

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

Régulation et rôle de la ligase de l'ubiquitine Itch dans la  
signalisation cellulaire

Bilal Ahmad Azakir

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et de sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales en vue  
de l'obtention du grade de PhD en sciences biologiques

Juillet 2008

© Bilal Ahmad Azakir, 2008



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:  
Régulation et rôle de la ligase de l'ubiquitine Itch dans la  
signalisation cellulaire

présentée par:  
Bilal Ahmad Azakir

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

**Michel Anctil, PhD**  
President-rapporteur

**Annie Angers, PhD**  
Directrice

**Muriel Aubry, PhD**  
Membre de jury

**Valerie Légendre-Guillemain, PhD**  
Examinatrice externe

**Marc Drolet, PhD**  
Représentant du doyen

## Résumé général:

Itch est une ligase de l'ubiquitine de la famille des HECT dont plusieurs substrats ont été identifiés, comme l'endophiline et Cbl. Itch est impliqué dans le système immunitaire, l'internalisation des récepteurs membranaires, la régulation de la signalisation cellulaire et l'apoptose. Itch est aussi régulé par phosphorylation, qui peut moduler son activité ainsi que ses interactions. Les voies de signalisation activées par la stimulation des récepteurs de l'EGF sont diversifiées et leur effet <sup>peuvent</sup> peut aller de la prolifération à l'apoptose, selon les facteurs de transcription activés. L'internalisation des EGFR est un mécanisme important pour réguler leur signalisation. Une dérégulation de leur internalisation cause une signalisation non contrôlable et par conséquent un développement anormal des cellules. EGFR est internalisé par l'endocytose dépendante de la clathrine et nécessite l'intervention de plusieurs protéines endocytiques, notamment endophiline et Cbl. Cbl ubiquityle l'EGFR et initialise son internalisation alors que l'endophiline joue un rôle dans la formation de la vésicule à la membrane. Précédemment, notre laboratoire a montré que l'endophiline est transloquée vers les endosomes et est ubiquitylée en réponse à l'EGF.

Pour mieux comprendre la régulation de Itch par la signalisation cellulaire, nous avons commencé par comprendre comment Itch est régulé in vivo. Nous avons montré que Itch s'autoubiquityle et se dégrade dans les protéasomes. Cependant cette ubiquitylation est renversée par son interaction avec la protéase FAM qui appartient à la classe des protéases de l'ubiquitine et qui permet d'hydrolyser les ubiquitines fixées sur le substrat. FAM interagit avec Itch par ses domaines WW et stabilise son niveau intracellulaire en le

désubiquitylant. La signalisation cellulaire régule l'interaction entre Itch et FAM. En effet, La phosphorylation de Itch par JNK cause un blocage complet de son interaction avec FAM. La conséquence de cette phosphorylation a été développée davantage lorsque nous avons examiné le rôle de la stimulation de l'EGF sur l'activité de Itch.

Dans cette voie, le traitement des cellules avec l'EGF cause le recrutement de Cbl et de l'endophiline qui induisent l'internalisation des EGFR vers les endosomes. Nous avons montré que le traitement des cellules HEK-293T avec l'EGF recombinant active JNK qui à son tour phosphoryle Itch sur un résidu thréonine et deux résidus sérine dans son domaine PRD. Cette phosphorylation a deux effets sur Itch : elle augmente son activité catalytique en augmentant l'ubiquitylation de ses substrats, spécifiquement endophiline et Cbl, et elle module ses interactions. La phosphorylation de Itch augmente son interaction avec Cbl et endophiline, mais diminue momentanément son interaction avec FAM. L'ubiquitylation de Cbl et endophiline est suffisante pour causer leur dégradation dans les protéasomes alors que Itch est sauvé par sa désubiquitylation par FAM/USP9X. La diminution des expressions endogènes de l'endophiline et de Cbl cause une expression plus forte des récepteurs sur la surface plasmique et par conséquent module la signalisation cellulaire induite par l'EGF. Itch augmente indirectement le niveau des EGFR à la surface plasmique et favorise la voie de l'Akt activée au niveau de la membrane plasmique sur la voie de JNK activée au niveau des endosomes.

Nous avons ensuite identifié un nouveau substrat de Itch, tBID. tBID est une protéine proapoptotique appartenant à la famille des Bcl-2 ayant un domaine homologue à BH3. La caspase 8, activée en réponse à un stimulus apoptotique, peut cliver BID pour libérer le

tBID. tBID est alors transloquée vers la mitochondrie et interagit préférentiellement avec la cardiolipine sur la membrane mitochondriale et induit l'oligomérisation de Bax et Bak, les deux membres apoptotiques de Bcl-2, augmentant la perméabilité membranaire mitochondriale et induisant le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme, l'activation des caspases 3 et l'apoptose.

Itch est capable d'interagir avec tBID mais pas avec la forme complète de la protéine, BID. Cette interaction résulte en l'ubiquitylation de tBID et sa dégradation dans les protéasomes. Nous avons montré que Itch protège les cellules contre l'apoptose induite par TRAIL en bloquant l'activation des caspases 3 activées par tBID et que l'EGF cause une inhibition plus significative des caspases par l'augmentation de l'activité de Itch.

**Mots clés :** Itch, ubiquitylation, EGFR, endophiline, Cbl, Akt, JNK, endocytose, phosphorylation, tBID, apoptose.

## Summary

Itch is a HECT domain ubiquitin ligase for which multiple substrates have been identified like endophilin and Cbl. Itch is implicated in the regulation of the immune system, receptor internalisation, cell signalling regulation and apoptosis. Itch is regulated by phosphorylation which modulates its activity and substrates recognition. Multiple pathways are activated by EGFR stimulation and these pathways may cause cell proliferation, differentiation or even apoptosis depending on the activated transcription factors. EGFR internalisation is a very important mechanism to regulate its signalisation. Disturbing EGFR internalisation results in a non controllable signalisation which may contribute to anormal developpement of the cells. EGFR is internalized via clathrin-dependent endocytosis, which involve different endocytic proteins like endophilin and Cbl. Cbl promotes receptor ubiquitylation and endophilin plays a role in vesicle formation. Our laboratory previously showed that endophilin is translocated to the endosomes and is ubiquitylated after treatment with EGF.

To better understand the regulation of Itch, we investigated new binding partners of Itch and identified the ubiquitin protéase FAM. We showed that Itch is autoubiquitylated and degraded in the proteasomes. However, this ubiquitylation is reversed by FAM, which hydrolyse the ubqiquitin linked to substrate proteins. FAM interacts with Itch via its WW domains, resulting in Itch desubiquitylation and increased stability. We showed that this interaction is regulated by cell signalling. In fact, JNK mediated Itch phosphorylation blocks its interaction with FAM. The consequence of this phosphorylation was further investigated when we examined the consequences of EGFR stimulation on Itch activity.

In this pathway, cells treatment with EGF results in the recruitment of Cbl and endophilin known to induce EGFR internalisation to the endosomes. We showed that the treatment of HEK-293T cells activates JNK which in turn phosphorylates Itch on two serine and one threonine residues in the PRD domain. This phosphorylation leads to increased Itch activity and increased ubiquitylation of its substrates, specifically endophilin and Cbl, and also modulates Itch interactions. It increased its interaction with Cbl and endophilin but momentarily decreased its interaction with FAM.

Decreasing endophilin and Cbl expressions may cause an increasing of EGFR level on the plasma surface and favour the Akt pathway activated at the plasma membrane over the JNK pathway activated at the endosomes.

We then identified tBID as a substrate for Itch. tBID is a proapoptotic protein member of the Bcl-2 family containing a single BH3 homology domain. Caspase 8, activated in response to apoptotic stimuli, causes the cleavage of BID to tBID which is translocated to the mitochondria and interacts preferentially with cardiolipin and induce the oligomerization of Bax and Bak, two members of Bcl-2 family, increasing the permeability of the mitochondria membrane and the release of cytochrome *c* to the cytosol which activates caspase 3 inducing apoptosis.

Itch is able to interact with tBID but not BID. This interaction results in tBID ubiquitylation and proteasomal degradation. Itch induces cell survival and inhibits caspase 3 activation by inducing tBID degradation. We showed that Itch protects cells from TRAIL induced apoptosis by blocking caspase 3 activation induced by tBID. EGF causes a more significant inhibition of caspase 3 by increasing Itch activity.



**Keywords:** Itch, ubiquityation, EGFR, endophilin, Cbl, Akt, JNK, endocytosis, phosphorylation, tBID, apoptosis.

## Tables des matières

<b>1. CHAPITRE 1.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 La ligase de l'ubiquitine Itch.....	4
1.1.1 La famille Nedd4/Usp5p .....	4
1.1.2 Structure.....	5
1.1.3 Ligases appartenant à la famille.....	7
1.1.4 Régulation des ligases de type HECT.....	8
1.1.4.1 Localisation cellulaire.....	8
1.1.4.2 Phosphorylation des substrats .....	9
1.1.4.3 Protéases de l'ubiquitine.....	10
1.1.5 Quelques substrats de Itch.....	11
1.1.6 Itch dans le système immunitaire.....	12
1.1.7 Régulation des récepteurs par Itch .....	14
1.1.8 Itch et l'endocytose .....	15
1.2 L'ubiquitylation .....	17
1.2.1 Réaction d'ubiquitylation .....	21
1.2.2 Différents types de ligases de l'ubiquitine .....	25
1.2.2.1 Régulation par phosphorylation.....	26
1.2.3 Désubiquitylation.....	28
1.2.3.1 Les protéases de l'ubiquitine.....	28
1.2.3.2 Rôles fonctionnels des protéases de l'ubiquitine .....	30
1.2.3.3 Le désassemblage des chaînes de polyubiquitine .....	31
1.3 Endocytose .....	32
1.3.1 Internalisation des protéines membranaires .....	32
1.3.2 Endocytose dépendante de la clathrine .....	33
1.3.3 Compartiments endocytiques.....	37
1.3.4 Influence de l'ubiquitylation sur l'endocytose.....	39
1.4 Les récepteurs tyrosine kinase.....	42
1.4.1 Activation des récepteurs par leurs ligands.....	42
1.4.2 Le récepteur du facteur de croissance épidermique.....	43
1.4.2.1 Principales voies de signalisation.....	44
1.4.2.2 Régulation par l'internalisation .....	52
1.4.2.3 Trafic intracellulaire des récepteurs.....	52
1.5 Apoptose.....	57
1.5.1 Voies apoptotiques.....	57
1.5.2 Régulation des protéines apoptotiques par ubiquitylation.....	59
1.5.3 La protéine proapoptotique BID .....	63
1.6 Objectifs .....	66
<b>2. Chapitre 2 .....</b>	<b>68</b>
<b>The Ubiquitin Ligase Itch is Auto-ubiquitylated In Vivo and In Vitro But Is Protected From Degradation By Interacting With The Deubiquitylating Enzyme FAM/USP9X.....</b>	<b>68</b>
2.1 Résumé.....	70
2.2 Abstract.....	71
2.3 Introduction .....	72
2.4 Experimental procédures.....	74
2.4.1 cDNA constructs and mutagenesis .....	74
2.4.2 Antibodies.....	76
2.4.3 Immunofluorescence analysis .....	76
2.4.4 Immunoprecipitation and pull-down assays.....	76

2.4.5 In vitro ubiquitylation assays.....	77
2.5 RESULTS .....	78
2.5.1 Identification of FAM/USP9X as a novel Itch interacting Partner.....	78
2.5.2 FAM/USP9X directly forms complexes with Itch .....	79
2.5.3 FAM/USP9X interacts with Itch through the WW domain.....	81
2.5.4 FAM/USP9X can deubiquitylate Itch .....	82
2.5.5 Itch is autoubiquitylated and degraded in the proteasome.....	83
2.5.6 Comparison of Itch and FAM/USP9X expression in various rat tissue extracts and cell lines.....	85
2.5.7 Interference with FAM function significantly affects intracellular levels of endogenous Itch.....	85
2.6 DISCUSSION.....	87
2.7 REFERENCES .....	91
2.8 FOOTNOTES .....	95
2.9 FIGURES.....	96
<b>3. CHAPITRE 3.....</b>	<b>110</b>
<b>Reciprocal regulation of the ubiquitin ligase Itch and the epidermal growth factor receptor signaling.....</b>	<b>110</b>
3.1 Résumé .....	112
3.2 Abstract :.....	113
3.3 Introduction .....	114
3.4 MATERIALS AND METHODS.....	115
3.4.1 Plasmids .....	115
3.4.2 Antibodies.....	116
3.4.4 Itch phosphorylation assay .....	116
3.4.5 Cell treatment and Immunoprecipitation.....	117
3.4.6 Quantitative analysis .....	117
3.5 RESULTS .....	118
3.5.1 Itch substrates are ubiquitylated following treatment with EGF.....	118
3.5.2 EGF induces degradation of Itch substrates .....	119
3.5.3 Itch activity is required for EGF-induced Endophilin degradation .....	120
3.5.4 Itch is protected from degradation by the protease FAM.....	121
3.5.5 EGF treatment activates JNK and Itch .....	121
3.5.6 JNK activity is necessary for EGF-induced ubiquitylation of Itch substrates.....	123
3.5.7 Modulation of substrate interactions .....	124
3.6 DISCUSSION.....	127
3.7 ACKNOWLEDGMENT .....	131
3.8 REFERENCES .....	132
3.9 FIGURES.....	137
<b>4. CHAPITRE 4.....</b>	<b>155</b>
<b>The ubiquitin ligase Itch plays an anti-apoptotic role by promoting tBID ubiquitylation and proteasomal degradation .....</b>	<b>155</b>
4.1 Résumé .....	157
4.2 Abstract.....	158
4.3 Introduction .....	159
4.4 Results.....	162
4.4.1 Itch interacts with tBID.....	162
4.4.2 tBID is a substrate of Itch.....	163
4.4.3 Itch levels influence cell survival.....	163
4.4.4 Itch protects cells from tBID induced apoptosis.....	164
4.4.5 Itch protects cells from TRAIL-induced apoptosis .....	165
4.4.6 EGF treatment activates Itch and increases tBID ubiquitylation and degradation .....	165
4.4.7 The anti-apoptotic effect of EGF stimulation depends in part on the function of Itch.....	167
4.5 Discusion .....	168

4.6 Materials and Methods .....	170
4.6.1 Plasmids, antibodies and Reagents .....	170
4.6.2 Immunoprecipitation and ubiquitylation assays .....	171
4.6.3 Cell survival assay .....	172
4.6.4 Measurement of caspase 3 activity .....	172
4.6.5 BRET analysis .....	<b>173</b>
4.6.6 Statistical analysis .....	<b>173</b>
4.7 Acknowledgment .....	173
4.8 REFERENCES .....	175
4.9 FIGURE LEGENDS .....	181
<b>5. CHAPITRE 5.....</b>	<b>193</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>193</b>
<b>6. Références.....</b>	<b>206</b>

## Liste des figures

- FIGURE 1-1 : LES DIFFERENTS DOMAINES DE ITCH. ITCH POSSEDE UN DOMAINE CATALYTIQUE HECT, 4 DOMAINES D'INTERACTION WW, UN DOMAINE RICHE EN PROLINE (PRD) ET UN DOMAINE C2.....6
- FIGURE 1-2 : LA RÉACTION D'UBIQUITYLATION NÉCESSITE L'ACTION DE 3 TYPES D'ENZYMES, APPELÉES E1, E2 ET E3. E1 (UBIQUITIN-ACTIVATING ENZYME) ACTIVE L'UBIQUITINE EN FORMANT AVEC ELLE UN THIOL-ESTER, ET LA TRANSMET À E2 (UBIQUITIN-CARRIER PROTEIN), QUI ÉGALEMENT FIXE L'UB PAR UN THIOL-ESTER. E2 ENSUITE, SOIT PAR L'INTERMÉDIAIRE DE E3 (UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE), SOIT AVEC E3, TRANSFERT L'UB SUR LE SUBSTRAT (HERSHKO ET CIECHANOVER, , 1998) .....24
- FIGURE 1-3 : MÉCANISME DE L'ENDOCYTOSE DÉPENDANTE DE LA CLATHRINE. L'ENDOCYTOSE COMMENCE PAR LE RECRUTEMENT DE L'ADAPTATEUR AP-2 (1) PUIS L'ASSEMBLAGE DE LA CLATHRINE POUR FORMER UN PUIITS (2). APRÈS, LA DYNAMINE EST RECRUTÉE (3) ET LE PUIITS COMMENCE À S'INVAGINER (4). LA DYNAMINE SE LOCALISE SUR LE COU DU PUIITS (5) ET INITIE LA FISSION DE LA VÉSICULE (6). LA VÉSICULE EST LIBÉRÉE POUR SE DIRIGER VERS LES ENDOSOMES (7) ET L'AP-2 EST RECRUTÉ VERS LA MEMBRANE POUR UN NOUVEAU CYCLE D'ENDOCYTOSE (8) (MOUSAVI ET AL., 2004). .....36
- FIGURE 1-4: RESUME GENERAL DES DIFFERENTS VOIES DE SIGNALISATION DE L'EGF CITEES NOTAMMENT LA VOIE DE L'AKT ET LA VOIE DE JNK .....51
- FIGURE 1-5: INTERNALISATION DES EGFR. UNE FOIS ACTIVE, LE EGFR S'AUTOPHOSPHRYLE ET RECRUTE LA LIGASE DE L'UBIQUITINE CBL, QUI LE MUTIUBIQUITINE ET S'ASSOCIE A CIN-85 ET L'ENDOPHILINE. EGFR INDUIT AUSSI LA MONOUBIQUITYLATION DE L'EPS-15 ET DE L'EPSIN. L'EPSIN INTERAGIT AVEC L'AP-2, LA CLATHRINE ET LA PHOSPHATIDYLINOSITOL-3-PHOSPHATE (PI3P) ET FORME UN COMPLEXE AVEC STAM QUI DIRIGE LE RECEPTEUR VERS LES ENDOSOMES. AUX ENDOSOMES, LE RECEPTEUR QUI NE PEUT PAS RECYCLE INTERAGIT AVEC HRS PHOSPHORYLE QUI A SON TOUR INTERAGIT AVEC TSG101 ET ESCRTI, CE QUI DIRIGE LE RECEPTEUR DANS LA LUMIERE INTERIEURE DES CORPS MULTIVESICULAIRES ET APRES VERS LES LYSOSOMES OU ILS SONT DEGRADES. P, PHOSPHATE; UB, UBIQUITINE (LE ROY AND WRANA, 2005).....56
- FIGURE 1-6 : SCHEMA REPRESENTATIF DE DIFFERENTES VOIES IMPLIQUEES DANS L'APOPTOSE : (1) LA VOIE EXTRINSEQUE INDUIT PAR LES LIGANDS DE RECEPTEUR DE MORT ; (2) LA VOIE DES CELLULES EFFECTRICES CYTOLYTIQUES ; (3) LA VOIE DES FACTEURS DE CROISSANCE ; (4) LA VOIE MITOCHONDRIALE ; (5) LA VOIE DE RETICULUM ENDOPLASMIQUE (DEMEDTS ET AL., 2006)..... 65
- FIGURE 2-1: FAM/USP9X IS IDENTIFIED AS AN ITCH-INTERACTING PROTEIN THROUGH AFFINITY SELECTION ASSAY AND TANDEM MASS-SPECTROMETRY ANALYSIS. (A) SCHEMATIC REPRESENTATION OF THE MODULAR STRUCTURE OF ITCH. THE MAIN STRUCTURAL DOMAINS ARE INDICATED: N-TERMINAL C2 DOMAIN (C2), PROLINE RICH DOMAIN (PRD), WW DOMAINS (WW), AND C-TERMINAL HECT DOMAIN (HECT). (B) GST AND GST-ITCH FUSION PROTEINS PRECOUPLED TO GLUTATHIONE-SEPHAROSE BEADS WERE INCUBATED WITH OR WITHOUT SOLUBLE BRAIN EXTRACTS (PNS). EQUAL ALIQUOTS OF GST OR GST-ITCH BOUND PROTEINS WERE RESOLVED BY SDS-PAGE STAINED WITH COOMASSIE BRILLIANT BLUE (RIGHT PANEL). CONTRAST IN THE UPPER PART OF THE GEL HAS BEEN DIGITALLY INCREASED TO ALLOW REPRODUCTION OF THE BANDS IN PRINT. ARROWS POINT TO BANDS EXCISED FROM THE GEL AND DIGESTED WITH TRYPSIN AND FROM WHICH THE ELUTED PEPTIDES WERE SEQUENCED BY MS/MS. (C) A SIMILAR GEL COLORED WITH MORE SENSITIVE SILVER STAINING IS SHOWN TO ALLOW BETTER VISUALIZATION OF THE BAND ATTRIBUTED TO FAM (1\*). .....96
- FIGURE 2-2: ITCH FORMS COMPLEXES WITH FAM/USP9X. (A) COIMMUNOPRCIPITATION (IP) OF ENDOGENOUS ITCH (LEFT PANEL) OR ENDOPHILIN (RIGHT PANEL) PROTEINS. CELL LYSATES (CL) FROM HEK-293T CELLS WERE IMMUNOPRECIPATED WITH ANTIBODIES AGAINST EITHER ITCH OR ENDOPHILIN. CL (100MG) AND IP COMPLEXES WERE SEPARATED ON A 3-12% SDS-PAGE. THE GEL WAS CUT HORIZONTALLY AND WESTERN BLOTTED WITH THE FAM/USP9X ANTIBODY (TOP), THE ITCH ANTIBODY (MIDDLE) AND THE ENDOPHILIN ANTIBODY (BOTTOM). AS A CONTROL (C3), PROTEIN A-SEPHAROSE BEADS WERE INCUBATED WITH THE CL IN THE ABSENCE OF EITHER ANTIBODY. (B) OVERLAY ASSAY USING GST, GST-ITCH, OR GST-ENDOPHILIN WERE PERFORMED ON EXTRACTS FROM HEK-293T CELLS. 100 MG OF CL FROM HEK-293T CELLS WAS SEPARATED ON SDS-

PAGE. THE MEMBRANE CORRESPONDING TO EACH LANE WAS CUT VERTICALLY, INCUBATED WITH 50 PMOL/ML OF GST, GST-ITCH, OR GST-ENDOPHILIN SEPARATELY AND WESTERN BLOTTED WITH ANTIBODIES TO GST. THE FIRST LANE SHOWS CONTROL BLOTS WITH THE INDICATED ANTIBODIES. (C) GFP-ITCH WAS TRANSFECTED INTO COS-7 CELLS AND ITS LOCALIZATION WAS COMPARED WITH THAT OF ENDOGENOUS FAM/USP9X. THE COLOCALIZATION OF ITCH (GREEN) WITH FAM/USP9X (RED) IS REVEALED IN THE BLENDED IMAGE (RIGHT PANEL) OPEN ARROWS POINT TO THE TGN REGION WHERE MOST COLOCALIZATION WAS OBSERVED. THE CLOSE ARROW POINT TO VESICULAR COMPARTMENTS WHERE BOTH PROTEINS ARE ALSO PRESENT. N = NUCLEUS. SCALE BAR REPRESENTS 10  $\mu$ M.....98

FIGURE 2-3: INTERACTION OF FAM AND ITCH THROUGH THE WW DOMAIN. (A) SCHEMATIC ILLUSTRATION OF FULL-LENGTH WILD TYPE (WT) GST-ITCH AND THE DELETION MUTANTS CONSTRUCTS: GST-ITCH LACKING THE C2 DOMAIN ( $\Delta$ C2), GST-ITCH LACKING THE C2 AND PROLINE RICH DOMAIN ( $\Delta$ C2/ $\Delta$ PRD), GST-ITCH HECT DOMAIN FUSION PROTEIN, GST-ITCH LACKING THE LIGASE DOMAIN HECT ( $\Delta$ HECT), GST-ITCH FUSION PROTEIN CONTAINING THE C2 ALONE (C2), GST-ITCH FUSION PROTEIN CONTAINING THE PRD ALONE (PRD), GST FUSED TO THE WW DOMAIN OF ITCH ONLY (WW), GST-ITCH FUSION CONTAINING THE C2 AND PRD DOMAIN (C2/PRD), GST-ITCH FUSION CONTAINING THE PRD AND WW DOMAIN (PRD/WW), AND GST-ITCH LACKING THE WW DOMAINS ( $\Delta$ WW). (B) SOLUBLE BRAIN EXTRACTS (CL) WERE MIXED WITH THE GST ALONE, GST-ITCH WT, OR THE VARIOUS GST-ITCH MUTANTS, PRE COUPLED TO GLUTATHIONE-SEPHAROSE BEADS. THE BOUND PROTEINS WERE THEN SUBJECTED TO SDS-PAGE FOLLOWED BY WESTERN BLOT ANALYSIS USING ANTI-ENDOGENOUS FAM AND ENDOPHILIN..... 100

FIGURE 2-4: FAM/USP9X CAN DEUBIQUITYLATE ITCH. (A+B) FLAG-ITCH AND MYC-UBIQUITIN WERE COEXPRESSED IN HEK-293T CELLS EITHER WITH OR WITHOUT V5-FAM INDICATED BY (+ OR -). (A) LYSATES WERE IMMUNOPRECIPITATED (IP) WITH ANTI-MYC ANTIBODY AND IMMUNOBLOTTED (IB) WITH ANTIBODIES TO V5 (TOP) AND FLAG BOTTOM. THE EXPRESSION OF FLAG-ITCH AND V5-FAM IN THE CELL LYSATES IS ALSO SHOWN AND REPRESENTED BY CELL LYSATE (CL). (B) LYSATES OF SIMILARLY TRANSFECTED CELLS WERE IMMUNOPRECIPITATED (IP) WITH ANTI-FLAG ANTIBODY AND IMMUNOBLOTTED (IB) WITH ANTIBODIES TO MYC..... 102

FIGURE 2-5: ITCH IS UBIQUITYLATED BY ITSELF AND DEGRADED IN THE PROTEASOME. (A) HEK-293T CELLS WERE TRANSFECTED WITH MYC-UBIQUITIN AND FLAG-ITCH WT OR THE LIGASE DEAD MUTANT FLAG-ITCH CA. 48 HOURS POST-TRANSFECTION, CELL-LYSATES WERE OBTAINED AND IMMUNOPRECIPITATED WITH EITHER ANTI-FLAG OR ANTI-MYC ANTIBODIES AS INDICATED, AND IMMUNOBLOTTED WITH EITHER ANTI-FLAG OR ANTI-MYC ANTIBODIES AS INDICATED. UBIQUITYLATED ITCH WT WAS READILY DETECTABLE, WHEREAS ONLY A TRACE OF UBIQUITYLATED ITCH CA COULD BE OBSERVED. (B) TO DETERMINE IF ITCH COULD BE UBIQUITYLATED BY ITSELF IN A TRANS-MOLECULAR FASHION, WE INCUBATED RECOMBINANT ITCH CA OBTAINED FROM A GST-FUSION PROTEIN EXPRESSED IN E. COLI WITH UBIQUITIN, E1, E2 AND ATP IN THE PRESENCE OF TOTAL CELL LYSATE, OR LYSATE IMMUNODEPLETED FOR ITCH AT 25 $^{\circ}$ C FOR 90 MIN. THE REACTION MIXTURE WAS PREPARED FOR IMMUNOBLOT (IB) WITH ANTI-ITCH ANTIBODY. UBIQUITYLATED ITCH (UB<sub>N</sub>-ITCH CA) IS INDICATED. THE BOTTOM PANEL SHOWS THE PRESENCE AND ABSENCE OF ITCH IN CONTROL AND DEPLETED CELL LYSATES, RESPECTIVELY. (C) HEK-293T CELLS TRANSFECTED WITH MYC-UBIQUITIN AND GFP-ITCH WT WERE INCUBATED WITH LACTACYSTIN FOR 16 HOURS OR IN CONTROL MEDIA. LYSATES WERE THEN IMMUNOPRECIPITATED WITH ANTI-GFP ANTIBODY AND IMMUNOBLOTTED WITH ANTI-MYC ANTIBODY (UPPER PANEL) TO SHOW UBIQUITYLATION, OF ANTI-GFP (LOWER PANEL) TO SHOW TOTAL IMMUNOPRECIPITATED GFP-ITCH PROTEIN. (D) UNTRANSFECTED CELLS WERE INCUBATED FOR 16 HOURS WITH LACTACYSTIN OR LEFT IN CONTROL SOLUTION. TOTAL CELL LYSATES WERE PREPARED FOR IMMUNOBLOTTING WITH ANTI-ITCH ANTIBODY AND ANTI-ACTIN ANTIBODY TO SHOW THE AMOUNT OF LOADED PROTEINS. .... 104

FIGURE 2-6: POSITIVE CORRELATION IN THE LEVELS OF ITCH AND FAM/USP9X EXPRESSION IN DIFFERENT RAT TISSUES AND CELL LINES. ITCH AND FAM/USP9X PROTEIN LEVELS WERE ANALYZED THROUGH WESTERN BLOT ANALYSIS IN ISOLATED RAT TISSUE (FIG. 7A) AND CELL LINES (FIG. 7B) USING THE DIFFERENT ANTIBODIES AS INDICATED. IN RAT TISSUES, ITCH PROTEINS CORRESPOND TO THE HIGHER MOLECULAR WEIGHT BAND (ARROW)..... 106

FIGURE 2-7: FAM/USP9X REGULATES ITCH EXPRESSION. (A) HEK-293T CELLS WERE TRANSIENTLY TRANSFECTED WITH TWO DIFFERENT FAM-SPECIFIC SIRNAS DESIGNATED PRS-1800 (MIDDLE PANEL) AND PRS-3601 (RIGHT PANEL) AT VARIOUS CONCENTRATIONS. AS A CONTROL THE SIRNA VECTOR PRS WAS TRANSFECTED (LEFT PANEL). CELL LYSATES WERE EXTRACTED FOUR DAYS AFTER TRANSFECTION AND WESTERN BLOTTED WITH ENDOGENOUS ANTIBODIES FOR FAM, ITCH AND B-ACTIN. (B) HEK-293T CELLS WERE TRANSIENTLY TRANSFECTED WITH PRS, PRS-1800, AND PRS-3601. ON DAY THREE POST-TRANSFECTION THE CELLS WERE INCUBATED WITH OR WITHOUT LACTACYSTIN FOR 24 HRS WHERE INDICATED (+ OR -). FOUR DAYS AFTER TRANSFECTION, CELLS WERE EXTRACTED AND ANALYZED BY WESTERN BLOTTING. A DIFFERENT GEL WAS LOADED WITH EXCESS PROTEIN (150 µG/LANE) AND BLOTTED WITH ANTI-ITCH ANTIBODY TO ALLOW VISUALIZATION OF UBIQUITYLATED ITCH IN PRESENCE OF LACTACYSTIN. (C) HEK-293T CELLS WERE TRANSIENTLY TRANSFECTED WITH PLASMIDS ENCODING MYC-UBIQUITIN (ALL LANES) AND WITH 15MG OR 20MG OF CONTROL VECTOR (PDEST-30) OR VECTOR EXPRESSING FAM (PDEST-30-FAM) AS INDICATED. ON DAY THREE POST-TRANSFECTION EQUAL AMOUNTS OF TOTAL PROTEIN (75MG) FROM EACH WERE ANALYSED BY IMMUNOBLOT ANALYSIS WITH THE INDICATED ANTIBODIES. (D) EXTRACTS OF CONTROL HEK-293T CELLS OR CELLS TRANSFECTED WITH FLAG-JNK WERE IMMUNOPRECIPITATED WITH AN ANTI-ITCH ANTIBODY, AND BLOTTED FOR FAM TO ASSESS CO-IMMUNOPRECIPITATION OF THE PROTEASE, AS INDICATED. CELL LYSATES (CL) REPRESENTING 1/20<sup>TH</sup> OF THE IMMUNOPRECIPITATED EXTRACTS WERE ALSO BLOTTED WITH THE INDICATED ANTIBODIES (LEFT PANELS). ..... 108

