (AF-2) qui se caractérise par la présence de l'hélice- $\alpha$  (H12), essentielle à l'activation ligand-dépendante des récepteurs et le recrutement de cofacteurs transcriptionnels (35,36). Finalement, à l'extrémité C-terminale, on retrouve le domaine F. Les fonctions de ce domaine sont plus ou moins bien comprises mais les études démontrent qu'il est principalement impliqué dans le recrutement de corégulateurs et régulerait ainsi l'activité des ERs (37).

Ils existent également plusieurs variants d'épissages pour les deux isoformes. Leur description se trouve dans la section 6.2.

## **2.2 – Mécanisme d'action général des ERs**

Les ERs agissent sous la forme de dimères et lorsque les deux isoformes sont coexprimés, l'hétérodimère ER $\alpha$ /ER $\beta$  se forme préférentiellement aux homodimères de chaque récepteur (38,39). Comme pour les autres récepteurs stéroïdiens, les ERs

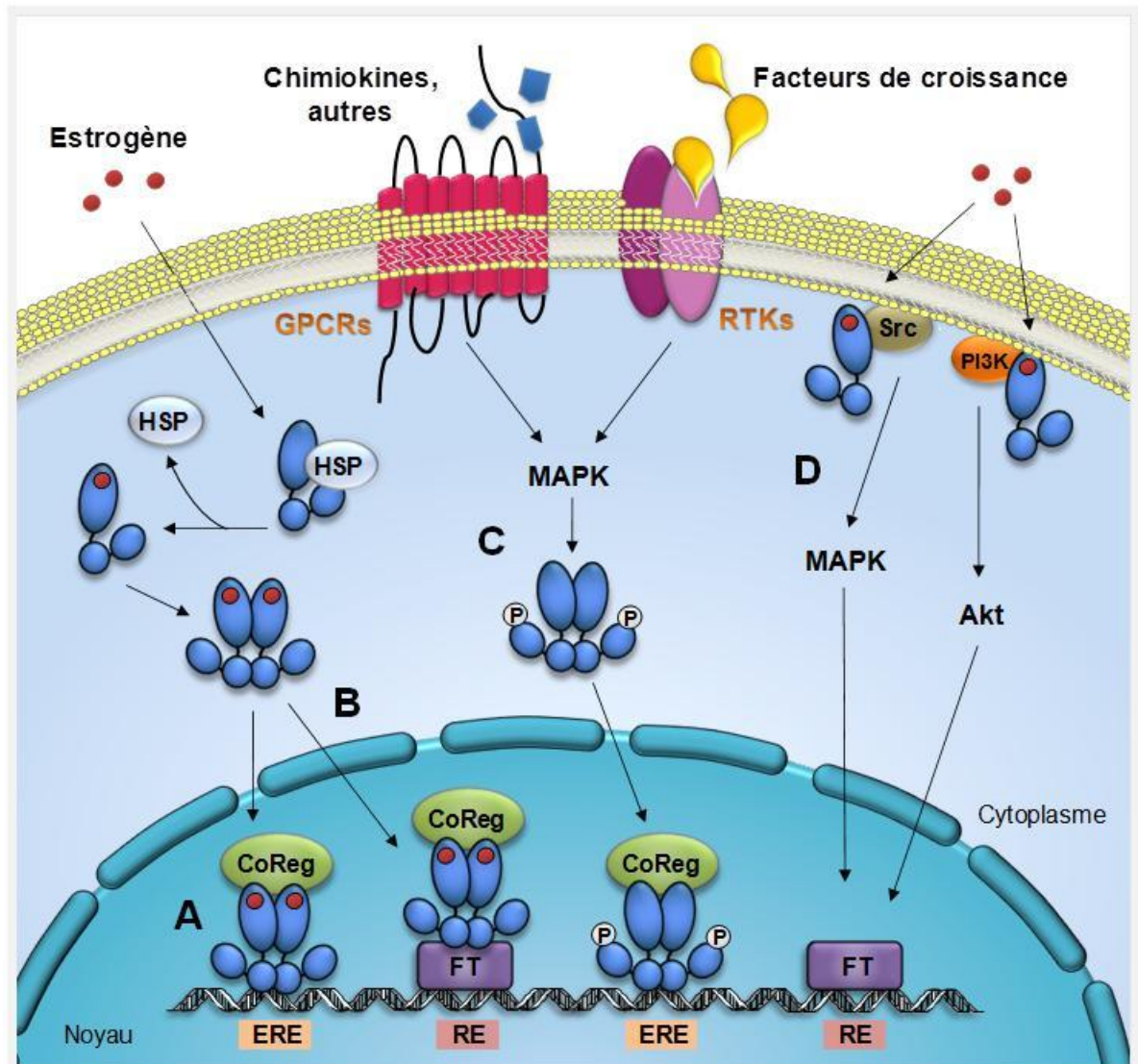
influencent la réponse cellulaire selon plusieurs mécanismes (Figure 3). Grâce à leurs deux domaines d'activation, les ERs peuvent être activés de façon ligand-dépendante (AF-2) ou indépendante (AF-1). Une fois activés, ils sont en mesure d'exercer des effets génomiques et non-génomiques. Leur action génomique peut se faire de deux façons, soit en interagissant directement avec l'ADN (voie classique), principalement au niveau d'éléments de réponse aux estrogènes (ERE) ou indirectement (voie non-classique), en se liant à un autre facteur de transcription déjà présent sur l'ADN.

### **2.2.1 – Activation des ERs**

Selon la voie d'activation classique des ERs (figure 3-A), en absence d'estrogène, les ERs sont majoritairement cytoplasmiques et interagissent avec les protéines chaperonnes HSP (heat shock protein) qui maintiennent les récepteurs inactifs en masquant leur domaine d'interaction avec l'ADN (40). Suite à la liaison d'estrogène au niveau du LBD, les ERs activés adoptent une nouvelle conformation qui induit leur dissociation des HSPs (protéines de choc thermique), leur dimérisation, leur translocation nucléaire et conséquemment leur liaison à l'ADN au niveau d'un élément de réponse aux estrogènes (ERE). Le changement de conformation du récepteur et l'interaction avec l'ADN favoriseront l'association des ERs avec des coactivateurs transcriptionnels qui vont promouvoir l'ouverture de la chromatine et le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. L'arrêt du processus transcriptionnel sera favorisé par le recrutement de corépresseurs transcriptionnels et la dégradation du récepteur. En fait, l'activation ligand-dépendante des ERs est un processus séquentiel et cyclique qui nécessite un recyclage des ERs par le protéasome en vue d'une activation optimale (voir section 5.2.4.3)

Le type de ligand aura une répercussion directe sur le recrutement des corégulateurs et l'interaction avec l'ADN (42-45). En effet, suite à la liaison de l'estrogène ou d'un agoniste, l'hélice H12 du domaine AF-2 des ERs va être réorientée de manière à trapper le ligand et à adopter une conformation optimale afin d'exposer sa surface d'interaction qui

est reconnue par le motif LXXLL ( $\alpha$ -helical nuclear receptor box motif) présent chez la majorité des protéines coactivatrices (46).



**Figure 3 : Mécanismes d'actions généraux des ERs**

Schématisation des différents modes d'actions des ERs. La description des mécanismes se trouve dans le texte. ERE : élément de réponse aux estrogènes, RE : élément de réponse, FT : Facteur de transcription.

*Image inspirée d'une illustration provenant de (41)*

À l'opposé, en présence d'un antagoniste, tel que le tamoxifène (anti-estrogène), l'hélice H12 adopte une autre conformation qui expose d'autres surfaces d'interaction qui

sont, quant à elles, accessibles aux corépresseurs transcriptionnels (42,47). Fait important à souligner, dans certaines conditions, le tamoxifène peut agir comme agoniste pour les ERs et avoir des répercussions néfastes sur la progression des cancers et le fonctionnement du traitement (voir section 6).

Grâce à leur domaine AF-1, dont l'activité est régulé par la phosphorylation, les ERs peuvent également être activés en absence d'estrogène en réponse à diverses voies de signalisation (48-52) (figure 3-C). Ce mécanisme d'activation ligand-indépendant fût démontré pour la première fois au début des années 1990 par l'observation que le traitement de souris ovariectomisées à l'EGF (epidermal growth factor) permettait la translocation de ER $\alpha$  et stimulait son activité (53). Depuis, nous savons que l'activité des ERs peut être régulée par l'action de plusieurs récepteurs membranaires incluant les récepteurs de la famille des récepteurs tyrosine kinase (RTK) et certains récepteurs couplés aux protéines G notamment le récepteur des chimiokines CXCR4 (voir section 5.1.2). L'activation de ces récepteurs enclenche plusieurs cascades signalétiques résultant en l'activation de plusieurs kinases incluant les MAPKs Erk1/2 et p38, PI3K/Akt et les protéines kinases (PKA et PKC) qui vont, à leur tour, induire la phosphorylation des ERs et réguler leur activité. Comme pour les autres récepteurs nucléaires, la phosphorylation de l'AF-1 influence leur translocation nucléaire et leur interaction avec l'ADN ainsi qu'avec les différents corégulateurs transcriptionnels (54,55).

Il est important de noter que l'action ligand-dépendante et indépendante des ERs ne sont pas mutuellement exclusives et l'activité transcriptionnelle des ERs est la résultante d'une synergie d'action entre leurs deux domaines d'activation (34,56). De plus, les différentes kinases activées peuvent moduler l'activité des ERs en phosphorylant d'autres domaines que l'AF-1 (41,57). Également, la phosphorylation n'est pas la seule modification post-traductionnelle à être impliquée dans la régulation de l'activité des ERs (41). Les rôles des MPTs sur la régulation des ERs et les voies de signalisation qui s'y rattachent, seront discutés plus en détails dans la section 5.

### 2.2.2 – Actions génomiques des ERs

Selon la voie classique, suite à leur activation ligand-dépendante ou indépendante, les ERs vont interagir sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère avec leurs éléments de réponse aux estrogènes (ERE) (figure 3 A-C). Néanmoins, très peu de gènes répondant aux estrogènes possèdent un ERE parfait dans leur région promotrice (33). Pour la plupart des gènes identifiés ayant un ERE fonctionnel, la séquence de celui-ci est souvent imparfaite pour un ou plusieurs nucléotides et la région promotrice est souvent composée de plusieurs copies d'EREs imparfaits.

Les ERs ont également la capacité de réguler la transcription de gènes sans interagir avec l'ADN (voie non-classique) (figure 3-B). Suite à leur activation par un ligand, les ERs peuvent interagir directement avec d'autres facteurs de transcription déjà présents sur l'ADN et moduler leurs activités en affectant le recrutement des cofacteurs transcriptionnels. Par cette voie non-classique, ER $\alpha$  et ER $\beta$  régulent indirectement l'activité transcriptionnelle du complexe c-Jun/c-Fos, qui lie un AP-1, ainsi que celle de Sp1 et NF- $\kappa$ B (58-60). En fonction du type de ligand et du type cellulaire, les ERs peuvent augmenter ou réprimer l'activité transcriptionnelle de ces facteurs de transcription. Les domaines AF-1 et F des ERs y jouent un rôle essentiel (61,62) et dans certains cas, les effets de ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont totalement opposés. Par exemple, lié à l'estrogène, ER $\alpha$  augmente l'activité des promoteurs AP-1 alors que ER $\beta$  l'inhibe (63).

Également, certains gènes régulés par l'estrogène ne possèdent d'élément de réponse classique ou non classique dans leur région promotrice et des résultats démontrent que l'expression de ces gènes implique la présence d'éléments distaux (64). Les éléments distaux sont des séquences pouvant être situées jusqu'à quelques milliers de paires de bases en amont ou en aval du site d'initiation (65). Ces éléments peuvent activer la transcription, on les appellera alors 'enhancers', ou la réprimer, on parlera de 'silencers'. Selon le mécanisme d'action proposé par lequel des séquences éloignées régulent la transcription, un repliement de l'ADN permettrait le rapprochement de ces séquences avec le site d'initiation



et, de ce fait, favoriserait les interactions avec la machinerie transcriptionnelle, permettant ainsi de passer outre les séquences qui isolent les différents loci du génome (66). L'expression de l'oncogène c-myc par ER est un bon exemple (67). En effet, bien que l'expression de c-myc soit rapidement induite en présence d'estrogène, la région promotrice proximale du gène ne semble pas impliquée et l'effet provient plutôt d'une région 'enhancer', qui contient un demi-site ERE et un demi-site AP-1, située 67-kb en amont du site d'initiation. De plus, la liaison des ERs au niveau des 'enhancers' nécessite la présence de certaines protéines telles que le facteur pionnier FoxA1/HNF3 $\alpha$  (Forkhead box A1/Hepatocyte Nuclear Factor 3 $\alpha$ ) et TLE1 (Transducin-like enhancer protein 1) (68-69).

### **2.2.3 – Actions non-génomiques des ERs**

Les estrogènes peuvent induire une réponse cellulaire très rapide via la stimulation positive ou négative d'une variété de protéines signalétiques. Ce phénomène est médié par la population des ERs se trouvant dans le cytoplasme près ou sur la membrane plasmique (70,71) (figure 3-D). Les ERs ne possèdent pas de domaine transmembranaire et les MPTs, telles que la myristoylation (72) et la palmitoylation (73,74), et les interactions protéine-protéine, avec entre autre la caveolin-1 (75) ou Shc, (76) sont nécessaires au recrutement de ER $\alpha$  et ER $\beta$  à la membrane plasmique. L'action non-génomique de ER $\alpha$  est largement documentée. ER $\alpha$  membranaire peut réguler l'activité de plusieurs cascades signalétiques en réponse à l'estrogène en interagissant avec plusieurs protéines incluant les récepteurs membranaires IGF-1R, EGFR et ErbB2 (77), les kinases Src (78,79), PI3K (80,81) et PLC- $\gamma$  (82), la protéine adaptatrice Shc (76) et les protéines G (83). Malgré le peu d'information sur l'action non-génomique de ER $\beta$ , nous savons que ER $\beta$  régule positivement l'activité de la MAPK p38 (81,84-86), Src (78,87), et mes résultats suggèrent qu'il régulerait également la kinase GSK-3 (voir chapitre 3, section 2.2). De plus, à l'inverse de ER $\alpha$ , ER $\beta$  cytoplasmique n'interagit pas avec PI3K (81).

Naturellement, bien que présenté séparément, l'action génomique et non-génomique des ERs ne sont pas mutuellement exclusives, mais complémentaires (78,88,89).

### **2.2.3.1 – Récepteur des estrogènes couplé aux protéines G (GPER)**

L'observation d'une réponse à l'estrogène dans les cellules n'exprimant pas ER $\alpha$  et ER $\beta$  a permis l'identification d'un nouveau membre de la famille des récepteurs des estrogènes, soit le GPER (90,91,92). GPER (GPR30) est un récepteur à sept passages transmembranaires couplé aux protéines G (GPCR) qui lie l'estrogène. La liaison de l'estrogène active son domaine couplé aux protéines G et stimule la formation de cAMP, l'activation de PI3K, l'activation des MAPKs et la transactivation de EGFR (91,93) (92,94). Certaines études le situent dans le réticulum endoplasmique (91,95) alors que d'autres dénotent sa présence à la membrane plasmique (96,97). Il est exprimé dans les organes reproducteurs (94,98,99) et les muscles (100). Par contre, les études des souris KO pour GPER ne démontrent pas de défauts reproducteurs ni d'anormalités physiologiques et fonctionnelles de ces organes (99,101-103). Or, ces résultats vont de pair avec les études qui démontrent que dans ces tissus GPR30 ne médie pas de réponse estrogénique, suggérant que l'action de ce récepteur est dépendante du type cellulaire (95,104,105). Son rôle en tant que récepteur des estrogènes est donc encore controversé (106).

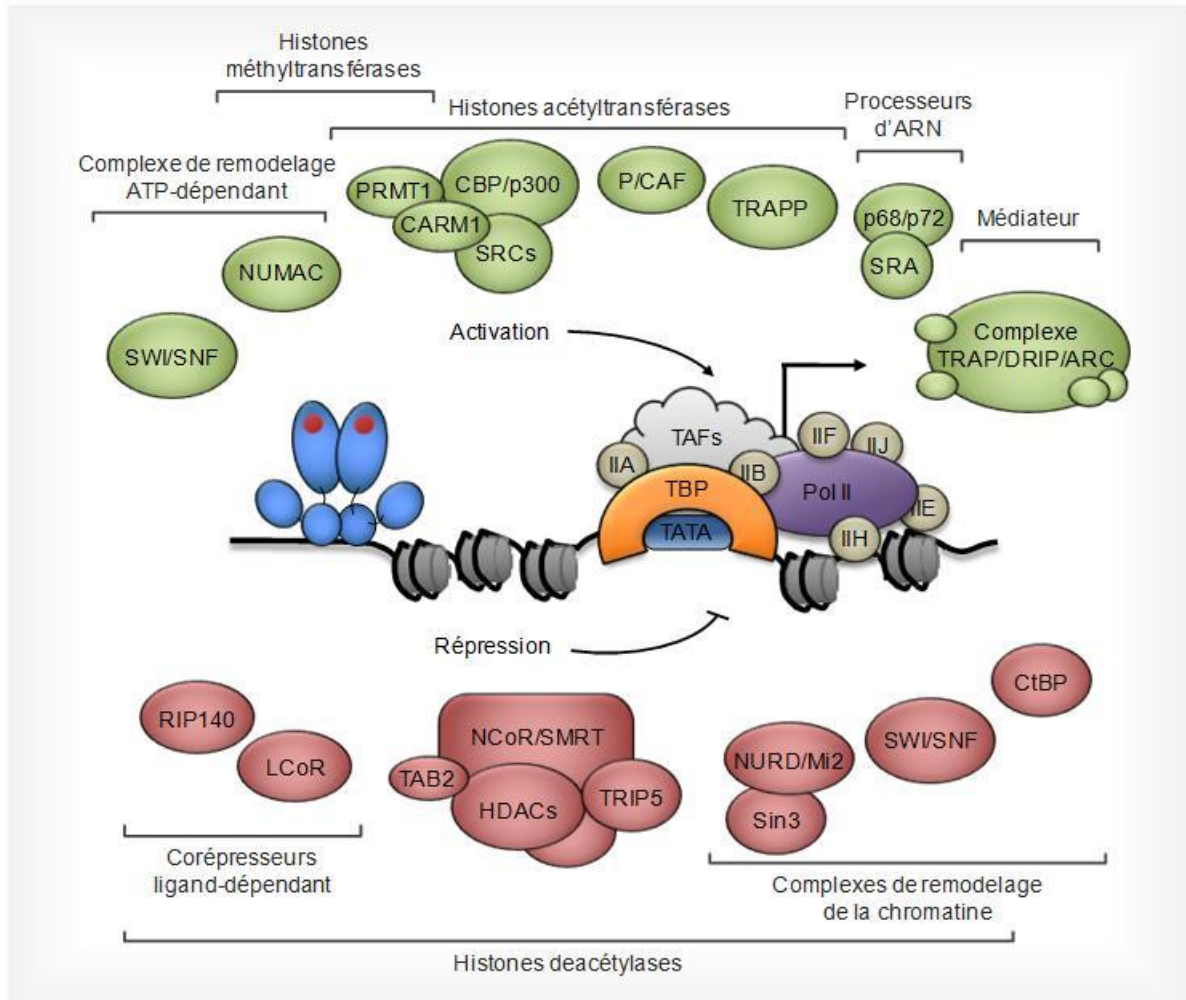
## **3 – Corégulateurs transcriptionnels**

Les corégulateurs transcriptionnels agissent principalement sous la forme de complexes protéiques regroupant des coactivateurs ou des corépresseurs (Figure 4). Leur rôle commun est d'induire le remodelage de la chromatine afin de la rendre plus ou moins

permissive à la transcription. Dans les complexes de coactivation, on retrouve entre autre des protéines qui ont la capacité de favoriser l'ouverture de la chromatine via l'acétylation (histone acétyltransférase) et la méthylation (histone méthyltransférase) des histones ainsi que des protéines qui favorisent la transcription et le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. À l'inverse des coactivateurs, les corépresseurs favorisent la condensation de la chromatine, majoritairement en induisant le recrutement d'histones déacétylases (HDACs). Les protéines N-CoR (nuclear receptor corepressor) et SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid receptors) interagissent directement avec les récepteurs et jouent un rôle clé dans le recrutement et la formation des complexes d'inhibition (47). Outre la déacétylation, des études récentes démontrent que la sumoylation des histones est également associée à l'induction d'une répression transcriptionnelle (107).

### **3.1 – Coactivateurs**

Parmi la longue liste des coactivateurs des ERs, on retrouve notamment les membres de la famille des SRCs (steroid receptor coactivator), soit SRC-1, SRC-2 (GRIP1) et SRC-3 (AIB1) (108). Importants régulateurs de l'activité de ERs, leur surexpression dans les cancers favorise la prolifération et est associée au développement d'une résistance aux antiestrogènes (109,110). Les SRCs sont en quelque sorte le cœur du complexe d'activation et leur recrutement permet d'amorcer le processus transcriptionnel (111). En effet, en plus de posséder un domaine LXXLL leur permettant d'interagir avec les ERs en présence du ligand, ils possèdent plusieurs domaines d'interaction qui favorisent le recrutement de d'autres protéines coactivatrices telles que les histones acétyltransférases p300 ou CBP, les méthyltransférases CARM1 ou PRMT1, les hélicases p72/68, la protéine SRA et des facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine, incluant le complexe SWI/SNF (111-113).



**Figure 4 : Les corégulateurs transcriptionnels**

Représentation schématique des principaux corégulateurs transcriptionnels. Vert : coactivateurs. Rouge : corépresseurs.

Également, les SRCs possèdent un domaine d'interaction situé dans leur région C-terminale qui leur permet d'interagir avec les ERs au niveau de leur domaine AF-1 (114). Par exemple, en complexe avec SRC-1, les protéines CBP, p300, TIF-2, p78/68 et SRA interagissent avec l'AF-1 de ER $\alpha$  et permet l'activation subséquente du récepteur (115-117). Chez ER $\beta$ , les protéines SRC-1, CBP et p300 peuvent lier l'AF-1 du récepteur et induire son activation (51,118,119). Également, les études démontrent que l'affinité des

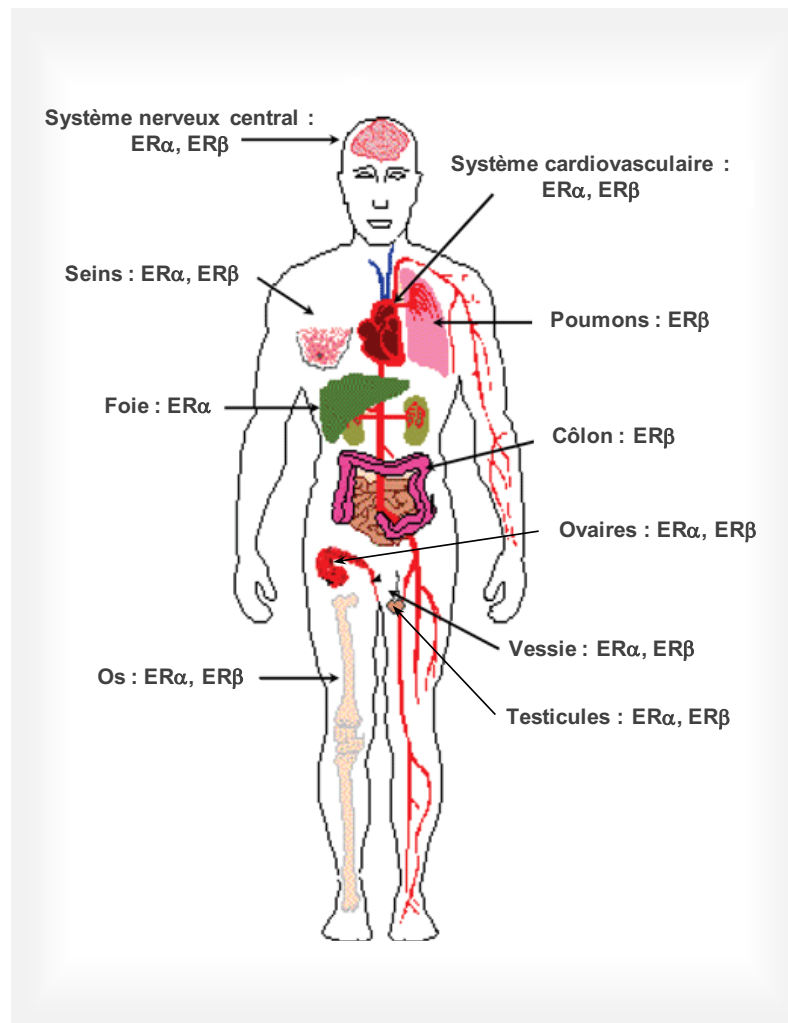
ERs envers les SRCs et/ou différents coactivateurs est différente d'un isoforme à l'autre ainsi qu'en fonction du ligand, des signaux, des modifications post-traductionnelles et de la région promotrice (44,120-124).

### **3.2 – Corépresseurs**

Les corépresseurs sont essentiels afin de modérer l'activité des ERs, de réguler adéquatement l'expression des gènes et permettre l'action des anti-estrogènes (123,125,126). Parmi les corépresseurs ciblant les ERs, les plus connus sont RIP140, N-CoR et SMRT. Ces corépresseurs possèdent un domaine LXXLL (RIP140) (127) ou un domaine similaire (N-CoR et SMRT) (128,129) qui leur permet d'entrer en compétition avec la liaison des coactivateurs. Un peu comme les SRCs, les protéines N-CoR et SMRT sont au centre des complexes corépresseurs et permettent principalement le recrutement de déacétylases, tel que les HDACs (47). Encore une fois, l'effet des corépresseurs diffère en fonction de l'isoforme, du ligand et de la région promotrice. Par exemple, SMRT et NCoR interagissent avec les ERs en présence du tamoxifène et N-CoR amplifie l'action antagoniste du tamoxifène sur ER $\alpha$  alors que pour ER $\beta$  l'action de SMRT semble primer. Contre toute attente, dans certaines conditions N-CoR et SMRT peuvent favoriser l'activation des ERs. En effet, en absence d'estrogène, N-CoR et SMRT stimule l'activité des ERs mais cet effet n'est observé que sur certaine région promotrice (123). Également, en présence d'estrogène, SMRT, et non N-CoR, est nécessaire à l'expression optimale des gènes PR, cyclinD1, et non pS2, par ER $\alpha$  en permettant le recrutement et l'activation de SRC-3 (130,131). À l'inverse, le recrutement du complexe RIP140-SMRT-HDAC3 sur ER $\alpha$  en présence d'estrogène, inhibe l'expression du gène PROS-1 (Sp-1) (132). N-CoR et SMRT peuvent également interagir avec ER $\beta$  en réponse à l'estrogène mais alors que N-CoR stimule son activité, celle de SMRT l'inhibe (123,133).

## 4 – Deux isoformes pour un même ligand ?

L'identification imprévue de ER $\beta$  a forcée la révision des concepts et des propriétés biologiques associés à la signalisation des ERs (134,135). Bien que les études *in vitro* démontrent une certaine redondance fonctionnelle entre les deux isoformes, les chercheurs ont observé une abondance et une distribution différentielle des ERs dans l'organisme qui laissaient fortement présager que les ERs soient en mesure d'exercer des fonctions distinctes (29,136,137) (Figure 5).



**Figure 5 : Distribution des ERs dans l'organisme**

Représentation des principaux organes exprimant ER $\alpha$  et/ou ER $\beta$ . Adaptation d'une illustration provenant de (140).

En effet, le niveau d'expression de ER $\alpha$  et ER $\beta$  diffère d'un organe à l'autre. Dans certains cas, le niveau d'expression des ERs peut être équivalent alors que dans d'autres cas, l'expression d'un des isoformes peut prédominer et/ou se limiter à un type cellulaire spécifique. ER $\alpha$  est préférentiellement exprimé dans l'utérus, la prostate (stroma), les ovaires (thèque), les testicules (cellules de Leydig), les os, les seins, le foie, les reins, les tissus adipeux, le cœur, la vessie, le thymus et dans certaines régions du cerveau. Quant à ER $\beta$ , on le retrouve principalement dans les ovaires (granulosa), les poumons, l'épididyme, la prostate (épithélium), le colon, la moelle osseuse, les glandes salivaires, le cerveau, l'endothélium vasculaire, la vessie, la rate, l'hypothalamus et le thymus. De plus, étant donné l'abondance des tissus et organes exprimant les récepteurs des estrogènes, ce n'est pas surprenant que l'estrogène et la dérégulation de la signalisation des ERs soit impliquée dans le développement ou la progression de plusieurs pathologies, incluant le cancer, l'ostéoporose, certaines maladies neurodégénératives et cardiovasculaires (parkinson, alzheimer, la sclérose en plaque, athérosclérose, etc.), le diabète, le lupus, l'endométriose et l'obésité (2,138,139).

#### **4.1 – Études des souris transgéniques**

Cette présomption fût confirmée par les études des souris transgéniques knockout (KO) pour ER $\alpha$  ( $\alpha$ ERKO) et/ou ER $\beta$  ( $\beta$ ERKO) qui ont permis, en plus de découvrir de nouvelles cibles de la signalisation des estrogènes, de démontrer que les ERs étaient en mesure d'exercer des fonctions spécifiques. En effet, quoique l'absence de ER $\alpha$  et/ou ER $\beta$  ne soit pas létal pour les souris et ne cause pas d'anomalies phénotypiques externes, les chercheurs ont observés chez ces souris des défauts au niveau de la formation osseuse, de la maturation des tissus reproducteurs (mâle et femelle), de la fertilité, du système cardiovasculaire, de l'angiogénèse et du comportement (141,142). Les chercheurs ont également observé que le phénotype des souris  $\beta$ ERKO est très différent de celui des souris  $\alpha$ ERKO. Par exemple, les souris  $\alpha$ ERKO des deux sexes sont infertiles alors que les souris  $\beta$ ERKO sont fertiles (143,144). Bien qu'en absence de ER $\beta$  les femelles présentent des

problèmes au niveau de la maturation des follicules ovariens qui résulte en diminution considérable de la fertilité (moins de portée et moins de naissance par portée), l'analyse de ces souris démontre clairement que ER $\alpha$  est l'acteur principal et essentiel au fonctionnement adéquat des tissus reproducteurs. ER $\beta$ , quant à lui, exerce des effets beaucoup plus importants au niveau de la prostate, du côlon, du système cardiovasculaire et du système nerveux central. Les souris  $\beta$ ERKO développent de l'hypertension, de l'anxiété et des cancers au niveau du côlon et de la prostate (145). ER $\beta$  semble aussi jouer un rôle primordial dans la migration et la survie neuronale (146,147).

## **4.2 – Profil d'expression génique : reflet des fonctions distinctes**

Récemment, des études génomiques à large spectre ont été réalisées sur les ERs (148-151). La comparaison de leur profil d'expression génique a permis de constater que bien que la majorité des gènes soient reconnus et régulés de façon similaire par les deux isoformes, les ERs sont en mesure de réguler l'expression de gènes spécifiques et parfois même entrer en compétition. Également, certains gènes ne sont reconnus que par l'hétérodimère ER $\alpha$ /ER $\beta$ . Conséquemment, le profil d'expression génique en réponse à l'estrogène sera directement influencé par le ratio d'expression des ERs. Par exemple, une étude réalisée dans des cellules de cancers du sein MCF- 7 démontre qu'en réponse à l'estrogène, parmi les 921 gènes différemment régulés par la présence ou l'absence de ER $\beta$ , ER $\beta$  interfère avec la régulation hormonale 171 gènes ciblés par ER $\alpha$  (par une amplification de l'action activatrice ou inhibitrice de ER $\alpha$  ou par un effet diamétralement opposé) et permet la régulation *de novo* de 516 gènes (151). Parmi ces gènes, plusieurs sont des joueurs clés impliqués dans le contrôle d'important processus cellulaires incluant la croissance cellulaire et la mort cellulaire, la différenciation, la mobilité, l'adhésion et la transduction des signaux. Devant l'importance de ces gènes et leur régulation différentielle par les ERs, ont comprend alors aisément pourquoi le ratio d'expression des ERs joue un rôle déterminant dans la réponse biologique engendrée par l'estrogène (152).



### 4.3 – Différences structurelles des ERs : impact sur la fonction

En comparant les séquences protéiques des deux isoformes, on constate que le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de liaison au ligand (LBD ou région E) sont les domaines qui sont le plus hautement conservés avec 95% et 60% d'homologie, respectivement (Figure 6). Le haut niveau de conservation de ces domaines et de leurs résidus laisse sous-entendre qu'il y a eu une forte pression sélective afin de maintenir ces fonctions de bases, soit l'interaction avec l'ADN et la reconnaissance du ligand, chez ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Toutefois, on remarque un très faible pourcentage d'homologie de séquence pour tous les autres domaines des ERs. Ces faibles pourcentages d'homologie laissent présagés que ces domaines soient à l'origine de différences physiopathologiques et fonctionnelles des ERs. Cette constatation est renforcée par le fait que ces régions sont le siège de différentes modifications post-traductionnelles (MPTs) et/ou du recrutement de cofacteurs transcriptionnels spécifiques (3).

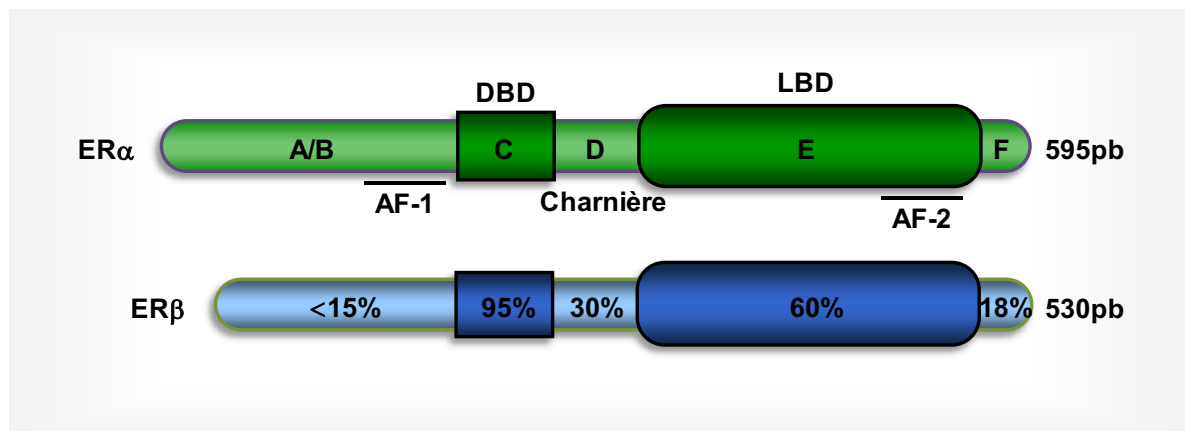


Figure 6 : Pourcentage d'homologie entre les différents domaines des ERs

### 4.3.1 – Le domaine N-terminal

Le domaine N-terminal (région A/B), qui contient le domaine d'activation 1 (AF-1), est la région la moins bien conservée entre les ERs et les études démontrent que chaque région N-terminale influence spécifiquement l'action des ERs. En plus d'être responsable de l'activation ligand-indépendante des ERs (48,51,118), ce domaine est responsable des différences d'action des ERs observées dans certains contextes en réponse à l'estrogène, aux antiestrogènes et à différentes voies de signalisation (59,62,153,154). L'effet spécifique de ces domaines peut même être transposée d'un récepteur à l'autre par la formation de chimère (155) et/ou avoir une influence dominante sur l'activité de l'hétérodimère ER $\alpha$ /ER $\beta$  (156). Au niveau de cette région, on retrouve plusieurs sérines qui sont phosphorylées en réponse à diverses voies de signalisation (41,57,157) (voir section 5.1.3). Les sites de phosphorylation présents dans l'AF-1 chez ER $\alpha$  et ER $\beta$  ne sont pas conservés entre les récepteurs et expliquent en partie que les isoformes puissent être différemment régulés par les voies de signalisation et exercer des fonctions qui leurs sont propres.

Par exemple, quoique les ERs lient de façon équivalente l'estrogène, ER $\beta$  est moins fortement activé que son homologue et ce phénomène est hautement régulé par l'AF-1. Plus précisément, la région N-terminale de ER $\alpha$  possède une activité constitutive et sa présence est essentielle à l'activation maximale du récepteur en présence d'estrogène (56,158). À l'inverse, la région N-terminale de ER $\beta$  possède une activité constitutive négligeable et sa présence limite l'activité estrogénique du récepteur (158-160). Plus récemment, une étude a démontré que l'activité répressive de la portion N-terminale de ER $\beta$  serait comprise dans les 20 premiers acides aminés (a.a.) de la région (161). L'AF-1 est également responsable de l'action inverse des ERs en réponse à l'estrogène sur la transcription des gènes AP-1 (61-63) ainsi qu'à l'effet agoniste du tamoxifène observé dans certaines conditions (voir section 6.3.1). De plus, il est maintenant connu que ER $\alpha$  et ER $\beta$  soient en mesure de réguler l'expression de gènes distincts et des études récentes suggèrent que l'AF-1 des ERs y jouerait un rôle significatif (162,163). La région N-terminale des ERs joue également un

rôle important sur l'activité des ERs en régulant leurs niveaux d'expressions protéiques (159,161,164,165).

### **4.3.2 – Le domaine de liaison à l'ADN**

Le domaine de liaison à l'ADN (DBD ou domaine C) est la région qui permet l'ancrage des ERs au niveau des EREs. En fonction des EREs avec lequel ils vont interagir, les ERs adoptent une conformation différente, ce qui résulte en un recrutement différentiel de corégulateurs (120). Il est intéressant de noter que l'analyse de la structure cristallographique des ERs a démontrée que les acides aminés du DBD impliqués dans l'interaction avec l'ADN sont parfaitement conservés (166). Malgré tout, ER $\beta$  a une plus faible affinité pour les hémi-sites des EREs que ER $\alpha$  (158,167,168). Également, quand les deux isoformes sont coexprimés, l'hétérodimère ER $\alpha$ /ER $\beta$  lie les EREs avec une affinité comparable à l'homodimère ER $\alpha$ , mais plus efficacement que l'homodimère ER $\beta$  (38,156). Ces différences sont les résultats des autres domaines des ERs qui, en modifiant la conformation des ERs en fonction des différents stimuli, vont influencer l'affinité des ERs avec l'ADN.

### **4.3.3 – La région charnière**

La région charnière (domaine D) confère une flexibilité à la structure et est importante pour la synergie d'action entre les domaines d'activation (AF-1 et AF-2) (34). Les études démontrent que cette région est le siège de différentes MPTs qui jouent un rôle important dans la régulation de l'activité des ERs. Notamment, la région charnière de ER $\alpha$  peut être modifiée par l'ubiquitination (169), la phosphorylation (170), l'acétylation (171) (172) et la sumoylation (173). Quoique les mécanismes régissant les conséquences de ces modifications sur l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  ne soient pas entièrement connus, ils impliquent pour la plupart le recrutement subséquent de cofacteurs transcriptionnels qui vont favoriser l'inhibition ou l'activation du récepteur en modulant l'activité intrinsèque du récepteur, son interaction avec l'ADN et/ou sa dégradation. La région charnière de ER $\beta$  est

également le siège d'une phosphorylation qui provoque une diminution de l'activité du récepteur en affectant le recrutement de corégulateurs et en favorisant la dégradation du récepteur (174,175).

#### **4.3.4 – Le domaine de liaison au ligand**

Comme pour les autres récepteurs nucléaires, la liaison du ligand se fait au niveau d'une cavité hydrophobe centrale au LBD. Chez les ERs, cette cavité est très flexible et beaucoup plus large que nécessaire pour accueillir l'estrogène (46). Cette propriété permet aux ERs de lier une très grande variété de ligands naturels (estrogènes, phytoestrogènes) ou chimiques (xenoestrogènes) (137,176-179). Il est intéressant de noter qu'une grande similitude est observée entre les LBD des ERs. En effet, à l'exception de deux acides nucléiques, la méthionine 336 (Met336) et l'isoleucine 373 (Ile373) présents chez ER $\beta$  et qui sont remplacés respectivement par la leucine 384 (Leu384) et la méthionine 421 (Met421) chez ER $\alpha$ , les acides aminés entourant la cavité liant l'hormone est identique pour les deux isoformes (181).

De par cette similitude, plusieurs ligands vont avoir une affinité équivalente pour les deux isoformes. Par contre, il y a quelques exceptions notamment la génistéine (phytoestrogène) qui a une affinité plus grande pour ER $\beta$  que pour ER $\alpha$  (182). De plus, la liaison d'un ligand peut résulter en une amplitude différentielle (177,183) et/ou un effet opposé entre les ERs (56,59,62,153). Ces différences sont évidemment influencées par les autres domaines des ERs et/ou des modifications post-traductionnelles survenant directement sur le DBD (41,57,61,157,180).

#### **4.3.5 – Le domaine C-terminal**

Malgré sa petite taille, il semblerait que le domaine C-terminal (région F) influence grandement plusieurs fonctions des ERs (37). Il contribue à la différence d'activité transcriptionnelle observée entre les deux isoformes (61,184), il modifie leurs interactions avec des corégulateurs (184,185) et il est requis pour l'activité antagoniste du tamoxifène

(186,187). Également, le domaine F est impliqué dans la dimérisation de ER $\alpha$  (185,188) et dans la dégradation de ER $\alpha$  et ER $\beta$  par le protéasome (161,189). De plus, la glycosylation du domaine F de ER $\alpha$  affecte négativement l'interaction du récepteur avec l'ADN (190).

En résumé, on remarque que les différences fonctionnelles majeures entre les ERs sont hautement dépendantes de l'action de leurs domaines les moins conservés, soit l'AF-1, la région charnière et le domaine F. Étant le siège de différentes modifications post-traductionnelles et/ou du recrutement de cofacteurs transcriptionnels spécifiques, ces observations soulignent l'importance de la signalisation et l'environnement intracellulaire sur l'activité différentielle des ERs.

## **5 – Régulation des ERs par les MPTs**

Les modifications post-traductionnelles (MPTs) des protéines sont un moyen efficace d'élargir et de diversifier le génome (191,192). Les MPTs sont essentielles à la survie de la cellule et sont, pour la plupart, hautement dynamiques et réversibles. Chaque protéine peut être modifiée simultanément ou consécutivement par différentes MPTs et il survient parfois une coopération ou une compétition entre diverses MPTs. Les conséquences d'une MPT varient d'une protéine à l'autre et nécessite une analyse cas par cas. En plus de moduler le fonctionnement des protéines, les MPTs assurent une connexion entre les protéines et l'environnement extracellulaire en agissant, en réponse à différents signaux déclencheurs, en tant que médiateurs et organisateurs des cascades de signalisation.

Selon une étude récente, le nombre de MPTs s'élèverait à plus de 300 (193). Parmi ces nombreuses MPTs, certaines sont connues pour réguler l'activité transcriptionnelle des ERs en influençant notamment le recrutement et l'activité des cofacteurs, leur conformation, leur stabilité, leur localisation cellulaire, leur interaction avec l'ADN et leur sensibilité au ligand (41,57). Cette liste comprend la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation, l'acétylation, la méthylation, la glycosylation et la palmitoylation. Près de 22

sites modifiés par différentes MPTs ont été identifiés sur ER $\alpha$  (41). Longtemps mis de côté par la communauté scientifique, principalement dû au fait que les outils (anticorps/cellules) permettant son étude n'étaient pas au point, notre compréhension de l'impact de ces modifications sur la régulation de ER $\beta$  n'est qu'à son commencement. Malgré tout, ER $\beta$  est de plus en plus étudié dans divers laboratoires et plusieurs évidences démontrent que les modifications post-traductionnelles jouent un rôle clé dans les différences fonctionnelles observées entre les isoformes.

Dans les sections suivantes, trois MPTs seront plus particulièrement développées, soit la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation. Les autres MPTs seront traitées en surface. De plus, afin d'alléger la thèse et de favoriser la compréhension, l'emphase sera mise sur le rôle de ces MPTs dans la régulation de ER $\beta$  et seulement quelques exemples concernant ER $\alpha$  seront cités.

## 5.1 – Phosphorylation

La phosphorylation est le mécanisme de régulation cellulaire le plus fréquemment utilisé et certainement le plus abondamment étudié. C'est un processus enzymatique hautement dynamique et réversible qui consiste en l'ajout covalent du groupement phosphate, provenant de l'adénosine triphosphate (ATP), sur un acide aminé (sérine, thréonine ou tyrosine) d'une protéine cible (194). Cette réaction est catalysée par une kinase et la déphosphorylation implique l'action d'une phosphatase (195). La famille des kinases compte 518 membres (196) et on les classe selon le résidu modifié : les sérines-thréonines kinases (plus de 400), les tyrosines kinases (~90), les tyrosines kinases-like et les kinases atypiques. Les phosphatases ont été moins étudiées que les kinases, mais leur action reste néanmoins essentiel, et on retrouve 180 exemplaires classés en 3 grands groupes (197) : sérine/thréonine phosphatase, tyrosine phosphatases et phosphatase à double spécificité.

## **5.1.1 – Rôles de la phosphorylation**

Comme toutes les autres MPTs, la phosphorylation permet l'expansion du génome. Par l'insertion d'une charge négative qui entraîne souvent chez la protéine cible un changement de conformation, la phosphorylation permet de diversifier le protéome en permettant, à partir d'une protéine, d'obtenir plusieurs fonctions différentes. En effet, ces réorganisations conformationnelles sont à la base du processus d'activation ou d'inhibition de nombreuses protéines (198). La phosphorylation agit également comme site de reconnaissance et entraîne de nouvelles interactions protéiques. Plusieurs protéines possèdent des domaines de reconnaissance des phosphoprotéines, tels que les domaines SH-2 (Src-homology) et PTB (phosphotyrosine-binding) qui reconnaissent des séquences spécifiques contenant des résidus tyrosines phosphorylées (199,200).

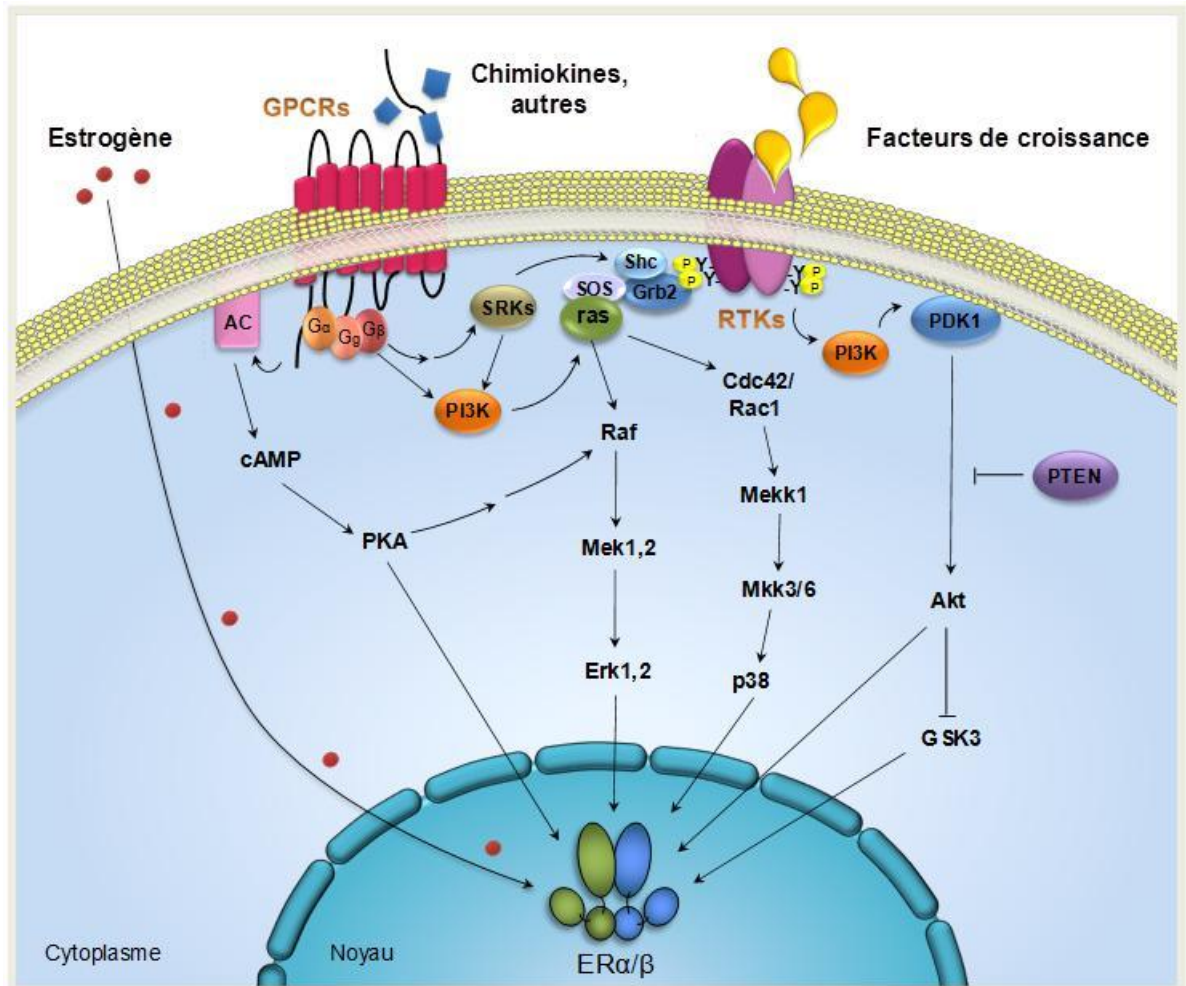
### **5.1.1.1 – La phosphorylation : médiateur des signaux cellulaires**

Ces deux rôles de la phosphorylation sont au cœur de la transduction des plusieurs signaux dans la cellule et permettent, par l'interaction et l'activation séquentielle de kinases, de propager les signaux intra et extra-nucléaires sous forme de cascades de signalisation (201-203). La régulation de ces voies de signalisation est maintenue par l'action de phosphatases. Une dérégulation d'une seule kinase ou phosphatase peut avoir des répercussions importantes sur la voie de signalisation tout entière et peut même entraîner des pathologies (204,205). Plusieurs kinases et phosphatase sont impliquées dans le cancer, des maladies métaboliques, neurologiques, musculaires et auto-immunes, et plusieurs sont ciblés par l'industrie pharmaceutique (206).

## **5.1.2 – Principales voies de signalisation régulant l'activité des ERs**

Bien que la liaison du ligand soit le premier signal d'activation des ERs, comme pour les autres récepteurs stéroïdiens, les ERs sont des phosphoprotéines et leur activité transcriptionnelle, ligand-dépendantes (AF-2) et indépendante (AF-1), sera hautement régulée par la phosphorylation. Les ERs sont phosphorylés en réponse à plusieurs kinases,

incluant entre autre les MAPKs (Erk1/2 et p38), PI3K/Akt, GSK-3, PKC et PKA (41,57). Ces kinases sont les protéines effectrices de différentes voies de signalisation pouvant être activées en réponse à plusieurs conditions intracellulaires et/ou molécules signalétiques (Figure 7).



**Figure 7 : Résumé des principales voies de signalisation ciblant les ERs**

Parmi celles-ci, l'EGF (epidermal growth factor), l'héréguline (HRG) et l'IGF (insulin-like growth factor) sont particulièrement importantes pour la régulation des ERs (48-51, 118, 154). Ces facteurs de croissances vont induire l'activation de leur récepteur



transmembranaire respectif soit : EGFR (ErbB1), ErbB2/ErbB3 et IGF-1R (207, 208). Membres de la superfamille des récepteurs tyrosines kinase, ces protéines transmembranaires possèdent un domaine de liaison au ligand extracellulaire et un domaine intracellulaire RTK (receptor tyrosine kinase) (209, 210). Leur activation par le ligand entrainera leur transphosphorylation et conséquemment l'induction de cascades de signalisation grâce aux tyrosines nouvellement phosphorylées qui vont servir de site d'encrage pour des protéines signalétiques (210, 211).

L'activité des ERs est également régulée par la signalisation de certains récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), notamment le récepteur des chimiokines CXCR4 (55, 212, 213). En fonction des protéines G couplés aux GPCRs, différentes cascades signalétiques pourront être induites grâce à l'activation/recrutement de protéines incluant l'adénylate cyclase (AC), Src, PLC $\gamma$  et PI3K (214-218). Comme les voies de signalisations régulées par les GPCRs recoupent celles activées par les RTKs, il n'est pas surprenant de voir que la signalisation de l'un influence, positivement ou négativement, celle de l'autre et/ou son activité (219, 220).

### **5.1.2.1 – Impact général de ces voies dans les cancers ER-positifs**

L'activation soutenue de EGFR et ErbB2/ErbB3 sont associés à une prolifération accrue des cancers du sein et le développement de résistance aux traitements anti-estrogéniques (14,19,221). Connus pour permettre l'activation ligand-dépendante des ERs et l'induction d'une prolifération similaire à l'estrogène mais en utilisant un programme transcriptionnel différent (démonstré pour l'EGF), ces effets ainsi que l'interconnexion entre ces récepteurs membranaires et les ERs, font partie des mécanismes impliqués dans le développement d'une telle résistance (222,223). De plus, cette résistance peut être contrée par l'inhibition des voies MAPKs ou PI3K/Akt, démontrant l'importance de ces voies sur l'activation ligand-indépendante des ERs (224). Conséquemment, la surexpression de ErbB2 dans les cancers du sein est associée avec un mauvais pronostic et dans de telles

conditions le niveau d'expression de ER $\beta$ , dont l'expression contrairement à ER $\alpha$  semble bénéfique (voir section 6), est souvent en corrélation inverse avec celui de ErbB2 (225).

IGF-1R est également souvent surexprimé dans les cancers (226) et sa surexpression est aussi associée au développement d'une résistance aux traitements endocriniens (227-230). Récemment, un groupe de recherche a démontré que l'activation de IGF-IR, par un processus p38-dépendant, augmente le ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$  en favorisant l'expression de ER $\alpha$  et en diminuant celle de ER $\beta$ , contribuant ainsi à une augmentation de la prolifération et une diminution de l'apoptose (221, 231).

Également, la surexpression de plusieurs GPCR et/ou suractivation est souvent observée dans les tumeurs, incluant les cancers du sein (232). Notamment, l'expression CXCR4, dont l'expression et le niveau de son ligand sont régulés positivement par l'estrogène et l'action des ERs (213, 233), joue un rôle majeur dans la régulation de la croissance des tumeurs et la formation de métastase (234). Ce récepteur a récemment été identifié par notre laboratoire comme étant un régulateur de l'activité ligand-dépendante et indépendante des ERs dont l'action favorise la prolifération et l'expression du ligand de CXCR4, démontrant ainsi une boucle d'autorégulation positive entre CXCR4 et les ERs dans les cancers du sein (213). Une boucle d'autorégulation positive entre les ER $\alpha$ , par son action génomique et non-génomique, et les ErbBs et IGF-IR a également été démontrée (77, 235, 236). Quant à ER $\beta$ , il réprime la voie Akt dans les cancers du sein en diminuant le niveau d'expression de ErbB2/ErbB3 et en augmentant celui de PTEN (237).

Les effecteurs de ces voies sont également d'importants régulateurs de la tumorigénèse. La voie Ras/Raf/Erk est impliquée dans la régulation de plusieurs processus cellulaires incluant la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire et l'homéostasie. L'activation constitutive ou soutenue de cette voie occasionne souvent une croissance anormale, l'induction de la tumorigénèse et est associé au développement d'une résistance aux traitements anti-estrogéniques (18,238). La voie phosphatidylinositol 3-kinase/Akt

(PI3K/Akt) est un régulateur majeur de la croissance cellulaire et son activation non-contrôlée induit l'inhibition des processus apoptotiques favorisant ainsi une prolifération aberrante, la survie, l'invasion tumorale et la résistance aux chimiothérapies (224). La kinase p38 est impliquée dans plusieurs processus biologiques incluant l'inflammation, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (239). Cette voie joue également un rôle majeur dans l'invasion et la migration des cellules épithéliales du sein (240) et tout comme pour les Erks et Akt, son activation dans les cancers du sein corrèle également avec une résistance aux anti-estrogènes (18, 241). Finalement, la surexpression de PKA dans les cancers du sein est aussi associée avec un mauvais pronostic, une augmentation de la tumorigénèse et au développement d'une résistance aux anti-estrogènes (242, 243).

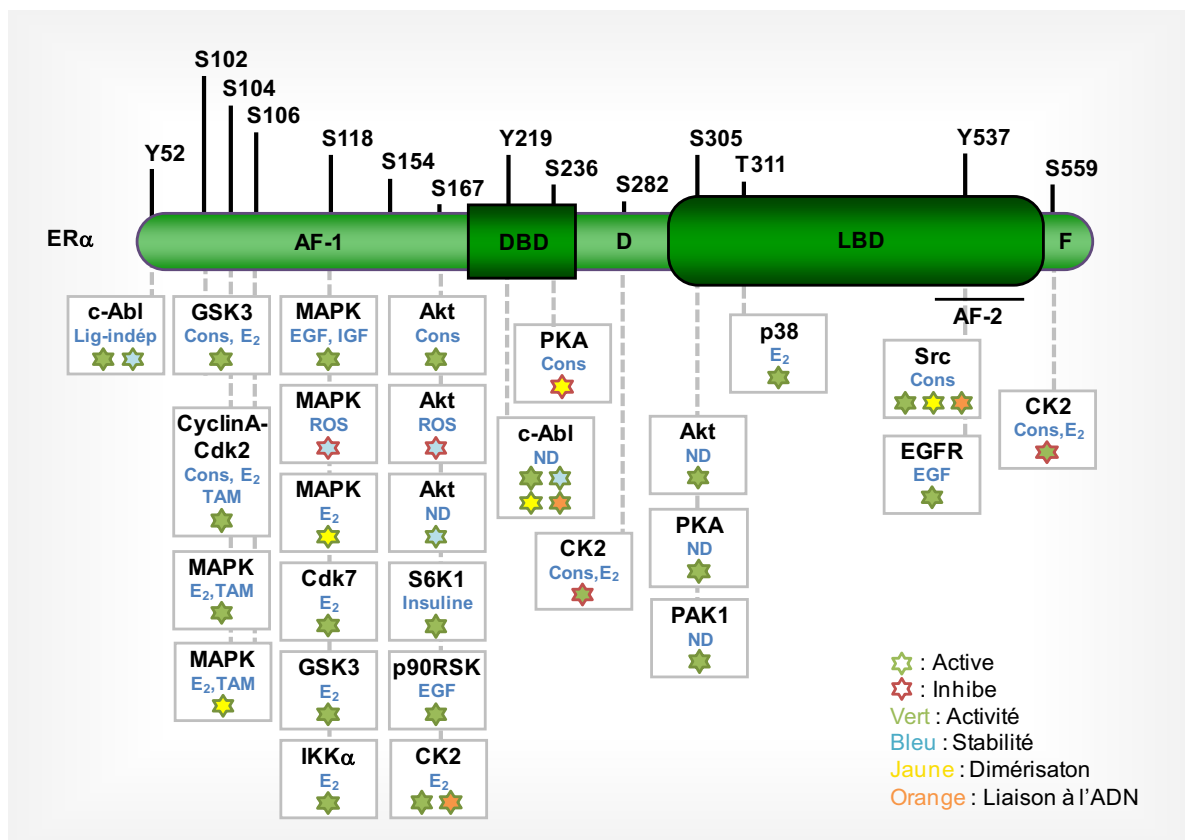
### **5.1.3 – La phosphorylation des ERs**

Tel que mentionné précédemment, les ERs sont des phosphoprotéines et leur activité transcriptionnelle ligand-dépendante et indépendante seront hautement régulées par différentes voies de signalisation impliquant la phosphorylation. Les sites de phosphorylation se retrouvent en majorité au niveau de la région N-terminale des ERs, domaine essentiel à l'activation ligand-indépendante des ERs et hautement impliqué dans les divergences d'action observées entre les isoformes (voir section 4.3.1). La plupart des sites de phosphorylation retrouvés sur les ERs sont des sérines et sont incluses dans un motif Ser/Thr-Pro (S/TP) reconnu préférentiellement par les MAPKs (mitogen-activated kinases). Outre les MAPKs, les ERs sont également phosphorylés en réponse à plusieurs autres kinases (figure 8 et 9). La phosphorylation peut réguler négativement ou positivement l'activité des ERs en influençant le pouvoir transcriptionnelle intrinsèque du récepteur, le recrutement de cofacteurs transcriptionnel, sa localisation cellulaire, sa dimérisation, sa stabilité et sa liaison à l'ADN (41,57). Les sites de phosphorylation peuvent être modifiés par plus d'une kinase et certains sites sont constitutivement phosphorylés, alors que d'autres seront phosphorylés en réponse à l'hormone et/ou seulement suite à l'activation d'une voie de signalisation spécifique. À l'exception d'un

seul (52), tous les sites de phosphorylation identifiés jusqu'à présents chez ER $\alpha$  et ER $\beta$  ne sont pas conservés entre les récepteurs et expliquent que les isoformes puissent être différemment régulés par les voies de signalisation et exercer des fonctions qui leur sont propres.

### 5.1.3.1 – Impacts sur ER $\alpha$

Le rôle de la phosphorylation sur ER $\alpha$  est étudié depuis le début des années 1980 et puisque le nombre de voies de signalisation et de kinases connus pour réguler ER $\alpha$  est imposant, cette section ne traitera que des principales. Pour les autres, leur impact général sur l'activité de ER $\alpha$  est brièvement décrit dans la figure 8.



**Figure 8 : Représentation schématique des sites de phosphorylation sur ER $\alpha$**

Une partie des références pour les différents sites de phosphorylation se trouvent dans les textes, les autres peuvent être retrouvés dans l'article de revue suivant (41)

ER $\alpha$  peut être activé en absence d'estrogène par l'action d'EGF et IGF qui, par l'action de la voie Ras-MAPK, induisent la phosphorylation (*p*) du résidu sérine 118 présent dans le domaine AF-1 du récepteur (48,50,244). Dans ces conditions, *p*S118S facilite l'interaction de ER $\alpha$  avec les coactivateurs incluant SRC-1 et CBP résultant ainsi en l'activation ligand-indépendante du récepteur (117). Également, les études démontrent que cette sérine joue un rôle majeur dans l'activité ligand-dépendante de ER $\alpha$  et que sa phosphorylation peut être induite par l'estrogène. Plusieurs kinases sont responsables de la phosphorylation estrogène-dépendante de S118, incluant MAPK (245), Cdk7 (244), IKK $\alpha$  (246), GSK-3 (247) et ERK7 (248). Également, d'autres signaux que l'estrogène et les facteurs de croissance peuvent induire *p*S118, notamment la prolactine (249) et les ROS (250). En fait, S118 est l'exemple typique de la complexité de la phosphorylation sur la régulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs puisque, en plus d'être ciblée par plusieurs kinases, les conséquences de ses dernières sont diverses (Figure 8). Dans la majorité des cas, *p*S118 favorise l'activation de ER $\alpha$  et de plus, des études démontrent qu'elle favorise l'action agoniste du tamoxifène (251).

Le lien direct entre l'EGF et la phosphorylation spécifique de ER $\alpha$  a également été démontré notamment au niveau de la sérine 167 (S167) et de la tyrosine 537 (Y537). La phosphorylation de S167 par EGF est dépendante de l'action de la kinase p90RSK et régule l'activité du domaine AF-1 (252). Cette sérine est également la cible des kinases Akt et S6K1. Les études démontrent que la phosphorylation de S167 par Akt active et stabilise le récepteur (253,254). L'induction de la phosphorylation de S167 par S6K1, kinase effectrice de la voie mTOR, active ER $\alpha$  et favorise la prolifération des cellules cancéreuses mammaires ER-positives (255). Ce même groupe démontre que la voie mTOR/S6K coopère avec la voie Ras/p90RSK pour favoriser la phosphorylation de S167 et promouvoir la prolifération (256). Lorsque combinés, ces résultats démontrent que S167 est fortement impliquée dans la prolifération ER $\alpha$ -dépendante. Il n'est donc pas surprenant de constater

que sa phosphorylation soit associée au développement d'une résistance au tamoxifène ainsi qu'à son action agoniste dans les cellules de l'endomètre (254). Quant à Y537, quoique la kinase n'ait pas été identifiée dans l'étude, sa phosphorylation induite par l'EGF promeut également la prolifération (257). Par contre, on peut supposer que ce soit par l'action de la kinase Src, puisque des études ont démontré que la phosphorylation de S167 par Src régule la liaison de ER $\alpha$  avec l'ADN, sa dimérisation et sa liaison à l'estrogène (49,258,259). Également, une mutation constitutive de Y537 en asparagine, conférant une activité constitutive à ER $\alpha$ , a été observée dans les tumeurs mammaires de certains patients (260).

Également, tel qu'observé dans la figure 9, plusieurs autres sites potentiels de l'action des facteurs de croissance, via leurs principales protéines effectrices, ont été identifiés sur ER $\alpha$ . Notamment, les sérines 104 et 106 suscitent particulièrement l'intérêt de la communauté scientifique car leur phosphorylation permet l'action agoniste du tamoxifène (251). En plus d'être phosphorylées par Erk1/2 en réponse à Ras, à l'estrogène et au tamoxifène, ces kinases peuvent être les cibles de GSK-3 et Cdk2 en réponse à l'estrogène et induire la transactivation de ER $\alpha$  (247,261). Également, l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  est augmentée par l'action de p38 et une étude démontre que la phosphorylation de la thréonine 311 est nécessaire à cette activation, puisqu'elle contrôle la localisation nucléaire de ER $\alpha$  (262).

Finalement, malgré le nombre élevé de GPCRs, encodés par près de 800 gènes, on connaît encore peu l'impact de ces récepteurs sur la régulation de ER $\alpha$ . La protéine Brx, une GEF (guanine nucleotide exchange factor) interagit et stimule l'activité de ER $\alpha$  (263). L'activation du récepteur de la mélatonine inhibe la prolifération des MCF-7 en diminuant l'activité et l'expression, protéique et ARNm, de ER $\alpha$  (212,264). Notre laboratoire a démontré que CXCR4 régule positivement l'activité ligand-dépendante et indépendante de ER $\alpha$ , et favorise la prolifération des MCF-7 mais le mécanisme moléculaire n'a pas été

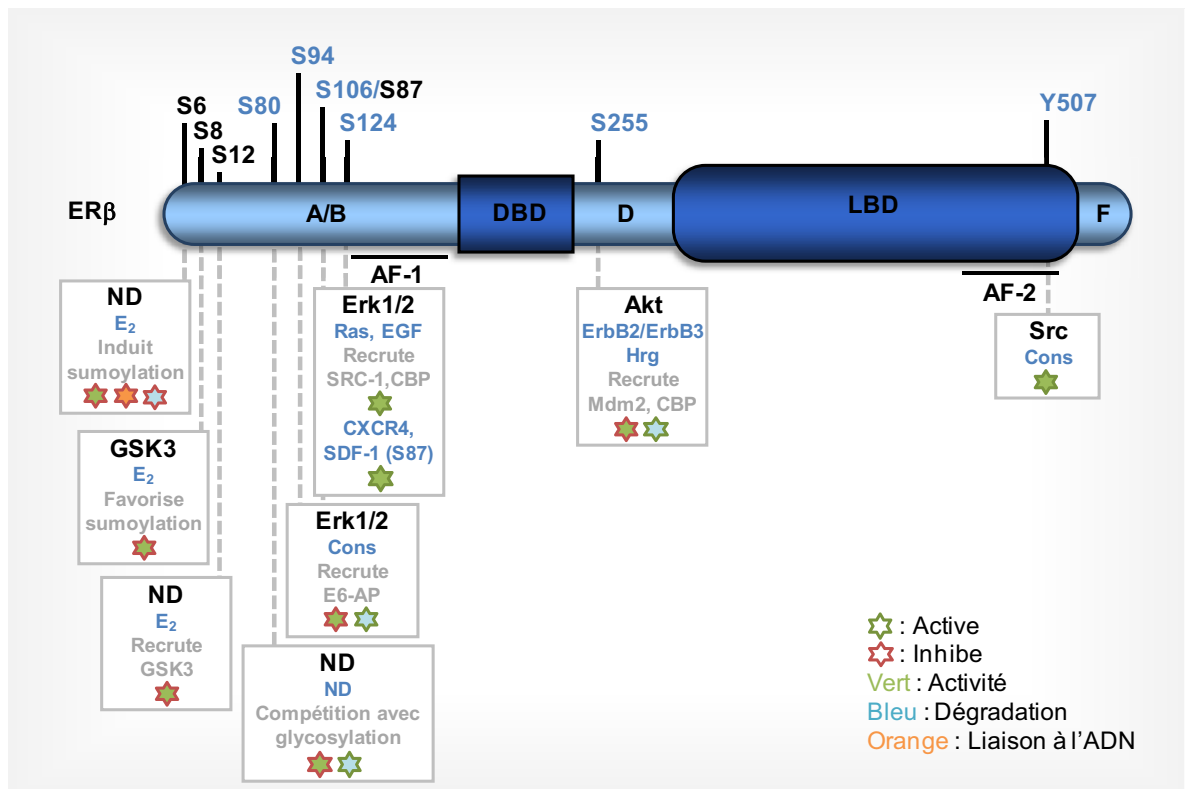
clairement identifié pour ce récepteur (213). De plus, les GPCRs sont connus pour réguler l'activité de PKA, et bien que le lien GPCR/PKA/ER $\alpha$  n'ait pas été établi, cette kinase régule l'activité de ER $\alpha$  en phosphorylant les sérines 236 et 305 (Figure 8). La phosphorylation de S236 par PKA favorise la dimérisation et l'activation de ER $\alpha$  et protège le récepteur de la dégradation par le protéasome (265, 266). La phosphorylation de S305 par PKA semble également favoriser la dimérisation de ER $\alpha$ , sa liaison à l'ADN et conséquemment son activation (267,268). De plus, la phosphorylation de S305 favorise l'action agoniste de tamoxifène sur ER $\alpha$  en induisant le recrutement de SRC-1 (243). Cette sérine peut également être la cible de Akt et cette phosphorylation est également associée au développement d'une résistance aux traitements endocriniens (170).

### **5.1.3.2 – Impacts sur ER $\beta$**

Contrairement à ER $\alpha$ , on connaît encore peu le rôle de la phosphorylation sur ER $\beta$ , mais les résultats démontrent que, tout comme pour son homologue, cette MPT joue un rôle majeur dans la régulation de l'activité transcriptionnelle du récepteur (figure 9). La majorité des sites ont été initialement identifiés chez l'isoforme murin mais puisqu'il existe une forte homologie entre cet isoforme et la version humaine de ER $\beta$ , on peut s'attendre à ce que les effets soient conservés.

L'EGF et l'oncogène Ras induisent l'activation ligand-indépendante de ER $\beta$  via l'induction des MAPKs Erk1/2 qui phosphorylent les sérines 106 et 124 favorisant ainsi le recrutement de SRC-1 et CBP au niveau du domaine AF-1 de ER $\beta$  (51,118). Les résultats de ma première publication (voir chapitre 2 section 1) démontrent que la sérine 106, en combinaison avec S94, régule l'activité, la stabilité et la mobilité intra-nucléaire de ER $\beta$  (165). La phosphorylation de ces sérines en réponse aux Erks favorise le recrutement de l'E3-ligase E6-AP, l'ubiquitination du récepteur, sa translocation vers la matrice nucléaire et sa dégradation par le protéasome. En combinaison, ces résultats démontrent que ce trio

de sérines a un impact majeur sur l'activité ligand-indépendante de ER $\beta$  en régulant le cycle transcriptionnel d'activation/dégradation de ER $\beta$  en réponse aux Erk1/2.



**Figure 9 : Représentation schématique des sites de phosphorylation sur ER $\beta$**

Les sites ont été identifiés chez la souris (bleu) et/ou chez l'humain (noir).  
Toutes les références se trouvent dans le texte.

S106 et S124 sont également impliquées dans la régulation de l'activité ligand-dépendante de ER $\beta$ . En effet, notre laboratoire a observé que ces sérines viennent contrebalancer l'effet inhibiteur de la voie ErbB2/ErbB3 sur la réponse estrogénique de ER $\beta$  en favorisant le recrutement de SRC-1 (269). Ce papier démontre également que l'activation de p38 est impliquée dans la régulation négative de ER $\beta$  par ErbB2/ErbB3 mais, bien que ce soit un effet AF-1 dépendant, la sérine cible n'a pas été identifiée.



Également, nous démontrons que cette répression s'explique aussi par l'activation de la voie PI3K/Akt par ErbB2/ErbB3 qui induit la phosphorylation de la sérine 255 présente dans la région charnière de ER $\beta$  (174,175). Plus précisément, l'activation de la voie PI3K/Akt en réponse à l'héréguline cible ER $\beta$  vers la dégradation par le protéasome en permettant la formation d'un complexe entre CBP et l'E3-ubiquitine ligase Mdm2. Ce complexe va ensuite interagir avec ER $\beta$  au niveau de S255 favorisant ainsi l'ubiquitination et la dégradation du récepteur. Chez l'isoforme humaine, on retrouve un acide aspartique (D) à la position de la sérine. Ce résultat laisse présager que cette région est continuellement négativement chargée en mimiquant l'état de phosphorylation originalement engendré par Akt chez l'isoforme murin. La mutation négative de D236 confirme que ce résidu est également impliqué dans la régulation de hER $\beta$  par ErbB2/ErbB3 via PI3K/Akt (175).

De plus, une autre étudiante du laboratoire a démontré que la sérine 87 (S106) est phosphorylée par les MAPKs en réponse à l'activation du récepteur des chimiokines CXCR4 (213). La phosphorylation de cette sérine par CXCL12/SDF-1, le ligand naturel de CXCR4 favorise l'activation du récepteur peu importe les conditions : en absence ou présence d'estrogène, sur un ERE ou un AP-1 et même en présence de tamoxifène, démontrant l'importance de cette sérine dans l'activation de ER $\beta$  et la croissance des cellules cancéreuses mammaires. De plus, l'importance de la phosphorylation S105 (S124) dans les cancers du sein a récemment été évaluée dans plusieurs lignées sensibles ou résistantes au tamoxifène (270). Cette étude démontre que la phosphorylation de S105 est associée avec un meilleur pronostic de survie et ce, même dans les lignées résistantes au tamoxifène, démontrant l'intérêt de l'utilisation de cette sérine comme marqueur de pronostic.

La sérine S80 (S60 chez l'humain) joue également un rôle important dans la régulation du niveau d'expression et de l'activité de ER $\beta$ . Cette sérine, identifiée par spectrométrie de masse, est située dans un motif PEST, région riche en proline, glutamine, sérine et thréonine, région reconnue pour être un signal de dégradation par le protéasome

(271). La phosphorylation de cette sérine résulte en une dégradation rapide de ER $\beta$  ainsi que dans l'activation du récepteur (272). Également, la phosphorylation au niveau de S80 compétitionne avec l'ajout de O-GlcNAc (glycosylation) sur la même sérine et les deux modifications occasionnent des effets totalement opposés. À l'inverse de la phosphorylation, la glycosylation de S80 stabilise ER $\beta$  et le rend moins apte à stimuler l'expression de ces gènes cibles (272).

Une telle différence entre la stabilité et l'activité de ER $\beta$  est également observée suite à la phosphorylation des sérines 6, 8 et 12. En effet, ma deuxième publication démontre que la phosphorylation de ces sérines, induit en partie par GSK-3 $\beta$ , favorise la sumoylation de ER $\beta$  et l'inhibition du récepteur en affectant négativement son interaction avec l'ADN. La sumoylation entre alors en compétition avec l'ubiquitination, sur le même site, protégeant ainsi ER $\beta$  de la dégradation (voir chapitre 2 section 2).

Finalement, tel que mentionné au début de la section, un seul résidu est conservé entre ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Il s'agit de la tyrosine 507 chez l'isoforme murin de ER $\beta$  (Y488 chez l'humain) complémentaire au résidu Y537 chez ER $\alpha$ . Tout comme pour ER $\alpha$ , la mutation de la tyrosine en asparagine confère une activité constitutive à ER $\beta$  et cet effet peut être aboli par les antiestrogènes qui provoquent une diminution de l'interaction entre les ERs et SRC-1 (52). Comme la conséquence générale de cette tyrosine sur l'activité de ER $\beta$  est conservée avec ER $\alpha$ , tout comme la tyrosine elle-même, il est fort à parier que Src soit également la kinase impliquée dans la phosphorylation de ce site chez ER $\beta$ .

Afin de conclure cette section, ces résultats combinés prouvent que les conséquences de la phosphorylation spécifique d'une sérine et/ou l'action des kinases sur l'activité des ER $\beta$ , tout comme pour ER $\alpha$ , peuvent différer en fonction du type cellulaire et/ou de l'activateur. Ce fait est également supporté par les études démontrant l'impact différentiel de la kinase p38 sur ER $\beta$ . En effet, alors que p38 active ER $\beta$  de façon ligand-dépendante en réponse au proto-oncogène Brx dans les cellules COS-7 (263), elle réprime

l'activité de ER $\beta$  dans MCF-7 en réponse à ErbB2/ErbB3 (269). Dans les mêmes cellules, suite à l'inhibition de IGF-IR, p38 module positivement l'expression de ER $\beta$  et favorise l'apoptose (221,231). Également, il ne faut pas perdre de vue que la phosphorylation peut également moduler l'activité des ERs en régulant l'activité de leurs corépresseurs transcriptionnels.

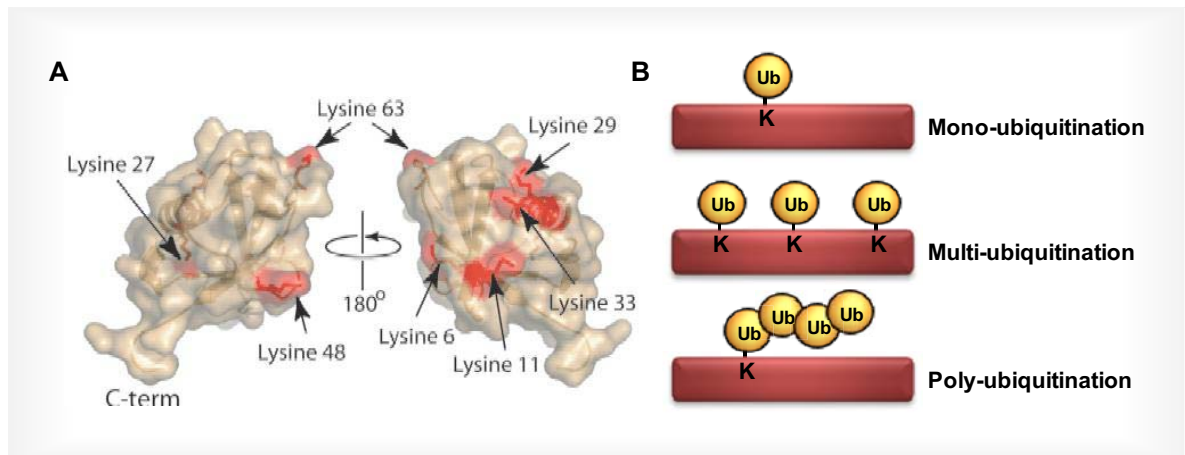
## 5.2 – L'ubiquitination

L'ubiquitination (aussi connu sous le nom d'ubiquitylation) est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'ajout d'une protéine, l'ubiquitine (Ubi), sur une ou plusieurs lysines acceptrices retrouvées chez une protéine cible. Cette modification fut découverte dans les années 1980 par les chercheurs Aaron Ciechanover, Avram Herskho et Irwin Rose (273), ce qui leur a valu l'obtention du prix Nobel de Chimie en 2004 (274). Les études des dernières années portant sur l'ubiquitination démontrent qu'elle est impliquée dans plusieurs processus cellulaires mais son rôle principal est sans conteste le recyclage protéique.

### 5.2.1 – L'ubiquitine

L'Ubi est une petite protéine de 76 acides aminés (8 kDa) ubiquitaire (d'où la provenance de son nom) et hautement conservée parmi les eucaryotes (275). Sa fonction principale est de marquer les protéines afin qu'elles soient dirigées et reconnues par un large complexe protéolytique (26S) connu sous le nom de protéasome. Le marquage d'une protéine par l'Ubi est le résultat d'une cascade enzymatique dont le résultat est la liaison covalente entre l'Ubi et une lysine cible qui peut mener à différents types de modifications, soit la mono, multi ou poly-ubiquitination (Figure 10) (276,277). La mono-ubiquitination réfère à l'addition d'une seule Ubi sur une lysine au sein d'une protéine, la multi-ubiquitination à l'addition d'Ubi sur plusieurs lysines et la poly-ubiquitination réfère en la liaison de chaîne d'ubiquitine. La poly-ubiquitination survient grâce aux 7 lysines que

possède l'Ubi et qui peuvent elles-mêmes servir de sites d'attache à une autre Ubi, permettant ainsi la formation d'une chaîne d'ubiquitine.



**Figure 10 : L'ubiquitine et les types d'ubiquitination**

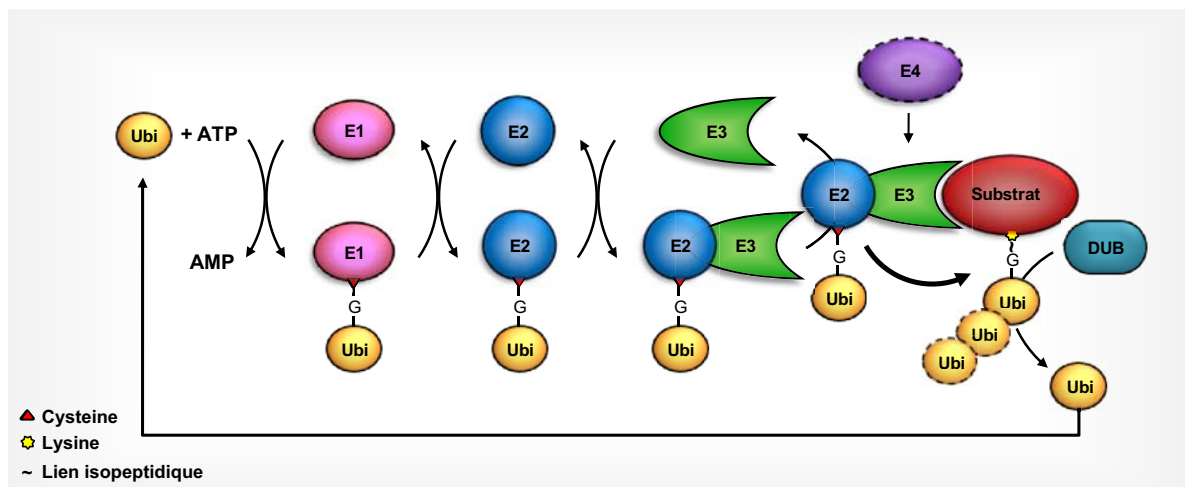
### 5.2.2 – Processus général

L'ubiquitination est un processus ATP-dépendant et réversible qui nécessite l'action de diverses enzymes incluant les enzymes d'activation (E1), de conjugaison (E2), des ligases (E3), des isopeptidases nommées déubiquitinases (DUBs) et parfois des protéines accessoires d'élongation (E4) (275,278) (figure 11).

Chez l'humain, on retrouve deux enzymes activatrices E1 impliquées dans l'ubiquitination, soit Uba1 et Uba6 (279). Uba1 est l'E1 la plus étudiée et la plus utilisée par les cellules. Elle interagit avec la majorité des E2-conjugases connues. Uba6 a très peu été étudiée mais il semblerait que la fonction de cette dernière diffère d'Uba1 puisqu'elle reconnaît différentes E2-conjugases. En présence d'ATP, une Ubi va être transférée dans le domaine catalytique de l'enzyme E1 par la formation d'un lien non-covalent entre le groupement COOH de la glycine 76 de l'Ubi et une cystéine de l'enzyme E1. Ce complexe

Ubi-E1 actif va ensuite être reconnu par l'une des 30 enzymes E2 et l'Ubi sera alors transféré sur l'E2 par une réaction de transthioylation.

Par la suite, une E3 intervient et permet le transfert de l'Ubi sur une protéine cible. Une liaison covalente entre le groupement COOH de la glycine 76 de l'Ubi et le groupement NH2 de la lysine cible est alors formée. Selon le signal et l'E3 utilisé, il y aura mono, multi ou poly-ubiquitination suite à l'addition successive d'ubiquitine sur l'ubiquitine ayant initialement été conjuguée au substrat. Le destin de la protéine cible est alors influencé par le type d'ubiquitination mais également par le type de chaîne formée qui lui dépend de la lysine de l'Ubi utilisée lors de l'élongation de la chaîne (voir section 5.2.3).



**Figure 11 : Schématisation du processus d'ubiquitination**

Schématisme de la cascade enzymatique entourant le processus d'ubiquitination. Les différentes étapes sont décrites dans le texte. Les E4-ligases (mauves) sont hachurées car quoiqu'elles favorisent grandement le processus de conjugaison, elles n'y sont pas essentielles.

Dans certaines circonstances, une protéine supplémentaire peut venir jouer le rôle de facteur d'élongation (E4) et, en combinaison avec une E3, l'action d'une E4 permet d'allonger les chaînes d'ubiquitines jusqu'à leur pleine longueur (112,278). Par exemple, initialement connues pour leur activité d'acétylation, les protéines p300 et CBP (CREB-

binding protein) s'avèrent être des régulateurs multifonctionnels puisqu'elles possèdent également une activité E4 ligase (280).

Finalement, tout comme pour la phosphorylation, l'ubiquitination est une modification réversible et le délicat équilibre entre l'ubiquitination et la déubiquitination est assuré par les DUBs (281). Certaines DUBs peuvent interagir avec les E3 ligases et même se trouver en même temps que cette dernière sur la protéine (282). La réversibilité est principalement observée dans le cas d'une ubiquitination non-liée à la dégradation. De plus, les DUBs jouent un rôle essentiel dans le recyclage d'Ubi (283). En effet, une fois ciblées vers la dégradation par le protéasome, les ubiquitines se trouvant sur les protéines marquées ne seront pas dégradées mais plutôt relarguées par des DUBs dans la cellule en vue d'être réutilisées ultérieurement.

Cette cascade enzymatique impliquant les enzymes E1, E2, E3 et isopeptidases est le mécanisme de base utilisé par toutes les autres protéines ubiquitin-like (Ubls), incluant entre autre la sumoylation, qui sera décrite plus en détail dans la section 5.3.

### **5.2.2.1 – E3 ligases**

Il existe plus de 600 gènes encodant les E3-ligases et on les sépare en trois groupes selon le type de domaine qu'elles contiennent : HECT (homologous to E6-associated protein C-terminus), RING (really interesting new gene) ou U-box (a modified RING motif without the full complement of Zn<sup>2+</sup>-binding ligands). Selon le groupe auquel elles appartiennent, elles vont permettre le transfert d'Ubi sur la protéine selon deux mécanismes. Lorsque l'E3 possède un domaine HECT, l'ubiquitine va d'abord être transférée sur une cystéine de l'enzyme elle-même avant d'être transférée sur le substrat (284). Les ligases possédant un domaine RING ou U-box vont engendrer le transfert direct de l'Ubi de l'E2 vers le substrat sans étape intermédiaire (285). Ce dernier sous-groupe est le plus répandu et bien que certaines E3 ligases de ce groupe puissent agir seules, d'autres agissent sous la forme de dimères, alors que certaines nécessitent la présence de protéines

chaperonnes ou agissent sous la forme de très large complexe multiprotéique. Un exemple de ligase pour chaque catégorie est retrouvé dans le tableau 1.

Vu la quantité énorme de protéines pouvant être utilisées pour l'ubiquitination, l'étude et la compréhension de la spécificité entre une protéine cible et son E1, E2, E3 et DUB représente un défi de taille et certains laboratoires commencent à se pencher sur le sujet (286).

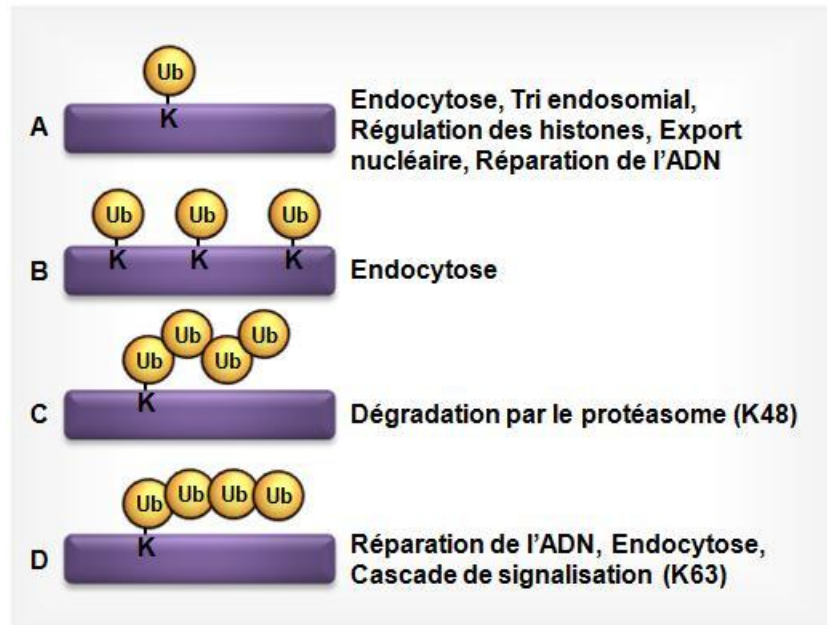
**Tableau 1 : Exemples de différents types d'ubiquitine ligases (E3)**

| Nom         | Nom complet  | Domaine  | Mode d'action                                      | Réf |
|-------------|--|----------|--|-----|
| E6-AP       | E6-associated protein  | HECT     | Agit seule   | 354 |
| Mdm2        | Murine double minute 2   | RING     | Agit seule   | 363 |
| CHIP        | C-terminus of Hsp70-interacting protein                            | U-Box    | Nécessite les protéines chaperonnes Hsp70 et Hsp90 | 602 |
| BRCA1/BARD1 | Breast cancer susceptibility gene 1 / BRCA1-associated RING domain | - / RING | Agit sous forme d'hétérodimère                     | 368 |
| APC         | Anaphase-promoting complex   | RING     | Agit sous forme d'un complexe multiprotéique       | 603 |

### 5.2.3 – Conséquences de l'ubiquitination

L'ubiquitination est reconnue comme étant principalement un signal de dégradation protéique par le protéasome 26S. Par contre, on retrouve de plus en plus d'exemples dans la littérature où l'ubiquitination est utilisée à d'autres fins, tel que l'endocytose et la transduction de signaux (287). Le type d'ubiquitination ainsi que le type de chaîne formée est le facteur déterminant du sort de la protéine ciblée et aura des répercussions importantes

sur le fonctionnement et la régulation de divers processus cellulaires incluant la réparation de l'ADN (288) et la transcription (289) (Figure12).



**Figure 12 : Conséquences de l'ubiquitination**

### 5.2.3.1 – Dégradation protéique

Les travaux du Dr. Rudolf Schoenhimer dans les années 1930 ont été les premiers qui ont permis de démontrer l'existence d'un recyclage (turnover) protéique (290). Dans ces années, le lysosome, par l'action des protéases acide-dépendante qu'il contient, était considéré comme le principal joueur impliqué dans cette dégradation protéique. Mais des études subséquentes ont permis de démontrer que, contre toute attente, la demi-vie de majorité des protéines n'étaient pas affectée par l'inhibition de l'alcalinisation des lysosomes. Tel que mentionné précédemment, il a fallu attendre 50 ans pour découvrir que la dégradation de la majorité des protéines cellulaires étaient sous le contrôle de l'ubiquitine et du protéasome 26S. Ce mécanisme de dégradation est connu sous le nom de « voie ubiquitine-protéasome ».



### 5.2.3.1.1 – Voie ubiquitine-protéasome

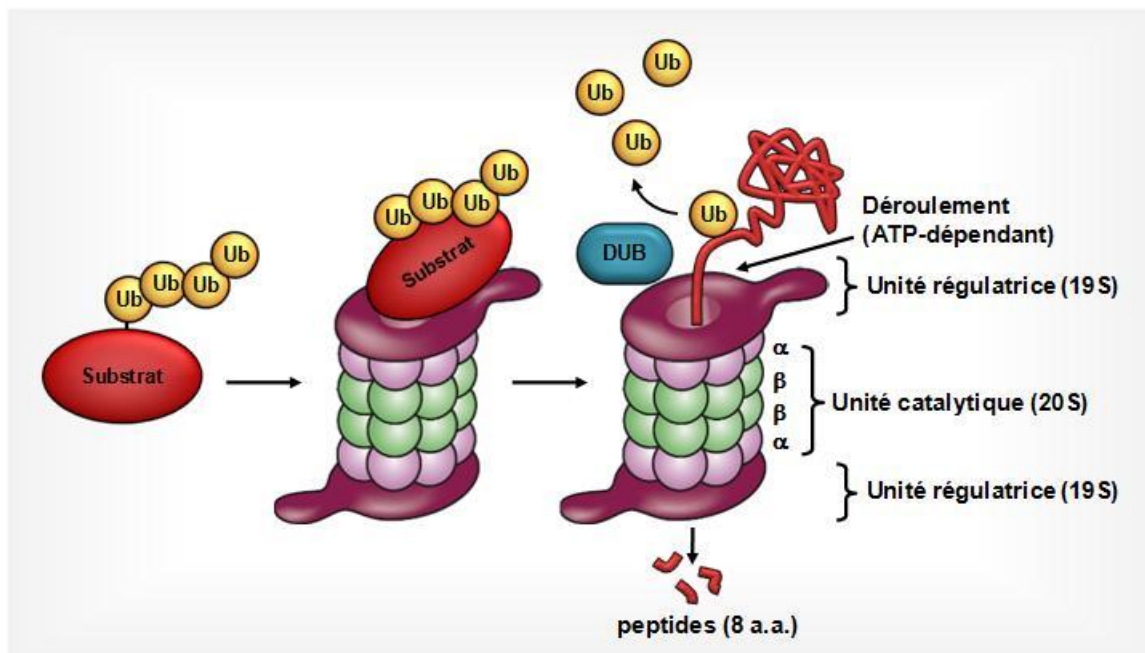
La voie ubiquitine-protéasome se divise en deux étapes. Premièrement, le substrat protéique, afin d'être reconnu par le protéasome, doit subir une polyubiquitination. Les études antérieures suggéraient que la chaîne d'Ubi nécessaire à cette reconnaissance devait être exclusivement de type K48, c'est-à-dire que les Ubi de la chaîne devaient être reliées entre elles par la lysine (K) 48 de l'Ubi voisine, et que cette dernière devait être composée d'au moins 4 molécules d'Ubi. Par contre, des études récentes démontrent que le protéasome accepte également d'autres types de chaînes (291,292). En effet, l'inhibition du protéasome ne provoque pas exclusivement l'accumulation de chaîne-K48, mais qu'elle induit également l'accumulation de tous les autres types de chaînes excepté les chaînes-K63. De plus, une étude plus concrète démontre que la formation de chaînes-K11 est nécessaire aux processus de dégradation impliqués dans la division cellulaire (293).

Les chaînes de poly-ubiquitines sont alors reconnues par des protéines possédant des domaines de liaison, soit les polyubiquitin-binding domains (UBDs). Certaines de ces protéines font partie intégrante du protéasome (294,295) alors que d'autres se retrouvent dans des complexes protéiques mobiles qui ont pour but de transporter les protéines jusqu'au protéasome (296,297).

L'étape suivante est la dégradation de la protéine marquée par le protéasome 26S et le démantèlement de la chaîne d'Ubi par les DUBs afin de maintenir un réservoir constant d'Ubi libres et prêtes à être utilisées par la cellule (Figure 13).

Le protéasome 26S est un large complexe multiprotéique qui dégrade les protéines en peptides et on le retrouve principalement près de l'enveloppe nucléaire, du réticulum endoplasmique et dans les corps nucléaires (299,300). Le protéasome est essentiellement composée de deux sous-unités régulatrices 19S entourant, à l'apex et à la base, la sous unité catalytique 20S (275). Les protéines qui composent les sous-unités 19S et celles qui y sont associées (ex : DUBs), permettent de reconnaître directement les protéines ubiquitinylées et d'induire leur déubiquitination, respectivement (301). De plus, le complexe 19S, grâce à

son activité ATP-dépendante, permet de déplier le substrat protéique et de le faire entrer dans la partie centrale du tunnel formé par la sous-unité 20S, qui elle est composée de quatre étages de 7 unités protéiques disposées en cercle (302). Les deux étages externes sont formées exclusivement d'unités  $\alpha$ , qui servent de « gardiens » alors que les deux étages internes, responsables du clivage protéique, sont formés d'une succession d'unités  $\beta 5$  (activité chymotrypsique),  $\beta 3$  (activité trypsique) et  $\beta 1$  (activité peptidyl-hydrolase). Le corps catalytique 20S est auto-suffisant (303).



**Figure 13 : Schématisation du mode d'action du protéasome 26S**

*Illustration inspirée de (298).*

#### 5.2.3.1.1.1 – Signaux ciblant les protéines vers le protéasome

Une question majeure persiste en ce qui concerne la voie ubiquitine-protéasome. En partant du fait que le nombre d'enzyme et/ou de combinaison d'enzyme possible pouvant être utilisé est énorme, comment la spécificité et sélectivité de cette voie est-elle atteinte ? Il est clair que le type de poly-ubiquitination, en particulier les chaînes K48, joue un rôle important, mais comment est-ce que les protéines sont choisies, quel est le signal ? En fait,

il n'existe pas de réponse exacte, ni de patron d'action commun, outre le fait que la reconnaissance spécifique du substrat par une E3 est un pré requis à l'ubiquitination (275). Les possibilités sont grandes. Le substrat peut être reconnu via son extrémité NH<sub>2</sub>-terminale (N-end rule pathway) (304), par la présence d'une séquence PEST (séquence riche en proline (P), acide glutamique (D), acide aspartique (E), sérine (S) et thréonine (T)) (305,306), suite à sa phosphorylation et/ou à la phosphorylation de la E3 ligase (307,308), par la présence de protéines auxiliaires (309,310) ou en présence d'un substrat muté, anormal ou mal replié (311,312). De plus, récemment, une nouvelle classe d'E3-ligase les STUbLs (Sumo-Targeted Ubiquitin Ligase) incluant notamment la protéine RNF4, a été identifiée et elles reconnaissent spécifiquement, par leur motif SIMs, les protéines sumoylées (414,448). La sumoylation est décrite dans la section 6.3. Également, il est difficile de prédire quelle lysine du substrat subira l'ubiquitination. Les difficultés liées à cette identification proviennent du fait qu'il n'existe aucune séquence propre à l'ubiquitination, que plus d'une lysine peut être ciblée et que la ou les lysines peuvent être reconnues par plus d'une E3- ligases (202,275).

#### **5.2.3.1.1.2 – Outils permettant l'étude de la voie ubiquitine-protéasome**

Il reste donc beaucoup de mystères entourant le fonctionnement de la voie ubiquitine-protéasome, mais la communauté scientifique possède quelques outils précieux qui aident à l'étude de ce processus cellulaire complexe. En laboratoire, les chercheurs utilisent des inhibiteurs du protéasome, principalement le MG132 et la lactacystine (314,315). Leur utilisation permet d'identifier rapidement les protéines cibles et d'en étudier leur demi-vie, leur niveau/type d'ubiquitination ainsi que leur mode d'action et de régulation, permettant alors de mieux comprendre l'impact cellulaire qui en découle.

#### **5.2.3.1.1.3 – Impacts physiologiques et pathologiques de la voie**

La dégradation protéique induite par la voie ubiquitine-protéasome joue un rôle important, voir essentiel, dans la régulation de nombreux processus cellulaires. Parmi ceux-

ci, on retrouve la croissance, la différenciation, le développement et la mort cellulaire (316,317), la réponse au stress (318), la réponse immunitaire et inflammatoire (319,320), la mémoire (321), le rythme circadien (322), la modulation des récepteurs et des pores membranaires (323,324), la réparation de l'ADN (325) et la transcription (289).

On constate donc que la voie ubiquitine-protéasome est un joueur clé du contrôle cellulaire. Il n'est donc pas surprenant qu'une aberration du système soit impliquée, directement ou indirectement, dans la pathogénèse de diverses maladies (cancer, dystrophie musculaire, inflammation, certaines maladies auto-immunes, etc) et que l'inhibition de cette voie représente une cible thérapeutique de choix (326-328). C'est déjà le cas du cancer; depuis 2003, la FDA (food and drugs administration) approuve l'utilisation chez les humains du bortezomib, un inhibiteur du protéasome, dans le traitement de différents types de cancers (329). D'autres inhibiteurs du protéasome potentiels pour le traitement de diverses maladies humaines sont également à l'étude dans différents groupes de recherche, tel que des inhibiteurs naturels incluant, entre autres, la glucosamine (330,331).

### **5.2.3.2 – Endocytose**

L'endocytose des récepteurs présents à la surface de la cellule est un processus qui permet de réguler l'activité de ces récepteurs en contrôlant l'accès à leur ligand. Une fois internalisés, les récepteurs peuvent être retournés à la membrane en vue d'une seconde activation ou être dégradés par le lysosome suite à la fusion de ce dernier avec l'endosome. De nombreux exemples de récepteurs membranaires tel que le récepteur EGFR (epidermal growth factor receptor) sont internalisés suite à leur mono, multi-ubiquitination ou poly-ubiquitination-K63 (332). Dans de nombreux cas, ces types d'ubiquitination agissent comme signal d'internalisation en vue d'une dégradation par le lysosome (333,334). De plus, plusieurs protéines adaptatrices impliquées dans l'endocytose possèdent des UBDs (ubiquitin binding domains) et leur activité est, dans la majorité des cas, régulée par leur propre mono-ubiquitination, démontrant l'importance de l'ubiquitination dans le processus d'endocytose (332).

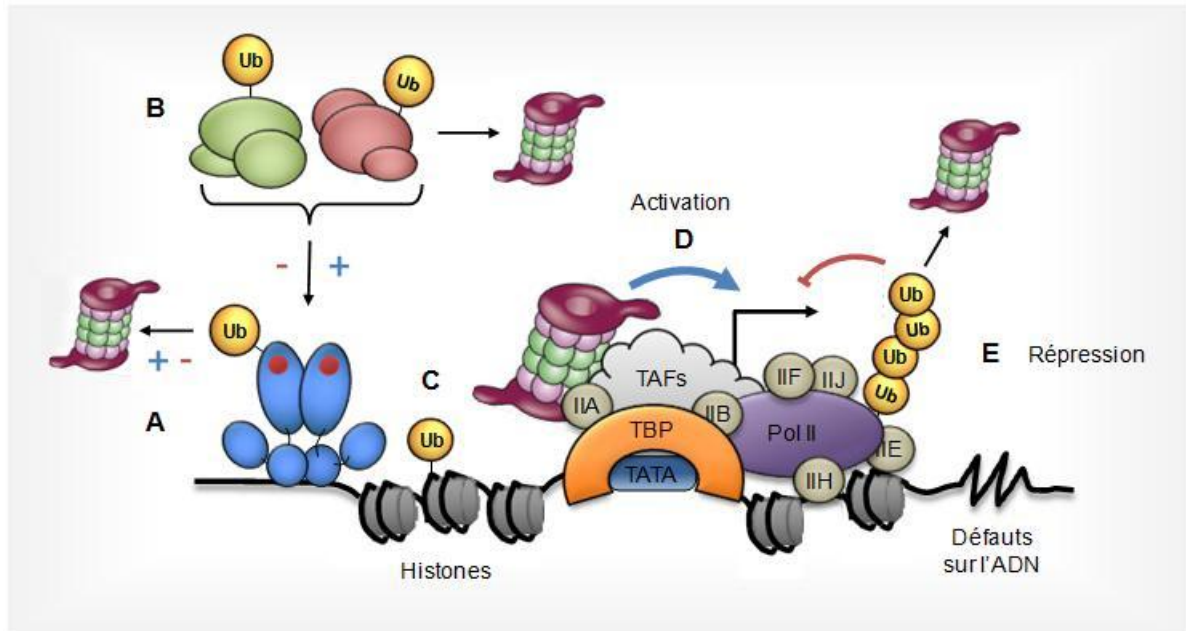
Également, il semblerait que l'ubiquitine soit un dénominateur commun pour la dégradation, car en plus de la dégradation suite à l'endocytose ou par le protéasome, des études récentes démontrent que l'ubiquitine, plus particulièrement la poly-ubiquitination K63 et K27, joue un rôle essentiel dans l'autophagie des mitochondries (336,605).

### **5.2.3.3 – Transduction de signaux**

L'intégration des signaux extracellulaires est possible grâce à différentes cascades de signalisation. L'ubiquitination influence, positivement ou négativement, de nombreuses voies de signalisation incluant la voie NF- $\kappa$ B, Wnt, MAPK, etc (319,337,338). L'ubiquitine peut influencer la voie en induisant la dégradation et/ou l'endocytose du récepteur membranaire, mais également en modulant l'activité, la demi-vie et l'interaction des protéines de la cascade. En particulier, la poly-ubiquitination K63 est utilisée par plusieurs voies de signalisation afin de promouvoir la reconnaissance et l'interaction protéique.

### **5.2.4 – Régulation de la transcription par la voie ubiquitine-protéasome**

La régulation de la transcription implique une synchronisation entre le recrutement, l'interaction et ultimement le retrait de plusieurs protéines et complexes sur l'ADN. Bien que la transcription soit un sujet abondamment étudié, il n'est pas encore clair comment la cellule réussit à initier, maintenir et arrêter cette tâche. La première preuve que l'ubiquitine pouvait être impliquée dans ce processus remonte à 1992 et depuis ce rôle est largement confirmé par les études qui démontrent que l'ubiquitine régule les facteurs de transcription, les cofacteurs, la chromatine, l'initiation, l'élongation et la terminaison (289,339) (Figure 14).



**Figure 14: Régulation de la transcription par la voie ubiquitine-protéasome**

Schématisme des différents modes d'action de l'ubiquitine sur la transcription. L'activité des facteurs des récepteurs nucléaires sera modulée par sa propre ubiquitination (A), celle des ses corégulateurs (B), celle des histones (D), par la liaison et/ou l'ubiquitination de la machinerie transcriptionnelle par le protéasome (D) et (E), respectivement.

Illustration inspirée de (339)

### 5.2.4.1 – Action sur la chromatine et la machinerie transcriptionnelle

La structure de la chromatine est hautement régulée par de nombreuses modifications post-traductionnelles, incluant l'ubiquitination. À ce jour, les histones H2A, H2B, H3 et H4 ont été identifiées comme cible de l'ubiquitination (340). Bien que les rôles de cette modification sur la structure et la fonction de la chromatine soient encore méconnus, l'ubiquitination des histones semble favoriser dans certains cas l'initiation, l'élongation ou la condensation de la chromatine. Les chercheurs ont également remarqué que le retrait de l'ubiquitine sur l'histone H2B est nécessaire à la progression de la transcription et que certaines ATPases de la sous-unité 19S du protéasome sont présentes sur la chromatine et nécessaires au processus d'élongation (341). Entre autres, on y retrouve SUG1 qui joue un rôle important dans la détection des défauts sur l'ADN durant l'élongation (342). En fait, la présence du complexe 19S est favorable à l'élongation et ce

processus est indépendant de la présence de la sous-unité catalytique 20S, démontrant que l'action non-protéolytique de l'ubiquitine joue un rôle important dans la régulation de la transcription (343,344). Par contre, en cas de défauts majeurs sur l'ADN, la dégradation s'avère essentielle et l'ARN polymérase II est ubiquitinylée et dégradée par le protéasome afin de permettre le recrutement de la machinerie de réparation (345).

#### **5.2.4.2 – Action sur les récepteurs nucléaires et leurs cofacteurs**

Pour la majorité des récepteurs nucléaires, excluant le récepteur des glucocorticoïdes (GR), il existe une corrélation positive entre le pouvoir d'activation du récepteur et sa dégradation par le protéasome 26S (346,347). En effet, l'inhibition du protéasome par le MG132 stabilise ces récepteurs mais, malgré l'augmentation du nombre de récepteurs dans la cellule, une inhibition de la transcription est observée. À l'inverse, lorsque ces récepteurs sont activés, leur concentration cellulaire diminue. Les récepteurs doivent donc être en mesure d'être dégradés afin de permettre une transcription optimale et on parle alors de « transactivation protéasome-dépendante ».

Les raisons derrière un tel phénomène sont encore ambiguës, mais les chercheurs suggèrent que la dégradation joue un rôle essentiel dans le recrutement périodique de cofacteurs transcriptionnels (ex : cofacteur B ne peut venir se lier au récepteur si le cofacteur A est toujours présent) et/ou que le retrait du complexe récepteur/cofacteur est nécessaire pour que la transcription continue. Également, l'inhibition de la transcription malgré l'abondance des récepteurs s'explique par le fait qu'une grande proportion d'entre eux se trouvent emprisonnés dans la matrice nucléaire (348,349). La matrice nucléaire est un domaine nucléaire connu pour être transcriptionnellement inactif (350,351). La présence de récepteurs immobilisés dans la matrice peut être observée par la technique de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) (165,352).

L'ubiquitination régule également le niveau de transcription des récepteurs nucléaires en modulant l'abondance et/ou l'activité des cofacteurs transcriptionnels (347). Également, plusieurs cofacteurs transcriptionnels possèdent des activités E2, E3 ou E4. On

peut penser entre autre à UBCH7 et E6-AP, une E2 conjugase et une E3 ligase, respectivement, qui agissent aussi comme coactivateur transcriptionnel pour plusieurs récepteurs nucléaires, ou aux acétyltransférases p300 et CBP qui possèdent également une activité E4 ligase (280,353,354).

### **5.2.4.3 – Impact sur la régulation des ERs**

La voie ubiquitine-protéasome est un processus essentiel pour l'activité hormono-dépendante et indépendante de ER $\alpha$  et ER $\beta$  (161,165,189,355-357). Les études démontrent que le recyclage constant des ERs par le protéasome est nécessaire afin d'optimiser (transactivation protéasome-dépendante) ou limiter leur réponse en fonction des stimuli et/ou de la concentration d'estrogène. Par exemple, en présence d'estrogène, la sous-unité SUG1 du complexe 19S du protéasome est impliquée dans le processus puisqu'elle interagit de manière ligand-dépendante avec les ERs et induit leur dégradation lorsque surexprimée (358). En absence d'estrogène, le domaine F de ER $\beta$  semble protéger ce dernier de la dégradation en empêchant la liaison de ER $\beta$  avec le protéasome par le biais de SUG1 (161).

De plus, tel qu'observé pour ER $\alpha$ , l'activation hormonale optimale de ER $\beta$  est dépendante de l'action du protéasome puisque son inhibition par le MG132 provoque la répression de l'activité transcriptionnelle estrogène-dépendante de ER $\beta$  (161,165). Quoique plusieurs E3 ligases, notamment CHIP, E6AP, et Mdm2, semblent jouer un rôle déterminant dans la régulation de l'activité de ER $\beta$  par la voie ubiquitine-protéasome, les protéines impliquées dans cette transactivation protéasome-dépendante n'ont toujours pas été identifiées.

CHIP à un effet protecteur sur le développement de cancer du sein car l'inhibition de son expression résulte en un développement rapide de tumeurs chez la souris (602). Son rôle de suppresseur de tumeurs vient de sa capacité à induire l'inhibition de plusieurs voies oncogéniques en régulant négativement les niveaux d'expression des protéines. CHIP



interagit avec ER $\beta$  de manière ligand-dépendante ou indépendante et il favorise préférentiellement l'ubiquitination et la dégradation des ER $\beta$  actifs (161). Sa présence réprime l'activité transcriptionnelle du récepteur et, ensemble, ces résultats démontrent que CHIP n'est pas impliqué dans la transactivation protéasome-dépendante de ER $\beta$  mais suggèrent plutôt que son rôle est de promouvoir l'arrêt de la transcription. CHIP interagit également avec ER $\alpha$  mais il est impliqué exclusivement dans la régulation du niveau d'expression basal de ER $\alpha$  puisqu'il interagit et ubiquitine ER $\alpha$  seulement lorsqu'aucun ligand n'est présent sur ce dernier et préférentiellement lorsqu'il est mal replié (189).

L'E3 ligase E6-AP possède une double fonction et il agit également comme coactivateur transcriptionnelle pour plusieurs récepteurs nucléaires, indépendamment de son activité E3-ligase (359). E6-AP augmente l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  et est recrutée suite à la phosphorylation de la sérine 118 du récepteur (164). Sa présence favorise la transcription en stabilisant l'interaction entre ER $\alpha$  et p300, et le retrait de l'expression de E6-AP résulte en une diminution de l'expression des gènes ER-dépendant (360). Également, la surexpression d'un mutant de E6-AP n'ayant plus d'activité E3-ligase induit la tumorigenèse mammaires chez les souris (361). Par contre, dans les mêmes conditions, la surexpression de E6-AP de type sauvage n'induit pas tumeurs. Également le niveau d'expression de E6-AP et ER $\alpha$  sont inversement corrélé dans les cancers du sein et de la prostate (361,362). Ces résultats démontrent l'importance de la double fonction de E6-AP sur la régulation de ER $\alpha$ . L'activité estrogénique de ER $\beta$  est également positivement régulée par la présence de E6-AP (résultats non-publiés) mais contrairement à ER $\alpha$ , cette activation n'est observée qu'en condition de forte surexpression. En absence d'estrogène, l'activité E3 ligase de E6-AP prime sur son activité coactivatrice, puisqu'aucune activation n'est observée en absence de ligand et sa surexpression réprime l'activité Erk-dépendante de ER $\beta$ . En effet, mes résultats démontrent que le recrutement de E6-AP au niveau de l'AF-1 de ER $\beta$  en réponse aux kinases Erk, induit la dégradation du récepteur et favorise l'arrêt de la transcription (voir chapitre 2 section 1) (165).

L'E3 ligase Mdm2, induit la mono ou poly-ubiquitination de nombreux substrats (363). Sa surexpression, observée dans près de 10% des tumeurs, est néfaste puisqu'en tant que principale E3-ligase du gène suppresseur de tumeur p53, sa surexpression est associée à une diminution du niveau d'expression de cette protéine (364). Les études du Dr Sanchez démontrent que Mdm2, en coopération avec CBP qui agirait comme E4-ligase, est impliquée dans la dégradation et l'inhibition concomitante de ER $\beta$  en réponse à l'activation de la voie PI3K/Akt par ErbB2/ErbB3 (175). Ces résultats expliquent l'inhibition transcriptionnelle de ER $\beta$  observée dans un tel contexte (174). Mdm2 interagit également avec ER $\alpha$  en présence ou en absence d'estrogène. La présence de Mdm2 active ER $\alpha$  et certaines expériences laissent présager que cet effet est dépendant de l'activité E3 ligase de Mdm2 et implique la dégradation par le protéasome (365-366). Également Mdm2 est souvent surexprimé dans les cancers ER-positifs et une étude récente démontre que son niveau d'expression est positivement régulé par ER $\alpha$  en réponse à l'estrogène (367), démontrant ainsi une boucle d'autorégulation positive entre ER $\alpha$  et Mdm2 favorable à la tumorigenèse.

Même si aucune étude n'a encore démontrée la régulation de ER $\beta$  par BRCA1/BARD1, on ne peut passer sous silence son rôle dans les cancers gynécologiques. BRCA1 est un gène suppresseur de tumeur et est impliqué dans plusieurs processus biologiques incluant la prolifération, la transcription, le cycle cellulaire, l'ubiquitination et la réparation de l'ADN (368,369). Son absence prédispose fortement les femmes à développer des cancers du sein et des ovaires (370,371) et sa mutation est responsable de 40-45% des cancers du sein héréditaires (372). C'est en complexe avec BARD1 (BRCA1-associated RING domain) que BRCA1 agit comme E3 ligase (373). Sa présence régule négativement la transcription des gènes pro-tumorigéniques, incluant des gènes ER-dépendants (374). En plus d'induire la mono-ubiquitination de ER $\alpha$ , BRCA1 favorise également la dégradation et l'inhibition du récepteur (313,375-377). Par un mécanisme de rétrocontrôle, ER $\alpha$  régule le niveau d'expression de BRCA1 en présence d'estrogène via la

voie non-classique (378) et ER $\beta$  pourrait être également impliqué dans cette régulation puisque les tumeurs associées à BRCA1 expriment un niveau de ER $\beta$  significativement plus élevé que ER $\alpha$  (379).

Finalement, malgré les nombreuses études entourant la régulation des ERs par l'ubiquitination et la voie ubiquitine protéasome, peu de sites d'ubiquitination ont été identifiés. Mes expériences ont permis l'identification d'un site de poly-ubiquitination sur ER $\beta$ , soit la lysine 4 (voir chapitre 3 section 3.1) mais l'E3 ligase impliquée n'a pas été identifié. Les lysines 302 et 303 de ER $\alpha$  ont été identifiées comme des sites de mono-ubiquitination (par BRCA1/BARD1) et de poly-ubiquitination (169,313,377). De plus, tel que démontré dans ces études, ces lysines sont également le siège de plusieurs MPTs (acétylation, sumoylation et méthylation) et certaines, en entrant en compétition avec l'ubi protègent ER $\alpha$  de la dégradation, alors que d'autres favorise l'ubiquitination et la dégradation subséquente du récepteur. Ces résultats sont un bon exemple de la complexité des interrelations entre les MPTs et soulignent l'importance de la dégradation et de la signalisation cellulaire dans la régulation des ERs.

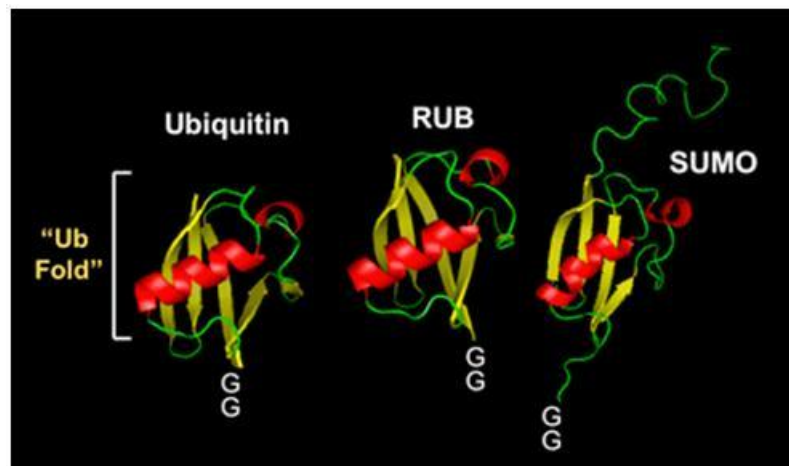
### **5.3 – La sumoylation**

La sumoylation est une modification post-traductionnelle hautement dynamique qui consiste en la liaison covalente d'une petite protéine SUMO (Small Ubiquitin-related MOdifier) sur une protéine cible. Seulement une faible proportion de la protéine cible, souvent moins de 1%, est sumoylée, rendant les investigations laborieuses (380). Malgré ce fait, de nombreux substrats nucléaires, cytoplasmiques et membranaires ont été identifiés depuis sa découverte au milieu des années 1990. Depuis, la sumoylation est reconnue comme étant un processus majeur impliqué dans la régulation de plusieurs fonctions biologiques autant chez les mammifères (381), les levures (382, 383) que les plantes (384).

### 5.3.1 – SUMO-1,2,3 et 4 : membres de la grande famille des Ubls

Chez l'humain, on retrouve quatre isoformes de SUMO soit ; SUMO-1 (aussi nommé Smt3c, PIC1, GMP1, sentrin et Ubl1), SUMO-2 (Smt3b), SUMO-3 (Smt3a) et SUMO-4. Les protéines SUMO-2 et 3 sont identiques à 95% alors que SUMO-1 et SUMO-4 ne possèdent que 50% et 86 % d'homologie, respectivement, avec ces dernières (385, 386). On retrouve les isoformes 1, 2 et 3 dans la majorité des tissus, alors que l'expression de SUMO-4 se limite qu'à un nombre restreint d'organes tels que le rein, les ganglions lymphatiques et la rate (386, 387).

Malgré ces différences, ce sont toutes de petites protéines d'environ 11kDa qui font partie de la famille des protéines ubiquitine-like (Ubl). Les membres de la famille des Ubls se caractérisent par le fait qu'ils possèdent tous un repliement semblable à celui de l'ubiquitine, c'est à dire le repliement  $\beta$ -grasp aussi connu sous le nom d'« ubiquitin fold » (Figure 15). De plus, leur conjugaison à une protéine cible se fait toute au niveau d'une lysine (K), implique une glycine (G) situé à leur extrémité C<sup>term</sup> et est coordonnée par une cascade enzymatique (388, 389).



**Figure 15 : Représentation du repliement ubiquitine caractéristique aux Ubls**

L'ubiquitine, RUB/Nedd8 et SUMO sont tous des membres de la famille des Ubls qui se caractérise par la présence d'une structure typique à l'ubiquitine connue sous le nom d'« ubiquitin fold » ou «  $\beta$ -grasp ». *Adaptation d'une image provenant du site internet du laboratoire du Dr. Richard Vierstra, Université du Wisconsin-Madison, Département de Génétique, <http://vierstra.genetics.wisc.edu/research.sumo.php>.*

SUMO-1 a été la première Ubl découverte et est la plus largement étudiée jusqu'à présent mais depuis, plusieurs autres membres se sont ajoutés à la famille qui en compte aujourd'hui treize, incluant RUB/Nedd8, ISG15 et Atg8 (390).

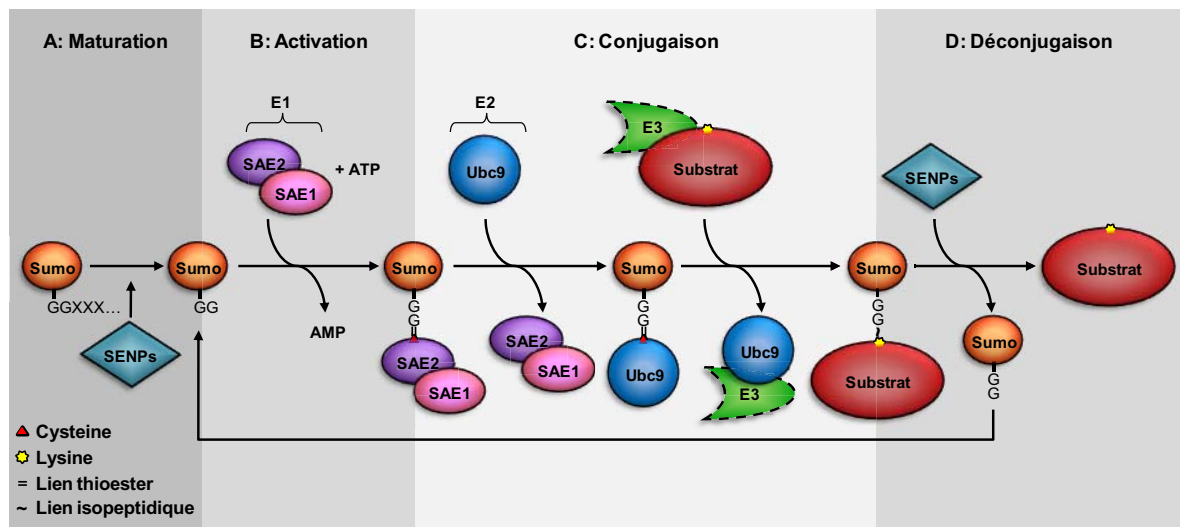
### 5.3.2 – La voie de la sumoylation

Similaire à l'ubiquitination, la voie de la sumoylation (voie SUMO) est un processus séquentiel qui requiert l'action de diverses enzymes, incluant des enzymes activatrices (E1), conjugas (E2), ligases (E3) et isopeptidases (Figure 16). À ce jour, on ne connaît qu'un nombre très limité d'enzymes appartenant à cette voie. On y retrouve qu'une seule enzyme activatrice hétérodimérique : SAE1/SAE2 (Aos1/Uba2 chez la levure) (391), une seule conjugas : Ubc9 (392, 393), quatre SUMO ligases : PIAS (394, 395), RanBP2 (396), Pc2 (397) et Mms21 (398), et six SUMO isopeptidases chez les mammifères : SENP1-3 et SENP5-7 (399). Il existe donc une différence frappante entre le nombre d'enzymes de la voie SUMO comparativement à la voie Ubi et ceci peut laisser présager une faible spécificité de la voie SUMO. Toutefois, la voie SUMO possède des moyens supplémentaires afin de permettre une plus grande spécificité d'action tels qu'une séquence consensus, des protéines SUMO distinctes, une conjugas qui possède une surface modulable d'interaction avec le substrat et différents modes de reconnaissance par les E3-ligases.

#### 5.3.2.1 – Processus général

L'étape initiale de la voie SUMO est la maturation des protéines SUMO. Cette étape consiste en un clivage protéolytique de 2 à 11 acides aminés afin d'exposer le motif diglycine (GG) situé en C<sup>term</sup> des SUMO. Ce processus est induit par les protéases SENPs et est essentiel pour la conjugaison des SUMO à leur substrat (400) (Figure 16A). La protéine SUMO mature est ensuite activée en se liant de façon ATP-dépendante à l'enzyme

activatrice E1 (SAE1/SAE2) via un lien thioesther entre la glycine de SUMO et la cystéine de l'enzyme E1 (Figure 16B).



**Figure 16 : La voie de la sumoylation**

Schématisation de la cascade enzymatique entourant le processus de sumoylation. Les différentes étapes sont décrites dans le texte. Les E3-ligases (vert) sont hachurées car quoiqu'elles favorisent grandement le processus de conjugaison, elles n'y sont pas essentielles puisque cette étape peut être assurée exclusivement par Ubc9. *Image inspirée de (401).*

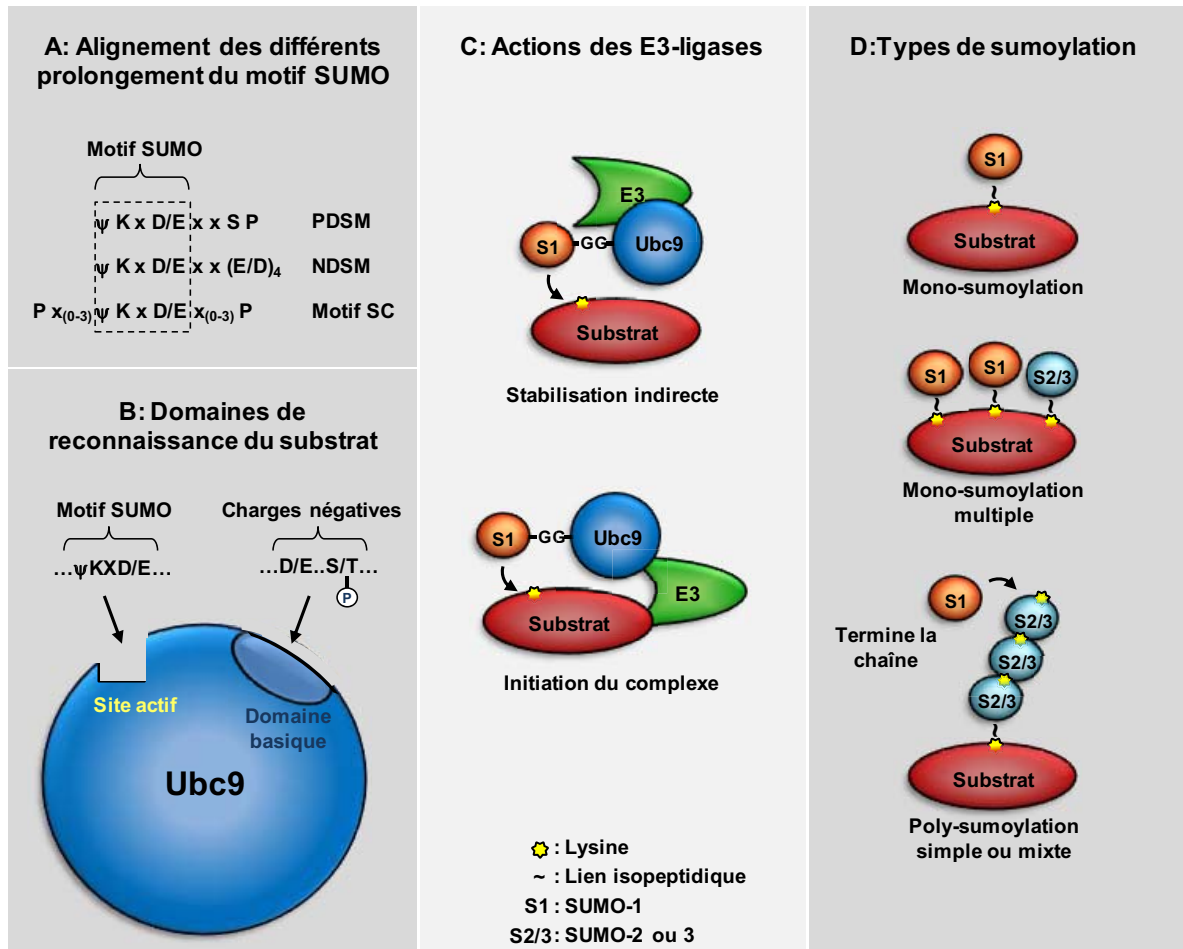
Par la suite, la protéine SUMO est transférée à l'enzyme de conjugaison Ubc9 (E2) par une réaction de transestérification. Ce complexe entre alors en contact avec le substrat et un lien isopeptidique se forme entre la glycine C<sup>term</sup> de la SUMO et une lysine (K) de la protéine cible, provoquant ainsi l'attachement de SUMO sur cette dernière (Figure 16C). Cette étape de la conjugaison peut être favorisée par l'action des E3-ligases.

Finalement, la sumoylation est un processus hautement réversible et les SUMO se trouvent à être rapidement déconjugués par les protéases SENPs et peuvent être alors réutilisés à l'étape d'activation (Figure 16D). Se sont les mêmes protéases qui sont utilisées à l'étape de la maturation (402).

### 5.3.2.2 – La conjugaison/déconjugaison de SUMO en détail

La lysine impliquée dans la conjugaison fait généralement partie d'un motif consensus de sumoylation  $\psi$ KXD/E, où  $\psi$  représente un acide aminé hydrophobe tel que l'isoleucine (I), la valine (V) ou la leucine (L), X n'importe quel acide aminé, D/E un acide aminé aspartique ou glutamique, respectivement (403). Quoique majoritaire, ce mécanisme de conjugaison n'est pas exclusif. Pour environ 25% des protéines sumoylées, incluant entre autres DAXX, Mdm2 et ER $\alpha$ , la sumoylation survient sur des résidus lysines qui ne font pas parti d'un motif consensus de sumoylation (173, 404-406). Il s'avère même que certaines protéines qui possèdent le motif ne soient pas sumoylées (407). De plus, plusieurs groupes ont identifié des prolongements au motif consensus de SUMO. En effet, ils démontrent que la conjugaison de SUMO peut être régulée par les acides aminés environnants, tels que des résidus prolines (SC : synergy control motif) (408), des résidus phosphorylables (PDSM : phosphorylation-dependent sumoylation motif) (409) et des résidus acides (NDSM : negatively charged amino acid-dependent sumoylation motif) (410) (Figure 17A). Toutes ces variations du motif de sumoylation ont un impact sur la conjugaison car ils affectent le recrutement et l'action de l'unique conjugase de la voie SUMO, Ubc9.

Toute conjugaison des Ubls nécessite l'action d'E2-conjugases mais Ubc9 se distingue des autres par son habileté à pouvoir reconnaître directement les protéines cibles. En effet, Ubc9 possède deux domaines qui sont impliqués dans la reconnaissance du substrat. Le premier est le site actif, qui reconnaît le motif consensus de SUMO (411, 412) et le second est une poche basique qui interagit favorablement avec des charges négatives (410) (Figure 17B). Ainsi, la présence d'acides aspartique (D), glutamique (E) ou de phosphates directement en aval du site SUMO agit comme catalyseur et favorise la sumoylation de la protéine cible en accentuant l'interaction d'Ubc9 avec cette dernière.



**Figure 17 : Mécanismes entourant la conjugaison de SUMO**

**A:** Alignement des différents motifs de sumoylation. **B:** Schématisation des domaines impliqués dans la reconnaissance du substrat présents chez Ubc9. **C:** Schématisation des deux modes d'actions utilisés par les E3-ligases pour augmenter la spécificité et la reconnaissance entre Ubc9 et le substrat. **D:** Schématisation des types de sumoylation. Selon le type de protéines SUMO et le nombre de motifs SUMO présents sur la protéine cible, la résultante de la conjugaison peut être la mono-sumoylation unique ou multiple et/ou la poly-sumoylation. La poly-sumoylation peut être simple (SUMO-2 ou 3) ou mixte (mélange de SUMO-2/3 et/ou de SUMO-1). *Image inspirée de* (Shen-Hsi Yang et al. 2006; Gareau et al. 2010; Geoffroy and Ronald T Hay 2009).

Le fait qu'Ubc9 puisse reconnaître directement le substrat fait en sorte que l'action des E3-ligases (qui servent d'adaptateur entre Ubc9 et la protéine cible) n'est pas essentielle à la conjugaison. Par contre, leur présence catalyse la conjugaison de SUMO car ils favorisent le rapprochement et la reconnaissance d'Ubc9 avec le substrat. Les E3-ligases



accentuent le transfert de SUMO sur le substrat selon deux mécanismes (Figure 17C). Dans le premier cas (stabilisation indirecte), l'interaction de l'E3-ligase avec la protéine cible n'est pas nécessaire. Cette dernière interagit seulement avec l'hétérodimère Ubc9-SUMO et permet de coordonner le positionnement de ce dernier afin d'obtenir une conjugaison optimale. En second lieu (initiation du complexe), l'interaction de la E3-ligase avec le substrat est l'étape initiale et permet alors le recrutement d'Ubc9-SUMO dans le complexe, facilitant ainsi la sumoylation (413).

Tous ces mécanismes impliqués dans la conjugaison apportent une spécificité d'action à la voie SUMO et cette spécificité est accentuée par la diversité des isoformes de SUMO et de SUMO-protéases pouvant être utilisées.