FIGURE 3-1 : TREATMENT WITH EGF INDUCES UBIQUITYLATION OF SEVERAL SUBSTRATES OF ITCH..... 137

FIGURE 3-2 : TREATMENT WITH EGF INDUCES PROTEASOME-DEPENDENT DEGRADATION OF ENDOPHILIN AND CBL, BUT NOT ITCH. HEK-293T CELLS COTRANSFECTED WITH THE INDICATED CONSTRUCTS AND TREATED WITH EGF IN CONTROL CONDITIONS OR IN THE PRESENCE OF 10 MM LACTACYSTIN. THE TOTAL CELL LYSATES WERE THEN IMMUNOBLOTTED FOR (A) ENDOGENOUS ENDOPHILIN, OR (B) TRANSFECTED HA-CBL TO REVEAL UBIQUITYLATION AND/OR DEGRADATION. (C) HEK-293T CELLS TRANSFECTED WITH FLAG-ITCH AND MYC-UBIQUITIN WERE TREATED AS ABOVE. FLAG-ITCH WAS IMMUNOPRECIPITATED AND BLOTTED WITH AN ANTI-MYC ANTIBODY. GRAPHS ON THE RIGHT REPRESENT AVERAGE PIXEL DENSITY OF AT LEAST THREE SIMILAR EXPERIMENTS FOR (A) ENDOGENOUS ENDOPHILIN BANDS (B) UBIQUITYLATED HA-CBL OR (C) UBIQUITYLATED FLAG-ITCH. OPEN CIRCLES: CONTROL CELLS; FILLED SQUARES: LACTACYSTIN TREATED CELLS. ERROR BARS REPRESENT STANDARD DEVIATION. .... 139

FIGURE 3-3: SIRNA EXPERIMENTS DEMONSTRATE ITCH AS THE LIGASE IN ENDOPHILIN DEGRADATION, AND SHOW THAT FAM RESCUE ITCH FROM ITS OWN EGF-INDUCED UBIQUITYLATION ..... 141

FIGURE 3-4 : : ITCH IS PHOSPHORYLATED IN A JNK DEPENDENT MANNER FOLLOWING TREATMENT WITH EGF. (A) NON-TRANSFECTED HEK-293T CELLS WERE TREATED OR NOT WITH 30 MM OF SP600125 FOR 24 HOURS IN SERUM-FREE MEDIA AND TREATED WITH 100 NG/ML OF EGF FOR THE INDICATED TIMES. PROTEINS FROM THE TOTAL CELL LYSATES WERE SEPARATED BY 2D GEL ELECTROPHORESIS AND TRANSFERRED TO NITROCELLULOSE FOR IMMUNOBLOTTING WITH AN ANTI-ITCH MONOCLONAL ANTIBODY OR ANTI-B-ACTIN AS A CONTROL. ITCH POSITION IN THE PH GRADIENT IS SHOWN RELATIVE TO B-ACTIN. THE SAME CELL LYSATE SEPARATED ON A 3-12% SDS-PAGE WAS BLOTTED WITH ANTI-P-JNK ANTIBODY TO SHOW JNK ACTIVATION. .... 143

FIGURE 3-5 : ITCH UBIQUITYLATION IS TRIGGERED BY JNK ACTIVATION. (A) HEK-293T CELLS WERE TRANSFECTED WITH GFP-ITCH AND MYC-UBIQUITIN ONLY, OR WITH GFP-ITCH, FLAG-JNK AND MYC-UBIQUITIN. THE TOTAL CELL LYSATES WERE IMMUNOPRECIPITATED WITH ANTI-GFP AND BLOTTED WITH ANTI-MYC TO SHOW ITCH UBIQUITYLATION. THE CELL LYSATES WERE ALSO BLOTTED WITH ANTI-GFP AND ANTI-FLAG TO ASSESS PROTEIN EXPRESSION. (B) HEK-293T CELLS WERE TRANSFECTED WITH GFP-ITCH AND MYC-UBIQUITIN AND THE INDICATED COMBINATIONS OF FLAG-GLK, KINASE INACTIVE FLAG-GLK (K->E) AND NON-TAGGED ENDOPHILIN A1. UBIQUITYLATED PROTEINS WERE IMMUNOPRECIPITATED WITH AN ANTI-MYC ANTIBODY AND IMMUNOPRECIPITATED PROTEINS WERE BLOTTED WITH AN ANTI-GFP ANTIBODY. THE CELL LYSATES WERE BLOTTED WITH THE INDICATED ANTIBODIES TO ASSESS TRANSFECTIONS. GLK AND ENDOPHILIN WERE PREVIOUSLY REPORTED TO COOPERATE TO ACTIVATE JNK (27). ..... 145

FIGURE 3-6 : TREATMENT WITH SP600125 BLOCKS EGF-INDUCED UBIQUITYLATION. (A) HEK-293T CELLS WERE TRANSFECTED WITH GFP-ENDOPHILIN, FLAG-ITCH AND MYC-UBIQUITIN AND TREATED FOR

24 HR WITH 30 MM SP600125 OR VEHICLE (CTRL) IN SERUM-FREE MEDIA BEFORE TREATMENT WITH EGF AS ABOVE. THE CELL LYSATES WERE IMMUNOPRECIPITATED WITH A POLYCLONAL ANTI-GFP ANTIBODY AND BLOTTED WITH A MONOCLONAL ANTI-MYC ANTIBODY. THE CELL LYSATES WERE FURTHER BLOTTED WITH ANTI-GFP TO ASSESS FOR GFP-ENDOPHILIN EXPRESSION AND ANTI-PO4-JNK TO SHOW JNK ACTIVATION. (B) HEK-293T CELLS TRANSFECTED WITH FLAG-ITCH WERE TREATED AS IN A. THE CELL LYSATES WERE BLOTTED WITH ANTI-PAN-ENDOPHILIN OR ANTI-P-JNK. THE ENDOGENOUS LEVEL OF ENDOPHILIN IS REDUCED FOLLOWING TREATMENT WITH EGF, BUT NOT WHEN JNK ACTIVITY IS BLOCKED BY SP600125. (C) HEK-293T CELLS WERE TRANSFECTED WITH HA-CBL, FLAG-ITCH AND MYC UBIQUITIN AND TREATED AS IN A. THE CELL LYSATES WERE IMMUNOPRECIPITATED WITH AN ANTI-MYC ANTIBODY AND UBIQUITYLATED CBL REVEALED WITH AN ANTI-HA ANTIBODY. THE CELL LYSATES WERE FURTHER BLOTTED WITH ANTI-HA TO ASSESS FOR HA-CBL EXPRESSION AND ANTI-P-JNK TO SHOW JNK ACTIVATION. (D) CELL TRANSFECTED WITH GFP-ITCH AND MYC-UBIQUITIN WERE TREATED AS IN A. THE CELL LYSATES WERE IMMUNOPRECIPITATED WITH A POLYCLONAL ANTI-GFP ANTIBODY AND BLOTTED WITH A MONOCLONAL ANTI-MYC ANTIBODY. THE CELL LYSATES WERE FURTHER BLOTTED WITH ANTI-GFP TO ASSESS FOR GFP-ITCH EXPRESSION AND ANTI-P-JNK TO SHOW JNK ACTIVATION. .... 147

FIGURE 3-7: THE INTERACTION BETWEEN ITCH AND OTHER PROTEINS ARE MODULATED AFTER TREATMENT WITH EGF IN A JNK-DEPENDANT MANNER. COIMMUNOPRECIPITATION WAS USED TO MEASURE THE INTERACTION BETWEEN ITCH AND DIFFERENT PROTEINS AFTER TREATMENT WITH EGF IN CONTROL CONDITIONS AND IN THE PRESENCE OF SP600125. CELL TREATMENT WITH EGF AND SP600125 WAS AS IN FIG. 6. (A) LYSATES FROM NON-TRANSFECTED TREATED CELLS WERE IMMUNOPRECIPITATED WITH AN ANTI-PAN-ENDOPHILIN POLYCLONAL ANTIBODY. IMMUNOPRECIPITATED PROTEINS AND CELL LYSATES WERE BLOTTED AS INDICATED. (B) CELL TRANSFECTED WITH 6XMYC-SMAD7 WERE TREATED AS ABOVE AND IMMUNOPRECIPITATED WITH A MONOCLONAL ANTI-ITCH ANTIBODY. IMMUNOPRECIPITATED PROTEINS AND CELL LYSATES WERE BLOTTED AS INDICATED. (C) CELL TRANSFECTED WITH HA-CBL WERE TREATED AS ABOVE AND IMMUNOPRECIPITATED WITH A MONOCLONAL ANTI-ITCH ANTIBODY. IMMUNOPRECIPITATED PROTEINS AND CELL LYSATES WERE BLOTTED AS INDICATED. (D) NON-TRANSFECTED HEK-293T CELLS WERE TREATED WITH SP600125 AND EGF AS ABOVE AND THE CELL LYSATES WERE IMMUNOPRECIPITATED WITH A MONOCLONAL ANTI-ITCH ANTIBODY. IMMUNOPRECIPITATED PROTEINS AND CELL LYSATES WERE BLOTTED AS INDICATED. .... 149

FIGURE 3-8: QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE EFFECT OF THE JNK INHIBITOR SP600125 ON ITCH SUBSTRATES UBIQUITYLATION AND ITCH CO-IMMUNOPRECIPITATION. (A) QUANTITATIVE ANALYSIS OF UBIQUITYLATED ENDOPHILIN, CBL OR ITCH ACCUMULATING AFTER TREATMENT WITH EGF IN CONTROL CONDITIONS OR IN THE PRESENCE OF SP600125. THE BARS REPRESENT THE AVERAGE PIXEL DENSITY FROM AT LEAST THREE WESTERN BLOT ANALYSIS SIMILAR TO THOSE PRESENTED IN FIGURE 6. (B) QUANTITATIVE ANALYSIS OF PROTEINS CO-IMMUNOPRECIPITATING WITH ITCH FROM CELLS TREATED WITH EGF IN CONTROL CONDITIONS OR IN THE PRESENCE OF SP600125. THE BARS REPRESENT THE AVERAGE PIXEL DENSITY FROM AT LEAST THREE WESTERN BLOT ANALYSIS SIMILAR TO THOSE PRESENTED IN FIGURE 7, EXPRESSED RELATIVE TO IMMUNOPRECIPITATED ITCH. ERROR BARS REPRESENT STANDARD DEVIATION. .... 151

FIGURE 3-9: ITCH EXPRESSION INFLUENCES EGF RECEPTOR DOWNSTREAM SIGNALING. (A) HEK-293T CELLS TRANSFECTED WITH CONTROL VECTOR (CTRL) OR WITH GTPASE INACTIVE DYNAMIN K44A (DYNK44A) WERE TREATED WITH EGF AS ABOVE. AKT AND JNK ACTIVATION WAS MEASURED USING PHOSPHO-SPECIFIC ANTIBODIES AGAINST ACTIVE AKT (P-AKT) OR ACTIVE JNK (P-JNK), AS INDICATED. (B) HEK-293T CELLS WERE TRANSFECTED WITH FLAG-ITCH, MYC-UBIQUITIN AND WITH OR WITHOUT DYNK44A, AS INDICATED, AND TREATED WITH EGF. LYSATES FROM CELLS WERE IMMUNOPRECIPITATED WITH ANTI-FLAG AND PROTEINS WERE BLOTTED TO REVEAL UBIQUITYLATION OF FLAG-ITCH WITH AN ANTI-MYC ANTIBODY. ENDOPHILIN DEGRADATION WAS MEASURED BY BLOTTING WITH AN ANTI-PAN-ENDOPHILIN ANTIBODY. (C) HEK-293T CELLS WERE TRANSFECTED WITH PLASMIDS ENCODING CONTROL HAIRPIN SEQUENCE (CTRL) OR SEQUENCE TARGETED AGAINST ITCH (SIRNA) OR GFP-ITCH. SEVENTY-TWO HOURS AFTER TRANSFECTION, CELLS WERE TREATED WITH EGF AND PROTEIN EXTRACTS BLOTTED WITH THE INDICATED ANTIBODIES. .... 153



**FIGURE 4-1: ITCH INTERACTS WITH TBID AND PROMOTES ITS PROTEASOMAL DEGRADATION.** (A) HEK-293T CELLS WERE COTRANSFECTED WITH EITHER BID-GFP OR TBID-GFP IN THE PRESENCE OF FLAG-ITCH. TOTAL CELL LYSATES WERE BLOTTED WITH ANTI-GFP AND ANTI-FLAG TO SHOW PROTEIN EXPRESSION AND THE TOTAL CELL LYSATES WERE IMMUNOPRECIPITATED WITH ANTI-FLAG AND BLOTTED WITH ANTI-GFP TO REVEAL BID AND TBID CO-IMMUNOPRECIPITATION. (B) 293T CELLS WERE COTRANSFECTED WITH CONSTANT AMOUNTS OF RLUC-ITCH AND VARIOUS AMOUNTS OF EITHER BID-GFP OF TBID-GFP. THE GRAPH PRESENTED HERE IS A REPRESENTATIVE EXAMPLE OF THE SATURATION STUDIES PERFORMED TO PROVIDE EVIDENCE FOR A SPECIFIC INTERACTION BETWEEN THE PROTEINS. BRET RATIOS WERE PLOTTED AS A FUNCTION OF THE EXCITED GFP ACTIVITY TO TOTAL RENILLA LUCIFERASE ACTIVITY RATIO, ALLOWING COMPARISON OF BRET RATIOS BETWEEN BID-GFP AND TBID-GFP WHEN EXPRESSED AT THE SAME LEVELS. THE BAR GRAPH REPRESENTS AVERAGE BRET RATIOS AT IDENTICAL TOTAL YFP/RLUC RATIO OF FOUR DIFFERENT EXPERIMENTS. THE CORRECTED BRET RATIO FOR RLUC-ITCH AND WILD TBID-GFP COEXPRESSION WAS ARBITRARILY SET TO 100%. (C) HEK-293T CELLS WERE TRANSFECTED WITH BID-GFP AND MYC-UBIQUITIN AND WITH OR WITHOUT FLAG-ITCH. CELLS WERE TREATED WHEN INDICATED WITH 20  $\mu$ M OF LACTACYSTIN FOR 24 HOURS. TOTAL CELL LYSATES WERE THEN IMMUNOBLOTTED FOR GFP TO REVEAL BID- AND TBID-GFP..... 181

**FIGURE 4-2: ITCH UBIQUITYLATES TBID BUT NOT BID.** (A) HEK-293T CELLS WERE TRANSFECTED WITH TBID-GFP AND MYC-UBIQUITIN IN THE PRESENCE OR ABSENCE OF FLAG-ITCH AND TREATED FOR 24 HR WITH 20  $\mu$ M LACTACYSTINE OR VEHICLE. THE TOTAL CELL LYSATES WERE IMMUNOPRECIPITATED WITH AN ANTI-GFP ANTIBODY AND BLOTTED WITH A MONOCLONAL ANTI-MYC ANTIBODY TO REVEAL TBID UBIQUITYLATION. CELL LYSATES WERE FURTHER BLOTTED WITH ANTI-GFP TO ASSESS FOR TBID-GFP EXPRESSION, AND ANTI-FLAG TO ASSESS FLAG-ITCH EXPRESSION. (B) CELLS WERE TRANSFECTED AND TREATED AS IN A, EXCEPT THAT BID-GFP REPLACED TBID-GFP..... 183

**FIGURE 4-3: ITCH PROMOTES CELL SURVIVAL.** (A) HEK 293T CELLS WERE TRANSFECTED WITH GFP-ITCH OR PLASMIDS ENCODING HAIRPIN SEQUENCES TARGETED AGAINST ITCH SEQUENCE (SIRNA) AND ANALYSED FOR SURVIVAL USING THE MTT METHOD. GRAPHS REPRESENTS AVERAGE CELL SURVIVAL IN PERCENT OF CONTROL. ERROR BARS REPRESENT STANDARD DEVIATION. A PART OF THE CELLS WERE LYSED AND IMMUNOBLOTTED WITH ANTI-ITCH OR ANTI-GFP TO REVEAL ENDOGENOUS ITCH OR GFP-ITCH OVEREXPRESSION (INSET). (B) HEK-293T CELLS TRANSFECTED AS ABOVE WERE LYSED AND ANALYZED FOR CASPASE 3 ACTIVITY. GRAPHS REPRESENTS AVERAGE FOLD INCREASE OF CASPASE 3 ACTIVITY RELATIVE TO CONTROL CELLS. ERROR BARS REPRESENT ONE STANDARD DEVIATION. N=4..... 185

**FIGURE 4-4: ITCH PROTECTS CELLS FROM TBID INDUCED APOPTOSIS.** HEK-293T CELLS WERE TRANSFECTED WITH INCREASING CONCENTRATIONS OF TBID-GFP ALONE (CTRL), WITH FLAG-ITCH (ITCH), OR WITH PLASMIDS ENCODING SHRNA SEQUENCE TARGETED AGAINST ITCH (SIRNA). CELLS WERE THEN ANALYSED FOR CELL SURVIVAL (A) OR CASPASE 3 ACTIVITY (B). BARS REPRESENT AVERAGE PERCENT CELL SURVIVAL OR AVERAGE FOLD CASPASE 3 ACTIVITY INCREASE RELATIVE TO CONTROL, UNTRANSFECTED CELLS (NOT SHOWN). ERROR BARS REPRESENT ONE STANDARD DEVIATION. N=4..... 187

**FIGURE 4-5: EGF TREATMENT PROTECTS HEK-293T CELLS FROM APOPTOSIS, PARTLY DEPENDING ON ITCH.** (A) HEK-293T CELLS TRANSFECTED AS INDICATED WERE TREATED WITH RECOMBINANT HUMAN TRAIL FOR 4 HOURS AND CELL SURVIVAL WAS ASSESSED USING THE MTT ASSAY. CASPASE 3 ACTIVITY WAS ASSESSED BY MEASURING DEGRADATION OF THE AC-DEVD-PNA PEPTIDE. OPEN BARS: CONTROL CELLS; FILLED BARS: TRAIL TREATED CELLS. ERROR BARS REPRESENT ONE STANDARD DEVIATION. (B) HEK-293T CELLS TRANSFECTED AS ABOVE WERE TREATED WITH 250NG/ML OF RECOMBINANT HUMAN TRAIL FOR 4 HOUR IN COMBINATION OR NOT WITH 100 NG/ML EGF. CELL SURVIVAL WAS ASSESSED USING THE MTT ASSAY. CASPASE 3 ACTIVITY WAS ASSESSED BY MEASURING DEGRADATION OF THE AC-DEVD-PNA PEPTIDE. OPEN BARS: CONTROL CELLS; FILLED BARS: TRAIL TREATED CELLS. SHADED BARS: TRAIL AND EGF TREATED CELLS. ERROR BARS REPRESENT ONE STANDARD DEVIATION. (C) NON-TRANSFECTED HEK-293T CELLS WERE TREATED WITH TRAIL OR TRAIL AND EGF AS ABOVE IN THE PRESENCE OF 20 $\mu$ M SP600125 OR VEHICLE (DMSO). CELL SURVIVAL WAS ASSESSED USING THE MTT ASSAY. CASPASE 3 ACTIVITY WAS ASSESSED BY MEASURING DEGRADATION OF THE AC-DEVD-PNA PEPTIDE. OPEN BARS: CONTROL

CELLS; FILLED BARS: SP600125 TREATED CELLS. ERROR BARS REPRESENT ONE STANDARD DEVIATION. N=3 FOR ALL OF THESE EXPERIMENTS. .... 189

FIGURE 4-6: EGF TREATMENT ACTIVATES ITCH AND INCREASES TBID UBIQUITYLATION AND DEGRADATION. (A) HEK-293T CELLS WERE TRANSFECTED WITH TBID-GFP, FLAG-ITCH AND MYC-UBIQUITIN PLAMIDS. CELLS WERE TREATED WITH 100 NG/ML EGF FOR THE INDICATED TIME. TOTAL CELL LYSATES WERE IMMUNOPRECIPITATED WITH ANTI-GFP AND BLOTTED WITH ANTI-MYC TO REVEAL TBID UBIQUITYLATION. CELL LYSATE WERE THEN BLOTTED WITH ANTI-GFP AND ANTI-FLAG TO REVEAL TBID AND ITCH EXPRESSION. CL: CELL LYSATES. (B) HEK-293T CELLS WERE COTRANSFECTED WITH BID-GFP AND FLAG-ITCH AND TREATED WITH 100 NG/ML EGF. FLAG-ITCH WAS IMMUNOPRECIPITATED FROM TOTAL CELL LYSATES WITH ANTI-FLAG AND BID CO-IMMUNPRICIPITATION WAS REVEALED WITH ANTI-GFP. FLAG-ITCH AND BID-GFP EXPRESSION WAS DETECTED IN THE TOTAL CELL LYSATES WITH ANTI-FLAG AND ANTI-GFP ANTIBODY RESPECTIVELY. (C) SAME AS IN B BUT CELLS WERE CO-TRANSFECTED WITH FLAG-ITCH AND TBID-GFP. (D) HEK-293T CELLS WERE TRANSFECTED WITH CONTROL VECTOR, GFP-ITCH, OR PLASMIDS ENCODING HAIRPIN SEQUENCES TARGETED AGAINST ITCH SEQUENCE. WHERE INDICATED, CELLS WERE TREATED THE JNK INHIBITOR SP600125 FOR 24 HOURS. CELLS WERE THEN TREATED WITH 100 NG/ML OF EGF FOR THE INDICATED TIME, AND PROTEIN EXTRACTS BLOTTED WITH ANTI-ITCH TO DETECT ITCH EXPRESSION OR ANTI-FLAG TO DETECT FLAG-ITCH EXPRESSION. PROTEIN EXTRACTS WERE ALSO IMMUNOBLOTTED WITH ANTI-GFP TO DETECT BID CLEAVEAGE AND TBID DEGRADATION, AS WELL AS WITH MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST PHOSPHO-SAPK/JNK (T183/Y185) TO SHOW JNK ACTIVITY. .... 191

FIGURE 5-1 : MODELE GENERAL DU MECANISME DE REGULATION RECIPROQUE DE ITCH ET EGFR. L'ACTIVATION DES EGFR PAR L'EGF RECRUTE CBL ET ENDOPHILINE VERS LA MEMBRANE OU ELLES INTERAGISSENT AVEC LE RECEPTEUR ACTIVE ET INDUISENT SON INTERNALISATION. EN MEME TEMPS, JNK EST ACTIVE EN REPOSE A L'EGF ET ACTIVE ITCH. ITCH AUGMENTE L'UBIQUITYLATION DE CBL ET ENDOPHILINE ET PROVOQUE LEUR DEGRADATION PROTEASOMALE. ITCH ALORS BLOQUE L'INTERNALISATION DE L'EGFR ET FAVORISE LA VOIE DE L'AKT ACTIVEE AU NIVEAU DE LA MEMBRANE PAR RAPPORT A LA VOIE DE JNK ACTIVEE AU NIVEAU DES ENDOSOMES. .... 205

## Liste des abréviations

ABC :	ATP Binding Cassette
ADNc :	Complementary DNA
AIP4 :	Atrophin interacting protein 4
Akt :	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AP-2 :	Adaptor protein 2
APC :	Anaphase Promoting Complex
ARH :	Autosomal Recessive Hypercholesterolemia
ASK :	Apoptosis Signal-regulating Kinase
ATP :	Adenosine triphosphate
BAR :	BIN/Amphiphysin/Rvsp
CAD :	Caspase-Activated Dnase
Cbl :	Castias B-lineage lymphomaM (murine)
CCV :	Clathrin coated vesicles
CDC2 :	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M
CIN85 :	Cbl interacting protein 85
CXCR4 :	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
CYLD :	CylinDromatosis
Dab :	Disabled
DISC :	Death-inducing Signaling Complex
DPF :	Asp-Pro-Phe
DUB :	Deubiquitylating enzyme
E1 :	Ubiquitin activating enzyme
E2 :	Ubiquitin conjugating enzyme
E3 :	Ubiquitin ligase enzyme
EEA1 :	Early endosome antigen 1
EH :	Ep15 homology domain
ENTH :	Epsine N-terminal homology domain
ERK1/2 :	Extracellular signal regulated kinase
ESCRT :	Endosomal Sorting Complex Required for Trnsport-I
FADD :	Fad Associated Death Domain
FYVE :	Fab1/YOB/Vc1p/EEA1
GAP :	GTPases Activating protein
GCK :	Glycogen synthase kinase
GLK :	Germinal like kinase
Grb2 :	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP :	Guanosine triphosphate
HAUSP :	Herpes-Associated Ubiquitin-Specific Protease
HECT :	Homologous to E6-AP Carboxy-terminus
HecW1 :	HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1
HPK :	Hematopoetic Progenitor Kinase 1
Hrs :	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase
IAP :	Inhibitor apoptosis protein

IFN $\gamma$ :	Interferon gamma
IGF-1R :	Insulin-like growth factor 1 receptor
IGF:	Insuline growth factor
IL4 :	Interleukin 4
I $\kappa$ b kinase :	IKK
JAMM :	Protease with Josephine JAB1/MPN/Mov34 metalloenzyme domain
JNK :	Kinase c-Jun-N-terminal
Jun b:	Jun B proto-oncogene
K :	Lysine
KLF :	Kruppel-like factor 2
LDL:	Low density lipoprotein
MAPK:	Mitogen activated protein kinase
MEK1/2 :	Mitogen activated extracellular signal regulated protein kinase
MLK :	Mixed Lineage Kinase
MSF:	Multi Facilitors Superfamily
MVB :	Multi vesicular body
Nedd4:	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4
NF- $\kappa$ b :	Necrosis factor kappa b
NGF :	Facteur de croissance neuronal
NPF :	Asparagine-proline-phenylalanine
NRG :	Neuregulin
OTU :	Ovarien tumor related ubiquitin
PAK :	p21-activated Kinase
PDGF :	Platelet-derived growth factor
PHD :	Plant-Homeo Domain
PI(4,5)P2 :	Phosphatidylinositol (4,5) diphosphate
PI3-kinase :	Phosphatidyl-inositol 3- kinase
PRD :	Proline rich domain
PTB :	Phosphotyrosine Binding domain
RCPG:	Receptor coupled to protein G
RING:	Really interesting new gene
RTK:	Tyrosine kinase receptor
RUNX2:	Runt-related transcription factor 2
SAPK :	Stress activated protein kinase
SCF:	Stem cell factor
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SH2:	Domain homologue to Src
SH3:	Src homologous 3
Skp1:	S-phase kinase-associated protein 1
SNARE:	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive protein NSF attachment protein receptors
SoS :	Son of sevenless
STAM :	Signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 1
SUMO:	Small Ubiquitin-like Modifier
TAK:	TGF $\beta$ -activated Kinase
tBID:	Truncated c-terminalBID

TGFβ:	Transforming growth factor, beta
TNF-α :	Facteur de necrosis tumeurle
TRADD:	TNF rceptor-Associated Death Domain
TRAF :	TNF receptor-associated factor
TRAILR2:	Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor 2
TSG101:	Tumor Susceptibility Gene 101
UBA :	Ubiquitin-like modifier activating enzyme
UBC:	Ubiquitin C
UCH:	Ubiquitine C-terminal hydrolase
UIM :	Ubiquitin interactif motif
USP :	Ubiquitin specific protein
VEGF :	Vascular endothelial growth factor
W :	Tryptophane
WWP1:	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1
WWP2 :	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2

La dédicace

Au nom de Dieu

Je dédis cette thèse à Ma mère et mon père, mes sœurs et mon frère

À ma joie et ma partenaire de vie : Areej

Et la mémoire de ma sœur :

Fatima



## Corps de l'ouvrage

Cette thèse tire son intérêt du rôle de la ligase de l'ubiquitine Itch dans de nombreux mécanismes intracellulaires. Nous avons démontré un mécanisme de régulation réciproque entre le récepteur de facteur de croissance épidermique et Itch. Ce mécanisme constitue une clé pour comprendre la dérégulation de ces récepteurs dans les cellules cancérigènes. Nous avons aussi identifié un nouveau substrat de Itch, tBID. À partir de nos études, nous sommes capables de dire que Itch est une protéine anti-apoptotique qui protège les cellules.



## Remerciements :

Je me rappelle la première fois que j'ai franchi les portes de l'université de Montréal en novembre 2004 sans vraiment savoir dans quoi je m'embarquais. Ce projet m'a été attribué et il m'a semblé intéressant même si, honnêtement, je ne savais pas à quelle point ma Professeuse attend ma contribution. Mais j'ai me suis dit : ca va être le 'Fun'. Ce n'est qu'avec le support et le guide de plusieurs individus que j'ai appris et développé une immense expérience, non seulement scientifique mais aussi personnelle, avec beaucoup des joyeux souvenirs et des amis inoubliables. Aux personnes qui ont contribué à la réalisation de cette thèse, je veux vous remettre ces petits mots.

Premièrement, je remercie ma superviseuse, Dr Annie Angers. C'était un long chemin que nous avons commencé ensemble pour produire ce travail. Tu es une personne remarquable qui va laisser dans ma vie beaucoup de souvenirs et des marques inoubliables.

Annie ne s'est jamais montrée avare à m'accorder tous le temps nécessaires pour m'aider à comprendre la biologie moléculaire, à développer un esprit scientifique de doute et de synthèse, à établir une bibliothèque de connaissance théoriques et une vaste expérience pratique. Son bureau était toujours, et croyez moi : toujours, ouvert pour moi sans rendez-vous ou désespoir. C'est à elle que je dois ma passion pour la recherche, son enthousiasme et son optimisme m'ont supporté pour compléter cette thèse malgré les circonstances difficiles par lesquelles je suis passé. Elle était pour moi comme une vague de science qui m'a amené avec elle dans la mer de la science, l'amie qui a supporté mes

blagues, mon stress, mes malheurs ainsi que mes bonheurs. Je remercie Dieu qui m'a donné l'opportunité de travailler avec elle.

À toi Annie, la personne et la professeure, je dis merci, merci infiniment.

Je remercie les membres de mon jury de thèse : Dr. Michel Anctil, Dr. Muriel Aubry, Dr. Valérie Legendre-Guillaumin d'avoir accepté de m'accorder leur temps pendant les vacances d'été pour évaluer cette thèse. Spécialement, je remercie Dr Muriel Aubry pour son support dans mon examen de synthèse et ses valeureux conseils.

Je remercie aussi les Docteurs : Peter Mcpherson, Thérèse Cabana, Jean-François Pflieger et Michel Anctil pour leur avis et discussion scientifique durant ma thèse.

Je voudrais aussi remercier tout le monde qui a fait de mon entourage un environnement formidable pour compenser le temps que j'ai passé sur cette thèse. À Raymond, qui m'a entouré avec sa joie et sa chaleureuse amitié ainsi que son support technique lorsque j'avais besoin. À Guillaume, mon étudiant et mon collègue, je te remercie pour les bons souvenirs que tu m'as laissés et ton amitié. À mes collègues, Annie, Syndia, Abdel, Maximus, Meriem, je vous remercie pour votre sympathie et votre agréable amitié. Elle va rester gravée dans ma mémoire comme la plus belle période de ma vie.

# **1. CHAPITRE 1**

## ***INTRODUCTION***

Le fonctionnement du récepteur de facteur de croissance épidermique (EGFR) est dérégulé par des mutations qui causent soit une augmentation de son exposition au niveau de la membrane plasmique soit une activation continue de son domaine intracellulaire. Dans un cas ou l'autre, il y aura une activation non contrôlable de sa signalisation cellulaire qui cause un développement anormal de la cellule aboutissant à la formation de tumeurs.

Plusieurs clés ont été identifiées dans le mécanisme de régulation des récepteurs à l'EGF (EGFR) incluant Cbl, qui fonctionne en même temps comme une ligase de l'ubiquitine et une protéine adaptatrice, et CIN85 qui fonctionne comme une protéine intermédiaire pendant l'endocytose du récepteur. Une fois phosphorylée, Cbl s'associe à CIN-85. CIN85, à son tour, recrute la protéine endocytaire endophiline qui cause la courbure négative de la membrane et le recrutement de la dynamine vers la membrane qui, ensemble, causeront l'internalisation de la vésicule endocytaire contenant l'EGFR. L'endophiline est ubiquitylée et est régulée négativement par la ligase de l'ubiquitine Itch. L'ubiquitylation de l'endophiline par Itch augmente en réponse à l'EGF et l'endophiline est internalisée au niveau des endosomes. Ceci peut avoir un effet négatif sur l'internalisation des EGFR.

Les travaux de ma thèse tirent leur origine d'observations préliminaires selon lesquelles la ligase de l'ubiquitine Itch reconnaît spécifiquement et ubiquityle la protéine endocytaire endophiline. Nous avons donc posé l'hypothèse, et démontré en partie, que Itch peut en effet avoir une incidence directe sur l'internalisation du récepteur de l'EGF. D'autre part, des travaux récents d'un groupe californien piloté par Micheal Karin ont démontré que Itch est phosphorylé par la kinase JNK (cJun N-terminal Kinase), et que cette modification de Itch augmente significativement son activité ligase (Gallagher et al., 2006).