Ainsi, selon l'isoforme de SUMO utilisée lors de la conjugaison et le nombre de lysines sumoylables sur la protéine cible, il s'en suivra alors une ou multiple mono-sumoylation ou poly-sumoylation (Figure 17D). En effet, SUMO-2/3 et 4 possèdent dans leur portion N<sup>term</sup> une lysine en position 11 (K11) qui fait partie d'un motif consensus de sumoylation et la présence de ce site permet donc à ces SUMO d'être elles-mêmes sumoylées, menant à la formation de chaîne de poly-SUMO (415). SUMO-1 ne possède pas cette lysine et il est admis que la conjugaison de SUMO-1 ne peut mener qu'à la mono-sumoylation. Toutefois, des chercheurs ont démontrés que SUMO-1 peut être utilisé en fin de chaîne, permettant ainsi l'arrêt de la poly-sumoylation et la formation de chaînes mixtes de SUMO-1, 2 et 3 (416). De plus, la formation de chaînes de poly-SUMO-1 a été observée *in vitro* au niveau de lysines ne faisant pas partie d'un motif SUMO, soit les lysines 7, 16, 17 et 117 (417, 418). Il n'est donc pas exclu que la poly-SUMO-1 *in vivo* puisse être mise en évidence ultérieurement.

Pour l'isoforme SUMO-4, quoiqu'il possède la K11, son implication dans la poly-sumoylation n'a pas encore été démontrée. De plus, il est plus que vraisemblable que l'interaction de SUMO-4 avec un substrat soit la résultante d'une interaction non-covalente impliquant un motif d'interaction/liaison à SUMO (SIM/SBD) (voir section suivante) et

non dû à une conjugaison traditionnelle (lien isopeptidique), puisqu'une proline se trouve en amont de son motif diglycine (GG) et empêche sa maturation (419).

Finalement, la spécificité de la voie SUMO est également dépendante de l'action des SUMO-protéases. Chez les mammifères, on retrouve six isoformes impliqués dans la déconjugaison et la maturation des SUMO, soit SENP1-3 et SENP5-7. Leur localisation cellulaire et leur spécificité pour les différentes SUMO varient d'un isoforme à l'autre (402). Par exemple, SENP1 est retrouvé dans le cytoplasme et le noyau, et est la protéase majoritaire pour la déconjugaison de SUMO-1. SENP2 cible également SUMO-1 mais favorise la déconjugaison de SUMO-2/3 à celle de SUMO-1. SENP3 et 5 ciblent exclusivement SUMO-2/3 alors que SENP6 et 7 sont impliqués dans le clivage des chaînes de SUMO-2/3.

### **5.3.3 – Conséquences de la sumoylation**

La sumoylation est aujourd'hui indéniablement reconnue comme étant un important régulateur de la fonctionnalité de plusieurs protéines. La liste de protéines ciblées par la sumoylation ne cesse de s'allonger, entraînant inévitablement une meilleure compréhension de son fonctionnement ainsi que des conséquences qui en découlent. Nous savons maintenant que la sumoylation est impliquée dans la régulation d'une variété de processus biologiques tels que la transcription (420), la réparation de l'ADN (421), le transport nucléaire (422), les fonctions chromosomiques (423), l'intégrité nucléaire (424), la progression du cycle cellulaire (425), la régulation de différentes voies de signalisation (426), etc (381). Bien évidemment, comme pour toutes les autres MPTs, la sumoylation entraîne ces effets en provoquant des changements moléculaires qui donnent lieu à de nouvelles fonctions/affinités/rôles aux protéines ciblées, modulant ainsi la transduction des signaux.

### 6.3.3.1 – Effets moléculaires et fonctionnels

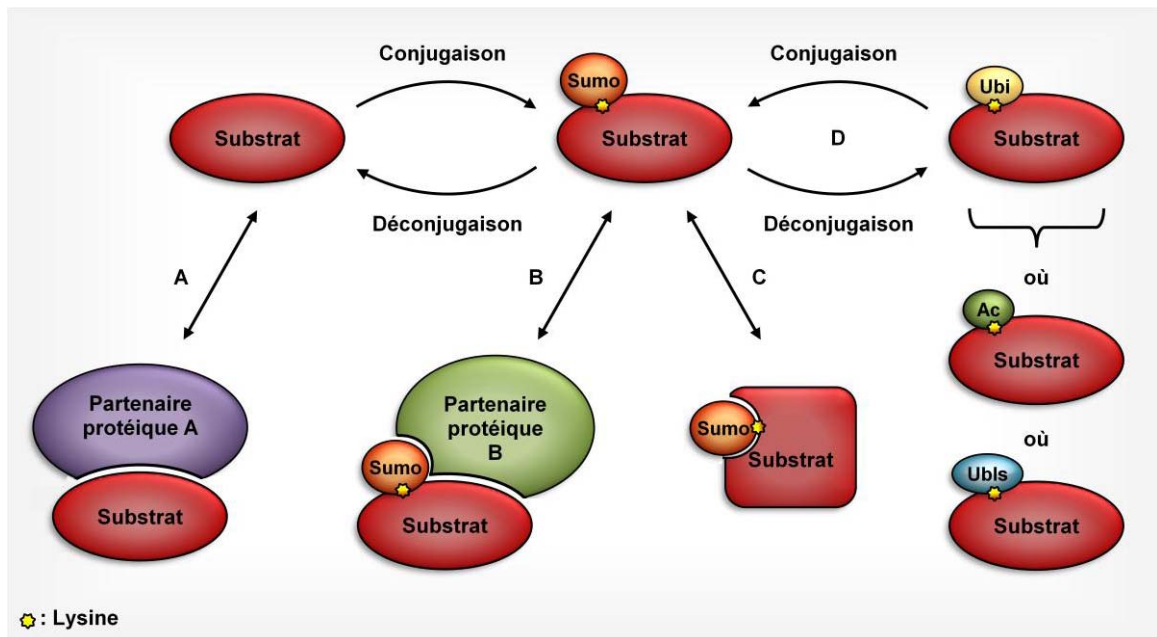
Les changements moléculaires issus de la sumoylation induisent une diversification du protéome selon quatre mécanismes non mutuellement exclusifs (Figure 18). Premièrement, la présence de SUMO sur une protéine peut empêcher à un partenaire protéique d'interagir avec cette dernière en masquant le site d'interaction initial. C'est le cas, entre autres, du répresseur transcriptionnel ZNF76 dont le site accepteur de SUMO chevauche son domaine d'interaction avec la protéine TBP (TATA-binding protein) (427).

À l'opposé, la présence de SUMO peut créer une nouvelle interface d'interaction et permettre le recrutement de nouveaux partenaires protéiques, comme le démontre l'exemple du coactivateur p300 qui, une fois sumoylé, interagit avec la déacétylase HDAC6 (428). Ces recrutements SUMO-dépendants nécessitent la présence de motifs de reconnaissance spécifique à SUMO sur le partenaire d'interaction, communément nommés SIM ou SBM (SUMO-interacting/binding motif) (429, 430). Les SIM/SBM sont composés d'un noyau hydrophobe entouré de résidus acides ou de sérines phosphorylables et interagissent de façon non-covalente avec les protéines SUMO.

Troisièmement, la liaison de SUMO sur une protéine cible peut induire un changement de conformation chez cette dernière, altérant ainsi son activité ou révélant des sites d'interactions protéiques jusqu'alors inaccessibles. Ce changement conformationnel peut être induit par l'interaction non-covalente de la SUMO conjuguée avec un SIM présent au sein même de cette protéine. Un exemple d'un tel changement est celui de la glycosidase TDG (thymine DNA glycosylase) pour qui la conjugaison de SUMO modifie sa conformation et résulte en une perte de son interaction avec l'ADN (432).

En dernier lieu, la conjugaison de SUMO se produit au niveau de lysines qui peuvent également être le siège d'attache de d'autres MPTs telles que l'ubiquitination, la neddylation, l'isgylation, l'acétylation, la méthylation, etc (433). Ainsi, la sumoylation peut entrer directement en compétition avec l'une ou l'autre de ces modifications, annuler leurs effets et engendrer de nouvelles conséquences fonctionnelles. C'est le cas, notamment, de

ER $\alpha$  dont le potentiel transcriptionnel est hautement régulé par une compétition directe entre l'attachement d'un groupement acétyle (acétylation), méthyl (méthylation), d'une ubi et de SUMO1 au niveau des mêmes lysines (45). Nos résultats démontrent également une compétition entre SUMO1 et ubi sur ER $\beta$  (voir chapitre 3 section 3.1).



**Figure 18 : Conséquences moléculaires de la sumoylation des substrats**

Ces quatre conséquences moléculaires ne sont pas mutuellement exclusives. La sumoylation peut induire : **A**: une perte d'interaction entre le substrat et son partenaire **B**: promouvoir de nouvelles interactions protéiques **C**: modifier la conformation de la protéine cible. **D**: compétitionner avec d'autres modifications post-traductionnelles, tels que l'ubiquitination (Ubi), l'acétylation (Ac) ou d'autres Ubls tels que la neddylation, au niveau de la lysine cible. *Image inspirée de (431).*

En résumé, les conséquences moléculaires de la sumoylation sont spécifiques à chaque protéine et vont avoir des répercussions directes sur leur fonctionnalité. Ainsi, un changement de conformation et/ou la création/perte d'interaction avec d'autres protéines, d'autres MPTs et/ou l'ADN en réponse à la sumoylation pourront résulter en un changement de localisation cellulaire, de stabilité et/ou d'activité chez la protéine cible

(380, 431). Et c'est justement l'étude de ces conséquences fonctionnelles qui est à la base de notre compréhension des répercussions biologiques de la sumoylation.

### **5.3.3.2 – Études des conséquences fonctionnelles : un défi de taille**

Il est impossible de prédire les conséquences fonctionnelles de la sumoylation, car chaque protéine est unique. Les conséquences seront la résultante des changements moléculaires qui sont également spécifiques à chaque protéine, aux domaines qu'elles contiennent, aux autres MPTs qu'elles subissent, aux autres protéines présentes, aux signaux intra et extra-cellulaires, etc.

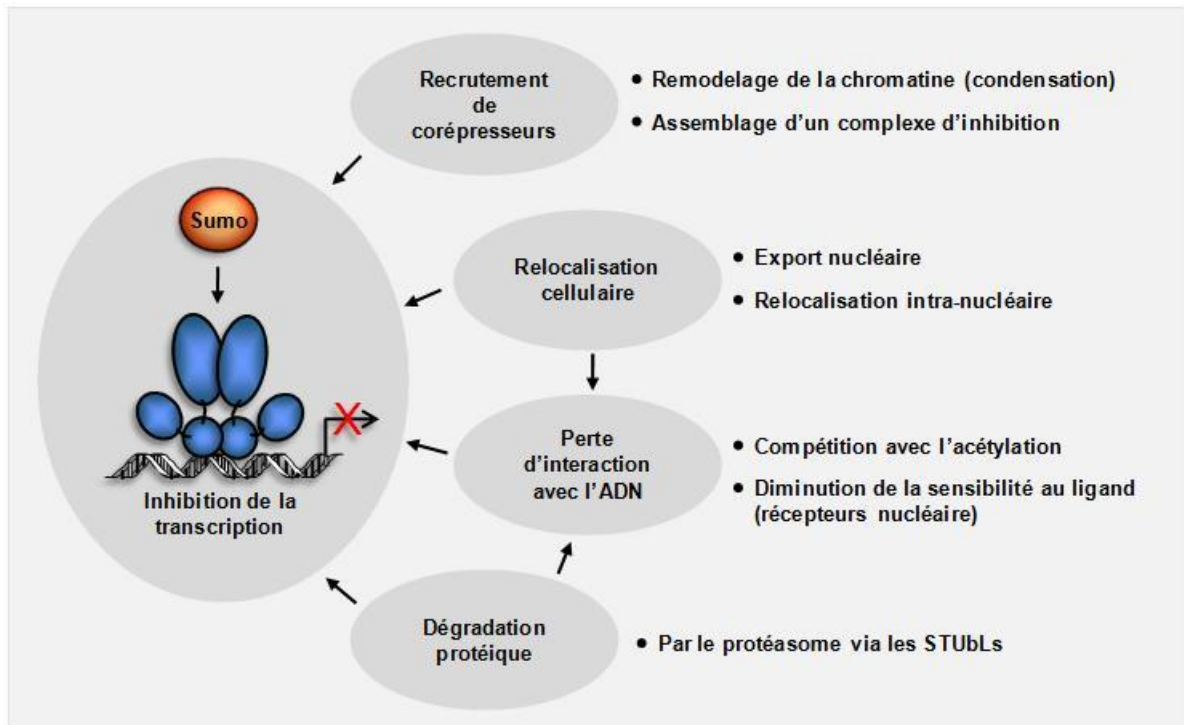
En plus de ce nombre élevé d'interactions et de complexes possibles entre les protéines, s'ajoute le fait que la sumoylation est une modification extrêmement transitoire et que seulement une faible proportion (moins de 1%) des protéines cibles se trouvent à être sumoylée à chaque intervalle de temps (380). Toutes ses caractéristiques font en sorte que l'étude de leur fonctionnalité représente un défi de taille.

Face à ces contraintes, l'expérience la plus importante pour étudier l'impact fonctionnel de la sumoylation consiste à muter le site de conjugaison de SUMO chez la protéine cible et de comparer ses fonctions avec celles de la protéine de type sauvage. Toutefois, comme la lysine dédiée à la conjugaison de SUMO peut être également le siège d'attache de d'autres MPTs, il est nécessaire de vérifier que les effets observés sont réellement dus à la perte de SUMO et ce, en créant des mutants ponctuels pour les autres acides aminés, tel que l'acide glutamique, présents dans le motif de sumoylation et en s'assurant que les effets observés sont similaires.

### **5.3.3.3 – Inhibition de la transcription**

La sumoylation est principalement associée avec l'atténuation ou la répression transcriptionnelle (434, 435). En effet, la plupart des facteurs de transcription et corégulateurs transcriptionnels cibles deviennent significativement plus actifs lorsque leur lysine acceptrice de SUMO est mutée. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'inhibition

transcriptionnelle observée (Figure 19) et la majorité implique un recrutement SUMO-dépendant d'effecteurs possédant des SIM/SBM (436).



**Figure 3 : Mécanismes liés à la répression transcriptionnelle induite par SUMO**

Schématisation des différents mécanismes pouvant être impliqués dans l'atténuation ou la répression transcriptionnelle des facteurs de transcription par la sumoylation. Ces mécanismes, non mutuellement exclusives, sont décrits dans le texte. STUbLs : SUMO-targeted ubiquitin ligase.

### 5.3.3.3.1 – Recrutement de corépresseurs

Premièrement, la sumoylation d'un facteur de transcription peut induire le recrutement de corépresseurs transcriptionnel qui ont la capacité de remodeler la chromatine. C'est le cas entre autres des histones déacétylases (HDAC), qui suite à leur recrutement SUMO-dépendant, vont induire la condensation de la chromatine en la déacétylant, rendant alors cette dernière inapte à la transcription (437). Cette conformation

inhibitrice de la chromatine peut alors perdurer même après la désumoylation du facteur de transcription. De plus, les histones elles-mêmes ont été identifiées comme étant des cibles de la sumoylation et leur sumoylation, qui est facilitée par leur acétylation, résulte en une répression de la transcription (107).

La sumoylation des facteurs de transcription peut également être initiatrice du recrutement et de la formation d'un complexe d'inhibition (435). Ainsi, la présence de SUMO va permettre le recrutement de corépresseurs transcriptionnels, tel que DAXX (Death domain-associated protein) (438), qui serviront ensuite de plateforme d'assemblage pour un complexe d'inhibition. Encore une fois, le complexe peut rester même après le retrait de SUMO, résultant en une répression soutenue de la transcription.

#### **5.3.3.3.2 – Altération de l'interaction avec l'ADN**

Outre le recrutement de corépresseurs, l'inhibition de la transcription peut être le résultat d'une diminution de la capacité des facteurs de transcription à interagir avec l'ADN. Cette dernière peut être causée par une compétition avec d'autres MPTs, une modification de leur localisation cellulaire, une diminution de leur stabilité protéique et/ou, dans le cas des récepteurs nucléaires, une diminution de leur sensibilité aux ligands.

Par exemple, l'acétylation est connue pour promouvoir l'interaction des facteurs de transcription avec l'ADN (439). Une compétition directe entre la conjugaison de SUMO et l'acétylation au niveau de la même lysine pourrait donc résulter en une inhibition transcriptionnelle du facteur de transcription ciblé. C'est le cas du facteur de transcription Plag2 (pleomorphic adenoma gene 2), dont la sumoylation compétitive avec son acétylation affectant ainsi négativement l'interaction de ce dernier avec l'ADN (440).

Également, dans le cas des récepteurs nucléaires, la sumoylation peut affecter négativement leur sensibilité au ligand, probablement par un changement de conformation, induisant ainsi une répression transcriptionnelle. Ce phénomène est observé chez le récepteur de la progestérone (PR) pour qui l'absence de sumoylation, induite par la

mutation de son site unique de sumoylation, induit une augmentation de sa sensibilité au ligand (441).

#### **5.3.3.3.3 – Relocalisation cellulaire**

L'inhibition de la transcription via la perte d'interaction avec l'ADN peut aussi être la résultante de l'export nucléaire de facteurs de transcription et/ou de corégulateurs. C'est le cas entre autres du facteur de transcription Smad3 (Sma- and MAD-related protein 3) (442) et du corépresseur CtBP (C-terminal binding protein) (443). En effet, la conjugaison de SUMO-1 sur Smad3 inhibe sa capacité de lier l'ADN en induisant sa relocalisation cytoplasmique, l'empêchant ainsi d'exercer son pouvoir transcriptionnel. À l'inverse, la sumoylation de CtBP permet sa localisation nucléaire. Non sumoylé, on le retrouve dans le cytoplasme.

Il peut également survenir une relocalisation intra-nucléaire. En effet, suite à leur sumoylation, certains facteurs de transcription sont relocalisés et séquestrés au niveau des corps nucléaires de PML (progressive multifocal leukoencephalopathy nuclear bodies). Les corps de PML sont des composantes de la matrice nucléaire (444), une structure nucléaire reconnue comme étant un siège d'encrage et de régulation de plusieurs fonctions nucléaires incluant la réplication de l'ADN, la transcription et l'inactivation génique (350). Les facteurs de transcription sumoylés qui se retrouvent séquestrés dans les corps de PML deviennent alors inaccessibles pour la transcription. Une telle conséquence a été observée notamment pour les facteurs de transcription Sp3 (stimulation protein 3) (445), LEF1 (Lymphoid enhancer factor 1) (446) et SATB2 (Special AT-rich sequence-binding protein 2) (447).

#### **5.3.3.3.4 – Dégradation protéique**

La répression transcriptionnelle induite par la sumoylation peut également être la conséquence d'une dégradation protéique des facteurs de transcription. Jusqu'à très récemment, la communauté scientifique concevait que, contrairement à l'ubiquitination, la sumoylation n'entraînait pas la dégradation protéique. Hors, ce concept a été aboli suite à la



découverte d'une nouvelle classe d'E3-ubiquitine ligase, les STUbLs (SUMO-targeted ubiquitin ligase) (414,448), dont leur recrutement est dépendant de la présence de SUMO. En effet, les STUbLs vont être recrutées au niveau des protéines sumoylées grâce à leur capacité à reconnaître et lier des chaînes de SUMO et, par leur activité E3-ubiquitine ligase, vont induire la poly-ubiquitination de la protéine cible et provoquer sa dégradation subséquente par le protéasome. Chez les mammifères, un seul membre de la famille a été identifié jusqu'à présent, soit RNF4 (RING finger protein 4), aussi connu sous le nom de Snurf (small nuclear RING finger protein). Cette dégradation SUMO-dépendante, initialement observée chez la protéine PML (449), a été décrite pour le facteur de transcription HIF-2 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$ ) (450). Toutefois, outre l'action des STUbL, la relocalisation des protéines au niveau des corps de PML peut également résulter en une dégradation protéique (444).

#### **5.3.3.4 – Activation de la transcription**

Néanmoins, malgré l'évidence du rôle de la sumoylation dans la répression transcriptionnelle, un nombre croissant d'exemples démontrent que la sumoylation peut également être associée avec une augmentation de la transcription (451).

Par exemple, paradoxalement à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de PR observée suite à la mutation de son site de sumoylation, la surexpression de SUMO-1 entraîne une augmentation de l'activité du récepteur et ce, même lorsque sa lysine cible est mutée. Ce résultat suggère que l'activation de PR est le résultat indirect de la sumoylation de d'autres protéines. En effet, la conjugaison de SUMO-1 sur le coactivateur SRC-1 augmente son pouvoir de coactivation et favorise sa localisation nucléaire, prolongeant ainsi son interaction avec PR et expliquant l'activation transcriptionnelle observée (452). PR n'est pas le seul facteur de transcription à être activé par la sumoylation. On y retrouve, entre autres, ER $\alpha$  (173) et p53 (453). Pour ER $\alpha$ , l'activation par SUMO semblerait également étroitement liée à son interaction avec SRC-1 et, tout comme pour PR, il a été

reporté que la sumoylation de p53 pouvait avoir des répercussions activatrices ou inhibitrices sur son activité.

Outre le rôle du coactivateur SRC-1 dans l'augmentation de l'activité transcriptionnelle en réponse à la sumoylation, des études récentes démontrent que l'E2-conjugase Ubc9 peut également promouvoir l'activation de plusieurs récepteurs nucléaires en agissant comme coactivateur transcriptionnel et ce, indépendamment de son pouvoir de conjugaison (454). Par exemple, les chercheurs ont observé que la surexpression d'Ubc9 provoquait une transactivation du récepteur des minéralocorticoïdes (MR) et ce, même lorsque l'activité conjugase d'Ubc9 était abolie par la substitution de la cystéine nécessaire à la conjugaison de SUMO par une sérine (C93S). Donc, en plus d'influencer la fonction des protéines en influençant la balance entre la conjugaison et la déconjugaison de SUMO, Ubc9 ajoute un niveau supplémentaire aux conséquences fonctionnelles de la voie SUMO en pouvant agir également comme coactivateur transcriptionnel.

Il est vrai que tous ces modes d'inhibition et/ou d'activation de la transcription par la sumoylation ne sont pas mutuellement exclusifs et sont très dépendants du contexte et/ou du type cellulaire rendant ainsi très complexe l'étude de l'impact de la sumoylation sur la régulation de la transcription. Or, c'est justement cette abondante diversité de conséquences qui permet aux cellules de s'adapter et de répondre efficacement aux différents signaux et environnements cellulaires.

### **5.3.4 – Conséquences de la sumoylation sur l'activité des ERs**

Tel que mentionné précédemment, ER $\alpha$  est une cible directe de la sumoylation (173). La conjugaison de SUMO-1 est ligand-dépendante et survient au niveau de deux sites non-consensus de sumoylation (K266 et K268) présents dans la région charnière du récepteur. La surexpression de SUMO-1 augmente l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$ , mais également celle du mutant rendu non-sumoylable. Ce résultat suggère que, tout

comme pour PR, l'activation de ER $\alpha$  est le résultat indirect de la sumoylation sur la régulation de ses principaux corégulateurs transcriptionnel.

Parmi les corégulateurs connus des récepteurs des estrogènes, plusieurs ont été identifiés comme étant des cibles de la sumoylation (Tableau2). Celle-ci provoque une diminution de l'activité de la plupart des coactivateurs alors qu'à l'inverse, l'activité des corépresseurs est augmentée. Ce tableau permet de constater encore une fois que le rôle majeur de la sumoylation sur la transcription est l'induction d'une répression transcriptionnelle. Il est donc difficile d'expliquer d'où vient l'activation transcriptionnelle observée pour ER $\alpha$ .

Les auteurs suggèrent que cette activation est la résultante de l'action coactivatrice de SRC-1 et/ou d'Ubc9, puisque qu'Ubc9-C93S (n'ayant plus d'activité conjugase) active également la transcription de ER $\alpha$  (173). Cette étude démontre également que l'E3-ligase PIAS3, seulement en absence de SUMO-1, agit comme coactivateur de la transcription. Par contre, en présence de SUMO-1, PIAS3 provoque l'inhibition transcriptionnelle de ER $\alpha$ , tout comme l'action de PIAS1. Ces contradictions d'action entre les différents joueurs de la voie de SUMO sur la régulation de l'activité de ER $\alpha$  démontrent toute la complexité entourant l'étude et l'impact de la sumoylation.

Pour ce qui est de la régulation de ER $\beta$  par la sumoylation, nous démontrons que la conjugaison de SUMO-1 sur le récepteur, inhibe son activité estrogénique et stabilise le récepteur en entrant en compétition avec l'ubiquitination. Également, cette étude nous a permis d'identifier un nouveau motif de sumoylation, dépendant de la phosphorylation. Outre mes résultats présentés dans le chapitre 2, on ne retrouve aucune étude à ce sujet dans la littérature.

**Tableau 2 : Effet de la sumoylation sur l'activité de corégulateurs des ERs**

| Fonctions     | Protéines     | Activité   | Effet de SUMO sur l'activité |   |   | Refs  |
|---------------|---------------|--|------------------------------|---|---|---|
|               |               |  | ↑                            | ↓ | Rôle(s)   |   |
| Coactivateurs | SRC-1         | Transactivation                                    | X                            |   | Prolonge sa rétention nucléaire.  | (452)   |
|               | GRIP1 (SRC-2) | Transactivation                                    |                              | X | Affecte négativement sa capacité d'interaction.   | (455)   |
|               | AIB1 (SRC-3)  | Transactivation                                    |                              | X | Atténuation de son activité.  | (456)   |
|               | CBP           | Histone acétyl-transférase                         |                              | X | Recrutement du corépresseur Daxx.   | (438)   |
|               | p300          | Histone acétyl-transférase                         |                              | X | Recrutement de la déacétylase HDAC6.  | (428)   |
|               | p68/p72       | Hélicase d'ARN                                     |                              | X | X   | Effets pléiotropiques : Augmente leur stabilité protéique. Favorise le recrutement de HDAC1. Augmente le pouvoir de transactivation de p68 mais diminue celui de p72. |
| Corépresseurs | HDAC1         | Histone déacétylase                                | X                            |   | Augmentation de son activité.   | (458)   |
|               | HDAC4         | Histone déacétylase                                | X                            |   | Augmentation de son activité.   | (459)   |
|               | N-CoR         | Transrépression (recrutement de HDACs)             | X                            |   | Augmentation de son activité.   | (460)   |
|               | RIP140        | Transrépression (recrutement de HDACs)             | X                            |   | Augmentation de son activité.   | (461)   |
|               | CtBP          | Transrépression (HDACs dépendante ou indépendante) | X                            |   | CtBP Permet sa localisation nucléaire, non sumoylé on le retrouve dans le cytoplasme.     | (443)   |
|               | BRCA1         | E3-ubiquitine ligase                               | X                            |   | Facilite son activité E3-ligase et induit la dégradation des protéines par le protéasome. | (462)   |
|               | Smad4         | Transrépression                                    | X                            |   | Augmente sa stabilité et sa localisation nucléaire.                                       | (463)   |

### 5.3.5 – Pathologies associées

La sumoylation exerce une influence majeure sur une multitude de mécanismes de régulation cellulaire et un dérèglement de cette voie peut facilement engendrer des répercussions physio-pathologiques. En effet, l'équilibre cellulaire entre la sumoylation et la désomoylation joue un rôle important dans le développement de diverses pathologies

humaines telles que le cancer (464), les maladies neurodégénératives et autoimmunes (465,466), les maladies infectieuses (467), les problèmes cardiaques (468), arthritiques (469), de vision (470), etc.

### **5.3.5.1 – Implication dans les cancers**

Parmi les protéines modifiées par la sumoylation, on retrouve plusieurs protéines impliquées dans la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose, tels que des facteurs de transcription, des oncoprotéines, des suppresseurs de tumeurs, des régulateurs du cycle cellulaire, des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN ainsi que dans la stabilité des chromosomes (464). Il est donc facile de conclure qu'une dérégulation de la voie SUMO puisse entraîner le développement de cancer. Son implication évidente dans la carcinogénèse a été établie et la voie de SUMO, plus spécifiquement Ubc9, est maintenant considérée comme une cible thérapeutique potentielle (471,472).

Ubc9 se trouve à être surexprimé dans plusieurs cancers, incluant les cancers de la prostate, pulmonaires et ovariens. La surexpression de Ubc9 favorise la prolifération de cellules cancéreuses mammaires, telles que les MCF-7, et ce probablement via l'activation transcriptionnelle de ER $\alpha$  (473). En repartant du fait qu'Ubc9 est la seule conjugase de la voie SUMO et qu'elle joue un rôle central dans la régulation de la sumoylation, Ubc9 représente donc une cible thérapeutique très prisée. Plusieurs approches pour altérer les fonctions d'Ubc9 sont présentement expérimentées, telles que l'inhibition de son site actif, supprimer son expression (par siRNA et shRNA), interférer sa liaison avec l'enzyme activatrice E1 (par la protéine viral Gam1) et empêcher son interaction avec les protéines d'intérêts (89,474).

Finalement, la SUMO-protéase SENP1 se trouve également surexprimée dans certains cancers (adénome thyroïdien et prostate), de même que l'E3-ligase PIAS3 (poumon, sein, prostate, colon et cerveau) (476). Ces exemples démontrent l'importance de la balance entre la sumoylation et la désomoylation dans la carcinogénèse et espérons que

tout comme pour la voie d'ubiquitination, les chercheurs découvrirons un moyen thérapeutique pour contrecarrer les dérégulations de cette voie.

## **5.4 – Autres modifications post-traductionnelles**

### **5.4.1 – La méthylation**

La méthylation joue un rôle important dans la régulation de la transcription. Alors que l'hyperméthylation de l'ADN inhibent l'expression génique en induisant la condensation de la chromatine, la méthylation des histones peut avoir un effet positif ou négatif sur la transcription en fonction de la lysine qui sera méthylée (477,606,607). En particulier, l'hyperméthylation de la région promotrice de ER $\beta$  a été associée à la perte et/ou la diminution du niveau d'expression de ER $\beta$  observées dans différentes lignées de cancers gynécologiques (478,479). La méthylation peut également être favorable à la transcription puisque l'ajout d'un groupement méthyle sur des résidus arginines présents dans la queue des histones par les PRMTs (proteins arginine methyltransferase) favorise l'ouverture de la chromatine et le processus transcriptionnel (480). Parmi les membres de cette famille, les plus étudiés dans la régulation de l'activité des ERs sont PRMT1 et CARM1 (coactivator-associated arginine methyltransferase) aussi connu sous le nom de PRMT4. Ces protéines sont présentes dans les complexes de coactivation des ERs et leur recrutement ligand-dépendant ou indépendant régule l'activité de ces derniers en modifiant les histones, mais également les corégulateurs transcriptionnels et même, dans le cas de ER $\alpha$ , le récepteur lui-même (123,481). En effet, le recrutement de PRMT1 et/ou CARM1 favorise la transcription des ERs en induisant la méthylation des histones H3 et H4 (482, 483). La méthylation des cofacteurs des ERs, PGC-1, RIP140, p300/CBP et SRC-3, régule leur activité, stabilité et/ou la formation des complexes corégulateurs influençant ainsi l'activité des ERs (481). De plus, ER $\alpha$  a récemment été identifié comme étant une protéine méthylée par PRMT1 et la méthylation du résidu arginine 260 est requise pour l'action non-

génomique de ER $\alpha$  en permettant à ce dernier d'interagir avec les protéines cytoplasmiques Src et p85 (484). Également, la méthylation de ER $\alpha$  par la méthyltransférase SET7 stabilise le récepteur, favorise son interaction avec ses gènes cibles et promouvoit leurs transactivation (608). Aucun site de méthylation n'a encore été découvert chez ER $\beta$ .

### 5.4.2 – L'acétylation

L'acétylation des protéines jouent un rôle important dans la régulation de leur activité et les ERs ne sont pas en reste. Un peu comme pour la méthylation, l'acétylation régule l'activité des ERs en modifiant les histones, mais également en modifiant les corégulateurs, les cascades de signalisation et/ou les récepteurs eux-mêmes (485). Il est clairement connu que l'acétylation des histones par les HATs permet l'ouverture de la chromatine alors que leur déacétylation par les HDACs induit l'effet inverse provoquant ainsi l'arrêt de la transcription. En plus de la régulation des histones, l'acétylation peu influencer l'activité de certaines kinases, incluant MEK2, et celles des cofacteurs transcriptionnels incluant p300, MTA1, PGC1 $\alpha$ , ACTR et les HDACs (486). Les HATs CBP et p300 induisent également l'acétylation de plusieurs lysines chez ER $\alpha$ , incluant K266, K268, K299, K302 et K303 (171,172). L'effet de l'acétylation sur l'activité de ER $\alpha$  varie en fonction de la lysine ciblée puisque l'acétylation estrogène-dépendante de K266 et K268 stimule l'activité transcriptionnelle du récepteur alors que l'acétylation constitutive de K299, K302 et K303 l'inhibe. L'exposition des ERs aux inhibiteurs des HDACs, induit la dégradation protéasome dépendante de ER $\alpha$  réprimant ainsi la prolifération estrogène dépendante des cellules de cancers du sein ER $\alpha$ -positives (Raphaël Margueron et al. 2004). À l'inverse l'inhibition des HDACs n'affecte pas la stabilité de ER $\beta$  et favorise l'activité transcriptionnelle du récepteur (488), démontrant encore une fois que ER $\alpha$  et ER $\beta$  puissent être inversement régulés. Par contre, aucun site d'acétylation n'a été identifié à ce jour sur ER $\beta$ .

### 5.4.3 – La palmitoylation

La palmitoylation est l'attachement d'une longue chaîne d'acide gras qui permet de cibler les protéines à la membrane plasmique en permettant leur interaction avec les radeaux lipidiques (lipid rafts). Les ER $\alpha$  membranaires sont connus pour être palmitoylés sur la cystéine 447 par l'enzyme PAT (palmitoyl acyltransferase). Suite à la liaison de l'estrogène, ER $\alpha$  membranaire subit des changements conformationnels qui induisent sa dépalmitoylation et sa dissociation avec la caveolin-1, ce qui facilite son association avec les molécules signalétiques telles que Src et PI3K favorisant ainsi la prolifération (73,489). Les cycles de palmitoylation et dépalmitoylation sont critiques pour ER $\alpha$  puisque la mutation de site C447 réprime son action non-génomique. La localisation membranaire ER $\beta$  via la palmitoylation a également été démontrée (75). Le site n'a pas été clairement identifié, mais vu que la cystéine palmitoylée de ER $\alpha$  est conservée chez ER $\beta$ , la C399 de ER $\beta$  représente un bon candidat. Il est intéressant de noter que malgré que le site semble conservé entre les ERs, cette MPT affecte différemment ER $\beta$  et les conséquences sur la prolifération sont à l'opposé. En effet, contrairement à ER $\alpha$ , la dépalmitoylation de ER $\beta$  induite par l'estrogène favorise l'interaction du récepteur avec la caveolin-1 et cet effet est nécessaire pour l'activation non-génomique de p38 par ER $\beta$  et l'induction de cascades proapoptotiques (74,84).

### 5.4.4 – La glycosylation

Une autre modification dynamique des protéines nucléaires et cytosoliques est la S/T-O- $\beta$ -GlcNAcylation ou la glycosylation. Le processus de glycosylation est similaire à la phosphorylation et plusieurs études démontrent que ces deux MPTs peuvent interagir sur le même résidu sérine ou thréonine au sein d'une protéine (490). La compétition et/ou balance entre ces deux MPTs est importante pour plusieurs processus notamment la signalisation et la transcription ainsi que pour le maintien adéquat des mécanismes et fonctions cellulaires. Dans la majorité des cas leurs conséquences sur l'activité des



protéines divergent, incluant l'oncogène c-myc, l'ARN polymérase II et ER(490). Tel que mentionné dans la section 5.1.3.2. la glycosylation et la phosphorylation entre en compétition sur la sérine 80 de ER $\beta$  située dans sa région N-terminale (272). La glycosylation de ER $\beta$  stabilise ce dernier mais le rend moins actif à stimuler l'expression de ces gènes cibles. À l'inverse, la phosphorylation de S80 stimule l'activité de ER $\beta$  mais induit une dégradation rapide du récepteur. De plus, la glycosylation du domaine F de ER $\alpha$  affecte négativement l'interaction du récepteur avec l'ADN mais le site n'a pas été identifié (190).

## **6 – Les ERs dans les cancers : rôle spécifique des isoformes**

L'estrogène et les ERs sont hautement impliqués dans le développement des cancers gynécologiques (sein, endomètre et ovaire) mais leurs dérégulations peut conduire au développement de plusieurs autres tumeurs malignes incluant certains cancers endocriniens (surrénale, pancréas, prostate et thyroïde), digestifs (colon, œsophage et foie) et les cancers des poumons (491). De plus, les études démontrent que le risque de développer un cancer gynécologique et/ou endocrinien augmente chez les patientes ayant des traitements d'hormonothérapie (remplacement de l'estrogène) (492,493) et que dans les mêmes conditions, ces traitements semblent diminuer le risque de développer un cancer des poumons (492, 494). Ces observations s'expliquent par le fait que l'impact de l'estrogène et des ERs dans ces tumeurs diffère (491). Par exemple, ER $\alpha$  promeut la prolifération de la majorité de ces cancers mais il n'a peu ou pas d'effet sur la prolifération des cancers pulmonaires (495). À l'inverse, ER $\beta$  influence négativement la prolifération de la majorité de ces tumeurs mais stimule la prolifération des cancers du poumon (495) et de la thyroïde (496). Ainsi ces observations démontrent que le ratio d'expression des ERs, corroboré par leurs différences fonctionnelles, aura un impact majeur sur le développement et la prolifération des ces tumeurs, et souligne le fort potentiel oncogénique de ER $\alpha$ .

## 6.1 – Effet antiprolifératif de ER $\beta$

Les niveaux d'expression de ER $\beta$  diminuent durant la progression de plusieurs types de tumeurs et il a récemment été décrit comme un potentiel suppresseur de tumeur. En effet, plusieurs études démontrent que sa présence est favorable à l'inhibition de la progression des cancers et qu'il agirait entre autre comme modulateur négatif de l'activité de ER $\alpha$  (138,497,498). En effet, bien que 50 à 75 % des tumeurs mammaires ER $\alpha$ -positives soient également ER $\beta$ -positives, le niveau d'expression de ER $\beta$ , comparé aux tissus sains, est souvent diminué (499,500) et une surexpression de ER $\beta$  dans les cellules cancéreuses mammaires ER $\alpha$ -positive inhibe la prolifération (501-503). À l'inverse, l'augmentation du niveau d'expression de ER $\alpha$  dans les cancers du sein est souvent observée (504). Le niveau d'expression de ER $\alpha$  est également supérieur à celui de ER $\beta$  dans les cancers ovariens (505) et une étude sur 58 tumeurs ovariennes de patients démontre que le niveau d'expression de ER $\beta$  est diminué dans ces tumeurs et que son expression est sélectivement réprimée durant la progression des cancers (506). Ces résultats sont en accord avec les études démontrant que ER $\beta$  agit comme suppresseur de tumeur dans la carcinogénèse ovarienne (507). Également, même si ER $\beta$  est le sous-type prédominant dans les cellules du colon, son expression est souvent diminuée dans les tumeurs et sa surexpression induit un arrêt du cycle cellulaire (508). L'arrêt du cycle cellulaire par ER $\beta$  a également été observé dans les cellules de cancers du sein (501). En plus d'agir comme modulateur de l'activité génomique de ER $\alpha$  et de favoriser l'expression de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et/ou de promouvoir l'inhibition de gène prolifératif, la présence de ER $\beta$  corrèle avec une meilleure réussite des traitements anti-estrogéniques (379,500).

L'effet anti-prolifératif de ER $\beta$  semble également provenir de son action non-génomique. Alors que dans la majorité des cas la signalisation extranucléaire de l'estrogène induite par ER $\alpha$  dans les cancers du sein favorise la prolifération et/ou la prévention de

l'apoptose (509), malgré le peu d'information encore disponible, les études semblent démontrer que l'action non-génomique de ER $\beta$  favorise l'activation de cascades antiprolifératives. ER $\beta$  membranaire régule positivement l'activité de la MAP kinase p38, connue pour ses effets proapoptotiques (85, 86). Son activation par l'action non-génomique de ER $\beta$  a un effet antiprolifératif dans les cellules de cancer du colon (74, 510). De plus, contrairement à ER $\alpha$ , l'estrogène ne provoque pas l'activation rapide de la kinase pro-oncogénique AKT par ER $\beta$  et semble même, dans certains cas, diminuer son activité (81). Ces résultats concordent avec d'autres études qui démontrent que ER $\beta$  cytoplasmique n'interagit pas avec PI3K, la kinase régulatrice de l'activité de Akt (80, 511). Également, bien que le mécanisme ne soit pas clairement identifié, mes résultats démontrent que l'action non-génomique de ER $\beta$  favorise l'activation de la kinase GSK-3 qui est connue pour restreindre l'action de plusieurs voies oncogéniques (voir chapitre 3 section 2.2).

Évidemment, il y a toujours exception à la règle. Par exemple, par son action non-génomique, ER $\beta$  interagit et module l'activité de la kinase Src (78, 87) et, en complexe avec AR, favorise la prolifération dans les cellules cancéreuses du colon (512). Également, tel que mentionné dans la section précédente, ER $\beta$  promeut la prolifération des tumeurs pulmonaires et thyroïdiennes. Par ces observations, il faut faire attention au terme anti-prolifératif accordé à ER $\beta$ . Car, comme le prouve les exemples si haut mentionnés et les études démontrant qu'une prolifération estrogène dépendante est observée dans les cellules ER $\alpha$ -négatives/ER $\beta$ -positives (513), il serait faux de dire que ER $\beta$  ne favorise pas la prolifération. Selon mon interprétation, ER $\beta$  possède clairement un pouvoir prolifératif beaucoup plus faible que ER $\alpha$  et conséquemment, plus la présence de ER $\beta$  sera abondante, plus la prolifération estrogène-dépendante sera soutenue.

En résumé, tous les résultats/observations mentionnés dans les deux sections précédentes illustrent bien que les ERs exercent des fonctions similaires et distinctes et que l'action des ERs sur le développement, le fonctionnement et la prolifération est fortement influencée par l'environnement cellulaire dans lequel ils se trouvent, laissant sous-entendre

la complexité de leur régulation, d'où l'importance de bien comprendre les mécanismes impliqués.

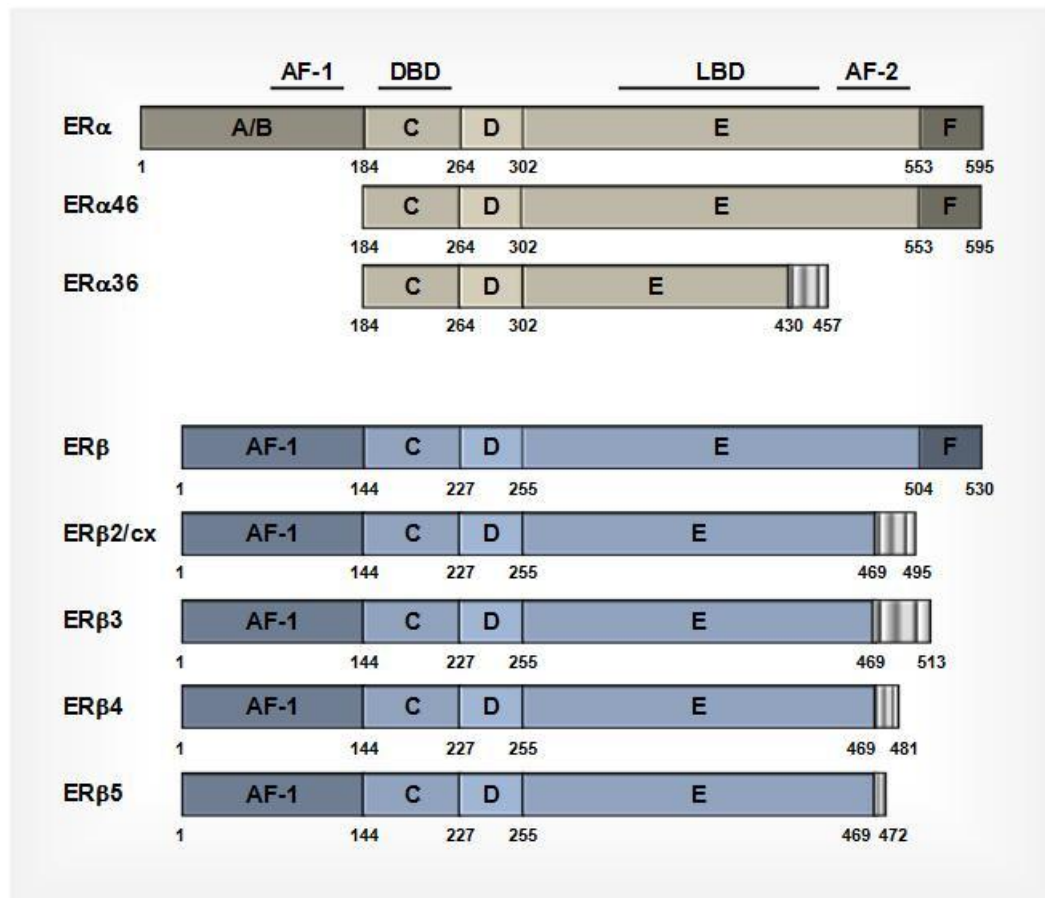
## 6.2 – Variants d'épissage des ERs

On retrouve plus d'une dizaine de variants d'épissage pour chaque isoforme des ERs (514). Ils peuvent être le résultat d'une version tronquée de ERs (figure 20), d'une duplication d'exons, etc. Ils sont répertoriés en fonction du type d'épissage dont ils proviennent (515). Ils sont exprimés dans une variété de tissus et lorsque coexprimés en présence des ERs de type sauvage, ils peuvent influencer positivement ou négativement leur transcription. Originellement découvert en 1990, nous savons encore peu de chose concernant leurs rôles physiologiques et pathologiques. Par contre, un nombre croissant d'évidences démontrent que certains variants d'épissage jouent un rôle physiologique important au niveau du cerveau, du sein, des organes reproducteurs masculins et féminins, du système respiratoire, gastrique et immunitaire (514). Puisqu'ils sont souvent exprimés et/ou coexprimés avec les ERs de type sauvage dans les cancers, l'évaluation de leur niveau d'expression lors du diagnostic est hautement envisagée.

### 6.2.1 – Isoformes de ER $\alpha$

Parmi les versions tronquées de ER $\alpha$  (66KDa), on retrouve les isoformes hER $\alpha$ -36 (36KDa) et hER $\alpha$ -46 (46KDa) (516,517). D'abord découvert dans les cellules de cancer du sein (MCF-7), l'isoforme hER $\alpha$ -36 ne possède aucun domaine d'activation mais conserve son DBD, sa région charnière, son LBD et des sites qui peuvent être myristoylés, suggérant qu'il pourrait s'ancrer à la membrane. Les études démontrent qu'il est, en effet, préférentiellement associé à la membrane plasmique où il favorise la prolifération cellulaire des cancers mammaires en permettant l'activation non-génomique des MAPKs en réponse à l'estrogène (518,519). Des hauts niveaux d'expression de hER $\alpha$ -36 sont associés à une réponse défavorable des patientes aux traitements anti-estrogéniques (520). hER $\alpha$ -36 a

également été détecté dans des cellules du colon et semble jouer un rôle dans la progression et le développement des cancers colorectaux (521).



**Figure 20 : Variants d'épissage des ERs**

Représentation schématique de quelques variants d'épissage des ERs.

À l'inverse de hERα-36, l'isoforme hERα-46 semble être en mesure d'exercer une action antiproliférative. Ce récepteur ne possède pas de domaine AF-1 et les études démontrent qu'il est en mesure d'antagoniser l'effet prolifératif de ERα dans les ostéoblastes (522) et dans les cellules de cancer du sein (517, 523). Une diminution de son expression est observée dans les cellules cancéreuses mammaires résistantes aux traitements anti-estrogéniques et sa surexpression exogène dans ces cellules est favorable à

l'action des traitements (524). Sa présence a également été observée dans les macrophages (525), les cellules du colon (521) et les cellules endothéliales (526).

### **6.2.2 – Isoformes de ER $\beta$**

Jusqu'à présent, il existe cinq versions protéiques tronquées de ER $\beta$  chez l'humain. ER $\beta$ 1 (ER $\beta$ ) est le récepteur de type sauvage encodé par les exons 1 à 8. Les quatre autres variants protéiques sont issus d'épissages alternatifs du dernier exon dont la résultante est le raccourcissement de leur LBD et l'absence d'un domaine AF-2 fonctionnel. ER $\beta$  est donc le seul isoforme à pouvoir interagir avec un ligand et conséquemment le seul à pouvoir induire une réponse ligand-dépendante. ER $\beta$ 2 (ER $\beta$ cx), ER $\beta$ 4 et ER $\beta$ 5 ne peuvent former d'homodimères, mais ils peuvent s'hétérodimériser avec ER $\beta$  et ER $\alpha$  (527). En hétérodimère avec ER $\beta$ 2, 4 ou 5, l'activité transcriptionnelle de ER $\beta$  est augmentée alors que celle de ER $\alpha$  est atténuée (528-531). Plus précisément, ER $\beta$ 2 forme préférentiellement un hétérodimère avec ER $\alpha$  plutôt que ER $\beta$  et il est considéré comme un inhibiteur potentiel de l'action proliférative de ER $\alpha$  puisqu'il affecte négativement l'interaction de ER $\alpha$  avec la chromatine. Une étude suggère qu'une partie de cette inhibition serait due à l'induction de la dégradation de l'hétérodimère ER $\beta$ 2/ER $\alpha$  par le protéasome (531). Le niveau d'expression de ER $\beta$ 2 et ER $\beta$ 5 a été évalué dans les cancers mammaires et malgré que leur rôle soit encore imprécis, leur présence semblerait favorable à la réponse aux traitements anti-estrogéniques dans les tumeurs ER $\alpha$ -positives (532), mais serait propice au développement d'une résistance dans les tumeurs ER $\alpha$ -négatives (533). Quant à ER $\beta$ 3, son expression semble se limiter aux testicules et aucune étude fonctionnelle à son sujet n'a été réalisée (534).

## **6.3 – Cibler thérapeutiquement l'action des ERs**

La première ligne d'action pour traiter les cancers ER-positifs est de bloquer l'action des ERs par l'administration d'adjuvants qui viennent antagoniser la liaison de

l'estrogène sur le récepteur. Par exemple, le tamoxifène (SERM) et le fulvestrant (SERD) sont couramment utilisés mais malheureusement plusieurs patientes développent une résistance (535). Comme on connaît de mieux en mieux le fonctionnement de chaque ER et les mécanismes impliqués dans le développement de telle résistance, de nouvelles stratégies d'actions sont proposées et/ou développées par la communauté scientifique. Parmi celles-ci, les chercheurs misent sur le développement et l'utilisation de composés: 1- inhibant l'interaction des ERs avec leurs cofacteurs (536,537) ou l'ADN (538,539), 2- ciblant spécifiquement l'action de ER $\beta$  (183,540-542), 3- altérant les voies de signalisation impliquées dans l'activation ligand-indépendante des ERs (234,543-545) modulateur des récepteurs de chimiokine), 4- inhibant la production d'estrogène (546). Également, étant donné l'abondance des tissus et organes exprimant les récepteurs des estrogènes, ce n'est pas surprenant que l'estrogène et la dérégulation de la signalisation des ERs soient impliquées dans le développement ou la progression de plusieurs autres pathologies que le cancer, incluant l'ostéoporose, certaines maladies neurodégénératives et cardiovasculaires (parkinson, alzheimer, la sclérose en plaque, athérosclérose, etc.), le diabète, le lupus, l'endométriose et l'obésité (138,139). Ici encore, puisque les études démontrent de plus en plus les rôles distincts des ERs dans ces pathologies (547), les chercheurs misent sur l'utilisation des ligands sélectifs des ERs afin de les traiter (540,548).

### **6.3.1 – Modulateur sélectif des ERs (SERM)**

Le tamoxifène, le raloxifène et le toremifène sont des composés estrogéniques présentement utilisés en clinique. Pouvant agir comme agoniste ou antagoniste (agonistes partiels), on les connaît sous le nom de SERM (selective estrogen receptor modulator) (177). Les SERMs compétitionnent avec la liaison de l'estrogène au niveau du LBD de ER $\alpha$  et ER $\beta$ . L'action antagoniste des SERMs provient du fait que bien qu'ils engendrent la dimérisation et la translocation des ERs dans le noyau, leur présence va réorienter l'hélice H12 de l'AF-2 de manière à favoriser le recrutement des corépresseurs transcriptionnels (42,46,47 ,549). Le niveau d'expression des corépresseurs dans la cellule

aura une répercussion directe sur la sensibilité des ERs à l'action antagoniste des SERMs (550,551). Permettant le recrutement de coactivateurs au niveau de l'AF-1, l'action agoniste des SERMs est directement dépendante de l'AF-1 des ERs et du niveau d'expression des coactivateurs dans la cellule (552,553). Par exemple, en raison de leur AF-1 différent, le tamoxifène peut agir comme agoniste pour ER $\alpha$  sur un ERE, mais agira sur ER $\beta$  exclusivement en tant qu'antagoniste (182). Dans les cellules de l'endomètre où SRC-1 est hautement exprimé, le tamoxifène agit comme agoniste alors que dans les tissus mammaires, où le niveau d'expression de SRC-1 est beaucoup plus faible, il agit comme antagoniste (554). L'action agoniste du tamoxifène dans ce tissu augmente de 2 à 5 fois le risque des patientes de développer un cancer de l'endomètre ainsi qu'une maladie thromboembolique (555).

De plus, toujours par un mécanisme AF-1 dépendant qui permet le recrutement de coactivateurs, le tamoxifène agit comme agoniste sur la transcription non-classique de gènes AP-1 et Sp-1 par ER $\alpha$  et ER $\beta$ , et ce, dans plusieurs types cellulaires (58,63). L'activation soutenue de cette voie d'action non-classique de ERs pourrait être néfaste pour le traitement des cancers du sein, puisqu'une association positive entre la résistance au tamoxifène et l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B et AP-1 a été démontrée (556-558). Par contre, des niveaux d'expression élevés de ER $\beta$  ne sont pas associés à la prolifération induite par le tamoxifène observée dans les tumeurs résistantes et comme ER $\beta$  est en mesure d'antagoniser l'action agoniste du tamoxifène de ER $\alpha$  sur un ERE, le ratio ER $\beta$ /ER $\alpha$  élevé est plus favorable.

Parmi la liste des SERMs, on retrouve également des composés présents dans notre environnement quotidien, tel que le bisphénol A et la génistéine. Le Bisphénol A, un composant majeur du plastique, est continuellement relargué dans notre environnement et on le retrouve dans l'eau, l'air, nos aliments etc. En liant les récepteurs des estrogènes, il mime tous les effets des estrogènes et contribue au développement de cancers du sein



(559,560). Il favorise également la prolifération des cellules ER-négatives via sa liaison au GPER (561).

À l'inverse, la génistéine, l'une des principales flavonoïdes du soja, semble avoir un effet protecteur puisque les femmes ayant une diète riche en soja sont moins à risque de développer un cancer du sein (562,563). Ce composé estrogénique agit majoritairement comme agoniste pour les deux isoformes. Par contre, ayant une affinité plus grande pour ER $\beta$ , il mime son action et inhibe la prolifération cellulaire des cancers du sein en diminuant l'expression et/ou l'activité de protéines pro-oncogénique tel que cyclin D1, Akt, ErbB2 et en augmentant l'expression de gène suppresseur de tumeur PTEN (564-566). De plus, une étude démontre que la génistéine permet de rendre les cellules plus sensibles à l'action du tamoxifène, et ce principalement en favorisant l'expression de ER $\beta$  amplifiant ainsi le pouvoir antagoniste du tamoxifène (567).

### **6.3.2 – Régulateur négatif sélectif des ERs (SERD)**

Tout comme l'estrogène et les SERMs, les SERDs (selectif estrogen receptor down-regulators), tels que le fulvestrant, se lient au LBD des ERs mais agissent comme antagonistes purs en inhibant la dimérisation et l'interaction des récepteurs avec l'ADN (568). L'action antagoniste du fulvestrant provient également du fait qu'il module la localisation cellulaire des ERs et induit la dégradation de ER $\alpha$ , mais non de ER $\beta$ , par le protéasome (569,570). Par son pouvoir exclusivement antagoniste, le fluvestrant (Faslodex ou ICI 182780) est utilisé pour traiter les cancers du sein qui ont démontré une résistance face aux autres traitements (571). Par contre le fulvestrant, tout comme le tamoxifène, agit comme agoniste sur le récepteur des estrogènes couplé aux protéines-G (GPER ou GPR30) mais la conséquence de cette activation sur la prolifération des cancers du sein est encore méconnue (92,572).

### 6.3.3 – Agonistes sélectifs spécifiques pour ER $\alpha$ et ER $\beta$

Il existe plusieurs agonistes sélectifs pour chaque isoforme, mais considérant les études qui démontrent que la prolifération induite par ER $\alpha$  contribue à la formation de tumeurs et que ER $\beta$  semble en mesure de contrecarrer cette prolifération ER $\alpha$ -dépendante, la communauté scientifique mise beaucoup sur le développement d'agoniste spécifique pour ER $\beta$  (183,541,542). Tout comme l'estrogène, ces agonistes sélectifs induisent des changements conformationnels qui vont directement influencer leur interaction avec l'ADN et le recrutement des cofacteurs transcriptionnels (45,150,573).

Le propylpyrazoletriol (PPT) est l'agoniste sélectif de ER $\alpha$  le plus utilisé et étudié. Ayant une affinité près de 400 fois supérieure pour ER $\alpha$  que ER $\beta$ , il mime presque parfaitement le patron d'expression génique de ER $\alpha$  induit par l'estrogène et n'induit pas l'activation de ER $\beta$  (150).

Les agonistes sélectifs de ER $\beta$  se séparent en trois grandes catégories : 1- Liant préférentiellement ER $\beta$ , 2- Liant spécifiquement ER $\beta$  et 3- Liant ayant une affinité similaire pour ER $\alpha$  et ER $\beta$  mais n'induisant que l'activation de ER $\beta$ . Dans le premier groupe, on retrouve le premier agoniste de ER $\beta$  à avoir été synthétisé et étudié, soit le diarylpropionitrile (DPN). Ce composé a une affinité 70 fois plus grande pour ER $\beta$  que pour ER $\alpha$  et bien qu'il active près de 170 fois plus fortement ER $\beta$  que ER $\alpha$ , il induit tout de même un patron d'expression génique similaire à l'estrogène dans les cellules ER $\alpha$ -positives/ER $\beta$ -négatives (45).

Le composé modèle du deuxième groupe est le composé synthétique ER $\beta$ -041 (Malamas 2004 (mel)). ER $\beta$ -041 a une affinité de 225 fois supérieure pour ER $\beta$  que ER $\alpha$  et il n'induit pas la prolifération des cellules des glandes mammaires et de l'utérus chez les rats (574), et diminue les lésions d'endométrioses (575). De plus, son patron d'expression génique est hautement similaire à celui de ER $\beta$ , et non ER $\alpha$ , en présence d'estrogène, démontrant sa haute sélectivité pour ER $\beta$  (45).

Découvert en 2007, des composés phytoestrogéniques ont été ajoutés à la liste des agonistes sélectifs de ER $\beta$ , soit MF101 et la liquiritigenin (LIQ), et ils représentent bien la troisième catégorie. MF101 (Menerba) est un extrait dérivé de 22 plantes traditionnellement utilisées en médecine chinoise (576) et LIQ a été isolé à partir d'une des plantes constituant MF101 (577). MF101 et LIQ lient de façon équivalente ER $\alpha$  et ER $\beta$  mais ne régulent pas la transcription en présence de ER $\alpha$  et ne stimulent pas la croissance utérine ni la formation de tumeur chez les modèles de souris (576,577). Des études réalisées sur l'humain démontrent que MF101 réduit les bouffées de chaleur chez les femmes péri et post-ménopausées (578,579). Plus sécuritaire que l'estrogène, son utilisation pourrait bientôt remplacer l'estrogène dans les traitements d'hormonothérapie.

Combinés, ces résultats démontrent que le développement d'agonistes sélectifs de ER $\beta$ , et plus particulièrement des agonistes des deux derniers groupes, représente un avenir prometteur et plus sécuritaire pour le traitement de plusieurs conditions physiopathologiques estrogène-dépendantes. De plus, l'utilisation de tels composés pourrait s'avérer très utile pour l'étude plus approfondie des rôles moléculaires spécifiques à ER $\beta$ . Par contre, il faudra faire attention à l'interprétation car, malgré un patron d'expression génique hautement similaire à celui engendré par l'estrogène, on remarque que ER $\beta$ -041, MF101, LIQ et DPN induisent différemment l'enrichissement de certains gènes impliqués dans divers processus biologiques importants et que ce patron diffère d'un type cellulaire à l'autre (45).

### **6.3.4 – Cibler l'action des ERs autrement que par un ligand**

#### **6.3.4.1 – Composés interférant avec la liaison à l'ADN ou les cofacteurs**

Récemment les composés DIBA (disulfide benzamide) et TPBM (theophylline, 8-[(benzylthiol)methyl]) ont été identifiés comme pouvant inhiber l'interaction de ER $\alpha$  avec

l'ADN (539,580). DIBA interagit spécifiquement avec le motif en doigt de zinc du DBD et sa présence dans des cellules de cancers du sein résistantes au tamoxifène permet de rétablir l'action de l'antiestrogène suggérant qu'il pourrait être utilisé en combinaison avec le tamoxifène (538). Le TPBM inhibe la transcription de ER $\alpha$  dans les cellules de cancers du sein et la croissance estrogénique ER $\alpha$ -dépendante dans les cellules cancéreuses ovariennes suggérant qu'il pourrait potentiellement être utilisé comme agent thérapeutique (539).

Également, des inhibiteurs de l'interaction entre ERs et ses cofacteurs ont été développés. Bien que leur impact biologique dans les cancers n'ait pas été encore évalué, les CBIs (coactivator binding inhibitors) semblent avoir un fort potentiel thérapeutique. Ils interfèrent avec la liaison des SRC-1 (581) et SRC-3 (536) sur ER $\alpha$  et une autre étude démontre que la majorité des CBIs pyrimidine démontrent une sélectivité plus grande pour ER $\alpha$  que ER $\beta$  (537).

#### **6.3.4.2 – Inhibiteurs de l'aromatase (AIs)**

Le fait que l'incidence des cancers du sein chez les femmes post-ménopausées, donc n'ayant plus d'ovaires fonctionnels, soit plus élevée a longtemps été un questionnement. Nous savons maintenant que la production d'estrogène chez ces femmes est de 10 à 50 fois plus élevée dans les tissus mammaires que dans le sang et que la concentration d'estrogène dans les tissus cancéreux est encore plus élevée que dans un tissu sain (582). Ce phénomène démontre bien que l'estrogène peut être produit *de novo* dans les différents organes par la présence de l'aromatase, enzyme permettant la biosynthèse d'estrogène à partir des androgènes, et ainsi favoriser le développement de tumeurs (4). Ces observations ont mené à l'utilisation d'inhibiteur de l'aromatase (AI), tel que l'anastrozole, le letrozole et l'exemestane, pour atténuer la synthèse d'estrogène et ainsi traiter certains types de tumeurs estrogènes dépendantes (491,546). Des études cliniques faites sur des cohortes de femmes post-ménopausées démontrent que les AIs, utilisés seuls ou séquentiellement avec le tamoxifène, sont plus efficaces que le tamoxifène pour prévenir la récurrence des cancers (583,584). Ils sont également utilisés pour traiter les cancers du sein métastatiques (585).

Par contre, comme pour les autres traitements, les patientes peuvent développer une résistance mais une étude récente faite chez la souris démontre que cette résistance peut être palliée par l'utilisation de l'agoniste de ER $\beta$ , le DPN, dont la présence, seulement en combinaison avec l'AI, inhibe la croissance cellulaire en provoquant l'arrêt du cycle cellulaire.

#### **6.3.4.3 – Inhibiteurs de la transduction des signaux**

Comme mentionné tout au long de cette thèse, l'activité des ERs est fortement régulée par la signalisation intracellulaire et certaines voies sont impliquées dans le développement de résistance. On peut alors s'attendre à ce que l'utilisation d'inhibiteurs des voies de signalisation impliquées dans la régulation des ERs aura un impact favorable en atténuant la prolifération des cancers hormonaux-résistants et/ou en prolongeant le délai avant l'apparition d'une résistance. Par exemple, l'utilisation du gefitinib (anti-EGFR), du trastuzumab ou du pertuzumab (tous deux anti-ErbB2) en combinaison avec le tamoxifène ou le fulvestrant lors de traitement de chimiothérapie permet d'amplifier l'effet antiprolifératif des antiestrogènes et favoriser l'apoptose (543,544). Quoique encore au stade expérimental, l'utilisation d'inhibiteurs de la farnesyltransferase (FTI), enzyme clé de la régulation des protéines Ras, inhibe la croissance *in vitro* de plusieurs tumeurs, incluant les cancers du sein, en induisant l'apoptose et son utilisation bonifie l'action du tamoxifène et des AIs (586). L'utilisation d'inhibiteurs de la voie CXCL12(SDF-1)/CXCR4/CXCR7 tel que les bicyclams (analogues du SDF-1), CTCE-9908 ou TN14003, semble prometteuse puisque les études précliniques *in vitro* ou *in vivo* sur les souris démontrent qu'ils favorisent l'inhibition des tumeurs primaires et ont des effets anti-métastatiques (234). Également, l'inhibition des voies de signalisation en ciblant les protéines plus en aval dans ces voies, tels que les MAPKs, Akt et les tyrosines kinases, est envisagée et/ou présentement en étude clinique (18,587,588).

L'activité des ERs est également hautement régulée par la voie ubiquitine-protéasome et la sumoylation. Telle que décrite dans les sections précédentes, une

dérégulation de ces voies favorise la progression et le développement de tumeurs, incluant les cancers ER-dépendants (voir section 5.2 et 5.3). Plusieurs approches pour altérer les fonctions d'Ubc9 sont présentement expérimentées (89,474) et le bortezomib, un inhibiteur du protéasome utilisé en clinique pour traiter différents types de cancers (329), lorsque combiné avec le fulvestrant accentue l'effet anti-prolifératif de l'antiestrogène (589).

Finalement, tous ces composés et/ou stratégies d'actions développés afin de traiter adéquatement les cancers ER-dépendants ont pu l'être grâce à notre meilleure compréhension de l'impact de la signalisation sur la régulation de ERs et sur le développement de résistance, démontrant l'importance de telles études. Par contre, même si nous sommes mieux équipés qu'il y a quelques années, il reste beaucoup à découvrir !

## 7 – Hypothèse et objectifs

ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont d'importants régulateurs du développement et de la croissance de divers tissus/organes et une régulation aberrante de leur activité est associée à l'initiation et la progression de cancers. De plus, malgré une certaine similitude fonctionnelle, les ERs sont en mesure d'exercer des fonctions distinctes et ces différences fonctionnelles se reflètent dans plusieurs conditions physiologiques et pathologiques notamment dans les cancers gynécologiques où des évidences récentes associent un potentiel anti-tumorigénique à ER $\beta$ , contrairement au pouvoir pro-prolifératif connu de ER $\alpha$ . Leur activité, ligand-dépendante et indépendante, est hautement régulée par les modifications post-traductionnelles et un déséquilibre de certaines voies de signalisation ont été associées à la progression de tumeurs ER-positives et/ou au développement d'une résistance face à différentes thérapies endocrines. De par leurs différences structurelles, les ERs sont différemment régulés par les MPTs et ces modifications semblent être les principaux instigateurs des différences physiopathologiques observées entre les ERs. Par contre, contrairement à ER $\alpha$ , nos connaissances de l'impact des MPTs sur la régulation de ER $\beta$  sont encore très limitées et les recherches faites tout au long de mes études de doctorat ont été réalisées en fonction d'augmenter notre compréhension sur ce sujet.

L'activité des ERs est hautement régulée par la voie ubiquitine-protéasome. En plus de permettre de contrôler leurs réponses physiologiques en limitant leur niveau d'expression, la dégradation est essentielle à une réponse maximale des ERs en réponse au ligand. Par le 1<sup>er</sup> article nous avons étudié le rôle encore inconnu de la voie ubiquitine-protéasome sur la régulation des ERs en absence de ligand en :

- a) Évaluant l'impact de l'inhibition de la dégradation sur l'activité de ER $\beta$  en comparaison à ER $\alpha$ .
- b) Déterminant la région des récepteurs impliquée dans cette différence.
- c) Définissant les signaux et les mécanismes en jeu.

- d) Évaluant le rôle de ces événements sur la stabilité, le comportement/localisation et l'activité de ER $\beta$ .

Également, la sumoylation, une modification dont la cascade enzymatique est hautement similaire à l'ubiquitination mais dont les conséquences divergent, a récemment été reconnue comme ayant un impact majeur de l'activité de plusieurs récepteurs nucléaires, incluant ER $\alpha$ . Le but de mon 2<sup>ième</sup> article était d'étudier le rôle encore inexploré de la sumoylation sur la régulation de ER $\beta$  en :

- a) Évaluant l'impact de SUMO-1 sur l'activité et la stabilité du récepteur.
- b) Localisant la région du récepteur impliquée dans cette régulation.
- c) Identifiant le site de sumoylation.
- d) Définissant les mécanismes et signaux moléculaires en jeu afin d'édifier au mieux l'ordre et la cascade des événements.
- e) Évaluant l'impact de cette modification sur la régulation des gènes cibles de ER $\beta$  dans les cellules cancéreuses mammaires.



## Chapitre 2 : Résultats

### 1 – 1<sup>ère</sup> publication

#### **Phosphorylation of Activation Function-1 Regulates Proteasome-dependent Nuclear Mobility and E6-AP Ubiquitin Ligase Recruitment to the Estrogen Receptor $\beta$**

**Nathalie Picard<sup>1,2,\*</sup>, Catherine Charbonneau<sup>1,2,\*</sup>, Mélanie Sanchez<sup>1,2</sup>, Anne Licznar<sup>4</sup>,  
Muriel Busson<sup>4</sup>, Gwendal Lazennec<sup>4</sup>, and André Tremblay<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup>Research Center, CHU Ste-Justine, and Departments of Biochemistry<sup>2</sup>, and Obstetrics & Gynecology<sup>3</sup>, University of Montreal, Montréal, QC, H3T 1C5, Canada

<sup>4</sup>INSERM, U844, Site Saint Eloi, 80 rue Augustin Fliche, Montpellier, F-34091, France, and University of Montpellier I, F-34090, France

Keywords: estrogen receptor; ER $\alpha$ ; ER $\beta$ ; AF-1; AF-2; MAPK/Erk; growth factors; ubiquitin; 26S proteasome; MG132; clasto-lactacystin; FRAP; photobleaching; E6-AP; E3 ubiquitin ligase

short title: Phosphorylation regulates ER $\beta$  turnover

\*, These authors have contributed equally

DISCLOSURE STATEMENT: The authors have nothing to disclose.

Correspondence should be addressed to:  
André Tremblay, Research Center, Ste-Justine Hospital, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec), H3T 1C5, Canada.

## 1.1 - Mise en contexte

La voie ubiquitine-protéasome est un processus essentiel pour l'activité hormono-dépendante et indépendante des récepteurs nucléaires. En plus de permettre de contrôler les réponses physiologiques des récepteurs en limitant leur niveau d'expression, le recyclage protéique par le protéasome permet leur réponse transcriptionnelle optimale. Contrairement à ER $\alpha$ , l'impact de cette voie sur la régulation de ER $\beta$  est très peu caractérisé. Outre le fait que l'activation estrogénique maximale de ER $\beta$ , tout comme ER $\alpha$ , est dépendante de l'action du protéasome et que l'E3-ligase CHIP permet de limiter la réponse estrogénique en provoquant l'arrêt de la transcription par l'ubiquitination et la dégradation du récepteur (161), nous n'avons aucune idée de l'impact de cette voie sur l'activité ligand-indépendante de ER $\beta$ . La publication qui suit a été réalisée de façon à étudier cet effet encore inconnu. Nous avons découvert qu'en absence de ligand, l'inhibition du protéasome provoquait une réponse différente entre ER $\alpha$  et ER $\beta$  qui s'expliquait en partie par la phosphorylation des sérines 94 et 106 situées dans le domaine AF-1 de ER $\beta$ . Leur phosphorylation par les kinases Erk favorise le recrutement de l'E3-ligase E6-AP et l'ubiquitination du récepteur ciblant alors ce dernier dans la matrice nucléaire, un complexe transcriptionnellement inactif, en vue d'être dégradé. L'inhibition de la dégradation emprisonne ER $\beta$  dans la matrice empêchant alors son interaction avec l'ADN et l'induction de la transcription, expliquant ainsi l'absence d'activation, contrairement à ER $\alpha$ , observée lors de l'inhibition du protéasome. De plus, en combinaison avec les résultats du Dr. André Tremblay qui démontrent que la phosphorylation des sérines 106 et 124 par les Erks permet l'activation ligand-indépendante de ER $\beta$ , nos résultats nous ont permis de proposer un modèle cyclique d'activation-dégradation de ER $\beta$  en réponse aux Erks où ces trois sérines y jouent un rôle central.

## **Contribution des auteurs**

Nathalie Picard : À titre de premier auteur, en me basant sur les résultats préalables de Catherine Charbonneau, j'ai fait l'analyse, la conception et réalisé la majorité des expériences présentées dans le papier (sauf celles mentionnées ci-bas). J'ai également participé à l'écriture et à la correction du manuscrit.

Catherine Charbonneau : Le titre de co-premier auteur fût donné à Catherine en raison du fait qu'elle a débuté le projet et réalisé les figures 1, 2, 3A-B et 4D.

Mélanie Sanchez : En tant que troisième auteur, Mélanie m'a apporté son expertise scientifique, théorique et technique, sur la phosphorylation ainsi que son aide dans plusieurs situations. Elle a également participé à la correction du manuscrit.

Anne Licznar, Muriel Busson et Gwendal Lazennec : Le Dr. Lazennec, ainsi que deux de ces étudiantes, Anne et Muriel, ont participé à la correction du manuscrit en apportant leurs critiques et leurs commentaires.

André Tremblay : En tant que superviseur, Dr. Tremblay a supervisé et participé à la conception du projet. Il a également écrit et corrigé l'article.

## Permission de l'éditeur de la revue

The Endocrine Society  
 8401 Connecticut Avenue, Suite 900  
 Chevy Chase, MD 20815-5817  
 Telephone: 301-941-0200  
 Fax: 301-941-0259

TIN Number: 73-0531256

---

**This printable page is your letter granting copyright permission.**

Original author to publish in a Dissertation.

Date: August 22, 2011

Reference Number:

Name: Nathalie Picard

Organization: Sainte-Justine research center

Department: Biochemistry, University of Montreal

Address: Dr. André Tremblay laboratory, Room 1709, 3175 Côte-Ste-Catherine  
 City, State and Postal Code: Montreal, Quebec H3T 1C5

Country: Canada

Phone: 514-345-4931 ext4090

Journal: Molecular Endocrinology

Author Name: N Picard, C Charbonneau, M Sanchez, A Licznar, M Busson, G Lazennec, A Tremblay

Title: Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-associated protein ubiquitin ligase recruitment to the

Year: 2008

Volume: 22

Page Range: 317-330

Figure Reproduction:

Figure Number(s): all

Where will the figures appear:

- Dissertation

- Title: Régulation dynamique de l'activité du récepteurs des estrogènes beta par les MPTs

- Publisher: Université de Montréal

Additional Comments: **I am requesting to use the full article in my dissertation.**

The Endocrine Society **grants permission** to reproduce table/figure all from the selected article stated above contingent upon the following conditions: 1) That you give proper credit to the author(s) and to include in your citation, the title of journal, title of article, volume, issue number, date, and page numbers. 2) That you include the statement *Copyright 2008, The Endocrine Society*. Please understand that permission is granted for one-time use only. Permission must be requested separately for future editions, revisions, translations, derivative works, and promotional pieces.

Title: Journal Publications Coordinator

Date: August 22, 2011

**Abstract**

The ubiquitin-proteasome pathway has been recognized as an important regulator in the hormonal response by estrogen receptor ER $\alpha$ , but its impact on ER $\beta$  function is poorly characterized. In the current study, we investigated the role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating ER $\beta$  activity and identified regulatory sites within the activation function AF-1 domain that modulate ER $\beta$  ubiquitination and nuclear dynamics in a hormone-independent manner. Whereas both ER $\alpha$  and ER $\beta$  were dependent on proteasome function for their maximal response to estrogen, they were regulated differently by proteasome inhibition in the absence of hormone, an effect shown to be dependent on their respective AF-1 domain. Given the role of AF-1 phosphorylation to regulate ER $\alpha$  and ER $\beta$  activity, we found that sequential substitutions of specific serine residues contained in MAPK consensus sites conferred transcriptional activation of ER $\beta$  in a proteasome-dependent manner through reduced ubiquitination and enhanced accumulation of mutant receptors. Specifically, serines 94 and 106 within ER $\beta$  AF-1 domain were found to modulate sub-nuclear mobility of the receptor to transit between inactive clusters and a more mobile state in a proteasome-dependent manner. In addition, cellular levels of ER $\beta$  were regulated through these sites by facilitating the recruitment of the ubiquitin ligase E6-associated protein in a phosphorylation-dependent manner. These findings suggest a role for ER $\beta$  AF-1 in contributing to the activation-degradation cycling of the receptor through a functional clustering of phosphorylated serine residues that cooperate in generating signals to the ubiquitin-proteasome pathway.

## Introduction

Estrogen plays a central role in reproductive physiology but also in pathological events such as breast and endometrium cancers. Regulation of target gene expression by estrogen is mediated upon its interaction with the estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ , which belong to the nuclear hormone receptor family of ligand-activated transcription factors. Although ER $\alpha$  shares similarities in terms of structure and response to hormone with ER $\beta$ , it is considered a strong predictive factor for endocrine therapy of reproductive cancers (1,2), whereas ER $\beta$  was shown to display anti-tumorigenic properties (3–5).

The current model for transcriptional activation of estrogen responsive genes by ERs involves a conformational change upon ligand binding that favors interaction with their cognate estrogen response element (ERE) and combinatorial recruitment of transcriptional cofactor complexes that mediate chromatin reorganization and essential interactions with the basal transcription machinery (6,7). Increasing evidence indicates that upon activation of ER $\alpha$  by estrogen, the recruitment of cofactors involved in chromatin remodeling, post-translational modifications and transcriptional activity among others, occurs in an ordered fashion, thereby integrating the response elicited by estrogen upon inducible promoters (8–11). Such concerted recruitment between cofactors is predicted to limit transactivation by ER $\alpha$  in response to changes in hormone levels.

Recent studies have integrated the ER $\alpha$ -mediated response to estrogen with proteasome-directed degradation of the receptor, thus supporting a mean by which target cells can sustain or limit a hormonal response through a continuous receptor turnover. ER $\alpha$  has been shown to be degraded through the 26S proteasome pathway in a ligand-dependent manner (12,13). Blocking proteasome activity with inhibitors such as MG132 impaired the ability of ER $\alpha$  to mediate a hormone-dependent transcriptional response and contributed to immobilize ER $\alpha$  in an inactive state in the nucleus (14,15). Interestingly, components of the ubiquitin-proteasome system, such as the 19S proteasome regulatory subunit Trip1/SUG1 (16,17) and the E3 ubiquitin ligases MDM2 (18) and E6-AP (19), have been shown to

enhance the transcriptional activity of several nuclear receptors including ER $\alpha$ . Moreover, these components were shown to cyclically reside with ER $\alpha$  on the pS2 responsive promoter in both a ligand-dependent and -independent manner, an effect abolished by MG132 resulting in the inhibition of pS2 gene transcription (10,11). These findings thus suggest that the proteasome-mediated degradation process is closely related to ER $\alpha$  transcriptional competence.

Ubiquitination of ER $\alpha$  has been demonstrated to vary upon the presence of hormone or antiestrogens, and the extent of ubiquitination was shown to correlate with receptor degradation, suggesting that ligand-dependent conformational changes can modulate ER $\alpha$  ubiquitination (13,20). Interestingly, unliganded ER $\alpha$  was also demonstrated to be ubiquitinated (10,13), therefore providing evidence that mechanisms other than ligand binding may dictate ubiquitination. As such, other signaling events have also been proposed to regulate ER $\alpha$  and ER $\beta$  activity. Studies have reported that the ability of epidermal growth factor EGF to activate ER $\alpha$  involved a MAPK-mediated phosphorylation of serine-118 within ER $\alpha$  AF-1 domain (21,22). Such activation of ER $\alpha$  by phosphorylation was proposed to involve coactivator recruitment at the AF-1 domain of ER $\alpha$  (23). Similarly, we demonstrated that ER $\beta$  activity is also modulated by growth factor signaling through MAPK-directed phosphorylation of AF-1 (24). Such activation was found to involve a favored recruitment of coactivators SRC-1 and CBP upon phosphorylation of ER $\beta$  AF-1 serines 106 and 124 (25,26). However, the role of AF-1 in mediating ER $\beta$  response to non-hormonal stimuli remains poorly defined and although both ER $\alpha$  and ER $\beta$  are regulated by growth factors, differences in terms of respective cofactor recruitment and AF-1 activity have been observed (27,28).

In the present study, we investigated the function of the ubiquitin-proteasome pathway in modulating the AF-1 dependent transcriptional response of ER $\beta$ . We identified specific MAPK sites within ER $\beta$  AF-1 domain that regulate ER $\beta$  activity in a proteasome-dependent manner by modulating receptor ubiquitination, sub-nuclear mobility, and

recruitment of E6-AP ubiquitin ligase. Our results demonstrate a role for the AF-1 domain to regulate the activation-degradation process of ER $\beta$ , thereby integrating its response to changes in kinase-activated pathways.

## **Results**

### **ER $\alpha$ and ER $\beta$ -mediated transcription are dependent upon proteasome function**

In order to assess the role of the proteasome pathway of degradation on ER $\alpha$  and ER $\beta$  transcriptional function, we first tested the effects of proteasome inhibition on the hormonal response of both receptors in human embryonic kidney 293 cells transfected with either ER $\alpha$  or ER $\beta$  and the estrogen-responsive luciferase reporter EREbLuc construct. As also reported (14), ER $\alpha$  mediated transcriptional activation in the presence of estrogen was nearly abolished by MG132, an inhibitor of the 26S proteasome (Fig. 1A). The hormonal response of ER $\alpha$  was also decreased using clasto-lactacystin, an irreversible proteasome inhibitor. Under the same conditions, we also observed that ER $\beta$  was subjected to a similar dependence on the proteasome pathway in its response to estrogen (Fig. 1A). These results indicate that maximal activation of ER $\alpha$  and ER $\beta$  by estrogen requires proteasome function.

In order to test whether the activity of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in absence of hormone was also dependent upon proteasome function, 293 cells were treated with increasing doses of MG132 in absence of estrogen and ER-driven luciferase activity was measured. We found that whereas basal ER $\alpha$ -mediated transcription was enhanced by MG132, similar doses of inhibitor had no significant effect on ER $\beta$ -dependent activity (Fig. 1B). To ensure that this difference in response of ER $\alpha$  and ER $\beta$  to MG132 is not related to variations in their cellular content, both ER $\alpha$  and ER $\beta$  are shown to accumulate in cells treated with MG132 compared to untreated cells, consistent with the inhibition of their degradation (Fig. 1C).

### **The AF-1 domain affects differently ER $\alpha$ and ER $\beta$ activity during proteasome inhibition**



Given the apparent difference in the requirement of the proteasome function involved in ligand-independent activity of ER $\alpha$  and ER $\beta$ , we determined the relative contribution of each receptor AF-1 domain on ER activity in response to proteasome inhibition. Truncated forms of ER $\alpha$  and ER $\beta$  were transfected and tested for their activity in absence of hormone. We observed that for ER $\alpha$ , removal of the N-terminal AB domain (CDEF $\alpha$  construct in Fig. 2A) did not greatly alter ER $\alpha$  response to proteasome inhibition, whereas removal of the AB region of ER $\beta$  (CDEF $\beta$  construct) resulted in a marked activation in the presence of MG132. These results suggest that each respective AF-1 domain may regulate differently the activity of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in a proteasome-dependent manner. In support of such different role, cells expressing ABC $\alpha$  construct showed a stronger activation in response to proteasome inhibition compared to cells expressing ABC $\beta$  (Fig. 2A). This apparent diverse contribution of each AF-1 was also transposable, as demonstrated with the use of chimeric forms of ER in which the AB region for each receptor was fused to the CDEF portion of the other, thus creating an ER $\alpha\beta$  and ER $\beta\alpha$  fusion chimeras. As such, the addition of the AB $\alpha$  region to CDEF $\beta$  did not significantly modify the activation levels observed for CDEF $\beta$  with MG132 or clasto-lactacystin (compare ER $\alpha\beta$  with CDEF $\beta$  in Fig. 2A), whereas fusion of AB $\beta$  to CDEF $\alpha$  decreased the activation of CDEF $\alpha$  by both inhibitors, resulting in an activation profile more closely related to ER $\beta$  than to ER $\alpha$ . These results demonstrate a role for the AF-1 domain in regulating ER $\beta$  transcriptional activity which is dependent upon proteasome function, and further suggest that regulatory signals are contained within this region to mediate receptor turnover and activity. Consistent with these observations, the N-terminal ABC $\beta$  construct was shown to strongly accumulate when expressed in cells treated with MG132 compared to untreated cells as determined by Western analysis, suggesting that this region itself is subjected to proteasome-dependent degradation (Fig. 2B). Under similar conditions, ABC $\alpha$  also accumulated but to a lesser extent than ABC $\beta$ , whereas CDEF $\beta$  and CDEF $\alpha$  levels remained respectively unaffected or slightly increased upon MG132 treatment.

**Contribution of MAPK consensus sites in proteasome-regulated transcription by ER $\beta$ .**

Our earlier studies have determined that phosphorylation of AF-1 in response to MAPK activation resulted in ER $\beta$  transcriptional activation (24,25). More specifically, phosphorylation at positions 106 and 124 in mouse ER $\beta$  contributed in a favored recruitment of coactivators SRC-1 and CBP and subsequent ligand-independent activation (25,26). Besides serines 106 and 124, other serine residues are also contained within consensus MAPK phosphorylation sites in ER $\beta$  AF-1 domain and may thus also function as putative functional targets of MAPK-associated signaling pathways. We tested the contribution of several of these MAPK sites in the proteasome-dependent regulation of ER $\beta$  activity, using serine to alanine mutants. As shown in Fig. 3A, single replacement of Ser-94, -106, or -124 conferred transcriptional activation of ER $\beta$  in the presence of MG132, while the Ser-69 substitution had no effect. Higher levels of activation were observed with the Ser-106 variant, reaching a near 4-fold increase. Interestingly, when Ser-94 was also substituted, thus creating a S94,106A double mutant, the increase in activity by proteasome inhibition was even stronger with a 7-fold increase compared to each respective single mutant. Other multiple variants containing the S106A mutation, such as the S106,124A and S94,106,124A variants, were also induced, although to a lesser extent than the S94,106A mutant, in response to proteasome inhibition (Fig. 3A). To ensure whether the apparent deregulation to proteasome inhibition in ER $\beta$  activity upon serine modifications resulted from the AF-1 domain itself, as suggested from the results presented in Fig. 2A, we performed luciferase assay with corresponding serine mutants in which the DEF region of ER $\beta$  was removed. A comparable activation profile of the ABC constructs carrying successive substitutions of Ser-94, -106 and -124, was obtained (Fig. 3B). In addition, removal of the DEF region conferred an even greater transcriptional potential to the S94,106A mutant in response to proteasome inhibition, reaching a 14-fold increase, compared to its corresponding full-length version (Figs. 3A and B). A role for the AF-2 function in regulating transcription in a manner dependent on proteasome activity has already been described for ER $\alpha$  (13,14), and our results support a similar role for ER $\beta$  as

well. However, coordinate removal of specific serine residues within ER $\beta$  AF-1 domain confers transcriptional activation when proteasome function is disrupted, raising the possibility that AF-1 regulatory sites participate in ER $\beta$  degradation by the proteasome. To test how the AF-1 serine substitutions may affect the steady-state levels of ER $\beta$ , we performed Western analysis on cells expressing wild-type and mutated ER $\beta$  in response to proteasome inhibition. Whereas wild-type ER $\beta$  levels were markedly increased in cells treated with MG132, the ER $\beta$  variants carrying the Ser-94 and/or Ser-106 substitutions, in the context of full-length or DEF-truncated receptor, were less prone to accumulate (Fig. 3C and D). Therefore, the changes in cellular levels of the S94,106A and S94,106,124A mutants did not account for the increase in their transcriptional activity following inhibition of proteasome function, but rather indicate an inverse relationship between receptor activity and cellular content. Such correlation has also been described for ER $\alpha$  in response to hormone and shown to be required to achieve maximal receptor activation (13,14).

### **Contribution of AF-1 serine residues in ER $\beta$ stability and ubiquitination**

Because we found that the S94,106A mutation rendered ER $\beta$  less prone to accumulate upon the presence of MG132, we performed a cycloheximide chase to evaluate the impact of the mutation on ER $\beta$  protein turnover. As shown in Fig. 4A and B, the half-life of ER $\beta$  increased from ~8h to approximately 12h by disruption of Ser-94 and -106, indicating that at least these residues are involved in ER $\beta$  degradation. Ubiquitination is the post-translational process commonly used to tag and direct proteins to degradation by the 26S proteasome, and the pattern and the extent to which a protein is ubiquitinated determine its rate of degradation (29). We analyzed whether ER $\beta$  was ubiquitinated in absence of ligand, and how the S94,106A substitution may affect ER $\beta$  ubiquitination *in vivo*. By expressing ER $\beta$  in cells with tagged-ubiquitin, we observed several ubiquitinated forms of ER $\beta$ , which accumulated in the presence of MG132 (Fig. 4C). Interestingly, reduced levels of ubiquitination were observed in cells expressing the S94,106A mutant, and treatment with

MG132 had moderate effect on receptor ubiquitination, when compared to wild-type ER $\beta$ . The apparent lower levels of ubiquitination of the S94,106A mutant suggest it has a reduced ability to be targeted by ubiquitination, which may then result in enhanced stability and transcriptional activity. This indicates that specific residues within the AF-1 of ER $\beta$  modulate receptor ubiquitination in absence of ligand and therefore contribute to ER $\beta$  degradation by the proteasome.

### **AF-1 modifications affect the nuclear-cytoplasmic distribution of ER $\beta$**

Receptor redistribution between nuclear and cytoplasmic compartments has been described for many nuclear receptors in response to agonists and antagonists, and at least for ER $\alpha$ , such response was shown to affect receptor proteolysis (13, 20, 30). To test whether AF-1 substitutions may alter the nuclear-cytoplasmic distribution of ER $\beta$  in a proteasome-dependent manner, we determined the relative protein levels of ER $\beta$  compared with the S94,106A mutant in each cellular compartment. Both nuclear and cytoplasmic fractions were isolated and validated for the presence of selective markers poly-ADP-ribose polymerase (PARP) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), respectively (Fig. 5A). We found higher levels of the S94,106A variant in both nuclear and cytoplasmic fractions of untreated cells, when compared with wild-type ER $\beta$  (Fig. 5B), supporting a lesser propensity of the mutant to be ubiquitinated and a prolonged half-life in conditions where proteasome function is not impaired. In addition, the levels of nuclear S94,106A mutant were not significantly changed upon proteasome inhibition, whereas ER $\beta$  strongly accumulated in the same conditions (Fig. 5B), suggesting that serines 94 and 106 are involved in the degradation of nuclear ER $\beta$  by the proteasome. In addition, to determine why the S94,106A mutant failed to accumulate in the presence of MG132, the levels of wild-type ER $\beta$  and S94,106A mutant were analyzed by Western in nuclear insoluble (matrix) and soluble fractions from cells treated or not with MG132. The results presented in Fig. 5C demonstrate that ER $\beta$  accumulates in the matrix in response to MG132, whereas a large proportion of the mutant was not affected and therefore resides in the soluble

nuclear fraction. These data suggest that Ser-94,106 regulate ER $\beta$  nuclear mobility to soluble/insoluble compartments and further support their role as recruiting signals in the clustering and immobilization of ER $\beta$  to the matrix in a manner independent of hormone.

### **Sub-nuclear trafficking of ER $\beta$ is dependent on AF-1 modifications and proteasome function**

Earlier studies using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP), have revealed the dynamic nature of steroid receptor movement within the nucleus and their association with active chromatin templates to engage transcriptional regulation (15, 31). Based on FRAP studies, the intranuclear mobility of ER $\alpha$  was found to be affected differently depending upon the addition of agonist or antagonist, indicating that ER $\alpha$  may associate to respectively transcriptionally active domains within the nucleus or immobilized to inactive clusters referred to as the nuclear matrix (10, 15, 32). Inhibition of proteasome activity was also shown to immobilize ER $\alpha$  to components of the nuclear matrix in treated cells (20, 33). Given our results on the accumulation of ER $\beta$  in the matrix compartment in response to MG132 (Fig. 5C $\uparrow$ ), we therefore determined how inhibiting proteasome activity affects the nuclear mobility of ER $\beta$  and evaluated the possible role of disrupting AF-1 activity using FRAP on live cells. FRAP analysis was performed on cells transfected with a yellow fluorescent protein (YFP) fusion of ER $\beta$ , which was initially validated for correct size by Western blot and for activity by luciferase assay (data not shown). In absence of ligand, ER $\beta$  was found highly mobile, reaching equilibrium in the bleached region within seconds, with a half-maximal recovery time ( $t_{1/2}$ ) of  $1.7 \pm 0.2$  sec ( $n = 12$  nuclei) (Fig. 6, A and B). Although slightly longer, this half-recovery time for ER $\beta$  was comparable to unliganded ER $\alpha$  ( $t_{1/2} \sim 1$  sec; data not shown and see Ref. 15), indicating that both receptors reside in a highly dynamic state, presumably awaiting for activation signals. As also reported for ER $\alpha$ , inhibiting proteasome activity with MG132 resulted in a profound immobilization of unliganded ER $\beta$ , such that the half-recovery time could not be estimated ( $t_{1/2} > 300$  sec, Fig. 6B). Such proteasome-dependent immobilization has been suggested to result from the clustering and association to non-chromatin templates, which is

consistent with the transcriptional activity we measured for ER $\beta$  in the presence of MG132. Remarkably, removal of Ser-94 and -106 in ER $\beta$  resulted in a more mobile receptor in the presence of MG132 ( $t_{1/2} = 39 \pm 5$  sec;  $n = 15$  nuclei), suggesting that these sites were important to facilitate ER $\beta$  to immobilize in response to proteasome inhibition (Fig. 6B). This behavior was also observed with the S94,106,124A mutant ( $t_{1/2} \sim 60$  sec; data not shown). These results indicate that disruption of ER $\beta$  AF-1 activity may allow the receptor to escape from associating with inactive clusters during proteasome inactivation, and therefore become available for transcriptional regulation. Consistent with these findings is the potent activation we observed for the S94,106A and S94,106,124A mutants by MG132 (Fig. 3, A and B).

### **The E6-AP ubiquitin ligase regulates ER $\beta$ degradation and activity**

E6-AP, an E3 ubiquitin-protein ligase proposed to mediate substrate specificity of the ubiquitin-proteasome degradation system (34), has been shown to participate in the degradation of ER $\alpha$  in response to estrogen (19, 35, 36). We tested whether E6-AP could also regulate the degradation of ER $\beta$  in transfected 293 cells. Coexpression of ER $\beta$  with E6-AP lead to a dramatic reduction in ER $\beta$  steady-state levels in absence of hormone as shown in Fig. 7A, an effect relieved by the addition of MG132, indicating that E6-AP is involved in ER $\beta$  degradation through the proteasome pathway. The S94,106A mutant was also subjected to E6-AP-dependent degradation but to a lesser extent than wild-type ER $\beta$ . Similarly, Fig. 7B shows a similar decrease in ER $\beta$  levels in response to increasing amounts of E6-AP in cells transfected with constitutive Mek1 and Erk plasmids, a condition that promotes ER $\beta$  phosphorylation and activity (25, 26). Under the same conditions, the S94,106A mutant was less affected. These effects were dependent on the E3 ligase activity of E6-AP, as demonstrated with the use of a ligase-defective C833A mutant that did not decrease ER $\beta$  levels (Fig. 7B).

The expression of E6-AP also reduced the half-life of ER $\beta$  in cells to approximately 4 h, compared with approximately 8 h in cells not transfected with E6-AP, whereas the turnover rate of the S94,106A mutant was less affected with a half-life of approximately 11 h (compare Figs. 7C, left panel, and 4B). Activation of Erk in cells expressing ER $\beta$  also contributed to accelerate its degradation with a half-life of approximately 2 h, an effect shown to be highly dependent upon the integrity of Ser-94 and -106 (Fig. 7C, right panel). Besides its role as an E3 ubiquitin-protein ligase, E6-AP has also been described to enhance the transcriptional activity of various steroid hormone receptors such as progesterone receptor, androgen receptor and ER $\alpha$  in response to hormone (19, 37). We therefore determined the potential of E6-AP to regulate ER $\beta$  activity using luciferase assay. Interestingly, both basal and Erk-stimulated activities of ER $\beta$  were reduced upon expression of E6-AP in cells, whereas disruption of Ser-94 and -106 severely impaired the effects of Erk and E6-AP on ER $\beta$  and enhanced its basal activity presumably due to the increased mutant stability (Fig. 7D). The repression of ER $\beta$  by E6-AP was also dependent on the integrity of E6-AP E3 ligase activity, as the C833A mutant had no effect. These results indicate that the repression exerted by E6-AP on ER $\beta$  activity is linked with its ability to mediate ER $\beta$  degradation in absence of hormone, and further emphasize the role of Ser-94 and 106 as critical residues involved in ER $\beta$  degradation and activity.

**The E6-AP ubiquitin ligase is recruited to ER $\beta$  in a phosphorylation-dependent manner through serines 94 and 106**

Based on the potential of E6-AP to regulate ER $\beta$  turnover, we then addressed whether E6-AP can be recruited to ER $\beta$  using coimmunoprecipitation assays. Figure 8A shows that E6-AP was detected in the ER $\beta$  immunoprecipitates, indicating that both proteins can interact. However, the extent by which E6-AP can be recruited to ER $\beta$  was severely diminished upon disruption of Ser-94 and -106, suggesting that these sites behave as important determinants in the interaction. More interestingly, the recruitment of E6-AP to ER $\beta$  was more pronounced in response to MAPK activation as shown in cells transfected with Mek1 and Erk compared with control cells (Fig. 8B). The S94,106A mutation severely

impaired the effect of Erk activation on the ability of ER $\beta$  to efficiently recruit E6-AP (Fig. 8B). These results suggest that the interaction of ER $\beta$  with E6-AP is regulated in a phosphorylation-dependent manner and involves Ser-94 and -106 of ER $\beta$  AF-1 domain.



## Discussion

In this study, we identify an important and unrecognized function of the AF-1 domain in targeting ER $\beta$  to the degradation process mediated by the ubiquitin-proteasome system. The current model of ER degradation has mostly been described for ER $\alpha$  in response to estrogen. Studies using proteasome inhibitors have shown that the hormonal activation of ER $\alpha$  was dependent upon the ubiquitin-proteasome pathway, therefore establishing a correlation between receptor degradation and activity, an observation also made for other nuclear receptors (12, 38). Similarly to ER $\alpha$ , we report that the response of ER $\beta$  to estrogen also required the proteasome function to achieve optimal receptor activation. However, in absence of hormone, whereas both ERs accumulated in cells treated for proteasome inhibition, the role of the proteasome in maintaining basal ER activity seemed to be different between the two receptor isoforms. Such dependence resides within the N-terminal region of each receptor, which were both stabilized upon proteasome inhibition but conferred a different responsiveness in terms of activity. Using a truncated ER $\alpha$ , Lonard et al. (14) have also reported an increased stability of ER $\alpha$  N-terminal region during proteasome inhibition. The significance of an apparent correlation between AF-1 activity and ER degradation is not completely understood, but it becomes clear that AF-1 activity could impact ER turnover and that this may occur in an isoform-dependent manner. Consistent with this, whereas the AF-1 region was shown to regulate the ligand-induced degradation of ER $\alpha$  (39), our results indicate that the role of ER $\beta$  AF-1 on receptor degradation can be uncoupled from the hormonal response.

The mechanistic activation of AF-2 function by ligand has been well detailed for nuclear receptors and in particular, crystallographic studies of ER $\alpha$  and ER $\beta$  ligand binding domains have helped to identify the structural determinants involved (40, 41, 42, 43). In contrast, modulation of AF-1 activity of estrogen receptors is intricate and variable and mostly depends on posttranslational modifications including phosphorylation. It is known that in response to growth factors, such as EGF, the activity of ER $\alpha$  and ER $\beta$  is associated

with phosphorylation of their respective AF-1 (2, 22, 44). The AF-1 domain of ER $\beta$  contains many putative phosphorylation sites of which Ser-106 and -124 were described to be directly phosphorylated by MAPK resulting in AF-1 activation of the receptor in response to EGF or ras (24, 25). Here, we show that these clustered serines along with Ser-94 are also involved in ubiquitination and turnover of ER $\beta$ , therefore providing evidence that the region within AF-1 that signals ER $\beta$  to degradation overlaps with the one involved in its activation by growth factor signaling pathways. This apparent paradoxical roles shared by the same domain within ER $\beta$  raised the possibility that both events, *i.e.* ubiquitination and transactivation, are required to mediate optimal AF-1 response of ER $\beta$  to nonhormonal stimuli. Such dual role for an activation domain to also signal to ubiquitination was reported to be important in limiting the activation potential of transcription factors (45). As opposed to other steroid receptors such as ER $\alpha$  and progesterone receptor, for which phosphorylation of their AF-1 was linked to hormone-dependent degradation and activity (39, 46), our results indicate that the AF-1 of ER $\beta$  appears to be sufficient in mediating such response. Supporting this hypothesis, we have observed that the N-terminal region of ER $\beta$  can be ubiquitinated in a manner similar to the full-length receptor and that such ubiquitination was also dependent on the integrity of Ser-94 and -106 (data not shown). In addition, we found that ER $\beta$  missing the AF-1 domain (CDEF $\beta$  construct) did not accumulate in response to MG132, an effect also observed by others (47). Our interpretation from these findings is that, in absence of hormone, Ser-94 and Ser-106 within the AF-1 domain provide the signal(s) that triggers ER $\beta$  ubiquitination. Recently, Tateishi et al. (47) have reported that the N-terminal domain of human ER $\beta$  corresponding to amino acids 1–37 was necessary for its degradation by estrogen. Whether the immediate N-terminal region of ER $\beta$  regulates ligand-dependent ubiquitination and/or receptor degradation in a manner similar to the region containing Ser-94 and -106 in absence of hormone is not known, but it can be predicted that although different stimuli, either hormonal or kinase-derived, regulate ER $\beta$  activity, they may also converge toward a common mechanism that dictates receptor turnover. In addition, given the significant

impact of the N-terminal region of ER $\beta$  to regulate receptor ubiquitination, the exact site(s) of such ubiquitination remains, however, unknown. Ubiquitin are typically conjugated to lysine residues in targeted proteins and many conserved lysines reside in the N-terminal region of ER $\beta$  from several species. However, attempts to delineate the ubiquitination sites in the N-terminal domain of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in response to hormone have not resulted in the identification of the targeted lysines (39, 47). So clearly, the exact mapping of the ubiquitination sites in the context of AF-1 activity of ER $\beta$  remains to be determined.

Recent studies based on fluorescent-based approaches have revealed the dynamic nature of ER $\alpha$  movement within the nucleus and its association with active chromatin templates to engage transcription in response to ligands, or its immobilization to inactive clusters referred to as the nuclear matrix during proteasome inhibition (10, 15, 32, 33, 48). We have therefore performed FRAP analysis to evaluate the mobility of ER $\beta$  in conditions in which proteasome activity was inhibited and on the possible role of disrupting AF-1 activity on ER $\beta$  nuclear dynamics. In absence of ligand, ER $\beta$  was found highly mobile, reaching equilibrium with a half-maximal recovery time comparable with ER $\alpha$ , indicating that both ERs reside in a highly dynamic state, presumably awaiting activation signals. Remarkably, whereas addition of MG132 resulted in a profound immobilization of ER $\beta$ , likely reflecting its clustering to non-chromatin templates, removal of Ser-94 and Ser-124, concomitantly with Ser-106, resulted in a more mobile receptor. These results suggest that disruption of ER $\beta$  AF-1 activity may allow the receptor to escape from associating to inactive clusters during proteasome inhibition, and to become or remain available for transcriptional regulation. Consistent with this hypothesis is the potent activation we observed for the S94,106A mutant in the presence of MG132, and its reduced ubiquitination and capacity to cluster to nuclear matrix, indicating that disruption of these residues leads to a deregulated ER $\beta$  less prone to proteasome-mediated degradation. The apparent inability of the AF-1 mutants to behave such as the wild-type ER $\beta$  and remained clustered and immobilized during proteasome inhibition, raised the interesting question as to whether AF-1 phosphorylation could signal ER $\beta$  to transit from active to inactive

chromatin compartments. Our observations indicate that this process occurs in a ligand-independent manner, thereby providing a unique potential of AF-1 to target ER $\beta$  to the nuclear matrix in kinase-activated cells. Because serine 106 and other residues that participate in the response of ER $\beta$  to growth factor signaling are conserved among nuclear receptors (2, 25), it would be expected that the ER $\beta$  intranuclear behavior may be shared with other nuclear receptors described to also be regulated by kinase-activated pathways. Consistent with this, we recently reported that activation of Akt modulated the intranuclear behavior and activity of ER $\beta$ , and its segregation with coactivator CBP through a conserved Akt site shared with other nuclear receptors (49).

The transcriptional deregulation of ER $\beta$  characterized by its enhanced activity during proteasome inhibition upon AF-1 disruption was rather intriguing and suggested a mechanism by which the AF-1 may participate in restraining or at least maintaining an adequate and regulated response of ER $\beta$  to cellular pathways involving MAPK activation. In an attempt to partly elucidate such mechanism, the E6-AP ubiquitin ligase was found to be favorably recruited to ER $\beta$  in response to signals that promote ER $\beta$  phosphorylation. Notably, this interaction was strongly dependent upon the presence of Ser-94 and -106, which resulted in a more rapid degradation of ER $\beta$  in response to Erk activation. This suggests that phosphorylation at these sites regulates ER $\beta$  turnover through the functional recruitment of components of the proteasome degradation pathway. Many studies, mostly involving ER $\alpha$ , have depicted a role for estrogen to modulate ER cellular levels through the ubiquitin-proteasome pathway, thereby providing a functional link between receptor turnover and activity. As such, several proteins that exhibit E3 ubiquitin-protein ligase activity, such as Mdm2 (18, 50), CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein) (51, 52), BRCA1 (breast cancer gene 1) (53) and E6-AP (19), have been shown to modulate the hormonal response of ER $\alpha$ . In that respect, E6-AP was described as a dual-function protein that associates with ER $\alpha$  to promote its degradation and coactivation by estrogen (19, 35, 36). This study extends the role of E6-AP to regulate ER $\beta$  degradation through the proteasome pathway and, with the increased ability of ER $\beta$  to recruit E6-AP compared with

the S94,106A mutant in response to Erk activation, it further identifies a novel function for serines 94 and 106 in maintaining suboptimal ER $\beta$  levels. These observations support the model shown in Fig. 9 in which the AF-1 domain provides the necessary signals through phosphorylation of critical residues that serve to recruit E6-AP to dictate ER $\beta$  turnover under ligand-independent mechanisms. The requirement of estrogen to achieve such ER $\beta$  regulation to kinase activation by E6-AP is not necessary because it was also the case for the recruitment of coactivators SRC-1 and CBP in response to MAPK activation (Refs. 25 and 26 and Fig. 9). However, we found that in contrast to ER $\alpha$ , the response of ER $\beta$  to estrogen was reduced by E6-AP (Picard, N., and A. Tremblay, unpublished observations), indicating that the potential of E6-AP to regulate the response to hormone differs for each ER. This raises the interesting possibility that a selective recruitment and use of specific E3 ligases may depend on how ER $\alpha$  and ER $\beta$  integrate various cellular signals to regulate their turnover and activity. Consistent with this, the recruitment of Mdm2 and E6-AP to ER $\alpha$ -responsive genes in response to estrogen was recently shown to be dependent on the presence of Ser-118, a phosphorylation site within ER $\alpha$  AF-1 (39). With the increasing number of E3 ligases reported in ER degradation by estrogen, it is likely that the cellular context and/or activation signals, whether it is hormonal or kinase-derived, might dictate selectivity of each ER in recruiting and use components of the proteasome pathway. Our studies demonstrate the ability of AF-1 domain to provide signals in regulating receptor mobility, ubiquitination, and turnover and to add to the intricate regulatory mechanisms involved in the control of nuclear receptor function by kinase signaling pathways.

## Materials and Methods

**Plasmids.** Expression pCMX plasmids coding for mouse ER $\alpha$ , mouse ER $\beta$ , and related truncated (ABC, CDEF, and chimeric constructs) and serine (positions 106 and 124) mutants have been described previously (25,26,28). Other ER $\beta$  serine to alanine mutants (positions 69 and 94) were generated by PCR mutagenesis using Pfu polymerase (Stratagene) and confirmed by automated sequencing. Plasmids coding for constitutively active Mek1 and Erk2 (28), and HA-tagged ubiquitin (54) have been described. The coding region of E6-AP has been inserted into pCMX-HA to produce a N-terminal tagged protein and the C833A ligase-deficient mutant was generated by mutagenesis as above.

**Cell culture, transfection and luciferase assay.** Human embryonic kidney 293 cells were routinely maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma) supplemented with 5% fetal bovine serum, in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37C. For transient transfection, cells were seeded in phenol red-free DMEM supplemented with charcoal dextrantreated serum and plasmid constructs were introduced into cells using the calcium phosphate precipitation method as described (28). Typically, for luciferase assay, cells were transfected with 500ng EREtkLuc reporter construct, 100ng ER expression plasmids, 50ng each of Mek1 and Erk2 expression plasmids, and 250ng pCMX- $\beta$ gal in a total of 1.5 $\mu$ g DNA per well. After 5- 6 h, the medium was changed and cells were treated for 16hrs with 10nM 17 $\beta$ -estradiol (E2) and/or 1 $\mu$ M proteasome inhibitor MG132 (Sigma) or clasto-lactacystin  $\beta$ -lactone (BioMol), unless otherwise stated. Cells were then harvested in potassium phosphate buffer containing 1% Triton X-100 and lysates analyzed for luciferase activity using a luminometer (Wallac). Luciferase values were normalized for transfection efficiency to  $\beta$ -galactosidase activity and expressed as relative fold response compared to controls. Luciferase assays are performed in duplicates from at least three independent experiments.

**Cell lysates, immunoprecipitation and immunoblotting.** Determination of ER $\alpha$  and ER $\beta$  cellular content by Western analysis has been described (28). Briefly, transfected cells were treated with 10nM E2 or 1 $\mu$ M MG132 for 16 hrs, washed with ice cold PBS and lysed in PBS containing 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholate acid, 0.1% SDS, 1mM sodium orthovanadate, 1mM sodium fluoride, 1mM PMSF, and protease inhibitor cocktail (Roche). Cell lysates were then subjected to SDS-PAGE and proteins transferred to nitrocellulose for immunoblotting. Membranes were incubated at 4°C with blocking reagent (Roche) in TBS, probed with antibodies against ER $\alpha$  or ER $\beta$ , and signals revealed by ECL using appropriate HRPconjugated secondary antibodies. For cells transfected with HA-tagged ER $\beta$  constructs (truncated forms and serine mutants), an anti-HA antibody (12CA5) was used for immunoblotting. In each experiment, total protein content was normalized using an anti- $\beta$ -actin antibody (Abcam). To detect ubiquitinated forms of ER $\beta$ , cells were transfected with ER $\beta$  (wt or mutated) in the presence or absence (control) of HA-tagged ubiquitin plasmid. Cells were treated with vehicle or 1 $\mu$ M MG132 for 16hrs, washed with ice cold PBS and lysed with 1% NP-40, 0.5% deoxycholate acid, 0.1% SDS, 1mM sodium orthovanadate, 1mM sodium fluoride, 1mM PMSF, and protease inhibitors in PBS. Cell lysates were pre-cleared before incubation with 1-2 $\mu$ g of anti ER $\beta$  antibody (Santa Cruz Biotech) overnight at 4°C with gentle agitation. Immune complexes were recovered with protein A/G-PLUS agarose, washed three times in lysis buffer and subjected to SDS-PAGE and immunoblotting as described above using anti-HA antibody. Co-immunoprecipitation analysis was performed to detect ER $\beta$ /E6-AP interaction in cells transfected with wt or mutated ER $\beta$  (myc-tagged) in the presence of HA-tagged E6-AP. Immunoprecipitation of ER $\beta$  was performed as above with an anti-myc antibody (9E10), except that salt concentration was raised to 0.7M and no SDS was added in the lysis buffer. The anti-HA antibody (12CA5) was used for immunoblotting.

**Cycloheximide chase.** 293 cells were transiently transfected with plasmids expressing HA-tagged wild-type or S94,106AER $\beta$  in absence or presence of E6-AP or Mek1/Erk2 plasmids. At 12 hours after transfection, cycloheximide (Sigma) was added at a

concentration of 50 $\mu$ M and cells were lysed for Western blot analysis at the indicated time points. Each signal intensity derived from two separate experiments was quantitated using an image analyzer (Alpha Innotech, San Leandro, CA) and expressed relative to  $\beta$ -actin levels.

**Preparation of nuclear and cytoplasmic extracts.** To prepare nuclear and cytoplasmic extracts, cells were pelleted by centrifugation, resuspended in hypotonic buffer containing 10mM Hepes, pH7.9, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 0.5mM DTT, 1mM sodium orthovanadate, 1mM sodium fluoride, 0.5mM PMSF and protease inhibitors, and lysed by three freeze-thaw cycles. Nuclei were separated from the cytosolic fraction by centrifugation at 12000g for 5min at 4°C. The nuclear pellet was resuspended in the same hypotonic buffer except that salt concentration was raised to 420mM KCl and 25% (v/v) glycerol was added. The matrix fraction was isolated from total nuclear extracts by centrifugation and supernatants corresponded to the soluble nuclear fractions. Equivalent amounts of cytoplasmic and nuclear fractions were then subjected to SDS-PAGE for Western analysis. The content of selective markers for nuclear (anti-PARP; Santa Cruz Biotech) and cytoplasmic (anti-GAPDH; Santa Cruz Biotech) compartments was tested by immunoblotting to ensure for the qualitative purity of the prepared fractions.

**Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP).** FRAP analysis was carried out on live 293 cells transfected with YFP fusions of wild-type or S94,106A mutant of ER $\beta$ . Cells were grown on chambered slides (LabTek) in phenol red-free DMEM containing 5% charcoal dextran-treated serum, and transfected by the calcium-phosphate procedure as described above. FRAP experiments were performed on a Zeiss LSM510 confocal microscope equipped with an Argon 514nm laser and a 530nm LP filter. A single z-section image of whole cell nuclei was captured before the bleach and at the indicated time points after. The bleached regions correspond to <10% of total nucleus using 100% laser intensity while scanned images were taken at 0.1% with an open pinhole and a numerical aperture of



0.8 to ensure that diffusion in the z dimension is avoided. Fluorescence intensities were analyzed using Zeiss Physiology software 3.2 and averaged from at least 10 nuclei.

## **Acknowledgments**

We wish to thank Dirk Bohmann and Martin Schefner for the generous gifts of respective plasmids for ubiquitin and E6-AP. We acknowledge the technical assistance of Simon Blouin and Julie Gabbay. We thank members of both labs for critical reading and useful comments.

## **Footnotes**

N.P. is supported by a doctoral award from the FRSQ (Fonds de la Recherche en Santé du Québec) and from the FHSJ (Fondation de l'Hôpital Ste-Justine), C.C. holds an award from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, M.S. is supported by the FHSJ, A.L. was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer, and M.B. by the Fondation pour la Recherche Médicale. A.T. is a New Investigator of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). This work was supported by grants from the CIHR, the Cancer Research Society Inc., and the Canadian Foundation for Innovation (to A.T.), and from ARC (Association pour la Recherche contre le Cancer, Grant No. 3582) and La ligue Nationale Contre le Cancer (to G.L.).

**Abbreviations:** AF, Activation function; CBP, cAMP response element binding protein-binding protein; E2, 17 $\beta$ -estradiol; E6-AP, E6-associated protein; EGF, epidermal growth factor; ER, estrogen receptor; ERE, estrogen response element; FRAP, fluorescence recovery after photobleaching; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HA, hemagglutinin; PARP, poly-ADP-ribose polymerase; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; SDS, sodium dodecyl sulfate; SRC, steroid receptor coactivator; YFP, yellow fluorescent protein.

## References

1. **Jensen EV, Jordan VC** 2003 The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin Cancer Res* 9:1980-1989
2. **Sanchez M, Tremblay A.** 2005 Growth factor signaling to estrogen receptors in hormone dependent cancers. in *Molecular Genetics of Cancer* pp.149-185. Research Signpost, Kerala, India.
3. **Duong V, Licznar A, Margueron R, Boulle N, Busson M, Lacroix M, Katzenellenbogen BS, Cavailles V, Lazennec G** 2006 ERalpha and ERbeta expression and transcriptional activity are differentially regulated by HDAC inhibitors. *Oncogene* 25:1799-1806
4. **Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C, Vignon F** 2001 ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology* 142:4120-4130
5. **Lazennec G** 2006 Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Lett* 231:151-157
6. **Glass CK, Rosenfeld MG** 2000 The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14:121-141
7. **McKenna NJ, O'Malley BW** 2002 Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108:465-474
8. **Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M** 2000 Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103:843-852
9. **Burakov D, Crofts LA, Chang CP, Freedman LP** 2002 Reciprocal recruitment of DRIP/mediator and p160 coactivator complexes in vivo by estrogen receptor. *J Biol Chem* 277:14359-14362
10. **Reid G, Hubner MR, Metivier R, Brand H, Denger S, Manu D, Beaudouin J, Ellenberg J, Gannon F** 2003 Cyclic, Proteasome-Mediated Turnover of Unliganded and Liganded ERalpha on Responsive Promoters Is an Integral Feature of Estrogen Signaling. *Mol Cell* 11:695-707
11. **Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F** 2003 Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115:751-763

12. **Nawaz Z, Lonard DM, Dennis AP, Smith CL, O'Malley BW** 1999 Proteasome dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:1858-1862
13. **Wijayaratne AL, McDonnell DP** 2001 The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators. *J Biol Chem* 276:35684-35692
14. **Lonard DM, Nawaz Z, Smith CL, O'Malley BW** 2000 The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptoralpha transactivation. *Mol Cell* 5:939-948
15. **Stenoien DL, Patel K, Mancini MG, Dutertre M, Smith CL, O'Malley BW, Mancini MA** 2001 FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent. *Nat Cell Biol* 3:15-23
16. **Lee JW, Ryan F, Swaffield JC, Johnston SA, Moore DD** 1995 Interaction of thyroidhormone receptor with a conserved transcriptional mediator. *Nature (London)* 374:91-94
17. **von Baur E, Zechel C, Heery D, Heine MJS, Garnier JM, Vivat V, Le Douarin B, Gronemeyer H, Chambon P, Losson R** 1996 Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *European Molecular Biology Organization Journal* 15:110-124
18. **Saji S, Okumura N, Eguchi H, Nakashima S, Suzuki A, Toi M, Nozawa Y, Saji S, Hayashi S** 2001 MDM2 enhances the function of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 281:259-265
19. **Nawaz Z, Lonard DM, Smith CL, Lev-Lehman E, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW** 1999 The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol* 19:1182-1189
20. **Marsaud V, Gougelet A, Maillard S, Renoir JM** 2003 Various phosphorylation pathways, depending on agonist and antagonist binding to endogenous estrogen receptor alpha (ERalpha), differentially affect ERalpha extractability, proteasome-mediated stability, and transcriptional activity in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 17:2013-2027
21. **Bunone G, Briand P-A, Miksicek RJ, Picard D** 1996 Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *European Molecular Biology Organization Journal* 15:2174-2183

22. **Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P** 1995 Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270:1491-1494
23. **Endoh H, Maruyama K, Masuhiro Y, Kobayashi Y, Goto M, Tai H, Yanagisawa J, Metzger D, Hashimoto S, Kato S** 1999 Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. *Mol Cell Biol* 19:5363-5372
24. **Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguère V** 1997 Cloning, chromosomal localization and functional analysis of the murine estrogen receptor  $\beta$ . *Molecular Endocrinology* 11:353-365
25. **Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguere V** 1999 Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor  $\beta$  through phosphorylation of activation function AF-1. *Molecular Cell* 3:513-519
26. **Tremblay A, Giguere V** 2001 Contribution of steroid receptor coactivator-1 and CREB binding protein in ligand-independent activity of estrogen receptor beta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 77:19-27
27. **Driggers PH, Segars JH, Rubino DM** 2001 The proto-oncoprotein Brx activates estrogen receptor beta by a p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 276:46792-46797
28. **St Laurent V, Sanchez M, Charbonneau C, Tremblay A** 2005 Selective hormonedependent repression of estrogen receptor beta by a p38-activated ErbB2/ErbB3 pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94:23-37
29. **Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK, Varshavsky A** 1989 A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243:1576-1583
30. **Fan M, Bigsby RM, Nephew KP** 2003 The NEDD8 pathway is required for proteasome-mediated degradation of human estrogen receptor (ER)-alpha and essential for the antiproliferative activity of ICI 182,780 in ERalpha-positive breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 17:356-365
31. **McNally JG, Muller WG, Walker D, Wolford R, Hager GL** 2000 The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science* 287:1262-1265

32. **Sharp ZD, Mancini MG, Hinojos CA, Dai F, Berno V, Szafran AT, Smith KP, Lele TT, Ingber DE, Mancini MA** 2006 Estrogen-receptor- $\alpha$  exchange and chromatin dynamics are ligand- and domain-dependent. *J Cell Sci* 119:4101-4116
33. **Stenoien DL, Mancini MG, Patel K, Allegretto EA, Smith CL, Mancini MA** 2000 Subnuclear trafficking of estrogen receptor- $\alpha$  and steroid receptor coactivator-1. *Mol Endocrinol* 14:518-534
34. **Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM** 1995 A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2563-2567
35. **Gao X, Mohsin SK, Gatalica Z, Fu G, Sharma P, Nawaz Z** 2005 Decreased expression of E6-associated protein in breast and prostate carcinomas. *Endocrinology* 146:1707-1712
36. **Li L, Li Z, Howley PM, Sacks DB** 2006 E6AP and calmodulin reciprocally regulate estrogen receptor stability. *J Biol Chem* 281:1978-1985
37. **Khan OY, Fu G, Ismail A, Srinivasan S, Cao X, Tu Y, Lu S, Nawaz Z** 2006 Multifunction steroid receptor coactivator, E6-associated protein, is involved in development of the prostate gland. *Mol Endocrinol* 20:544-559
38. **Alarid ET, Bakopoulos N, Solodin N** 1999 Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. *Mol Endocrinol* 13:1522-1534
39. **Valley CC, Metivier R, Solodin NM, Fowler AM, Mashek MT, Hill L, Alarid ET** 2005 Differential regulation of estrogen-inducible proteolysis and transcription by the estrogen receptor  $\alpha$  N terminus. *Mol Cell Biol* 25:5417-5428
40. **Brzozowski AM, Pike ACW, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström L, Greene GL, Gustafsson J-Å, Carlquist M** 1997 Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature (London)* 389:753-758
41. **Heldring N, Pawson T, McDonnell D, Treuter E, Gustafsson JA, Pike AC** 2007 Structural Insights into Corepressor Recognition by Antagonist-bound Estrogen Receptors. *J Biol Chem* 282:10449-10455
42. **Pike AC, Brzozowski AM, Hubbard RE, Bonn T, Thorsell AG, Engstrom O, Ljunggren J, Gustafsson JA, Carlquist M** 1999 Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor  $\beta$  in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J* 18:4608-4618

43. **Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL** 1998 The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95:927-937
44. **Shao D, Lazar MA** 1999 Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *Journal of Clinical Investigation* 103:1617-1618
45. **Salghetti SE, Muratani M, Wijnen H, Futcher B, Tansey WP** 2000 Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3118-3123
46. **Lange CA, Shen T, Horwitz KB** 2000 Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1032-1037
47. **Tateishi Y, Sonoo R, Sekiya Y, Sunahara N, Kawano M, Wayama M, Hirota R, Kawabe Y, Murayama A, Kato S, Kimura K, Yanagisawa J** 2006 Turning off estrogen receptor beta-mediated transcription requires estrogen-dependent receptor proteolysis. *Mol Cell Biol* 26:7966-7976
48. **Htun H, Holth LT, Walker D, Davie JR, Hager GL** 1999 Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. *Mol Biol Cell* 10:471-486
49. **Sanchez M, Sauvé K, Picard N, Tremblay A** 2007 The hormonal response of estrogen receptor beta is decreased by the PI3K/Akt pathway via a phosphorylation-dependent release of CREB-binding protein. *J Biol Chem* 282:4830-4840
50. **Cascio S, Bartella V, Garofalo C, Russo A, Giordano A, Surmacz E** 2007 Insulin-like growth factor 1 differentially regulates estrogen receptor-dependent transcription at estrogen response element and AP-1 sites in breast cancer cells. *J Biol Chem* 282:3498-3506
51. **Tateishi Y, Kawabe Y, Chiba T, Murata S, Ichikawa K, Murayama A, Tanaka K, Baba T, Kato S, Yanagisawa J** 2004 Ligand-dependent switching of ubiquitinproteasome pathways for estrogen receptor. *EMBO J* 23:4813-4823
52. **Fan M, Park A, Nephew KP** 2005 CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein) promotes basal and geldanamycin-induced degradation of estrogen receptoralpha. *Mol Endocrinol* 19:2901-2914

53. **Eakin CM, Maccoss MJ, Finney GL, Klevit RE** 2007 Estrogen receptor alpha is a putative substrate for the BRCA1 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5794-5799
54. **Musti AM, Treier M, Bohmann D** 1997 Reduced ubiquitin-dependent degradation of c- Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science* 275:400-402

## Figure legends

**Figure 1. Transactivation by ER $\alpha$  and ER $\beta$  is variably dependent upon proteasome function.** **A-** Human 293 cells were transfected with an EREbLuc reporter gene and ER $\alpha$  or ER $\beta$  expression plasmid, and treated with vehicle, 10nM 17 $\beta$ -estradiol (E2), and proteasome inhibitors MG132 (1 $\mu$ M) or clasto-lactacystin (1 $\mu$ M) for 16hrs. Cells were then harvested for luciferase activity measurements, and results normalized to  $\beta$ -galactosidase activity are expressed as relative luciferase units (RLU). **B-** 293 cells were transfected with EREbLuc reporter with ER $\alpha$  or ER $\beta$  expression plasmid and treated with increasing amounts of MG132 for 16hrs. Values are expressed as % change in activity compared to untreated cells set at 100%. **C-** 293 cells were transfected with ER $\alpha$  or ER $\beta$  constructs and treated with 10nM E2 or 1 $\mu$ M MG132 for 16hrs. Whole cell extracts were analysed by Western blot using ER specific antibodies. Sample loading was normalized with  $\beta$ -actin content for each sample.

**Figure 2. Contribution of the AF-1 region to the proteasome-dependent activity of ER $\alpha$  and ER $\beta$ .** **A-** The transcriptional activities of full-length versions or truncated forms lacking the N-terminal (CDEF constructs) or the C-terminal region (ABC constructs) of ER $\alpha$  or ER $\beta$  were determined on an EREbLuc in 293 cells, in response to 1 $\mu$ M MG132 or 1 $\mu$ M clasto-lactacystin. Also tested were chimeric forms of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in which the AB regions were swapped between each ER isoform. Values are expressed as fold response in luciferase activity compared to untreated cells set at 1.0 for each ER construct used in transfection. **B-** HA-tagged forms of Cterminal (ABC) or N-terminal (CDEF) truncated forms of ER $\alpha$  and ER $\beta$  were expressed in 293 cells and analyzed by Western blot using an anti-HA antibody. Cells were treated with 10nM E2 or 1 $\mu$ M MG132 for 16hrs prior to harvest. Protein amounts were normalized to  $\beta$ -actin content.

**Figure 3. MAPK consensus sites within the AF-1 modulate ER $\beta$  activity upon proteasome inhibition.** **A-** 293 cells were transfected with an EREbLuc reporter in the



presence of wild-type ER $\beta$  or various serine to alanine substituted mutants at the indicated positions within the AF-1 region of ER $\beta$ . After transfection, cells were treated with 1 $\mu$ M MG132 for 16hrs and harvested for luciferase assay. Values are expressed as fold response compared to untreated cells set at 1.0 for each ER $\beta$  construct used in transfection. **B-** Similar experiment as in (A) except that wt and serine mutants of ER $\beta$  C-terminal truncated ABC constructs were used in transfection. **C-** Western analysis of wt and serine mutated ER $\beta$  expressed in cells treated with vehicle or 1 $\mu$ M MG132 for 16 hrs. Protein amounts were normalized to  $\beta$ -actin content. **D-** Similar as in (C) except that ABC truncated forms of ER $\beta$  were expressed and analyzed by Western blot.

**Figure 4. Serines 94 and 106 regulate ER $\beta$  stability and ubiquitination.** **A-** Cycloheximide chase experiment using 293 cells expressing ER $\beta$  or the S94,106A mutant. Transfected cells were treated with 50 $\mu$ M cycloheximide and lysed at the indicated time points for Western analysis.  $\beta$ -actin was used as a loading control. **B-** The S94,106A mutation confers an increased stability to ER $\beta$ . Quantitation of signal intensity of ER $\beta$  and S94,106A mutant derived from two separate experiments of cycloheximide chase described in (A). Results are normalized to  $\beta$ -actin content and expressed as the % change of time zero which was set at 100%. **C-** 293 cells were transfected with either wt or the S94,106A mutant of ER $\beta$  in the presence of a HA-ubiquitin plasmid. Cells were treated with vehicle or 1 $\mu$ M MG132 for 16hrs, and harvested for immunoprecipitation using an anti ER $\beta$  antibody. Immunoprecipitates were analyzed by Western blot with an anti-HA antibody.

**Figure 5. Proteasome function and serine modifications affect the nuclear localization of ER $\beta$ .** **A-** Validation of the separation into cytoplasmic (C) and nuclear (N) protein extracts by Western analysis using antibodies against respectively PARP and GAPDH markers. **B-** 293 cells were transfected with HA-tagged wild-type or the S94,106A ER $\beta$  construct, and treated with vehicle or 1 $\mu$ M MG132 for 16hrs. Both cytoplasmic (C) and nuclear (N) fractions were isolated and analyzed by Western blot using an anti-HA

antibody. C- Cells were transfected as in (B) and nuclear extracts were separated into insoluble matrix fractions (M) and soluble nuclear fractions (S) for Western analysis.

**Figure 6. Serines 94 and 106 regulate ER $\beta$  nuclear mobility.** A- Untreated and MG132-treated 293 cells transfected with wild-type or S94,106A mutant of YFP-ER $\beta$  were subjected to fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis. Images show single z-sections of whole cell nuclei obtained before and at the indicated time points after bleaching. Bleached images were obtained ~0.5 sec after the actual bleach corresponding to the rectangular box which represents 10-15% of the total cell volume. Scanned images were taken at 0.1-0.5% laser intensity, while bleach was at 100%. After bleach, total nuclear fluorescence reaches equilibrium faster for untreated compared to MG132 treated cells, indicating a restrained mobility of ER $\beta$  during proteasome inhibition. Scale bar represents 10  $\mu$ m. B- Recovery curves from cells treated with vehicle (open squares) or 1 $\mu$ M MG132 (filled squares). Fluorescence intensity values were averaged (n=10 nuclei) and plotted over time. Values before bleach are shown to control for fluctuations of fluorescent signals.

**Figure 7. The E6-AP ubiquitin ligase regulates ER $\beta$  degradation and activity.** A- Western analysis of wt and S94,106A mutated ER $\beta$  in response to E6-AP expression. After transfection, cells were treated with vehicle or 1 $\mu$ M MG132 for 16 hrs and analyzed for ER $\beta$  content. Protein amounts were normalized relative to  $\beta$ -actin. B- The S94,106A mutation impairs the E6-AP dependent decrease of ER $\beta$  levels in Erk-activated cells. Cells were transfected with ER $\beta$  or S94,106A mutant in the presence of increasing amounts of E6-AP construct, and analyzed by Western. Erk was activated by coexpressing constitutive Mek1 and Erk plasmids. Cells were also transfected with the C833A ubiquitin ligase-deficient form of E6-AP. C- The S94,106A ER $\beta$  mutant is less prone to degradation by E6-AP and Erk activation. Cells were transfected with the respective constructs as in (B) and subjected to a cycloheximide chase. Representative blots are shown for ER $\beta$  and S94,106A mutant in cells expressing E6-AP (left panel) or Mek1 and Erk (right panel). Corresponding quantitation of signal intensity of ER $\beta$  and S94,106A mutant derived from two separate

experiments of cycloheximide chase is also shown. Results are normalized to  $\beta$ -actin content and expressed as the % change of time zero which was set at 100%. **D-** E6-AP reduces ER $\beta$  transcriptional activity. Cells were transfected as in (B) in the presence of an EREbLuc reporter gene for luciferase assay. Erk was activated by coexpressing constitutive Mek1 and Erk plasmids and the C833A mutant of E6-AP was also tested. Values are expressed as fold response in luciferase activity relative to cells expressing ER $\beta$  which was set at 1.0.

**Figure 8. Phosphorylation-dependent recruitment of E6-AP to ER $\beta$  through serines 94 and 106.** **A-** E6-AP coimmunoprecipitates with ER $\beta$ . 293 cells were transfected with myc-tagged ER $\beta$  or S94,106A mutant in absence or presence of HA-E6-AP, and then treated with 1 $\mu$ M MG132 for 16hrs. Immunoprecipitation was carried out with an anti myc antibody, and E6-AP was detected by Western analysis using an anti HA antibody. ER $\beta$  was also monitored in each sample using an ER $\beta$  antibody. **B-** E6-AP is recruited in a phosphorylation-dependent manner involving Ser-94 and -106. Coimmunoprecipitation assay as described in (A) except that Mek1/Erk plasmids were used in transfection to promote Erk activation and no MG132 was added to cells.