Or, il est généralement admis que JNK peut être activée directement ou indirectement via les voies de signalisation du récepteur EGF. L'équipe de Bilodeau a montré aussi que la voie de l'EGFR régule le clivage de la protéine proapoptotique BID et protège les cellules contre l'effet des facteurs de nécrose tumoral alpha ( $TNF\alpha$ ).

Dans ce contexte, les travaux que j'ai entrepris visent à examiner la régulation de l'activité de la ligase de l'ubiquitine Itch dans le contexte de la signalisation et du trafic intracellulaire des récepteurs activés à la membrane plasmique.

Le premier chapitre de ma thèse sera consacré à faire le point sur les connaissances actuelles concernant la ligase de l'ubiquitine Itch, qui a été impliquée dans plusieurs événements de signalisation cellulaire ainsi que des autres membres de la famille Nedd4. Par la suite, je décrirai l'ubiquitylation et son rôle dans différents mécanismes comme l'endocytose et l'internalisation des récepteurs, l'apoptose et je définirai l'EGFR, son activation, son internalisation, ses voies de signalisation et sa régulation par l'ubiquitylation, je décrirai ensuite les voies apoptotiques et la famille de Bcl-2 et l'implication de l'ubiquitylation dans ce processus, surtout la protéine proapoptotique tBID.

## 1.1 La ligase de l'ubiquitine Itch

La protéine Itch a initialement été décrite par le groupe de Neal Copeland et Nancy Jenkin comme étant le produit du gène muté dans la lignée de souris « non-agouti lethal A18 » (Perry et al., 1998). Cette lignée est issue d'une inversion dans la région du gène agouti sur le chromosome deux et affecte l'expression du gène voisin, Itch. En plus de la peau plus sombre caractéristique des mutants agouti, cette lignée est affectée par une hyperplasie des organes lymphoïdes et une inflammation sévère du foie et du tractus digestif. Les souris mutantes sont également affectées d'une irritation cutanée sévère, qui fait qu'elles se grattent constamment, et furent surnommées souris « Itchy », d'où le nom donné au gène et à la protéine qu'il code, Itch.

### 1.1.1 La famille *Nedd4/Usp5p*

Itch fait partie d'une famille de protéines comptant une dizaine de membres, caractérisée par une architecture commune, et une activité enzymatique de liaison de l'ubiquitine à différentes protéines substrats. Les membres fondateurs de cette famille, et aussi les mieux connus, sont la ligase Nedd4 (Neuronal precursor cells expressed developmentally down-regulated protein 4) et Rsp5p, l'unique homologue connu chez la levure *S. cerevisiae*. La liaison de l'ubiquitine à des protéines substrats est une modification postraductionnelle commune, résultant le plus souvent en la dégradation des substrats et aussi parfois en la modification de la localisation intracellulaire ou de l'activité des substrats (voir section 1.2) (Rotin et al., 2000).

### **1.1.2 Structure**

Les ligases de la famille Nedd4/Rsp5p possèdent toutes un domaine HECT (Homologous to E6-AP Carboxy-terminus) à leur extrémité C-terminale, qui leur confère leur activité catalytique. Ce domaine contient une boucle responsable de la liaison à l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine et une autre boucle contenant le site actif construit autour de la cystéine responsable de la liaison avec l'ubiquitine. Le transfert de l'ubiquitine vers le substrat est assuré par un résidu phénylalanine localisé à la fin du domaine.

La partie N-terminale des ligases de type Nedd4/Rsp5p est constituée d'un domaine C2, permettant l'association de ces protéines avec les phospholipides et les inositols polyphosphates des membranes cellulaires et responsable de leur localisation intracellulaire. Entre le domaine C2 et le domaine HECT se situe un nombre variable de petits motifs WW (deux à quatre selon la protéine), constitués d'environ 40 acides aminés et caractérisés par la présence de deux résidus tryptophanes (W) permettant aux ligases d'interagir avec leurs protéines substrats via des petits motifs riches en proline. Le consensus usuel de ces motifs est PXXYP (Ingham et al., 2004) (Figure 1-1).

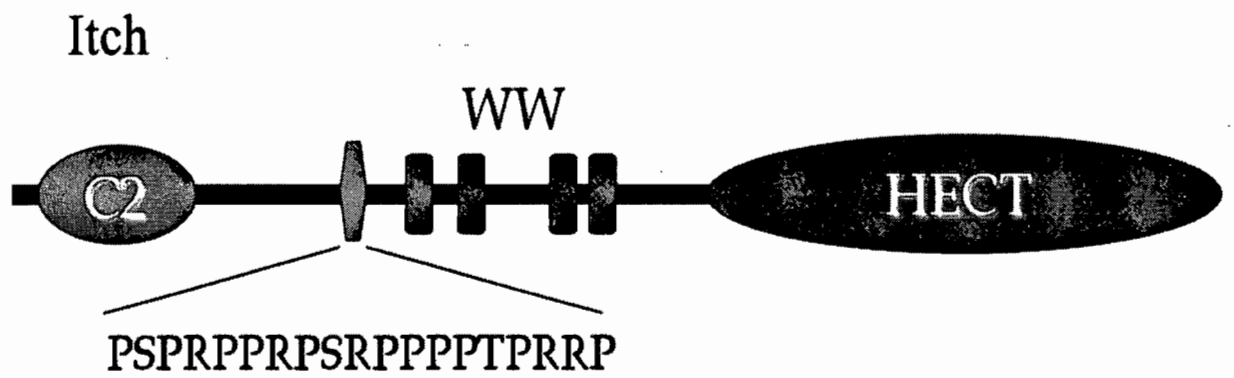


Figure 1-1 : **les différents domaines de Itch**. Itch possède un domaine catalytique HECT, 4 domaines d'interaction WW, un domaine riche en proline (PRD) et un domaine C2.



### **1.1.3 Ligases appartenant à la famille**

La famille des Nedd4 regroupe neuf protéines chez l'humain : Nedd4, Nedd4-2/Nedd4L, WWP1/Tiul1, WWP2, Smurf1, Smurf2, HecW1/NEDL1, HecW2/NEDL2 et AIP4/Itch.

Smurf-1 et Smurf2 sont impliquées dans la suppression de la signalisation des récepteurs de TGF $\beta$  par la dégradation d'une protéine de la voie de TGF $\beta$ , Smad2 (Kuratomi et al., 2005). Aussi, ces 2 ligases sont recrutées vers une protéine régulatrice de la voie TGF $\beta$ , Smad7 qui peut moduler l'activité de Smurf2 en facilitant le recrutement de l'enzyme de transfert de l'ubiquitine UbcH7 vers la ligase (Chong et al., 2006; Ogunjimi et al., 2005). L'importance des ligases Smurf vient donc de leur effet sur la voie TGF $\beta$ , impliquée non seulement dans l'inhibition de la prolifération des cellules épithéliales, mais aussi dans la stimulation de la prolifération des fibroblastes. Les ligases Smurf1 et Smurf2 agissent également sur les facteurs de transcription RUNX2 et RUNX3 par leur domaine WW et cause leur ubiquitylation et leur dégradation dans les protéasomes et régule par ce mécanisme l'invasion des cellules cancéreuses dans le sein et la prostate (Kaneki et al., 2006). La ligase WWP1 est impliquée également dans le cancer, notamment le cancer de la prostate et le cancer du sein. En effet, des études ont montré que l'expression de WWP1 augmente de 58% dans les cellules cancéreuses du sein (Chen et al, 2007). WWP1 monoubiquityle le suppresseur de tumeur p53, permettant sa translocation du noyau vers le cytoplasme. Par conséquent, l'activité transcriptionnelle de p53 est inhibée par WWP1 malgré une élévation dans le niveau d'expression de p53 (Laine and Ronai, 2007; Chen and Matesic, 2007). Il

existe d'autres substrats de WWP1 comme les facteurs de transcription KLF2 et KLF5, qui contiennent 3 domaines à doigts zinc sur leur extrémité C-terminale et qui ont un rôle dans plusieurs processus biologiques comme la prolifération, le cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation et l'angiogenèse (Chen and Matesic, 2007; Chen et al., 2005; Zhang et al., 2004). En 2001, les études de Jerry Lingrel ont montré que WWP1 inhibe l'activité transcriptionnelle de KLF2. D'autres études ont ensuite montré que WWP1 interagit avec KLF2 par son domaine inhibiteur et promeut l'ubiquitylation et la dégradation de KLF2 dans les protéasomes (Zhang et al., 2004). En outre, l'expression de WWP1 est corrélée avec celle de KLF5 dans le cancer de la prostate et du sein, ce qui montre indirectement que WWP1 peut contribuer à la tumorigenèse en modulant l'expression et l'activité de ces 2 facteurs de transcription (Chen et al., 2005).

Un autre membre de la famille des Nedd4 est NEDL2/HecW2 qui permet d'ubiquityler le suppresseur de tumeur p73 par l'intermédiaire d'une interaction WW/PY (Miyazaki et al., 2003). Par contre, NEDL2/HecW2 stabilise le niveau de p73 et augmente son activité transcriptionnelle par un mécanisme qui reste mal compris.

### **1.1.4 Régulation des ligases de type HECT**

#### **1.1.4.1 Localisation cellulaire**

Les ligases de la famille des Nedd4 sont localisées au niveau de la membrane plasmique, du cytoplasme et du noyau. Elles se retrouvent aussi au niveau des compartiments endocytiques comme l'endosome précoce, l'endosome tardif et l'appareil de Golgi (Chen and Matesic, 2007). Par exemple, Itch est localisé au niveau des compartiments

endosomaux. Leur domaine C2 est nécessaire mais pas suffisant pour leur localisation au niveau des endosomes (Angers et al., 2004). La surexpression de la protéine Itch dépourvue du domaine C2 se localise au niveau cytoplasmique et non plus juste endosomale. WWP1 est localisée au niveau des endosomes dans la lignée des cellules squelettiques musculaires C2C12 (Flasza et al., 2006). Nedd4 est déplacé vers la mitochondrie après la stimulation des IGF-1R et les protéines Nedd4 sont localisées au niveau du noyau (Peruzzi et al., 2001). Cette localisation dépend de leur interaction avec d'autres protéines intracellulaires. En effet, après la stimulation des récepteurs de TGF $\beta$ , Smad-7 s'accumule au niveau du noyau où elle interagit avec Smurf1 ou WWP1 (Ebisawa et al., 2001). Ce complexe sort ensuite du noyau pour interagir avec T $\beta$ R1. Le même effet est observé avec WWP1 qui sera exclue du noyau suite à la stimulation des récepteurs Notch. Donc, le changement de la localisation des Nedd4 semble être un modulateur majeur pour l'accessibilité d'interaction avec leur substrat ainsi que leur activité. Dans le cas de Itch, aucune étude n'a encore rapporté de corrélation entre son activité et sa localisation intracellulaire. Par exemple, le domaine catalytique de WWP1 est nécessaire pour maintenir la localisation de WWP1 au niveau de noyau et pour le transfert de l'ubiquitine (Flasza et al., 2006).

#### **1.1.4.2 Phosphorylation des substrats**

Plusieurs membres de la famille des Nedd4 sont modulés positivement ou négativement par phosphorylation. Par exemple, l'activité de la ligase Nedd4-2 est modulée par phosphorylation de résidus thréonine et sérine par la kinase SGK1 induit par les

glucocorticoïdes en réponse à différents stimuli comme l'insuline ou le facteur de croissance de type insuline, l'aldostérone, la vasopressine et le NGF (Nerve Growth Factor). Cette phosphorylation survient lorsqu'un stimulus active la kinase SGK1 qui à son tour interagit par son motif PY avec le domaine WW de Nedd4-2 et permet de la phosphoryler, causant ainsi une diminution dans son activité catalytique (Snyder et al., 2002) . La phosphorylation des substrats peut être un modulateur de leur ubiquitylation. Cette phosphorylation peu promouvoir ou inhiber leur interaction avec leur E3 ligases ainsi que leur ubiquitylation. Par exemple, la phosphorylation du motifs inhibiteur de l'immunorécepteur basé sur la tyrosine (ITIM) est nécessaire pour son interaction et son ubiquitylation par la ligase de l'ubiquitine Cbl (walter et al., 2008). Ainsi pour la protéine oncogénique cyclin D1, sa phosphorylation sur le résidu thréonine 286 promeuve son interaction avec le complexe Skp1-Cul1-F box (SCF) qui induit son ubiquitylation (Lin DI, 2006).

#### **1.1.4.3 Protéases de l'ubiquitine**

Les enzymes de désubiquitylation sont des protéases qui clivent spécifiquement le lien peptidique à l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine, inversant de ce fait la réaction d'ubiquitylation. Plusieurs études montrent que certaines ligases de l'ubiquitine sont associées avec les DUB à l'état de base et ces DUB renversent directement l'action de l'ubiquitylation de leur substrats et l'ubiquitylation de la ligase par elle même (Baek, 2003) .

Un exemple bien décrit de modulation d'une ligase de type Nedd4 par un DUB est l'association entre Rsp5 et Ubp2. Rsp5 se lie à Ubp2 via Rup1. Elle permet de rapprocher,

par le biais de son domaine UBA, Rsp5 à Ubp2 et facilite la désubiquitylation de Rsp5. Elle permet aussi de réguler la formation des chaînes de polyubiquitine sur le substrat de Rsp5. La perte de l'activité de Ubp2 corrèle avec la diminution du niveau de Rsp5 et une diminution de son activité intrinsèque. L'interaction entre Rsp5 et Ubp2 peut expliquer en partie comment le substrat de Rsp5 peut être mono ou polyubiquitylée. Ubp2 peut promouvoir la monoubiquitylation de certaines cibles par un cycle d'ubiquitylation et de désubiquitylation alors qu'elle clive la chaîne d'ubiquitine liée directement sur le substrat (Kee et al., 2006).

### **1.1.5 Quelques substrats de Itch**

L'homologue humain de Itch est aussi connu sous le nom de AIP4 (Atrophin-1-interacting protein 4). Ce gène code une protéine de 846 acides aminés. Itch est la seule ligase de la famille Nedd4 qui contient un domaine riche en proline (PRD : proline rich domain). Ce domaine a la capacité d'interagir avec les domaines SH3 (Src homology 3). C'est en utilisant le domaine SH3 lors du criblage d'une banque d'expression que notre groupe a identifié Itch comme une protéine interagissante avec l'endophiline (Angers et al., 2004). Puis, nous avons montré que cette interaction est médiée via le domaine PRD de Itch. Entre temps, plusieurs autres substrats de Itch ont été identifiés, ces substrats interagissent avec Itch par son domaine WW, comme notch et occludin qui sont des protéines d'association à la membrane (Qui et al., 2000 ; Traweger et al., 2002), deux protéines nucléaires, les facteurs de transcription NF-E2 et Jun (Chen et al., 2001), la HEF-1 (Human Enhancer of Filamentation-1) (Feng et al., 2004) et la protéine inhibitrice de la voie des TGF $\beta$ , Smad-7

(Bai et al., 2004). Récemment, plusieurs autres substrats de Itch ont été identifiés comme la protéine anti-apoptotique c-Flip impliquée dans la mort cellulaire en réponse au TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha) 5, les deux suppresseurs de tumeur de la famille des p53, p73 et p63 (Rossi et al., 2005), et l'ubiquitine ligase à domaine RING, Cbl (Magnifico et al., 2003).

Itch peut être régulé par plusieurs voies de signalisation cellulaire comme la voie des JNK (c-Jun N-terminal Kinase), la voie des TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor) et voie de la Src Kinase. L'activation de la voie des TNF- $\alpha$  augmente la phosphorylation de JNK et par conséquent celle de Itch. Ceci augmente l'activité ligase de Itch ainsi que l'ubiquitylation de son substrat c-Flip et diminue son niveau intracellulaire (Chang et al., 2006) Par contre, l'activation de la kinase Fyn cause la phosphorylation de Itch sur les résidus tyrosine et par la suite diminue son activité intrinsèque ainsi que l'ubiquitylation de ses substrats (Yang et al., 2006) Donc, l'activité de Itch peut être modulée positivement ou négativement par des kinases activées en réponse à des stimuli extracellulaires.

### ***1.1.6 Itch dans le système immunitaire***

À cause des désordres immunitaires sérieux de la souris (Itchy), plusieurs travaux ont tenté d'élucider le rôle de Itch dans le système immunitaire. Il est rapidement apparu que les cellules T des souris Itchy se différencient anormalement en cellules Th2. Dans ce contexte, le facteur de transcription JunB a été identifié comme un substrat important de Itch. Il a été proposé que l'absence de Itch résulte en une surexpression de Jun B, qui serait responsable de la différenciation anormale des cellules T (Li et al., 1999; Fang et al., 2002).

Chez les jeunes souris mutantes Itchy, l'irritation de la peau est précédée d'un gain

de taille important des nœuds lymphoïdes, ce qui suggère que la perte de Itch affecte l'activation et le développement des cellules T13. La stimulation des cellules T primaires par l'anticorps CD3 avec l'anti-CD28 montre une petite augmentation dans la prolifération et la production de l'interleukine IL-2. Par contre, dans les mêmes conditions, la production de IL4 et non de l'interféron IFN- $\gamma$  est augmenté dans les cellules Itch-/- (Fang et al., 2002). L'augmentation de IL4 s'accroît lorsque les cellules Itch-/- CD4 T sont différenciées en cellules Th2. Ces études suggèrent alors que Itch joue un rôle dans la différenciation sans avoir un effet sur le processus d'activation initial (Gomez-Martin et al., 2008).

Jun B joue un rôle dans la différenciation des cellules CD4T en cellules Th1 et Th2 parce que la perte de JunB dans les cellules T réduit la production des cytokines et diminue la réponse immunitaire médiée par Th2. Itch dans ce processus peut inhiber la production de Th2 et la différenciation des cellules T par l'ubiquitylation et la dégradation de JunB résultant en la diminution de son niveau intracellulaire (Fang et al., 2002).

La cytokine proinflammatoire TNF est un signal pour la mort ou la survie cellulaire. Selon le contexte, TNF- $\alpha$  peut activer NF- $\kappa$ b ou JNK. L'activation de NF- $\kappa$ b favorise la survie cellulaire, tandis que l'activation de JNK stimule l'apoptose. Récemment, Itch a été impliqué dans le maintien de cet équilibre. Suite à la stimulation des récepteurs TNF- $\alpha$ , Itch induit l'ubiquitylation de la protéine anti-apoptotique c-FLIP dont l'activation est médiée par le NF- $\kappa$ b. La dégradation de c-Flip dans les protéasomes par Itch inhibe la survie cellulaire et induit l'apoptose (Chang et al., 2006).

### **1.1.7 Régulation des récepteurs par Itch**

Itch régule aussi négativement les récepteurs Notch. Notch est un important récepteur trans-membranaire qui régule l'oncogenèse. Une dysfonction de ces récepteurs cause la formation de tumeurs. Les études récentes ont montré que Itch régule l'endocytose et la dégradation de Notch en causant sa mono-ubiquitylation et poly-ubiquitylation. Itch interagit directement avec l'extrémité N-terminale du récepteur Notch1 (Chastagner et al., 2008 ; Qiu et al., 2000). Chez les souris *Itch*<sup>-/-</sup>, il y a une augmentation du niveau des récepteurs Notch à la membrane et ceci est corrélé avec une augmentation dans la signalisation de l'Akt, augmentant ainsi la survie cellulaire (Matesic et al., 2006). En effet, les récepteurs Notch sont impliqués dans le développement cellulaire et ils peuvent signaler au niveau de la membrane plasmique pour activer la voie de l'Akt responsable du maintien de la survie cellulaire. Après leur stimulation, ces récepteurs sont rapidement internalisés pour être dégradés par la suite dans les protéasomes. La diminution du niveau de Itch cause un blocage de la dégradation de ces récepteurs; Itch provoque donc indirectement l'internalisation de ces récepteurs et leur dégradation (Matesic et al., 2006).

Itch a également été impliqué dans la régulation du récepteur CXCR4. Ce récepteur appartient à la grande famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires et est activé par la liaison du facteur SDF-1. L'activation des récepteurs CXCR4 induit une variété de signaux qui permettent la survie cellulaire, la prolifération, la chimiotaxie, la migration et l'adhésion. La surexpression des CXCR4 dans les cellules cancéreuses est associée avec les métastases. Itch ubiquityle CXCR4 suite à une stimulation par SDF-1 et cause la dégradation lysosomale du récepteur (Marchese et al., 2003).



La signalisation via les récepteurs TGF $\beta$  est aussi modulée par l'activité ligase de l'ubiquitine Itch. La diminution de l'expression de Itch dans les fibroblastes embryonnaires des souris entraîne une diminution de la phosphorylation de Smad-2, Smad-4 et Smad-7 (Bai et al., 2004). En effet, Itch favorise la formation d'un complexe entre le récepteur et Smad-2, ce qui améliore la transcription induite par TGF $\beta$ . Itch régule donc la signalisation de TGF $\beta$  indépendamment de l'ubiquitylation du récepteur, par la modulation de la phosphorylation de Smad-2 (Bai et al., 2004; Lallemand et al., 2005).

Itch régule aussi l'endocytose du récepteur TRPV4 qui est un membre de la famille des récepteurs de potentiel transitoire (TRP). Itch est capable d'interagir et d'ubiquityler ce récepteur. Ceci n'induit pas sa dégradation dans les protéasomes mais réduit son expression au niveau de la membrane plasmique (Wegierski et al., 2006)

### **1.1.8 *Itch et l'endocytose***

Itch est impliqué dans l'endocytose par la modulation des protéines impliquées dans l'internalisation des récepteurs comme l'endophiline et Cbl.

L'endophiline est une protéine de 40kDa qui existe en 3 isoformes, l'endophiline A1 exprimée au niveau du cerveau, l'endophiline A2 exprimée partout et l'endophiline A3 exprimée au niveau des testicules et du cerveau. L'endophiline possède un domaine Bar à son extrémité N-terminale qui lui permet d'initier la courbure de la membrane lors de l'invagination des puits recouverts de clathrine, qui deviennent des vésicules endocytiques. Les domaines N-Bar sont capables de se dimériser et de se lier à la membrane. Elle possède aussi un domaine SH3 qui lui permet d'interagir avec d'autres protéines endocytiques, notamment la dynamine, qui est la GTPase responsable de la fission des vésicules tapissées

de clathrine lors de l'endocytose (Simpson et al., 1999; Takei et al., 1995), la synaptojanine, qui régule la formation des vésicules par la déphosphorylation de PI(4,5)P<sub>2</sub> 22 et l'amphyphysine, qui est impliquée dans les étapes ultimes du détachement des vésicules, en participant via le recrutement de la dynamine (Micheva et al., 1997; Shupliakov et al., 1997). Plusieurs autres protéines interagissent avec le domaine SH3 d'endophiline, dont deux ont été identifiés lors du criblage d'une banque d'expression d'ADNc de cerveau de rat : la GLK (germinal center kinase-like kinase-GLK) qui est reliée à la voie de la JNK, et Itch dont il est question ici (Angers et al., 2004; Ramjaun et al., 2001).

Un autre substrat de Itch impliqué dans l'endocytose est la ligase de l'ubiquitine Cbl. Cbl est une ligase de l'ubiquitine présente dans les cellules sous trois isoformes : c-Cbl, Cbl-c et Cbl-b. Cbl-c et c-Cbl possèdent un domaine riche en proline et un domaine associé à l'ubiquitine dans leur extrémité C-terminale (UBA) et un domaine en doigt de zinc Ring responsable de leur activité catalytique (Soubeyran et al., 2002; Wang et al., 2001; Szymkiewicz et al., 2002). Par contre, Cbl-b ne possède pas de domaine UBA et son domaine PRD est plus petit. La famille des Cbl est responsable de l'ubiquitylation de plusieurs récepteurs tyrosine kinase, notamment les récepteurs de l'EGF (Epidermal Growth Factor) et les récepteurs du facteur de croissance des plaques sanguines. Cette ubiquitylation est reliée à leur internalisation par endocytose. 30 c-Cbl est aussi impliquée dans la régulation des kinases comme Src, Syk and Fyn 28. La forme mutée de Cbl, Cbl-V, ne possède pas la moitié N-terminale de la protéine et agit comme un dominant négatif et augmente la transformation cellulaire par l'inhibition de l'internalisation des récepteurs tyrosines kinases et l'augmentation de leur activité (Thien et al., 2001). Récemment, on a montré que Cbl est la cible des ligases de l'ubiquitine Nedd4 et Itch. Cette ubiquitylation est suffisante

pour entraîner la dégradation des protéines Cbl dans les protéasomes et par conséquent la diminution de l'internalisation des récepteurs de l'EGF (Magnifico et al., 2003).

Des études ont montré que l'inhibition de la formation du complexe Cbl-CIN-85-endophiline bloque l'internalisation des récepteurs de l'EGF. Itch pourrait donc être impliqué dans la régulation des récepteurs à activité tyrosine kinase par l'ubiquitylation de l'endophiline et de Cbl.

## **1.2 L'ubiquitylation**

La dégradation des protéines cellulaires est importante pour la réponse cellulaire. Dans le cas des récepteurs  $TFN\alpha$ , leur activation mène à la dégradation des protéines anti-apoptotiques c-Flip suite à leur ubiquitylation par Itch, ce qui est nécessaire afin que la cellule entre en apoptose (Chang et al., 2006). Ainsi, la régulation de la protéolyse de ces protéines est impliquée dans plusieurs processus intracellulaires critiques comme la différenciation, le métabolisme lipidique, et d'autres. Généralement, deux systèmes cellulaires sont responsables de la dégradation des protéines cellulaires : le système lysosomal et le système protéosomique. La dégradation lysosomale est médiée principalement par des protéases comme la cathepsine K et la calpaïne. Des patients dépourvus de la cathepsine K souffrent d'un désordre dans le remodelage des os appelé pycnodysostose (Motyckova et al., 2001). La calpaïne appartient au groupe des protéases à cystéine dépendant du calcium qui sont impliquées dans l'adhésion, le réarrangement du cytosquelette, l'inflammation et l'apoptose. La calpaïne est constituée d'une grande sous-unités de 80 KDa et d'une petite sous-unités de 30 KDa dont l'élimination cause la mort à

des stades embryonnaires précoces (Croall et Ersfeld, 2007).

Cependant la majorité des protéines cellulaires sont dégradées dans les protéasomes. Dans ce processus, les protéines sont marquées par une chaîne d'ubiquitine, et sont transférées directement vers les protéasomes 26S. La protéine destinée à la dégradation se lie via la chaîne d'ubiquitine à des régulateurs de protéases dépendant de l'ATP. Cette protéine est ensuite dépliée par un processus nécessitant l'hydrolyse de l'ATP. La protéine dépliée est transférée vers l'intérieur du protéasome où elle est dégradée par des endopeptidases, aminopeptidases et carboxypeptidases.

Le mécanisme enzymatique responsable de l'ubiquitylation a été originellement décrit dans les années 80 par Hershko, Rose et Ciechanover, récipiendaires du prix Nobel de chimie en 2004 pour cette contribution. Hershko et ses collègues ont purifié et reconstitué le système de dégradation protéasomale dépendant de l'ATP par le fractionnement cellulaire des réticulocytes qui sont des globules rouges dépourvus de lysosomes. Plusieurs étapes subséquentes ont amené à la découverte du mécanisme d'ubiquitylation (Hershko et al., 1980).

Le premier rôle décrit pour les réactions d'ubiquitylation est la dégradation des substrats dans les protéasomes. Cependant, nous savons maintenant que l'ubiquitylation des protéines joue également un rôle indépendant des protéasomes. L'ubiquitine est identifiée comme un signal important pour le recrutement des récepteurs dans les vésicules endocytiques et la régulation du sort de ces récepteurs dans les compartiments intracellulaires (Miranda and Sorkin, 2007). La conjugaison de l'ubiquitine aux protéines est impliquée dans leur stabilité, leur activité, et leur localisation dans de nombreux processus intracellulaires incluant la réparation de l'ADN et l'activité transcriptionnelle et

traductionnelle (Hershko and Ciechanover, 1998; Hicke and Dunn, 2003; Pickart, 2004). Pour que l'ubiquitine soit liée à son substrat, la glycine de son extrémité C-terminale est liée d'une façon covalente avec le groupe  $\epsilon$ -aminé de résidus lysine du substrat ou d'une autre molécule d'ubiquitine dans le but de former des chaînes. Les différents rôles de l'ubiquitylation s'expliquent par la nature des chaînes ainsi que le nombre de molécules d'ubiquitine ajoutées au substrat.

Il existe trois formes d'ubiquitylation : la monoubiquitylation, la multiubiquitylation et la polyubiquitylation. La monoubiquitylation consiste en la fixation d'une seule molécule d'ubiquitine sur le substrat (Hicke, 2001; Marmor and Yarden, 2004). La multiubiquitylation consiste en la fixation d'une seule molécule mais sur plusieurs lysines du substrat. Ces deux formes ne sont pas un signal pour la dégradation du substrat dans les protéasomes, mais influent sur la localisation et l'activité des substrats (Pickart, 2004). La polyubiquitylation consiste en la fixation d'une chaîne des molécules de l'ubiquitine sur un ou plusieurs résidus lysine du substrat (Pickart, 2004).

La molécule d'ubiquitine possède elle-même plusieurs résidus lysines (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63) et toutes ces lysines peuvent accepter des molécules d'ubiquitine afin de former des chaînes de polyubiquitines. Le résidu à l'intérieur de la molécule de l'ubiquitine sur laquelle se forme la chaîne est crucial pour déterminer le sort de la protéine ubiquitylée. Ainsi, les chaînes de polyubiquitines formées sur la K48 sont considérées comme les plus fréquentes et causent la dégradation de la protéine conjuguée par les protéasomes. En accord avec son rôle dans la dégradation des substrats, la lysine K48 est la seule lysine essentielle pour la viabilité des cellules de levures, car l'inhibition de la dégradation de certaines protéines inhibitrices du développement est nocifs à la cellule

(Pickart, 1997; Clague and Urbe, 2006).

Le deuxième type de chaîne le plus abondant est les chaînes de polyubiquitines liées par la K63. Ces chaînes sont impliquées dans plusieurs processus, mais surtout au niveau de la réparation de l'ADN, parce que la polyubiquitylation de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) par des chaînes K63 est nécessaire pour sa translocation nucléaire et la correction des erreurs dues aux dommages à l'ADN (Chiu et al., 2006). En plus, les cellules portant des mutations sur la K63 de l'ubiquitine et qui ne peuvent pas former ce type de chaînes montrent une hypersensibilité aux ultraviolets, ce qui cadre bien avec le rôle critique des chaînes K63 pour le maintien de l'intégrité génomique. La polyubiquitylation via des chaînes K63 est aussi observée sur les protéines TRAF2 et TRAF6. Ces deux protéines sont des ligases à domaine RING et sont capables de s'autoubiquityler : elles forment alors sur elles-mêmes des chaînes d'ubiquitine via la K63 ce qui augmente leur capacité à phosphoryler I $\kappa$ B $\alpha$  entraînant l'activation de cette voie de signalisation. La principale différence entre les chaînes d'ubiquitine K48 et K63 et qui explique leur impact fort différent pour la protéine substrat est leur conformation tridimensionnelle. Les chaînes K63 adoptent une conformation allongée par des interactions intramoléculaires. La conformation fermée des chaînes K48 est reconnue par les protéasomes tandis que la conformation ouvertes des chaînes K63 permet d'autres types d'interaction (Clague and Urbe, 2006).

Il est cependant beaucoup plus difficile d'établir le mécanisme qui permet la formation des chaînes K48 versus les chaînes K63. Certaines enzymes E2 pourraient être responsables de la sélection du type de chaînes transférées aux E3 et, éventuellement, aux substrats.

### **1.2.1 Réaction d'ubiquitylation**

La conjugaison de l'ubiquitine à son substrat est médiée par 3 enzymes : La première étape de liaison à l'ubiquitine débute par l'activation enzymatique de l'ubiquitine par une enzyme activatrice (E1) qui utilise l'ATP pour générer une forme d'ubiquitine énergétique et réactive au thiolester. La seconde étape consiste à transférer l'ubiquitine activée vers une enzyme de transfert de l'ubiquitine (E2). Environ 50 E2 différentes ont été identifiées, lesquelles pourraient conférer une certaine spécificité à cette étape de liaison (Wetz ad Dixit, 2008). La troisième étape est le transfert de l'ubiquitine activée vers le substrat protéique. Cette réaction s'effectue par une protéine ligase de l'ubiquitine (E3). L'enzyme E3 s'associe à la fois au substrat protéique et à l'enzyme E2 contenant l'ubiquitine activée, puis catalyse le transfert de l'ubiquitine vers son substrat (Figure 1-2).