**Figure 9. A proposed model for the role of AF-1 in the response of ER $\beta$  to Erk activation.** Activation of Erk in cells promotes ER $\beta$  phosphorylation at the AF-1 domain which mediates a favored recruitment of transcriptional coactivators SRC-1 and CBP, and subsequent transactivation (25,26). The phosphorylation of AF-1 also promotes the recruitment of the E3 ubiquitin ligase E6-AP to ER $\beta$  which results in receptor ubiquitination, transcriptional repression, clustering into inactive nuclear compartments, and degradation by the ubiquitin-proteasome system. This activation-degradation pathway is highly dependent upon the phosphorylation of the AF-1 domain of ER $\beta$  at distinct sites and does not require the presence of hormone, thereby providing an exclusive and functional role for the AF-1 to integrate receptor activity and turnover to kinase signaling pathways.

Fig.1

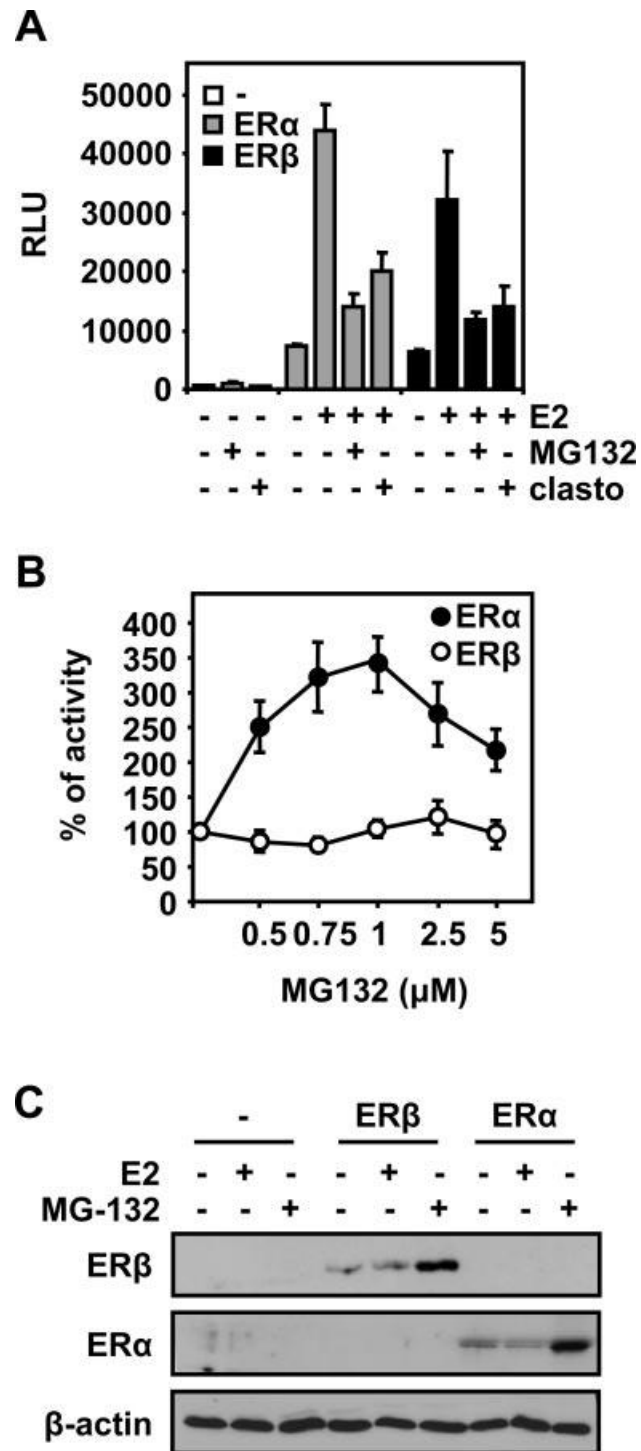
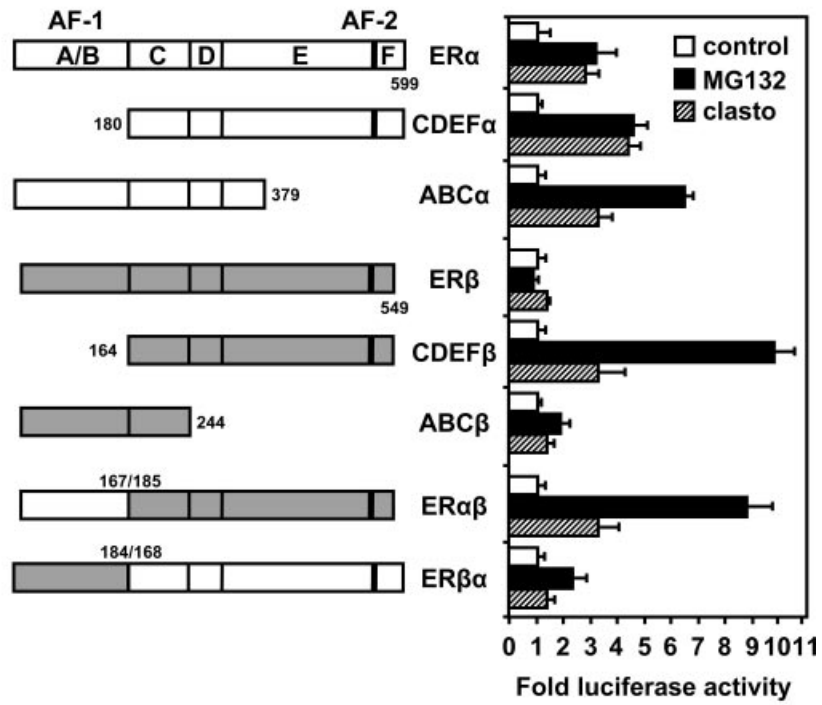


Fig. 2

A



B

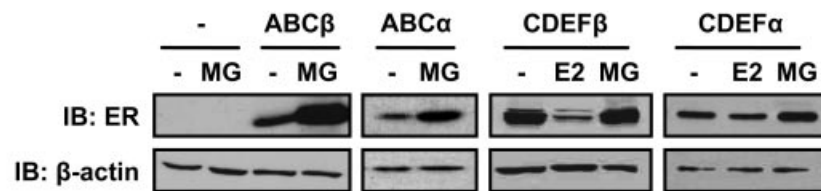


Fig.3

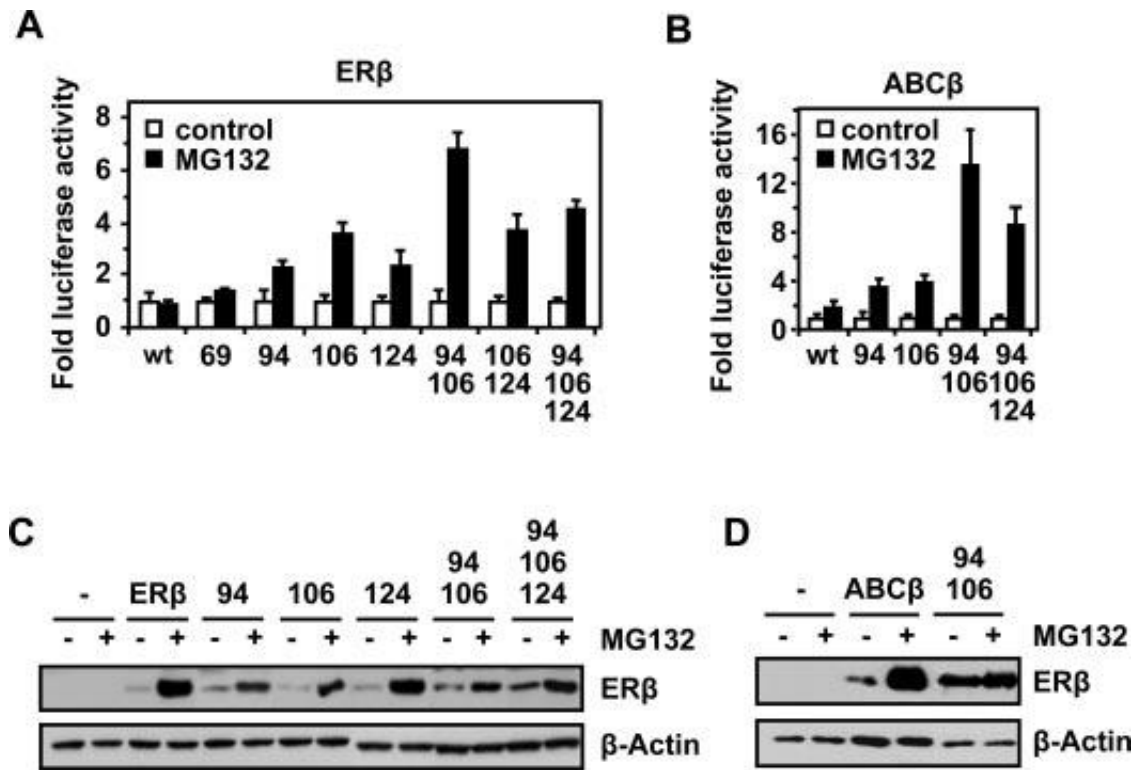


Fig.4

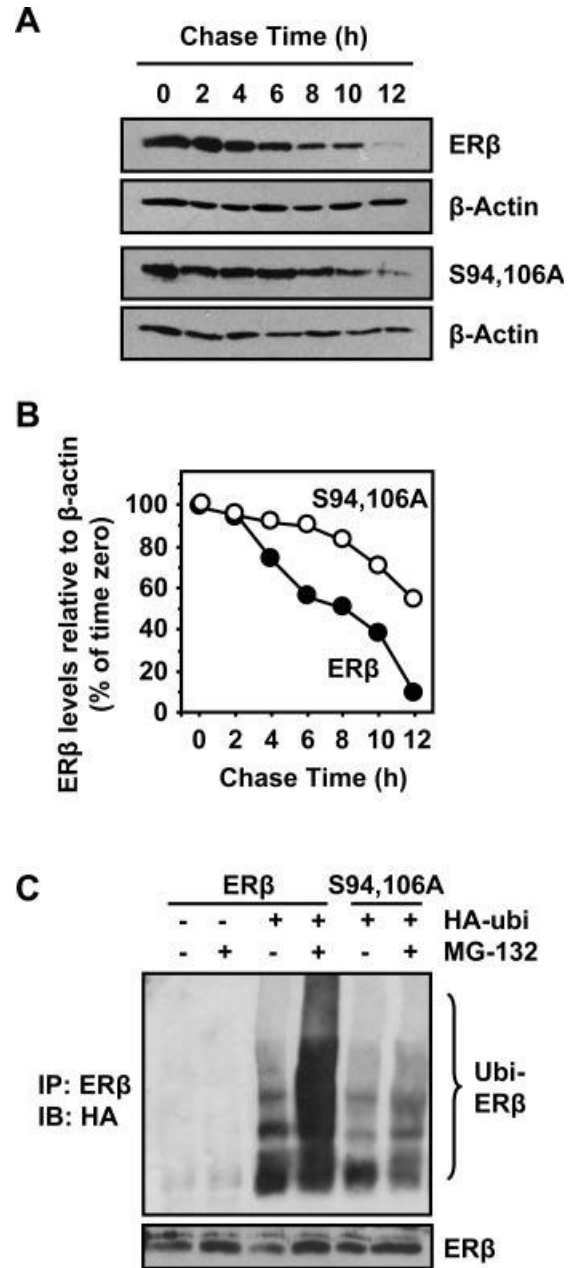


Fig.5

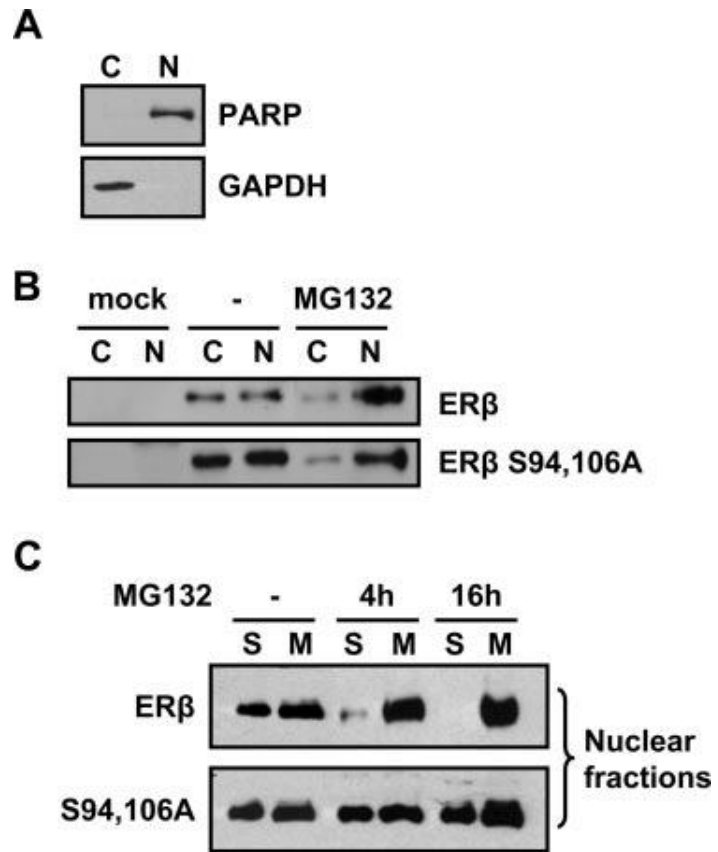
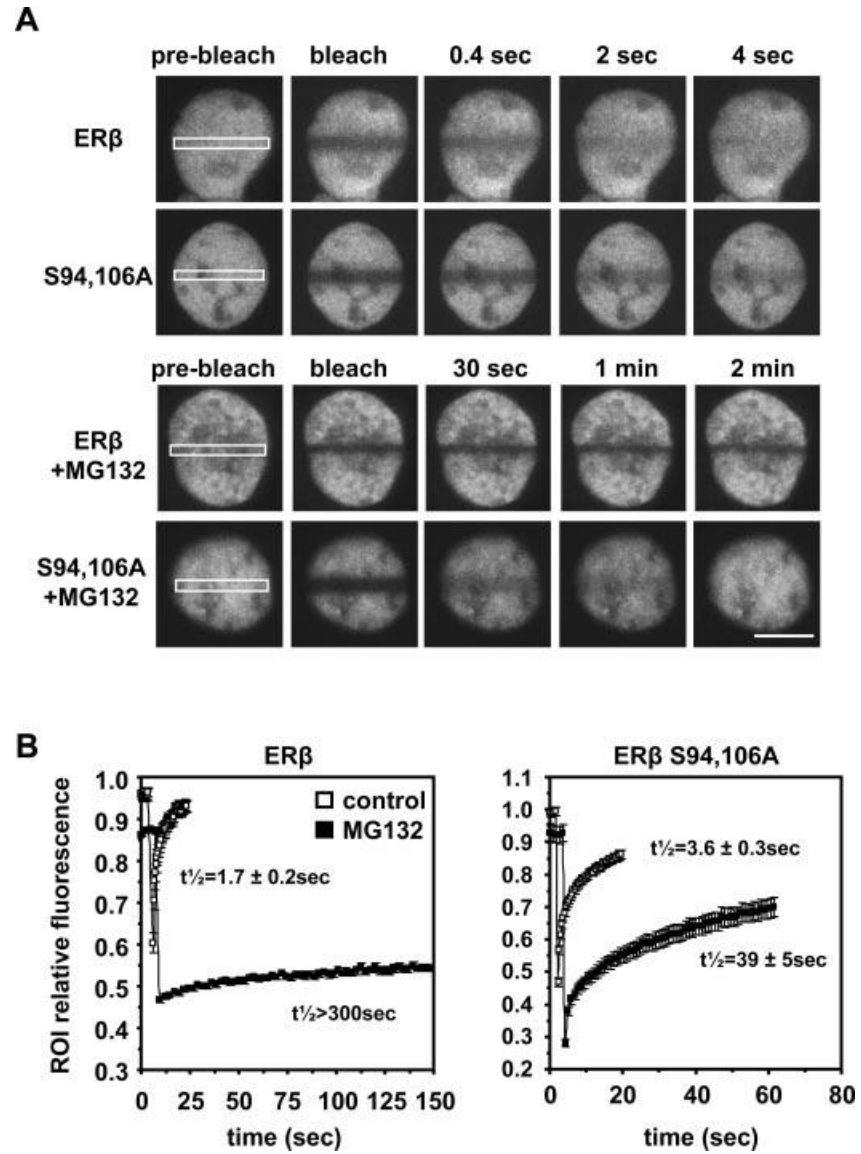




Fig.6



**Fig.7**

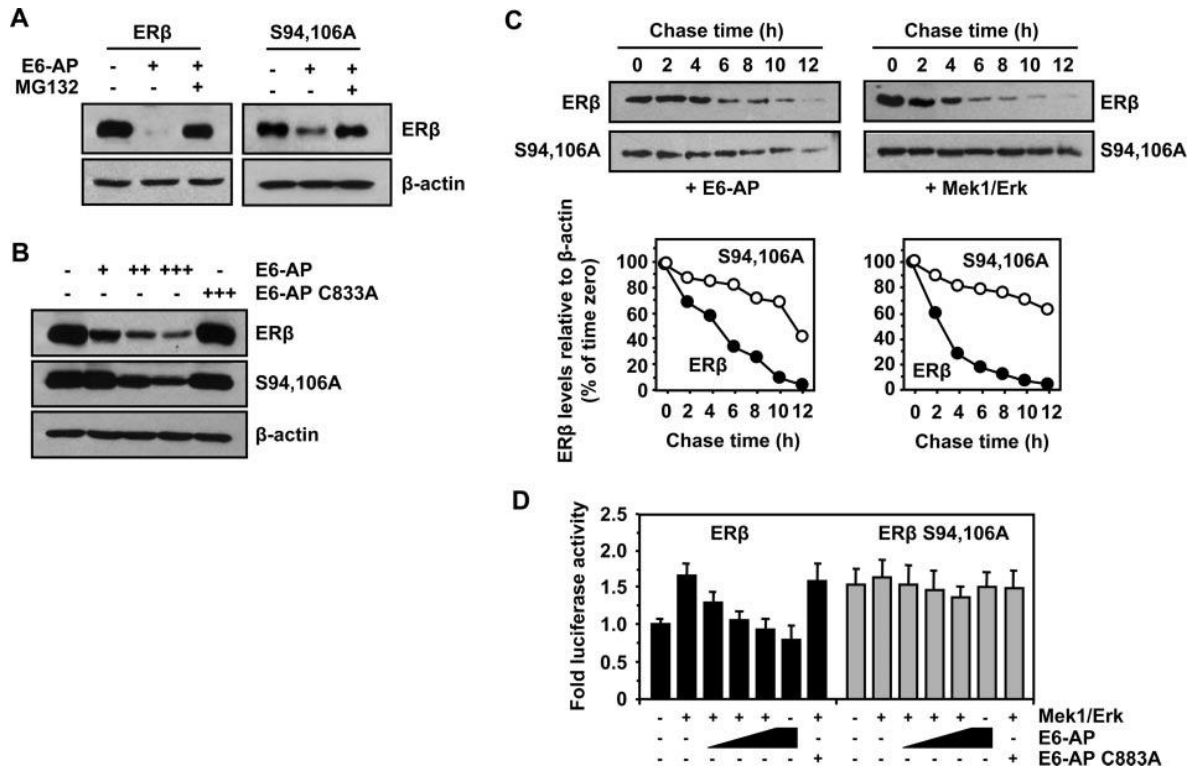


Fig.8

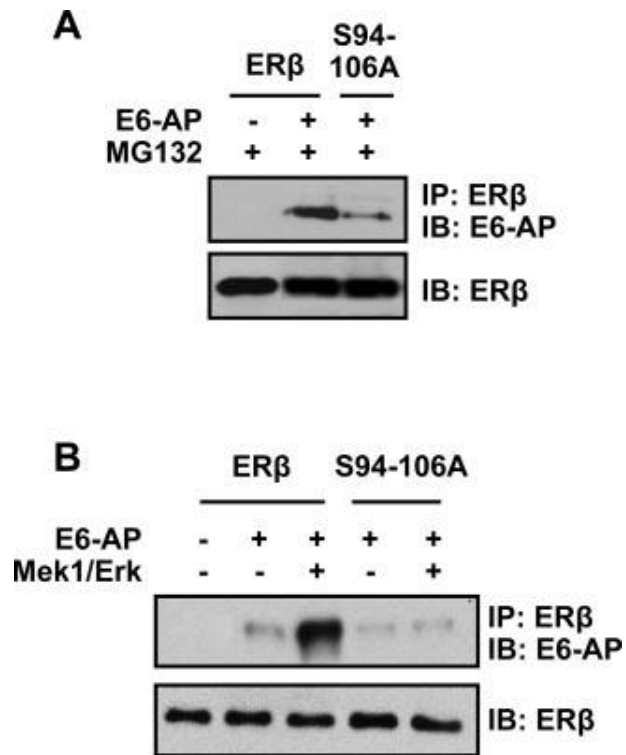
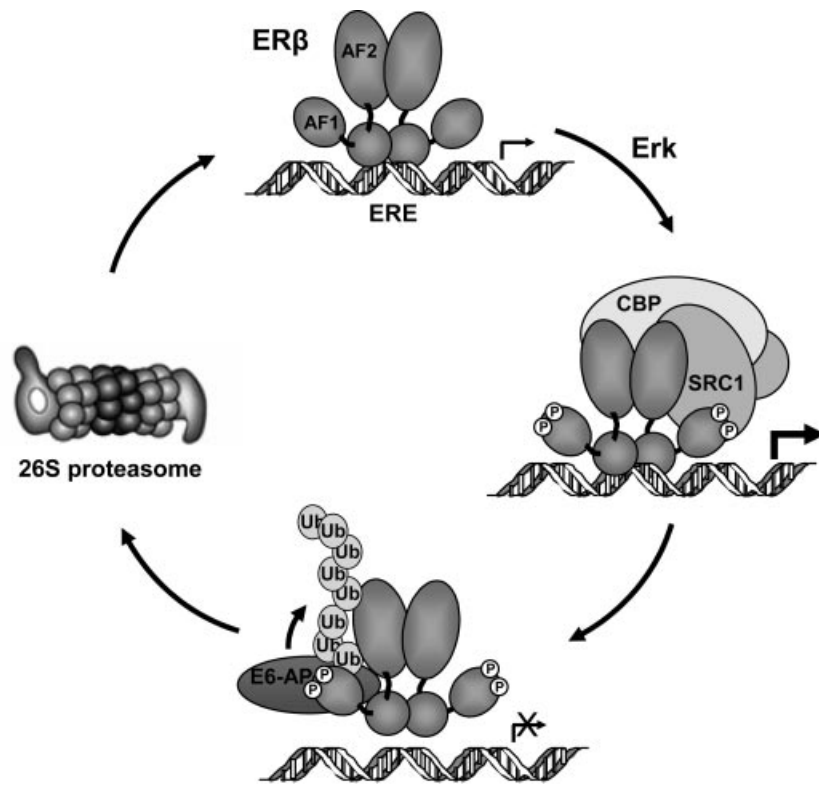


Fig.9



**2 – 2<sup>ième</sup> publication****Identification of ER $\beta$  as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by GSK3 $\beta$** 

**Nathalie Picard<sup>1,2</sup>, Mélanie Sanchez<sup>1,2</sup>, Xavier Masclez Muriel Aubry<sup>2</sup> and  
André Tremblay<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup>Sainte-Justine Hospital Research Center and the Departments of <sup>2</sup>Biochemistry and <sup>3</sup>Obstetrics and Gynecology. University of Montreal, Montréal , Québec, H3T 1C5 Canada.

**(Soumis à Molecular Cell Biology)**

**Running title:** ER $\beta$  pSuM regulates sumoylation and ubiquitination

**Keywords:** Estrogen receptor; GSK3; phosphorylation; ubiquitin; SUMO; Ubc9; SENP1; 26S proteasome; breast cancer

**DISCLOSURE STATEMENT:** The authors have no competing interests.

\* Correspondence should be addressed to:

André Tremblay, Research Center, Ste-Justine Hospital, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec), H3T 1C5, Canada.

Phone: (514) 345-4931 x2830

Fax: (514) 345-4988

## Highlights

- A novel non-consensus phosphorylation-dependent sumoylation motif termed *pSuM* is identified
- SUMO1 addition at the *pSuM* of ER $\beta$  reduces its DNA binding, activity and turnover
- SUMO1 and ubiquitin compete at the same acceptor site of the *pSuM*
- The *pSuM* is connected to a GSK3 $\beta$ -activated extension that functions as a SUMO enhancer

**Abbreviations:** AF, activation function; CBP, CREB-binding protein; Dtl/RAMP, denticleless homolog/retinoic acid-regulated nuclear matrix-associated protein; E2-25K/Hip2, ubiquitinconjugating enzyme E2K/huntingtin interacting protein 2; E6-AP, papilloma virus E6-associated protein; Eaf2, ELL-associated factor 2; ERE, estrogen response element; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GATA, GATA-binding protein; GFP, green fluorescent protein; I $\kappa$ B $\alpha$ , NF-kappa-B inhibitor alpha; LXR, liver X receptor; NACA, nascent polypeptide-associated complex subunit alpha; NDSM, negatively charged amino acid-dependent sumoylation motif; NF-IL3, nuclear factor interleukin-3 regulated protein; Pc2, polycomb 2 protein; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PDSM, phosphorylation-dependent sumoylation motif; PIAS, protein inhibitor of activated STAT; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferatoractivated receptor gamma; RanBP2, Ran-binding protein 2; SAE1/SAE2, SUMO-activating enzyme subunit 1 and 2; SENP, sentrin (also known as SUMO)-specific protease; SRC-1, steroid receptor coactivator 1; SREBP, sterol regulatory element-binding transcription factor; Ubc9, Ubiquitin-conjugating enzyme 9;

## 2.1 – Mise en contexte

Depuis sa découverte inattendue il y a environ vingt ans, la sumoylation a soulevé un engouement scientifique qui a permis l'identification de nombreuses protéines cibles entraînant rapidement une meilleure compréhension de son mode d'action. Ayant de nombreuses conséquences au point de vue moléculaire, la sumoylation s'est révélée comme un important régulateur de la fonctionnalité de plusieurs protéines, incluant les récepteurs nucléaires. Dans la majorité des cas, la sumoylation de ces récepteurs est associée à une répression transcriptionnelle (434). ER $\alpha$  fait partie des exceptions et la conjugaison ligand-dépendante de SUMO-1 induit son activation (173). L'effet atténuateur ou activateur de la sumoylation peut être un effet direct de la sumoylation du récepteur et/ou provenir de l'effet indirect des corégulateurs transcriptionnels. De nombreux cofacteurs pouvant interagir avec les ERs sont régulés par la sumoylation (voir section 5.3.4) et devant tous ces faits, nous avons évalué, par la publication qui suit, l'effet encore inexploré de la sumoylation sur l'activité de ER $\beta$ . Nos résultats démontrent qu'à l'inverse de ER $\alpha$ , SUMO-1 réprime l'activité estrogénique de ER $\beta$ , identifiant ainsi la sumoylation comme une MPT importante pour discriminer l'action des deux isoformes. L'effet inhibiteur résulte de la conjugaison de SUMO-1 sur ER $\beta$  qui affecte négativement son interaction avec l'ADN. Nous avons identifié le site d'attache de SUMO-1 sur ER $\beta$  et contre toute attente, nous avons découvert qu'il faisait parti d'un motif de sumoylation dépendant de la phosphorylation jusqu'alors inconnu que nous avons nommé *pSuM*. Nous démontrons aussi qu'aux abords de ce site ce trouve un regroupement de sérines qui favorisent la liaison de SUMO-1 sur *pSuM* et qui sont régulées entre autres par la kinase GSK3. Cette étude nous a également permis de mettre en évidence une compétition entre SUMO-1 et l'ubiquitination au niveau du *pSuM* augmentant ainsi notre compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation de la stabilité de ER $\beta$ .

## Contribution des auteurs

Nathalie Picard : À titre de premier auteur, j'ai initié le projet, fait l'entière conception, créé tous les clones de ER $\beta$  et réalisé toutes les expériences. J'ai également écrit la première version de l'article et participé activement à la correction.

Mélanie Sanchez : En tant que deuxième auteure, Mélanie, par son expertise scientifique sur les ERs, a participé aux discussions et m'a apporté son aide à nombreuses reprises (théorique et technique) ce qui m'a aidé à bien diriger et structurer mon projet. Elle a également participé à la correction du papier.

Xavier Mascle : Le titre de troisième auteur revient à Xavier, étudiant du Dr. Aubry. Il m'a fourni plusieurs des clones utilisés durant mon projet. Son expertise sur la sumoylation ainsi que les nombreuses conversations sur le sujet, ont été une aide précieuse et m'ont permis de résoudre quelques uns des problèmes rencontrés en cours de route me permettant ainsi de mener à bien mon projet. Il a également participé à la correction du manuscrit.

Muriel Aubry : Dr. Muriel m'a gracieusement fourni certains des clones utilisés pour la sumoylation et elle a participé à la correction du papier.

André Tremblay : En tant que superviseur, Dr. Tremblay a supervisé et participé à la conception du projet. Il a également corrigé l'article.



## Permission de l'éditeur de la revue

### ASM Journals Statement of Authors' Rights

#### **Authors may post their articles to their institutional repositories**

ASM grants authors the right to post their accepted manuscripts in publicly accessible electronic repositories maintained by funding agencies, as well as appropriate institutional or subject-based open repositories established by a government or non-commercial entity. Since ASM makes the final, typeset articles from its primary-research journals available free of charge on the ASM Journals and PMC websites 6 months after final publication, ASM recommends that when submitting the accepted manuscript to PMC or institutional repositories, the author specify that the posting release date for the manuscript be no earlier than 6 months after the final publication of the typeset article by ASM.

#### **Authors may post their articles in full on personal or employer websites**

ASM grants the author the right to post his/her article (after publication by ASM) on the author's personal or university-hosted website, but not on any corporate, government, or similar website, without ASM's prior permission, provided that proper credit is given to the original ASM publication.

#### **Authors may make copies of their articles in full**

Corresponding authors are entitled to 10 free downloads of their papers. Additionally, all authors may make up to 99 copies of his/her own work for personal or professional use (including teaching packs that are distributed free of charge within your own institution). For orders of 100 or more copies, you should seek ASM's permission or purchase access through Highwire's Pay-Per-View option, available on the ASM online journal sites.

#### **Authors may republish/adapt portions of their articles**

ASM also grants the authors the right to republish discrete portions of his/her article in any other publication (including print, CD-ROM, and other electronic formats) of which he or she is author or editor, provided that proper credit is given to the original ASM publication. "Proper credit" means either the copyright lines shown on the top of the first page of the PDF version, or "Copyright © American Society for Microbiology, [insert journal name, volume number, year, page numbers and DOI]" of the HTML version. You may obtain permission from Rightslink. For technical questions about using Rightslink, please contact Customer Support via phone at (877) 622-5543 (toll free) or (978) 777-9929.

## SUMMARY

SUMO conjugation has emerged as a dynamic process in regulating protein function. Here we identify the estrogen receptor ER $\beta$  as a new target of SUMO-1. ER $\beta$  SUMO-1 modification occurs on a unique non-consensus sumoylation motif, which becomes fully competent upon phosphorylation of its contained serine residue that provides the essential negative charge for sumoylation. This process is further regulated by phosphorylation of additional adjacent serine residues by GSK3 $\beta$ , which maximizes ER $\beta$  sumoylation in response to hormone. SUMO-1 attachment prevents ER $\beta$  degradation by competing with ubiquitin at the same acceptor site, and dictates ER $\beta$  transcriptional inhibition by altering estrogen-responsive target promoter occupancy and gene expression in breast cancer cells. These findings uncovered a novel phosphorylated sumoylation motif  $\psi$ KxS or *p*SuM that is connected to a GSK3-activated extension that functions as a SUMO enhancer. This extended *p*SuM offers a valuable signature to predict novel SUMO substrates under protein kinase regulation.

## INTRODUCTION

SUMOylation is a highly dynamic post-translational process that consists of conjugating the small ubiquitin-like modifier SUMO on target proteins (Hay, 2005). SUMO modification is involved in diverse aspects of protein function which are often linked to nuclear activities, such as DNA replication, genome stability, nuclear transport and gene transcription (Seeler and Dejean, 2003). Despite a low and transient stoichiometric proportion of SUMO-modified proteins, an increasing number of substrates have been characterized mostly based on the presence of a predicted minimal core SUMO consensus motif  $\psi$ KxE/D (where  $\psi$  represents a large hydrophobic residue), in which the lysine serves as the acceptor site to covalently link SUMO (Rodriguez et al., 2001). The sequential enzymatic events leading to protein sumoylation closely resemble those of ubiquitination (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). The core SUMO motif is recognized by the unique E2-conjugating enzyme Ubc9, which upon transfer from the E1 activating enzyme SAE1/SAE2, conjugates SUMO onto a specific lysine residue. Although Ubc9 is sufficient to promote sumoylation, three classes of E3 ligases that consist of the nucleoporin RanBP2, the Polycomb repressor Pc2, and the PIAS ligase family members have been described to facilitate the conjugation process. Sumoylation is reversible as the SUMO tags can rapidly be cleaved from target proteins by the SENP family of Sentrin-specific isopeptidases, which ensure a dynamic and appropriate maintenance of SUMO substrates (Kim and Baek, 2009). Recently, two different extensions following the  $\psi$ KxE/D motif have been found to enhance substrate sumoylation for some targets: the phosphorylation-dependent sumoylation motif (PDSM) which consists of the sequence  $\psi$ KxExxpSP (Hietakangas et al., 2006); and the negatively charged amino acid-dependent sumoylation motif (NDSM), which is characterized by a cluster of acidic residues (Yang et al., 2006). As both motifs share a common feature of negatively-charged residues to participate in SUMO modification, an important role for specific kinase signalling pathways becomes an attractive regulatory mechanism for sumoylation.

Estrogens play a pivotal role in reproductive physiology through direct interaction with the estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ , which belong to the nuclear hormone receptor family of ligand-activated transcription factors. However, disruption of ER transcriptional regulation is also associated with pathological events such as breast and endometrium cancers. While ER $\alpha$  is considered as a strong predictive factor in endocrine therapy of reproductive cancers, the clinical value of ER $\beta$  is still debated, although recent evidence has associated ER $\beta$  with anti-tumorigenic properties and a favorable outcome in specific context (Lazennec et al., 2001; Sanchez and Tremblay, 2005; Fox et al., 2008; Hartman et al., 2009). Whereas the two receptors share obvious similarities in terms of structure, response to hormone and overlapping target gene sets, subtype specific effects on gene transcription, cell-based response, dimeric context and kinase-dependent regulation have revealed that ER $\alpha$  and ER $\beta$  can exert distinct functions as well.

Transcriptional activation of ER $\alpha$  and ER $\beta$  by estrogen involves a multistep process consisting of ligand binding, dimerization, interaction with their cognate DNA estrogen response element, and combinatorial recruitment of transcriptional coregulators. Such complex assembly is achieved in part by numerous posttranslational modifications that have been ascribed to the various components, providing extensive layers of specificity. For ERs, both ligand-induced and ligand-independent activation can be modulated by phosphorylation, in support of a significant role of kinase transduction pathways to differentially signal ER $\alpha$  and ER $\beta$  (Sanchez and Tremblay, 2005; Ward and Weigel, 2009; Maggi, 2011). More precisely, a cluster of phosphorylation sites has been identified to regulate AF-1 activity of ER $\beta$  and specific recruitment of coactivators SRC-1 and CBP, and of ubiquitin ligase E6-AP, highlighting the key role of this modification to regulate receptor activity and degradation (Picard et al., 2008; Sanchez et al., 2010; Tremblay et al., 1999a). Sumoylation has recently been added as a new regulator in the fine-tuning of nuclear receptors and associated coregulators activities (Treuter and Venteclef, 2010). Most nuclear

receptors that have been reported to undergo sumoylation were shown to be inhibited by this process, through either an active repression such as for AR, PgR and ERR $\alpha/\gamma$  (Poukka et al., 2000; Abdel-Hafiz et al., 2002; Vu et al., 2007; Tremblay et al., 2008), or a signal- and promoter specific transrepression as for PPAR $\gamma$  and LXR $\alpha/\beta$  (Ghisletti et al., 2007). SUMO modification was also reported for ER $\alpha$  in response to hormone, but was linked to transcriptional activation of the receptor (Sentis et al., 2005), providing a potential therapeutic perspective in ER-regulated breast carcinogenesis (Karamouzis et al., 2008).

This study identifies ER $\beta$  as a target of sumoylation through an unexpected SUMO-1 conjugation to a non-consensus SUMO accepting motif in which the usual aspartic residue flanking the acceptor lysine is replaced by a phosphorylated serine. This novel motif of SUMO target recognition that we termed *pSuM* for phosphorylated sumoylation motif regulates various aspects of ER $\beta$  function, including receptor stability, hormonal transcriptional control and chromatin binding.

## RESULTS

### ER $\beta$ is modified by SUMO1

To first determine whether ER $\beta$  is a potential substrate for SUMO, *in vitro* sumoylation was carried out on ER $\beta$  in the presence of ATP and purified components of the SUMO pathway, such as the SUMO E1 activating (SAE1/2) and E2 conjugating (Ubc9) enzymes. As shown in Figure 1A, addition of all constituents revealed a specific higher molecular weight form, indicating that ER $\beta$  was sumoylated. We then tested the sumoylation of ER $\beta$  in cells by transfecting human embryonic kidney 293 cells with ER $\beta$  and GFP-tagged SUMO1 plasmids. Western analysis of immunoprecipitated ER $\beta$  using anti-ER $\beta$  and anti-GFP antibodies, respectively, revealed a single higher molecular weight band whose intensity was clearly enhanced by the presence of estrogen (Figure 1B). The molecular weight of this band corresponds to the predicted shift induced by the covalent linkage of GFP-SUMO1 to ER $\beta$ . These results suggest that ER $\beta$  is sumoylated at a unique site and in a hormone-dependent manner. To further address the specificity of ER $\beta$  sumoylation, addition of the E2 SUMO conjugase Ubc9 potently enhanced the sumoylation of ER $\beta$  in cells, as opposed to its catalytically inactive C93S mutant (Figure 1C). Conversely, nuclear desumoylase SENP1 strongly abolished ER $\beta$  sumoylation, whereas the inactive SENP1 C603S mutant was inefficient (Figure 1D). These results establish ER $\beta$  as a specific SUMO1 substrate.

### A novel non-consensus SUMO recognition motif dictates ER $\beta$ sumoylation at Lys-4

We next wanted to identify the exact sumoylation site on ER $\beta$  but inspection of ER $\beta$  sequence from mouse or human has not revealed any site corresponding to the core SUMO consensus  $\psi$ KxE/D motif. In order to determine which region confers sumoylation potential, we thus performed sumoylation assay in cells expressing N-terminal truncated forms of ER $\beta$  (Figure 2A). While mouse full-length ER $\beta$  was efficiently sumoylated in

presence of estrogen (Figure 2B), removal of the entire N-terminal AF-1 region (CDEF $\beta$  construct) completely abolished ER $\beta$  sumoylation (Figure 2C), a result also observed with the human CDEF $\beta$  construct (Figure 2D). This indicates that the AF-1 containing region is required for ER $\beta$  sumoylation. Removal of the first 64 amino acids of mouse ER $\beta$  ( $\Delta$ 1-64 construct) further established the proximal N-terminal region as being targeted by SUMO1 in presence of estrogen (Figure 2E).

When comparing the sequence alignment of ER $\beta$  isoforms in this region (Figure 2F), we found a putative non-consensus SUMO attachment site corresponding to sequence IKNS which bears a serine residue instead of the usual glutamic acid residue of the SUMO  $\psi$ KxE consensus motif. This raises the striking possibility that phosphorylation of Ser-6 could confer the necessary negative charge for SUMO modification to occur. If true, then Lys-4 (Lys-23 in mouse ER $\beta$ ) in the IKNS sequence would serve as a SUMO attachment site. To test this hypothesis, a K4R mutant in which Lys-4 was mutated to arginine in human ER $\beta$  was assessed for sumoylation. As predicted, we found that the estrogen-dependent sumoylation signal obtained for wild-type ER $\beta$  was lost when using the K4R mutant (Figure 2G, lanes 3 and 4), indicating that Lys-4 is the SUMO accepting site in ER $\beta$ .

Interestingly, mutation of Ser-6 to alanine (S6A) without affecting Lys-4, also prevented ER $\beta$  sumoylation (Figure 2G, lane 5), indicating that Ser-6 is essential for ER $\beta$  sumoylation and further suggesting that phosphorylation of this residue is required. This hypothesis was supported by adding a negative charge at this position with the substitution of Ser-6 with aspartic acid (S6D) or glutamic acid (S6E) residue, which contributed to strongly enhance SUMO1 attachment compared to wild-type ER $\beta$  (Figure 2G, lanes 7 and 9). The S6E mutant was shown to be more effective since this modification creates a perfect SUMO  $\psi$ KxE motif. While sumoylation of S6E was enhanced by

estrogen, it was also observed in absence of hormone, suggesting that besides estrogen, other recruiting signals might promote ER $\beta$  sumoylation (Figure 2H). When Lys-4 was mutated in the context of Ser-6 substitution to acidic residues (K4R,S6D and K4R,S6E double mutants), the ER $\beta$  sumoylation signal was lost, indicating again the essential role of Lys-4 as a SUMO acceptor site (Figure 2E, lanes 8 and 10). Furthermore, the S6D and S6E mutations did not promote sumoylation to other sites since no additional SUMO-modified signals were observed in these conditions. These results reveal the IKNS sequence as the unique sumoylation motif for SUMO1 attachment on ER $\beta$ . Therefore, this SUMO1 recruiting sequence represents a novel non-consensus SUMO site that appears to function through phosphorylation to then mimic a classic consensus SUMO motif. In that respect, this site is different from the reported phosphorylation-dependent SUMO motif PDSM and from the negatively-charged amino acid dependent SUMO motif NDSM (Figure 2F) (Hietakangas et al., 2006; Yang et al., 2006). We therefore termed this newly identified sumoylation site *pSuM* for phosphorylated Sumoylation Motif.

### **Sumoylation of *pSuM* represses ER $\beta$ transcriptional activity**

We next investigated whether ER $\beta$  transcriptional potential was modulated by SUMO modification. Using reporter assays with a luciferase gene under the control of an estrogen responsive element (EREbLuc), we observed that sumoylation-deficient K4R (26-fold) and S6A (13-fold) ER $\beta$  mutants displayed a greater transcriptional response to estrogen when compared to wild-type receptor (8.5-fold), suggesting that SUMO inhibits ER $\beta$  activity in the context of hormone (Figure 3A). In line with such interpretation, the SUMO-enhancing S6E mutation clearly impaired ER $\beta$  response to estrogen (2.5 fold), while that of the S6D mutant (7.5-fold) was less affected compared to wild-type ER $\beta$  (Figure 3A), consistent with their respective levels of sumoylation (Figure 2G). Thus, the extent to which these mutants respond to estrogen inversely correlates with their ability to undergo sumoylation. This is especially emphasized with the SUMO-defective K4R



mutant, in whom the inhibitory potential of the S6E mutation could not abrogate its increased capacity to respond to estrogen (Figure 3B). These results strongly indicate that SUMO conjugation to Lys-4 is a crucial determinant to achieve ER $\beta$  repression.

The inhibitory role of SUMO on ER $\beta$  activity was further determined in cells transfected with increasing amounts of SUMO1, which caused a dose-dependent reduction in ER $\beta$  response to estrogen of near 3-fold, compared to cells not transfected with SUMO1 (Figure 3A). Such inhibitory role of SUMO1 on ER $\beta$  activity was severely impaired using the SUMO-defective K4R and S6A mutants, which showed a weak but not significant reduction in activity. In the same line, the SUMO-competent S6D and S6E mutants still retained the inhibitory response to SUMO1 expression (Figure 3A). This is consistent with a selective role of the *p*SuM to promote inhibition of ER $\beta$  by SUMO1.

To establish whether the integrity of ER $\beta$  *p*SuM has an impact on estrogen-responsive gene expression, we performed qRT-PCR analysis on human breast carcinoma Hs578t cells expressing ER $\beta$  wild-type or SUMO-related mutants. Stable expression of ER $\beta$  in Hs578t cells conferred estrogen responsiveness of known ER target genes such as progesterone receptor (*PgR*), trefoil factor *TFF1* and cytochrome *c* oxidase *Cox7A2L* (Sanchez et al., 2007). Indeed, expression of wild-type ER $\beta$  contributed to enhance the expression of these target genes with values ranging from 2 to 2.5-fold in response to estrogen, as opposed to parental ER $\beta$ -negative Hs578t cells which remained unresponsive (Figure 3C and Figure S1). Interestingly, greater responses to estrogen were achieved in the SUMO-defective K4R expressing cells, supporting the negative role of sumoylation on ER $\beta$  activity. Consistent with this, while addition of SUMO1 strongly abolished wild-type ER $\beta$  regulation of *PgR*, *TFF1*, and *Cox7A2L* genes by estrogen, it had no significant effect on ER $\beta$  K4R activation (Figure 3C and Figure S1). In addition, SUMO-competent

S6E expression cells exhibited an impaired gene response to estrogen when compared to wild-type ER $\beta$ , consistent with the poor activity of the S6E mutant (Figure 3A). These results establish a functional role of *p*SuM sumoylation in downregulating ER $\beta$  transcriptional activity and hormone responsive gene expression.

### **Modification of Lys-4 by SUMO regulates ER $\beta$ degradation**

We recently reported that ER $\beta$  transcriptional competence was closely associated with its proteasome-directed degradation, supporting a means by which target cells can limit their response to hormonal activating signals (Picard et al., 2008). Given the extent to which SUMO1 regulates ER $\beta$  activity, we thus addressed the role of sumoylation on ER $\beta$  stability. Figure 4A shows that the steady-state levels of ER $\beta$  in presence of hormone were increased with the SUMO-inducing S6D and S6E mutations, whereas S6A mutation had no significant effect, suggesting that ER $\beta$  stability is enhanced by sumoylation. However, disruption of the SUMO Lys-4 acceptor site alone (K4R) or in combination with S6D and S6E mutations contributed to further increase ER $\beta$  accumulation, as if the absence of SUMO1 was also stabilizing ER $\beta$ . In an attempt to better understand this intriguing relationship, increasing amounts of SUMO1 were added in transfection, which caused the accumulation of wild-type ER $\beta$ , an effect not observed with the K4R mutant (Figure 4B). Similarly, the SUMO-competent S6D and S6E forms of ER $\beta$  also accumulated in response to SUMO1 expression as opposed to S6A mutant, again indicating that sumoylation of ER $\beta$  has a stabilizing effect. The fact that K4R levels remained unresponsive to SUMO1 also agrees with such interpretation, but its enhanced accumulation over wild-type as seen in absence of exogenous SUMO1 (Figure 4B) might refer to a different mechanism possibly related to receptor degradation. Consistent with this, cycloheximide chase experiments revealed that disruption of Lys-4 almost completely abrogated ER $\beta$  degradation in absence of estrogen when compared to wild-type (half-life of ~9 hr; Figure 4C). However, as with wild-type ER $\beta$  ( $t_{1/2}$  = 6 hr), the addition of estrogen increased

ER $\beta$  K4R turnover rate ( $t_{1/2} > 10$  hr), indicating that this mutant still exhibited hormonal-dependent degradation. These results imply that while sumoylation of Lys-4 appears to protect ER $\beta$  from degradation, it might not represent the unique mechanism involved in the regulation of ER $\beta$  degradation by hormone.

### **SUMO1 competes with ubiquitin at Lys-4 of the core *p*SuM sequence of ER $\beta$**

Based on the inherent ability of sumoylation to regulate ER $\beta$  stability through modification of the *p*SuM IKNS sequence and on the known role of ubiquitin chain addition on lysine residues to direct protein degradation by the 26S proteasome, we next tested the interesting possibility that Lys-4 might also serve as a target for ER $\beta$  ubiquitination. As expected, an increase in ER $\beta$  ubiquitination signals was observed in cells co-transfected with ubiquitin and treated with estrogen and MG132, a commonly used 26S proteasome inhibitor (Figure 5A). However, substitution of Lys-4 under these conditions markedly reduced the ubiquitination of ER $\beta$ , revealing Lys-4 as a target site for ubiquitination and possibly explaining why the K4R mutant exhibits such an enhanced stability. We then evaluated the possibility that ubiquitin and SUMO might compete for access to ER $\beta$  Lys-4 and found that addition of SUMO1 induced a marked decrease in ER $\beta$  ubiquitination levels, an effect that was dependent on SUMO1 attachment since a conjugatable-defective SUMO1 $\Delta$ GG mutant had no effect (Figure 5B). In addition, SUMO1 contributed to decrease the poly-ubiquitination of the SUMO-responsive S6D and S6E mutants, whilst no significant effects were observed for the SUMO-deficient S6A (Figure 5C). These results identify the *p*SuM sequence as a tightly regulated convergent target motif for sumoylation and ubiquitination dynamic processes.

### **Sumoylation alters ER $\beta$ interaction with chromatin**

In view that SUMO1 was shown to repress ER $\beta$  transcriptional activity by hormone and that it promoted receptor accumulation by competing with ubiquitin, therefore affecting

its recognition by the 26S proteasome, our results suggest that the *pSuM* might serve as a regulatory module linking ER $\beta$  degradation with its transcriptional competence. Whereas the contribution of Lys-4 in that process is clearly implicated, it remains unknown why substitution of Lys-4 to render ER $\beta$  non-permissive to SUMO1 and ubiquitin binding still conferred enhanced stability and estrogenic responsiveness of ER $\beta$  (Figs. 3B and 4C). To further address the role of Lys-4 in ER $\beta$  response to hormone and on the inhibition of the transcriptional activity of ER $\beta$  when sumoylated, we evaluated how sumoylation influenced ER $\beta$  sensitivity to hormone. Transcriptional activities of wild-type ER $\beta$  and SUMO-deficient K4R and S6A mutants were obtained using luciferase assay in response to increasing concentrations of estrogen, which indicated that the SUMO-deficient mutants were more responsive to hormone than wild-type receptor, with a greater response for the K4R mutant (expressed in RLU; Figure 6A). When these data were plotted using a non-linear regression transformation method to ensure/measure estrogen sensitivity, we observed that disruption of Lys-4 or Ser-6 had no effect on ER $\beta$  interaction with hormone with EC<sub>50</sub> values of ~0.05nM in each case (Figure 6B), indicating that sumoylation does not alter ER $\beta$  sensitivity to estrogen.

We then evaluated whether ER $\beta$  sub-cellular localisation was affected by sumoylation. Using fluorescence microscopy, ER $\beta$  was found mostly nuclear in cells and no obvious relocalisation of ER $\beta$  to the cytoplasm was observed in response to SUMO1 addition (Figure S2). In Western analysis in which the cytosolic (C) and nuclear (N) fractions of transfected 293 cells expressing wild-type ER $\beta$  were prepared (Figure 6C), a greater proportion of ER $\beta$  to the nuclear compartment was observed in response to SUMO1 expression (Figure 6D), consistent with its reduced degradation. In absence of SUMO1 addition, the SUMO-competent S6E mutant already exhibited an enriched nuclear localisation when compared to wild-type, indicating a favoured clustering of sumoylated ER $\beta$  to the nucleus and no transition to the cytoplasm. To better define the intra-nuclear

localisation, nuclear extracts were separated into soluble (S), chromatin-bound nucleoplasm (CB) and insoluble matrix (M) fractions (Figure 6E). When compared in terms of relative proportion, SUMO1 appears to release ER $\beta$  from the CB fraction (from 17.1% of total amount to 3.6% in absence vs presence of SUMO1, respectively), as opposed to the SUMOdeficient K4R (18.7 vs 15.3%) and S6A (14.3 vs 14.8%) mutants, which tend to accumulate in the S fraction (Figure 6F). The SUMO-competent S6D (19.0 vs 5.9%) and S6E (5.8 vs 2.7%) behaved as the wild-type receptor in response to SUMO1 expression, with the S6E already exhibiting a weak occupation in the CB fraction in absence of SUMO1 addition. These results emphasize the role of sumoylation and of Lys-4 to regulate ER $\beta$  intra-nuclear movement and transcriptional competence in a SUMO-dependent context.

To relate the specific role of ER $\beta$  sumoylation to a transcriptionally-related chromatin context, we performed ChIP experiments on the estrogen response regions (ERE) of ERregulated promoters in human Hs578t breast cancer cells. As these cells are ER-negative, it allowed us to determine the promoter occupancy of the various SUMO ER $\beta$  mutants. We found that expression of SUMO1 provoked a decrease in wild-type ER $\beta$  association with the proximal ERE region of the *TFF1*, *PgR* and *Cox7A2L* genes, ranging from 17 to 71% reduction compared to control (Figure 6G). This effect of SUMO was also observed on ER $\beta$  recruitment to more distal estrogen-regulated binding regions as shown for the *PgR* gene (Sauvé et al., 2009), suggesting a similar *cis*-regulated role of SUMO on proximal and distal binding of ER $\beta$ . A decrease in ER $\beta$  recruitment to promoter regions was also evidenced with the K4R and S6A mutants when compared to wild-type receptor, whereas the SUMO-competent S6D and S6E variants were more prone to associate to these regions (Figure 6G). These results are consistent with a negative effect of sumoylation at Lys-4 and on the importance of *p*SuM integrity in altering ER $\beta$  interaction with *cis*-binding elements, thereby supporting the inhibitory outcome of SUMO1 on estrogen-dependent gene regulation by ER $\beta$ .

**SUMO modification at the *p*SuM site of ER $\beta$  is enhanced by GSK3, defining an extended regulatory SUMO motif**

In an attempt to characterize the incoming phosphorylation signal that functions to enhance *p*SuM sumoylation, we tested the impact of several kinase inhibitors on ER $\beta$  sumoylation in presence of hormone. A profound decrease in ER $\beta$  SUMO1 conjugation was observed with the inhibition of GSK3 $\alpha/\beta$  isoforms, whereas the inhibition of other prolinedirected kinases such as MAPK family members Erk1/2, p38 and Jnk had no or very weak effect (Figure 7A). Of other kinases tested, Src tyrosine kinase and PKA did not seem to be involved as well. These results suggest a selective targeting of proline-directed site phosphorylation by GSK3. As the phosphorylated Ser-6 included within the *p*SuM is itself contained within a Ser-Pro sequence and therefore could translate GSK3 regulation, the two SUMO-competent S6D and S6A mutants were tested under the same conditions. Surprisingly, GSK3 inhibition still led to a significant decrease of SUMO1 conjugation for both mutants (Figure 7B), indicating that Ser-6 might not be a strong determinant required for GSK3-dependent enhancement of ER $\beta$  sumoylation.

Interestingly, a highly conserved GSK3 $\alpha/\beta$  recognition motif corresponding to the consensus S/TxxxS/TP was found immediately adjacent to the *p*SuM sequence, in which Ser-8 and Ser-12 of human ER $\beta$  are included (Figure 7C). We thus tested the hypothesis that these sites might confer responsiveness to GSK3 to regulate ER $\beta$  sumoylation. Indeed, while still able to mediate ER $\beta$  SUMO1 conjugation possibly through their intact *p*SuM, the S8A and S12A ER $\beta$  mutants exhibited a reduced sumoylation compared to wild-type, with a more pronounced decrease when both residues were mutated (Figure 7D). In addition, substitution of Ser-8, Ser-12 or both rendered ER $\beta$  sumoylation unresponsive to GSK3 inhibition. These results indicate that the increase in ER $\beta$  sumoylation by GSK3 and in presence of hormone is dependent on the phosphorylation of Ser-8 and -12 immediately flanking the *p*SuM of ER $\beta$ , therefore defining an extended regulatory motif for SUMO1

conjugation. The fact that both Ser-8 and Ser-12 are indispensable to achieve maximal sumoylation in response to hormone is in line with the model described for most GSK3 substrates (Cohen and Frame, 2001), in which Ser-12 of ER $\beta$  would serve as the priming phosphorylation site to conduct the subsequent phosphorylation of Ser-8 by GSK3. The importance of these two serine residues is also emphasized with their highly conserved status along with the *p*SuM sequence, among mammals and other vertebrae expressing ER $\beta$  (Figure 7C).

With our observation that GSK3 enables ER $\beta$  sumoylation in presence of estrogen, we next explore the possibility that GSK3 activity might be itself modulated by estrogen. GSK3 $\alpha$  and GSK3 $\beta$  function as constitutive enzymes in resting cells and it is upon Akt-dependent phosphorylation of their respective Ser-21 and Ser-9 residue that they become inactivated (Cohen and Frame, 2001). Thus, by probing Ser-9 phosphorylation in Western analysis, we found that estrogen reduces the phosphorylation of GSK3 $\beta$  in a time-dependent manner (Figure 7E). Such response was mediated through ER $\beta$ , suggesting an activation of GSK3 $\beta$  by a non-genomic action of ER $\beta$ . Interestingly, SUMO1 expression also increases GSK3 $\beta$  activity by reducing Ser-9 phosphorylation in absence or presence of estrogen (Figure 7F). This effect was further alleviated with serum addition in an Akt-dependent manner, consistent with the role of Akt as a negative regulator of GSK3 activity. Such decrease in GSK3 $\beta$  activity by serum led to a reduction in ER $\beta$  SUMO1 conjugation, which was then relieved with Akt inhibition (Figure 7G). Altogether, these results establish a major role of GSK3 $\beta$  to stimulate the sumoylation process in the context of hormone, and identify a novel non-consensus extended SUMO recruiting motif that functions in a phosphorylation-dependent manner.

## DISCUSSION

In this study, we identify the nuclear receptor ER $\beta$  as a novel sumoylated target that enables conjugation of SUMO-1 to the accepting lysine 4 embedded into a  $\psi$ KxS motif that diverges from the core consensus  $\psi$ KxE. This atypical SUMO recognition motif that we termed *pSuM* is located in the unstructured AF-1 domain of ER $\beta$  and is made competent for proper SUMO modification through the negatively charged environment provided by the phosphorylation of Ser-6, which seems sufficient to recreate a genuine SUMO consensus motif. The initial determination of the classic  $\psi$ KxE SUMO conjugation motif was made possible after comparing the sequence flanking the acceptor lysine residues located within the various SUMO targets originally identified, such as RanGAP1, PML, I $\kappa$ B, and p53 among others (Rodriguez et al., 2001; Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). Structural studies have revealed that the bulky aliphatic and acidic side chains of the  $\psi$ KxE motif are both needed to interact with Ubc9 in order to protrude the lysine into the catalytic pocket of the E2 enzyme (Bernier-Villamor et al., 2002). Whether phosphorylation of the *pSuM* confers a stable recognized structure similar to those proposed for yeast PCNA (Hoege et al., 2002) and human E2-25K/Hip2 (Pichler et al., 2005), or might represent a different mechanism in recruiting and positioning Ubc9 remains to be clarified, but the negative charge provided by addition of phosphate seems indispensable and certainly represents an attractive mechanism in regulating SUMO modification at the level of the target itself.

Sumoylation has been shown to be enhanced by phosphorylation, such as in HSF-1 and -4 (Hietakangas et al., 2006), GATA1 (Collavin et al., 2004), ERR $\alpha$  and  $\gamma$  (Hietakangas et al., 2006; Vu et al., 2007; Tremblay et al., 2008), and MEF2 (Gregoire et al., 2006). In most cases, such regulation occurs through a PDSM motif, which differs from the *pSuM* by its phosphorylated serine that is not located directly within the core sumoylation motif but in the downstream extension (Hietakangas et al., 2006). Similarly, a



cluster of acidic residues flanking the  $\psi$ KxE site was shown to facilitate sumoylation of Elk-1, PML and LRH-1/NR5A2 (Yang et al., 2006). The proposed mechanism to enhance sumoylation through these two extended motifs has referred to their common property of adding a negatively-charged environment to promote substrate recognition with Ubc9 basic patch (Mohideen et al., 2009). Here, we have characterized a regulatory extension to the *p*SuM which is under the control of GSK3 as depicted in Figure 7H. In this model, we define an extended *p*SuM corresponding to the sequence  $\psi$ KxSPS(S)xxSP, in which the phosphorylation of adjacent serine residues at position 8 and 12 of ER $\beta$  brings additional negative charges to potentiate the sumoylation process. Interestingly, the extended *p*SuM is highly conserved between ER $\beta$  species (Figure 7C), which suggests GSK3 $\beta$  as an essential regulator of *p*SuM targeted sumoylation of ER $\beta$  across vertebrates. Based on the known preference of GSK3 for phosphorylation-primed substrates, it is expected that phosphorylation of Ser-12, and possibly also Ser-6 within the *p*SuM itself, might be mediated by another kinase that first targets ER $\beta$ . With these two residues being part of a Ser-Pro motif, many proline-directed kinases can be considered, but the interesting possibility that MAPK/Erk family members might participate is highly expected, especially based on their prominent role to regulate the AF-1 activity of ER $\beta$  (Sanchez et al., 2010). Moreover, we do not know if Ser-9, which is also highly conserved in the *p*SuM extension of ER $\beta$ -expressing species (Figure 7C), participates as well in such build up of negative charge addition under GSK3 $\beta$  action. Clearly, further investigation is needed to clarify such role.

While investigating more closely the role of GSK3 $\beta$  in ER $\beta$  sumoylation, we observed that GSK3 $\beta$  was rapidly activated by estrogen and that ER $\beta$  itself can translate these effects, providing a mechanism by which ER $\beta$  SUMO addition is under hormonal regulation. These findings also suggest that GSK3 activity is regulated by non-genomic actions of ER $\beta$  in response

to estrogen. Initially confined to glycogen metabolism, GSK3 has turned out to have a key role in many cellular signalling pathways, including responses to insulin, Wnt, growth factors and nutrients among others, which confers GSK3 a multi-tasking role and implication in various pathologies (Cohen and Frame, 2001; Doble and Woodgett, 2003). GSK3 $\beta$  is active in resting cells through constitutive Tyr-216 phosphorylation and stimuli such as insulin cause phosphorylation at Ser-9 and inactivation of GSK3 $\beta$  through the PI3-kinase/Akt pathway (Cross et al., 1995). The mechanism by which non-genomic activation of ER $\beta$  contributes to Ser-9 dephosphorylation and GSK3 $\beta$  activation in our study is still uncertain, but recent findings in rodent brain capillaries and breast cancer cells have shown that sustained ER $\beta$  activation by extended exposure to estradiol resulted in PTEN activation and decreased Akt activity and GSK3 phosphorylation (Lindberg et al., 2011; Hartz et al., 2010). Interestingly, part of the mechanism involved might also refer to ER $\beta$  response to Akt activation, as we demonstrated that Akt signalling downregulates ER $\beta$  degradation and activity in breast cancer cells (Sanchez et al., 2007). This indicates that ER $\beta$  might play an important role in regulating GSK3 $\beta$  activity in estrogen-responsive cells.

Sumoylation of transcription factors has mainly been associated with their transcriptional attenuation or repression (Gill, 2005), and our results support such mechanism for ER $\beta$ . Interestingly, ER $\alpha$  is one of few examples for which sumoylation was shown to exert transcriptional activation (Chauchereau et al., 2003; Sentis et al., 2005). This uncovers sumoylation as a key regulator for both isoforms, but with such apparently opposite effect between each subtype, it might have clear implications on ER-regulated gene expression, especially in the context of breast cancer cells that express both forms. For example, it has been proposed that ER $\beta$  can interfere with ER $\alpha$ -mediated oncogenic proliferation of breast cancer cells, therefore providing a tumor suppressor-like activity of ER $\beta$  dependent on cellular context (Lazennec et al., 2001; Hartman et al., 2009; Fox et al., 2008). Whether sumoylation of ER $\beta$  might affect such activity remains an interesting issue

to resolve, but with the prominent role of ER $\beta$  AF-1 activity to modulate ER $\alpha$ -mediated transcription (Tremblay et al., 1999b; Gougelet et al., 2007), and given that ER $\beta$  sumoylation appears to be restricted to the AF-1 domain, these findings supports an important role for sumoylation in regulating ER hormonal actions and biological functions.

Our results revealed that SUMO-1 conjugation affected ER $\beta$  protein turnover by competing with ubiquitin addition on Lys-4, protecting ER $\beta$  against proteasomal degradation. This identifies Lys-4 as a common and shared accepting residue for both modifications and suggests a mutually exclusive site that determines ER $\beta$  response to incoming signals. Since phosphorylation of the *p*SuM is a required determinant for ER $\beta$  sumoylation, it is interesting to note that ubiquitination of ER $\beta$  was also shown to be induced by kinase-dependent signals targeting the AF-1 domain (Picard et al., 2008). This implies that ER $\beta$  sumoylation and ubiquitination are regulated in a dynamic and competitive fashion, depending on different overlapping recruiting signals and/or by the modified target itself. Consistent with this, our observations indicate that as long as the *p*SuM integrity is intact and functional, ER $\beta$  remains more competent for sumoylation between the two reversible processes, suggesting a shift in the equilibrium on the side of the SUMO-ER $\beta$  pool. For this reason, we believe that sumoylation constitutes a protective step for ER $\beta$  degradation by the proteasome, possibly similar to what has been described for I $\kappa$ B $\alpha$  (Desterro et al., 1998), but that does not exclude that each modification can label ER $\beta$  for different functions, as it was reported for PCNA which also exhibits sumoylation and ubiquitination on the same site (Hoegge et al., 2002). Our results however clearly demonstrate that this shared occupancy of Lys-4 constitutes an important feature in ER $\beta$  turnover and regulation of transcription.

Our attempt to search other potential targets that contain the minimal  $\psi$ KxS *p*SuM sequence has identified several proteins involved in a vast area of functions and therefore might not be stringent enough to predict for phosphorylation-dependent sumoylated substrates. However, homology search for *p*SuM with the GSK3 extension conferred more specificity as it selected a restricted number of proteins, which interestingly were mostly associated with gene transcription, including GATA-4, SREBP-2, NF-IL3, and also Nor-1 which belongs to the nuclear receptor superfamily (Figure 7C), suggesting a shared mechanism to coordinate various gene expression programs. Of interest among others is the identification of SREBP-1 and -2 as targets of GSK3 with several sites involved, some of which remain to be identified, which mediate SREBP ubiquitin-dependent turnover (Kim et al., 2004; Sundqvist et al., 2005), and also the identification of Ser-183, contained in the predicted *p*SuM of NF-IL3 (Figure 7C), as a phosphorylation site involved in NF-IL3 degradation (Doi et al., 2004). Although the functionality of the predicted extended *p*SuM in these targets and others has yet to be determined, our findings uncovered a novel and highly regulated SUMO motif, which expands the dynamic nature of the sumoylation process and adds to the intricate mechanisms used by incoming signals to regulate gene transcription.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### **Plasmids**

pCMX expression plasmids coding for mouse and human full-length ER $\beta$ ,  $\Delta$ 1-64 and CDEF (aa 215-530) ER $\beta$  constructs, and for HA-tagged ubiquitin have been described (Tremblay et al., 1999a; Sanchez et al., 2007; Picard et al., 2008). The human ER $\beta$  Lys-4 to arginine, Ser-6 to alanine, aspartic acid or glutamic acid, Ser-8 and Ser-12 to alanine, and the corresponding double mutants were all obtained by PCR mutagenesis using *Pwo* DNA polymerase (Roche), and verified by automated sequencing. Plasmids for GFP-tagged SUMO1 (Masclé et al., 2007), wildtype and catalytically inactive C603S SENP1 (Bailey and O'Hare, 2004) and Ubc9 and its inactive C93S mutant (Tremblay et al., 2008) have been described. Untagged SUMO1 construct was obtained by removing the GFP-tag in pcDNA3.1 (Invitrogen).

### **Cell culture and transfection**

Human embryonic kidney 293 cells were routinely maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma) supplemented with 5 % fetal bovine serum, respectively. Human breast cancer Hs578t cells were cultured in DMEM containing 10 % FBS. For transient transfection, cells were seeded 16-20 hours prior transfection in phenol red-free DMEM supplemented with charcoal dextran-treated serum. Plasmids constructs were introduced into cells using the calcium phosphate precipitation method as described (Picard et al., 2008; St Laurent et al., 2005). Treatments were added in fresh phenol red-free medium in absence serum for the indicated time and concentration unless otherwise stated.

### **Luciferase assay**

Luciferase assays were done as described using an EREbLuc reporter (Picard et al., 2008). Cells were treated for 18-20 hr with vehicle or 10 nM 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>), except for the dose response curve in which increasing concentrations (10<sup>-16</sup> to 10<sup>-5</sup> M) were used. Data

were statistically analyzed with GraphPad Prism v4. Values are normalized to the  $\beta$ -galactosidase activity and expressed as relative luciferase units (RLU) or fold-response derived from at least three independent experiments performed in triplicate.

### **Cell lysates and immunoblotting**

Determination of ER $\beta$  cellular content was done by Western analysis essentially as described (Picard et al., 2008). Cells were lysed in PBS containing 1 % Triton X-100, 0.5 % deoxycholate acid, 0.1% SDS, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 1 mM PMSF, and protease inhibitor cocktail (Roche), and subjected to Western analysis using an anti-ER $\beta$  antibody (Santa Cruz). Total protein loading was normalized using an anti- $\beta$ -actin antibody (Abcam). Total endogenous GSK3 $\beta$  and phosphorylated GSK3 $\beta$  were determined with anti-GSK3 $\beta$  and antiphospho-GSK3 $\beta$  (Ser-9) antibodies (Cell Signalling), respectively.

### ***In Vitro* Sumoylation Assay**

[<sup>35</sup>S]-Met-labeled ER $\beta$  wild-type and K4R were produced using the TNT T7-coupled reticulocyte lysate system (Promega) and subjected to *in vitro* sumoylation reaction. Typically, ER $\beta$  proteins are incubated at 37°C for 1 hr with 150 ng of E1 enzyme (SAE1/SAE2), 1  $\mu$ g of E2 enzyme (UbcH9) and 1  $\mu$ g of SUMO1 (Boston Biochem) in 50 mM Tris pH 7.5, containing 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 2.5 mM ATP. The reactions were stopped by adding an equal volume of Laemmli buffer and boiled. Samples were separated by SDS-PAGE and analyzed by fluorography.

### **Cellular Sumoylation Assay**

293 cells were transfected with the specified ER $\beta$  constructs along with GFP-SUMO1 in the presence of Ubc9 when indicated. Dominant-negative variants of SUMO1 (SUMO1 $\Delta$ GG) and Ubc9 (C93S) were also used to inhibit sumoylation, as well as SENP1

and its inactive C603S mutated form. At 24 hr after transfection, cells were treated with vehicle or 10 nM estradiol for 5- 18 hr in fresh medium and then harvested in 50 mM Tris pH 7.5, containing 100 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0.8 % SDS, 5 mM EDTA, 20 mM N-ethylmaleimide, and protease/phosphatase inhibitors (Roche). Extracts were immunoprecipitated with an anti-ER $\beta$  antibody (Santa Cruz Biotech), and Western analysis was performed using antibodies against either GFP (Roche) or ER $\beta$ . Cells were also treated with protein kinase inhibitors for Mek (50  $\mu$ M PD98059; BioMol), p38 (10  $\mu$ M SB203580; BioMol), Jnk (10  $\mu$ M SP600125; BioMol), Src (1  $\mu$ M PP2; Calbiochem), PKA (100  $\mu$ M H89; Calbiochem), PI3-K (10 nM LY294002; Alexis Biochemicals), and GSK3 (4  $\mu$ M 6BIO (2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxime; Alexis Biochemicals) to address their respective role on ER $\beta$  sumoylation.

### **Ubiquitination assay**

The detection of ubiquinated forms of ER $\beta$  was performed essentially as described (Picard et al., 2008). 293 cells were transfected with wild-type or ER $\beta$  mutants along with HA-tagged ubiquitin with or without SUMO1 plasmids. Cells were then treated with vehicle, 1  $\mu$ M MG132 (Sigma) and/or 10 nM 17 $\beta$ -estradiol for 16 hr, and harvested for immunoprecipitation using an anti-ER $\beta$  antibody (Santa Cruz). Extracts were analyzed with an anti-HA antibody (12CA5) and input levels of ER $\beta$  normalized.

### **Cycloheximide Chase**

293 cells were transfected with wild-type and mutated ER $\beta$ . At 24 hr after transfection, 50  $\mu$ M cycloheximide (Sigma) was added in fresh medium and cells were treated with or without 10 nM 17 $\beta$ -estradiol. Cells were then harvested at the indicated time points and ER $\beta$  steady-state levels were analyzed as previously described (Picard et al., 2008). Each result was derived from at least three separate experiments and expressed relative to  $\beta$ -actin levels.

### **Preparation of sub-cellular fractions**

293 cells were transfected with ER $\beta$  wild-type or site-specific mutants as specified, and 24 hr after transfection, cells were treated with 10 nM 17 $\beta$ -estradiol for 16 hr in the presence of 1  $\mu$ M MG132. Cells were washed in ice-cold PBS and the cytoplasmic fraction (C) was obtained by repeated freeze-thaw cycles in 10 mM Hepes pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 20 mM N-ethylmaleimide, 20 U/ml RNasin, in the presence of protease and phosphatase inhibitors (Roche). The nucleoplasmic fraction (N) was obtained by centrifugation and nuclei resuspended in 10 mM Pipes, pH 6.8, containing 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 % Triton, 20 mM N-Ethylmaleimide, 20 U/ml RNasin and protease/phosphatase inhibitors. The soluble fraction (S) was obtained after centrifugation, and the chromatin bound (CB) proteins were removed by extraction in freshly prepared digestion buffer containing 10 mM Pipes, pH 6.8, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 % Triton, 20 mM N-Ethylmaleimide, 20 U/ml RNasin, in the presence of 200 U/ml DNase I (Ambion). DNA digestion was terminated by adding 250 mM ammonium sulphate. The matrix fraction (M) was obtained by resuspending the final pellet in Laemmli buffer. Proteins of each fraction were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western using an anti-ER $\beta$  antibody (Santa Cruz Biotech). The following antibodies of selective markers of each sub-cellular compartment were used to ensure the purity of the prepared fractions: anti-GAPDH (Santa Cruz Biotech), anti-Lamin A/C (Cell Signaling), anti-Nucleolin (Enzo Life Sciences), anti-DNA PolIII (Santa Cruz Biotech), and anti-cytokeratin 5/8 (Santa Cruz Biotech).

### **RNA isolation and real-time PCR**

ER-negative Hs578t cells were transfected with ER $\beta$  wild-type or variants as specified, in presence or absence of pcDNA-SUMO1. After 36 hr of transfection, cells were treated with



vehicle or 10 nM 17 $\beta$ -estradiol for 6 hr in fresh medium. Complementary DNA was prepared as described (Rodrigue-Way et al., 2007) and PCR amplification was done in a volume of 20  $\mu$ l with 0.5 to 1  $\mu$ l of reverse transcription reaction for 25 to 35 cycles (Fermentas). PCR products were analyzed on a StepOnePlus cycler (Applied Biosystems) and on gel (Alpha Innotech). Sequences of PCR primers are available on request. Values are derived from triplicate from at least two separate experiments and normalized to RPLP0 expression.

### **Chromatin immunoprecipitation assay**

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were done as previously described (Avallone et al., 2006; Sauvé et al., 2009). Hs578t cells were transfected with wild-type and mutants of ER $\beta$ , in absence or presence of SUMO1, and compared to mock-transfected cells. At 24 hr after transfection, cells were treated with 10 nM 17 $\beta$ -estradiol for 40 min and then harvested. Primer pairs were designed to encompass proximal and distal ERE sites of estrogen-responsive promoters (Sauvé et al., 2009).

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We wish to thank Dirk Bohmann and Daniel Bailey for the generous gifts of respective plasmids for ubiquitin and SENP1. We acknowledge the technical assistance of Véronique Caron. We thank members of the lab for critical reading and useful comments. N.P. is supported by a doctoral award from the FRSQ (Fonds de la Recherche en Santé du Québec) and from the FHSJ (Fondation de l'Hôpital Ste-Justine), and M.S. is supported by the FHSJ. A.T. is a New Investigator of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the CIHR, and the Canadian Foundation for Innovation (to A.T.).

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1. ER $\beta$ is SUMO1-modified

(A) *In vitro* sumoylation of ER $\beta$ . [<sup>35</sup>S]-Methionine labeled ER $\beta$  was incubated in the presence or absence of purified human SAE1/2 and SUMO1 proteins, and subjected to *in vitro* sumoylation with Ubc9. Sumoylation was analyzed by SDS-PAGE and fluorography. (B) *In vivo* sumoylation of ER $\beta$ . 293 cells were transfected with ER $\beta$  and GFP-SUMO1 expression plasmids as indicated and then treated with 10nM estradiol or left untreated for 18 hr. Immunoprecipitation (IP) was carried out with an anti-ER $\beta$  antibody, and bound proteins analyzed by Western immunoblot (IB) using a second anti-ER $\beta$  (*top*) or an anti-GFP (*bottom*) antibody. (C and D) Immunoprecipitation assays as described in panel B except that plasmids for wild-type Ubc9 or ligase-deficient Ubc9 C93S mutant (C) or for wild-type SENP1 or catalytically-inactive SENP1 C603A mutant (D) were added in transfection. In each case, cells were treated with 10 nM estradiol for 18h prior to Western analysis with an anti-ER $\beta$  antibody. Asterisks denote non specific signals.

### Figure 2. Identification of a novel non-consensus SUMO conjugation motif in ER $\beta$

(A) Schematic representation of full-length (549 aa) and N-terminal truncated  $\Delta$ 1-64 aa and CDEF (aa 164-549) forms of mouse ER $\beta$ . Also shown are transcriptional activation functions AF-1 and AF-2. (B and C) 293 cells were transfected with plasmids coding for HA-tagged mouse full length ER $\beta$  (B) or CDEF $\beta$  (C) in presence or absence of GFP-SUMO1 plasmid. Cells were treated with 10nM estradiol for 18 hr and harvested for immunoprecipitation with an anti-ER $\beta$  antibody. Extracts were analyzed for sumoylation by Western immunoblot using an anti-HA antibody. (D) Similar as in panel B, except that a plasmid coding for human CDEF $\beta$  (aa 145-530) was used and immunoprecipitation was carried out with an anti-ER $\beta$  antibody. (E) Similar as in panel D, except that mouse full-length and  $\Delta$ 1-64 aa ER $\beta$  were assayed for sumoylation. (F) Sequence alignment for

predicted SUMO motif located near the N-terminal end of mouse and human ER $\beta$ . The predicted SUMO site differs from the consensus SUMO motif and from the extended phosphorylation-dependent SUMO motif (PDSM) and the negatively-charged amino acid dependent SUMO motif (NDSM) with the replacement of the conserved aspartic acid residue by a serine residue (Ser-6 in human ER $\beta$ ). (G) Estrogen promotes SUMO1 attachment to Lys-4 of human ER $\beta$  which involves Ser-6. ER $\beta$  sumoylation performed with wild-type or various point mutants of human ER $\beta$  expressed in 293 cells. Immunoprecipitation and Western analysis were done as in panel D. (H) Basal and estrogen-elicited sumoylation of ER $\beta$  S6E mutant. Sumoylation was carried out as in panel G. Asterisks denote non specific signals.

**Figure 3. ER $\beta$  transcriptional potential is reduced by sumoylation**

(A) Transcriptional activity of wild-type and site-specific mutants of ER $\beta$  in response to estrogen and SUMO1. 293 cells were transfected with an EREbLuc reporter gene along with each ER $\beta$  construct (100ng) and increasing amounts of SUMO-1 (0, 25, 50, 100 and 200 ng). Cells were then treated with 10nM estradiol for 18 hr and harvested for luciferase activity measurement. (B) Reporter gene assay performed as in panel A for the indicated ER $\beta$  point mutants, except that SUMO1 was omitted. Luciferase values were normalized to  $\beta$ -galactosidase activity and expressed as percentage of estradiol response of wild-type receptor which was set at 100 %. (C) ER $\beta$ -specific inhibition of progesterone receptor (PgR) target gene expression by SUMO1 requires Lys-4. Real-time PCR analysis of PgR expression in ER-negative breast cancer Hs578t cells expressing ER $\beta$  wild-type or site-specific mutants. Cells were transfected or not with SUMO1 construct and treated with 10 nM estradiol for 6 hr. Results were normalized to RPLP0 expression.

**Figure 4. SUMO1 modulates ER $\beta$  stability**

(A) Steady-state levels of wild-type and site-specific *p*SuM mutants of ER $\beta$ . Extracts of 293 cells transfected with the various ER $\beta$  constructs and treated with 10nM estradiol for 18 hr were subjected to Western analysis with an anti-ER $\beta$  antibody. Protein loading was monitored with  $\beta$ -actin content. (B) Western analysis as in panel A except that increasing amounts of SUMO1 (0, 0.5, 1.0, and 2.0-fold relative to each ER $\beta$  construct) were added in transfection.  $\beta$ -actin was used as a loading control. (C) The K4R mutation confers stability to ER $\beta$ . (*Top*) Cycloheximide chase experiment using 293 cells expressing ER $\beta$  wild-type or K4R mutant. Cells were treated with 50  $\mu$ M cycloheximide and lysed at the indicated time points for Western analysis using anti-ER $\beta$  antibody.  $\beta$ -actin was used as a loading control. (*Bottom*) Quantification of signal intensity derived from three separate chase experiments. Results are normalized to  $\beta$ -actin content and expressed as the percentage of change of time zero, which was set at 100 %.

**Figure 5. SUMO1 competes with ubiquitin at Lys-4 of ER $\beta$  *p*SuM**

(A) ER $\beta$  Lys-4 is a target of ubiquitin. Ubiquitination assay of 293 cells transfected with ER $\beta$  wild-type or K4R mutant in absence or presence of ubiquitin. Cells were treated with 1  $\mu$ M MG132 for 16 hr and extracts subjected to immunoprecipitation with anti-ER $\beta$  antibody. Western analysis was performed using a different anti-ER $\beta$  antibody. (B and C) SUMO1 competes with ubiquitin at Lys-4 of ER $\beta$ . Cells were transfected with wild-type (B) or *p*SuM mutants (C) of ER $\beta$  in the presence or absence of ubiquitin and SUMO1 constructs. A non-conjugatable SUMO1 $\Delta$ GG mutant was also used to inhibit sumoylation. Cell extracts were processed as in panel A.

**Figure 6. Sumoylation modulates ER $\beta$  chromatin interaction without altering hormone sensitivity**

(Panels A and B) ER $\beta$  *p*SuM regulates the capacity to respond to hormone but not sensitivity. 293 cells expressing ER $\beta$  wild-type or *p*SuM mutants K4R and S6A were co-transfected with an ERE-bLuc reporter gene, and treated with increasing concentrations of estradiol for 18 hr. Cells were then harvested for luciferase activity measurement and results normalized to  $\beta$ -galactosidase activity. Average values derived from at least three separate experiments are indicated as relative luciferase units (RLU) for each ER $\beta$  construct (panel A) and as a percentage of maximal response of each variant to estrogen (panel B) using a non-linear regression curve fitting transformation. (Panels C and D) SUMO1 affects nuclear ER $\beta$  content. Cells were transfected with the various ER $\beta$  constructs with or without SUMO1 and protein extracts were separated into cytoplasmic (C) and nuclear (N) fractions and validated by Western analysis for respective GAPDH and Lamin A/C markers (panel C). Both C and N fractions were also analyzed by Western with anti-ER $\beta$  antibody (panel D). Prior to harvest, cells were treated with 1  $\mu$ M MG132 and 10 nM estradiol for 16 hr. (Panels E and F) SUMO1 decreases chromatin-bound ER $\beta$ . Nuclear extracts of cells transfected as in panel D were separated into soluble (S), chromatin-bound (CB) and matrix (M) fractions validated by Western for their respective markers (panel E). Nuclear fractions were also analyzed with anti-ER $\beta$  antibody (panel F). (Panel G) SUMO1 reduced ER $\beta$  promoter occupancy through the *p*SuM. ChIP analysis on Hs578t cells expressing ER $\beta$  wild-type or *p*SuM sitespecific mutants and transfected or not with SUMO1 construct. Cells were treated with 10 nM estradiol for 40 min prior to harvest. Fold changes of ChIP signals are expressed relative to wildtype ER $\beta$ -expressing cells.

**Figure 7. GSK3 enhances estrogen-dependent sumoylation of ER $\beta$  through an extended *p*SuM**

(A) GSK3 regulates ER $\beta$  sumoylation. The effect of various kinase inhibitors (see Methods for specification) was assessed on ER $\beta$  sumoylation in 293 cells transfected with wild-type

ER $\beta$  and GFP-SUMO1. Cells were left untreated or treated with inhibitors and 10 nM estradiol for 6 hr and 5 hr, respectively. (B) The effect of GSK3 inhibition on ER $\beta$  SUMO-competent S6D and S6E mutants. Cells were treated as in (A). (C) Conserved homology sequence alignment of the *p*SuM with the GSK3 extension among ER $\beta$  species (h, human; m, mouse; r, rat; rh, rhesus monkey; ov, *ovis aries*; bi, *sturnus vulgaris*; x, *xenopus*) and other transcription regulators. Highly conserved residues are shaded. Also shown are putative phosphorylated residues (Ser-8 and Ser-12 in human ER $\beta$ ) contained in the GSK3 consensus motif. (D) Ser-8 and Ser-12 participate in ER $\beta$  sumoylation. Sumoylation assay similar as to panel B with cells transfected with ER $\beta$  wild-type or S8A, S12A and S8,12A mutants. Asterisks denote non-specific signals. (E) GSK3 $\beta$  activity is modulated by ER $\beta$ . 293 cells were transfected with ER $\beta$  and treated with 10 nM estradiol for the indicated time points. Endogenous phosphorylated GSK3 $\beta$  levels were determined by Western analysis using a phospho-specific antibody against the inhibitory Ser-9 phosphorylation site of GSK3 $\beta$ . Extracts were also analyzed for total GSK3 $\beta$  content. (F) Repression of GSK3 $\beta$  activity by Akt. Western analysis performed as in panel E with cells transfected with ER $\beta$  and SUMO1 constructs and then treated in serum-depleted medium with vehicle, 10 nM estrogen, 5 % fetal bovine serum (FBS), and 10 nM Akt inhibitor LY294002 for 5h. (G) Sumoylation of ER $\beta$  in response to FBS and Akt inhibition. Cells were treated as in panel F and sumoylated ER $\beta$  was detected as in panel D. (H) Proposed model for ER $\beta$  regulation by SUMO1. ER $\beta$  is SUMO-1 modified on Lys-4 of the *p*SuM sequence located at the N-terminal end of the AF-1 domain. This sumoylation can occur in a ligand-independent manner but is highly favoured by hormone which facilitates optimal Ser-6 phosphorylation, providing the necessary negative charge in *p*SuM for Ubc9 recognition and attachment of SUMO1. This whole process is further enhanced through non-genomic effects of ER $\beta$  activation resulting in GSK3 $\beta$  activation and phosphorylation of specific serine residues including Ser-8, immediately flanking the *p*SuM. It is not known whether Ser-12 is phosphorylated by GSK3 $\beta$  but likely serves as a priming site. Modification of

ER $\beta$  by SUMO regulates diverse aspects of ER $\beta$  functions, including receptor stability through competition with ubiquitin on the same accepting site, intranuclear localization, and transcriptional repression by disrupting ER $\beta$  interaction with active chromatin.

## REFERENCES

- Abdel-Hafiz, H, Takimoto, G S, Tung, L, and Horwitz, K B (2002). The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression. *J. Biol. Chem.* *277*, 33950-33956.
- Avallone, R, Demers, A, Rodrigue-Way, A, Bujold, K, Harb, D, Anghel, S, Wahli, W, Marleau, S, Ong, H, and Tremblay, A (2006). A Growth Hormone-Releasing Peptide that Binds Scavenger Receptor CD36 and Ghrelin Receptor Upregulates ABC Sterol Transporters and Cholesterol Efflux in Macrophages Through a PPAR $\gamma$ -dependent Pathway. *Molecular Endocrinology* *20*, 3165-3178.
- Bailey, D and O'Hare, P (2004). Characterization of the localization and proteolytic activity of the SUMO-specific protease, SENP1. *J. Biol. Chem.* *279*, 692-703.
- Bernier-Villamor, V, Sampson, D A, Matunis, M J, and Lima, C D (2002). Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* *108*, 345-356.
- Chauchereau, A, Amazit, L, Quesne, M, Guiochon-Mantel, A, and Milgrom, E (2003). Sumoylation of the progesterone receptor and of the steroid receptor coactivator SRC-1. *J Biol Chem.* *278*, 12335-12343.
- Cohen, P and Frame, S (2001). The renaissance of GSK3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 769-776.
- Collavin, L, Gostissa, M, Avolio, F, Secco, P, Ronchi, A, Santoro, C, and Del, S G (2004). Modification of the erythroid transcription factor GATA-1 by SUMO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 8870-8875.
- Cross, D A, Alessi, D R, Cohen, P, Andjelkovich, M, and Hemmings, B A (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* *378*, 785-789.
- Desterro, J M, Rodriguez, M S, and Hay, R T (1998). SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF- $\kappa$ B activation. *Mol. Cell* *2*, 233-239.
- Doble, B W and Woodgett, J R (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* *116*, 1175-1186.
- Doi, M, Okano, T, Yujnovsky, I, Sassone-Corsi, P, and Fukada, Y (2004). Negative control of circadian clock regulator E4BP4 by casein kinase I $\epsilon$ -mediated phosphorylation. *Curr. Biol.* *14*, 975-980.



- Fox, E M, Davis, R J, and Shupnik, M A (2008). ERbeta in breast cancer--onlooker, passive player, or active protector? *Steroids* 73, 1039-1051.
- Geiss-Friedlander, R and Melchior, F (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat. Rev. Mol Cell Biol* 8, 947-956.
- Ghisletti, S, Huang, W, Ogawa, S, Pascual, G, Lin, M E, Willson, T M, Rosenfeld, M G, and Glass, C K (2007). Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol Cell* 25, 57-70.
- Gill, G (2005). Something about SUMO inhibits transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 536-541.
- Gougelet, A, Mueller, S O, Korach, K S, and Renoir, J M (2007). Oestrogen receptors pathways to oestrogen responsive elements: the transactivation function-1 acts as the keystone of oestrogen receptor (ER)beta-mediated transcriptional repression of ERalpha. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 104, 110-122.
- Gregoire, S, Tremblay, A M, Xiao, L, Yang, Q, Ma, K, Nie, J, Mao, Z, Wu, Z, Giguere, V, and Yang, X J (2006). Control of MEF2 transcriptional activity by coordinated phosphorylation and sumoylation. *J Biol Chem* 281, 4423-4433.
- Hartman, J, Strom, A, and Gustafsson, J A (2009). Estrogen receptor beta in breast cancer--diagnostic and therapeutic implications. *Steroids* 74, 635-641.
- Hartz, A M, Madole, E K, Miller, D S, and Bauer, B (2010). Estrogen receptor beta signalling through phosphatase and tensin homolog/phosphoinositide 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 down-regulates blood-brain barrier breast cancer resistance protein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 334, 467-476.
- Hay, R T (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18, 1-12. Hietakangas, V, Anckar, J, Blomster, H A, Fujimoto, M, Palvimo, J J, Nakai, A, and Sistonen, L (2006). PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 45-50.
- Hoegel, C, Pfander, B, Moldovan, G L, Pyrowolakis, G, and Jentsch, S (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-141.
- Karamouzis, M V, Konstantinopoulos, P A, Badra, F A, and Papavassiliou, A G (2008). SUMO and estrogen receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 107, 195-210.

- Kim, J H and Baek, S H (2009). Emerging roles of desumoylating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 155-162.
- Kim, K H, Song, M J, Yoo, E J, Choe, S S, Park, S D, and Kim, J B (2004). Regulatory role of glycogen synthase kinase 3 for transcriptional activity of ADD1/SREBP1c. *J. Biol. Chem.* 279,51999-52006.
- Lazennec, G, Bresson, D, Lucas, A, Chauveau, C, and Vignon, F (2001). ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology* 142, 4120-4130.
- Lindberg, K, Helguero, L A, Omoto, Y, Gustafsson, J A, and Haldosen, L A (2011). Estrogen receptor beta represses Akt signaling in breast cancer cells via downregulation of HER2/HER3 and upregulation of PTEN: implications for tamoxifen sensitivity. *Breast Cancer Res.* 13, R43.
- Maggi, A (2011). Liganded and unliganded activation of estrogen receptor and hormone replacement therapies. *Biochim. Biophys. Acta.*
- Masclé, X H, Germain-Desprez, D, Huynh, P, Estéphan, P, and Aubry, M (2007). 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.
- Mohideen, F, Capili, A D, Bilimoria, P M, Yamada, T, Bonni, A, and Lima, C D (2009). A molecular basis for phosphorylation-dependent SUMO conjugation by the E2 UBC9. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 945-952.
- Picard, N, Charbonneau, C, Sanchez, M, Licznar, A, Busson, M, Lazennec, G, and Tremblay, A (2008). Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-AP ubiquitin ligase recruitment to the estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol.* 22, 317-330.
- Pichler, A, Knipscheer, P, Oberhofer, E, van Dijk, W J, Korner, R, Olsen, J V, Jentsch, S, Melchior, F, and Sixma, T K (2005). SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 264-269.
- Poukka, H, Karvonen, U, Janne, O A, and Palvimo, J J (2000). Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 14145-14150.

- Rodrigue-Way, A, Demers, A, Ong, H, and Tremblay, A (2007). A Growth Hormone-Releasing Peptide Promotes Mitochondrial Biogenesis And A Fat Burning-like Phenotype Through Scavenger Receptor CD36 in White Adipocytes. *Endocrinology* 148, 1009-1018.
- Rodriguez, M S, Dargemont, C, and Hay, R T (2001). SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J. Biol. Chem.* 276, 12654-12659.
- Sanchez, M, Picard, N, Sauvé, K, and Tremblay, A (2010). Challenging estrogen receptor beta with phosphorylation. *Trends Endocrinol. Metab* 21, 104-110.
- Sanchez, M, Sauvé, K, Picard, N, and Tremblay, A (2007). The hormonal response of estrogen receptor beta is decreased by the PI3K/Akt pathway via a phosphorylation-dependent release of CREB-binding protein. *J Biol Chem* 282, 4830-4840.
- Sanchez, M and Tremblay, A (2005). Growth factor signaling to estrogen receptors in hormone dependent cancers. *Molecular Genetics of Cancer* 5, 149-185.
- Sauvé, K, Lepage, J, Sanchez, M, Heveker, N, and Tremblay, A (2009). Positive Feedback Activation of Estrogen Receptors by the CXCL12-CXCR4 Pathway. *Cancer Res.* 69, 5793-5800.
- Seeler, J S and Dejean, A (2003). Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 690-699.
- Sentis, S, Le Romancer, M, Bianchin, C, Rostan, M C, and Corbo, L (2005). Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol Endocrinol.* 19, 2671-2684.
- St Laurent, V, Sanchez, M, Charbonneau, C, and Tremblay, A (2005). Selective hormonedependent repression of estrogen receptor beta by a p38-activated ErbB2/ErbB3 pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94, 23-37.
- Sundqvist, A, Bengoechea-Alonso, M T, Ye, X, Lukiyanchuk, V, Jin, J, Harper, J W, and Ericsson, J (2005). Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF(Fbw7). *Cell Metab* 1, 379-391.
- Tremblay, A, Tremblay, G B, Labrie, F, and Giguere, V (1999a). Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor b through phosphorylation of activation function AF- 1. *Molecular Cell* 3, 513-519.

Tremblay, A M, Wilson, B J, Yang, X J, and Giguere, V (2008). Phosphorylation-Dependent Sumoylation Regulates ERR{alpha} and {gamma} Transcriptional Activity Through a Synergy Control Motif. *Mol Endocrinol.* 22, 570-584.

Tremblay, G B, Tremblay, A, Labrie, F, and Giguère, V (1999b). Dominant activity of activation function 1 (AF-1) and differential stoichiometric requirements for AF-1 and -2 in the estrogen receptor a-b heterodimeric complex. *Molecular and Cellular Biology* 19, 1919-1927.

Treuter, E and Venteclef, N (2010). Transcriptional control of metabolic and inflammatory pathways by nuclear receptor SUMOylation. *Biochim. Biophys. Acta.*

Vu, E H, Kraus, R J, and Mertz, J E (2007). Phosphorylation-dependent sumoylation of estrogenrelated receptor alpha1. *Biochemistry* 46, 9795-9804.

Ward, R D and Weigel, N L (2009). Steroid receptor phosphorylation: Assigning function to sitespecific phosphorylation. *Biofactors* 35, 528-536.

Yang, S H, Galanis, A, Witty, J, and Sharrocks, A D (2006). An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *EMBO J.* 25, 5083-5093.

Fig.1

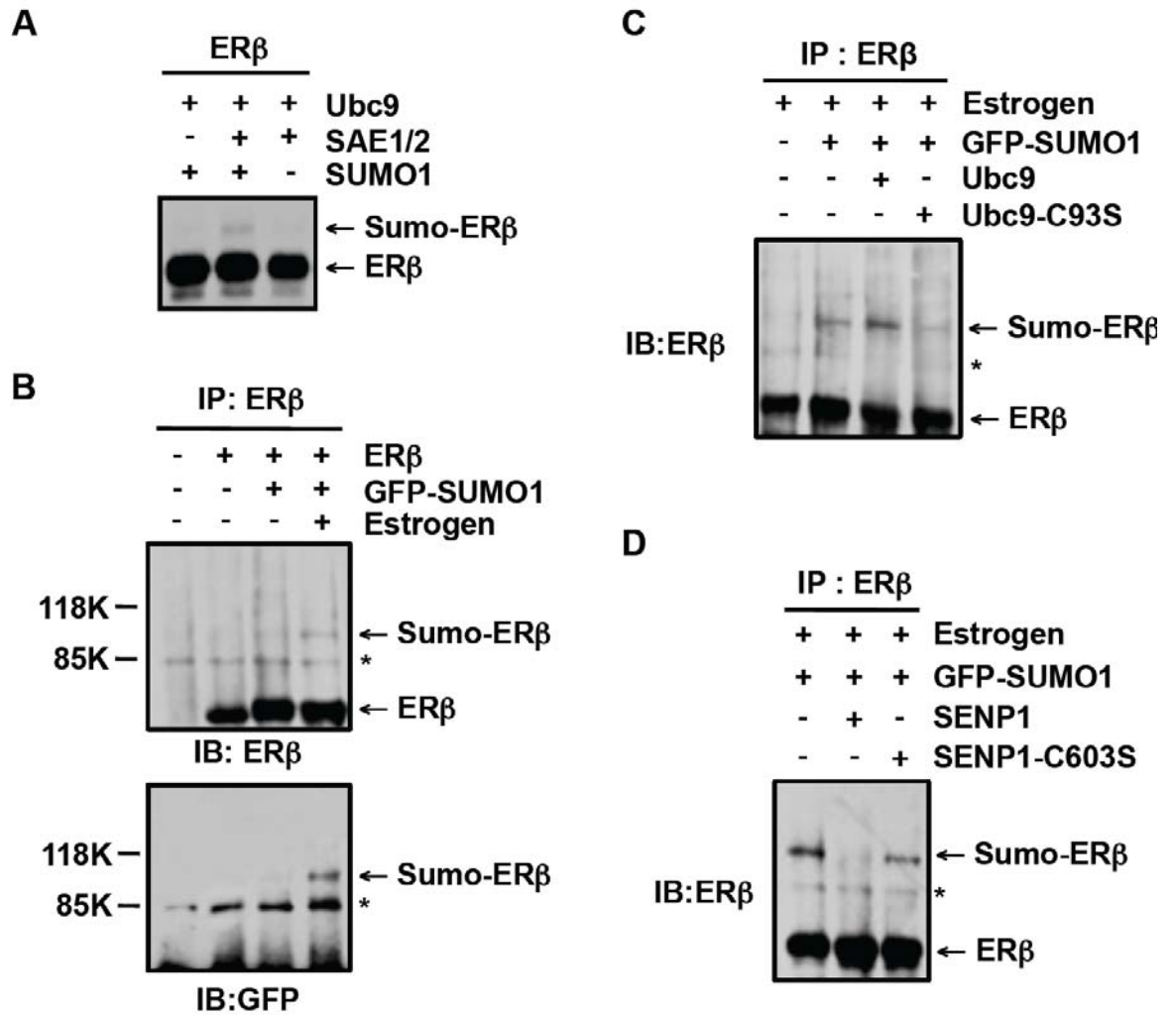


Fig.2

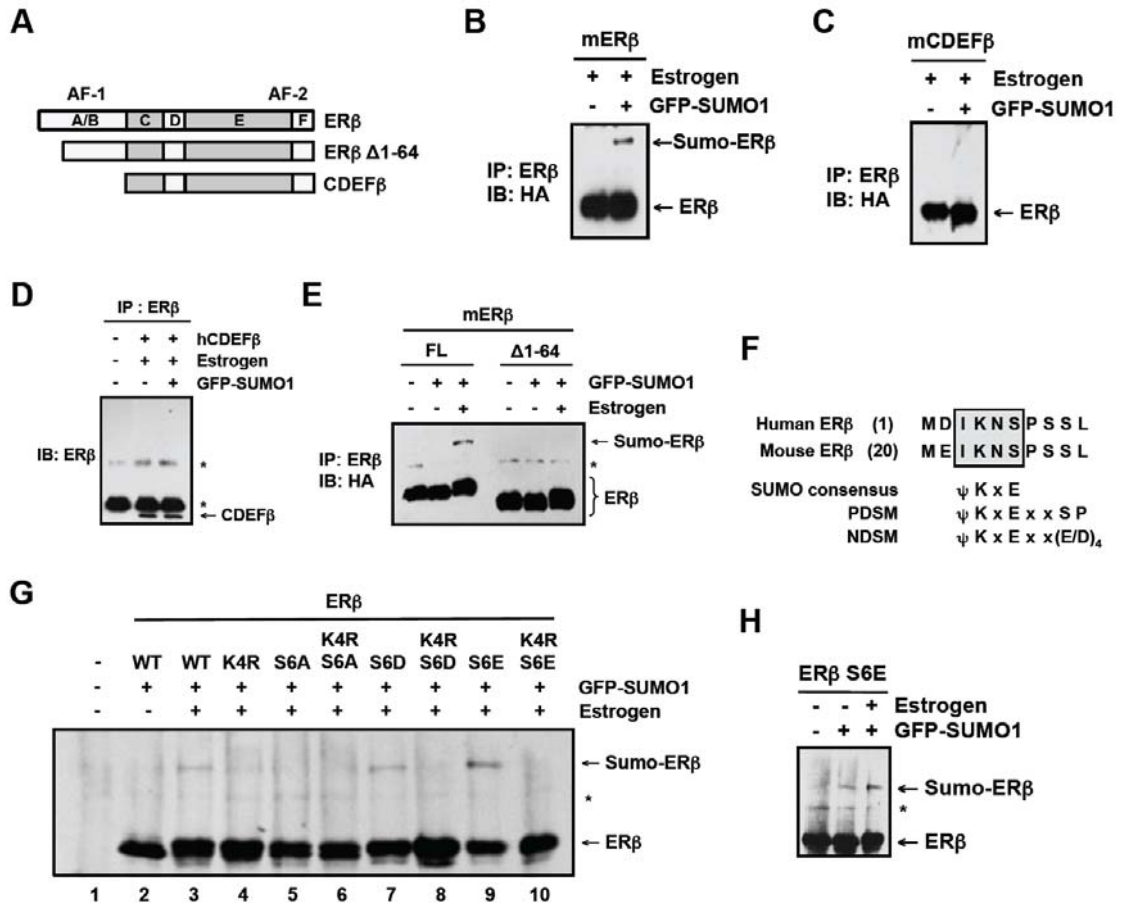


Fig.3

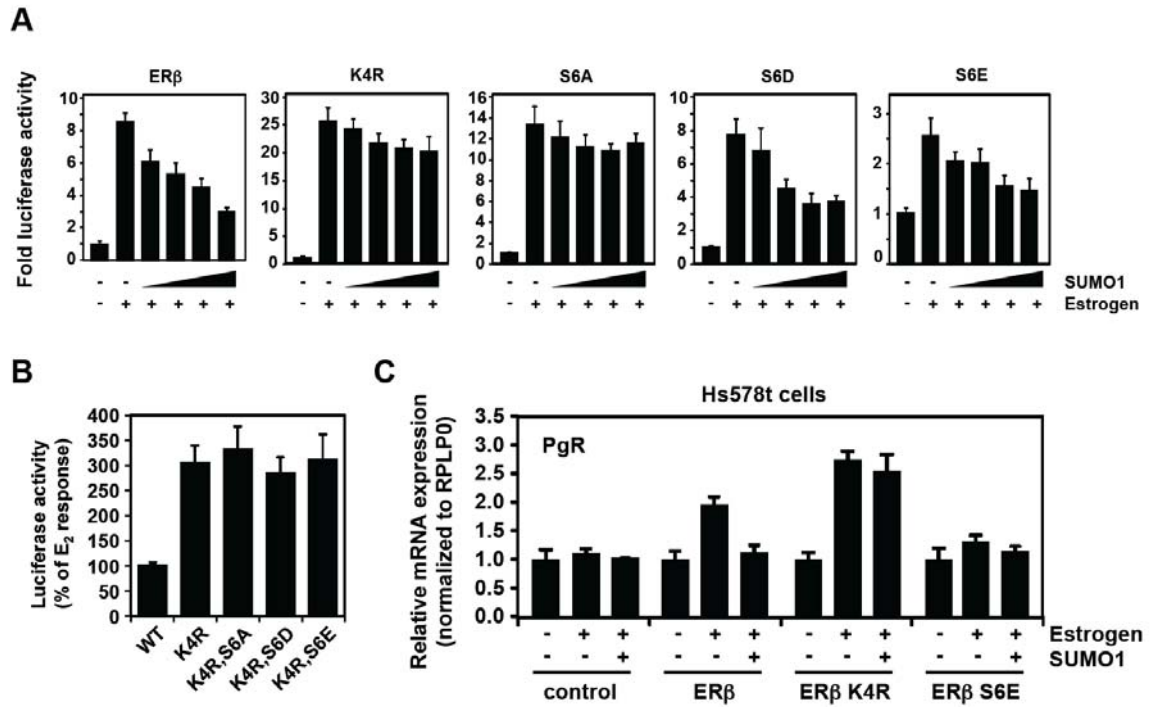


Fig.4

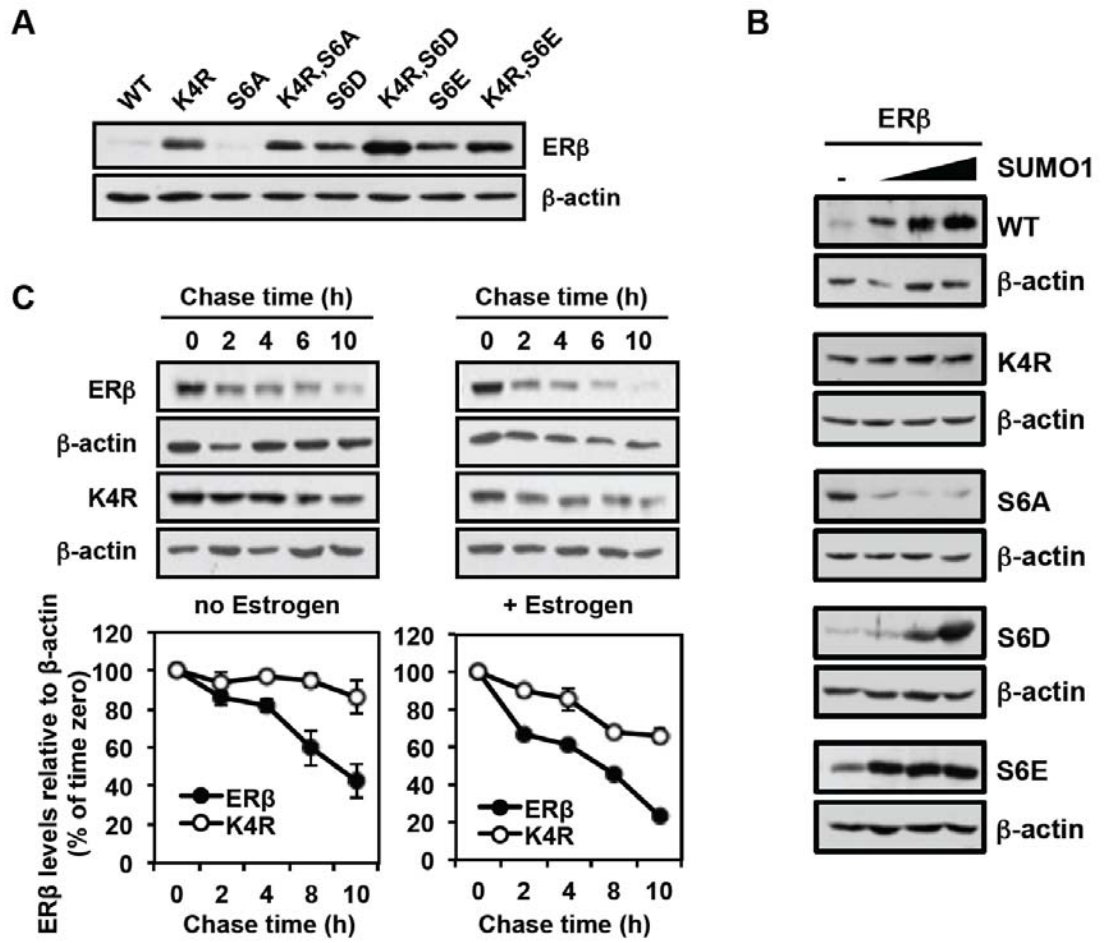
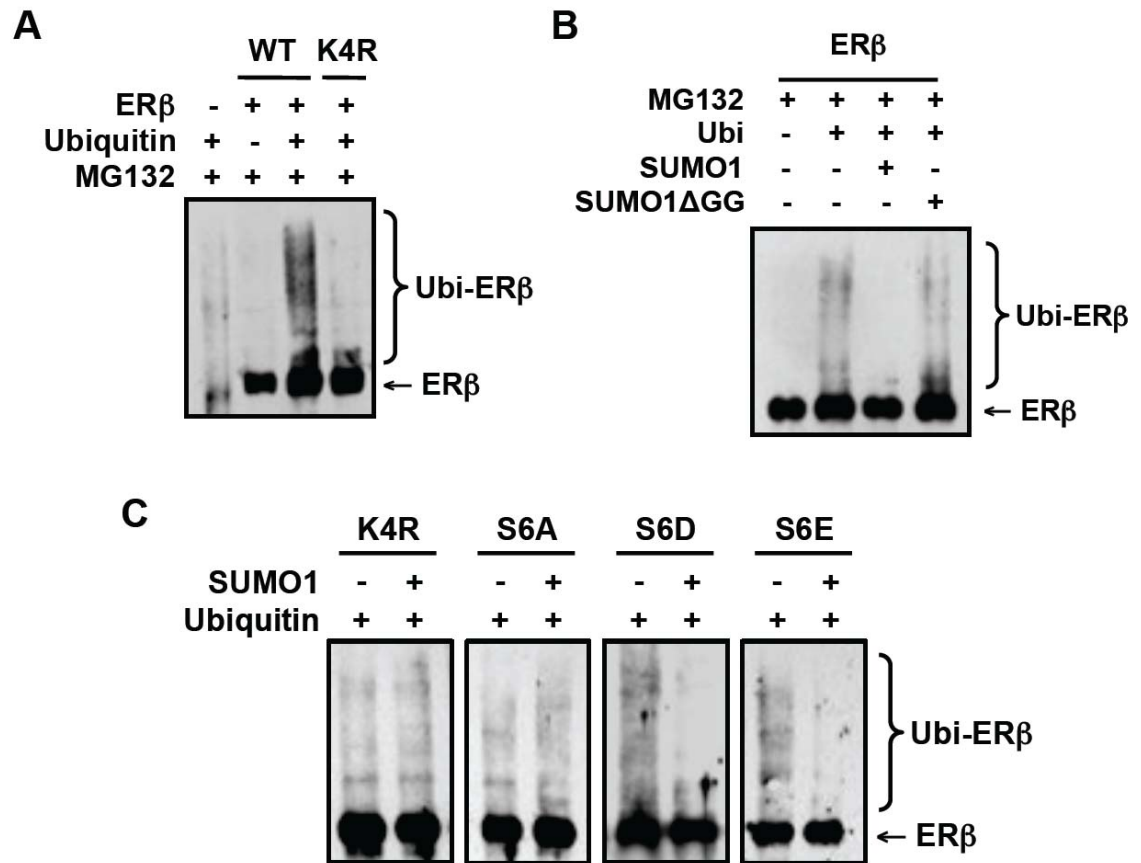




Fig.5



**Fig.6**

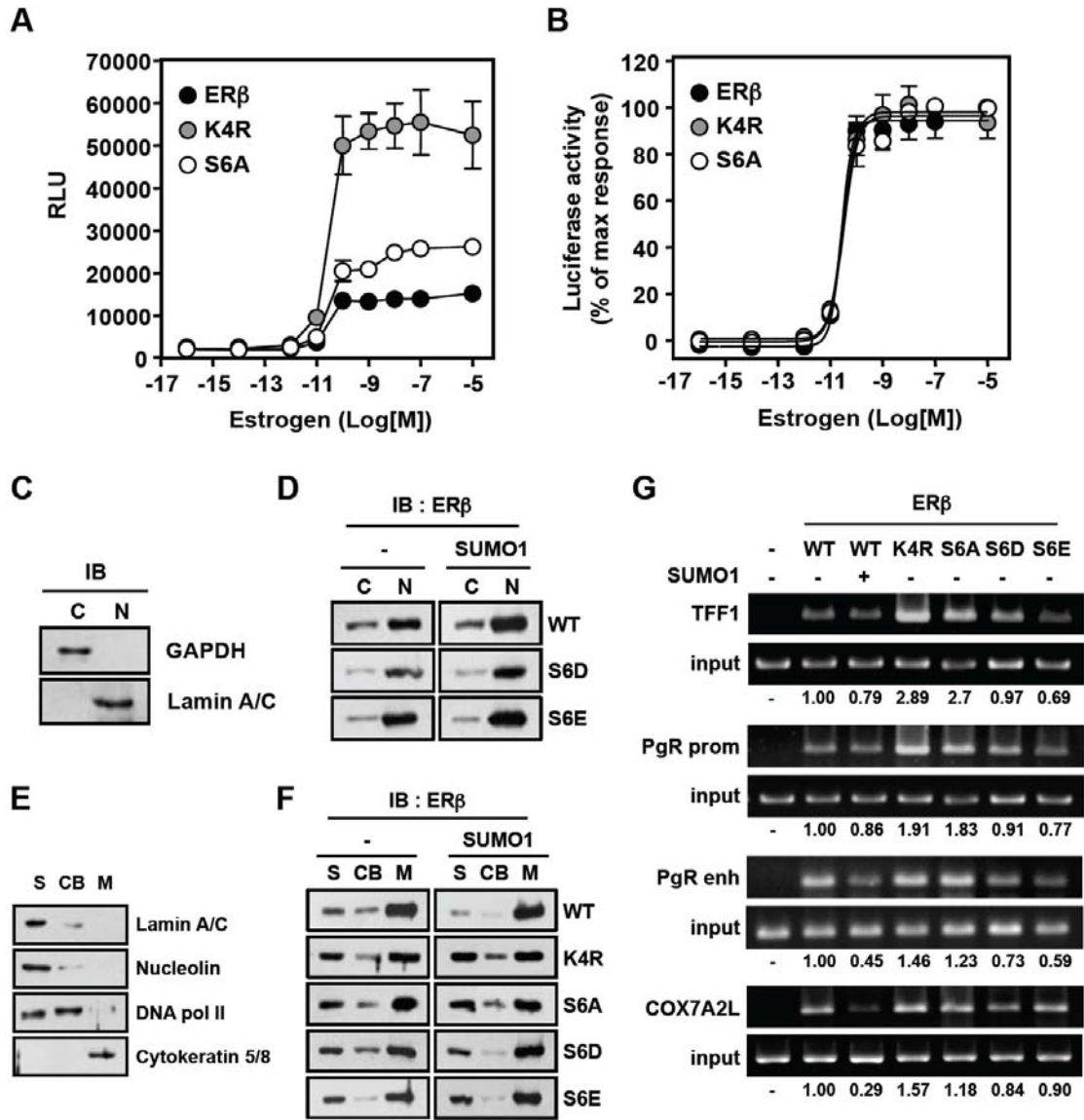


Fig.7

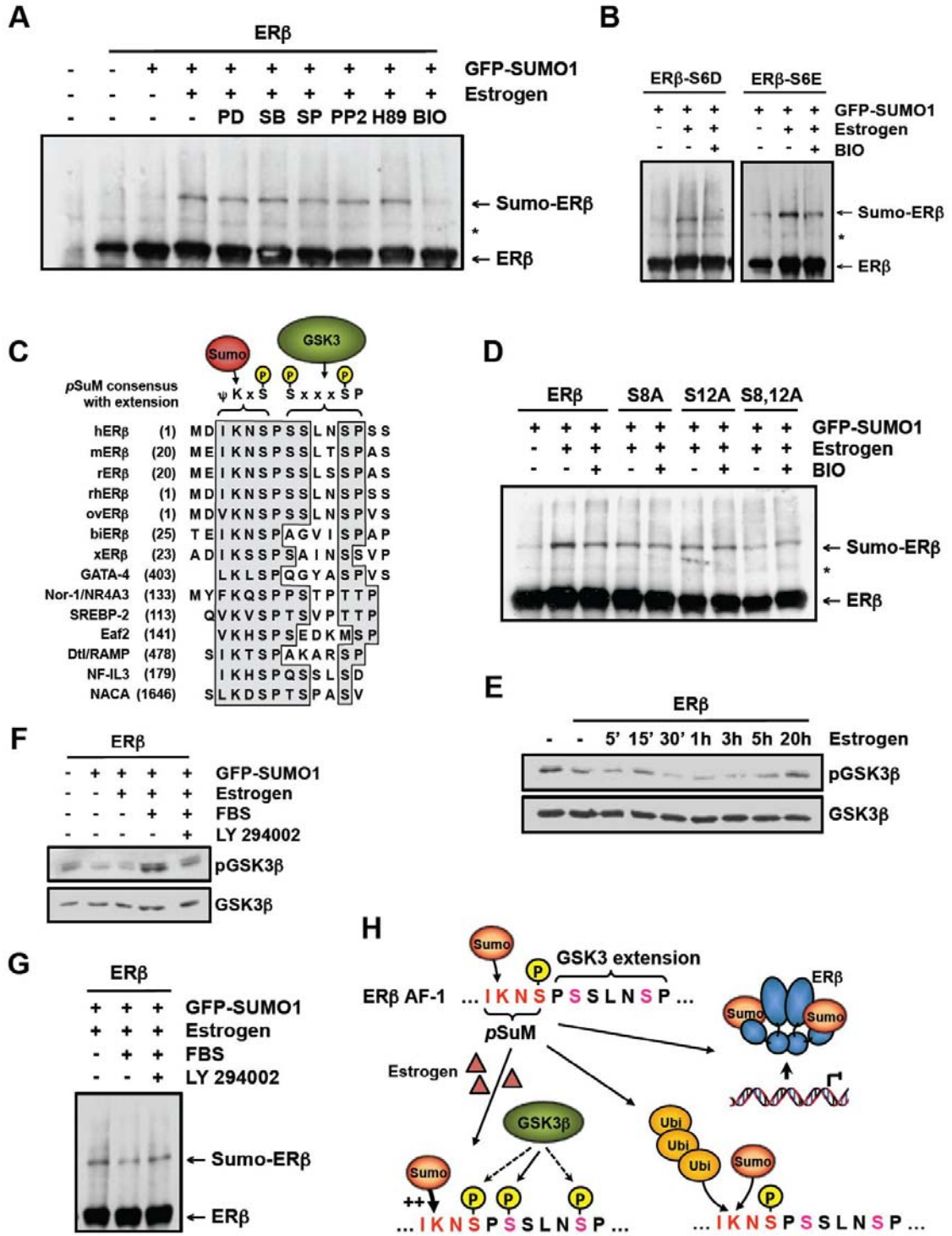
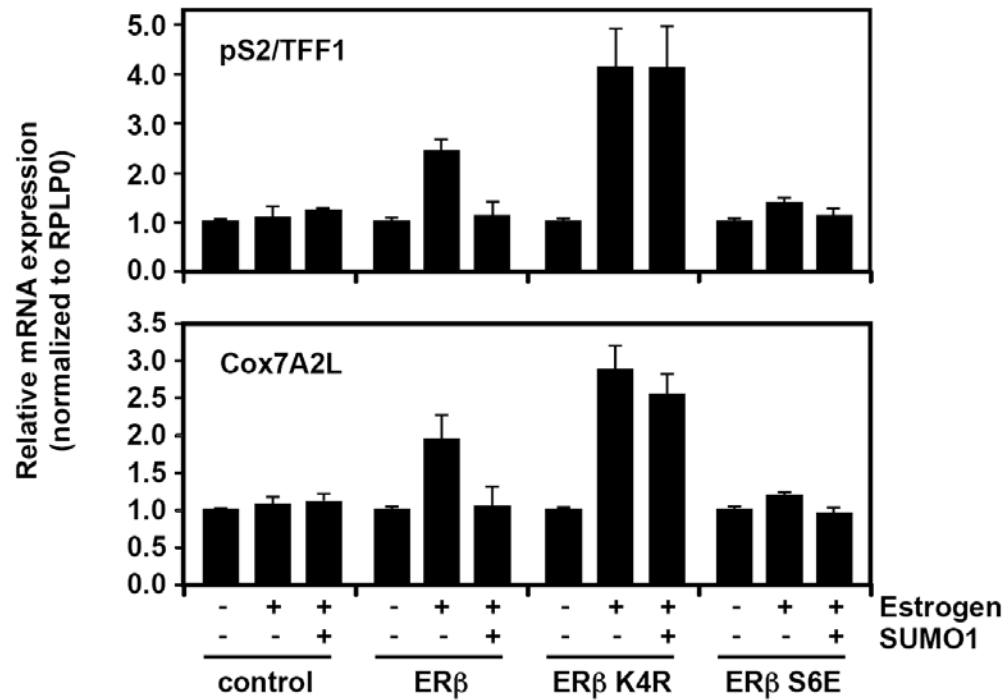
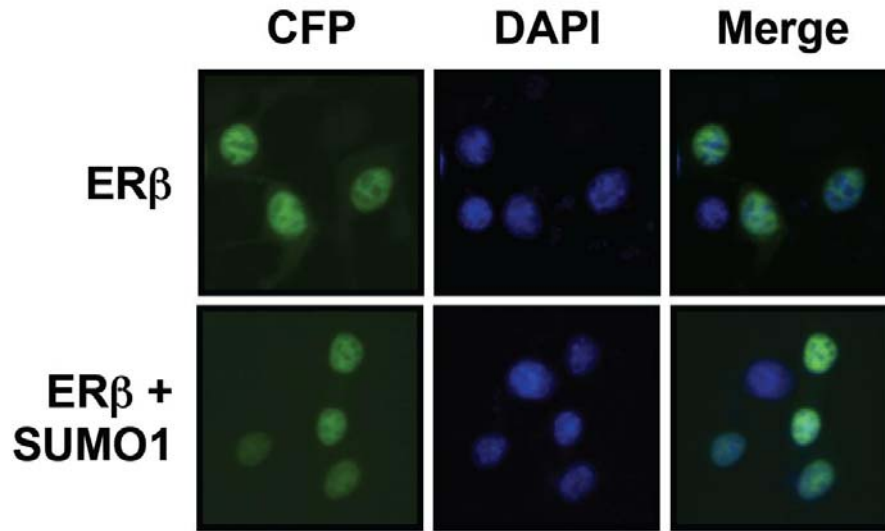


Fig.S1



**Figure S1. ER $\beta$ -specific inhibition of target gene expression by SUMO1 requires Lys-4.**

Real-time PCR analysis of estrogen-responsive trefoil factor *TFF1* and cytochrome *c* oxidase *Cox7A2L* gene expression in human breast cancer Hs578t cells expressing ER $\beta$  wild-type or site-specific mutants. Cells were transfected or not with pcDNA-SUMO1 construct and then treated with vehicle or 10 nM 17 $\beta$ -estradiol for 6 hr. Results were normalized to *RPLP0* expression. Values are derived from triplicate from at least two separate experiments and normalized to *RPLP0* expression.

**Fig.S2****Figure S2. Analysis of ERβ nuclear localization by fluorescence.**

ERβ remains mostly nuclear in response to SUMO-1 expression. Human 293 cells were transfected with CFP-ERβ in absence or presence of SUMO-1. Cells were then fixed and analyzed by fluorescence using filters for CFP and DAPI shown alone and merged.

### **Supplemental Experimental Procedures Real-time PCR**

Human breast cancer Hs578t cells expressing ER $\beta$  wild-type or SUMO variants as indicated were transfected with or without pcDNA-SUMO1, and then treated with vehicle or 10 nM 17 $\beta$ -estradiol for 6 hr in fresh medium. Complementary DNA was prepared as described (Rodrigue-Way et al., 2007) and PCR was performed and analyzed on a StepOnePlus cycler (Applied Biosystems) and on gel (Alpha Innotech). Sequences of PCR primers are available on request. Values are derived from triplicate from at least two separate experiments and normalized to *RPLP0* expression.

### **Fluorescent microscopy**

293 cells were seeded on coverslips in a 6-well plate overnight prior to transfection in phenol red-free DMEM supplemented with 5% charcoal dextrantreated FBS. Transient transfections were carried with a CFP-tagged ER plasmid in absence or presence of SUMO-1. 20 hr after transfection, cells were washed twice with cold PBS and fixed in 4% formaldehyde. The coverslips were mounted on microscope slides and examined in fluorescence with excitation/emission filters of 435/470 nm (CFP) using a Nikon TE-2000 inverted microscope as previously described (Sanchez et al. 2007). Cell nuclei were also stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

### **Supplemental References**

Rodrigue-Way, A, Demers, A, Ong, H, and Tremblay, A (2007). A Growth Hormone-Releasing Peptide Promotes Mitochondrial Biogenesis And A Fat Burning-like Phenotype Through Scavenger Receptor CD36 in White Adipocytes. *Endocrinology* 148, 1009-1018.

Sanchez, M, Sauvé, K, Picard, N, and Tremblay, A (2007). The hormonal response of estrogen receptor beta is decreased by the PI3K/Akt pathway via a phosphorylation-dependent release of CREB-binding protein. *J Biol Chem* 282, 4830-4840.

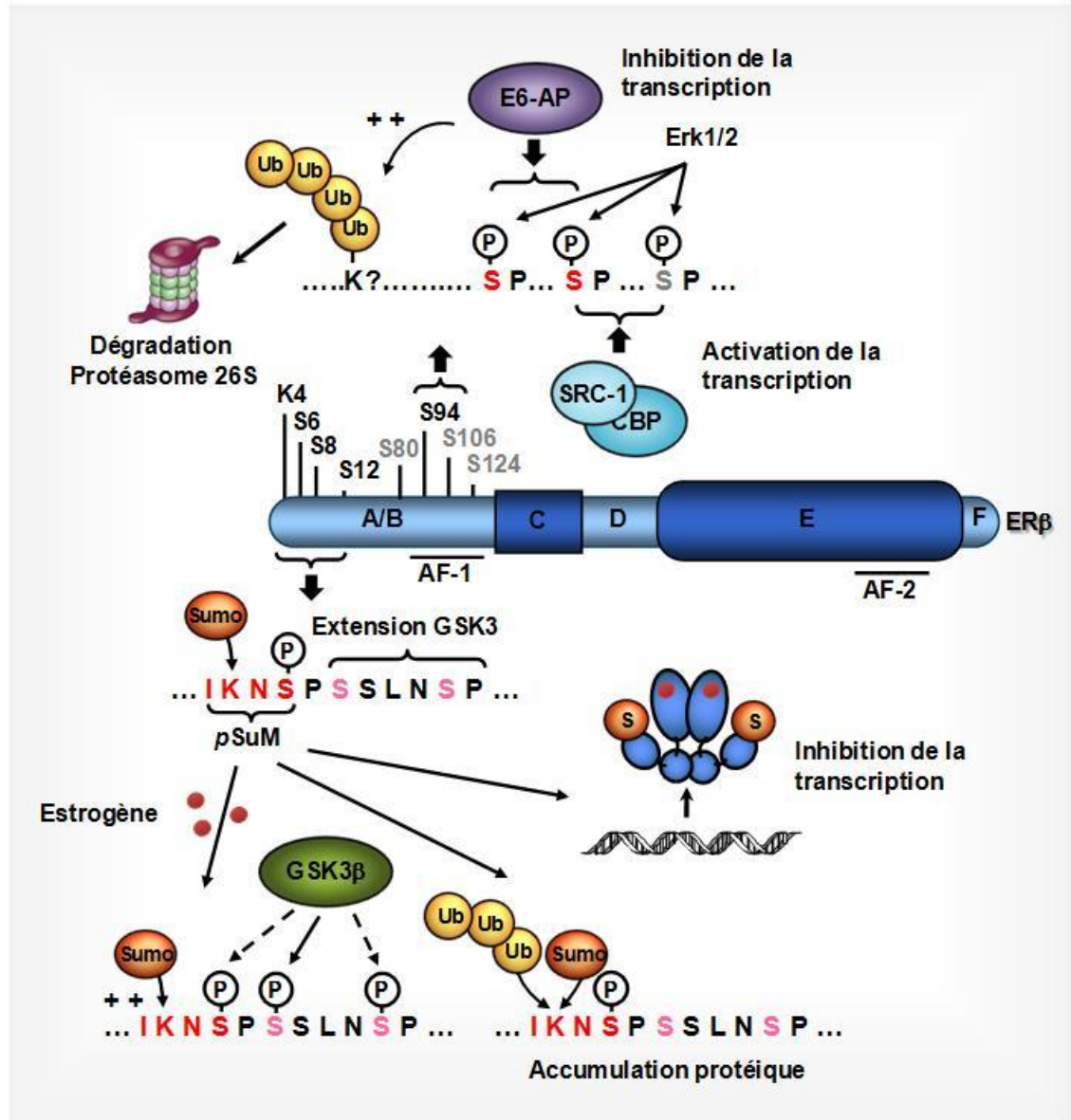
## **Chapitre 3 : Discussion générale, perspectives, conclusion**

### **Discussion**

#### **1 – Régulation dynamique de ER $\beta$ par les modifications post-traductionnelles**

Les modifications post-traductionnelles (MPTs) sont de puissants modulateurs de l'activité de ERs. Hautement dynamiques et réversibles, elles fournissent une connexion constante entre les ERs et leur environnement, assurant ainsi une réponse adéquate des ERs en fonction des différents signaux intra ou extracellulaires. L'activité transcriptionnelle des ERs sera donc le reflet de cet environnement et le résultat d'une combinaison de plusieurs MPTs puisque celles-ci peuvent modifier simultanément ou consécutivement les ERs et même coopérer ou entrer en compétition l'une contre l'autre. On comprend alors aisément comment la dérégulation d'une seule voie de signalisation peut avoir des répercussions majeures sur l'intégrité et le fonctionnement des ERs pouvant même mener jusqu'au développement de cancers et/ou une résistance aux traitements, d'où l'importance de bien comprendre leurs conséquences sur l'action des ERs.

La principale contribution de mes travaux de doctorat est l'apport d'une meilleure compréhension de la régulation encore méconnue de ER $\beta$  en réponse à différentes MPTs. Plus précisément, la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation coopèrent afin de réguler l'activité transcriptionnelle ligand-dépendante et indépendante de ER $\beta$ . Fait intéressant à souligner, tous les sites nouvellement identifiés se situent dans le domaine AF-1 de ER $\beta$  (Figure 21). Or, les études s'accordent de plus en plus pour affirmer que l'AF-1 est le principal domaine impliqué dans l'action différentielle des ERs observée dans différents contextes (voir chapitre 1 section 4.3.1). Par contre, malgré son importance, nous savons encore peu de choses concernant la régulation du domaine AF-1 de ER $\beta$  et mes recherches ont permis d'y associer de nouvelles fonctions et/ou mécanismes d'actions.



**Figure 21 : Résumé des MPTs associées au domaine AF-1 de ERβ**

Schématisation résumant les sites des modifications post-traductionnelles connues (grises) et nouvellement découvertes (noires) par mes études au niveau de l'AF-1 de ERβ.

En effet, ma première étude (figure 21-haut) a permis d'identifier le domaine AF-1 comme étant un important régulateur, voir exclusif, de la stabilité de ERβ par la voie ubiquitine-protéasome. Nous démontrons que la phosphorylation des sérines 94 et 106 au niveau de l'AF-1 permet de cibler ERβ vers la dégradation par le protéasome 26S en favorisant le recrutement de l'E3-ligase E6-AP et son ubiquitination subséquente. Elles



permettent également de cibler ER $\beta$  vers la matrice nucléaire, un complexe transcriptionnellement inactif. Ainsi, ces sérines participent à l'atténuation de l'activité de ER $\beta$  en absence de ligand et permettent d'apporter une explication à l'absence d'activité constitutive de l'AF-1 de ER $\beta$ , contrairement à ER $\alpha$ , identifiant du coup un des mécanismes impliqué dans la régulation différentielle AF-1-dépendante de ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Cette étude nous permet également de proposer un modèle où ces sérines viennent réguler le cycle transcriptionnelle ligand-indépendant de ER $\beta$  en permettant l'arrêt du processus transcriptionnel.

Ma deuxième étude (figure 21-bas) a permis l'identification de ER $\beta$  comme étant une nouvelle cible de la sumoylation. La conjugaison de SUMO-1 sur le domaine AF-1 de ER $\beta$  réprime l'activité estrogénique de ER $\beta$ , identifiant du coup un mécanisme potentiellement impliqué dans la régulation différentielle AF-1-dépendante de ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Cette sumoylation est dépendante de la phosphorylation et presque exclusivement observée en présence d'estrogène identifiant du coup, pour la première fois, l'induction d'une phosphorylation en réponse à l'estrogène sur ce récepteur. Également, nous démontrons que la sumoylation compétitionne avec l'ubiquitination et stabilise le récepteur. Combinés, ces résultats permettent de proposer une explication à l'effet atténuateur connu de l'AF-1 sur l'activité estrogénique de ER $\beta$ . Également, cette étude a permis l'identification d'un nouveau site sumoylation dépendant de la phosphorylation, que nous avons nommé *pSuM*, et permet d'apporter une nouveauté à notre compréhension des mécanismes impliqués dans la sumoylation du récepteur.

Dans les sections qui suivent, l'ordre dans laquelle je viens de vous présenter mes résultats/constatations ne sera pas conservé puisque plusieurs mécanismes se recourent entre mes découvertes. L'accent sera mis principalement sur l'identification du nouveau site de sumoylation et les rôles de l'AF-1 que mes études ont permis d'identifier et/ou d'expliquer.