La plupart des organismes contiennent seulement une forme de E1, une douzaine de formes de E2 et un grand nombre de formes de l'enzyme E3, qui assurent la spécificité de la réaction d'ubiquitylation. Ces E3 sont divisées en 2 familles fonctionnant différemment au niveau du mécanisme de transfert de l'ubiquitine au substrat. On trouve la famille des RING (Really Interesting New Gene) possédant un domaine en doigt de zinc et la famille des HECT (Pickart, 2001a). Récemment, d'autres familles plus petites ont été décrites comme les protéines à domaine U-box et à domaine PHD (Plant-Homeo Domain) (Ardley et Robinson, 2005).

Il existe d'autres modifications post-transcriptionnelles similaires à l'ubiquitylation.

La première modification est la sumolisation. SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) est une petite protéine similaire à l'ubiquitine. Les premiers membres de la famille des gènes SUMO ont été découverts chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* où ils sont impliqués dans la mitose et la méiose (Meluh and Koshland, 1995). Plus tard, plusieurs isoformes de SUMO ont été identifiés, SUMO-1 ou PIC-1 (Boddy et al., 1996), SUMO-2 et SUMO-3 (Lapenta et al., 1997; Chen et al., 1998). La structure tri-dimensionnelle de SUMO est semblable à celle de l'ubiquitine (Bayer et al., 1998). Les résidus diglycine dans l'extrémité C-terminale de SUMO et de l'ubiquitine sont identiques. Ces résidus sont le site de fixation au groupement NH<sub>2</sub> de la lysine de l'enzyme de conjugaison-ligation et de la protéine cible. La similitude entre SUMO et l'ubiquitine, laisse présager que les mécanismes d'activation, de conjugaison et de ligation sont aussi comparables. La sumolisation joue un rôle important dans le transport nucléaire, la régulation de la transcription, l'apoptose et la stabilité des protéines (Bayer et al., 1998).

La deuxième modification est la néddylation. Elle utilise le complexe de l'enzyme de l'activation E1 composé de deux sous-unités APP-BP1 et UBA3 et l'enzyme E2 UBC12 (Wada et al., 2000). Les seuls substrats connus de la néddylation sont les membres de la famille des protéines Cullin : Cul1, Cul2, Cul3, Cul4A, Cul4B et Cul5, qui sont modifiées par Nedd8 chez les mammifères. Plusieurs études se concentrent sur l'isoforme Cul1. Il peut interagir avec l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine CDC34, la kinase Skp1 et la protéine F-Box qui forme avec eux un complexe Skp1/Cul1/F-box ayant une activité ligase de l'ubiquitine (Bai et al., 1996; Lisztwan et al., 1998). In vitro, la néddylation de Cul1 est essentielle pour l'ubiquitylation de I $\kappa$ B $\alpha$  (Seol et al., 1999), ce qui montre que la néddylation peut jouer un rôle dans la reconnaissance des substrats par certaines ligase de



l'ubiquitine.

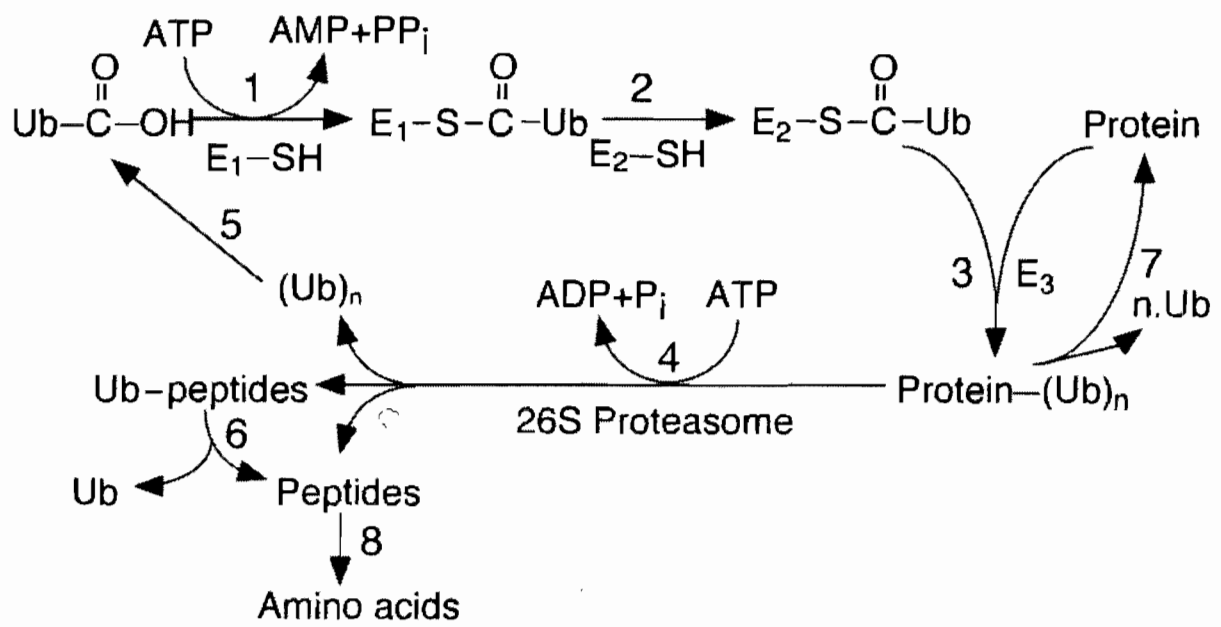


Figure 1-2 : la réaction d'ubiquitylation nécessite l'action de 3 types d'enzymes, appelées E1, E2 et E3. E1 (ubiquitin-activating enzyme) active l'ubiquitine en formant avec elle un thiol-ester, et la transmet à E2 (ubiquitin-carrier protéin), qui également fixe l'Ub par un thiol-ester. E2 ensuite, soit par l'intermédiaire de E3 (ubiquitin-protein ligase), soit avec E3, transfère l'Ub sur le substrat (Hershko et Ciechanover, , 1998)

### **1.2.2 Différents types de ligases de l'ubiquitine**

La famille des ligases à domaine HECT a été découverte lors d'études menées sur le suppresseur de tumeur p53 et les interactions avec les Ubch5 et Ubch7 (Honda and Yasuda, 2000) (Schwarz et al., 1998). Le faible niveau de p53 présent dans les cellules infectées par le virus papillomavirus est causé par son association avec l'E6AP. Suite à des études biochimiques, on a été démontré que E6-AP est une ligase de l'ubiquitine qui catalyse le transfert de l'ubiquitine vers p53 et subséquemment dirige sa dégradation protéasomale (Daniels et al., 1998). Le domaine C-terminal de A6-AP est le domaine catalytique retrouvé dans un grand nombre de ligases de l'ubiquitine (domaine HECT). Dans cette famille, l'ubiquitine sera transférée par une liaison thioester de l'E2 vers les ligases de l'ubiquitine E3 qui à leur tour transfèrent l'ubiquitine vers le substrat.

Les ligases RING n'ont pas une fonction enzymatique propre mais activent les enzymes E2 et agissent comme adaptateur entre cette enzyme et le substrat. Ces interactions facilitent le transfert de l'ubiquitine vers le substrat. Ces ligases contiennent aussi des domaines d'interaction protéique qui peuvent moduler la reconnaissance des substrats (Pickart, 2004; Pickart, 2001b) Elles peuvent aussi être divisées en sous unités simple ou multiples. Les ligases RING ayant une seule sous unité, comme Cbl, contiennent le domaine RING et le site de reconnaissance du substrat sur le même polypeptide. Les ligases RING ayant plusieurs sous unités, comme la famille du complexe SCF (Skp1/Cullin 1/F-box), sont formées d'une combinaison de domaines de plusieurs protéines ce qui rend la reconnaissance du substrat plus complexe.

D'autres protéines contenant des domaines spécifiques peuvent avoir une activité de ligase de l'ubiquitine. Ces protéines sont considérées comme des extensions des familles des ligases. On reconnaît d'abord les protéines avec un domaine U-box. Ce domaine est constitué de 70 acides aminés et adopte une structure très similaire à celle des domaines RING. Ces protéines permettent d'allonger les chaînes des ubiquitines déjà formées sur un substrat par les enzymes E1, E2 et E3 (Ardley et Robinson, 2005). Un autre domaine contenant une activité ligase de l'ubiquitine est constitué de 4 cystéines et une histidine et forme un doigt de zinc similaire à celui des ligases à domaine RING. Les protéines à domaine PHD sont majoritairement impliquées dans l'ubiquitylation de protéines nucléaires et appartiennent généralement à des modules qui se lient aux chromosomes. Elles peuvent aussi jouer un rôle dans l'ubiquitylation des protéines de la signalisation cellulaire et la régulation de la dynamique des mitochondries (Ardley et Robinson, 2005).

#### **1.2.2.1 Régulation par phosphorylation**

La phosphorylation est un mécanisme de modification post-traductionnelle des protéines dans laquelle des enzymes spécialisées, les kinases, ajoutent un groupe phosphate sur la chaîne latérale d'un ou plusieurs résidus spécifiques de leurs substrats. Dans les cellules animales, les résidus habituellement modifiés sont les sérines, les thréonines ou les tyrosines. Cette phosphorylation a pour effet de moduler l'activité de la protéine en question soit positivement soit négativement et aussi elle peut affecter ses interactions. Récemment, plusieurs études ont mis en évidence la régulation de certaines ligases de l'ubiquitine par la phosphorylation. En fait, l'interaction entre le substrat et

l'enzyme E3 est modulée soit par la phosphorylation du substrat soit par la phosphorylation de la ligase de l'ubiquitine elle-même. Chez les mammifères, la phosphorylation régule l'internalisation des récepteurs d'EGF. L'autophosphorylation du récepteur permet son interaction avec la ligase de l'ubiquitine Cbl qui induit la multiubiquitylation du récepteur. À son tour, EGFR induit la phosphorylation de Cbl, ce qui lui permet de reconnaître le complexe CIN85-endophiline (Soubeyran et al., 2002). Récemment, des études ont montré que la kinase Abl permet d'inhiber le recrutement de Cbl vers la membrane plasmique en réponse à l'EGF sans perturber sa stabilité. Abl permet alors de bloquer la formation du complexe EGFR et Cbl et inhibe l'endocytose des EGFR dépendante de Cbl (Tanos et Pendergast, 2006).

Certaines ligases de l'ubiquitine sont phosphorylées directement et cette phosphorylation peut affecter leur activité et leurs interactions. Par exemple, La kinase CDC2 phosphoryle et augmente l'activité de la ligase de l'ubiquitine APC (Anaphase Promoting Complex) (Kramer et al., 2000). Par contre, la phosphorylation de la ligase de l'ubiquitine BRCA1-BARD1 par la CDK2 inhibe son activité (Hayami et al., 2005). Récemment encore, Gao et al. ont montré que Itch est activé après sa phosphorylation par la kinase JNK (Gao et al., 2004). Cette phosphorylation changerait sa conformation et augmenterait son interaction avec son substrat c-Jun (Gallagher et al., 2006).

### 1.2.2.2 Régulation de l'interaction entre les ligases et leurs substrats

La reconnaissance des substrats par les ligases de l'ubiquitine peut être affectée par leur interaction avec d'autres protéines auxiliaires. Certaines protéines interagissent avec la ligase de l'ubiquitine comme par exemple, Sprouty, un inhibiteur de la voie de signalisation des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) (Egan et al., 2002; Haglund et al., 2002) qui interagit avec Cbl et empêche son interaction avec les récepteurs d'EGF ce qui permet d'inhiber l'ubiquitylation du récepteur et son internalisation (Haglund et Dikic, 2005). La protéine Alix joue indirectement le même rôle, en séquestrant CIN-85 dont l'interaction avec Cbl est nécessaire pour l'internalisation des récepteurs d'EGFR (Schmidt et al., 2004). Par contre, la Smad-7, un inhibiteur de la voie TGF $\beta$ , interagit avec la ligase de l'ubiquitine Smurf-1 et la recrute au niveau de la membrane plasmique, facilitant son interaction avec le récepteur et son ubiquitylation (Ebisawa et al., 2001).

## 1.2.3 Désubiquitylation

### 1.2.3.1 Les protéases de l'ubiquitine

Les DUB sont classées en deux familles : les hydrolases C-terminal de l'ubiquitine (UCH) et les protéases spécifiques de l'ubiquitine (USP) (Baek, 2003). Il existe aussi trois autres familles moins abondantes qui sont les protéases reliées aux tumeurs ovariennes OTU, les protéases avec des domaines Josephin et les protéases avec des motifs JAMM.

La famille des UCH est associée aux protéasomes et impliquée dans la génération et

le recyclage des chaînes d'ubiquitines conjuguées sur les protéines lors de la dégradation dans les protéasomes. Les UCH sont généralement des petites protéines (20-30 Kda) et la plus connue est l'UCH-L1 qui est essentielle dans la régulation de la dégradation des protéines cytoplasmiques impliquées dans les maladies de Parkinson et l'Alzheimer et les fonctions synaptiques normales (Setsuie et Wada, 2007). Comparée avec les UCH, la famille des USP est beaucoup plus grande (60-300) constitue la majorité des DUB et est capable d'hydrolyser les ubiquitines des substrats ubiquitinés et les sauver de la dégradation par les protéasomes (Hochstrasser, 1995). C'est une famille de protéases récemment découvertes qui permet d'hydrolyser la liaison de l'ubiquitine aux substrats et les chaînes de polyubiquitine. La protéase la plus connue de cette famille est la A20, un régulateur négatif dans la voie des NFκB (Wertz et al., 2004). FAM appartient à la famille des USP et est capable de moduler l'activité de ses substrats en hydrolysant l'ubiquitine des substrats avant leur rentrer dans les protéasomes (Wood et al., 1997)

Le domaine Josephin est un domaine monomérique qui a une conformation globulaire et possède une activité de désubiquitylation. Ces domaines peuvent lier l'ubiquitine directement et hydrolyse les chaînes de polyubiquitine séparées de leur substrat avant leur entrer dans les protéasomes (Baek, 2003).

Les protéases à domaine JAMM (JAB1/MPN/Mov34 metalloenzyme) se distinguent des deux autres classes par la présence des motifs liant le métal et l'absence des doigts de Zinc. Leur rôle est l'hydrolyse des ubiquitines liées sur les substrats afin que ces derniers puissent être dégradés dans les protéasomes (Baek, 2003).

### 1.2.3.2 Rôles fonctionnels des protéases de l'ubiquitine

Comme la phosphorylation, l'ubiquitylation est un processus réversible. L'attachement des ubiquitines sur les substrats peut être inversé par l'action des DUB. Dans les cellules eucaryotes, les ubiquitines sont synthétisées sous forme de précurseurs fusionnés avec les sous unités des ribosomes (Baek, 2003). Une des fonctions importantes des DUB est de dissocier les ubiquitines des protéines ribosomales par clivage protéolytique, ce qui rend les ubiquitines disponibles pour la conjugaison avec les enzymes E1.

Plusieurs autres rôles sont associés aux DUB comme, la régénération des monomères d'ubiquitine, la désubiquitylation des substrats et le désassemblage des chaînes de polyubiquitines libres.

Les chaînes d'ubiquitines sont séparées des substrats et recyclées au niveau des protéasomes. Les DUB sont impliquées dans le recyclage des ubiquitines associées aux substrats lorsque ces derniers parviennent aux protéasomes {Borodovsky, 2001 #441}. Elles assurent ainsi le maintien d'un niveau adéquat dans les cellules. Les DUB sauvent les ubiquitines et assure le recyclage des ubiquitines et le maintien d'un niveau adéquat dans la cellule. Une mutation dans ces enzymes provoque des défauts dans le développement cellulaire à cause de la diminution de la disponibilité de l'ubiquitine. L'ubiquitylation et la dégradation de certaines protéines impliquées dans l'apoptose ou la mort cellulaire programmée ainsi que d'autres processus cellulaires comme l'internalisation des récepteurs membranaires, l'inflammation et d'autres n'est plus possible, et les cellules s'en trouvent profondément mal en point. (Baek, 2003).

Certaines DUB interagissent directement avec des protéines substrats et les



désubiquitylent spécifiquement. Un des exemples de ce phénomène est la désubiquitylation de CYLD (cylindromatosis), qui a une activité de suppresseur de tumeur dû à sa capacité d'inactiver la voie des NFκB. En effet, CYLD permet d'hydrolyser l'ubiquitine liée sur TRAF2 et TRAF6, deux protéines inhibitrices de la voie TNF, et augmente leur stabilité dans la cellule causant une augmentation indirecte de leur activité (Trompouki et al., 2003; Kovalenko et al., 2003). Aussi, CYLD désubiquityle la protéine proapoptotique Bcl-3 et prévient sa translocation vers le noyau, un mécanisme clé pour activer la signalisation de la voie des NFκB (Massoumi et al., 2006) Un autre exemple est la DUB HAUSP qui permet de désubiquityler le suppresseur de tumeur p53 et augmente sa stabilité cellulaire (Lim et al., 2004; Li et al., 2002) ainsi que l'enzyme d'ubiquitylation Mdm2 (Fuchs et al., 1998).

#### **1.2.3.3 Le désassemblage des chaînes de polyubiquitine**

L'accumulation des chaînes de polyubiquitine peut inhiber la dégradation protéasomale et devenir toxique pour la cellule. Ces chaînes sont le résultat de la dégradation des substrats dans les protéasomes parce que les chaînes doivent être hydrolysées du substrat afin que ce dernier soit accessible pour les protéasomes (Baek, 2003) Pour résoudre ce problème, la levure a recours à des DUB spéciale comme la DUB Ubp14 qui permet de désassembler les ubiquitines à partir de l'extrémité de la chaîne des polyubiquitine et rendre les ubiquitines disponibles pour l'ubiquitylation des substrats. L'importance de Ubp14 est démontrée par le fait que la déficience en Ubp14 augmente le nombre des chaînes de polyubiquitine et inhibe la dégradation protéasomale des substrats (Amerik et al., 1997).

## **1.3 Endocytose**

### **1.3.1 Internalisation des protéines membranaires**

Le développement des organismes multicellulaires demande une régulation précise de la transduction des signaux intracellulaires en réponse aux stimuli extracellulaires. La signalisation incontrôlée cause des anomalies dans le développement et des maladies comme le cancer. Les récepteurs membranaires sont les molécules clés qui reçoivent et transmettent la signalisation cellulaire de l'environnement extracellulaire vers le milieu intracellulaire. La liaison du ligand à son récepteur active des effecteurs et déclenche une cascade d'événements causant une réponse cellulaire spécifique. La régulation du niveau membranaire soit du récepteur soit du ligand est donc important pour la modulation de la transduction du signal. L'endocytose joue un rôle clé dans cette régulation.

Le maintien de l'intégrité cellulaire et de la réponse biologique dépend du transport de nombreuses molécules membranaires et extracellulaires vers l'intérieur de la cellule. Ce mécanisme de transport est réalisé grâce à l'intervention de différents mécanismes d'endocytose requérant la mobilisation de plusieurs protéines chargées de former une vésicule endocytique qui est ensuite transportée aux endosomes. La principale voie d'internalisation des vésicules est la voie dépendante de la clathrine. D'autres voies ont été décrites, principalement via les cavéoles, mais nous nous contenterons ici d'examiner la voie dépendante de la clathrine que l'on croit responsable de l'internalisation d'environ 50% des récepteurs de surface internalisés suite à leur activation (Le Roy and Wrana,

2005).

la voie de l'endocytose a été étudié au premier temps chez les levures et les études chez les mammifères qui ont précédées ont montré que cette voie est similaire chez ces deux espèces. L'internalisation est suivie du transport de la vésicule vers les vacuoles/lysosomes par l'intermédiaire des endosomes précoces et tardifs (Riezman, 1998). Les études de l'endocytose chez les levures ont porté sur deux types des récepteurs membranaires. Le premier type appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G, représentés par les récepteurs du facteur  $\alpha$ , Ste2p et le récepteur de facteur  $\alpha$ , Ste3p. Le deuxième type est la famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) et des transporteurs MSF (Multi Facilitators Superfamily) qui modulent la capacité des organismes unicellulaires à s'adapter rapidement aux fluctuations des signaux extracellulaires (Horak, 1997).

### ***1.3.2 Endocytose dépendante de la clathrine***

La voie d'endocytose dépendante de la clathrine permet l'internalisation des nutriments, des pathogènes, des antigènes, des facteurs de croissance et des récepteurs actifs (Le Roy and Wrana, 2005). Cette voie débute par la formation d'un manteau de clathrine autour d'une portion de la membrane plasmique qui deviendra la vésicule endocytique (Brodsky et al., 2001). La clathrine s'assemble en triskèles pour former des structures appelées cages. Ces propriétés d'assemblage spontané ont suggéré que la clathrine est le moteur responsable de la déformation de la membrane lors de la formation des vésicules. Par ailleurs, le maillage rigide formé par le réseau de clathrine permettrait de piéger les récepteurs en cours d'internalisation. Cet assemblage est stimulé par une famille

de protéines adaptatrices, les adaptines (Bonifacino and Dell'Angelica, 1999). Le complexe AP-2 ferait le lien entre la membrane plasmique, les récepteurs et la clathrine, d'où leur nom adaptines. La fission des vésicules de la surface de la membrane plasmique est due à une protéine à activité GTPasique, la dynamine. Cette hypothèse a été confirmée par le fait que l'expression de mutants de la dynamine incapables d'hydrolyser ou de lier le GTP inhibe la formation des vésicules tapissées de clathrine (Damke et al., 1994). D'autres ont montré que la dynamine est capable d'interagir directement avec des liposomes, de les déformer en tubes et de morceler ces tubes en vésicules en présence de GTP (Takei et al., 1995; Sweitzer et Hinshaw, 1998). La dynamine est organisée en plusieurs domaines fonctionnels dont un domaine C-terminal riche en proline qui interagit avec une série de protéines à domaines SH3 qui jouent différents rôles dans l'endocytose (Figure 3).

Une de ces protéines est l'intersectine, qui assure la connexion avec la cytosquelette d'actine, mais pourrait aussi intervenir dans le recrutement de la dynamine au sein des puits tapissés de clathrine. L'endophiline et l'amphiphysine interagissent aussi avec la dynamine. Ces deux protéines possèdent un domaine Bar, que l'on croit impliqué dans la génération de la courbure négative de la membrane plasmique nécessaire à la formation des vésicules (Gallop et al., 2006).

La protéine interagissante avec le Huntington (HIP) interagit aussi avec la clathrine et l'AP-2 et joue un rôle dans la régulation de l'endocytose et la cytosquelette d'actine. Ces protéines pourraient aussi être impliquées dans les étapes ultimes du détachement des CCV, en participant au recrutement de la dynamine indirectement (Shupliakov et al., 1997).

L'Eps15 participe aussi aux événements de l'endocytose des récepteurs activés. L'Eps15 a été identifiée comme un substrat de phosphorylation du récepteur de l'EGF. De

plus, Eps15 est associée de façon constitutive au complexe AP-2, par une interaction directe avec l'oreille de l' $\alpha$ -adaptine. Cette interaction se fait par l'intermédiaire de motifs DPF (Asp-Pro-Phe) présents dans la partie carboxy-terminale d'Eps15 (Benmerah et al., 1996). Il est apparu récemment que l'endocytose des récepteurs membranaires, notamment les récepteurs couplés aux protéines G et les récepteurs à activité kinase, jouent un rôle actif dans le contrôle spatio-temporel de leur signalisation, et certaines protéines de l'endocytose dépendante de la clathrine participent directement à la transduction du signal (Le Roy et Wrana, 2005) (Figure 1.3).

La spécificité et la séquence de transport des vésicules nécessite des fusions membranaires contrôlées par plusieurs protéines comme SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) attachment protein (SNAP) receptors) et les membres de la famille des Rab. Les SNAREs établissent la spécificité de fusion des membranes par l'assemblage entre v-SNARE sur la vésicule et t-SNARE sur la membrane cible afin de former le complexe SNARE. Le résultat de ce complexe est la fusion entre la vésicule et la membrane cible. Les protéines Rab peuvent contrôler la fusion membranaire par le recrutement des protéines endocytiques vers le complexe SNARE. Par exemple, les Rab5 régulent la fusion des endosomes précoces avec les endosomes de tri. Les autres Rab comme les Rab4 et les Rab11 ont été localisées au niveau d'endosomes spécifiques de la voie endocytique et définissent des domaines distincts de ces compartiments. Rab4 régule le recyclage direct et rapide des molécules à partir des endosomes de tri alors que Rab11 est plutôt impliquée dans le recyclage indirect par les endosomes de recyclage.

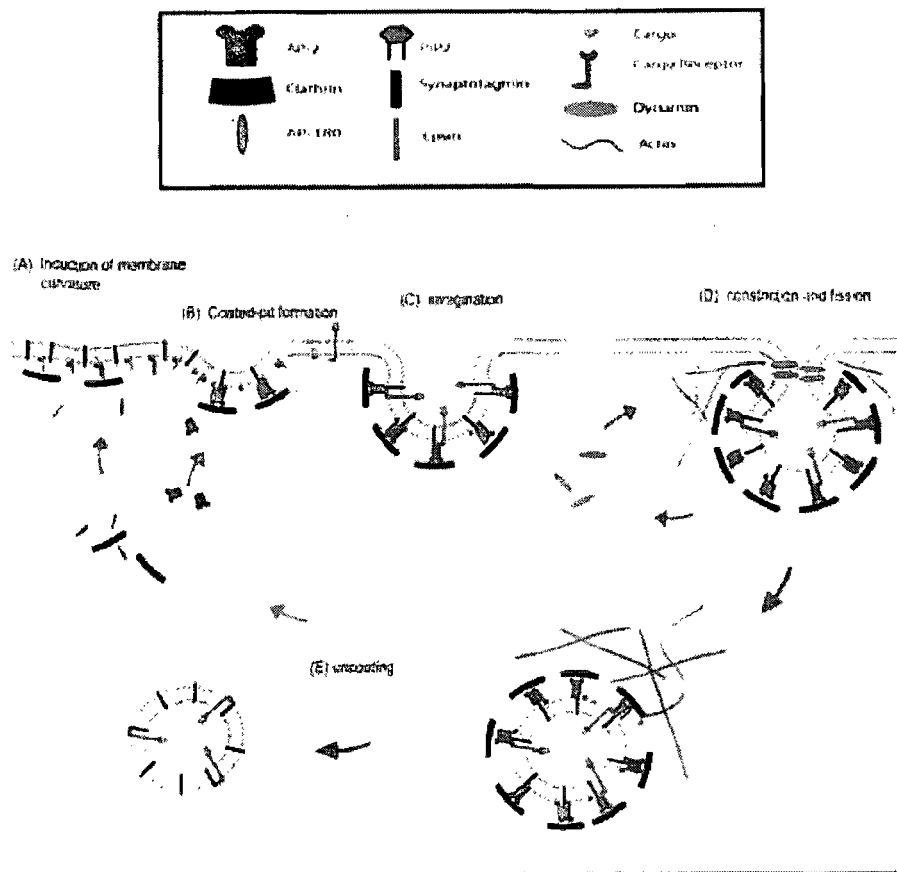


Figure 1-3: Mécanisme de l'endocytose dépendante de la clathrine. L'endocytose commence par le recrutement de l'adaptateur AP-2 (1) puis l'assemblage de la clathrine pour former un puits (2). Après, la dynamine est recrutée (3) et le puits commence à s'invaginer (4). La dynamine se localise sur le cou du puits (5) et initie la fission de la vésicule (6). La vésicule est libérée pour se diriger vers les endosomes (7) et l'AP-2 est recruté vers la membrane pour un nouveau cycle d'endocytose (8) (Mousavi et al., 2004).

### **1.3.3 Compartiments endocytiques**

Le transport des molécules de la membrane plasmique vers les lysosomes implique 3 étapes majeures : l'endocytose dépendante de la clathrine, le trafic endosomal et la dégradation lysosomale. Les vésicules tapissées de clathrine qui se forment au niveau de la membrane plasmique fusionnent avec les vésicules internes pour former les endosomes précoces. Les compartiments endosomaux sont caractérisés par leur morphologie tubulo-vésiculaire et peuvent être divisés en endosomes précoces et tardifs et une structure intermédiaire, les vésicules multilamellaires. Il est incertain si les endosomes sont des compartiments différents préexistant ou s'ils sont une forme de maturation des vésicules membranaires endocytées, malgré qu'ils soient différents dans leur morphologie, leur localisation, leurs caractéristiques physiques et leur composition en protéines.

Les endosomes précoces sont des vésicules tubulaires localisées en périphérie de la cellule alors que les endosomes tardifs sont sphériques et localisés plus près du noyau. Les corps multilamellaires sont des structures intermédiaires causés par l'invagination de la membrane des endosomes tardifs et leur fusion avec des vésicules internes ce qui leur confère leur structure multilamellaire. Malgré que les corps multivésiculaires sont considérés comme des endosomes tardifs, plusieurs caractéristiques morphologiques et physiques les distinguent. À noter que le pH diffère entre les compartiments endosomaux. Il commence à 5.5-6.5 au niveau des endosomes précoces puis il se réduit vers 4.5-3.5 dans les endosomes tardifs et les lysosomes.

Suite à l'internalisation, la vésicule endocytique néoformée se dégage de la clathrine et fusionne avec le compartiment endosomal. Le cargo est ainsi transféré aux membranes

des endosomes et acheminé jusqu'au lysosomes. Ceci se réalise par fusion des différents endosomes et des structures endosomales préexistantes. Les vésicules néoformées fusionnent avec les endosomes de tri et les endosomes tardifs. Comme leur nom l'indique, les endosomes de tri permettent de décider de la destination finale du cargo soit vers la membrane plasmique soit vers les lysosomes. Plusieurs récepteurs membranaires sont transmis des endosomes de tri vers les endosomes tardifs par des vésicules multilamellaires (MVB : Multi vesicular body) où ils seront internalisés à l'intérieur de ces vésicules et acheminés vers les lysosomes pour leur dégradation. Par contre, les récepteurs destinés à être recyclés vers la surface plasmique sont soit acheminés directement à partir des endosomes de tri soit indirectement par les compartiments endocytiques de recyclage.

Les membranes cellulaires contiennent plusieurs phospholipides dont quelques-uns sont distribués d'une façon spécifique pour former des microdomaines et permettent le recrutement des protéines contenant de domaines de liaison aux lipides. PI(4,5)P2 est un lipide enrichi au niveau de la membrane plasmique et sert à recruter plusieurs protéines endocytiques comme l'AP-2, l'AP-180, la dynamine, l'amphiphysine, l'intersectine et l'épsine qui se lie avec le PIP2 par leur domaine ANTH ou PH. Par contre, le PIP3 est enrichi au niveau de la membrane des endosomes et interagit avec les protéines contenant les domaines FYVE comme Hrs et EEA1. Les membranes des endosomes tardifs sont enrichies spécifiquement par l'acide lysobiphosphatidique qui est impliqué dans l'invagination de leur membrane interne (Haucke et al. 2005).

Le trafic endosomal est régulé par plusieurs modifications post-traductionnelles et plusieurs protéines de la famille des Rab qui sont des effecteurs ayant une fonction



GTPasique. Sur la membrane des endosomes tardifs, Rab5 joue un rôle crucial dans le recrutement d'autres protéines comme l'EEA1, la Radaptin-5 et la rabenosyn-5 qui induit la fusion des endosomes précoces et recrute aussi deux classes de phosphatidyl inositol triphosphate, PI(3)PK (I et III) qui ont une structure similaire mais leur fonction est différents. Alors, une interaction entre les protéines et les phospholipides membranaires est nécessaire pour réguler le cheminement du cargo (Le Roy et Wrana, 2005).

### ***1.3.4 Influence de l'ubiquitylation sur l'endocytose***

Il existe des protéines qui possèdent des domaines liant les ubiquitines. Ces protéines sont nommées les protéines à domaine liant l'ubiquitine et jouent un rôle crucial dans la régulation de la stabilité des protéines, leur localisation subcellulaire et leur propriété d'interaction avec les autres protéines. La première DUB retrouvée est la sous-unité S5a du protéasome (Rpn10 chez les levures) qui contient un motif d'interaction avec l'ubiquitine UIM nécessaire et suffisant pour lier la surface hydrophobe de l'ubiquitine. Le S5a peut sélectionner les chaînes de polyubiquitine et joue un rôle dans la reconnaissance des substrats polyubiquitylés par les protéasomes (Elsasser et al., 2002).

Ces protéines jouent le rôle d'adaptateur entre la machinerie d'ubiquitylation et la voie endocytique. Ces protéines ne sont pas douées d'une activité enzymatique mais composées des domaines d'interactions protéines-protéines et protéines-lipides et contiennent des sites potentiels pour des modification post-traductionnelles comme la phosphorylation et l'ubiquitylation. Elles possèdent normalement plus qu'un seul domaine d'interaction et peuvent interagir avec plusieurs protéines en même temps ou

simultanément pour former un complexe protéique actif. Ces protéines adaptatrices interagissent et reconnaissent plusieurs signaux ou motifs dans le domaine intracellulaire du récepteur et facilitent l'assemblage de tout un complexe nécessaire pour son endocytose (Hurley et al., 2006). En effet, elles contiennent des domaines spécifiques comme les domaines homologues à l'Eps-15 (EH), les domaines liant les résidus tyrosines phosphorylés, et les domaines interagissant avec l'ubiquitine.

Plusieurs protéines endocytiques possèdent une ou plusieurs copies d'une petite séquence de 20 acides aminés s'appelant le motif d'interaction avec l'ubiquitine (UIM) qui se lie avec l'ubiquitine (Hurley et al., 2006). Ils permettent de monoubiquityler les récepteurs membranaires et de les connecter avec la machinerie d'endocytose au niveau de la membrane plasmique ou au niveau des vésicules endocytiques. Ces 2 protéines endocytiques, Epsin et Eps-15, possèdent un domaine UIM et forment un complexe avec la protéine adaptatrice AP-2 qui est responsable de la formation des puits tapissés de clathrine (CCP) (Benmerah et al., 1998; Chen et al., 1998; Polo et al., 2002), et la fission des vésicules (Shih et al., 2002). Hrs et STAM sont aussi deux protéines endocytiques qui contiennent des domaines UIM. Elles fixent les molécules d'ubiquitine et régulent de l'entrée du cargo ubiquitylé dans les corps multivésiculaires. L'inhibition de l'expression de STAM cause un retard dans la dégradation des récepteurs EGF, ce qui montre qu'elle est impliquée dans le tri des récepteurs vers les lysosomes (Kanazawa et al., 2003). Plusieurs protéines à domaine UIM sont elles-mêmes ubiquitylées mais le rôle de cette ubiquitylation n'est pas encore connu. Il a été suggéré que cette monoubiquitylation permet la reconnaissance des récepteurs ainsi que d'autres protéines endocytiques.

Récemment, un autre groupe des protéines adaptatrices contenant un domaine PTB

(phosphotyrosine Binding) a été impliqué dans le transfert des récepteurs endocytés vers les vésicules. Notamment, Disabled (Dab) et Numb. Malgré qu'il soit bien connu que ces protéines se lient aux motifs tyrosine phosphorylés, d'autres études ont montré que ces protéines engendrent aussi des interactions protéines-lipides (Calderwood et al., 2003). Par exemple, le domaine PTB de Dab2 interagit avec le motif NPXY dans la région cytoplasmique des récepteurs LDL (Low Density Lipoprotein) indépendamment des tyrosines phosphorylées et interagit aussi avec la PIP2 (Calderwood et al., 2003) pour réguler l'internalisation des récepteurs LDL. Entre autre, ces protéines interagissent avec des protéines endocytiques. Dab2 a 2 motifs DPF (aspartate-proline-phenylalanine) qui interagissent avec la sous-unité alpha d'AP2 et 5 motifs NPF qui interagissent avec les protéines endocytiques à domaine EH. Il est donc suggéré que cette famille de protéines adaptatrices peut sélectivement lier le récepteur à la machinerie d'endocytose.

## **1.4 Les récepteurs tyrosine kinase**

Les facteurs de croissance contrôlent la croissance cellulaire, la prolifération, la différenciation, la survie et la migration en activant leur récepteur membranaire spécifique. Les récepteurs à activité tyrosine kinase ont été impliqués initialement dans la communication cellulaire dans les organismes pluricellulaires. Ces récepteurs sont caractérisés par la présence dans leur portion intracellulaire d'une activité tyrosine kinase activée par la liaison du ligand. Généralement, la liaison du ligand cause la dimérisation de deux récepteurs, puis l'autophosphorylation du récepteur et l'activation de l'activité tyrosine kinase. Ces phosphorylations induisent une cascade de transduction du signal impliquée dans le développement normal des cellules.

### **1.4.1 Activation des récepteurs par leurs ligands**

La fixation du ligand sur son récepteur spécifique induit la dimérisation des récepteurs, l'autophosphorylation des résidus tyrosine et l'activation du domaine PTK intramembranaire qui induit l'activation des récepteurs et des messagers secondaires. Quelques ligands sont dimériques comme le PDGF et le VEGF alors que d'autres sont monomériques comme l'EGF. L'autophosphorylation régule le recrutement des protéines effectrices vers le récepteur. Ces protéines effectrices sont normalement des protéines adaptatrices ou des enzymes qui contiennent des domaines d'interaction protéiques comme le domaine Src homology 2 (SH2) et des domaines de liaison aux phosphotyrosines (PTB) qui reconnaît les tyrosines phosphorylés du récepteur. Ces protéines adaptatrices sont

responsables du recrutement d'autres protéines de signalisation pour créer une cascade de signalisation qui induit la croissance cellulaire (Wiley et Burcke, 2003).

L'initiation de la signalisation cellulaire au niveau de la membrane plasmique se termine par une réponse nucléaire où les facteurs de transcription sont activés et régulent l'expression de gènes cibles (Lo et al., 2006). La signalisation des récepteurs de la famille des RTK peut être interconnectée par plusieurs protéines modulatrices ce qui crée une mosaïque de signalisation complexe. Ces modifications peuvent être sous forme de phosphorylation, méthylation, acétylation, hydroxylation ou ubiquitylation.

Nous allons dans les paragraphes qui suivent d'écrire la signalisation et l'endocytose des récepteurs à l'EGF puisque ces récepteurs sont le modèle de notre étude.

#### **1.4.2 Le récepteur du facteur de croissance épidermique**

La famille des EGFR contient 4 types classés suivant leur différence dans la structure, ces membres sont l'EGFR (EGFR/ErbB1/HER1), le Neu/ErbB2/HER2, le Erb3/HER3 et le Erb4/HER4. La famille des EGFR est exprimée dans le tissu épithélial, mésodermique et neuronal. Dans le tissu épithélial, l'EGFR est localisé dans la partie basolatérale. Ils peuvent transmettre leur signal vers le mésoderme jusqu'au tissu épithélial où ils jouent un rôle important dans le développement de l'embryon, et la croissance cellulaire, la différenciation chez les adultes et la survie des cellules épithéliales. Plusieurs études ont montré qu'un dysfonctionnement des EGFR causent des maladies cancéreuses (Sibilia, 2007 #307). Par exemple, l'atténuation de la signalisation des EGFR dans les souris cause la mort de ces souris au stade embryonnaire. Aussi, le Knock out des EGFR cause directement le mort de

l'embryon dû à une déficience dans le développement du cerveau, de la peau, du foie, et de l'intestin, alors que le Knock out dans les 2 autres familles, ErbB2 et ErbB3, cause aussi la mort de l'embryon mais à cause du développement anormal du tissu cardiaque seulement (Miettinen et al., 1995 #447; Threadgill et al., 1995; Sibia et Wagner, 1995).

Les ligands de la famille des EGFR contiennent un domaine de liaison au récepteur composé d'un domaine EGF-like, et 3 boucles intramoléculaires combinées par des ponts disulfure. Les ligands sont relâchés de la partie transmembranaire du récepteur par l'action des métalloprotéinases. Des ligands comme l'EGF, le TGF $\beta$ , l'amphireguline et la  $\beta$ -celluline sont spécifiques pour l'EGFR alors que d'autres ligands comme l'épireguline et l'héparine peuvent se lier sur l'EGFR et l'ErbB4. La Neuregulin 1 (NRG) se lie sur l'Erb3 et l'ErbB4 alors que le NRG 2, 3 et 4 lient spécifiquement l'ErbB4 (Wells, 1999).

#### **1.4.2.1 Principales voies de signalisation**

Comme tous les récepteurs tyrosine kinase, les EGFR sont composés d'un domaine de fixation du ligand extracellulaire suivi par un seul domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique contenant l'activité tyrosine kinase conservée entre des séquences régulatrices. La fixation du ligand sur ces récepteurs induit la dimérisation suivie de l'autophosphorylation de résidus tyrosine dans le domaine intracellulaire. Les tyrosines phosphorylées recrutent et activent alors des protéines qui ont un domaine SH2 (Src Homology 2) capable d'interagir spécifiquement avec les phosphotyrosine (Odaka et al., 1997) (Lemmon et al., 1997). Parmi les protéines à domaine SH2, on retrouve la PI3-kinase (Phosphatidyl-inositol 3- kinase), GAP (GTPase Activating protein) et la phospholipase C

gamma. Ces liaisons conduisent alors à une phosphorylation de ces protéines substrat stimulant leur propre activité enzymatique et enclenchent ainsi la signalisation du récepteur (Wells, 1999) (figure 1-4).

La structure cristallisée du domaine extracellulaire du récepteur montre qu'il est construit de 4 sous-domaines (I à IV), le domaine I et III se lie au ligand alors que la région riche en cystéine dans le domaine II est responsable de la dimérisation du récepteur. Une interaction intramoléculaire entre les cystéines du domaine II et du domaine IV peut jouer un rôle dans le maintien du récepteur sous forme inactif et inhibé. La liaison du ligand sur son récepteur induit un changement de conformation dans le domaine extracellulaire causant l'exposition du domaine de dimérisation de deux monomères.

La conséquence la plus importante de l'activation des RTK est l'activation d'une somme des voies de signalisation aboutissant à des conséquences qui peuvent être opposées. Nous décrirons deux voies principales activées par la stimulation des EGFR : la voie de l'Akt et la voie de JNK.

#### 1.4.2.1.1 La voie de l'Akt

La voie de l'Akt est activée en réponse à plusieurs signaux extracellulaires qui stimulent des récepteurs membranaires tels que les récepteurs ErbB, les récepteurs de facteur de croissance de l'insuline (IGF) et les récepteurs de l'intégrine. Après la stimulation des récepteurs, les tyrosines phosphorylées recrutent la sous-unité régulatrice p85 de la phosphatidyl-inositol kinase 3 (PI3K) par son domaine SH2. Subséquemment, la sous-unité catalytique de PI3K phosphoryle le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) sur la position 3' de l'anneau inositol pour générer le PIP3. Le PIP3, à son tour, sert à recruter vers

la membrane plasmique les protéines ayant un domaine de liaison aux phospholipides comme la kinase dépendante de phosphoinositide (PDK-1) et la kinase B/Akt. L'Akt et la PDK-1 sont spécifiquement recrutées vers la membrane plasmique par leur domaine homologue à la plekstrine (PH) à partir duquel PDK-1 phosphoryle le résidu thréonine 308 dans le domaine kinase de l'Akt. Une autre forme de PDK-1, la PDK-2, phosphoryle Akt sur le résidu sérine 473 pour assurer une activation complète de l'Akt. Une fois activée, l'Akt se transfère de la membrane plasmique vers le cytoplasme et le noyau où elle phosphoryle une variété des substrats impliqués dans des réponses cellulaires spécifiques comme l'évasion de l'apoptose, l'atténuation des signaux de croissance, l'angiogenèse ou l'augmentation du potentiel de l'invasion tissulaire (Jun et al., 1999; LoPiccolo, 2007).

Plus spécifiquement, l'Akt est impliquée dans la régulation de la progression du cycle cellulaire par la phosphorylation des inhibiteurs du cycle cellulaire comme la p21 et la p27 et par l'augmentation de la traduction de la cycline D1 (Liang et al., 2003). La phosphorylation de p21 et p27 par l'Akt les retient dans le cytoplasme, ce qui prévient leur translocation vers le noyau et inhibe leur activité. En plus, l'activité kinase de l'Akt inhibe la kinase de synthèse de glycogène (GSK) et active la glycolyse et le transport du glucose d'où son rôle crucial dans la régulation du métabolisme énergétique. Les études d'O'Conner ont montré que l'Akt peut aussi réguler l'apoptose. En effet, ils ont montré que le signal anti-apoptotique induit par l'Akt est créé par la stimulation du facteur nucléaire Kappa (NFκB) et l'inactivation des protéines pro-apoptotiques comme le promoteur de mort de la famille des Bcl-2 (BAD) et la procaspase-9. Dans les tumeurs qui représentent une surexpression de l'EGFR ou une activation anormale, la voie de PI3K-Akt est importante pour la survie cellulaire ainsi que la prolifération (Henson et Gibson, 2006). La résistance des cellules aux



signaux apoptotiques extracellulaires comme les radiations peut être due à une stimulation continue des EGFR résultant en l'activation de la voie PI3K/Akt d'une façon incontrôlable et la translocation de l'EGFR vers le noyau où ils activent la kinase de l'ADN (DNA-PK), un enzyme majeur dans le mécanisme de réparation des cassures de l'ADN (Milano et Magne, 2003). Donc, les antagonistes contre l'EGFR qui permettent une activation continue de la voie de l'Akt servent comme un outil pour la thérapie des tumeurs résistantes présentant une surexpression de l'EGFR ou une forme constitutivement active.

#### 1.4.2.1.2 La voie du JNK

La voie des MAPK est la plus étudiée parmi les voies de signalisation induite par Ras suite à la stimulation des EGFR. Ces trois voies de signalisation majeures sont la voie de Ras-Raf-MAPK, la voie de la c-Jun-N-terminal Kinase (JNK) ou la voie activée par le stress (SAPK) et la voie de p38. Ces voies peuvent être activées par des récepteurs membranaires ainsi que par une mutation ponctuelle dans les gènes de Ras causant une activation constitutionnelle de Ras. L'EGFR est un stimulateur potentiel de la voie de MAPK par les Ras. L'activation de Ras par ces récepteurs peut être directe ou indirecte par le recrutement de la protéine de liaison aux facteurs de croissance (Grb2) vers les tyrosines phosphorylés du récepteur. Grb2 forme un complexe avec la protéine Son of Sevenless (SoS) qui à son tour phosphoryle et active Ras. Une fois activé, Ras est capable de se lier à Raf qui permet la phosphorylation de la MEK1/2 (mitogen activated extracellular signal regulated protein kinase) et ERK1/2 (extracellular signal regulated kinase). La forme phosphorylée de l'ERK migre vers le noyau et active plusieurs facteurs de transcription qui régulent l'expression des gènes qui contrôlent la prolifération (Cobb et al.,1994)

L'activation continuelle de cette voie de signalisation par une mutation causant l'activation constitutionnelle de Ras peut induire une résistance cellulaire aux radiations ioniques. Une étude a montré que l'activation constitutive de Ras résulte d'une activité autocrine constitutive des récepteurs de l'EGF. Ceci peut activer constitutivement aussi la production des ligands de l'EGFR, le facteur de croissance de tumeur (TGF) et l'amphireguline. Après leur synthèse et leur sécrétion, ces ligands peuvent se lier aux EGFR et causer une activation constitutive de ces récepteurs et de leur cascade de signalisation (Dent et al., 2003).

Plusieurs études ont montré que la signalisation des récepteurs transmembranaires comme les récepteurs à activité tyrosine kinase et les récepteurs couplés aux protéines G qui régulent la différenciation et la prolifération cellulaire passent par la voie de MAPK (Mitogen activated protein Kinase). Les MAPK sont exprimées dans la majorité des cellules eucaryotes. La c-Jun N-terminale Kinase (JNK), ou la protéine kinase activée par le stress cellulaire (SAPK) existe sous trois isoformes, ces isoformes sont encodés par 3 gènes : JNK1 (SAPK $\gamma$ ), JNK2 (SAPK $\alpha$ ) et JNK3 (SAPK $\beta$ ). La structure cristalline de JNK montre que cette protéine est constituée d'un domaine N-terminal de 4 sous-unités de I à IV responsables de l'orientation des molécules de l'ATP et une extrémité C-terminal de 5 sous-unités de VI à XI responsables de la fixation spécifique des substrats et l'ancrage de Mg<sup>2+</sup> ATP. Le motif actif de JNK Thr-Pro-Tyr est localisé dans la sous-unité VIII. JNK est le substrat de deux MAPK kinase, MKK4 et MKK7, qui permettent de phosphoryler JNK sur les résidus tyrosine et thréonine pour l'activer. Par contre, plusieurs MKKK sont capables d'activer la JNK comme MEK kinase, MLK (Mixed Lineage Kinase), ASK (Apoptosis Signal-regulating Kinase) et la TAK (TGF $\beta$ -activated Kinase). Ces MKKK sont alors activées par des ste20 Like kinase

comme la PAK (p21-activated Kinase), la GCK (Germinal Center Kinase) et la HPK (Hematopoetic Progenitor Kinase 1). Le mécanisme de transmission du signal entre les différentes MAPK reste mal connu (Wang et al., 2000).

JNK joue son rôle biologique par la phosphorylation de plusieurs cibles. Comme l'indique son nom, JNK phosphoryle les résidus Ser63 et Ser73 dans l'extrémité N-terminal de c-jun (Derijard et al., 1994). JNK phosphoryle aussi d'autres facteurs de transcription comme l'Elk-1 et l'ATF-2 (Cavigelli et al., 1995). L'ATF-2 est capable de former un dimère avec c-Jun et augmente son activité transcriptionnelle alors que l'Elk-1 est impliqué dans l'induction de gènes c-fos et forme aussi un dimère avec c-Jun pour activer le facteur de transcription, AP-1 (Treisman, 1995). Les substrats de JNK ne sont pas limités aux facteurs de transcription. Lorsque les cellules U937 sont irradiées, JNK est activée et est acheminée vers la mitochondrie où elle phosphoryle et supprime l'effet apoptotique de Bcl-X<sub>L</sub> (Kharbanda et al., 2000). En effet, l'activité de l'AP-1 est inhibée ainsi que l'apoptose dans des fibroblastes embryonnaires isolées des souris déficientes en JNK1<sup>-/-</sup>, JNK2<sup>-/-</sup>. JNK1 peut jouer un rôle dans l'activation des cellules T, JNK2 joue un rôle dans l'activation de la voie apoptotique des cellules T alors que JNK3 est impliquée dans l'apoptose induite par l'exitocologie dans l'hipocampe (Sabapathy et al., 1999).

Malgré l'existence de plusieurs évidences qui montrent l'implication de JNK dans l'activation de la voie apoptotique, plusieurs études montrent un rôle de JNK dans l'amélioration de la survie cellulaire. JNK protège les cellules HeLa contre l'effet apoptotique des photons qui activent la voie de TNF- $\alpha$ , impliquée dans la prolifération des cellules BAF3 et PC-12 (Assefa et al., 1999). Cette diversité peut être expliquée tant par l'isoforme activé

lors d'une stimulation que par l'amplitude et le temps de l'activation de JNK ainsi que l'implication des autres MAPK dans la signalisation.

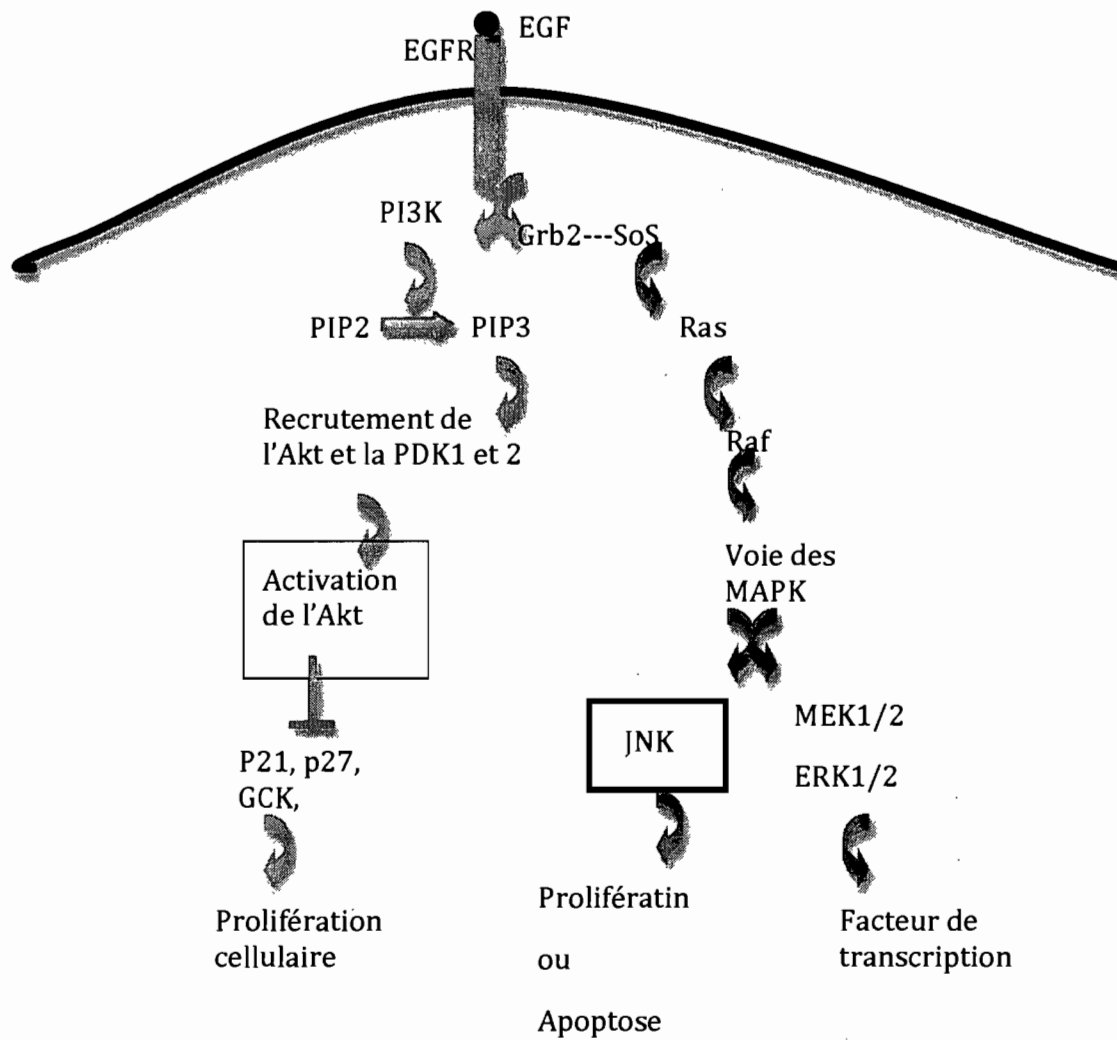


Figure 1-4: Résumé général des différents voies de signalisation de l'EGF citées notamment la voie de l'Akt et la voie de JNK.

### **1.4.2.2 Régulation par l'internalisation**

L'atténuation de la transmission de la signalisation peut être réversible ou irréversible et induite par plusieurs mécanismes intracellulaires. L'atténuation réversible contrôle la durée et l'amplitude du signal alors que l'atténuation irréversible par la dégradation du récepteur contribue à l'inhibition du signal et crée une période de repos avant qu'un autre signal n'arrive. Des exemples de l'atténuation réversible sont la rétroaction négative, les phosphatases et les antagonistes. Par contre, l'atténuation irréversible est atteinte lorsque le récepteur est internalisé par l'endocytose vers les endosomes où il sera dégradé. Ensemble, ces 2 mécanismes contribuent à réguler la signalisation des EGFR pour un meilleur développement cellulaire parce qu'un dérèglement dans ces mécanismes négatifs montré impliqué dans le développement de cancers. En accord avec nos études. L'équipe de Vieira a montré que l'inhibition de l'internalisation de l'EGFR augmente la prolifération cellulaire et module la signalisation des EGFR (Vieira et al., 1996). En effet, la surexpression du mutant de la dynamine K44A dont l'activité GTPasique n'est pas fonctionnelle bloque l'activation de la voie des ERK et augmente la phosphorylation de l'Akt.

### **1.4.2.3 Trafic intracellulaire des récepteurs**

Après la stimulation, les EGFR sont rapidement internalisés à partir de la surface cellulaire par la voie de l'endocytose dépendante de la clathrine ou par les cavéoles. La voie

des cavéoles est activée une fois le stimulus (EGF) est présente en des grandes concentrations. Cette voie permet aux cellules de contrôler l'internalisation de l'EGF en excès. Les récepteurs internalisés sont acheminés aux endosomes précoces puis aux endosomes tardifs, puis aux corps multivésiculaires vers les lysosomes, où ils sont recyclés vers la membrane plasmique. Plusieurs études ont mis en évidence la nécessité de plusieurs signaux cellulaires nécessaires pour l'internalisation du récepteur, comme l'activité tyrosine kinase du récepteur, des séquences des motifs endocytaires localisées dans le domaine intracellulaire et la machinerie d'ubiquitylation (Wells et al., 1999)

Plusieurs études ont montré l'importance de l'ubiquitylation dans la régulation de l'endocytose des EGFR. L'ubiquitylation peut intervenir directement par l'ubiquitylation du récepteur, ou indirectement, par l'ubiquitylation des protéines endocytiques essentielles pour l'internalisation.

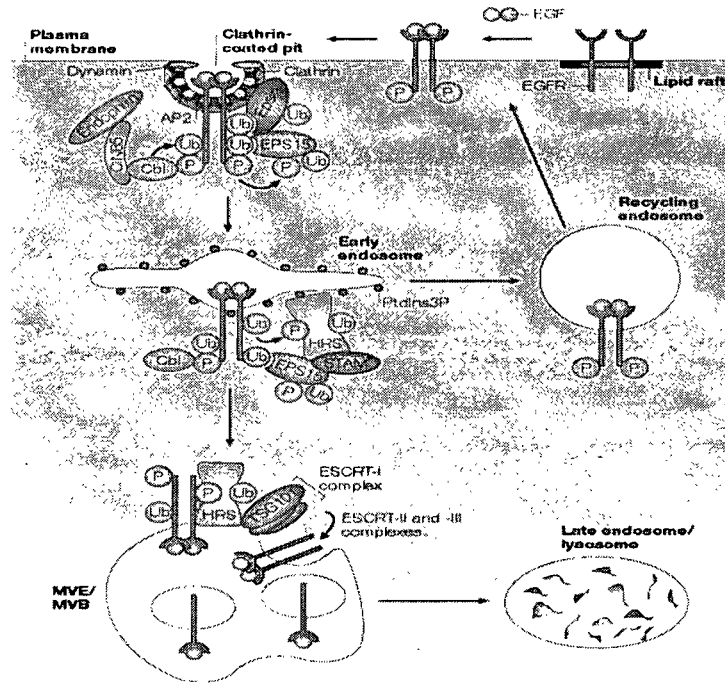
L'ubiquitylation directe du EGFR débute avec sa multiubiquitylation au niveau de la membrane plasmique par Cbl (ligase E3 à domaine RING) qui se lie au récepteur directement via son domaine SH2 ou par l'intermédiaire de Grb2 (Haglund et al., 2002; Waterman et Yarden, 2001; Waterman et al., 2002). En réponse à l'EGF, Cbl est phosphorylé par la kinase Src qui améliore son interaction avec la protéine de 85 kDa interagissant avec Cbl, CIN-85 (Le Roy and Wrana, 2005; Dikic, 2003) qui est constitutivement liée à l'endophiline (Gallop et al., 2006). L'endophiline contient un domaine N-BAR capable d'induire la courbure de la membrane et aide la formation de la vésicule de la membrane plasmique. L'inhibition de l'interaction entre ces trois protéines bloque l'internalisation du récepteur sans affecter son interaction avec Cbl et son ubiquitylation (Soubeyran et al.,

2002). Ce mécanisme semble être commun à d'autres récepteurs tyrosine kinase, comme les récepteurs des facteurs de croissance hépatocytaires, les récepteurs des facteurs de croissance des plaquettes et les c-Kit {Masson, 2006 #455}. L'ubiquitylation de l'EGFR par Cbl est aussi détectée au niveau des endosomes, ce qui montre que Cbl est aussi impliquée dans l'adressage de l'EGFR vers les lysosomes (Longva et al., 2005). En effet, des études ont montré que l'ubiquitylation de l'EGFR par Cbl est essentielle pour le tri de l'EGFR aux endosomes et non pas pour son internalisation (Ravid et al., 2004; Duan et al., 2003; Le Roy et Wrana, 2005)

L'ubiquitylation est impliquée aussi indirectement dans l'internalisation des EGFR par l'ubiquitylation de l'Eps15 et de l'epsin, deux protéines endocytaires qui régulent son endocytose. La phosphorylation de EGFR induit aussi la monoubiquitylation de Eps-15 (EGFR-pathway substrate 15-EPS15) et d'epsine par une ligase E3 non-identifiée. EPS15 et epsine sont des récepteurs d'ubiquitine qui contiennent des domaines UIM (Polo et al., 2002). La monoubiquitylation de l'epsin bloque son interaction avec la protéine adaptatrice AP-2 et la clathrine ce qui montre que l'ubiquitylation peut aussi promouvoir la dissociation des EGFR des adaptateurs de la clathrine (Marmor and Yarden, 2004). Alternativement au niveau des endosomes, le récepteur peut former un complexe avec Eps-15, STAM (Signal Transduction Adaptor molecule) et Hrs (Hepathocyte-growth-factor-Regulated tyrosine kinase Substrat) (Bache et al., 2003). Hrs dirige le récepteur pour l'interaction avec le complexe TSG101 (Tumor Susceptibility Gene 101) et ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Trnasport-1) et l'adresse vers les endosomes tardifs pour sa dégradation et la terminaison de sa signalisation (Marmor et Yarden, 2004) (Figure 1-5).



L'endocytose des EGFR a un rôle significatif dans le contrôle de la signalisation des EGFR par conséquent dans la réponse biologique. Au niveau des endosomes, les EGFR sont capables de lier toutes leurs protéines effectrices notamment mSOS, Ras, Raf, MEK1 et toutes les MAPK. Malgré le blocage de l'activation des EGFR à la surface et de son recyclage, les récepteurs internalisés déjà actifs induisent un signal et favorisent la survie cellulaire (Johannessen et al., 2000).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 1-5: Internalisation des EGFR. Une fois activé, le EGFR s'autophosphoryle et recrute la ligase de l'ubiquitine Cbl, qui le multiubiquitine et s'associe à Cin-85 et l'endophiline. EGFR induit aussi la monoubiquitination de l'Eps-15 et de l'epsin. L'epsin interagit avec l'AP-2, la clathrine et la phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) et forme un complexe avec STAM qui dirige le récepteur vers les endosomes. Aux endosomes, le récepteur qui ne peut pas être recyclé interagit avec HRS phosphorylé qui à son tour interagit avec TSG101 et ESCRTI, ce qui dirige le récepteur dans la lumière intérieure des corps multivésiculaires et après vers les lysosomes où ils sont dégradés. P, phosphate; Ub, ubiquitine (Le Roy and Wrana, 2005).

## **1.5 Apoptose**

L'apoptose, ou la mort cellulaire programmée, est un mécanisme systématique dans lequel la cellule est détruite. Cette mort cellulaire est essentielle pour maintenir le développement et l'homéostasie de l'organisme. Les cellules apoptotiques peuvent se retrouver dans tous les tissus normaux, notamment durant le développement embryonnaire et fœtal où l'élimination des cellules surnuméraires est crucial afin de permettre un développement normal et un bon fonctionnement des différents tissus.

Il est aussi bien connu que l'apoptose joue un rôle clé durant le développement des lymphocytes et la progression de la réponse immunitaire. Les cellules T et B développées qui ne contiennent pas des récepteurs spécifiques de l'antigène fonctionnels sont détruites par apoptose. C'est ainsi que l'auto-réaction inflammatoire des lymphocytes est éliminée par apoptose durant le développement dans les os et le thymus. Durant le cours normal de la réponse immunitaire adaptative à des pathogènes, la cellule hôte doit rapidement produire des antigènes spécifiques dirigés contre la cellule affectée. Une fois que le pathogène est éliminé, l'apoptose permet l'élimination des cellules effectrices permettant au système immunitaire de retourner à son état de base (Sehra and Dent, 2006).