## 2 – Ajout d'un nouveau chapitre à la sumoylation phosphorylation-dépendante

Classiquement, la conjugaison des protéines SUMO survient sur une lysine située au coeur d'un motif consensus de sumoylation  $\psi K_x(D/E)$ , où  $\psi$  représente un large a.a. hydrophobe, X n'importe quel a.a. et D/E l'acide glutamique et aspartique, respectivement (403). L'analyse de la structure de Ubc9 en interaction avec ce motif a permis de démontrer que les chaînes latérales aliphatiques, des a.a. hydrophobes, et acides, des acides aminés D/E (qui confèrent une charge négative), sont nécessaires afin de permettre l'interaction de Ubc9 et de bien positionner la lysine dans le domaine catalytique de l'enzyme (590). Mes recherches démontrent que la conjugaison de SUMO-1 sur ER $\beta$  survient sur la lysine 4 (K4) et que cette lysine fait partie d'un motif de sumoylation qui diffère du site consensus par le fait qu'une sérine (S6) se trouve à la traditionnelle position de l'acide aminé acide. Ce site atypique  $\psi K_x S$ , que nous avons nommé *pSuM* pour phosphorylated sumoylation motif, devient fonctionnel grâce à la charge négative générée par la phosphorylation de S6 qui recrée l'environnement essentiel à la conjugaison de SUMO. La régulation de la sumoylation par la phosphorylation a également été observée chez certaines protéines, incluant HSF-1 et 4, GATA1, MEF2 et ERR $\alpha$  et  $\gamma$ . Par contre, le motif couramment utilisé, soit le PDSM (phosphorylation-dependent sumoylation motif), diffère du *pSuM* par le fait que la sérine cible n'est pas située directement au coeur du motif de sumoylation, mais située trois a.a. en aval de ce dernier (409). Le motif *pSuM*, hautement conservé sur ER $\beta$  entre les différentes espèces, représente donc un attrayant nouveau mode de régulation de la sumoylation par la phosphorylation et pourrait éventuellement servir pour l'identification de d'autres cibles.

### 2.1 – Un peu d'aide de GSK-3 : régulation de l'extension du *pSuM*

Le PDSM, tout comme le NDSM (negatively charge-dependent sumoylation motif) constitué d'un regroupement de résidus acides D et E (410), sont des extensions au motif SUMO qui permettent d'accentuer la sumoylation du substrat. L'effet catalyseur de ces

extensions provient du fait qu'elles créent un environnement négativement chargé qui est favorablement reconnu par la poche basique d'Ubc9, accentuant ainsi l'interaction entre cette dernière et sa protéine cible (410,591). Nous avons identifié une extension similaire à la suite du *p*SuM, soit  $\psi$ KxSPS(S)xxSP, dans laquelle la phosphorylation des résidus sérines en position 8 et 12 apporte une charge négative additionnelle qui vient potentialiser le processus de sumoylation sur ER $\beta$ . Ces sérines font partie du site consensus de phosphorylation reconnu par GSK-3 (S/TxxxS/TP). Leur mutation en alanine ou l'inhibition de GSK-3 diminue considérablement le niveau de sumoylation de ER $\beta$  démontrant l'importance de cette extension dans la régulation de ce processus. L'observation que cette extension est hautement conservée entre les ER $\beta$  des différentes espèces vient renforcer cette affirmation. Également, il est important de souligner que nous sommes les premiers à démontrer une régulation de ER $\beta$  par GSK-3 $\beta$ .

Selon le mode d'action classique de GSK-3, cette kinase reconnaît son site lorsque ce dernier est préalablement phosphorylé au niveau de la sérine en C<sup>term</sup> du motif (équivalent à S12 sur ER $\beta$ ) et induit la phosphorylation séquentielle des sites situés à chaque quatre a.a. en amont (N<sup>term</sup>) (592). Ainsi, S8 est la cible directe de GSK-3 $\beta$ , mais il est plus probable que la phosphorylation de S6 et S12 soit médiée par d'autres kinases puisque l'inhibition de GSK-3 n'abolit pas complètement la sumoylation de ER $\beta$  contrairement à la mutation de S6. Ces sérines sont potentiellement la cible d'une et/ou des « proline-directed kinase » comme les MAPKs, puisqu'elles sont suivies d'une proline (P). On remarque également que la sérine 9 (S9) est hautement conservée au niveau de l'extension du *p*SuM, suggérant qu'elle puisse jouer un rôle dans la création de la charge négative de l'extension du *p*SuM par GSK-3 $\beta$  et/ou indépendamment de son action. Clairement, il reste beaucoup à faire afin de bien comprendre la régulation de ces sérines et d'identifier les kinases impliquées. Par contre, il se peut que cela représente un défi de taille, car comme nous le démontre si bien l'exemple de la sérine 118 de ER $\alpha$ , une sérine peut être la cible de plusieurs kinases en réponse à un même signal et/ou être la cible de la même kinase en réponse à différents stimuli (voir chapitre 1 section 5.1.3.1). De plus, devant l'inefficacité de tous les inhibiteurs des kinases testés à diminuer de façon

considérable la sumoylation de ER $\beta$  (Fig 7A, papier2), excluant l'inhibiteur de GSK-3, on ne peut qu'émettre l'hypothèse que ces sérines soient la cible de plus d'une kinase et que l'inhibition d'une kinase puisse être compensée par l'action d'une autre.

## 2.2 – ER $\beta$ potentialise l'action de GSK-3 $\beta$

Contrairement à la majorité des kinases, GSK-3 $\beta$  est constitutivement active dans les cellules et son activité est négativement régulée par la phosphorylation de sa sérine 9 par différentes kinases notamment Akt et ce, en réponse à divers stimuli, incluant les facteurs de croissance (592). En étudiant plus précisément l'action de GSK-3 sur la sumoylation de ER $\beta$ , nous avons observé que la sérine 9 de GSK-3 $\beta$  est rapidement déphosphorylée par l'estrogène et que cet effet est médié par ER $\beta$  lui-même. Cette observation permet d'expliquer en partie l'augmentation de la sumoylation observée en réponse à l'estrogène. En effet, nos résultats suggèrent que lié à l'estrogène, ER $\beta$ , par son action non-génomique, va potentialiser l'activité constitutive de GSK-3 $\beta$  qui, à son tour, va favoriser la sumoylation de ER $\beta$ . Nous ne savons pas comment l'action non-génomique de ER $\beta$  contribue à la déphosphorylation de S9. Par contre, la phosphatase PTEN semble une cible de choix puisque ER $\beta$  n'interagit pas avec PI3K, suggérant que l'action non-génomique de ER $\beta$  en faveur de GSK-3 $\beta$  provient de la régulation de protéines en amont de cette voie (81). De plus, combiné avec des études récentes (237,593), nos résultats suggèrent que ER $\beta$  agirait comme régulateur négatif de la voie PI3K/Akt, effet totalement opposé à ce qui a été décrit pour ER $\alpha$ , et permettrait d'expliquer en partie le rôle anti-prolifératif de ER $\beta$  dans certains cancers. Clairement, l'effet de ER $\beta$  sur GSK-3 $\beta$  mériterait une évaluation plus approfondie et cette hypothèse sera développée dans la section perspective.

## 2.3 – Prédiction de nouvelles cibles du pSuM

Finalement, tel que mentionné tout au long de cette section, la découverte du pSuM pourrait servir à l'identification de nouvelles cibles de la sumoylation. Nous avons observé

la présence du motif minimal du *p*SuM  $\psi$ KxS chez plusieurs protéines impliquées dans différentes fonctions, suggérant que ce site puisse effectivement être ciblé par la sumoylation chez d'autres protéines que ER $\beta$ . De plus, lorsque nous avons fait des recherches d'homologie de séquences en y incluant l'extension du *p*SuM, nous avons également observé la présence de cette séquence chez plusieurs protéines mais un fait intéressant en ressort. En effet, la majorité d'entre elles sont impliquées dans la régulation de l'expression génique, notamment GATA-3, SREBP-2, NF-IL3 et aussi Nor-1 qui fait partie de la grande famille des récepteurs nucléaires (Fig 7C, chapitre 2 section 2), suggérant que l'extension GSK-3 puisse être un mécanisme communément utilisé pour coordonner l'expression des gènes. Quoique la fonctionnalité des potentiels *p*SuM retrouvés chez ces protéines reste à déterminer, il est clair que l'identification de ce nouveau, et hautement régulé, motif de sumoylation ajoute une nouvelle page aux mécanismes entourant la sumoylation ainsi qu'aux rôles joués par les différents signaux sur la régulation de la transcription génique.

### **3 – SUMO-1 : régulateur négatif de l'activité de ER $\beta$**

La sumoylation des facteurs de transcription est principalement associée avec l'atténuation ou la répression de leur activité transcriptionnelle et nous démontrons que ER $\beta$  fait partie du lot. En effet, la conjugaison de SUMO-1 altère l'interaction de ER $\beta$  avec la chromatine et favorise son accumulation dans la matrice, un domaine nucléaire connu pour être transcriptionnellement inactif.

Ce résultat contraste avec ER $\alpha$  pour qui la liaison de SUMO-1 augmente son activité transcriptionnelle (173,452) et suggère fortement que la sumoylation soit une modification clé de l'action différentielle des ERs observée dans plusieurs contextes en présence d'estrogène. Une telle régulation différentielle pourrait avoir un impact majeur sur la régulation des gènes ER-dépendants et pourrait s'avérer particulièrement importante dans les cancers du sein. En effet, plusieurs études démontrent que ER $\beta$  peut interférer avec l'action oncogénique proliférative de ER $\alpha$  dans les cancers gynécologiques (voir chapitre

1 section 6.1). Sachant que l'AF-1 de ER $\beta$  semble jouer un rôle prédominant dans la régulation de la transcription ER $\alpha$ -dépendante (162) et que ce domaine est le siège de la sumoylation, il serait hautement probable que la sumoylation de ER $\beta$  soit impliqué dans l'atténuation de l'action proliférative de ER $\alpha$ . L'étude d'une telle éventualité sera discutée dans la section perspective.

Également, puisque nous démontrons que la sumoylation de ER $\beta$  est positivement régulée par l'action de GSK-3 $\beta$ , ce résultat suggère que la présence de GSK-3 $\beta$  active induirait l'inhibition de l'activité ligand-dépendante du récepteur. Nous serions encore en présence d'une régulation inverse puisqu'une étude a démontré que GSK-3 $\beta$  régule positivement la stabilité et l'activité de ER $\alpha$  en induisant la phosphorylation des sérines 102, 104, 106 et 118 (247).

### **3.1 – Compétition entre SUMO-1 et Ubi au niveau de la lysine 4**

Fait intéressant, nous démontrons que la lysine 4 (K4) du *pSuM* ER $\beta$  est également un site d'attache pour l'ubiquitine. Nous observons que la conjugaison de SUMO-1 régule la stabilité de ER $\beta$  en compétitionnant avec cette modification, protégeant ainsi ER $\beta$  de la dégradation par le protéasome 26S. Connaissant la corrélation positive entre le pouvoir d'activation des récepteurs nucléaires et la dégradation par le protéasome, nous pouvons supposer que l'effet atténuateur de la sumoylation l'activité de ER $\beta$  puisse également provenir du fait qu'en entrant en compétition avec l'ubiquitination, SUMO-1 inhiberait la transactivation protéasome-dépendante du récepteur. Or nos résultats, ainsi que ceux publiés par Tateishi et al. (161), démontrent clairement que K4 n'est pas impliquée dans un tel processus. Malgré ce fait, nous démontrons que l'ubiquitination de K4 joue un rôle majeur dans la régulation de la stabilité de ER $\beta$  puisque sa mutation induit une forte accumulation protéique. Pour cette raison, nous pensons que la sumoylation est une étape qui permet de protéger ER $\beta$  de l'action du protéasome, possiblement de façon similaire à ce qui a été décrit pour I $\kappa$ B $\alpha$  (392). Cela n'exclut pas le fait que chaque modification semble cibler ER $\beta$  pour des fonctions différentes et exclusives, tel qu'il a été rapporté pour la

protéine PCNA (604). Ceci implique que la sumoylation de ER $\beta$  et l'ubiquitination sont régulées de façon dynamique et compétitive, possiblement en s'empêchant mutuellement, permettant ainsi à la cellule de réguler différemment ER $\beta$  en fonction des signaux.

Justement, nos observations nous indiquent que tant que l'intégrité du *p*SuM est intacte et fonctionnelle, donc que la S6 est phosphorylable, ER $\beta$  reste plus compétant pour la sumoylation en réponse à l'estrogène. De plus, il est intéressant de faire le parallèle avec ma première publication qui démontre que la phosphorylation des sérines 94 et 106 de l'AF-1 de ER $\beta$ , en réponse aux kinases Erk1/2, induit l'ubiquitination et la dégradation du récepteur. Est-ce que nous serions en face d'un mécanisme impliquant K4 ? Plus précisément, est-ce la E3 ligase E6-AP recrutée par la phosphorylation de ses sérines utilise la K4 comme site d'ubiquitination ? Cette question mériterait d'être approfondie. Néanmoins, nos résultats démontrent clairement que le partage de l'attachement de ses deux modifications sur K4 constitue une facette importante de la régulation de la stabilité et du potentiel transcriptionnel de ER $\beta$ , et nous permettent de souligner l'importance du rôle l'AF-1 dans ces processus.

#### **4 – Rôles du domaine AF-1 de ER $\beta$**

Le domaine AF-1 a une haute influence sur l'activité des récepteurs nucléaires. Finement régulé par les modifications post-traductionnelles, il permet aux récepteurs d'adapter leur activité ligand-dépendante et indépendante en fonction du contexte cellulaire. Par contre, contrairement à ER $\alpha$ , les mécanismes entourant la régulation de l'AF-1 de ER $\beta$  ont très peu été étudiés. Tous les sites que nous avons nouvellement identifiés se situent dans l'AF-1 de ER $\beta$  et nous permettent d'y associer des rôles encore inconnus et/ou d'apporter des explications aux rôles déjà connus.

#### **4.1 – L'AF-1 : principal régulateur de l'action du protéasome sur ER $\beta$**

La transcription est un processus cyclique et sa régulation implique une synchronisation entre le recrutement de corégulateurs, l'interaction et ultimement le retrait de plusieurs protéines et complexes sur l'ADN. La voie ubiquitine-protéasome joue un rôle clé dans la régulation de l'activité des récepteurs nucléaires, et ce à plusieurs niveaux : 1- en régulant la quantité initiale des facteurs de transcription et/ou de leurs corégulateurs, 2- en permettant l'arrêt du cycle transcriptionnel en induisant la dégradation des récepteurs et des corégulateurs, 3- en assurant une activité optimale en réponse au ligand, processus connu sous le nom de transactivation protéasome-dépendante (voir chapitre 1 section 5.2.4). Ce dernier point a été prouvé grâce à l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome 26S. En effet, les études ont démontré que l'activation hormonale de la majorité des récepteurs nucléaires, incluant ER $\alpha$ , est dépendante de la voie ubiquitine-protéasome, puisque malgré une augmentation de la quantité protéique des récepteurs, l'inhibition du protéasome induit une inhibition de leur activité.

En combinant tous les résultats de nos recherches, nous avons fait l'observation des trois rôles susmentionnés et nous avons identifié des mécanismes impliqués dans deux d'entre eux (1 et 2). En effet, nous démontrons que l'activité estrogénique ER $\beta$ , de façon similaire à ER $\alpha$ , est dépendante de la dégradation puisque nous observons l'inhibition de son activité en présence de l'inhibiteur du protéasome. Cet effet a également été observé dans l'étude de Tateishi et al (161). Ce même groupe rapporte que les 37 premiers a.a. de l'AF-1 de ER $\beta$  sont nécessaires à cette transactivation protéasome-dépendante et tout comme nous, démontrent que la lysine 4 n'est pas impliquée. Par contre, nous démontrons que l'ubiquitination de la lysine 4 régule négativement l'activité ligand-dépendante et indépendante en diminuant le niveau d'expression du récepteur. Également, nous observons qu'en absence d'estrogène, la voie ubiquitine-protéasome régule différemment ER $\alpha$  et ER $\beta$ . En effet, en présence de l'inhibiteur du protéasome, bien que les deux isoformes accumulent dans la cellule, ER $\beta$  n'est pas actif contrairement à ER $\alpha$ . L'inactivité de ER $\beta$  est AF-1-dépendante car en absence de ce domaine, ER $\beta$  devient transcriptionnellement



actif lorsque le protéasome est inhibé. Ce résultat concorde avec les résultats de la littérature qui démontrent que contrairement à son homologue, l'AF-1 de ER $\beta$  ne possèdent pas d'activité constitutive et souligne l'importance de l'AF-1 dans l'action différentielle des ERs. Nous démontrons que l'ubiquitination dépendante des sérines 94 et 106 est impliqué dans cette atténuation AF-1 dépendante en régulant négativement le niveau d'expression de ER $\beta$  et sa dynamique intranucléaire.

Ainsi, toutes nos observations soulignent l'importance de l'AF-1 dans la régulation de l'activité ligand-dépendante et indépendante ER $\beta$  par la voie ubiquitine-protéasome. Cependant, le fait marquant de nos découvertes est que nous démontrons que la régulation de ER $\beta$  par la voie ubiquitine-protéasome est hautement, si ce n'est pas exclusivement, dépendante de l'AF-1. En effet, en absence de ce domaine, ER $\beta$  n'accumule pas dans la cellule lors de l'inhibition du protéasome, un effet également observé par Tateishi et al (161). Ainsi, en démontrant que l'AF-1 est la principale région ciblée par l'action de la voie ubiquitine-protéasome, il est facile de prédire que nous ne sommes qu'au commencement de la compréhension du rôle de l'AF-1 dans la régulation de l'activité ER $\beta$  par le protéasome.

#### **4.2 – AF-1 : régle la dynamique intranucléaire de ER $\beta$**

L'utilisation de technique de fluorescence telle que le FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) nous permet d'étudier l'état transcriptionnel des récepteurs en temps réel dans les cellules vivantes. En effet, les études ont révélé que la dynamique du mouvement intranucléaire permettait de refléter l'état transcriptionnel des récepteurs. Par exemple, une très haute mobilité est associée au fait que les récepteurs ne sont pas actifs et qu'ils sont en attente de signaux activateurs. Activés, les récepteurs ont une mobilité partielle, reflet de leur association transitoire avec la chromatine active. Finalement, une immobilisation complète, observée lors de l'inhibition du protéasome, est signe que les récepteurs se retrouvent dans la matrice nucléaire, un complexe transcriptionnellement

inactif possiblement en attente de dégradation. Nos résultats démontrent que l'AF-1 permet de réguler cette dynamique.

#### **4.2.1 – Les sérines 94-106 : immobilise ER $\beta$ dans la matrice nucléaire**

Nous démontrons que les sérines 94 et 106 permettent de cibler ER $\beta$  dans la matrice nucléaire. En effet, ER $\beta$  de type sauvage est complètement immobile dans le noyau suite à l'inhibition du protéasome, signe qu'il est prisonnier dans la matrice nucléaire. Dans ces mêmes conditions, le retrait des sérines 94 et 106 rend le récepteur modérément mobile, signe que l'absence de phosphorylation au niveau de ses sérines permet à ER $\beta$  d'échapper partiellement à son association avec la matrice nucléaire, lui permettant alors d'aller interagir avec l'ADN et d'enclencher la transcription. En accord avec cette observation, nos résultats démontrent qu'en absence de ses sérines, ER $\beta$  est moins ubiquitinylé, qu'il accumule moins dans la matrice suite à l'inhibition du protéasome et qu'il est transcriptionnellement actif. Ainsi, les sérines 94 -106 permettent à ER $\beta$  de transiter de la chromatine active à la matrice nucléaire, inactive, ce qui explique en partie l'absence d'activité constitutive du récepteur observée lors de l'inhibition du protéasome.

#### **4.2.2 – ER $\beta$ sumoylé accumule dans la matrice nucléaire**

Bien que nous n'ayons pas étudié l'effet de la sumoylation sur ER $\beta$  par la technique de FRAP, nos observations démontrent que la sumoylation régule la dynamique intranucléaire de ER $\beta$  puisque qu'en plus d'induire une perte de l'interaction entre ER $\beta$  et l'ADN, nous observons une accumulation de ER $\beta$  sumoylé dans la matrice. Ce résultat permet d'apporter une explication supplémentaire à l'effet atténuateur de la sumoylation sur ER $\beta$  car ainsi immobilisé dans la matrice, ER $\beta$  ne peut plus aller induire la transcription. Par contre, puisque la sumoylation protège ER $\beta$  de la dégradation, cette observation laisse présager que la sumoylation n'envoie pas ER $\beta$  vers la matrice dans le but de le dégrader, mais plutôt l'entreposer transitoirement. Cette hypothèse sera discutée plus en détails dans la section perspective.

### **4.3 – AF-1 : atténuateur de l'activité transcriptionnelle de ER $\beta$**

L'AF-1 de ER $\beta$  ne possède pas d'activité constitutive et les études démontrent que la présence de l'AF-1 a un effet négatif sur la réponse estrogénique de ER $\beta$  (158-160). Par contre, les mécanismes derrière ces fonctions de l'AF-1 étaient pour ainsi dire presque entièrement inconnus avant mes recherches. Les résultats de mes deux publications permettent d'apporter une explication à l'absence d'activité constitutive de l'AF-1 ainsi que de proposer des explications à l'effet atténuateur de l'AF-1 sur l'activité estrogénique de ER $\beta$ . Plus précisément, les deux rôles que nous avons nouvellement associés à l'AF-1 et qui sont décrits ci-haut, ainsi que les interrelations entre les différentes MPTs nouvellement identifiées, y jouent un rôle clé.

#### **4.3.1 – S94 et S106 : signaux atténuateurs de l'activité constitutive de l'AF-1**

Contrairement à ER $\alpha$ , les études démontrent que l'AF-1 de ER $\beta$  ne possède pas d'activité constitutive (158-160). Nos résultats montrent que les sérines 94 et 106 sont impliquées dans le processus. En effet, en les rendant inaptes à la phosphorylation par leur mutation en alanine, nous observons que l'activité basale de ER $\beta$  en absence d'estrogène est augmentée (Fig 7D, chapitre 2 section 2, comparer la colonne 1 et 8). Puisque nous avons prouvé que la phosphorylation de S94 et S106 favorise l'ubiquitination, la dégradation du récepteur et son immobilisation dans la matrice nucléaire, nous expliquons l'augmentation de l'activité constitutive de l'AF-1 par le fait que, dans ces conditions, le niveau d'expression de ER $\beta$  est augmenté et que le récepteur est plus transcriptionnellement activable, tel que le reflète l'augmentation de sa mobilité intranucléaire. De plus, l'activité constitutive de l'AF-1 induite par la mutation des sérines 94 et 106 est également observée lors de l'inhibition du protéasome, démontrant que ces sérines sont effectivement d'important régulateur de l'activité constitutive de l'AF-1. Par contre, dans ces conditions, l'activité transcriptionnelle observée est fortement accentuée (près de 6 fois). Ce résultat est possiblement le reflet de l'augmentation de la quantité

protéique de ER $\beta$  causé par l'inhibition de la dégradation mais souligne également le fait que la phosphorylation de S94 et 106 n'est pas le seul signal impliqué dans la régulation de la stabilité/activité de ER $\beta$ . De plus, ayant identifié la lysine 4 comme site d'ubiquitination, il serait intéressant de vérifier si elle est impliquée dans un tel mécanisme.

#### **4.3.2 – S94 et S106 : signaux atténuateurs de l'activité ligand-indépendante de ER $\beta$**

En réponse aux kinases Erks, l'activité ligand-indépendante de ER $\beta$  est augmentée. Nous démontrons que les sérines 94 et 106 sont des signaux atténuateur de cette activation. En effet, la phosphorylation de ces sérines par les Erks régule négativement l'activité du récepteur en favorisant le recrutement de l'E3-ligase E6-AP, l'ubiquitination du récepteur et sa dégradation par le protéasome. En absence de ces sérines, E6-AP n'est plus en mesure de réprimer l'activation Erk-dépendante de ER $\beta$ . Ainsi, en combinaison avec les résultats du Dr. André Tremblay qui démontrent que la phosphorylation des sérines 106 et 124 par les Erks permet l'activation ligand-indépendante de ER $\beta$  en induisant le recrutement de SRC-1 et CBP (51,118), nos résultats nous ont permis de proposer un modèle cyclique d'activation-dégradation de ER $\beta$  où l'arrêt de la transcription serait médiée par le recrutement phospho-dépendant de E6-AP. Bien que ce modèle reste à être confirmé nous pouvons conclure que nous avons identifié une région de l'AF-1 hautement importante à l'activité ligand-indépendante de ER $\beta$ . De plus, connaissant la synergie d'action entre les domaines d'activation des ERs (AF-1 et AF-2), il ne serait pas impossible que ce trio de sérines aient un impact sur l'activité ligand-dépendante de ER $\beta$  et cette hypothèse mériterait d'être étudiée.

#### **4.3.3 – S6 et K4 : signaux atténuateurs de l'activité estrogénique de ER $\beta$**

Quoique ER $\alpha$  et ER $\beta$  lient de façon équivalente l'estrogène, ER $\beta$  est moins fortement activé que son homologue (158-160). Les études, et nos observations en laboratoire, démontrent que l'atténuation observée provient du domaine AF-1 de ER $\beta$

puisque le retrait de ce dernier permet à ER $\beta$  d'avoir une activité comparable à ER $\alpha$ . Également, par une interprétation personnelle des résultats présentés par Tateishi et al (161), nous constatons que cet effet est essentiellement dépendant des 20 premiers a.a. de l'AF-1 de ER $\beta$ . En effet, l'activité estrogénique de ER $\beta$  suite au retrait de ces a.a est comparable celle observé en absence de son domaine AF-1. Nous démontrons que la sumoylation de ER $\beta$  est justement comprise dans cette région suggérant fortement que nous ayons identifié un signal atténuateur clé de la réponse estrogénique de ER $\beta$ . En effet, en empêchant la sumoylation par la mutation de la sérine du *pSuM* (S6) on observe une suractivation de ER $\beta$  en réponse à l'estrogène.

Par contre, la sumoylation ne semble pas être le seul joueur impliqué puisque nous observons que la mutation de la lysine acceptrice de SUMO-1 (K4) augmente encore plus l'activité estrogénique de ER $\beta$  que la simple mutation de la S6. Puisque nous avons démontré que cette lysine est également le siège de l'ubiquitination, qu'elle est impliquée dans la régulation de la stabilité du récepteur et que sa mutation, contrairement à S6, induit une forte accumulation de ER $\beta$  dans la cellule, nous pouvons en déduire que cette différence d'activation est le résultat de l'augmentation de la quantité protéique de ER $\beta$ . En fait, la mutation de K4 induit une activation qui est comparable à celle induite par l'absence des 20 premiers a.a. de l'AF-1 ou l'absence complète de l'AF-1 (161). Tous ces résultats suggèrent donc que l'ubiquitination de la lysine 4 de ER $\beta$ , en plus de sa sumoylation, sert également comme signal atténuateur en réprimant le niveau d'expression du récepteur. Ils démontrent aussi que bien que ces deux MPTs semblent mutuellement exclusives, et que nous soyons vraisemblablement en face de deux mécanismes distincts, elles coordonnent leurs efforts dans un but commun : réprimer l'activité de ER $\beta$ .

#### **4.4 – K4 : « LE » site clé de l'effet atténuateur général de l'AF-1 ?**

Suite à de telles observations, nous ne pouvons passer sous silence le fait que la lysine 4 semble être le site clé impliqué dans l'effet atténuateur de l'AF-1 et ce, autant en

présence d'estrogène qu'en absence, puisque nous observons que l'activité basale de ER $\beta$  en absence de ligand est également augmentée suite à la mutation de la lysine 4 (résultat non publié). L'étude de son impact s'avère une avenue hautement intéressante mais inévitablement complexe, puisque que face à une telle prépondérance d'action, il ne serait pas surprenant que l'ubiquitination et la sumoylation de K4 soient régulées par plusieurs mécanismes et/ou signaux cellulaires.

En résumé, grâce à tous ces résultats, nous avons maintenant un portrait plus complet des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de ER $\beta$  et une meilleure compréhension du rôle joué par le domaine AF-1. Ces connaissances nous permettent de mieux interpréter et/ou prédire l'action de ER $\beta$  dans différents contextes cellulaires et donnent lieu à de nombreuses perspectives.

## **Perspectives**

Tel que mentionné précédemment, mes résultats donnent lieu à de nombreuses perspectives. Je vais me limiter à trois qui, selon moi, méritent d'être plus particulièrement étudiées soit :

- 1- Étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet atténuateur de la lysine 4 :
  - a. Par la sumoylation
  - b. Par l'ubiquitination
  
- 2- Étudier le rôle anti-prolifératif de ER $\beta$  :
  - a. Évaluer l'hypothèse que le rôle anti-prolifératif de ER $\beta$  est AF-1-dépendant
  - b. Évaluer l'effet de l'action non-génomique de ER $\beta$
  
- 3- Étudier l'impact de l'AF-1 et des MPTs dans l'amélioration de la réponse cellulaire au tamoxifène induite par ER $\beta$

## **1 – Mécanismes moléculaires régulant l'effet atténuateur de K4**

Dans le but de mieux comprendre et/ou expliquer les mécanismes impliqués dans la régulation et/ou l'effet atténuateur de la lysine 4 sur ER $\beta$ , plusieurs avenues s'offrent à nous. Dans cette section, je me limiterai à seulement quelques propositions pour la sumoylation et l'ubiquitination.

### **1.1 – La sumoylation**

#### **1.1.1 – La sérine 6 du pSuM: cible potentielle de la kinase CK2 ?**

Tel que mentionné dans la section discussion, les sérines 6, 8, 12 et possiblement la sérine 9, régulent positivement la sumoylation de ER $\beta$ . Nous avons identifié la sérine 8 de ER $\beta$  comme étant une cible de GSK-3 $\beta$ , mais malgré nos efforts nous n'avons pu identifier la ou les kinases impliquées dans la phosphorylation des autres sérines. Fait intéressant, en analysant la séquence impliquée dans la sumoylation du récepteur, on remarque que la phosphorylation de S12 permettrait la création d'un site consensus pour la caséine kinase 2 (CK2) soit S/TxxD/E où S9 devient le site de phosphorylation potentiel. Une fois phosphorylé, S9 créerait alors un nouveau site consensus CK2 dont la sérine cible serait S6. CK2 représente donc une kinase potentielle pour cibler les sérines 6 et 9. Nos résultats préliminaires suggèrent fortement qu'une telle hypothèse puisse s'avérer exacte puisque nous observons une diminution considérable de la sumoylation de ER $\beta$  lors de l'ajout d'un inhibiteur chimique de CK2 (résultat non publié). Afin de confirmer son implication, nous pourrions vérifier si l'inhibition de la sumoylation induite par l'inhibiteur est perdue lorsque S6 et/ou S9 sont mutées. Il faudrait également tester l'effet de la présence ou l'inhibition de CK2, ainsi que l'impact de la mutation de S9, sur l'activité transcriptionnelle de ER $\beta$ .

Jusqu'à présent, trois sérines sur ER $\alpha$  ont été identifiées comme cible de CK2 soit les sérines 167, 282 et 559. La phosphorylation des sérines 282 et 559 par CK2 a un impact légèrement négatif sur l'activation ligand-dépendante de ER $\alpha$  (594). À l'inverse la phosphorylation de S167 augmente l'activité du récepteur en favorisant l'interaction de



ER $\alpha$  avec l'ADN (595,596). Malgré ces discordances et le fait que l'axe de régulation entre CK2 et ER $\alpha$  a encore besoin d'être plus profondément étudié, CK2 semble avoir majoritairement un effet positif sur l'activité de ER $\alpha$  puisque l'inhibition de CK2 par un agent chimique inhibe l'activité du récepteur (594). Donc, dans l'éventualité où CK2 serait impliquée dans la sumoylation, elle induirait vraisemblablement l'atténuation de l'activité de ER $\beta$  et nous aurions peut-être encore droit à un exemple d'une régulation inverse entre les ERs.

### **1.1.2 – Les E3 ligases PIAS, impliquées dans la sumoylation de ER $\beta$ ?**

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la répression transcriptionnelle de ER $\beta$  par SUMO-1, il serait intéressant d'évaluer le rôle des différentes E3 ligase, notamment les PIAS (proteins inhibitor of activated STATs). En effet, les études démontrent que dans la majorité de cas où les facteurs de transcription sont sumoylés au niveau de leur domaine d'inhibition et/ou dans une région régulant négativement leur activité, les protéines PIAS ont été identifiées comme étant impliquées dans le processus (597). Si on repart du fait que l'AF-1 est atténuateur de l'activité estrogénique de ER $\beta$ , que cet effet semble être compris dans les 20 premiers a.a., que c'est justement la région où ER $\beta$  est sumoylé et que la sumoylation réprime l'activité de ER $\beta$ , il est fort probable que les PIAS soient de la partie. Également, bien que la fonction biologique des corps de PML, domaines associés à la matrice nucléaire, reste encore énigmatique, plusieurs évidences démontrent qu'ils sont transcriptionnellement inactifs et impliqués dans l'atténuation de la répression transcriptionnelle en servant de lieu d'entreposage et/ou d'assemblage des corégulateurs sur les facteurs de transcription (598). Or, selon le modèle proposé pour l'action des PIAS, ces protéines joueraient un double rôle dans l'atténuation des facteurs de transcription par la sumoylation en agissant comme E3-ligase et en ciblant ces protéines vers les corps de PML (597). Dans l'éventualité où une ou des PIAS seraient impliquées dans la sumoylation de ER $\beta$  et l'atténuation de son activité, ce double rôle des PIAS permettrait d'expliquer le mécanisme derrière le ciblage de ER $\beta$  vers la matrice nucléaire

que nous avons observé. Également, leur action permettrait d'apporter une explication au rôle antagoniste de la sumoylation sur ER $\beta$ .

En effet, l'observation que la sumoylation protège ER $\beta$  de la dégradation par le protéasome en compétitionnant, au niveau de la lysine 4, avec l'ubiquitination, soulève un questionnement des plus intéressants. Pourquoi est-ce que la cellule fait en sorte d'inhiber la transcription de ER $\beta$  tout en le protégeant de la dégradation ? Cette question anime l'hypothèse que le but de la sumoylation n'est pas d'induire un arrêt complet de la transcription mais plutôt de permettre seulement son atténuation en réduisant entre autres, tel que nos résultats le démontrent, la capacité du récepteur à reconnaître ses éléments de réponses. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'ER $\beta$  sumoylé n'est pas dirigé vers la matrice nucléaire en vue d'y être dégradé. Il y serait plutôt entreposé temporairement, probablement au niveau des corps de PML, en attente d'un prochain cycle transcriptionnel et en vue d'y être préparé via son assemblage avec les corégulateurs. Une telle éventualité éviterait à la cellule le besoin de resynthétiser de nouveaux récepteurs et lui permettrait d'être prête à agir rapidement. Clairement, il s'agit d'une avenue intéressante à évaluer.

Une façon rapide et efficace d'évaluer si les PIAS sont impliqués dans la sumoylation ER $\beta$  et dans la régulation de son activité, serait d'étudier l'effet de leur présence sur le niveau de sumoylation du récepteur (western blot) ainsi que sur son activité transcriptionnelle (essais luciférase). L'utilisation de dominants négatifs des PIAS et/ou de siRNA dirigés contre ceux-ci, seraient nécessaire en vue de confirmer leur rôle dans l'éventualité où les expériences précédentes ce seraient avérées positives. Également, grâce à la technique d'immunohistochimie par fluorescence, nous pourrions évaluer si ER $\beta$  accumule dans les corps de PML en réponse à SUMO-1. De plus, cette technique pourrait également nous servir à affirmer, ou infirmer, si les PIAS sont impliqués dans le ciblage de ER $\beta$  vers les corps de PML et ce, en évaluant si leur présence module la localisation de ER $\beta$  dans ces structures et/ou si elles colocalisent avec ER $\beta$ . Par contre, afin de certifier nos observations, l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre la phosphorylation de la sérine 6, reflétant le niveau de sumoylation de ER $\beta$ , s'avérerait fort utile. En effet, le

développement d'un tel anticorps nous serait hautement profitable, car il permettrait de voir où et quand ER $\beta$  est sumoylé et ce, autant dans un contexte *in vitro* que *in vivo*.

## 1.2 – L'ubiquitination

### 1.2.1 – La lysine 4 : cible de quelle E3-ligase ?

Devant l'évidence que la lysine 4 est hautement impliquée dans la régulation de la dégradation de ER $\beta$  du récepteur et que cette conséquence a un effet majeur sur l'activité du récepteur, il serait intéressant d'identifier le ou les E3-ligases impliquées. Deux candidats potentiels s'offrent à nous.

En effet, nous démontrons que E6-AP, en réponse à la phosphorylation des sérines 94 et 106, favorise la dégradation du récepteur et qu'elle a un effet atténuateur sur l'activité ligand-indépendante de ER $\beta$ . L'absence de la lysine 4 a le même effet, suggérant une interconnexion entre ces deux mécanismes et que la lysine soit une cible de E6-AP. Afin de tester cette hypothèse, la première étape serait de voir si l'inhibition transcriptionnelle de l'activité Erk-dépendante de ER $\beta$  par E6-AP, ainsi que la dégradation induite, sont perdues en absence de la lysine 4. Plus précisément, si K4 est impliquée, nous observerions que le mutant ER $\beta$ -K4R serait beaucoup moins sensible à l'action de cette E3-ligase. Également, nous pourrions faire un essai d'ubiquitination afin de confirmer son implication.

De plus, connaissant la double fonction de E6-AP (E3-ligase et coactivateur transcriptionnel) et le fait que contrairement à la majorité des récepteurs nucléaires, incluant ER $\alpha$ , E6-AP n'agit pas ou que très faiblement comme protéine coactivatrice sur l'activité ligand-dépendante de ER $\beta$  (résultats non-publiés), nous pouvons supposer que l'AF-1 contribue à contrebalancer l'action coactivatrice de E6-AP. En fait, la légère activation n'est observée que seulement en conditions de forte surexpression. Il suffirait de voir par essai luciférase si le mutant ER $\beta$ -S94,106A devient actif en présence de E6-AP et/ou si l'activation des kinases Erk1/2 réprimerait la faible action coactivatrice de E6-AP sur ER $\beta$ -wt. Également, en utilisant les mêmes conditions, nous pourrions voir par

immunobuvardage et immunoprécipitation si E6-AP interagit et favorise la dégradation de ER $\beta$  en présence d'estrogène, effets qui seraient sensibles à la présence de l'AF-1 et/ou des sérines 94 et 106.

Également, CHIP serait une E3-ligase potentielle puisque l'étude de Tateishi et al. démontre que cette ligase interagit avec ER $\beta$  au niveau des 37 premier a.a de l'AF-1 du récepteur et régule négativement son activité estrogénique en induisant la dégradation du récepteur (161). Cette étude démontre aussi que CHIP interagit aussi fortement avec ER $\beta$  en présence qu'en absence d'estrogène. Ainsi, la lysine 4 pourrait fort bien être utilisée par CHIP pour réguler négativement l'activité de ER $\beta$  en modulant le niveau d'expression basal du récepteur. Ce fait concorde également avec nos observations que la lysine 4 influence l'activité ligand-indépendant et dépendante du récepteur. Toutes les techniques et expériences susmentionnées pour l'étude de E6-AP, pourraient également servir à l'étude du rôle de CHIP sur la dégradation K4-dépendante de ER $\beta$ .

## **2 – Évaluation du rôle anti-prolifératif de ER $\beta$**

Des évidences récentes ont associées à ER $\beta$  un pouvoir anti-tumorigénique. En effet, les études démontrent que sa présence est favorable à l'inhibition de la progression des cancers ER $\alpha$ -positifs (voir chapitre 1 section 6.1). L'inhibition de la progression de ces cancers vient du fait que ER $\beta$  agit entre autre comme modulateur négatif de l'activité génomique de ER $\alpha$ . Or, les travaux de Gougelet et al. démontrent que l'AF-1 de ER $\beta$  joue un rôle clé dans l'atténuation ER $\beta$ -dépendante de l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  (162). De plus, l'isoforme ER $\beta$ 2/cx, qui ne possède pas de domaine AF-2 fonctionnel, est capable d'antagoniser l'expression génique de ER $\alpha$  (531). Ces évidences suggèrent fortement que l'effet atténuateur de ER $\beta$  sur l'action pro-proliférative de ER $\alpha$  soit AF-1-dépendant. À ma connaissance, cette hypothèse n'a jamais été évaluée. Je propose d'étudier cette éventualité en y intégrant les nouvelles fonctions et/ou mécanismes d'actions que mes

recherches ont permis d'associer au domaine AF-1 de ER $\beta$ , car il est fort probable que certains pourraient y être impliqués et justement expliquer les faits observés.

De plus, certaines études suggèrent que l'action anti-proliférative de ER $\beta$  dans les cancers est également médiée par son action non-génomique. Puisque je démontre que ER $\beta$  régule par son action non-génomique l'activité de GSK-3 $\beta$ , probablement un signe que ER $\beta$  régule négativement la voie PI3K/Akt, je propose d'étudier plus en profondeur le mécanisme.

## 2.1 – Un rôle anti-prolifératif pour l'AF-1 de ER $\beta$ ?

Nous pourrions évaluer l'hypothèse que l'AF-1 soit responsable de l'effet atténuateur de ER $\beta$  sur la prolifération estrogénique ER $\alpha$ -dépendante dans les cellules de cancer du sein MCF-7. Ces cellules sont très sensibles à l'action proliférative de ER $\alpha$ , elles n'expriment que très faiblement ER $\beta$  et l'effet anti-prolifératif de ER $\beta$  y a déjà été démontré (151,501). En transfectant les MCF-7 avec ER $\beta$  de type sauvage (ER $\beta$ -wt) ou une version tronquée de ER $\beta$  n'ayant plus de domaine AF-1 (ER $\beta$  $\Delta$ AF-1), nous pourrions comparer l'effet de leur présence sur la prolifération estrogène-dépendante par l'essai colorimétrique MTT. S'il s'avère que le domaine AF-1 est impliqué dans le processus, nous pourrions observer deux conséquences : 1- ER $\beta$  $\Delta$ AF-1 ne réprime pas la prolifération, démontrant que l'AF-1 est le domaine clé ou 2- ER $\beta$  $\Delta$ AF-1 réprime la prolifération mais moins efficacement que ER $\beta$ -wt, démontrant qu'il est impliqué mais que son action n'est pas exclusive.

Également, puisque mes résultats démontrent que la sumoylation et l'ubiquitination (dégradation) de la lysine 4 sont hautement impliquées dans l'effet atténuateur de l'AF-1 sur l'activité estrogénique de ER $\beta$ , il serait intéressant d'évaluer dans les mêmes conditions l'impact des différents mutants de sumoylation. Si la sumoylation y joue un rôle, le mutant constitutivement sumoylé ER $\beta$ -S6E induira une inhibition plus grande que ER $\beta$ -wt. À l'inverse, les mutants non sumoylables, ER $\beta$ -S6A et ER $\beta$ -K4R, auront peu ou pas d'effet

sur la prolifération, respectivement. En effet, on s'attend à ce que ER $\beta$ -K4R agissent comme le mutant ER $\beta$  $\Delta$ AF-1 puisque mes résultats démontrent que, contrairement à l'impact de la mutation de la sérine 6 du *p*SuM, l'effet atténuateur de l'AF-1 est complètement perdu en absence d'une lysine 4 fonctionnelle. De plus, puisque nous démontrons que la sumoylation affecte négativement l'interaction de ER $\beta$  avec l'ADN et que l'absence de la lysine 4 induit une forte accumulation protéique, nous pourrions expliquer en partie le mécanisme derrière cette inhibition. En effet, en dimérisant avec ER $\alpha$ , ER $\beta$  viendrait entraver l'action génomique de ER $\alpha$  en réprimant l'interaction de l'hétérodimère au niveau de la chromatine et/ou en favorisant sa dégradation. Ces deux mécanismes d'action ont déjà été observés pour l'isoforme ER $\beta$ 2/cx, augmentant ainsi la plausibilité de notre hypothèse. En effet, en hétérodimère avec ER $\alpha$ , ER $\beta$ 2/cx diminue l'interaction du dimère avec l'ADN et augmente la dégradation de ER $\alpha$  (530-532). Cette hypothèse pourrait être vérifiée en parallèle par des essais d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et en vérifiant le niveau d'expression protéique des isoformes.

Si nos résultats démontrent qu'effectivement le domaine AF-1 et/ou la sumoylation sont impliqués dans l'atténuation de la prolifération ER $\alpha$ -dépendante, il serait vraiment intéressant d'étudier leur rôle dans un contexte *in vivo*. Nous pourrions implanter des tumeurs ER $\alpha$ -positive/ER $\beta$ -négative (xénogreffe) chez des souris nues et, lorsque les tumeurs auront atteint un diamètre acceptable, injecter de vecteurs lentiviraux encodant pour le ou les mutants ci-haut mentionnés directement dans celles-ci. Nous devrions observer soit une régression des tumeurs et/ou une diminution de leur vitesse de développement en présence de ER $\beta$ -wt et peu ou pas d'effet du mutant ER $\beta$  $\Delta$ AF-1, démontrant le pouvoir anti-tumorigénique de ER $\beta$  et le rôle de l'AF-1 dans ce processus. Si la sumoylation est impliquée, l'inhibition ER $\beta$ -dépendante sera accentuée ou diminué en présence de ER $\beta$ -S6E et ER $\beta$ -S6A, respectivement, et cet effet devrait être plus marqué pour ER $\beta$ -K4R.

## **2.2 – Action non-génomique de ER $\beta$ : régulateur négatif de la voie PI3K/Akt?**

Les études démontrent que l'activation constitutive de la voie PI3K/Akt dans les cancers du sein favorise la prolifération et elle a été associée avec l'induction d'une résistance aux traitements anti-estrogéniques (599,600). Akt régule négativement l'activité de GSK-3 $\beta$  en induisant la phosphorylation de sa sérine 9. Or, l'inactivation de GSK-3 $\beta$  est observée dans plus de 60% des tumeurs mammaires et est associée avec un mauvais pronostic (601). De plus, alors que les études démontrent que ER $\alpha$ , principalement par son action non-génomique, favorise l'activation de la voie PI3K/Akt et l'inactivation concomitante de GSK-3 $\beta$ , des évidences récentes dans les capillaires cérébraux de rat et dans les cellules de cancer du sein suggèrent qu'à l'inverse de son homologue, ER $\beta$  serait un régulateur négatif de la voie. En effet, les études démontrent que l'activation soutenue de ER $\beta$  par l'estrogène augmente le niveau d'expression et l'activité de PTEN, résultant en une diminution de l'activité d'Akt et une diminution de la phosphorylation négative de GSK-3 $\beta$  (237,593). Ainsi, un ratio ER $\beta$  supérieur à ER $\alpha$  serait favorable à l'inhibition de la progression des tumeurs et expliquerait en partie le rôle anti-prolifératif de ER $\beta$ . Nos résultats suggèrent fortement que l'action non-génomique de ER $\beta$  participe à la régulation négative de la voie PI3K/Akt, puisque nous avons observé que ER $\beta$  induit rapidement la déphosphorylation de la sérine 9 de GSK-3 $\beta$  en réponse à l'estrogène. Par contre, nous n'avons pas évalué les mécanismes.

Puisque contrairement à ER $\alpha$ , ER $\beta$  cytoplasmique n'interagit pas avec PI3K, ce résultat suggère que l'inhibition de cette voie survient en amont d'Akt (511). Or, l'activité de cette dernière est principalement régulée par PTEN. Afin de déterminer d'où provient l'action de ER $\beta$ , nous pourrions exprimer ER $\beta$  dans les cellules HEK293 et traiter séquentiellement ces cellules à l'estrogène durant de très courtes périodes de temps (5, 10, 15, 30min...). Puis, avec l'aide d'anticorps phospho-spécifique dirigés contre les protéines susmentionnées, incluant Akt et GSK-3 $\beta$ , nous pourrions évaluer quelle kinase est activée

et à quel moment. Ceci nous permettant de déduire l'origine de l'activation de ER $\beta$ . Une fois la kinase identifiée, il nous faudrait faire une immunoprécipitation à partir d'un lysat cytoplasmique afin de confirmer l'interaction. L'utilisation d'estrogène couplé à la BSA, qui ne peut entrer dans la cellule, nous permettrait d'étudier les conséquences cellulaires, notamment sur la prolifération, qui découlent exclusivement de l'effet non-génomique de ER $\beta$ . Par contre, puisque ER $\beta$  est également capable d'induire rapidement l'activation de d'autres kinases, il faudrait dans un tel contexte utiliser des mutants, des inhibiteurs et/ou des siRNA avant d'affirmer que les effets non-génomique ER $\beta$  sur la prolifération sont médiés par l'inactivation de la voie PI3K/Akt. Également, dans le but d'évaluer si l'action de ER $\beta$  cytoplasmique joue un rôle dans l'inhibition de la prolifération estrogénique ER $\alpha$ -dépendante, nous pourrions transfecter dans les MCF-7 un clone ER $\beta$  dont le signal de localisation cellulaire serait muté.

### **3 – Mécanisme entourant l'amélioration de la réponse cellulaire au tamoxifène par ER $\beta$**

Contrairement à ER $\alpha$ , le tamoxifène agit exclusivement comme antagoniste pour ER $\beta$ , sur un ERE, et les études démontrent que cet effet est dépendant de l'AF-1 (32). Mes études suggèrent que les sérines 94 et 106 répriment l'activité constitutive de ER $\beta$  et que la sumoylation phosphorylation-dépendante de ER $\beta$  réprime l'activité estrogénique du récepteur. Il serait intéressant d'évaluer si l'un et/ou l'autre de ces mécanismes sont impliqués dans l'action du tamoxifène. En effet, il a été démontré pour ER $\alpha$  que le tamoxifène pouvait induire la phosphorylation de sérines dans l'AF-1 et que ce mécanisme était impliqué dans l'action agoniste du tamoxifène puisqu'il permettait le recrutement de coactivateurs transcriptionnels, compensant ainsi l'action antagoniste de cet adjuvant (117,251). Le rôle des sérines 94 et 106, du moins celui de recruter E6-AP et d'induire la dégradation de ER $\beta$ , serait peut probable puisque le tamoxifène n'induit pas la dégradation du récepteur. Par contre, l'éventualité que le tamoxifène induise la phosphorylation du



*p*SuM et favorise l'atténuation du récepteur en augmentant sa sumoylation semble prometteuse. Pour ce faire, la première étape serait de vérifier si le tamoxifène provoque la sumoylation de ER $\beta$ . Dans l'affirmative, nous pourrions, par essai luciférase et MTT, vérifier si la mutation de la sérine 6 du *p*SuM vient contrecarrer l'effet antagoniste du tamoxifène sur l'activité estrogénique et la prolifération de ER $\beta$ .

Si cette hypothèse s'avère exacte, puisqu'il existe une corrélation positive entre la présence de ER $\beta$  et l'augmentation de l'efficacité du tamoxifène a été démontrée et peut même inverser l'effet agoniste de cet adjuvant dans les cellules ER $\alpha$ -positives résistantes, nous pourrions évaluer si la sumoylation de ER $\beta$  y est impliqué (379,500). Nous pourrions évaluer cette hypothèse en utilisant de cellules MCF-7 que nous aurions au préalable rendues résistantes en les traitants sur une longue période au tamoxifène. L'impact de la transfection des clones ER $\beta$ -wt, ER $\beta$  $\Delta$ AF-1, ainsi que celui des différents clones de sumo (ER $\beta$ -S6A, S6E ou K4R) sur la prolifération des cellules résistantes serait, ici aussi, détectée par l'essai MTT. Dans l'éventualité où nous observons une atténuation plus marqué de la prolifération dans les cellules ER $\beta$ -S6E et l'absence, ou très peu d'effet, dans les cellules ER $\beta$ -S6A, K4R et  $\Delta$ AF-1, en plus de démontrer que la sumoylation est impliqué dans les processus, nous serions les premiers à confirmer que la corrélation positive entre la présence de ER $\beta$  et l'efficacité accrue du tamoxifène est bel et bien dépendante de l'AF-1.

## **Conclusion**

Pour l'instant, seulement ER $\alpha$  est utilisé comme marqueur pronostic des cancers gynécologiques afin d'évaluer si les patients seraient à même de bénéficier d'un traitement anti-estrogénique. Or, puisque les études démontrent qu'un meilleur ratio ER $\beta$ /ER $\alpha$  est favorable à l'inhibition de la prolifération des tumeurs ER $\alpha$ -positives et l'action des anti-estrogènes, nous croyons que le niveau d'expression de ER $\beta$  devrait être évalué. De plus, puisque ces effets semblent être principalement dépendant des domaines AF-1 respectifs des ERs et que nos résultats démontrent que la phosphorylation des sérines 94 et 106, celles des sérines 6, 8 et 12 ainsi que l'ubiquitination et la sumoylation de la lysine 4 jouent un rôle prépondérant dans l'atténuation de l'activité de ER $\beta$  et la régulation de sa stabilité protéique, nous croyons que l'évaluation de ces sites clés devrait également être considérée. En effet, nos résultats suggèrent fortement que ces sites nouvellement identifiés sur ER $\beta$  pourraient avoir un impact majeur sur l'effet anti-tumorigénique et l'induction d'une meilleure réponse aux traitements par ER $\beta$ . De plus, plusieurs sites de modifications post-traductionnels sur ER $\alpha$  ont également été identifiés comme ayant un rôle majeur dans la tumorigénèse et le développement de résistance (voir section 5.1.3.1). En résumé, nous croyons que la voie du futur est de développer des tests diagnostiques qui combindraient l'analyse de tous ces biomarqueurs puisqu'ils nous permettraient de mieux anticiper la réussite des thérapies et proposer des traitements personnalisés.

## Bibliographie

1. Ghayee HK, Auchus RJ (2007) Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 8:289-300.
2. Nilsson S, Gustafsson J-Å (2010) Estrogen receptors: their action and functional roles in health and disease. *Nuclear receptors, Proteins and cell regulation* 8:94-101
3. Ascenzi P et al. (2006) Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Molecular aspects of medicine* 27:299-402.
4. Park C, Overton C (2010) Premature menopause linked to CVD and osteoporosis. *The Practitioner* 254:21-2, 25-6, 2.
5. Vujovic S et al. (2010) EMAS position statement: Managing women with premature ovarian failure. *Maturitas* 67:91-3.
6. Jones MEE et al. (2006) Of mice and men: the evolving phenotype of aromatase deficiency. *Trends in endocrinology and metabolism* 17:55-64.
7. Constantine GD, Pickar JH (2003) Estrogens in postmenopausal women: recent insights. *Current opinion in pharmacology* 3:626-34.
8. Taylor HS, Manson JE (2011) Update in hormone therapy use in menopause. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96:255-64.
9. Colditz GA (1998) Relationship between estrogen levels, use of hormone replacement therapy, and breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 90:814-23.
10. Santen RJ et al. (2007) Critical assessment of new risk factors for breast cancer: considerations for development of an improved risk prediction model. *Endocrine-related cancer* 14:169-87.
11. Société canadienne du cancer (2010) Statistiques canadiennes sur le cancer. *Agence de la santé publique du canada.*
12. Société canadienne du cancer (2007) Statistiques canadiennes sur le cancer. *Agence de la santé publique du canada.*
13. Harvey JM et al. (1999) Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *Journal of clinical oncology* 17:1474-81.
14. Normanno N et al. (2005) Mechanisms of endocrine resistance and novel therapeutic strategies in breast cancer. *Endocrine-related cancer* 12:721-47.
15. Lumachi F et al. (2011) Endocrine therapy of breast cancer. *Current medicinal chemistry* 18:513-22.
16. Ali S, Coombes RC (2002) Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nature reviews. Cancer* 2:101-12.
17. Madaio RA et al. (2010) Overcoming endocrine resistance in breast cancer. *Current cancer drug targets* 10:519-28.
18. Haagenson KK, Wu GS (2010) The role of MAP kinases and MAP kinase phosphatase-1 in resistance to breast cancer treatment. *Cancer metastasis reviews* 29:143-9.

19. Kurokawa H, Arteaga CL (2003) ErbB (HER) receptors can abrogate antiestrogen action in human breast cancer by multiple signaling mechanisms. *Clinical cancer research* 9:511S-5S.
20. Jensen EV, Jacobson HI (1960) Fate of steroidal estrogens in target tissues. *Biological Activities of Steroids in Relation to Cancer* 161-174.
21. Jensen EV, Jacobson HI (1962) Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Progress in Hormone Research* 18:318-414.
22. Toft D, Gorski J (1966) A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 55:1574-1581.
23. Green S et al. (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320:134-9.
24. Kuiper GG et al. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:5925-30.
25. Mosselman S et al. (1996) ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS letters* 392:49-53.
26. Tremblay GB et al. (1997) Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Molecular endocrinology* 11:353-65.
27. Zhang Z et al. (2004) Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. *Genome research* 14:580-90.
28. Green S et al. (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320:134-9.
29. Enmark E et al. (1997) Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82:4258-65.
30. Aranda A, Pascual A (2001) Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiol Rev* 81:1269-1304.
31. Wärnmark A et al. (2003) Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Molecular endocrinology* 17:1901-9.
32. Kumar R, Litwack G (2009) Structural and functional relationships of the steroid hormone receptors' N-terminal transactivation domain. *Steroids* 74:877-83.
33. Parker MG et al. (1993) Structure and function of the estrogen receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences* 684:119-26.
34. Zwart W et al. (2010) The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *Journal of cell science* 123:1253-61.
35. Heery DM et al. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387:733-736.
36. McKenna NJ et al. (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine reviews* 20:321-44.

37. Skafar DF, Zhao C (2008) The multifunctional estrogen receptor-alpha F domain. *Endocrine* 33:1-8.
38. Cowley SM et al. (1997) Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *The Journal of biological chemistry* 272:19858-62.
39. Papoutsis Z et al. (2009) Binding of estrogen receptor alpha/beta heterodimers to chromatin in MCF-7 cells. *Journal of molecular endocrinology* 43:65-72.
40. Ylikomi T et al. (2008) Reappraisal of the Role of Heat Shock Proteins as Regulators of Steroid Receptor Activity.
41. Le Romancer M et al. (2011) Cracking the Estrogen Receptor's Posttranslational Code in Breast Tumors. *Endocrine reviews* 32:1-26.
42. Brzozowski AM et al. (1997) Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389:753-8.
43. Margeat E et al. (2003) Ligands Differentially Modulate the Protein Interactions of the Human Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Journal of Molecular Biology* 326:77-92.
44. Suzuki S et al. (2007) Modulation of coactivator recruitment by cooperative ligand binding to human Estrogen receptor alpha and beta. *Biological & pharmaceutical bulletin* 30:1641-7.
45. Paruthiyil S et al. (2009) Drug and cell type-specific regulation of genes with different classes of estrogen receptor beta-selective agonists. *PloS one* 4:e6271.
46. Nettles KW, Greene GL (2005) Ligand control of coregulator recruitment to nuclear receptors. *Annual review of physiology* 67:309-33.
47. Privalsky ML (2004) The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annual review of physiology* 66:315-60.
48. Kato S et al. (1995) Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science (New York, N.Y.)* 270:1491-4.
49. Arnold SF et al. (1995) Phosphorylation of tyrosine 537 on the human estrogen receptor is required for binding to an estrogen response element. *The Journal of biological chemistry* 270:30205-12.
50. Bunone G et al. (1996) Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *The EMBO journal* 15:2174-83.
51. Tremblay A et al. (1999) Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Molecular cell* 3:513-9.
52. Tremblay GB et al. (1998) Ligand-independent activation of the estrogen receptors alpha and beta by mutations of a conserved tyrosine can be abolished by antiestrogens. *Cancer research* 58:877-81.
53. Ignar-Trowbridge DM et al. (1992) Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:4658-62.
54. Denner LA et al. (1990) Hormonal regulation and identification of chicken progesterone receptor phosphorylation sites. *The Journal of biological chemistry* 265:16548-55.

55. Hill CS, Treisman R (1995) Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 80:199-211.
56. Tzukerman MT et al. (1994) Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Molecular endocrinology* 8:21-30.
57. Sanchez M et al. (2010) Challenging estrogen receptor beta with phosphorylation. *Trends in endocrinology and metabolism* 21:104-10.
58. Kushner PJ et al. (2000) Estrogen receptor pathways to AP-1. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 74:311-7.
59. Saville B et al. (2000) Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *The Journal of biological chemistry* 275:5379-87.
60. O'Lone R et al. (2004) Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Molecular endocrinology* 18:1859-75.
61. Weatherman RV, Scanlan TS (2001) Unique protein determinants of the subtype-selective ligand responses of the estrogen receptors (ERalpha and ERbeta ) at AP-1 sites. *The Journal of biological chemistry* 276:3827-32.
62. Webb P et al. (1999) The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Molecular endocrinology* 13:1672-85.
63. Paech K et al. (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 277:1508-10.
64. Carroll JS et al. (2006) Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nature Genetics* 38:1289-97
65. Ptashne M. (1988) How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335 (6192):683-9
66. Deng W et Blobel GA. (2010) Do chromatin loops provide epigenetic gene expression states ? *Current Opinion in Genetics & Development* 20(5):548-54
67. Wang C et al. (2011) Estrogen induces c-myc gene expression via an upstream enhancer activated by the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Molecular endocrinology* 25(9):1527-38
68. Carroll JS et al. (2005) Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell* 122:33-43.
69. Holmes KA et al. (2011) Transducin-like enhancer protein 1 mediates estrogen receptor binding and transcriptional activity in breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Epub ahead of print]
70. Cheskis BJ (2004) Regulation of cell signalling cascades by steroid hormones. *Journal of cellular biochemistry* 93:20-7.
71. Boonyaratankornkit V, Edwards DP (2007) Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. *Seminars in reproductive medicine* 25:139-53.
72. Rai D et al. (2005) Distinctive actions of membrane-targeted versus nuclear localized estrogen receptors in breast cancer cells. *Molecular endocrinology* 19:1606-17.

73. Acconcia F et al. (2004) S-palmitoylation modulates human estrogen receptor-alpha functions. *Biochemical and biophysical research communications* 316:878-83.
74. Galluzzo P et al. (2007) Role of ERbeta palmitoylation in the inhibition of human colon cancer cell proliferation. *Endocrine-related cancer* 14:153-67.
75. Pedram A et al. (2007) A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* 282:22278-88.
76. Song RX et al. (2004) The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:2076-81.
77. Song RX-D et al. (2010) Estrogen utilization of IGF-1-R and EGF-R to signal in breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 118:219-30.
78. Wong C-W et al. (2002) Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:14783-8.
79. Shupnik MA (2004) Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation. *Oncogene* 23:7979-89.
80. Simoncini T et al. (2000) Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407:538-41.
81. Acconcia F et al. (2005) Survival versus apoptotic 17beta-estradiol effect: role of ER alpha and ER beta activated non-genomic signaling. *Journal of cellular physiology* 203:193-201.
82. Li T et al. (2009) SH2D4A regulates cell proliferation via the ERalpha/PLC-gamma/PKC pathway. *BMB reports* 42:516-22.
83. Kumar P et al. (2007) Direct Interactions with G alpha i and G beta-gamma mediate nongenomic signaling by estrogen receptor alpha. *Molecular endocrinology* 21:1370-80.
84. Marino M, Ascenzi P (2008) Membrane association of estrogen receptor alpha and beta influences 17beta-estradiol-mediated cancer cell proliferation. *Steroids* 73:853-8.
85. Porras A et al. (2004) P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Molecular biology of the cell* 15:922-33.
86. Harper SJ, LoGrasso P (2001) Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38. *Cellular Signalling* 13:299-310.
87. Barletta F et al. (2004) Characterization of the interactions of estrogen receptor and MNAR in the activation of cSrc. *Molecular endocrinology* 18:1096-108.
88. Björnström L, Sjöberg M (2004) Estrogen receptor-dependent activation of AP-1 via non-genomic signalling. *Nuclear receptor* 2:3.
89. Ordóñez-Morán P, Muñoz A (2009) Nuclear receptors: genomic and non-genomic effects converge. *Cell cycle* 8:1675-80.
90. Filardo EJ et al. (2000) Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the

- epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Molecular endocrinology* 14:1649-60.
91. Revankar CM et al. (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307:1625-30.
  92. Thomas P et al. (2005) Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146:624-32.
  93. Filardo EJ (2002) Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 80:231-8.
  94. Lucas TFG et al. (2010) Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat sertoli cells. *Biology of reproduction* 83:307-17.
  95. Otto C et al. (2008) G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology* 149:4846-56.
  96. Funakoshi T et al. (2006) G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochemical and biophysical research communications* 346:904-10.
  97. Filardo E et al. (2007) Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology* 148:3236-45.
  98. Wang C et al. (2007) Expression of G protein-coupled receptor 30 in the hamster ovary: differential regulation by gonadotropins and steroid hormones. *Endocrinology* 148:4853-64.
  99. Otto C et al. (2009) GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice. *Biology of reproduction* 80:34-41.
  100. Ding Q et al. (2009) Estradiol-mediated ERK phosphorylation and apoptosis in vascular smooth muscle cells requires GPR 30. *American journal of physiology. Cell physiology* 297:C1178-87.
  101. Wang C et al. (2008) GPR30 contributes to estrogen-induced thymic atrophy. *Molecular endocrinology* 22:636-48.
  102. Windahl SH et al. (2009) The role of the G protein-coupled receptor GPR30 in the effects of estrogen in ovariectomized mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 296:E490-6.
  103. Mårtensson UEA et al. (2009) Deletion of the G protein-coupled receptor 30 impairs glucose tolerance, reduces bone growth, increases blood pressure, and eliminates estradiol-stimulated insulin release in female mice. *Endocrinology* 150:687-98.
  104. Pedram A et al. (2006) Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Molecular endocrinology* 20:1996-2009.
  105. Madak-Erdogan Z et al. (2008) Nuclear and extranuclear pathway inputs in the regulation of global gene expression by estrogen receptors. *Molecular endocrinology* 22:2116-27.
  106. Langer G et al. (2009) A critical review of fundamental controversies in the field of GPR30 research. *Steroids* 75:603-610.



107. Shii Y, Eisenman RN (2003) Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:13225-30.
108. Leo C, Chen JD (2000) The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* 245:1-11.
109. Kershah SM et al. (2004) Expression of estrogen receptor coregulators in normal and malignant human endometrium. *Gynecologic oncology* 92:304-13.
110. Karmakar S et al. (2011) Distinctive functions of p160 steroid receptor coactivators in proliferation of an estrogen-independent, tamoxifen-resistant breast cancer cell line. *Endocrine-related cancer* 18:113-27.
111. Stallcup MR et al. (2000) Co-operation between protein-acetylating and protein-methylating co-activators in transcriptional activation. *Biochemical Society transactions* 28:415-8.
112. Lanz RB et al. (1999) A Steroid Receptor Coactivator, SRA, Functions as an RNA and Is Present in an SRC-1 Complex. *Cell* 97:17-27.
113. Endoh H et al. (1999) Purification and Identification of p68 RNA Helicase Acting as a Transcriptional Coactivator Specific for the Activation Function 1 of Human Estrogen Receptor alpha. *Mol. Cell. Biol.* 19:5363-5372.
114. Webb P (1998) Estrogen Receptor Activation Function 1 Works by Binding p160 Coactivator Proteins. *Molecular Endocrinology* 12:1605-1618.
115. Benecke A (2000) Synergy between estrogen receptor alpha activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. *EMBO Reports* 1:151-157.
116. Watanabe M et al. (2001) A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor alpha coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *The EMBO journal* 20:1341-52.
117. Dutertre M, Smith CL (2003) Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor-alpha: regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains. *Molecular endocrinology* 17:1296-314.
118. Tremblay A, Giguère V (2001) Contribution of steroid receptor coactivator-1 and CREB binding protein in ligand-independent activity of estrogen receptor beta. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 77:19-27.
119. Kobayashi Y et al. (2000) p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor alpha and beta by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *The Journal of biological chemistry* 275:15645-51.
120. Loven MA et al. (2001) Estrogen response elements alter coactivator recruitment through allosteric modulation of estrogen receptor beta conformation. *The Journal of biological chemistry* 276:45282-8.
121. Hall JM, et al (2002) Allosteric regulation of estrogen receptor structure, function, and coactivator recruitment by different estrogen response elements. *Molecular endocrinology* 16:469-86.

122. Bai Y, Giguère V (2003) Isoform-selective interactions between estrogen receptors and steroid receptor coactivators promoted by estradiol and ErbB-2 signaling in living cells. *Molecular endocrinology* 17:589-99.
123. Klinge CM et al. (2004) Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors alpha and beta by coactivators and corepressors. *Journal of molecular endocrinology* 33:387-410.
124. Cascio S et al. (2007) Insulin-like growth factor 1 differentially regulates estrogen receptor-dependent transcription at estrogen response element and AP-1 sites in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 282:3498-506.
125. Keeton EK, Brown M (2005) Cell cycle progression stimulated by tamoxifen-bound estrogen receptor-alpha and promoter-specific effects in breast cancer cells deficient in N-CoR and SMRT. *Molecular endocrinology* 19:1543-54.
126. Hong W et al. (2010) Inhibition of MAP kinase promotes the recruitment of corepressor SMRT by tamoxifen-bound estrogen receptor alpha and potentiates tamoxifen action in MCF-7 cells. *Biochemical and biophysical research communications* 396:299-303.
127. Heery DM et al. (2001) Core LXXLL motif sequences in CREB-binding protein, SRC1, and RIP140 define affinity and selectivity for steroid and retinoid receptors. *The Journal of biological chemistry* 276:6695-702.
128. Perissi V et al. (1999) Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes & development* 13:3198-208.
129. Webb P (2000) The Nuclear Receptor Corepressor (N-CoR) Contains Three Isoleucine Motifs (I/LXXII) That Serve as Receptor Interaction Domains (IDs). *Molecular Endocrinology* 14:1976-1985.
130. Peterson TJ et al. (2007) The silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor (SMRT) corepressor is required for full estrogen receptor alpha transcriptional activity. *Molecular and cellular biology* 27:5933-48.
131. Karmakar S et al. (2010) Cooperative activation of cyclin D1 and progesterone receptor gene expression by the SRC-3 coactivator and SMRT corepressor. *Molecular endocrinology* 24:1187-202.
132. Suzuki A et al. (2010) Down-regulation of PROS1 gene expression by 17beta-estradiol via estrogen receptor alpha (ERalpha)-Sp1 interaction recruiting receptor-interacting protein 140 and the corepressor-HDAC3 complex. *The Journal of biological chemistry* 285:13444-53.
133. Webb P et al. (2003) ERbeta Binds N-CoR in the Presence of Estrogens via an LXXLL-like Motif in the N-CoR C-terminus. *Nuclear receptor* 1:4.
134. Giguere V et al. (1998) Estrogen Receptor  $\beta$ : Re-evaluation of Estrogen and Antiestrogen Signaling. *Steroids* 63:335-339.
135. Gustafsson JA (1999) Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *The Journal of endocrinology* 163:379-83.
136. Katzenellenbogen BS, Korach KS (1997) A new actor in the estrogen receptor drama--enter ER-beta. *Endocrinology* 138:861-2.
137. Kuiper GG et al. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863-70.

138. Deroo BJ, Korach KS (2006) Estrogen receptors and human disease. *The Journal of clinical investigation* 116:561-70.
139. Gosselin D, Rivest S (2011) Estrogen receptor transrepresses brain inflammation. *Cell* 145:495-7.
140. Nilsson S, Gustafsson J-Å (2011) Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clinical pharmacology and therapeutics* 89:44-55.
141. Couse JF (1999) Estrogen Receptor Null Mice: What Have We Learned and Where Will They Lead Us? *Endocrine Reviews* 20:358-417.
142. Curtis Hewitt S et al. (2000) Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor knockout mice - what their phenotypes reveal about mechanisms of estrogen action. *Breast Cancer Res* 2:345-352.
143. Lubahn DB (1993) Alteration of Reproductive Function but Not Prenatal Sexual Development After Insertional Disruption of the Mouse Estrogen Receptor Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:11162-11166.
144. Kregge JH (1998) Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:15677-15682.
145. Harris HA (2007) Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies. *Molecular endocrinology* 21:1-13.
146. Wang L et al. (2001) Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor beta knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:2792-6.
147. Wang L et al. (2003) Estrogen receptor (ER)beta knockout mice reveal a role for ERbeta in migration of cortical neurons in the developing brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:703-8.
148. Liu Y et al. (2008) The genome landscape of ERalpha- and ERbeta-binding DNA regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:2604-9.
149. Zhao C et al. (2010) Genome-wide mapping of estrogen receptor-beta-binding regions reveals extensive cross-talk with transcription factor activator protein-1. *Cancer research* 70:5174-83.
150. Charn TH et al. (2010) Genome-wide dynamics of chromatin binding of estrogen receptors alpha and beta: mutual restriction and competitive site selection. *Molecular endocrinology* 24:47-59.
151. Grober OM et al. (2011) Global analysis of estrogen receptor beta binding to breast cancer cell genome reveals an extensive interplay with estrogen receptor alpha for target gene regulation. *BMC genomics* 12:36.
152. Matthews J, Gustafsson J-Å (2003) Estrogen signaling : A Subtle Balance Between ERa and ERb. *Review Literature And Arts Of The Americas* 3:281-292.
153. McDonnell DP et al. (1995) Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Molecular endocrinology* 9:659-69.
154. Sanchez M, Tremblay A (2005) in *Molecular genetics of cancer* (Research Signpost, Trivandrum, India, INDE), pp 149-185.

155. McInerney EM et al. (1998) Transcription activation by the human estrogen receptor subtype beta (ER beta) studied with ER beta and ER alpha receptor chimeras. *Endocrinology* 139:4513-22.
156. Tremblay GB et al. (1999) Dominant activity of activation function 1 (AF-1) and differential stoichiometric requirements for AF-1 and -2 in the estrogen receptor alpha-beta heterodimeric complex. *Molecular and cellular biology* 19:1919-27.
157. Maggi A (2011) Liganded and unliganded activation of estrogen receptor and hormone replacement therapies. *Biochimica et biophysica acta* 1812:1054-60.
158. Cowley SM, Parker MG (1999) A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 69:165-75.
159. Hall JM, McDonnell DP (1999) The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140:5566-78.
160. Delaunay F et al. (2000) Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors alpha and beta. *Molecular pharmacology* 58:584-90.
161. Tateishi Y et al. (2006) Turning off estrogen receptor beta-mediated transcription requires estrogen-dependent receptor proteolysis. *Molecular and cellular biology* 26:7966-76.
162. Gougelet A et al. (2007) Oestrogen receptors pathways to oestrogen responsive elements: the transactivation function-1 acts as the keystone of oestrogen receptor (ER)beta-mediated transcriptional repression of ERalpha. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 104:110-22.
163. Hawse JR et al. (2008) Estrogen receptor beta isoform-specific induction of transforming growth factor beta-inducible early gene-1 in human osteoblast cells: an essential role for the activation function 1 domain. *Molecular endocrinology* 22:1579-95.
164. Valley CC et al. (2005) Differential regulation of estrogen-inducible proteolysis and transcription by the estrogen receptor alpha N terminus. *Molecular and cellular biology* 25:5417-28.
165. Picard N et al. (2008) Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-associated protein ubiquitin ligase recruitment to the estrogen receptor beta. *Molecular endocrinology* 22:317-30.
166. Schwabe JW et al. (1993) The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell* 75:567-78.
167. Hyder SM et al. (1999) Interaction of human estrogen receptors alpha and beta with the same naturally occurring estrogen response elements. *Biochemical pharmacology* 57:597-601.
168. Loven MA et al. (2001) Interaction of estrogen receptors alpha and beta with estrogen response elements. *Molecular and cellular endocrinology* 181:151-63.

169. Berry NB et al. (2008) Estrogen receptor-alpha hinge-region lysines 302 and 303 regulate receptor degradation by the proteasome. *Molecular endocrinology* 22:1535-51.
170. Giordano C et al. (2010) Growth factor-induced resistance to tamoxifen is associated with a mutation of estrogen receptor alpha and its phosphorylation at serine 305. *Breast cancer research and treatment* 119:71-85.
171. Kim MY et al. (2006) Acetylation of estrogen receptor alpha by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor. *Molecular endocrinology* 20:1479-93.
172. Wang C et al. (2001) Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *The Journal of biological chemistry* 276:18375-83.
173. Sentis S et al. (2005) Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity. *Molecular endocrinology* 19:2671-84.
174. Sanchez M et al. (2007) The hormonal response of estrogen receptor beta is decreased by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway via a phosphorylation-dependent release of CREB-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 282:4830-40.
175. Sanchez M et al. (2011) Coordinate regulation of estrogen receptor beta degradation by Mdm2 and CREB binding protein in response to growth signals. *Oncogene* Accepted.
176. Kuiper GGJM (1998) Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor. *Endocrinology* 139:4252-4263.
177. Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA (2000) Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast cancer research* 2:335-44.
178. Hsieh RW et al. (2006) Identification of ligands with bicyclic scaffolds provides insights into mechanisms of estrogen receptor subtype selectivity. *The Journal of biological chemistry* 281:17909-19.
179. Shelly W et al. (2008) Selective estrogen receptor modulators: an update on recent clinical findings. *Obstetrical & gynecological survey* 63:163-81.
180. Pike ACW (2006) Lessons learnt from structural studies of the oestrogen receptor. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 20:1-14.
181. Pike AC et al. (1999) Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *The EMBO journal* 18:4608-18.
182. Barkhem T et al. (1998) Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Molecular pharmacology* 54:105-12.
183. Minutolo F, Macchia M (2011) Estrogen receptor  $\beta$  ligands: Recent advances and biomedical applications. *Medicinal Research* 31:364-442.

184. Wärnmark A et al. (2001) Differential recruitment of the mammalian mediator subunit TRAP220 by estrogen receptors ERalpha and ERbeta. *The Journal of biological chemistry* 276:23397-404.
185. Peters GA, Khan SA (1999) Estrogen receptor domains E and F: role in dimerization and interaction with coactivator RIP-140. *Molecular endocrinology* 13:286-96.
186. Montano MM et al. (1995) The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Molecular endocrinology* 9:814-25.
187. Schwartz JA et al. (2002) Mutations targeted to a predicted helix in the extreme carboxyl-terminal region of the human estrogen receptor-alpha alter its response to estradiol and 4-hydroxytamoxifen. *The Journal of biological chemistry* 277:13202-9.
188. Yang J et al. (2008) The F-domain of estrogen receptor-alpha inhibits ligand induced receptor dimerization. *Molecular and cellular endocrinology* 295:94-100.
189. Tateishi Y et al. (2004) Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome pathways for estrogen receptor. *The EMBO journal* 23:4813-23.
190. Hart GW (1997) A Subpopulation of Estrogen Receptors Are Modified by O-Linked N-Acetylglucosamine. *Journal of Biological Chemistry* 272:2421-2428.
191. Walsh CT et al. (2005) Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 44:7342-72.
192. Clark RSB et al. (2005) Posttranslational protein modifications. *Critical care medicine* 33:S407-9.
193. Witze ES et al. (2007) Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nature methods* 4:798-806.
194. Mann M et al. (2002) Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends in biotechnology* 20:261-8.
195. Arena S et al. (2005) Genetic analysis of the kinome and phosphatome in cancer. *Cellular and molecular life sciences* 62:2092-9.
196. Manning G et al. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-34.
197. Denu JM et al. (1996) Form and function in protein dephosphorylation. *Cell* 87:361-4.
198. Johnson LN, Lewis RJ (2001) Structural basis for control by phosphorylation. *Chemical reviews* 101:2209-42.
199. Pawson T (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature* 373:573-80.
200. Pawson T, Nash P (2003) Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* 300:445-52.
201. Hunter T (2000) Signaling--2000 and beyond. *Cell* 100:113-27.
202. Downward J (2001) The ins and outs of signalling. *Nature* 411:759-62.
203. Schlessinger J, Lemmon MA (2003) SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2003:RE12.
204. Futreal PA et al. (2004) A census of human cancer genes. *Nature reviews. Cancer* 4:177-83.

205. Andersen JN et al. (2004) A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *The FASEB journal* 18:8-30.
206. Cohen P (2002) Protein kinases - the major drug targets of the twenty-first century? *Nature reviews. Drug discovery* 1:309-315.
207. Toyoda H et al. (1995) Molecular cloning of mouse epiregulin, a novel epidermal growth factor-related protein, expressed in the early stage of development. *FEBS letters* 377:403-7.
208. LeRoith D et al. (1995) Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocrine reviews* 16:143-63.
209. Toyoshima K et al. (1988) Structure and function of the erbB gene family. *IARC scientific publications*:149-58.
210. Riedemann J, Macaulay VM (2006) IGF1R signalling and its inhibition. *Endocrine-related cancer* 13 Suppl 1:S33-43.
211. Jorissen RN et al. (2003) Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental cell research* 284:31-53.
212. Kiefer TL et al. (2005) Differential regulation of estrogen receptor alpha, glucocorticoid receptor and retinoic acid receptor alpha transcriptional activity by melatonin is mediated via different G proteins. *Journal of pineal research* 38:231-9.
213. Sauv e K et al. (2009) Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway. *Cancer research* 69:5793-800.
214. Naor Z et al. (2000) Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends in endocrinology and metabolism* 11:91-9.
215. Yart A et al. (2002) Phosphoinositide 3-kinases in lysophosphatidic acid signaling: regulation and cross-talk with the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *Biochimica et biophysica acta* 1582:107-11.
216. Lu D-Y et al. (2009) SDF-1alpha up-regulates interleukin-6 through CXCR4, PI3K/Akt, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in microglia. *European journal of pharmacology* 613:146-54.
217. Osmond RIW et al. (2010) An emerging role for kinase screening in GPCR drug discovery. *Current opinion in molecular therapeutics* 12:305-15.
218. Smith FD et al. (2011) Plugging PKA into ERK scaffolds. *Cell cycle* 10:731-2.
219. Waters C et al. (2004) The role of G-protein coupled receptors and associated proteins in receptor tyrosine kinase signal transduction. *Seminars in cell & developmental biology* 15:309-23.
220. Bhola NE, Grandis JR (2008) Crosstalk between G-protein-coupled receptors and epidermal growth factor receptor in cancer. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13:1857-65.
221. Mendoza RA et al. (2011) Interactions between IGF-I, estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ), and ER $\beta$  in regulating growth/apoptosis of MCF-7 human breast cancer cells. *The Journal of endocrinology* 208:1-9.
222. Lupien M et al. (2010) Growth factor stimulation induces a distinct ER $\alpha$  cistrome underlying breast cancer endocrine resistance. *Genes & development* 24:2219-27.

223. Osborne CK et al. (2003) Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 95:353-61.
224. Ghayad SE et al. (2010) Endocrine resistance associated with activated ErbB system in breast cancer cells is reversed by inhibiting MAPK or PI3K/Akt signaling pathways. *International journal of cancer*. 126:545-62.
225. Myers E et al. (2004) Inverse relationship between ER-beta and SRC-1 predicts outcome in endocrine-resistant breast cancer. *British journal of cancer* 91:1687-93.
226. Bohula EA et al. (2003) Targeting the type 1 insulin-like growth factor receptor as anti-cancer treatment. *Anti-cancer drugs* 14:669-82.
227. Zhang Y et al. (2011) Elevated insulin-like growth factor 1 receptor signaling induces antiestrogen resistance through the MAPK/ERK and PI3K/Akt signaling routes. *Breast cancer research* 13:R52.
228. Jones HE et al. (2004) Insulin-like growth factor-I receptor signalling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells. *Endocrine-related cancer* 11:793-814.
229. Warshamana-Greene GS et al. (2005) The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor, NVP-ADW742, sensitizes small cell lung cancer cell lines to the effects of chemotherapy. *Clinical cancer research* 11:1563-71.
230. Krueckl SL et al. (2004) Increased insulin-like growth factor I receptor expression and signaling are components of androgen-independent progression in a lineage-derived prostate cancer progression model. *Cancer research* 64:8620-9.
231. Mendoza RA et al. (2011) Tumorigenicity of MCF-7 human breast cancer cells lacking the p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase. *The Journal of endocrinology* 208:11-9.
232. Li S et al. (2005) Overexpression of G protein-coupled receptors in cancer cells: involvement in tumor progression. *International journal of oncology* 27:1329-39.
233. Boudot A et al. (2011) Differential Estrogen-Regulation of CXCL12 Chemokine Receptors, CXCR4 and CXCR7, Contributes to the Growth Effect of Estrogens in Breast Cancer Cells. *PloS one* 6:e20898.
234. Sun X et al. (2010) CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer metastasis reviews* 29:709-22.
235. Kahlert S et al. (2000) Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *The Journal of biological chemistry* 275:18447-53.
236. Zhao Y et al. (2008) The expression of estrogen receptor isoforms alpha, beta and insulin-like growth factor-I in uterine leiomyoma. *Gynecological endocrinology* 24:549-54.
237. Lindberg K et al. (2011) Estrogen receptor beta represses Akt signaling in breast cancer cells via downregulation of HER2/HER3 and upregulation of PTEN - implications for tamoxifen sensitivity. *Breast cancer research* 13:R43.
238. Roberts PJ, Der CJ (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26:3291-310.
239. Cuadrado A, Nebreda AR (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *The Biochemical journal* 429:403-17.



240. Shin I et al. (2005) H-Ras-specific activation of Rac-MKK3/6-p38 pathway: its critical role in invasion and migration of breast epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 280:14675-83.
241. Gutierrez MC et al. (2005) Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of clinical oncology* 23:2469-76.
242. Miller WR (2002) Regulatory subunits of PKA and breast cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 968:37-48.
243. Michalides R et al. (2004) Tamoxifen resistance by a conformational arrest of the estrogen receptor alpha after PKA activation in breast cancer. *Cancer cell* 5:597-605.
244. Chen D et al. (2002) Phosphorylation of human estrogen receptor alpha at serine 118 by two distinct signal transduction pathways revealed by phosphorylation-specific antisera. *Oncogene* 21:4921-31.
245. Sheeler CQ et al. (2003) Mutation of serines 104, 106, and 118 inhibits dimerization of the human estrogen receptor in yeast. *Endocrine research* 29:237-55.
246. Park K-J et al. (2005) Formation of an IKKalpha-dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. *Molecular cell* 18:71-82.
247. Medunjanin S et al. (2005) Glycogen synthase kinase-3 interacts with and phosphorylates estrogen receptor alpha and is involved in the regulation of receptor activity. *The Journal of biological chemistry* 280:33006-14.
248. Henrich LM et al. (2003) Extracellular signal-regulated kinase 7, a regulator of hormone-dependent estrogen receptor destruction. *Molecular and cellular biology* 23:5979-88.
249. González L et al. (2009) Activation of the unliganded estrogen receptor by prolactin in breast cancer cells. *Oncogene* 28:1298-308.
250. Weitsman GE et al. (2009) Reactive oxygen species induce phosphorylation of serine 118 and 167 on estrogen receptor alpha. *Breast cancer research and treatment* 118:269-79.
251. Thomas RS et al. (2008) Phosphorylation at serines 104 and 106 by Erk1/2 MAPK is important for estrogen receptor-alpha activity. *Journal of molecular endocrinology* 40:173-84.
252. Joel PB et al. (1998) pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Molecular and cellular biology* 18:1978-84.
253. Campbell RA et al. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *The Journal of biological chemistry* 276:9817-24.
254. Shah YM, Rowan BG (2005) The Src kinase pathway promotes tamoxifen agonist action in Ishikawa endometrial cells through phosphorylation-dependent stabilization of estrogen receptor (alpha) promoter interaction and elevated steroid receptor coactivator 1 activity. *Molecular endocrinology* 19:732-48.
255. Yamnik RL et al. (2009) S6 kinase 1 regulates estrogen receptor alpha in control of breast cancer cell proliferation. *The Journal of biological chemistry* 284:6361-9.

256. Yamnik RL, Holz MK (2010) mTOR/S6K1 and MAPK/RSK signaling pathways coordinately regulate estrogen receptor alpha serine 167 phosphorylation. *FEBS letters* 584:124-8.
257. Márquez DC et al. (2001) Epidermal growth factor receptor and tyrosine phosphorylation of estrogen receptor. *Endocrine* 16:73-81.
258. Arnold SF et al. (1995) Phosphorylation of the human estrogen receptor on tyrosine 537 in vivo and by src family tyrosine kinases in vitro. *Molecular endocrinology* 9:24-33.
259. Arnold SF et al. (1997) Estradiol-binding mechanism and binding capacity of the human estrogen receptor is regulated by tyrosine phosphorylation. *Molecular endocrinology* 11:48-53.
260. Zhang QX et al. (1997) An estrogen receptor mutant with strong hormone-independent activity from a metastatic breast cancer. *Cancer research* 57:1244-9.
261. Rogatsky I et al. (1999) Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *The Journal of biological chemistry* 274:22296-302.
262. Lee H, Bai W (2002) Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Molecular and cellular biology* 22:5835-45.
263. Driggers PH et al. (2001) The proto-oncoprotein Brx activates estrogen receptor beta by a p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *The Journal of biological chemistry* 276:46792-7.
264. Molis TM et al. (1994) Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Molecular endocrinology* 8:1681-90.
265. Chen D et al. (1999) Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Molecular and cellular biology* 19:1002-15.
266. Tsai H-W et al. (2004) Protein kinase A activation of estrogen receptor alpha transcription does not require proteasome activity and protects the receptor from ligand-mediated degradation. *Endocrinology* 145:2730-8.
267. Balasenthil S et al. (2004) Estrogen receptor activation at serine 305 is sufficient to upregulate cyclin D1 in breast cancer cells. *FEBS letters* 567:243-7.
268. Tharakan R et al. (2008) Phosphorylation of estrogen receptor alpha, serine residue 305 enhances activity. *Molecular and cellular endocrinology* 295:70-8.
269. St-Laurent V et al. (2005) Selective hormone-dependent repression of estrogen receptor beta by a p38-activated ErbB2/ErbB3 pathway. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 94:23-37.
270. Hamilton-Burke W et al. (2010) Phosphorylation of estrogen receptor beta at serine 105 is associated with good prognosis in breast cancer. *The American journal of pathology* 177:1079-86.
271. Cheng X et al. (2000) Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor beta. *Biochemistry* 39:11609-20.
272. Cheng X, Hart GW (2001) Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *The Journal of biological chemistry* 276:10570-5.

273. Hershko A (1996) Lessons from the discovery of the ubiquitin system. *Trends in biochemical sciences* 21:445-9.
274. Hershko A (2005) The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell-division cycle (Nobel lecture). *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 44:5932-43.
275. Glickman MH, Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews* 82:373-428.
276. Hicke L (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2:195-201.
277. Li W, Ye Y (2008) Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65:2397-406.
278. Koegl M et al. (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96:635-44.
279. Schulman BA, Harper JW (2009) Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10:319-31.
280. Shi D et al. (2009) CBP and p300 are cytoplasmic E4 polyubiquitin ligases for p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:16275-80.
281. Wilkinson KD (2000) Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Seminars in cell & developmental biology* 11:141-8.
282. Nijman SMB et al. (2005) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123:773-86.
283. Welchman RL et al. (2005) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6:599-609.
284. Zheng N (2003) A closer look of the HECTic ubiquitin ligases. *Structure* 11:5-6.
285. Deshaies RJ, Joazeiro CAP (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annual review of biochemistry* 78:399-434.
286. Christensen DE, Klevit RE (2009) Dynamic interactions of proteins in complex networks: identifying the complete set of interacting E2s for functional investigation of E3-dependent protein ubiquitination. *The FEBS journal* 276:5381-9.
287. Welchman RL et al. (2005) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6:599-609.
288. Ramaekers CHMA, Wouters BG (2011) Regulatory functions of ubiquitin in diverse DNA damage responses. *Current molecular medicine* 11:152-69.
289. Bhat KP, Greer SF (2011) Proteolytic and non-proteolytic roles of ubiquitin and the ubiquitin proteasome system in transcriptional regulation. *Biochimica et biophysica acta* 1809:150-5.
290. Olson RE (1997) The dynamic state of body constituents (Schoenheimer, 1939). *The Journal of nutrition* 127:1041S-1043S.
291. Xu P et al. (2009) Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* 137:133-45.

292. Jacobson AD et al. (2009) The lysine 48 and lysine 63 ubiquitin conjugates are processed differently by the 26 S proteasome. *The Journal of biological chemistry* 284:35485-94.
293. Song L, Rape M (2010) Regulated degradation of spindle assembly factors by the anaphase-promoting complex. *Molecular cell* 38:369-82.
294. Deveraux Q et al. (1994) A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *The Journal of biological chemistry* 269:7059-61.
295. Lam YA et al. (2002) A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 416:763-7.
296. Chen L, Madura K (2002) Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Molecular and cellular biology* 22:4902-13.
297. Kim I et al. (2004) Multiple interactions of rad23 suggest a mechanism for ubiquitylated substrate delivery important in proteolysis. *Molecular biology of the cell* 15:3357-65.
298. Hochstrasser M (2009) Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 458:422-9.
299. Enenkel C et al. (1998) Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. *The EMBO journal* 17:6144-54.
300. Brooks P et al. (2000) Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *The Biochemical journal* 346 Pt 1:155-61.
301. Elsasser S et al. (2004) Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. *The Journal of biological chemistry* 279:26817-22.
302. Pickart CM, Cohen RE (2004) Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5:177-87.
303. Shringarpure R et al. (2003) Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *The Journal of biological chemistry* 278:311-8.
304. Varshavsky A et al. (2005) Felix Hoppe-Seyler Lecture 2000. The ubiquitin system and the N-end rule pathway. *Biological chemistry* 381:779-89.
305. Rechsteiner M, Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in biochemical sciences* 21:267-71.
306. García-Alai MM et al. (2006) Molecular basis for phosphorylation-dependent, PEST-mediated protein turnover. *Structure* 14:309-19.
307. Lahav-Baratz S (1995) Reversible Phosphorylation Controls the Activity of Cyclosome-Associated Cyclin-Ubiquitin Ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:9303-9307.
308. Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annual review of immunology* 18:621-63.
309. Bercovich B et al. (1997) Ubiquitin-dependent degradation of certain protein substrates in vitro requires the molecular chaperone Hsc70. *The Journal of biological chemistry* 272:9002-10.

310. Jin T et al. (2000) The chaperone protein BiP binds to a mutant prion protein and mediates its degradation by the proteasome. *The Journal of biological chemistry* 275:38699-704.
311. Hershko A et al. (1982) Immunochemical analysis of the turnover of ubiquitin-protein conjugates in intact cells. Relationship to the breakdown of abnormal proteins. *The Journal of biological chemistry* 257:13964-70.
312. Seufert W, Jentsch S (1990) Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *The EMBO journal* 9:543-50.
313. Eakin CM et al. (2007) Estrogen receptor alpha is a putative substrate for the BRCA1 ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:5794-9.
314. Lee DH, Goldberg AL (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends in cell biology* 8:397-403.
315. Tomoda H, Omura S (2000) Lactacystin, a proteasome inhibitor: discovery and its application in cell biology. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 120:935-49.
316. Konstantinova IM et al. (2008) Role of proteasomes in cellular regulation. *International review of cell and molecular biology* 267:59-124.
317. Fasanaro P et al. (2010) Regulation of the endothelial cell cycle by the ubiquitin-proteasome system. *Cardiovascular research* 85:272-80.
318. Löw P (2011) The role of ubiquitin-proteasome system in ageing. *General and comparative endocrinology* 172:39-43.
319. Wertz IE, Dixit VM (2010) Signaling to NF-kappaB: regulation by ubiquitination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2:a003350.
320. Hochrainer K, Lipp J (2007) Ubiquitylation within signaling pathways in- and outside of inflammation. *Thrombosis and haemostasis* 97:370-7.
321. Kaang B-K et al. (2009) Synaptic protein degradation as a mechanism in memory reorganization. *The Neuroscientist* 15:430-5.
322. Ooijen G van et al. (2011) Proteasome Function Is Required for Biological Timing throughout the Twenty-Four Hour Cycle. *Current biology : CB* 21:869-75.
323. Frank SJ, Fuchs SY (2008) Modulation of growth hormone receptor abundance and function: roles for the ubiquitin-proteasome system. *Biochimica et biophysica acta* 1782:785-94.
324. Feldherr CM et al. (2001) Regulation of functional nuclear pore size in fibroblasts. *Journal of cell science* 114:4621-7.
325. Ramadan K, Meerang M (2011) Degradation-linked ubiquitin signal and proteasome are integral components of DNA double strand break repair: New perspectives for anti-cancer therapy. *FEBS letters*. 585:2868-75
326. Petroski MD (2008) The ubiquitin system, disease, and drug discovery. *BMC biochemistry* 9 Suppl 1:S7.
327. Genin E, Reboud-Ravaux M, Vidal J (2010) Proteasome inhibitors: recent advances and new perspectives in medicinal chemistry. *Current topics in medicinal chemistry* 10:232-56.

328. Chen D, Dou QP (2010) The ubiquitin-proteasome system as a prospective molecular target for cancer treatment and prevention. *Current protein & peptide science* 11:459-70.
329. Chen D et al. (2011) Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Current cancer drug targets* 11:239-53.
330. Rechsteiner M (1991) Natural substrates of the ubiquitin proteolytic pathway. *Cell* 66:615-8.
331. Liu BQ et al. (2011) Glucosamine induces cell death via proteasome inhibition in human ALVA41 prostate cancer cell. *Experimental & molecular medicine*.
332. Mukhopadhyay D, Riezman H (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315:201-5.
333. Sundvall M et al. (2008) Isoform-specific monoubiquitination, endocytosis, and degradation of alternatively spliced ErbB4 isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:4162-7.
334. Lauwers E et al. (2009) K63-linked ubiquitin chains as a specific signal for protein sorting into the multivesicular body pathway. *The Journal of cell biology* 185:493-502.
335. Clague MJ, Urbé S (2010) Ubiquitin: Same Molecule, Different Degradation Pathways. *Cell* 143:682-685.
336. Kirkin V et al. (2009) A role for ubiquitin in selective autophagy. *Molecular cell* 34:259-69.
337. Tauriello DVF, Maurice MM (2010) The various roles of ubiquitin in Wnt pathway regulation. *Cell cycle* 9:3700-9.
338. Laine A, Ronai Z (2005) Ubiquitin chains in the ladder of MAPK signaling. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2005:re5.
339. Muratani M, Tansey WP (2003) How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4:192-201.
340. Kinyamu HK et al. (2005) Linking the ubiquitin-proteasome pathway to chromatin remodeling/modification by nuclear receptors. *Journal of molecular endocrinology* 34:281-97.
341. Henry KW et al. (2003) Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes & development* 17:2648-63.
342. Weeda G et al. (1997) The XPB subunit of repair/transcription factor TFIIH directly interacts with SUG1, a subunit of the 26S proteasome and putative transcription factor. *Nucleic acids research* 25:2274-83.
343. Ferdous A et al. (2001) The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Molecular cell* 7:981-91.
344. Ferdous A et al. (2002) A nonproteolytic function of the 19S regulatory subunit of the 26S proteasome is required for efficient activated transcription by human RNA polymerase II. *Biochemistry* 41:12798-805.
345. Lee K-B et al. (2002) Transcription-coupled and DNA damage-dependent ubiquitination of RNA polymerase II in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:4239-44.

346. Wallace AD, Cidlowski JA (2001) Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *The Journal of biological chemistry* 276:42714-21.
347. Dennis AP, O'Malley BW (2005) Rush hour at the promoter: how the ubiquitin-proteasome pathway polices the traffic flow of nuclear receptor-dependent transcription. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 93:139-51.
348. DeFranco DB (1997) Subnuclear trafficking of steroid receptors. *Biochemical Society transactions* 25:592-7.
349. Stenoien DL et al. (2000) Subnuclear trafficking of estrogen receptor-alpha and steroid receptor coactivator-1. *Molecular endocrinology* 14:518-34.
350. Stuurman N et al. (1990) The nuclear matrix from cells of different origin. Evidence for a common set of matrix proteins. *The Journal of biological chemistry* 265:5460-5.
351. Pederson T (2000) Half a century of "the nuclear matrix". *Molecular biology of the cell* 11:799-805.
352. Stenoien DL et al. (2001) FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent. *Nature cell biology* 3:15-23.
353. Verma S et al. (2004) The Ubiquitin-Conjugating Enzyme UBCH7 Acts as a Coactivator for Steroid Hormone Receptors. *Society* 24:8716-8726.
354. Ramamoorthy S, Nawaz Z (2008) E6-associated protein (E6-AP) is a dual function coactivator of steroid hormone receptors. *Nuclear receptor signaling* 6:e006.
355. Lonard DM et al. (2000) The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Molecular cell* 5:939-48.
356. Reid G et al. (2003) Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Molecular cell* 11:695-707.
357. Zhang H et al. (2006) The catalytic subunit of the proteasome is engaged in the entire process of estrogen receptor-regulated transcription. *The EMBO journal* 25:4223-33.
358. Masuyama H, Hiramatsu Y (2004) Involvement of suppressor for Gal 1 in the ubiquitin/proteasome-mediated degradation of estrogen receptors. *The Journal of biological chemistry* 279:12020-6.
359. Nawaz Z et al. (1999) The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily. *Molecular and cellular biology* 19:1182-9.
360. Catoe HW, Nawaz Z (2011) E6-AP facilitates efficient transcription at estrogen responsive promoters through recruitment of chromatin modifiers. *Steroids*.
361. Ramamoorthy S et al. (2011) Overexpression of ligase defective E6-associated protein, E6-AP, results in mammary tumorigenesis. *Breast cancer research and treatment*.
362. Gao X et al. (2005) Decreased expression of e6-associated protein in breast and prostate carcinomas. *Endocrinology* 146:1707-12.

363. Marine J-C, Lozano G (2010) Mdm2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond. *Cell death and differentiation* 17:93-102.
364. Toledo F, Wahl GM (2006) Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nature reviews. Cancer* 6:909-23.
365. Saji S et al. (2001) MDM2 enhances the function of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 281:259-65.
366. Duong V et al. (2007) Differential regulation of estrogen receptor alpha turnover and transactivation by Mdm2 and stress-inducing agents. *Cancer research* 67:5513-21.
367. Brekman A et al. (2011) A p53-independent role of Mdm2 in estrogen-mediated activation of breast cancer cell proliferation. *Breast cancer research : BCR* 13:R3.
368. Starita LM, Parvin JD (2003) The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. *Current opinion in cell biology* 15:345-50.
369. Parvin JD (2004) Overview of history and progress in BRCA1 research: the first BRCA1 decade. *Cancer biology & therapy* 3:505-8.
370. Perou CM et al. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747-52.
371. Sorlie T et al. (2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:8418-23.
372. Rosen EM et al. (2003) BRCA1 gene in breast cancer. *Journal of cellular physiology* 196:19-41.
373. Hashizume R et al. (2001) The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *The Journal of biological chemistry* 276:14537-40.
374. Welsh PL et al. (2002) BRCA1 transcriptionally regulates genes involved in breast tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:7560-5.
375. Fan S et al. (2002) p300 Modulates the BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity. *Cancer research* 62:141-51.
376. Xu J et al. (2009) A novel mechanism whereby BRCA1 / 1a / 1b fine tunes the dynamic complex interplay between SUMO-dependent / independent activities of Ubc9 on E2-induced ER · activation / repression and degradation in breast cancer cells. *Cancer*:939-949.
377. Ma Y et al. (2010) BRCA1 regulates acetylation and ubiquitination of estrogen receptor-alpha. *Molecular endocrinology* 24:76-90.
378. Hockings JK et al. (2008) Involvement of a specificity proteins-binding element in regulation of basal and estrogen-induced transcription activity of the BRCA1 gene. *Breast cancer research* 10:R29.
379. Litwiniuk MM et al. (2008) Expression of estrogen receptor beta in the breast carcinoma of BRCA1 mutation carriers. *BMC cancer* 8:100.
380. Johnson ES (2004) Protein modification by SUMO. *Annual review of biochemistry* 73:355-82.



381. Zhao J (2007) Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cellular and molecular life sciences* 64:3017-33.
382. Rosonina E et al. (2010) SUMO functions in constitutive transcription and during activation of inducible genes in yeast. *Genes & development* 24:1242-52.
383. Ulrich HD, Davies AA (2009) In vivo detection and characterization of sumoylation targets in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in molecular biology* 497:81-103.
384. Miura K, Hasegawa PM (2010) Sumoylation and other ubiquitin-like post-translational modifications in plants. *Trends in cell biology* 20:223-32.
385. Saitoh H, Hinchey J (2000) Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *The Journal of biological chemistry* 275:6252-8.
386. Bohren KM et al. (2004) A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *The Journal of biological chemistry* 279:27233-8.
387. Guo D et al. (2004) A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nature genetics* 36:837-41.
388. Welchman RL et al. (2005) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6:599-609.
389. Herrmann J et al. (2007) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circulation research* 100:1276-91.
390. Kerscher O et al. (2006) Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annual review of cell and developmental biology* 22:159-80.
391. Azuma Y et al. (2001) Expression and regulation of the mammalian SUMO-1 E1 enzyme. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15:1825-7.
392. Desterro JM et al. (1997) Ubc9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS letters* 417:297-300.
393. Johnson ES, Blobel G (1997) Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *The Journal of biological chemistry* 272:26799-802.
394. Jackson PK (2001) A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes & development* 15:3053-8.
395. Kotaja N et al. (2002) PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Molecular and cellular biology* 22:5222-34.
396. Pichler A et al. (2002) The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108:109-20.
397. Kagey MH et al. (2003) The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* 113:127-37.
398. Potts PR, Yu H (2005) Human MMS21/NSE2 is a SUMO ligase required for DNA repair. *Molecular and cellular biology* 25:7021-32.
399. Mukhopadhyay D, Dasso M (2007) Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends in biochemical sciences* 32:286-95.

400. Mossesso E, Lima CD (2000) Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Molecular cell* 5:865-76.
401. Meulmeester E, Melchior F (2008) Cell biology : SUMO. *Nature* 452:709-11.
402. Wilkinson K a, Henley JM (2010) Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *The Biochemical journal* 428:133-45.
403. Rodriguez MS et al. (2001) SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *The Journal of biological chemistry* 276:12654-9.
404. Seeler J-S, Dejean A (2003) Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4:690-9.
405. Jang M-S et al. (2002) Modification of Daxx by small ubiquitin-related modifier-1. *Biochemical and biophysical research communications* 295:495-500.
406. Miyauchi Y et al. (2002) Sumoylation of Mdm2 by protein inhibitor of activated STAT (PIAS) and RanBP2 enzymes. *The Journal of biological chemistry* 277:50131-6.
407. Xue Y et al. (2006) SUMOsp: a web server for sumoylation site prediction. *Nucleic acids research* 34:W254-7.
408. Subramanian L et al. (2003) A synergy control motif within the attenuator domain of CCAAT/enhancer-binding protein alpha inhibits transcriptional synergy through its PIASy-enhanced modification by SUMO-1 or SUMO-3. *The Journal of biological chemistry* 278:9134-41.
409. Hietakangas V et al. (2006) PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:45-50.
410. Yang S-H et al. (2006) An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *The EMBO journal* 25:5083-93.
411. Sampson DA et al. (2001) The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *The Journal of biological chemistry* 276:21664-9.
412. Lin D et al. (2002) Identification of a substrate recognition site on Ubc9. *The Journal of biological chemistry* 277:21740-8.
413. Gareau JR, Lima CD (2010) The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11:861-71.
414. Geoffroy M-C, Hay RT (2009) An additional role for SUMO in ubiquitin-mediated proteolysis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10:564-8.
415. Tatham MH et al. (2001) Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *The Journal of biological chemistry* 276:35368-74.
416. Matic I et al. (2008) In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy. *Molecular & cellular proteomics* 7:132-44.

417. Pedrioli PGA et al. (2006) Automated identification of SUMOylation sites using mass spectrometry and SUMmOn pattern recognition software. *Nature methods* 3:533-9.
418. Yang M et al. (2006) Assembly of a polymeric chain of SUMO1 on human topoisomerase I in vitro. *The Journal of biological chemistry* 281:8264-74.
419. Owerbach D et al. (2005) A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochemical and biophysical research communications* 337:517-20.
420. Ouyang J et al. (2009) Regulation of transcription factor activity by SUMO modification. *Methods in molecular biology* 497:141-52.
421. Morris JR (2010) SUMO in the mammalian response to DNA damage. *Biochemical Society transactions* 38:92-7.
422. Pichler A, Melchior F (2002) Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic* 3:381-7.
423. Watts FZ (2007) The role of SUMO in chromosome segregation. *Chromosoma* 116:15-20.
424. Heun P (2007) SUMO organization of the nucleus. *Current opinion in cell biology* 19:350-5.
425. Bischof O, Dejean A (2007) SUMO is growing senescent. *Cell cycle* 6:677-81.
426. Andreou AM, Tavernarakis N (2009) SUMOylation and cell signalling. *Biotechnology journal* 4:1740-52.
427. Zheng G, Yang Y-C (2004) ZNF76, a novel transcriptional repressor targeting TATA-binding protein, is modulated by sumoylation. *The Journal of biological chemistry* 279:42410-21.
428. Girdwood D et al. (2003) P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Molecular cell* 11:1043-54.
429. Hecker C-M et al. (2006) Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *The Journal of biological chemistry* 281:16117-27.
430. Song J et al. (2004) Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:14373-8.
431. Geiss-Friedlander R, Melchior F (2007) Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8:947-56.
432. Baba D et al. (2005) Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. *Nature* 435:979-82.
433. Guo B et al. (2007) Signalling pathways and the regulation of SUMO modification. *Biochemical Society transactions* 35:1414-8.
434. Gill G (2005) Something about SUMO inhibits transcription. *Current opinion in genetics & development* 15:536-41.
435. Garcia-Dominguez M, Reyes JC (2009) SUMO association with repressor complexes, emerging routes for transcriptional control. *Biochimica et biophysica acta* 1789:451-9.

436. Chupreta S et al. (2005) A small conserved surface in SUMO is the critical structural determinant of its transcriptional inhibitory properties. *Molecular and cellular biology* 25:4272-82.
437. Yang S-H, Sharrocks AD (2004) SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Molecular cell* 13:611-7.
438. Kuo H-Y et al. (2005) SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of Daxx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:16973-8.
439. Soutoglou E et al. (2000) Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Molecular cell* 5:745-51.
440. Zheng G, Yang Y-C (2005) Sumoylation and acetylation play opposite roles in the transactivation of PLAG1 and PLAGL2. *The Journal of biological chemistry* 280:40773-81.
441. Abdel-Hafiz H et al. (2009) Mechanisms underlying the control of progesterone receptor transcriptional activity by SUMOylation. *The Journal of biological chemistry* 284:9099-108.
442. Imoto S et al. (2008) Sumoylation of Smad3 stimulates its nuclear export during PIASy-mediated suppression of TGF-beta signaling. *Biochemical and biophysical research communications* 370:359-65.
443. Lin X et al. (2003) Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Molecular cell* 11:1389-96.
444. Lallemand-Breitenbach V, Thé H (2010) PML nuclear bodies. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2:a000661.
445. Ross S et al. (2002) SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Molecular cell* 10:831-42.
446. Sachdev S et al. (2001) PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes & Development* 15:3088-3103.
447. Dobрева G et al. (2003) SUMO modification of a novel MAR-binding protein, SATB2, modulates immunoglobulin mu gene expression. *Genes & development* 17:3048-61.
448. Denuc A, Marfany G (2010) SUMO and ubiquitin paths converge. *Biochemical Society transactions* 38:34-9.
449. Tatham MH et al. (2008) RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nature cell biology* 10:538-46.
450. Van Hagen M et al. (2010) RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2alpha. *Nucleic acids research* 38:1922-31.
451. Lyst MJ, Stancheva I (2007) A role for SUMO modification in transcriptional repression and activation. *Biochemical Society transactions* 35:1389-92.
452. Chauchereau A et al. (2003) Sumoylation of the progesterone receptor and of the steroid receptor coactivator SRC-1. *The Journal of biological chemistry* 278:12335-43.

453. Stehmeier P, Muller S (2009) Regulation of p53 family members by the ubiquitin-like SUMO system. *DNA repair* 8:491-8.
454. Chang Y-L et al. (2007) Regulation of nuclear receptor and coactivator functions by the carboxyl terminus of ubiquitin-conjugating enzyme 9. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39:1035-46.
455. Kotaja N et al. (2002) The nuclear receptor interaction domain of GRIP1 is modulated by covalent attachment of SUMO-1. *The Journal of biological chemistry* 277:30283-8.
456. Wu H et al. (2006) Coordinated regulation of AIB1 transcriptional activity by sumoylation and phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 281:21848-56.
457. Mooney SM et al. (2010) Sumoylation of p68 and p72 RNA helicases affects protein stability and transactivation potential. *Biochemistry* 49:1-10.
458. David G et al. (2002) SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities. *The Journal of biological chemistry* 277:23658-63.
459. Kirsh O et al. (2002) The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *The EMBO journal* 21:2682-91.
460. Tiefenbach J et al. (2006) SUMOylation of the corepressor N-CoR modulates its capacity to repress transcription. *Molecular biology of the cell* 17:1643-51.
461. Rytinki MM, Palvimo JJ (2008) SUMOylation modulates the transcription repressor function of RIP140. *The Journal of biological chemistry* 283:11586-95.
462. Xu J et al. (2009) A novel mechanism whereby BRCA1/1a/1b fine tunes the dynamic complex interplay between SUMO-dependent/independent activities of Ubc9 on E2-induced ERalpha activation/repression and degradation in breast cancer cells. *International journal of oncology* 34:939-49.
463. Lin X et al. (2003) SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4. *The Journal of biological chemistry* 278:31043-8.
464. Kim KI, Baek SH (2009) Small ubiquitin-like modifiers in cellular malignancy and metastasis. *International review of cell and molecular biology* 273:265-311.
465. Sarge KD, Park-Sarge O-K (2011) SUMO and Its Role in Human Diseases. *International review of cell and molecular biology* 288:167-83.
466. Wilkinson KA et al. (2010) Targets and consequences of protein SUMOylation in neurons. *Brain research reviews* 64:195-212.
467. Bailey D, O'Hare P (2002) Herpes simplex virus 1 ICP0 co-localizes with a SUMO-specific protease. *J. Gen. Virol.* 83:2951-2964.
468. Wang J (2009) SUMO conjugation and cardiovascular development. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 14:1219-29.
469. Yan D et al. (2010) Emerging roles of SUMO modification in arthritis. *Gene* 466:1-15.
470. Gong L, Li DW-C (2010) SUMOylation in ocular development and pathology. *Current molecular medicine* 10:794-801.

471. Kim KI, Baek SH (2006) SUMOylation code in cancer development and metastasis. *Molecules and cells* 22:247-53.
472. Hoeller D, Dikic I (2009) Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature* 458:438-44.
473. Mo Y-Y et al. (2005) A role for Ubc9 in tumorigenesis. *Oncogene* 24:2677-83.
474. Duan X et al. (2009) Targeting the SUMO E2 conjugating enzyme Ubc9 interaction for anti-cancer drug design. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 9:51-4.
475. Mo Y-Y, Moschos SJ (2005) Targeting Ubc9 for cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets* 9:1203-16.
476. Hoeller D et al. (2006) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. *Nature reviews. Cancer* 6:776-88.
477. Chen T (2011) Mechanistic and functional links between histone methylation and DNA methylation. *Progress in molecular biology and translational science* 101:335-48.
478. Zhao C et al. (2003) Expression of estrogen receptor beta isoforms in normal breast epithelial cells and breast cancer: regulation by methylation. *Oncogene* 22:7600-6.
479. Suzuki F et al. (2008) Loss of estrogen receptor beta isoform expression and its correlation with aberrant DNA methylation of the 5'-untranslated region in human epithelial ovarian carcinoma. *Cancer science* 99:2365-72.
480. Lorenzo A Di, Bedford MT (2011) Histone arginine methylation. *FEBS letters* 585:2024-31.
481. Teyssier C et al. (2010) Protein arginine methylation in estrogen signaling and estrogen-related cancers. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 21:181-9.
482. Wang H et al. (2001) Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* 293:853-7.
483. Bauer U-M et al. (2002) Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation. *EMBO reports* 3:39-44.
484. Le Romancer M et al. (2010) Methylation, a key step for nongenomic estrogen signaling in breast tumors. *Steroids* 75:560-4.
485. Singh BN et al. (2010) Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets. *Expert review of anticancer therapy* 10:935-54.
486. Whittle JR et al. (2007) Sirtuins, nuclear hormone receptor acetylation and transcriptional regulation. *Trends in endocrinology and metabolism* 18:356-64.
487. Margueron R et al. (2004) Histone deacetylase inhibition and estrogen signalling in human breast cancer cells. *Biochemical pharmacology* 68:1239-46.
488. Duong V et al. (2006) ERalpha and ERbeta expression and transcriptional activity are differentially regulated by HDAC inhibitors. *Oncogene* 25:1799-806.
489. Acconcia F et al. (2005) Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Molecular biology of the cell* 16:231-7.
490. Zachara NE, Hart GW (2006) Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochimica et biophysica acta* 1761:599-617.
491. Chen GG et al. (2008) Estrogen and its receptors in cancer. *Medicinal research reviews* 28:954-74.

492. Fernandez E et al. (2003) Hormone replacement therapy and cancer risk: a systematic analysis from a network of case-control studies. *International journal of cancer*. 105:408-12.
493. Mourits MJE, Bock GH DE (2006) Exogenous steroids for menopausal symptoms and breast/endometrial cancer risk. *International journal of gynecological cancer* 16 Suppl 2:494-6.
494. Schabath MB et al. (2004) Hormone replacement therapy and lung cancer risk: a case-control analysis. *Clinical cancer research* 10:113-23.
495. Bogush TA et al. (2010) Estrogen receptors, antiestrogens, and non-small cell lung cancer. *Biochemistry*. 75:1421-7.
496. Kumar A et al. (2010) Estradiol-induced proliferation of papillary and follicular thyroid cancer cells is mediated by estrogen receptors alpha and beta. *International journal of oncology* 36:1067-80.
497. Bardin A et al. (2004) Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocrine-related cancer* 11:537-51.
498. Treeck O et al. (2010) Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells. *Breast cancer research and treatment* 120:557-65.
499. Shaw JA et al. (2002) Oestrogen receptors alpha and beta differ in normal human breast and breast carcinomas. *The Journal of pathology* 198:450-7.
500. Borgquist S et al. (2008) Oestrogen receptors alpha and beta show different associations to clinicopathological parameters and their co-expression might predict a better response to endocrine treatment in breast cancer. *Journal of clinical pathology* 61:197-203.
501. Paruthiyil S et al. (2010) Estrogen receptor  $\beta$  causes a G2 cell cycle arrest by inhibiting CDK1 activity through the regulation of cyclin B1, GADD45A, and BTG2. *Breast cancer research and treatment* 129:777-84
502. Ström A et al. (2004) Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:1566-71.
503. Williams C et al. (2008) A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells. *Oncogene* 27:1019-32.
504. Miyoshi Y et al. (2010) Mechanisms of estrogen receptor- $\alpha$  upregulation in breast cancers. *Medical molecular morphology* 43:193-6.
505. Cunat S et al. (2004) Estrogens and epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 94:25-32.
506. Bardin A et al. (2004) Involvement of estrogen receptor beta in ovarian carcinogenesis. *Cancer research* 64:5861-9.
507. Lazennec G (2006) Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer letters* 231:151-7.
508. Martineti V et al. (2005) ERbeta is a potent inhibitor of cell proliferation in the HCT8 human colon cancer cell line through regulation of cell cycle components. *Endocrine-related cancer* 12:455-69.

509. Cortez V et al. (2010) Extranuclear signaling by estrogen: role in breast cancer progression and metastasis. *Minerva ginecologica* 62:573-83.
510. Marino M et al. (2003) Biphasic estradiol-induced AKT phosphorylation is modulated by PTEN via MAP kinase in HepG2 cells. *Molecular biology of the cell* 14:2583-91.
511. Lee Y-R et al. (2005) Up-regulation of PI3K/Akt signaling by 17beta-estradiol through activation of estrogen receptor-alpha, but not estrogen receptor-beta, and stimulates cell growth in breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 336:1221-6.
512. Migliaccio A et al. (2000) Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *The EMBO journal* 19:5406-17.
513. Skliris GP et al. (2008) Estrogen receptor alpha negative breast cancer patients: estrogen receptor beta as a therapeutic target. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 109:1-10.
514. Taylor SE et al. (2010) Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease. *Cancer letters* 288:133-48.
515. Hirata S et al. (2003) Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *Trends in endocrinology and metabolism* 14:124-9.
516. Wang Z et al. (2005) Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. *Biochemical and biophysical research communications* 336:1023-7.
517. Flouriot G et al. (2000) Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *The EMBO journal* 19:4688-700.
518. Wang Z et al. (2006) A variant of estrogen receptor-alpha, hER-alpha36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:9063-8.
519. Zhang XT et al. (2011) A positive feedback loop of ER- $\alpha$ 36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. *Oncogene* 30:770-80.
520. Shi L et al. (2009) Expression of ER- $\alpha$ 36, a novel variant of estrogen receptor  $\alpha$ , and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27:3423-9.
521. Jiang H et al. (2008) Transcriptional analysis of estrogen receptor alpha variant mRNAs in colorectal cancers and their matched normal colorectal tissues. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 112:20-4.
522. Denger S et al. (2001) ERalpha gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins. *Molecular endocrinology* 15:2064-77.
523. Penot G et al. (2005) The human estrogen receptor-alpha isoform hERalpha46 antagonizes the proliferative influence of hERalpha66 in MCF7 breast cancer cells. *Endocrinology* 146:5474-84.



524. Klinge CM et al. (2010) Estrogen receptor alpha 46 is reduced in tamoxifen resistant breast cancer cells and re-expression inhibits cell proliferation and estrogen receptor alpha 66-regulated target gene transcription. *Molecular and cellular endocrinology* 323:268-76.
525. Murphy AJ et al. (2009) Estradiol regulates expression of estrogen receptor ERalpha46 in human macrophages. *PloS one* 4:e5539.
526. Li L et al. (2003) Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:4807-12.
527. Zhao C et al. (2008) Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nuclear receptor signaling* 6:e003.
528. Leung Y-kin et al. (2006) Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: A key to understanding ER-beta signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(35):13162-7.
529. Poola I et al. (2005) Estrogen receptors beta4 and beta5 are full length functionally distinct ERbeta isoforms: cloning from human ovary and functional characterization. *Endocrine* 27:227-38.
530. Ogawa S et al. (1998) Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic acids research* 26:3505-12.
531. Zhao C et al. (2007) Estrogen receptor beta2 negatively regulates the transactivation of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells. *Cancer research* 67:3955-62.
532. Davies MPA et al. (2004) Correlation of mRNA for oestrogen receptor beta splice variants ERbeta1, ERbeta2/ERbetacx and ERbeta5 with outcome in endocrine-treated breast cancer. *Journal of molecular endocrinology* 33:773-82.
533. Skliris GP et al. (2006) Expression of oestrogen receptor-beta in oestrogen receptor-alpha negative human breast tumours. *British journal of cancer* 95:616-26.
534. Moore JT et al. (1998) Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochemical and biophysical research communications* 247:75-8.
535. Musgrove EA, Sutherland RL (2009) Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nature reviews. Cancer* 9:631-43.
536. Gunther JR et al. (2008) Amphipathic benzenes are designed inhibitors of the estrogen receptor alpha/steroid receptor coactivator interaction. *ACS chemical biology* 3:282-6.
537. Parent AA et al. (2008) Blocking estrogen signaling after the hormone: pyrimidine-core inhibitors of estrogen receptor-coactivator binding. *Journal of medicinal chemistry* 51:6512-30.
538. Wang LH et al. (2006) Disruption of estrogen receptor DNA-binding domain and related intramolecular communication restores tamoxifen sensitivity in resistant breast cancer. *Cancer cell* 10:487-99.
539. Mao C et al. (2008) A new small molecule inhibitor of estrogen receptor alpha binding to estrogen response elements blocks estrogen-dependent growth of cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 283:12819-30.

540. Swedenborg E et al. (2010) Endocrine disruptors targeting ERbeta function. *International journal of andrology* 33:288-97.
541. Mohler ML et al. (2010) Estrogen receptor beta selective nonsteroidal estrogens: seeking clinical indications. *Expert opinion on therapeutic patents* 20:507-34.
542. Shanle EK, Xu W (2010) Selectively targeting estrogen receptors for cancer treatment. *Advanced drug delivery reviews* 62:1265-76.
543. Gee JMW et al. (2003) The antiepidermal growth factor receptor agent gefitinib (ZD1839/Iressa) improves antihormone response and prevents development of resistance in breast cancer in vitro. *Endocrinology* 144:5105-17.
544. Arpino G et al. (2007) Treatment of human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer xenografts with multiagent HER-targeted therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 99:694-705.
545. Scholten D et al. (2011) Pharmacological Modulation of Chemokine Receptor Function. *British journal of pharmacology* [Epub ahead of print]
546. Smith IE, Dowsett M (2003) Aromatase inhibitors in breast cancer. *The New England journal of medicine* 348:2431-42.
547. Mueller SO, Korach KS (2001) Estrogen receptors and endocrine diseases: lessons from estrogen receptor knockout mice. *Current opinion in pharmacology* 1:613-9.
548. Baraka AM et al. (2011) The possible role of estrogen and selective estrogen receptor modulators in a rat model of Parkinson's disease. *Life sciences* 88:879-85.
549. Nagy L, Schwabe JWR (2004) Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends in biochemical sciences* 29:317-24.
550. Lavinsky RM et al. (1998) Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:2920-5.
551. Jackson TA et al. (1997) The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Molecular endocrinology* 11:693-705.
552. Smith CL, O'Malley BW (2004) Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocrine reviews* 25:45-71.
553. McDonnell DP (2002) Definition of the Molecular and Cellular Mechanisms Underlying the Tissue-selective Agonist/Antagonist Activities of Selective Estrogen Receptor Modulators. *Recent Progress in Hormone Research* 57:295-316.
554. Shang Y, Brown M (2002) Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 295:2465-8.
555. Swaby RF et al. (2007) SERMs for the treatment and prevention of breast cancer. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 8:229-39.
556. Johnston SR et al. (1999) Increased activator protein-1 DNA binding and c-Jun NH2-terminal kinase activity in human breast tumors with acquired tamoxifen resistance. *Clinical cancer research* 5:251-6.
557. Schiff R et al. (2000) Oxidative stress and AP-1 activity in tamoxifen-resistant breast tumors in vivo. *Journal of the National Cancer Institute* 92:1926-34.
558. Zhou Y et al. (2007) Enhanced NF kappa B and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer. *BMC cancer* 7:59.

559. Weber Lozada K, Keri RA (2011) Bisphenol A Increases Mammary Cancer Risk in Two Distinct Mouse Models of Breast Cancer. *Biology of reproduction* 85:490-7
560. Yang M et al. (2009) Effects of bisphenol A on breast cancer and its risk factors. *Archives of toxicology* 83:281-5.
561. Dong S et al. (2011) Bisphenol A induces a rapid activation of Erk1/2 through GPR30 in human breast cancer cells. *Environmental pollution* 159:212-8.
562. Cho YA et al. (2010) Effect of dietary soy intake on breast cancer risk according to menopause and hormone receptor status. *European journal of clinical nutrition* 64:924-32.
563. Kang X et al. (2010) Effect of soy isoflavones on breast cancer recurrence and death for patients receiving adjuvant endocrine therapy. *Canadian Medical Association journal* 182:1857-62.
564. Kousidou OC et al. (2006) Effects of the natural isoflavonoid genistein on growth, signaling pathways and gene expression of matrix macromolecules by breast cancer cells. *Mini reviews in medicinal chemistry* 6:331-7.
565. Sakla MS et al. (2007) Genistein affects HER2 protein concentration, activation, and promoter regulation in BT-474 human breast cancer cells. *Endocrine* 32:69-78.
566. Peng J-H et al. (2010) Prepubertal genistein exposure affects erbB2/Akt signal and reduces rat mammary tumorigenesis. *European journal of cancer prevention* 19:110-9.
567. Mai Z et al. (2007) Genistein sensitizes inhibitory effect of tamoxifen on the growth of estrogen receptor-positive and HER2-overexpressing human breast cancer cells. *Molecular carcinogenesis* 46:534-42.
568. Wittmann BM et al. (2007) Definition of functionally important mechanistic differences among selective estrogen receptor down-regulators. *Cancer research* 67:9549-60.
569. Carlson RW (2005) The history and mechanism of action of fulvestrant. *Clinical breast cancer* 6 Suppl 1:S5-8.
570. Peekhaus NT et al. (2004) Distinct effects of the antiestrogen Faslodex on the stability of estrogen receptors-alpha and -beta in the breast cancer cell line MCF-7. *Journal of molecular endocrinology* 32:987-95.
571. Bross PF (2002) FDA Drug Approval Summaries: Fulvestrant. *The Oncologist* 7:477-480.
572. Kleuser B et al. (2008) 17-Beta-estradiol inhibits transforming growth factor-beta signaling and function in breast cancer cells via activation of extracellular signal-regulated kinase through the G protein-coupled receptor 30. *Molecular pharmacology* 74:1533-43.
573. Kraichely DM et al. (2000) Conformational changes and coactivator recruitment by novel ligands for estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta: correlations with biological character and distinct differences among SRC coactivator family members. *Endocrinology* 141:3534-45.
574. Harris HA et al. (2003) Evaluation of an estrogen receptor-beta agonist in animal models of human disease. *Endocrinology* 144:4241-9.

575. Harris HA et al. (2005) A selective estrogen receptor-beta agonist causes lesion regression in an experimentally induced model of endometriosis. *Human reproduction* 20:936-41.
576. Cvoro A et al. (2007) Selective activation of estrogen receptor-beta transcriptional pathways by an herbal extract. *Endocrinology* 148:538-47.
577. Mersereau JE et al. (2008) Liquiritigenin is a plant-derived highly selective estrogen receptor beta agonist. *Molecular and cellular endocrinology* 283:49-57.
578. Stovall DW, Pinkerton JV (2009) MF-101, an estrogen receptor beta agonist for the treatment of vasomotor symptoms in peri- and postmenopausal women. *Current opinion in investigational drugs* 10:365-71.
579. Grady D et al. (2009) MF101, a selective estrogen receptor beta modulator for the treatment of menopausal hot flashes: a phase II clinical trial. *Menopause* 16:458-65.
580. Wang LH et al. (2004) Suppression of breast cancer by chemical modulation of vulnerable zinc fingers in estrogen receptor. *Nature medicine* 10:40-7.
581. Rodriguez AL et al. (2004) Design, synthesis, and in vitro biological evaluation of small molecule inhibitors of estrogen receptor alpha coactivator binding. *Journal of medicinal chemistry* 47:600-11.
582. Yager JD, Davidson NE (2006) Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *The New England journal of medicine* 354:270-82.
583. Howell A et al. (2005) Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 365:60-2.
584. Jakesz R et al. (2005) Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. *Lancet* 366:455-62.
585. Gligorov J et al. (2007) Adjuvant and extended adjuvant use of aromatase inhibitors: reducing the risk of recurrence and distant metastasis. *Breast* 16 Suppl 3:S1-9.
586. Dalenc F et al. (2005) Farnesyl-transferase inhibitor R115,777 enhances tamoxifen inhibition of MCF-7 cell growth through estrogen receptor dependent and independent pathways. *Breast cancer research* 7:R1159-67.
587. Jerusalem G et al. [Targeted therapies in breast cancer]. *Revue médicale de Liège* 66:379-84.
588. Kannaiyan R et al. (2011) Celastrol inhibits tumor cell proliferation and promotes apoptosis through the activation of c-Jun N-terminal kinase and suppression of PI3 K/Akt signaling pathways. *Apoptosis* 16:1028-41
589. Ishii Y et al. (2011) Bortezomib enhances the efficacy of fulvestrant by amplifying the aggregation of the estrogen receptor, which leads to a proapoptotic unfolded protein response. *Clinical cancer research* 17:2292-300.
590. Bernier-Villamor V et al. (2002) Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* 108:345-56.
591. Mohideen F et al. (2009) A molecular basis for phosphorylation-dependent SUMO conjugation by the E2 UBC9. *Nature structural & molecular biology* 16:945-52.

592. Doble BW (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of Cell Science* 116:1175-1186.
593. Hartz AMS et al. (2010) Estrogen Receptor beta Signaling through Phosphatase and Tensin Homolog / Phosphoinositide 3-Kinase / Akt / Glycogen Synthase Kinase 3 Down-Regulates Blood-Brain Barrier Breast Cancer Resistance Protein. *Cancer* 334:467-476.
594. Williams CC et al. (2009) Identification of four novel phosphorylation sites in estrogen receptor alpha: impact on receptor-dependent gene expression and phosphorylation by protein kinase CK2. *BMC biochemistry* 10:36.
595. Arnold SF et al. (1995) Phosphorylation of the human estrogen receptor by mitogen-activated protein kinase and casein kinase II: consequence on DNA binding. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 55:163-72.
596. Tzeng DZ, Klinge CM (1996) Phosphorylation of purified estradiol-liganded estrogen receptor by casein kinase II increases estrogen response element binding but does not alter ligand stability. *Biochemical and biophysical research communications* 223:554-60.
597. Schmidt D, Müller S (2003) PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation. *Cellular and molecular life sciences* 60:2561-74.
598. Zhong S et al. (2000) The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nature cell biology* 2(5):E85-90.
599. Bose S et al. (2006) The Akt pathway in human breast cancer: a tissue-array-based analysis. *Modern pathology* 19:238-45.
600. Tokunaga E et al. (2006) Activation of PI3K/Akt signaling and hormone resistance in breast cancer. *Breast cancer* 13:137-44.
601. Ding Q et al. (2007) Myeloid cell leukemia-1 inversely correlates with glycogen synthase kinase-3beta activity and associates with poor prognosis in human breast cancer. *Cancer research* 67:4564-71.
602. Kajiro M et al. (2009) The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. *Nature cell biology* 11:312-319
603. Barford D (2011) Structure, function and mechanism of the anaphase promoting complex (APC/C). *Quarterly reviews of biophysics* 44:153-90.
604. Hoegge, C et al.(2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419:135-141.
605. Tang F et al. (2011) RNF185, a novel mitochondrial ubiquitin E3 ligase, regulates autophagy through interaction with BNIP1. *Plos One* 6:e24367.
606. Cheng X and Blumenthal RM. (2010) Coordinated chromatin control: structural and functional linkage of DNA and histone methylation. *Biochemistry* 49:2999-3008.
607. Sotelis A. et al. (2011) H3K27 demethylation by JMJD3 at a poised enhancer of anti-apoptotic gene BCL2 determines ER $\alpha$  ligand dependency. *The EMBO journal* 30:3947-61.
608. Subramanian K et al. (2008) Regulation of estrogen receptor alpha by the SET7 lysine methyltransferase. *Molecular cell* 9:336-47.