### **1.5.1 Voies apoptotiques**

En général, deux voies principales existent pour conduire à l'apoptose: l'apoptose médiée par des récepteurs ou l'apoptose médiée par des granules. Chaque voie implique l'activation des caspases, une famille de protéases qui active plusieurs types de protéines

dont la protéine responsable de la fragmentation de l'ADN (Siegel and Lenardo, 2002). L'apoptose induite par des récepteurs est déclenchée par les membres de la famille des TNF $\alpha$  qui contiennent un domaine cytoplasmique appelé le domaine de mort. Cette famille comprend Fas, les récepteurs de TNF1, et les récepteurs de TRAIL1/DR4, TRAILR2/DR5 (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor). Après la liaison de leur ligand respectif, ces récepteurs se trimérisent causant le recrutement des protéines adaptatrices comme FADD (Fad Associated Death Domain) et TRADD (TNF receptor-Associated Death Domain) vers la région cytoplasmique du récepteur. Ces protéines contiennent un domaine de mort et recrutent à leur tour la forme précurseur de la caspase 8, la procaspase 8. Ces protéines ensemble forment un complexe protéique nommé DISC (Death-inducing Signaling Complex). L'accumulation de la procaspase 8 dans le complexe DISC cause son activation par un autoclivage catalytique. La forme activée de la caspase 8 peut maintenant à son tour activer les caspases 3 et 7 existant sous forme des précurseurs et qui conduisent directement à l'apoptose (Siegel et Lenardo, 2002).

Alternativement, les caspases 8 peuvent causer l'activation de la caspase 3 par l'amplification de la boucle mitochondriale nommée voie apoptotique intrinsèque. Cette voie nécessite l'action des protéines proapoptotiques de la famille de Bcl-2 comme BID, Bax, et Bak. Une fois cette voie activée, les caspases 3 et 7 peuvent médier la mort cellulaire par l'activation des CAD (Caspase-Activated Dnase) qui crée des cassures dans les brins d'ADN résultant en la fragmentation de l'ADN (Soeda et al., 2001 ; Pan et al., 2003).

L'apoptose induite par les granules est initiée par le relâchement des granules cytotoxiques des cellules immunitaires effectrices dans l'espace qui sépare la cellule cible et la cellule effectrice. Le granule cytotoxique contient un grand nombre des protéines lytiques

comme la perforine, la granzymes A et B, la granulysine et la calréticuline. Le modèle connu actuel suggère que la granzyme B entre dans la cellule par endocytose et est relâchée au niveau des endosomes par la perforine qui crée des pores dans la membrane. Une fois à l'intérieur de la cellule, la granzyme grâce à son activité protéase cause l'apoptose par le clivage des protéines proapoptotiques comme la caspase 8, la caspase 3, et BID (Cullen et al., 2008).

La mitochondrie joue aussi un rôle important dans l'apoptose, qu'elle soit induite par les récepteurs ou par les granules. La mitochondrie amplifie le signal apoptotique par le relargage du cytochrome *c*, Apaf-1, Smac, et l'AIF (Apoptosis inducing Factor) et aussi les radicaux libres oxygénés RLO du compartiment interne de la membrane mitochondriale (Siegel et Lenardo, 2002). Le mécanisme d'action des RLO dans l'apoptose reste mal connu (figure 1-5).

### ***1.5.2 Régulation des protéines apoptotiques par ubiquitylation***

Plusieurs évidences suggèrent que la machinerie de l'ubiquitylation joue un rôle crucial dans la régulation de l'apoptose par le ciblage des protéines cellulaires vers la dégradation dans les protéasomes, par l'altération de leur activité biochimique ou par le changement de leur localisation cellulaire. Des études rapportent une corrélation entre l'augmentation de l'expression de l'ubiquitine durant l'apoptose dans les muscles inter segmentaux chez les insectes. En plus, dans les cellules leucémiques humaines HL60, l'inhibition des protéasomes induit l'apoptose (Drexler, 1997). L'inhibition des protéasomes peut protéger les lymphocytes contre l'effet de la dexamthasone, les

radiations  $\gamma$ , l'ester de phorbol et l'etoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II (Grimm et al., 1996 ; Dallaporta et al., 2000). Ceci est causé par l'inhibition de la dégradation des protéines apoptotiques comme le p53.

Le suppresseur de tumeur p53 joue un rôle critique dans le maintien de l'intégrité du génome et la prévention du développement des tumeurs. Lorsque l'ADN est endommagé par des agents tumorigènes comme l'hypoxie, le manque de facteurs de croissance et d'autres, le niveau endogène de p53 augmente rapidement pour arrêter le développement cellulaire. Cependant, le niveau de p53 est régulé par la voie d'ubiquitylation dépendante des protéasomes. p53 est le substrat de la ligase de l'ubiquitine Mdm2 qui maintient un niveau bas dans des cellules en repos. L'ubiquitylation de p53 par Mdm2 facilite aussi le transfert de p53 du cytoplasme vers le noyau où il peut activer les gènes de transcription apoptotiques (Fuchs et al., 1998). En effet, Lors de la stimulation de la cellule par un agent chimiothérapeutique ou par des radiations, la phosphorylation de p53 inhibe son interaction avec Mdm2 résultant en une inhibition de son ubiquitylation et de sa dégradation (Honda et al., 2000b). En plus, l'ubiquitylation de p53 est renversée par l'enzyme DUB, l'HAUSP (Herpes-Associated Ubiquitin-Specific Protease), et ceci même en présence de Mdm2 (Li et al., 2002; Brazhnik et Kohn, 2007). Cependant, si le niveau de p53 augmente, il peut activer la transcription des gènes de Mdm2, exerçant ainsi une rétroaction négative sur son propre niveau. Comme la plupart des ligases de l'ubiquitine, Mdm2 est capable de s'auto-ubiquityler (Fang et al., 2000). Cette ubiquitylation est régulée par l'expression de sa forme homologue, la MdmX dépourvue d'une activité catalytique. L'interaction entre ces deux protéines inhibe l'autoubiquitylation de Mdm2. En plus, l'expression de MdmX inhibe l'interaction entre Mdm2 et p53, causant ainsi une inhibition

de l'ubiquitylation de p53 et une augmentation de son niveau intracellulaire (Jackson and Berberich, 2000). Des études ont montré que les souris déficientes en Mdm2 mourront à un stade embryonnaire précoce. Par contre, ce phénotype est renversé par des délétions simultanées dans p53 (Haines et al., 1994). Donc, en conclusion, Mdm2 régule l'entrée des cellules en apoptose par la dégradation du suppresseur de tumeur p53, et est elle-même stabilisée par l'expression de MdmX qui empêche son autoubiquitylation et son interaction avec p53 (Jackson and Berberich, 2000). Puisque p53 est impliquée dans le développement des tumeurs, l'ubiquitylation peut jouer un rôle indirect dans ce processus.

Un autre exemple de l'implication de l'ubiquitylation dans l'apoptose est fourni par la famille des inhibiteurs de l'apoptose, IAP, qui sont des ligases de l'ubiquitine qui permettent d'inhiber l'apoptose par l'inactivation et la dégradation des protéines pro-apoptotiques. Les IAP contiennent un domaine RING et sont dotées d'une activité de ligase de l'ubiquitine (Deveraux et al., 1999). Les IAP peuvent inhiber l'apoptose induite par la surexpression des protéines effectrices de l'apoptose, les caspases 1 et 2 (Hawkins et al., 1998). L'effet inhibiteur des IAP résulte de leur association avec les caspases et l'induction de leur ubiquitylation (Richter et al., 2000). Certaines protéines mitochondriales comme Smac-DIABLO s'associent à XIAP, c-IAP-1 et c-IAP-2, inhibent leur interaction avec les caspases et causent leur auto-ubiquitylation et leur dégradation dans les protéasomes (Yang et Du, 2004 #461}. Aussi DIAB, membre de la famille des XIAP, interagit avec les protéines mitochondriales Grim, Reaper (Rpr) et Sikle, induit leur auto-ubiquitylation ainsi que leur ubiquitylation par la ligase de l'ubiquitine SCF (Skp1-Cdc53-Cullin-F-box) (Wing, 2003). Les IAP ne servent pas seulement de régulateurs négatifs de l'apoptose mais peuvent aussi activer l'apoptose. Une étude récente a montré que la stimulation des récepteurs TNF

(Tumor Necrosis Factor) résulte en l'activation de c-IAP-1 qui ubiquitine le facteur de survie cellulaire TRAF-2 impliqué dans la voie de NF $\kappa$ b, ce qui initie des signaux pro-apoptotiques (Angileri et al., 2008). Le facteur de transcription NF $\kappa$ b contrôle plusieurs réactions cellulaires importantes dans les réponses immunitaires, inflammatoires et apoptotiques. L'ubiquitylation est impliquée dans 3 étapes de la signalisation de NF $\kappa$ b : la dégradation de NF $\kappa$ b, l'inhibition de I $\kappa$ b et l'activation de I $\kappa$ b kinase (IKK) (Karin and Lin, 2002). L'ubiquitylation de IKK augmente son interaction avec le récepteur NF $\kappa$ b et bloque son activation alors que sa désubiquitylation par l'enzyme DUB cylindromatosis inhibe cette interaction et entraîne l'activation du récepteur et la propagation de son signal (Kovalenko et al., 2003).

Bcl-2 a été identifiée en 1985 à cause de la résistance des cellules affectées par sa mutation. Elle résulte d'une translocation dans le chromosome à t (14 :18) des lymphomes folliculaires. La famille de Bcl-2 regroupe des protéines ayant un à quatre domaines d'homologie à Bcl-2 (BH) et qui ont une fonction pro- ou anti-apoptotique. La présence des deux membres de cette famille, Bax ou Bak, est essentielle pour que certaines types de cellules entrent en apoptose et chaque type cellulaire nécessite au moins un des membres de la famille de Bcl-2 pour survivre (Lutz, 2000; Fletcher et Huang, 2008). Les membres de la famille de Bcl-2 avec seulement le domaine BH3 sont activés en réponse à plusieurs stimuli apoptotiques et sont capables d'induire l'apoptose par leur interaction directe avec Bax et Bak ou leur interaction avec la région hydrophobe des protéines anti-apoptotiques, Bcl-2 et Bcl-xL, causant l'inhibition de leur activité (Lutz, 2000). L'activité intrinsèque de ces protéines est contrôlée par la transcription, la phosphorylation, le clivage protéolytique ou l'ubiquitylation et la dégradation dans les protéasomes. Un exemple de l'implication de



l'ubiquitylation est la protéine anti-apoptotiques Bcl-2. La surexpression de Bcl-2 dont les 4 lysines sont mutés, donc incapable de recevoir les ubiquitines, inhibe l'apoptose induite par TNF- $\alpha$ , montrant que la dégradation de Bcl-2 est nécessaire pour que TNF- $\alpha$  induise l'apoptose dans les cellules (Breitschopf et al., 2000 ). Cependant, la phosphorylation de Bcl-2 peut inhiber son ubiquitylation. Ceci est montré par le fait que la mutation des sites de phosphorylation de Bcl-2 cause son ubiquitylation et sa dégradation et par conséquent l'activation de l'apoptose induit par les TNF- $\alpha$ . Ces études montrent que, a priori de son ubiquitylation, Bcl-2 doit être déphosphorylé. La phosphatase responsable de la déphosphorylation de Bcl-2 est la phosphatase 3. Par contre l'ubiquitine ligase responsable de l'ubiquitylation de Bcl-2 et sa dégradation n'est pas encore établi (Breitschopf et al., 2000).

### **1.5.3 La protéine proapoptotique BID**

BID ou BH3-Interacting domain Death agonist est une protéine de 23 KDa avec seulement un domaine BH3 appartenant à de la famille Bcl-2. BID est le membre le plus commun de la famille Bcl-2, et est exprimée dans les cellules somatiques ainsi que les lignées cellulaires transformées. BID promeut l'apoptose mitochondriale qui nécessite l'activation des caspases effectrices. Dans ces cellules, l'induction apoptotique repose sur l'intervention des récepteurs de surface de la famille du TNF $\alpha$ , et provoque la formation du complexe DISC (death inducing signaling complex). Ce complexe recrute et active la pro-caspase 8 dont une des cibles est la protéine proapoptotique BID (Yin, 2006).

Le clivage de BID *in vivo* semble être contrôlé par un phénomène de

phosphorylation/déphosphorylation. BID est un substrat des caséine kinases 1 et 2, et n'est pas reconnue par la caspase 8 lorsqu'elle est sous sa forme phosphorylée. Elle doit donc être déphosphorylée pour être clivée et activée par la caspase 8 (Desagher et al., 2001). La caspase 8 peut reconnaître plusieurs sites de clivage dans la protéine BID mais produit majoritairement un fragment C-terminal de 15 kDa (clivage après l'asp59) appelé tBID (truncated c-terminal BID). tBID est capable d'interagir avec Bax pour favoriser les séquences d'événements aboutissant à l'activation de cette dernière. En effet, l'interaction avec tBID facilite la liaison de Bax aux membranes mitochondriales externes et provoque une exposition de son domaine N-terminal. Bax est supposé acquérir ainsi son activité proapoptotique qui consiste à modifier la perméabilité de la membrane mitochondriale externe et se manifeste par la relocalisation de facteurs apoptogènes (cytochrome c, AIF, smac/DIABLO, endonucléase G) (Eskes et al., 2000). Plus récemment, il a été suggéré que tBID ne soit pas qu'un simple activateur de Bax, mais qu'elle soit aussi compétente pour provoquer par elle-même la libération des protéines apoptogènes à partir de mitochondries isolées. L'ensemble de ces résultats a donc suggéré que la fonction pro-apoptotique de tBID in vivo repose sur ses capacités conjointes d'interagir avec Bax par un mécanisme dépendant de BH3, et de déstabiliser les membranes lipidiques par un mécanisme semblable à celui décrit pour Bax. (Kudla et al., 2000). BID est aussi régulé par ubiquitylation. Breitschopf et al. ont montré que cette ubiquitylation cause sa dégradation dans les protéasomes et que l'inhibition des protéasomes augmente le niveau de BID endogène. Cependant, ils ont pas identifié la ligase de l'ubiquitine responsable de l'ubiquitylation de BID (Breitschopf et al., 2000).

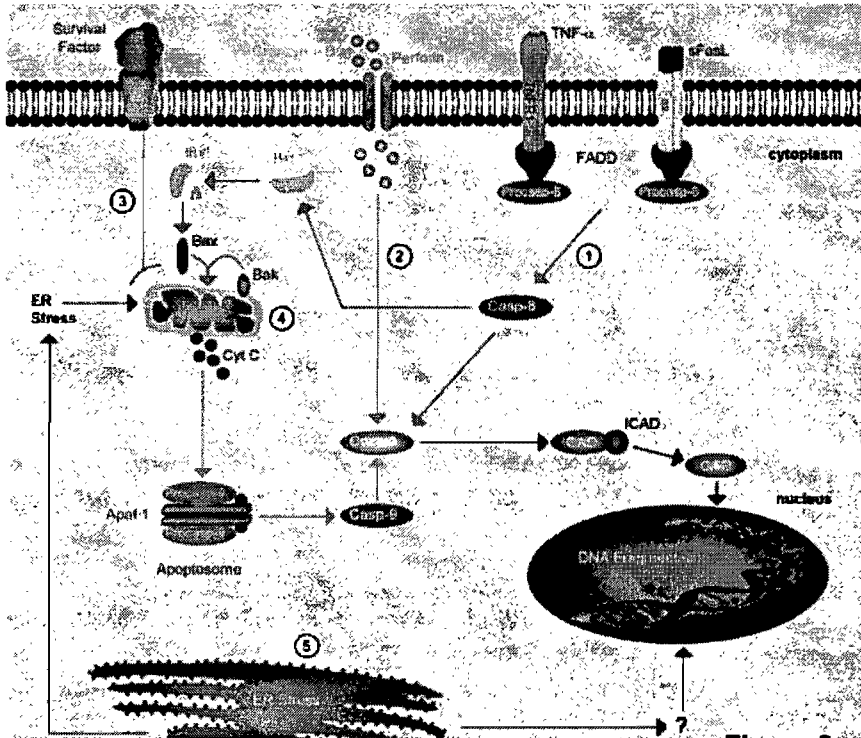


Figure 1-6 : Schéma représentatif de différentes voies impliquées dans l'apoptose : (1) la voie extrinsèque induit par les ligands de récepteur de mort ; (2) La voie des cellules effectrices cytolitiques ; (3) La voie des facteurs de croissance ; (4) La voie mitochondriale ; (5) La voie de réticulum endoplasmique (Demedts et al., 2006).

## 1.6 Objectifs

L'objectif principal de cette thèse était de comprendre comment l'activité enzymatique de Itch peut être régulée dans un contexte cellulaire. Le corollaire de cet objectif était également d'analyser l'impact de l'activation de Itch sur ses substrats et les mécanismes moléculaires auxquels ils participent.

L'implication de Itch dans plusieurs processus cellulaires montre l'importance de comprendre le mécanisme qui permet de réguler l'activité et le fonctionnement de cette protéine. Dans ce but, nous avons tenté d'identifier les protéines qui agissent sur la régulation de Itch et les protéines régulées par Itch. Cette démarche nous a amené à examiner la rétroaction entre Itch et la signalisation du récepteur EGF et le rôle de Itch dans l'apoptose.

Dans le chapitre 1, nous avons identifié une protéine interagissant avec Itch, la protéase de l'ubiquitine FAM. Nous avons donc cherché à déterminer la conséquence de cette interaction sur l'activité et la stabilité de Itch. Comme plusieurs ligases de l'ubiquitine, Itch est capable de s'autoubiquityler et est ensuite dégradé dans les protéasomes. Nous avons postulé que Itch est stabilisée par son interaction avec FAM, qui bloque sa dégradation en le désubiquitylant. Cette interaction est modulée par JNK, qui régule l'interaction de Itch avec ses substrats en le phosphorylant.

Dans le chapitre 2, nous avons postulé que l'activation de Itch par JNK peut entraîner sa régulation, et peut-être celle du récepteur de l'EGF lui-même, via les substrats endocytiques de Itch, soit l'endophiline et Cbl. Ce mécanisme nous permettra de

comprendre pourquoi l'endophiline, dont la seule ligase de l'ubiquitine est Itch, est ubiquitylée et transférée au niveau des endosomes après le traitement de l'EGFR. La stimulation de l'EGFR cause une augmentation de la phosphorylation par JNK et son activation. Pour savoir si l'effet de l'EGF sur Itch est dû à JNK sur Itch, nous avons étudié sa propre activité et ses interactions en réponse à l'EGF. Nous avons montré que l'EGF augmente la phosphorylation de Itch dépendamment de JNK et ceci augmente son activité et son interaction avec ses substrats, notamment l'endophiline et Cbl. Étant donné que la signalisation de l'EGFR dépend de son internalisation qui est régulée par l'endophiline et Cbl, notre but était aussi de savoir si Itch permet de moduler la signalisation induite par les EGFR. Nous avons démontré que Itch est capable de bloquer l'internalisation de l'EGFR au niveau de la membrane plasmique et de moduler sa signalisation cellulaire en favorisant l'activation membranaire de la voie de l'Akt.

Plusieurs études antérieures nous ont poussé à considérer tBID comme un potentiel substrat de Itch. Dans le chapitre 4, nous démontrons que tBID est ubiquitylée par Itch et que l'activation des récepteurs de l'EGF diminue le niveau de BID. Nous savons déjà que la stimulation des EGFR augmente l'activité de la ligase de l'ubiquitine Itch par la voie de JNK, ce qui suggère que tBID peut être ubiquitylée par Itch et dégradée dans les protéasomes. Nous avons ensuite montré que l'ubiquitylation de tBID par Itch est suffisante pour protéger les cellules contre l'apoptose induite par TNF- $\alpha$ .

## 2. Chapitre 2

### ***The Ubiquitin Ligase Itch is Auto-ubiquitylated In Vivo and In Vitro But Is Protected From Degradation By Interacting With The Deubiquitylating Enzyme FAM/USP9X***

Rania Mouchantaf†, Bilal A. Azakir†, Peter S. McPherson, Susan M. Millard, Stephen A. Wood, Annie Angers.

Ce chapitre a été publié dans le " Journal of biological chemistry" en 2006. † les deux auteurs ont contribué également dans cet article

Dans ce chapitre, nous avons tenté d'identifier de nouveaux substrats de Itch. Nous avons examiné les protéines capables de se lier à Itch dans un extrait de cerveau du rat. Nous avons ainsi identifié la protéase FAM. L'activité enzymatique de FAM permet de cliver spécifiquement les unités d'ubiquitines fusionnées aux protéines substrats, et d'ainsi inverser l'effet de l'ubiquitylation. Nous avons démontré que lorsqu'activée, Itch provoque sa propre ubiquitylation et sa dégradation dans les protéasomes. La surexpression de FAM permet de réduire l'ubiquitylation de Itch, mais il n'est pas possible de détecter l'ubiquitylation de FAM par Itch. Au niveau cellulaire, l'inhibition de l'expression de FAM par interférence d'ARN (siRNA) provoque une diminution significative du niveau d'expression de Itch due à sa dégradation par les protéasomes. De même, la surexpression de FAM entraîne l'augmentation du niveau intracellulaire de Itch. Finalement, l'activation de la kinase JNK entraîne une augmentation significative de l'ubiquitylation de Itch et inhibe son interaction avec FAM. L'ensemble de ces résultats suggère que la ligase de l'ubiquitine Itch peut être stabilisée par FAM. Dans cette étude, mon rôle a été de démontrer que Itch est capable de s'autoubiquityler *in vivo* et *in vitro* et est dégradé dans les protéasomes. J'ai aussi démontré que JNK module l'interaction entre FAM et Itch et que l'expression de ces deux protéines est corrélée dans différentes lignées cellulaires. J'ai participé à la confirmation que FAM est capable de désubiquitiner Itch et que la diminution de son expression entraîne la dégradation de Itch dans les protéasomes.

## 2.1 Résumé

Itch est une ligase de l'ubiquitine impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires. Nous avons déjà identifié Itch comme un partenaire pour la protéine endocytaire l'endophiline et nous avons montré qu'il est localisé au niveau des endosomes. En utilisant la purification par affinité couplée à la spectrométrie de masse, nous avons maintenant identifié une nouvelle protéine interagissant avec Itch, la protéase de l'ubiquitine FAM/USP9X. L'association entre FAM et Itch a été confirmée *in vitro* par colonne d'affinité en utilisant les billes de glutathione S-transférase et *in vivo* par co-immunoprécipitation. Dans les cellules Cos-7, Itch et FAM se colocalisent partiellement au niveau du réseau transgolgien et les vésicules périphériques. Nous avons aussi déterminé que les domaines WW de Itch sont les domaines responsables de l'interaction avec FAM. La surexpression de FAM/USP9X résulte en une désubiquitylation de Itch. De plus, nous avons montré que Itch est capable de s'autoubiquityler et que ceci est suffisant pour sa dégradation dans les protéasomes. En examinant le niveau de Itch et de FAM dans différentes lignées cellulaires et tissus de rats, nous avons montré une corrélation positive dans l'expression de ces 2 protéines. Cette observation suggère que l'expression de FAM peut avoir une influence sur le niveau intracellulaire de Itch. La diminution de l'expression de FAM par ARN d'interférence cause une diminution significative du niveau de Itch, qui peut être prévenue par l'inhibition des protéasomes. Ainsi, la surexpression de FAM/USP9X résulte en une augmentation marquée dans le niveau de Itch. Ces résultats démontrent une relation positive entre une ligase de l'ubiquitine et une protéase de l'ubiquitine basée sur une interaction directe entre ces 2 protéines.



## 2.2 Abstract

Itch is a ubiquitin ligase that has been implicated in the regulation of a number of cellular processes. We previously have identified Itch as a binding partner for the endocytic protein Endophilin and found it to be localized to endosomes. Using affinity purification coupled to mass spectrometry, we have now identified the ubiquitin-protease FAM/USP9X as a binding partner of Itch. The association between Itch and FAM/USP9X was confirmed in vitro by GST-pull down and in vivo through coimmunoprecipitation. Itch and FAM partially colocalize in COS-7 cells at the TGN and in peripheral vesicles. We mapped the FAM-binding domain on Itch to the WW domains, a region known to be involved in substrate recognition. However, transient overexpression of FAM/USP9X resulted in the deubiquitylation of Itch. Moreover, we show that Itch autoubiquitylation leads to its degradation in the proteasome. By examining the amounts of Itch and FAM in various cell lines and rat tissues, a positive correlation was found in the expression of both proteins. This observation suggests that the levels of FAM expression could have an influence on Itch in cells. Experimental decrease in FAM levels by RNA interference leads to a significant reduction in intracellular levels of endogenous Itch, that can be prevented by treatment with the proteasome inhibitor lactacystin. Accordingly, overexpression of FAM/USP9X resulted in a marked increase in endogenous Itch levels. These results demonstrate an intriguing interplay between a ubiquitin-ligase and a ubiquitin protease, based on direct interaction between the two proteins.

## 2.3 Introduction

The ubiquitin-mediated proteolytic pathway has been implicated in multiple cellular processes, including endocytosis, cell cycle regulation, transcriptional activation, and antigen presentation. Polyubiquitylated proteins are recognized and degraded by the proteasome, a multisubunit protein degradation complex (1). Protein ubiquitylation also serves regulatory functions in the cell that do not involve proteasome-mediated degradation. For example ligand-induced ubiquitylation of the Ste2 receptor in yeast triggers receptor endocytosis and targeting to vacuoles (2). Similarly, ubiquitylation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) triggers its degradation in lysosomes after trafficking in the endosomal compartments (3).

The ubiquitin ligase Itch belongs to the Nedd4/Rsp5p HECT domain-containing family of E3 ligases characterized by a number of regions that are involved in intracellular localization and protein-protein interactions which include an N-terminal C2 domain, four WW domains and a C-terminal HECT domain (Fig. 1A). The N-terminal Itch C2 domain is responsible for its intracellular localization to endosomes (4); the WW domains are responsible for the recognition of several substrate proteins (e.g. (5-12)); the C-terminal HECT domain harbors the ligase activity of the enzyme (13)(Fig. 1A).

Previously we have demonstrated that Endophilin A1, an SH3 domain-containing protein that functions in clathrin-mediated endocytosis is a substrate for Itch. Interestingly, Itch does not interact with Endophilin via its WW domains; rather through a short 18 a.a. proline rich region (PRD)(4). Because of the prominent role of ubiquitylation in endocytosis

and our observation that both Itch and Endophilin are highly expressed in the brain, we performed pull-down experiments from rat brain extracts in order to identify novel substrates of Itch. Interestingly, one of the protein bands isolated was identified as the ubiquitin specific protease FAM, also known as USP9X.

Ubiquitin proteases, or deubiquitylating enzymes (DUBs), form a large class of proteins whose activity is to mediate the disassembly of ubiquitin-protein conjugates. Based on sequence motif similarity, more than 90 DUBs have been identified in the human genome and were originally classified into two main families: the ubiquitin C-terminal hydrolases (UCH) and ubiquitin-specific proteases (USP) (14). Proteases belonging to the UCH family are generally small (20-30kDa) and are associated with the proteasomes. They are involved in the generation/recycling of ubiquitin monomers from polyubiquitin chains by removing it from proteins degraded in proteasomes (15). Members of the USP family, which includes FAM/USP9X, are large (60-300kDa) and are able to hydrolyze ubiquitin from ubiquitylated substrates prior to proteasomal entry, thus extending the proteins' half-life and therefore modulate their activities in the cell. This type demonstrates tissue specific pattern of expression and has been shown to exhibit substrate specificity.

USP9X/FAM is the mammalian counterpart of the product of the *Drosophila* fat-facets gene (*faf*) that is essential for normal eye development and viability of the early embryo (16). Genetic experiments have identified the Liquid facets protein (Lqf) as one critical substrate of Faf in the eye (17). In mammalian cells, a few substrates have been identified for USP9X/FAM. It binds to and stabilizes  $\beta$ -catenin and AF-6, important components of cell-cell adhesions and members of a transcription factor complex. Another substrate for

FAM/USP9X is the vertebrate homologue of Lqf, Epsin1 (17-19). Epsin 1, a major binding partner for Eps15 (EGFR phosphorylated protein 15), functions as an important adaptor in clathrin coat assembly and may have additional roles in growth factor receptor signaling and transcription (20).

In this report, we characterize the interaction between Itch and FAM/Usp9X. Similar to other HECT domain ubiquitin ligases, Itch activity leads to its auto-catalytic ubiquitylation (21-23). We show that this auto-ubiquitylation activity leads to proteasomal degradation of Itch. Interaction between Itch and FAM reverses Itch auto-ubiquitylation and protects the ligase from proteasomal degradation. Consistent with this observation, experimental manipulation of FAM levels by overexpression or siRNA-induced downregulation directly impact on endogenous Itch levels. Accordingly, the expression levels of both proteins are correlated in a variety of tissues and cell-lines. Together, these results suggest that FAM directly regulates the level of expression of Itch, which suggests that Itch-dependent cellular processes would also be dependent on FAM expression.

## **2.4 Experimental procedures**

### ***2.4.1 cDNA constructs and mutagenesis***

Full-length Itch WT, Itch  $\Delta$ C2, Itch  $\Delta$ C2/ $\Delta$ PRD, Itch C2, Itch PRD, and ligase-dead Itch CA constructs were described in Angers et al.(4). Other Itch cDNA constructs were obtained by polymerase chain reaction (PCR) using Vent DNA polymerase (New England Biolabs) and

the following primers: Itch HECT, forward, 5'-  
 GAGAATCGATAAGTCGACCTATGTTGGGACTTCAAAG-3', reverse 5'-  
 GAGAGGTACCGCGCCGCTTACTCTTGTCCAAATCCTTCTG-3'; Itch  $\Delta$ HECT, forward, 5'-  
 GAGAATCGATAAGTCGACCAATGGGTAGCCTCACCATG- 3', reverse 5'-  
 GAGAGGTACCGCGCCGCTTACCGAACATAGGCTATCTGAG-3'; Itch WW, forward, 5'-  
 GAGAATCGATAAGTCGACTCAATGGTTCACCATCTGCC-3', reverse, 5'-  
 GAGAGGTACCGCGCCGCTTACCGAACATAGGCTATCTGAG-3'; Itch C2/PRD, forward, 5'-  
 GAGAATCGATAAGTCGACCAATGGGTAGCCTCACCATG- 3', reverse 5'-  
 GAGAGGTACCGCGCCGCTTAGGCAGATGGTGAACCATTG-3'; Itch PRD/WW, forward, 5'-  
 GAGAATCGATAAGTCGACCTGAAGATGCAGGAGCTG-3', reverse, 5'-  
 GAGAGGTACCGCGCCGCTTACCGAACATAGGCTATCTGAG-3'. The resulting PCR products  
 were subcloned into pGEX-4T-1 (Amersham) to add a GST tag. Itch  $\Delta$ WW was produced by  
 deleting the 5' end of Itch full-length in pGEX-4T-1 with EcoRI digestion and subcloning in  
 its place the PCR product obtained from primers forward 5'-  
 GAGAGAATTCTCAATGGGTAGCCTCACCATG-3', reverse 5'-  
 GAGAGAATTCTAGGGCCTGAGCCTCCAG-3'. His6-Myc-ubiquitin was previously  
 described(24). HA-Ubiquitin expression vector was a kind gift from Ted Dawson (John  
 Hopkins University) and FAM siRNA vectors were a kind gift from René Bernards  
 (Netherlands Cancer Institute)(25). All GST-fusion proteins were expressed in DH5 $\alpha$  and  
 BL21 strains of *E. coli* and purified with glutathione-Sepharose beads according to the  
 manufacturer's instructions (Amersham).

### **2.4.2 Antibodies**

Monoclonal antibodies against the Flag epitope and  $\beta$ -actin were purchased from Sigma-Aldrich. Monoclonal antibody against Myc and HA epitopes were obtained from Santa Cruz Biotechnology and US Biologicals, respectively. Polyclonal antibody against GFP was purchased from Molecular Probes and Pan-Endophilin polyclonal antibody was purchased from Zymed. Affinity purified polyclonal antibodies against GST(26) and FAM (27) were described previously.

### **2.4.3 Immunofluorescence analysis**

COS-7 cells were plated on poly-L-lysine-coated coverslips and transfected using Fugene reagent (Roche). Approximately 15 h post-transfection, cells were fixed with 2% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS; 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.9% NaCl, pH 7.4) for 20 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100/PBS for 4 min, and processed with appropriate primary and secondary antibodies.

### **2.4.4 Immunoprecipitation and pull-down assays**

For cultured cells, 100 mm dishes of transfected HEK-293T cells were washed in PBS and resuspended in 1 ml/dish buffer A (20 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, protease inhibitors). The cells were sonicated and Triton X-100 was added to a final concentration of 1%. Extracts were incubated for 20 min at 4°C and centrifuged at 13 000 rpm in a microfuge. For brain extracts, adult rat brains were homogenized in buffer A and

centrifuged at 1 000 x g for 10 min. Triton X-100 was added to the supernatant to a final concentration of 1% and the extract was incubated for 30 min at 4°C. The sample was then centrifuged at 150 000 x g for 30 min. For immunoprecipitation assays, extracts of transfected cells were pre-cleared with either protein A-Sepharose or protein G-agarose beads. The pre-cleared supernatants were then incubated with the indicated antibodies and protein A-Sepharose or protein G-agarose beads for 4-16 h at 4°C. Beads were washed extensively with buffer A/1% Triton X-100 and prepared for Western blot analysis. For pull-down assays, extracts were incubated with 10 µg of the appropriate GST-fusion protein for 4-16 h at 4°C. Beads were washed extensively in the same buffer and prepared for Western blot analysis.

#### ***2.4.5 In vitro ubiquitylation assays***

Recombinant ubiquitin was purchased from Sigma-Aldrich and ubiquitin activating enzyme (E1) and UbcH7 (E2) were purchased from Affinity Bioreagents. Full-length Itch CA proteins were produced as GST-fusions and eluted from glutathione beads by thrombin cleavage. ubiquitylation reactions (25 µl) contained 10 µg Itch CA, ubiquitin (25 µM), ubiquitin activating enzyme E1 (100 nM), ubiquitin conjugating enzyme UbcH7 E2 (0.5 µM), and 10 µg total proteins extracted from HEK-293T cells, or the same extract immunodepleted for Itch, and ATP (4 mM) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM DTT. The reactions were incubated for 90 min at 25°C and stopped by addition of SDS-PAGE loading buffer and boiling. The reaction mixtures were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and subjected to Western blot.

## 2.5 RESULTS

### ***2.5.1 Identification of FAM/USP9X as a novel Itch interacting Partner***

To detect Itch binding partners, GST and GST-Itch fusion proteins precoupled to glutathione-Sepharose were then incubated with rat brain extract. Affinity purified complexes were separated by SDS-PAGE and visualized by Coomassie Brilliant Blue G (Fig. 1B). Several protein bands that specifically associated with GST-Itch were identified and cut out of the gel. Each band was individually processed to yield in-gel trypsin digestion products and the resulting peptide products were separated and analysed in an automated system by nanoscale liquid chromatography quadrupole time-of-flight MS/MS as described in (28). Spectra were analyzed by MASCOT software to identify tryptic peptide sequences matching to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) of non-redundant protein database with a confidence level of 95% or greater (29). Six of the eight bands isolated were heavily contaminated with GST and/or Itch peptides, which prevented the identification of potential Itch interacting partners present within that region of the gel. One of the remaining bands, positioned at approximately 40 kDa in the gel, contained 12 peptides assigned to Endophilin. Itch was identified as an Endophilin binding partner in earlier work (4). The other band was positioned well above the 200 kDa marker. MS/MS analysis revealed 28 peptide matches to the ubiquitin specific protease USP9X/FAM (Fig.1B). The calculated molecular mass of USP9X/FAM is ~ 290 kDa.



### ***2.5.2 FAM/USP9X directly forms complexes with Itch***

FAM/USP9X is a large protein and the conserved enzymatically active site represents only a small fraction of its size. It is thus likely that the protease exhibits a complex structure, possibly with multiple specific binding domains to recognize various substrates (30,31). In order to verify that FAM/USP9X and Itch form complexes *in vivo* at physiological concentrations, we performed coimmunoprecipitation experiments of endogenous proteins in cell lysates from HEK-293T cells. HEK-293T cells were selected because they express detectable levels of both Itch and FAM/USP9X (Fig. 6B). Immunoprecipitation of endogenous Itch coimmunoprecipitated substantial amounts of FAM/USP9X (Fig. 2A). Endophilin was also coimmunoprecipitated. Hence endogenous Itch is capable of interacting with both FAM/USP9X and Endophilin. Since it is known that Endophilin directly interacts with Itch, we next investigated whether coimmunoprecipitation of Itch with Endophilin would also pull down FAM/USP9X. Indeed, immunoprecipitation of endogenous Endophilin resulted in the coimmunoprecipitation of both FAM/USP9X and Itch (Fig. 2A). Taken together, these results suggest that Itch can interact with both Endophilin and FAM/USP9X, in the same ternary complex *in vivo*.

We next performed overlay experiments to determine if the interaction between Itch and FAM/USP9X is direct. In these assays, extracts from HEK-293T cells were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and incubated with purified GST, GST-Itch or GST-Endophilin. Bound proteins were subsequently detected with an anti-GST antibody. Significant binding of Itch to FAM/USP9X was observed. Additionally, Itch bound directly to Endophilin (Fig. 2B). On the other hand, Endophilin did not directly interact with

FAM/USP9X under these conditions, but with several other proteins migrating around 100 kDa, most likely corresponding to Itch, GLK and Dynamin, proteins previously demonstrated to interact with Endophilin (Fig. 2B) (4,32,33). No binding was detected when resolved HEK-293T proteins were incubated with GST alone. Thus, the interaction between Itch and FAM can occur in the absence of an intermediate. However, results from the coimmunoprecipitation and overlay assays indicate that the association between FAM/USP9X and Endophilin can be explained via an indirect interaction, most likely mediated by Itch. These data also imply that FAM/USP9X exhibits specificity in its direct interaction with select substrates.

To further confirm the interaction between the proteins, we investigated whether FAM/USP9X and Itch are localized to similar subcellular compartments. The subcellular localization of Itch and FAM/USP9X have been previously explored separately. In COS-7 cells Itch expression was found in the TGN and endosomal compartments (4). The perinuclear pool overlapped with markers of the Golgi with no significant overlap with those of the endoplasmic reticulum. Similar to Itch localization, FAM/USP9X staining was associated with the Golgi, multivesicular bodies and lysosomes. Little, if any colocalization was found with markers of the early endosomes or the endoplasmic reticulum (27). To explore this further, we transiently transfected COS-7 cells with GFP-tagged Itch-full length and performed immunofluorescent detection of endogenous FAM/USP9X using a specific FAM polyclonal antibody (27) (Fig. 2C). Similar to previous reports, FAM staining was visualized predominantly in a perinuclear compartment and exhibited punctate staining that extended throughout the cell. Similarly, the expression of Itch was predominantly detected as punctate structures in the cytoplasm and around the nucleus; consistent with

our previous observations. The proteins overlap in a perinuclear compartment most likely corresponding to the Golgi apparatus. The extent of colocalization is less apparent in more peripheral vesicular structures, suggesting that only a subset pool of both proteins are colocalized in vivo.

### ***2.5.3 FAM/USP9X interacts with Itch through the WW domain***

HECT domain ubiquitin ligases of the Nedd4 family generally interact with their substrates through the WW domains, with recognition preference for the motif PPXY(PY) (34). Additionally, in earlier work we have shown that another domain on Itch, the PRD, is also involved in protein interaction, specifically to Endophilin (4). Hence, we sought to map the specific region on Itch involved in binding to FAM/USP9X. A number of N- and C-terminal truncations were engineered by successively deleting each characterized domain separately or in combination (Fig. 3A). Rat brain extracts were mixed with the constructs expressed as GST-fusion proteins precoupled to glutathione-Sepharose. Bound proteins were then resolved on SDS-PAGE and blotted with a polyclonal antibody specific to FAM/USP9X. As a control for Itch interaction, we also blotted for Endophilin. All GST-Itch fusion proteins containing the WW domains were able to pull down FAM/USP9X from the extract. Conversely those lacking the WW domains were unable to bind FAM/USP9X (Ann2, Fig. 3B). Deletion of the WW domains alone completely abolished the ability of Itch to bind to FAM/USP9X (Fig. 3B). Similar to previous reports, Itch required the PRD domain to recognize Endophilin (Fig. 3B). Additionally, FAM/USP9X did not bind to control GST (Fig. 3B) or GST-Endophilin (data not shown). These results demonstrate that FAM/USP9X is recognized by the WW domains of Itch.

#### ***2.5.4 FAM/USP9X can deubiquitylate Itch***

FAM/USP9X is a member of the USP family of deubiquitylating enzymes characterized by a number of conserved regions including the Cys and His boxes in the catalytic core of the enzyme. The protease has been shown to deubiquitylate a number of target proteins such as Epsin and AF-6. On the other hand, Itch itself ubiquitylates various substrates. By virtue of the direct interaction between Itch and FAM/USP9X, we reasoned that each might be a substrate for the other, that is that FAM/USP9X could deubiquitylate Itch, and Itch could ubiquitylate FAM/USP9X. Since Itch can undergo autocatalytic ubiquitylation (see below), HEK-293T cells were cotransfected with plasmids expressing Myc-ubiquitin and Flag-Itch with or without V5-FAM. Forty-eight hours post transfection, the cells were lysed, and ubiquitylated proteins were immunoprecipitated with an anti-Myc antibody. Proteins were then separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and blotted with anti-FLAG or anti-V5 antibody to assess the presence of Itch or FAM, respectively, in the ubiquitylated protein pool. When cells were transfected with FLAG-Itch and Myc-ubiquitin, ubiquitylated forms of Itch could be detected by the FLAG antibody in the immunoprecipitated fraction (Fig. 4A, lower panel). In the presence of FAM/USP9X, all ubiquitylated FLAG-Itch was lost. Interestingly, ubiquitylated FAM could not be detected in the cells coexpressing FLAG-Itch and V5-FAM, suggesting that Itch might not ubiquitylate FAM (Fig. 5A, upper panel). Flag Western blots of cell lysates (CL) revealed equal expression of Flag-Itch in all conditions. To further explore FAM induced deubiquitylation of Itch, HEK-293T cells transfected with Flag-Itch and myc-ubiquitin and with or without V5-FAM were immunoprecipitated with anti-Flag antibody and immunoprecipitated proteins were blotted with monoclonal anti-Myc

antibody to detect ubiquitylation. A significant decrease in Itch ubiquitylation was observed upon FAM/USP9X overexpression represented by a reduction in the number of Itch migrating species resulting from ubiquitin modifications of this protein (Fig. 4B). Together these results demonstrate that FAM/USP9X is capable of cleaving ubiquitin chains from the ligase Itch.

### ***2.5.5 Itch is autoubiquitylated and degraded in the proteasome***

Having established an interaction between Itch and FAM/USP9X, we next sought to address the relevance of this interaction at the cellular level. Previously, the association between ubiquitin ligases and ubiquitin proteases has been shown to stabilize the ligase, which sometimes undergo autoubiquitylation followed by proteasome degradation (35,36). This is consistent with our observation that FAM/USP9X readily deubiquitylates Itch. In light of such an observation we assessed the ability of Itch to ubiquitylate itself. Toward this end, we coexpressed Flag-Itch and Myc-ubiquitin in HEK-293T cells and subjected Myc immunoprecipitates to Western blot analysis with Flag antibody, and conversely, blotted Flag immunoprecipitates with anti-Myc antibodies. Ubiquitylated Itch can be easily observed as the accumulation of higher molecular weights bands (Fig. 4B and 5A). Surprisingly, a mutant Itch construct lacking the ubiquitin ligase activity (Itch<sub>C830A</sub>) (4) is also ubiquitylated under similar conditions (Fig. 5A). Ubiquitylation of the ligase-inactive mutant is much lower than the WT form, but this is expected given that in these conditions the only source of ligase activity is the endogenous enzymes. This raises the possibility that Itch may be the substrate of other ubiquitin ligases or that it is ubiquitylated in trans by endogenous Itch present in HEK-293T cells. To address this question, we performed in vitro

ubiquitylation assays using recombinant Itch-CA produced as a GST fusion protein in *E. coli*, and subsequently cleaved from GST with thrombin. Recombinant Itch CA was incubated with purified mammalian ubiquitin activating enzyme (E1), recombinant UbcH7 (E2), ubiquitin and ATP, in the presence of HEK-293T cell extract as a source of E3 ligase. As expected, the ligase inactive form of Itch was ubiquitylated under these conditions. To verify if the ligase activity was provided by Itch itself, we immunodepleted the HEK-293T cell extract with a monoclonal Itch antibody, and used the depleted extract as a source of E3 ligase activity. When Itch was eliminated from the cell extract in this manner, no ubiquitylation of Itch CA could be obtained *in vitro*. (Fig. 5.B). The lower panel shows the efficacy of the depletion procedure by blotting the cell extracts with an anti-Itch antibody.

Ubiquitylation frequently serves as a signal for proteasome-dependent degradation. To determine whether ubiquitylated Itch undergoes proteasomal degradation, we treated HEK-293T cells transfected with FLAG-Itch and Myc-Ubiquitin with the proteasome inhibitor lactacystin. The amount of ubiquitylated Itch immunoprecipitated from treated cells was significantly higher compared to untreated, demonstrating that ubiquitylated Itch is degraded in the proteasome (Fig. 5C). To verify that endogenous Itch was also degraded in proteasomes, HEK-293T cells were transfected with Myc-ubiquitin and incubated in the presence or absence of the proteasome inhibitor lactacystin. Cell lysates were then subjected to Western blot analysis using endogenous mouse Itch monoclonal antibody. Levels of endogenous Itch increased in cells treated with lactacystin. Hence, similar to results from our overexpression experiments, endogenous Itch is degraded in a proteasome-dependent manner. (Fig. 5D).

### ***2.5.6 Comparison of Itch and FAM/USP9X expression in various rat tissue extracts and cell lines***

If Itch undergoes proteasomal degradation as a consequence of its own enzymatic activity and that FAM can reverse this effect by deubiquitylating Itch, we reasoned that the presence of FAM might be required to ensure high levels of Itch expression. We thus examined the amounts of both the protease and ligase by carrying out Western blot analysis from rat tissue extracts which included the brain and a number of peripheral organs. Expression of FAM/USP9X was highest in the whole brain, thymus and in the lung. Detectable levels of the protease were present in the heart, ovaries, pancreas and spleen. It was absent, however, in the liver and kidney (Fig. 6A). Itch on the other hand appears to be ubiquitously expressed in both the central and peripheral tissues. However, as expected, its levels were elevated in those organs expressing FAM/USP9X. Hence, in accordance to previous reports, FAM/USP9X appears to have a restricted pattern of expression compared to the ligase Itch, however, levels of the ligase are tightly associated with those of the protease. Similarly, endogenous Itch protein levels paralleled the amounts of FAM/USP9X in various cell lines, which constitute a more homogenous sample than tissue extracts (Fig. 6B).

### ***2.5.7 Interference with FAM function significantly affects intracellular levels of endogenous Itch***

To strengthen the conclusion that FAM/USP9X stabilizes Itch in cells, we explored the effects of down regulating FAM/USP9X expression through siRNA experiments in HEK-293T cells. A four-day incubation with various concentrations of two different vectors

expressing siRNAs specific for FAM (25) strongly reduced the levels of endogenous FAM/USP9X expression particularly at 15 and 20 $\mu$ g of plasmid (Fig. 7A, upper panel). As a control, transfection with the plasmid vector expressing a random filling sequence did not result in any changes of FAM/USP9X expression. Accordingly, we detected a diminution in endogenous Itch levels in cells transfected with FAM/USP9X targeted siRNA, but no change in  $\beta$ -actin (Fig. 7A, middle and lower panel). The most likely explanation for our findings is that the decrease in Itch expression is due to an increase in the ubiquitylated state of the protein which would serve as a signal for proteasomal degradation. Additionally, these findings strongly suggest that Itch is deubiquitylated by FAM/USP9X in vivo. Since ubiquitylation of proteins is usually associated with their turnover (37) we next examined the effect of proteasomal inhibition on Itch stability. HEK-293T cells were transfected with the two different FAM/USP9X specific siRNA plasmids separately, along with the control vector. On the third day post transfection cells were incubated with or without lactacystin for 24 hours. Proteasomal inhibition almost completely restored the levels of Itch in the cell and blocked Itch dependent proteasomal degradation (Fig. 7B). This is comparable with previous reports showing that proteasome inhibition leads to the stabilization of proteasome targeted ubiquitylated proteins (6,38). In support of this idea, we reasoned that overexpression of FAM/USP9X should result in further stabilization of endogenous Itch. HEK-293T cells were transfected with vectors expressing Myc-Ubiquitin with or without FAM/USP9X. Cell extracts were then blotted with anti-FAM/USP9X and anti-Itch antibodies. The introduction of exogenous protease resulted in increased levels of Itch. These increases appeared to be correlated with the level of exogenous FAM/USP9X expressed (Fig. 7C). These results indicate that the fate of Itch is tightly controlled by the state of FAM/UPS9X in



the cell. Hence FAM/USP9X plays a critical role in modifying Itch function through deubiquitylation.

It has been previously reported that the stress-related kinase JNK can phosphorylate Itch, and that JNK-induced phosphorylation is concomitant to an increase in Itch auto-ubiquitylation in T cells (21). It was also shown by the same group, that JNK phosphorylates residues located in the PRD domain of Itch, and impacts on the ability of Itch to bind its target proteins (39). We therefore examined the impact of JNK activity in the capacity of Itch to bind to FAM/USP9X. We overexpressed Flag-JNK in HEK-293T cells. Overexpression of JNK leads to its autoactivation, as shown by the phospho-JNK blot of cell lysates (Fig. 7D). When JNK is active, immunoprecipitation of endogenous Itch fails to coimmunoprecipitate FAM/USP9X (Fig. 7D). This is consistent with the observed augmentation of Itch ubiquitylation in response to JNK activation reported by (21).

## 2.6 DISCUSSION

The ubiquitin ligase Itch plays key roles in different cellular contexts by virtue of its target substrates. In the present study, we establish that Itch is a substrate for the protease FAM/USP9X. Both proteins appear to specifically and directly interact. Consistent with the functional interaction, FAM/USP9X and Itch were shown to colocalize in perinuclear compartments, and to a lesser extent in more peripheral vesicular compartments. As a consequence of this interaction Itch is deubiquitylated and protected from proteasomal degradation. A notable aspect to the interaction between FAM/USP9X and Itch is the

striking symmetry of the relationship, in that when the expression of the protease is reduced, the amount of intracellular Itch declines due to degradation of the ligase in proteasomes. When FAM/USP9X was overexpressed, the levels of Itch increased as well.

Recently, we and others have shown that activation of the c-jun N-terminal kinase (JNK) led to increased phosphorylation and ubiquitylation of Itch (Azakir and Angers, unpublished observations) (21,39). Here we show that ubiquitylation of Itch leads to its proteasomal degradation and that this degradation is greatly enhanced in the absence of FAM. Therefore, one important role of FAM could be to stabilize the Itch ligase not only at basal level, but more importantly, after its activation in specific signaling contexts. Cells with different levels of FAM activity could therefore respond differently to treatments that activate Itch.

By comparing the endogenous levels of both Itch and FAM in various tissues and cell lines, it was evident that in cases where there was more FAM/USP9X, Itch levels were also elevated. Other groups have demonstrated a similar relationship between FAM/USP9X and its substrates. In *Drosophila*, the levels of Lqf throughout the eye disc were reduced in *faf*<sup>-</sup> flies in a manner that reflects the amount of Faf protein (17,40). The condition was completely reversed when *faf*<sup>+</sup> gene function was reintroduced back to *faf*<sup>-</sup> flies (40). Similarly, the levels of other FAM/USP9X substrates such as  $\beta$ -catenin and AF-6 were also shown to be regulated by FAM/USP9X in cases of protease overexpression and/or depletion (27,41,42). Taken together, it is clear that FAM/USP9X stabilizes its target proteins, thus providing them with the opportunity to ultimately regulate different pathways in the cell.

The precise physiological significance of the global regulation of ubiquitylation revealed by our study remains to be determined. However, because ubiquitylation has been shown to regulate certain components of the endocytic pathway, changes in the steady-state level of protein ubiquitylation through the action of USPs may also be linked to changes in membrane traffic. Indeed several observations suggest that FAM/USP9X is linked to endocytosis. First, genetic experiments in flies have demonstrated that mutating components of the endocytic complex such as the clathrin heavy chain and  $\alpha$ -adaptin enhances the *lqf* mutant phenotype (17). In *lqf* or *faf* mutant eye discs, the Notch ligand Delta accumulates on cell membranes and fails to be internalized normally (43). The Notch/Delta signalling pathway is highly conserved and participates in several key aspects of normal development by regulating differentiation, proliferation and apoptosis (44). Additionally, *Lqf* is the *Drosophila* homolog of Epsin, a multi-modular protein that binds phosphoinositol lipids at the cell membrane, the adaptor complex AP2, Clathrin, ubiquitin and other endocytic accessory proteins such as Eps15 (45,46). Epsin is required for endocytosis in yeast and in mammalian cells (20). In mammalian cells Epsin1 has been demonstrated to be a physiological substrate for FAM/USP9X (19). Interestingly, in vitro experiments demonstrated that ubiquitylation of Epsin decreased its binding towards its endocytic-interacting partners such as liposomes, clathrin and AP-2 thus highlighting a critical role for FAM/USP9X (19). Itch has been directly linked with the endocytic machinery as well, particularly through its interaction with Endophilin and Cbl (4,6).

The critical assembly of the Cbl/CIN85-Endophilin molecular complex at the tyrosine residues of the C-terminus of the EGF receptor following ligand activation mediates its ubiquitylation followed by internalization (47). The complex includes Cbl proteins that are

RING finger-domain containing E3 ubiquitin ligases implicated in the ubiquitylation and downregulation of the EGF receptor at the cell surface (47,48). Generally, escape from Cbl-mediated ubiquitylation and downregulation is one common characteristic of receptor tyrosine kinases that have undergone oncogenic deregulation. Mutants forms of Cbl whose RING fingers are defective, and thus unable to ubiquitylate the EGF receptor, have been shown to have transforming activity presumably as a consequence of decreased EGF receptor turnover and increased signaling activity. Accordingly, overexpression of Cbl leads to enhanced ubiquitylation and degradation of the EGF receptor (6,47,48). The ubiquitin ligase Itch has been shown to bind to and ubiquitylate Cbl resulting in its degradation in proteasomes. Consequently, Itch inhibits Cbl mediated ubiquitylation and downregulation of the EGF receptor resulting in an increase in EGF receptor levels (6). Another component of this complex is the adaptor protein Endophilin that participates at multiple stages in clathrin-coated endocytosis. As mentioned earlier, we have shown that Itch can also bind to and ubiquitylate Endophilin (4). Moreover there is evidence to suggest that Eps15, another protein implicated in EGFR internalization, is also a substrate for Itch (49).

In conclusion we have identified a novel key mechanism by which Itch levels are normally regulated in the cell. Our findings demonstrate that Itch is auto-ubiquitylated, and protected from degradation by the ubiquitin protease FAM/USP9X. It now becomes of great interest to determine which pathological and physiological states are influenced by the physical and functional interaction between both proteins.

## 2.7 REFERENCES

1. Pickart, C. M. (2001) *Annu Rev Biochem* 70, 503-533
2. Hicke, L., and Riezman, H. (1996) *Cell* 84(2), 277-287
3. Katzmann, D. J., Odorizzi, G., and Emr, S. D. (2002) *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(12), 893-905
4. Angers, A., Ramjaun, A. R., and McPherson, P. S. (2004) *Journal of Biological Chemistry* 279(12), 11471-11479
5. Chang, L., Kamata, H., Solinas, G., Luo, J. L., Maeda, S., Venuprasad, K., Liu, Y. C., and Karin, M. (2006) *Cell* 124(3), 601-613
6. Magnifico, A., Ettenberg, S., Yang, C., Mariano, J., Tiwari, S., Fang, S., Lipkowitz, S., and Weissman, A. M. (2003) *J Biol Chem* 278(44), 43169-43177
7. Ikeda, A., Caldwell, R. G., Longnecker, R., and Ikeda, M. (2003) *J Virol* 77(9), 5529-5534
8. Fang, D., Elly, C., Gao, B., Fang, N., Altman, Y., Joazeiro, C., Hunter, T., Copeland, N., Jenkins, N., and Liu, Y. C. (2002) *Nat Immunol* 3(3), 281-287
9. Chen, X., Wen, S., Fukuda, M. N., Gavva, N. R., Hsu, D., Akama, T. O., Yang-Feng, T., and Shen, C. K. (2001) *Genomics* 73(2), 238-241
10. Traweger, A., Fang, D., Liu, Y. C., Stelzhammer, W., Krizbai, I. A., Fresser, F., Bauer, H. C., and Bauer, H. (2002) *J Biol Chem* 277(12), 10201-10208
11. Courbard, J. R., Fiore, F., Adelaide, J., Borg, J. P., Birnbaum, D., and Ollendorff, V. (2002) *J Biol Chem* 277(47), 45267-45275
12. Qiu, L., Joazeiro, C., Fang, N., Wang, H. Y., Elly, C., Altman, Y., Fang, D., Hunter, T., and Liu, Y. C. (2000) *J Biol Chem* 275(46), 35734-35737

13. Liu, H., Chen, B., Xiong, H., Huang, Q. H., Zhang, Q. H., Wang, Z. G., Li, B. L., Chen, Z., and Chen, S. J. (2004) *Oncogene* 23(19), 3385-3394
14. Baek, K. H. (2003) *Exp Mol Med* 35(1), 1-7
15. Hochstrasser, M. (1995) *Curr Opin Cell Biol* 7(2), 215-223
16. Fischer-Vize, J. A., Rubin, G. M., and Lehmann, R. (1992) *Development* 116(4), 985-1000
17. Cadavid, A. L., Ginzel, A., and Fischer, J. A. (2000) *Development* 127(8), 1727-1736
18. Chen, H., Fre, S., Slepnev, V. I., Capua, M. R., Takei, K., Butler, M. H., Di Fiore, P. P., and De Camilli, P. (1998) *Nature* 394(6695), 793-797
19. Chen, H., Polo, S., Di Fiore, P. P., and De Camilli, P. V. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25), 14908-14913
20. De Camilli, P., Chen, H., Hyman, J., Panepucci, E., Bateman, A., and Brunger, A. T. (2002) *FEBS Lett* 513(1), 11-18
21. Gao, M., Labuda, T., Xia, Y., Gallagher, E., Fang, D., Liu, Y. C., and Karin, M. (2004) *Science* 306(5694), 271-275
22. Nuber, U., Schwarz, S. E., and Scheffner, M. (1998) *Eur J Biochem* 254(3), 643-649
23. Verdecia, M. A., Joazeiro, C. A., Wells, N. J., Ferrer, J. L., Bowman, M. E., Hunter, T., and Noel, J. P. (2003) *Mol Cell* 11(1), 249-259
24. Ward, C. L., Omura, S., and Kopito, R. R. (1995) *Cell* 83(1), 121-127
25. Dirac, A. M. G., Nijman, S. M. B., Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Raymond, J. D. (2005) Functional Annotation of Deubiquitinating Enzymes Using RNA Interference. In: *Methods in Enzymology*, Academic Press
26. McPherson, P. S., Czernik, A. J., Chilcote, T. J., Onofri, F., Benfenati, F., Greengard, P.,

- Schlessinger, J., and De Camilli, P. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(14), 6486-6490
27. Murray, R. Z., Jolly, L. A., and Wood, S. A. (2004) *Mol Biol Cell* 15(4), 1591-1599
28. Blondeau, F., Ritter, B., Allaire, P. D., Wasiak, S., Girard, M., Hussain, N. K., Angers, A., Legendre-Guillemain, V., Roy, L., Boismenu, D., Kearney, R. E., Bell, A. W., Bergeron, J. J., and McPherson, P. S. (2004) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(11), 3833-3838
29. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., and Cottrell, J. S. (1999) *Electrophoresis* 20(18), 3551-3567
30. Wood, S. A., Pascoe, W. S., Ru, K., Yamada, T., Hirchenhain, J., Kemler, R., and Mattick, J. S. (1997) *Mechanisms of Development* 63(1), 29-38
31. Chen, X., Overstreet, E., Wood, S. A., and Fischer, J. A. (2000) *Dev Genes Evol* 210(12), 603-610
32. Ramjaun, A. R., Angers, A., Legendre-Guillemain, V., Tong, X. K., and McPherson, P. S. (2001) *J Biol Chem* 276(31), 28913-28919
33. de Heuvel, E., Bell, A. W., Ramjaun, A. R., Wong, K., Sossin, W. S., and McPherson, P. S. (1997) *J Biol Chem* 272(13), 8710-8716
34. Otte, L., Wiedemann, U., Schlegel, B., Pires, J. R., Beyermann, M., Schmieder, P., Krause, G., Volkmer-Engert, R., Schneider-Mergener, J., and Oschkinat, H. (2003) *Protein Sci* 12(3), 491-500
35. Wu, X., Yen, L., Irwin, L., Sweeney, C., and Carraway, K. L., 3rd. (2004) *Mol Cell Biol* 24(17), 7748-7757
36. Boutell, C., Canning, M., Orr, A., and Everett, R. D. (2005) *J Virol* 79(19), 12342-12354
37. Weissman, A. M. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(3), 169-178

38. Rossi, M., De Laurenzi, V., Munarriz, E., Green, D. R., Liu, Y. C., Vousden, K. H., Cesareni, G., and Melino, G. (2005) *Embo J* 24(4), 836-848
39. Gallagher, E., Gao, M., Liu, Y. C., and Karin, M. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(6), 1717-1722
40. Chen, X., Zhang, B., and Fischer, J. A. (2002) *Genes Dev* 16(3), 289-294
41. Taya, S., Yamamoto, T., Kanai-Azuma, M., Wood, S. A., and Kaibuchi, K. (1999) *Genes Cells* 4(12), 757-767
42. Pantaleon, M., Kanai-Azuma, M., Mattick, J. S., Kaibuchi, K., Kaye, P. L., and Wood, S. A. (2001) *Mech Dev* 109(2), 151-160
43. Overstreet, E., Flitch, E., and Fischer, J. A. (2004) *Development* 131(21), 5355-5366
44. Louvi, A., and Artavanis-Tsakonas, S. (2006) *Nat Rev Neurosci* 7(2), 93-102
45. Wendland, B. (2002) *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(12), 971-977
46. Legendre-Guillemain, V., Wasiak, S., Hussain, N. K., Angers, A., and McPherson, P. S. (2004) *J Cell Sci* 117(Pt 1), 9-18
47. Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W. Y., and Dikic, I. (2002) *Nature* 416(6877), 183-187
48. Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S. A., Katz, M., Tsygankov, A. Y., Alroy, I., Lavi, S., Iwai, K., Reiss, Y., Ciechanover, A., Lipkowitz, S., and Yarden, Y. (1999) *Mol Cell* 4(6), 1029-1040
49. Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M. R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P., and Di Fiore, P. P. (2002) *Nature* 416(6879), 451-455



## 2.8 FOOTNOTES

The authors wish to thank Dr. Ted Dawson and René Bernards for generous gifts of cDNA plasmids, as well as Dr. Raquel Aloyz and Dr. Maya Saleh for specific cell-lines extracts. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Discovery Grant 288238 and the Fonds de recherche sur la nature et les technologies of Quebec (FQRNT) Young Investigator Grant SC-94269 (to AA). AA is supported by a FQRNT young investigator award. PSM is a CIHR Investigator and a McGill University William Dawson Scholar. SSM and SAW would like to acknowledge support from the NHMRC Australia.

†These authors contributed equally to this work.

## 2.9 FIGURES

Figure 2-1: FAM/USP9X is identified as an Itch-interacting protein through affinity selection assay and tandem mass-spectrometry analysis. (A) Schematic representation of the modular structure of Itch. The main structural domains are indicated: N-terminal C2 domain (C2), proline rich domain (PRD), WW domains (WW), and C-terminal HECT domain (HECT). (B) GST and GST-Itch fusion proteins precoupled to glutathione-Sepharose beads were incubated with or without soluble brain extracts (PNS). Equal aliquots of GST or GST-Itch bound proteins were resolved by SDS-PAGE stained with Coomassie brilliant blue (right panel). Contrast in the upper part of the gel has been digitally increased to allow reproduction of the bands in print. Arrows point to bands excised from the gel and digested with trypsin and from which the eluted peptides were sequenced by MS/MS. (C) A similar gel colored with more sensitive silver staining is shown to allow better visualization of the band attributed to FAM (1\*).

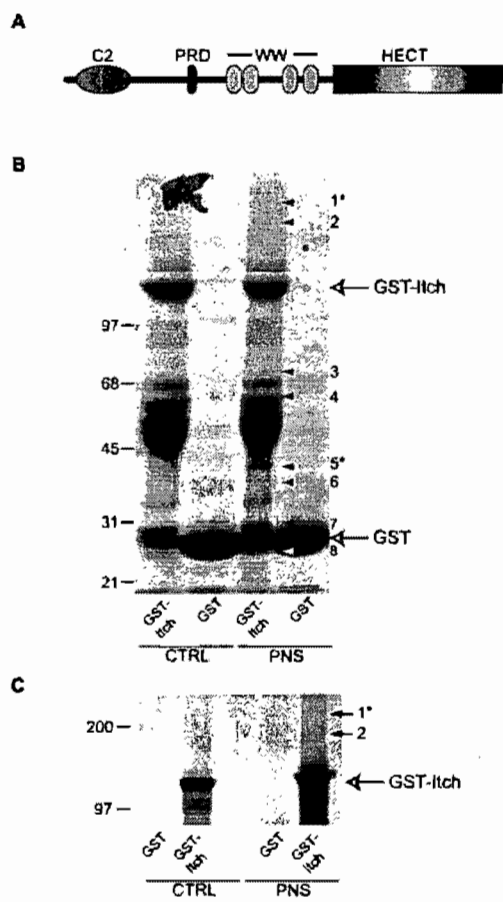


FIGURE 1

Figure 2-2 : Itch forms complexes with FAM/USP9X. (A) coimmunoprecipitation (IP) of endogenous Itch (left panel) or Endophilin (right panel) proteins. Cell lysates (CL) from HEK-293T cells were immunoprecipitated with antibodies against either Itch or Endophilin. CL (100 $\mu$ g) and IP complexes were separated on a 3-12% SDS-PAGE. The gel was cut horizontally and Western blotted with the FAM/USP9X antibody (top), the Itch antibody (middle) and the Endophilin antibody (bottom). As a control (C3), protein A-Sepharose beads were incubated with the CL in the absence of either antibody. (B) Overlay assay using GST, GST-Itch, or GST-Endophilin were performed on extracts from HEK-293T cells. 100  $\mu$ g of CL from HEK-293T cells was separated on SDS-PAGE. The membrane corresponding to each lane was cut vertically, incubated with 50 pmol/ml of GST, GST-Itch, or GST-Endophilin separately and western blotted with antibodies to GST. The first lane shows control blots with the indicated antibodies. (C) GFP-Itch was transfected into Cos-7 cells and its localization was compared with that of endogenous FAM/USP9X. The colocalization of Itch (green) with FAM/USP9X (red) is revealed in the blended image (right panel) Open arrows point to the TGN region where most colocalization was observed. The close arrow point to vesicular compartments where both proteins are also present. n = nucleus. Scale bar represents 10  $\mu$ m.

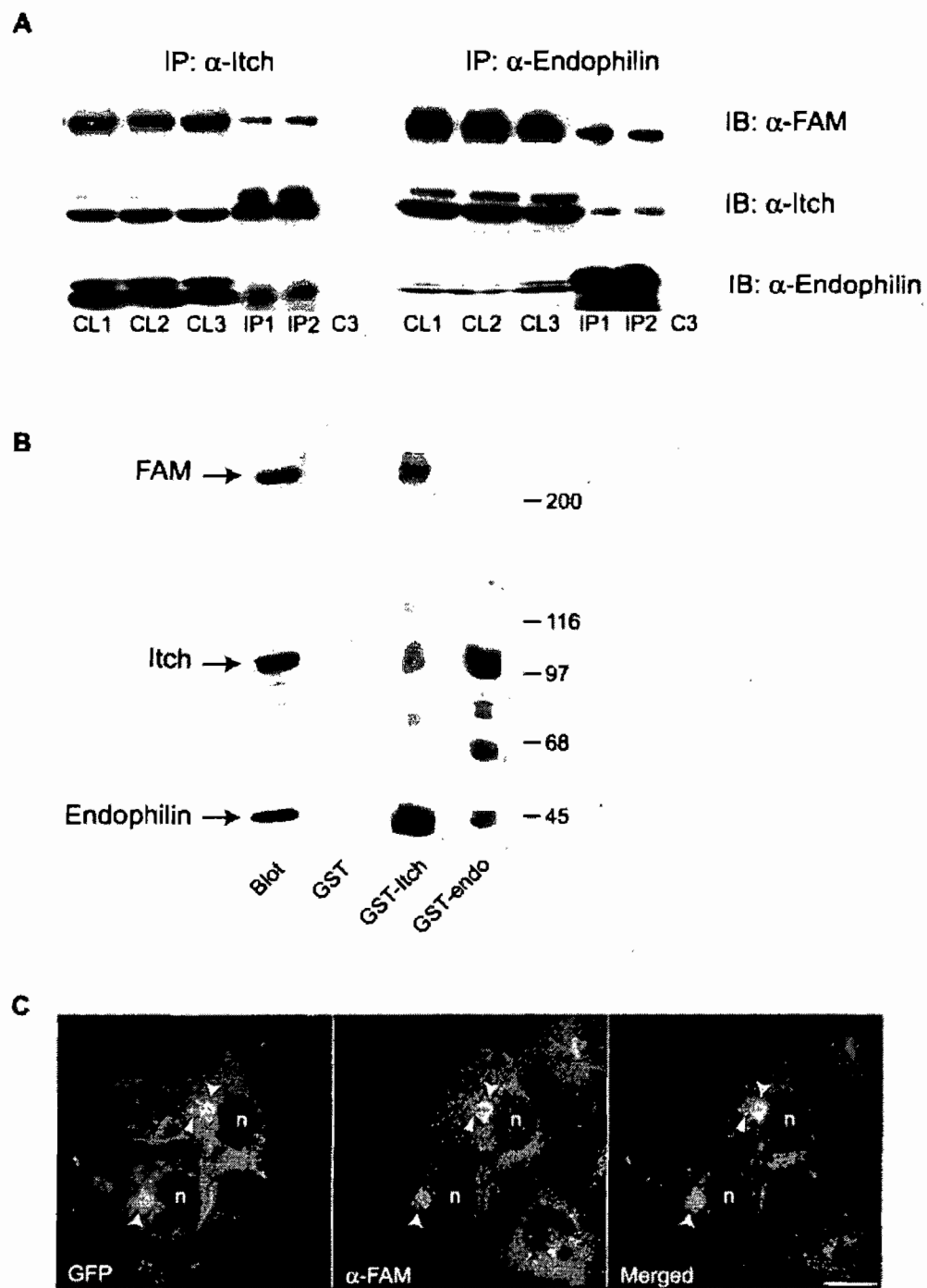
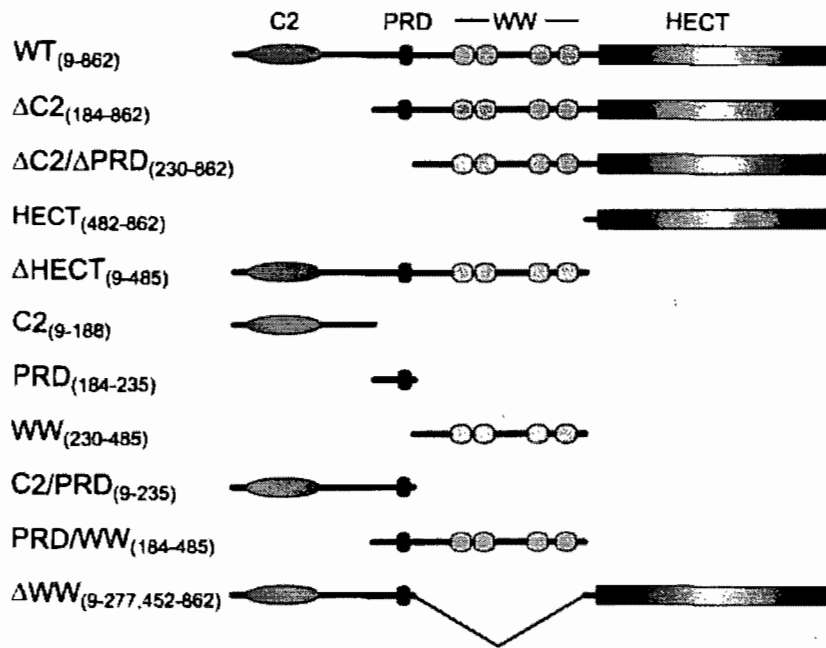


FIGURE 2

Figure 2-3 : Interaction of FAM and Itch through the WW domain. (A) Schematic illustration of full-length wild type (WT) GST-Itch and the deletion mutants constructs: GST-Itch lacking the C2 domain ( $\Delta$ C2), GST-Itch lacking the C2 and proline rich domain ( $\Delta$ C2/ $\Delta$ PRD), GST-Itch HECT domain fusion protein, GST-Itch lacking the ligase domain HECT ( $\Delta$ HECT), GST-Itch fusion protein containing the C2 alone (C2), GST-Itch fusion protein containing the PRD alone (PRD), GST fused to the WW domain of Itch only (WW), GST-Itch fusion containing the C2 and PRD domain (C2/PRD), GST-Itch fusion containing the PRD and WW domain (PRD/WW), and GST-Itch lacking the WW domains ( $\Delta$ WW). (B) Soluble brain extracts (CL) were mixed with the GST alone, GST-Itch WT, or the various GST-Itch mutants, pre coupled to glutathione-sepharose beads. The bound proteins were then subjected to SDS-PAGE followed by Western Blot analysis using anti-endogenous FAM and Endophilin.

A



B

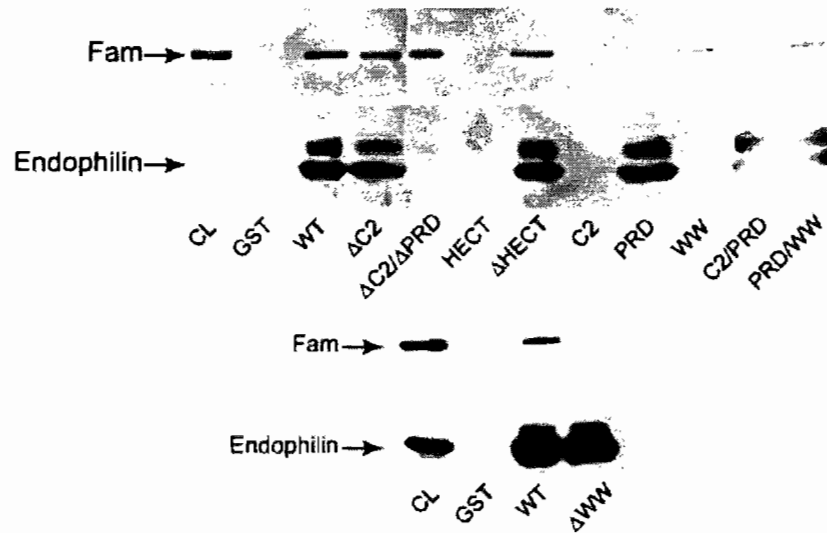


FIGURE 3

Figure 2-4 : FAM/USP9X can deubiquitylate Itch. (A+B) Flag-Itch and myc-ubiquitin were coexpressed in HEK-293T cells either with or without V5-FAM indicated by (+ or -). (A) Lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-myc antibody and immunoblotted (IB) with antibodies to V5 (top) and Flag bottom. The expression of Flag-Itch and V5-FAM in the cell lysates is also shown and represented by cell lysate (CL). (B) Lysates of similarly transfected cells were immunoprecipitated (IP) with anti-Flag antibody and immunoblotted (IB) with antibodies to myc.



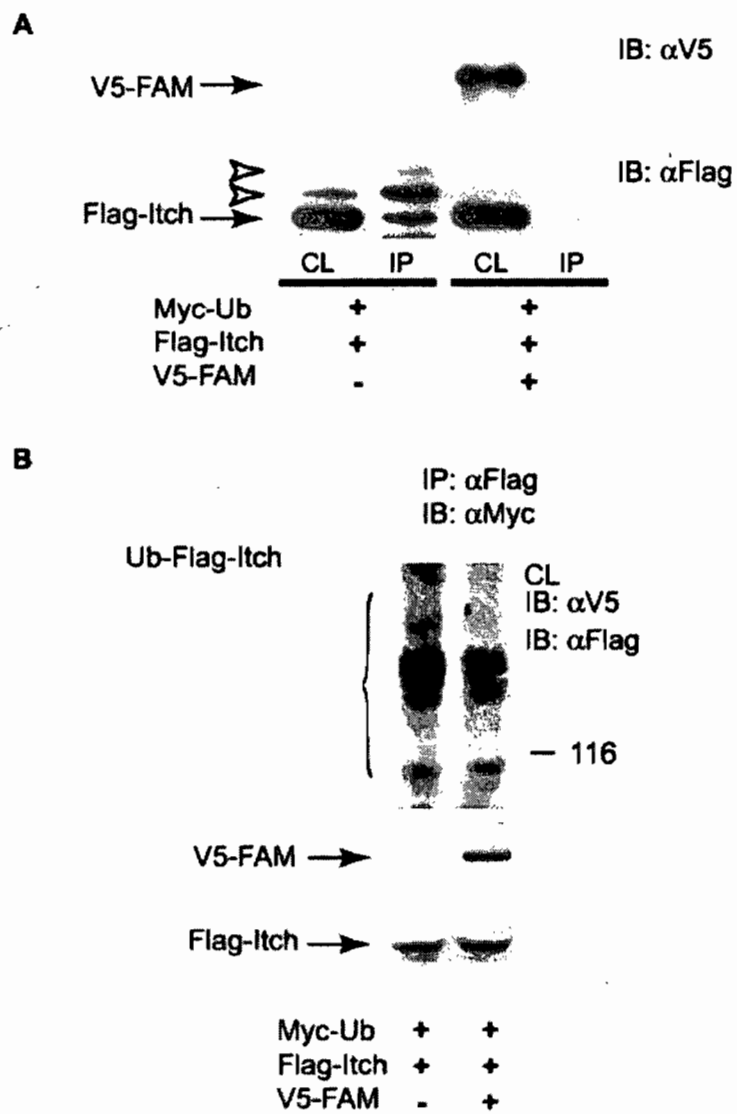


FIGURE 4

Figure 2-5 : Itch is ubiquitylated by itself and degraded in the proteasome. (A) HEK-293T cells were transfected with Myc-ubiquitin and Flag-Itch WT or the ligase dead mutant Flag-Itch CA. 48 hours post-transfection, cell-lysates were obtained and immunoprecipitated with either anti-Flag or anti-Myc antibodies as indicated, and immunoblotted with either anti-Flag or anti-Myc antibodies as indicated. Ubiquitylated Itch WT was readily detectable, whereas only a trace of ubiquitylated Itch CA could be observed. (B) To determine if Itch could be ubiquitylated by itself in a trans-molecular fashion, we incubated recombinant Itch CA obtained from a GST-fusion protein expressed in *E. coli* with ubiquitin, E1, E2 and ATP in the presence of total cell lysate, or lysate immunodepleted for Itch at 25°C for 90 min. The reaction mixture was prepared for immunoblot (IB) with anti-Itch antibody. Ubiquitylated Itch ( $Ub_n$ -Itch CA) is indicated. The bottom panel shows the presence and absence of Itch in control and depleted cell lysates, respectively. (C) HEK-293T cells transfected with Myc-ubiquitin and GFP-Itch WT were incubated with lactacystin for 16 hours or in control media. Lysates were then immunoprecipitated with anti-GFP antibody and immunoblotted with anti-Myc antibody (upper panel) to show ubiquitylation, of anti-GFP (lower panel) to show total immunoprecipitated GFP-Itch protein. (D) Untransfected cells were incubated for 16 hours with lactacystin or left in control solution. Total cell lysates were prepared for immunoblotting with anti-Itch antibody and anti-actin antibody to show the amount of loaded proteins.

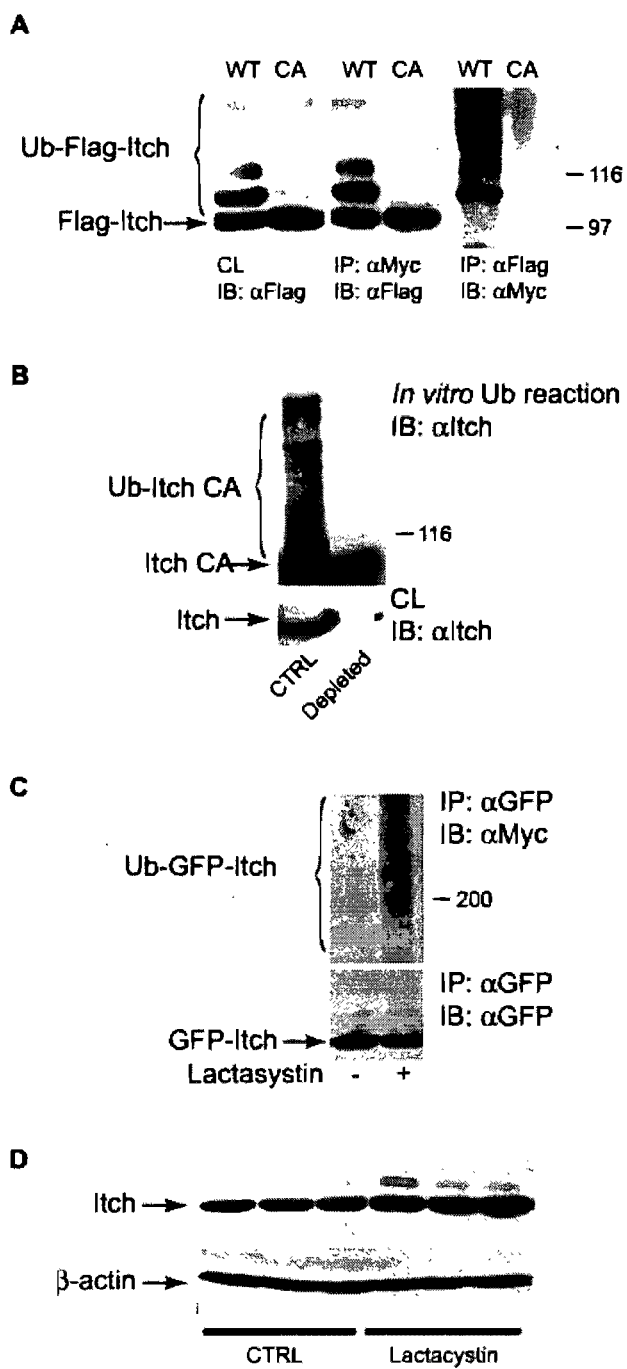


FIGURE 5

Figure 2-6 : Positive correlation in the levels of Itch and FAM/USP9X expression in different rat tissues and cell lines. Itch and FAM/USP9X protein levels were analyzed through Western blot analysis in isolated rat tissue (Fig. 7A) and cell lines (Fig. 7B) using the different antibodies as indicated. In rat tissues, Itch proteins correspond to the higher molecular weight band (arrow).

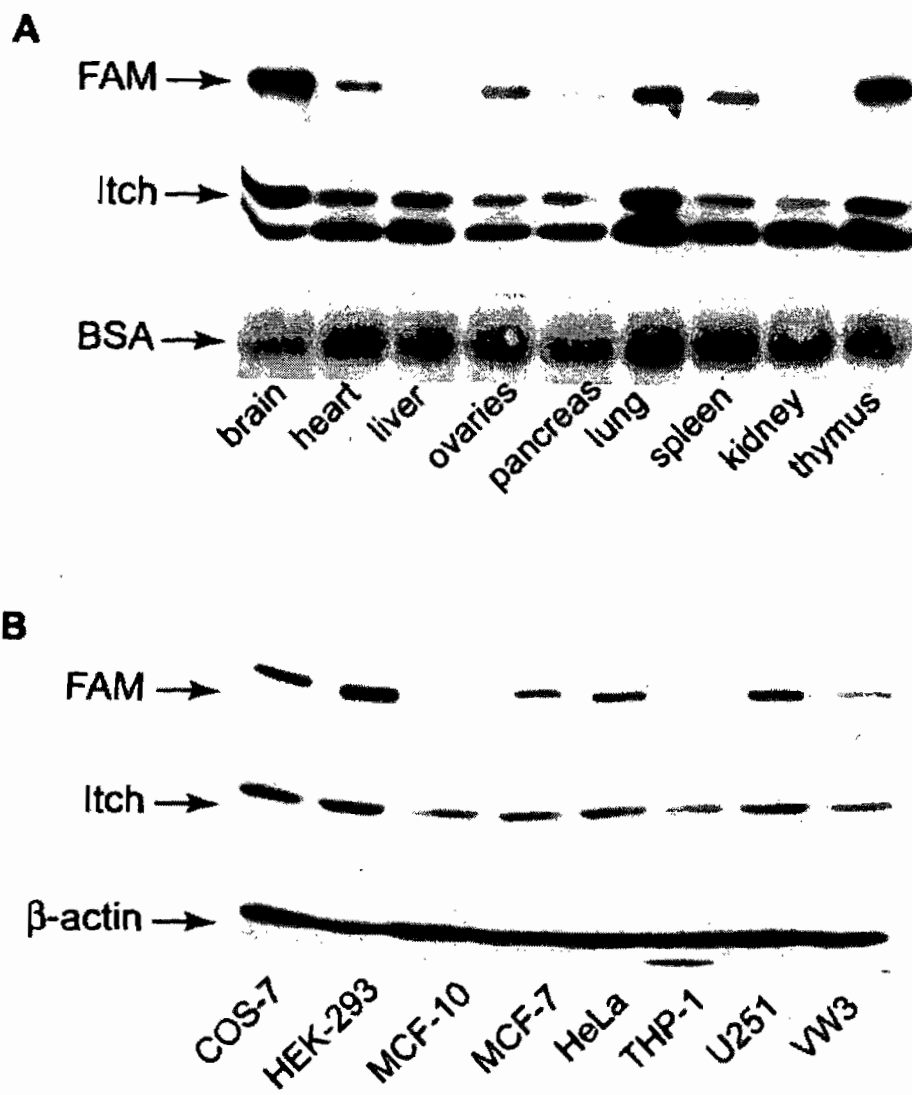


FIGURE 6

Figure 2-7 : FAM/USP9X regulates Itch expression. (A) HEK-293T cells were transiently transfected with two different FAM-specific siRNAs designated pRS-1800 (middle panel) and pRS-3601 (right panel) at various concentrations. As a control the siRNA vector pRS was transfected (left panel). Cell lysates were extracted four days after transfection and Western blotted with endogenous antibodies for FAM, Itch and  $\beta$ -actin. (B) HEK-293T cells were transiently transfected with pRS, pRS-1800, and pRS-3601. On day three post-transfection the cells were incubated with or without lactacystin for 24 hrs where indicated (+ or -). Four days after transfection, cells were extracted and analyzed by western blotting. A different gel was loaded with excess protein (150  $\mu$ g/lane) and blotted with anti-Itch antibody to allow visualization of ubiquitylated Itch in presence of lactacystin. (C) HEK-293T cells were transiently transfected with plasmids encoding Myc-ubiquitin (all lanes) and with 15 $\mu$ g or 20 $\mu$ g of control vector (pDEST-30) or vector expressing FAM (pDEST-30-FAM) as indicated. On day three post-transfection equal amounts of total protein (75 $\mu$ g) from each were analysed by immunoblot analysis with the indicated antibodies. (D) Extracts of control HEK-293T cells or cells transfected with Flag-JNK were immunoprecipitated with an anti-Itch antibody, and blotted for FAM to assess co-immunoprecipitation of the protease, as indicated. Cell lysates (CL) representing 1/20<sup>th</sup> of the immunoprecipitated extracts were also blotted with the indicated antibodies (left panels).

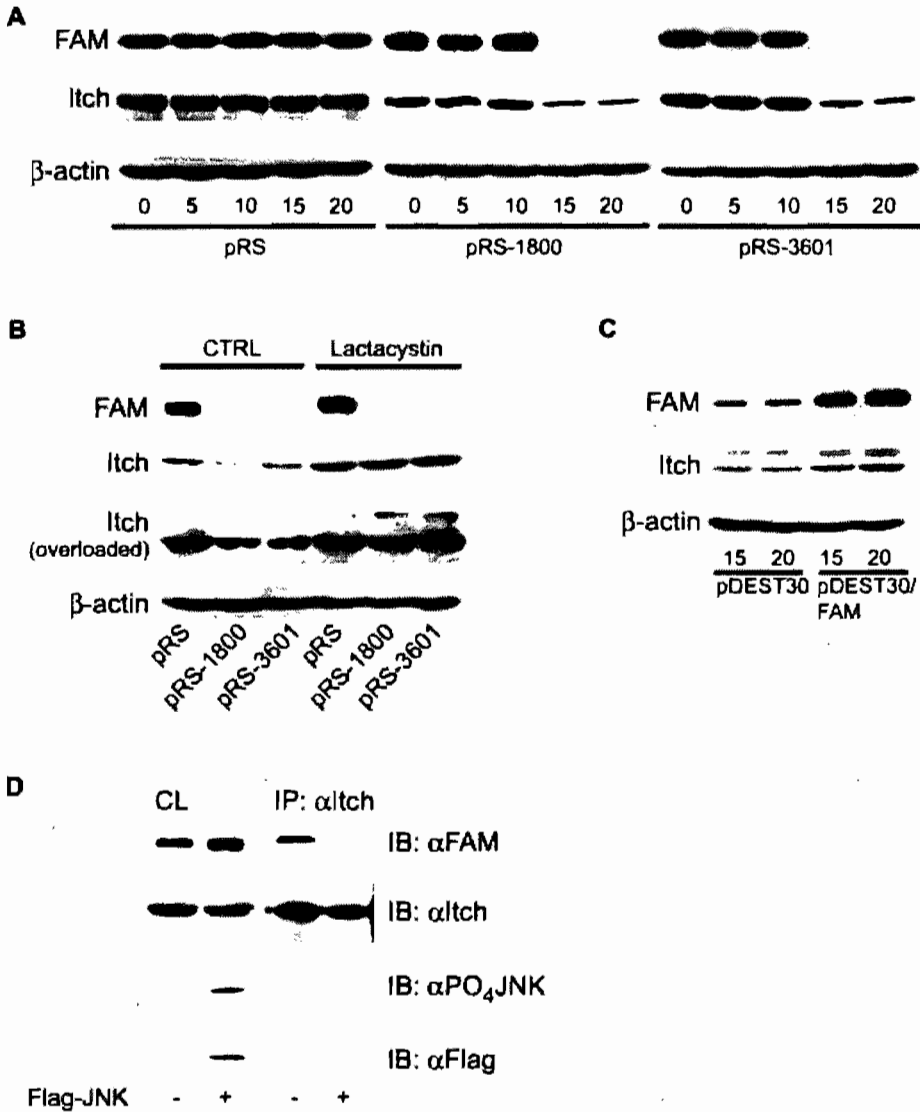


FIGURE 7

### **3. CHAPITRE 3**

#### ***Reciprocal regulation of the ubiquitin ligase Itch and the epidermal growth factor receptor signaling***

Bilal A. Azakir et Annie Angers



Dans ce chapitre, nous avons déterminé le rôle de l'activation des EGFR sur l'activité de Itch. Nous avons montré que la stimulation des EGFR augmente l'ubiquitylation de Cbl, endophiline et Smad-7 par Itch et que cette ubiquitylation est suffisante pour causer leur dégradation dans les protéasomes. Itch lui-même est régulé par les EGFR parce que nous avons montré que son ubiquitylation augmente en réponse à l'EGF mais il n'est pas dégradé dans les protéasomes car il est désubiquitylé et sauvé par la protéase FAM. En effet, le traitement à l'EGF cause une augmentation de la phosphorylation de Itch par JNK. Comme la phosphorylation de Itch cause un changement de ses interactions, nous avons examiné l'interaction de Itch avec ses substrats en réponse à l'EGF. Nous avons montré que la phosphorylation de Itch en réponse à l'EGF augmente son interaction avec ses substrats Cbl et endophiline mais diminue temporairement son interaction avec FAM. L'ensemble de ces résultats montre que l'activité et la stabilité de Itch sont régulées par l'EGFR via la voie de JNK et que cette régulation affecte l'ubiquitylation et la dégradation des substrats de Itch spécifiquement Cbl et endophiline, qui régulent à leur tour l'internalisation des EGFR. Dans cette étude, j'ai réalisé toutes les expériences ainsi que l'écriture de la première version du manuscrit. Cet article a été soumis à la revue *Molecular Cell biology*.

### 3.1 Résumé

La stimulation des récepteurs à l'EGF par l'EGF active une panoplie de cascades de signalisation suivies par la dégradation des récepteurs. La prévention de la dégradation des récepteurs provoque une augmentation de la signalisation mitogénique et potentiellement, le cancer. Cbl et endophiline sont deux protéines clés nécessaires pour l'internalisation et la dégradation des récepteurs et toutes deux sont ubiquitylées et dégradées dans les protéasomes suite à la stimulation de l'EGFR, fournissant une rétroaction négative sur l'internalisation des récepteurs. Le mécanisme de cette voie est mal connu. Dans cette étude, nous démontrons que le traitement des cellules avec l'EGF provoque une phosphorylation de la ligase de l'ubiquitine Itch dépendamment de JNK, ce qui cause la stimulation de l'activité de Itch. L'activation de JNK suite à la stimulation des EGFR cause une augmentation de l'interaction entre Itch et FAM limitant l'influence de sa propre ubiquitylation et sa dégradation. Finalement, l'activation de JNK stimule l'association entre Itch et ses substrats. Ces effets se combinent pour causer une augmentation de l'ubiquitylation des substrats de Itch incluant Cbl et endophiline, ce qui résulte en leur dégradation dans les protéasomes. Conséquemment, Itch est un régulateur de la dégradation des récepteurs à l'EGF.

### **3.2 Abstract :**

EGF-mediated stimulation of the EGF receptor activates a plethora of signaling cascades followed by receptor down regulation. Preventing down regulation leads to increased mitogenic signaling and potentially, cancer. Cbl and Endophilin are two key proteins required for EGF receptor down regulation and both become ubiquitylated and subject to proteasome-mediated degradation following EGF activation, providing a negative feedback loop for EGF receptor down regulation. The mechanism of this pathway is unknown. Here, we demonstrate that treatment of cells with EGF leads to JNK-dependent phosphorylation of the ubiquitin ligase Itch, stimulating Itch ligase activity. EGF-stimulated JNK activation causes an increased interaction between Itch and the de-ubiquitylating enzyme FAM, limiting the influence of Itch auto ubiquitylation on its own degradation. Finally, JNK activation stimulates the association of Itch with its substrates. These effects combine to cause increased ubiquitylation of Itch substrates including Endophilin and Cbl, resulting in the proteasome dependent down regulation of these key trafficking proteins. Thus, Itch is a key regulatory locus for EGF receptor degradation.

### 3.3 Introduction

Activation of EGF receptor triggers an intricate network of intracellular signaling cascades leading to diverse cell responses, including growth and proliferation (3, 25, 26). Following EGF receptor activation, many signaling proteins are rapidly ubiquitylated, including the receptor itself, Eps15, Epsin and CIN85 (16, 17). The RING-domain ubiquitin ligase Cbl is the enzyme required for ligand-induced ubiquitylation of the EGF receptor and CIN85 (6, 12), and another RING-domain ligase, Parkin, has been implicated in Eps15 ubiquitylation (7). Cbl is directly recruited to activated EGF receptor through its SH2 domain, which accounts for the coupling of its ligase activity with receptor activation. Other ubiquitylation reactions triggered by receptor activation have been tentatively attributed to HECT-domain ubiquitin ligases. However, it is not clear how these ubiquitylation reactions are coupled to receptor activation. Ubiquitin ligases play important regulatory roles in the cell as they catalyze the final step of the ubiquitylation reaction, and are thought to ensure the specificity of the process by selecting the correct substrate proteins. Itch is an ubiquitin ligase of the HECT family with several well characterized substrate interactions (1, 2, 8, 15, 18, 21, 28). Cbl and Endophilin are two substrates of Itch that are involved in EGF receptor downregulation. Importantly, both substrates are ubiquitylated following treatment of cells with EGF (1, 21). Itch is also one of the few ubiquitin ligases that has been shown to be regulated by protein kinases. Phosphorylation of Itch has a major impact on its capacity to interact with and ubiquitylate JunB. The c-Jun N-terminal kinase (JNK) has been shown to phosphorylate Itch on at least three residues in its proline-rich domain, and leads to increased JunB ubiquitylation (9, 11). In contrast, the Src kinase Fyn phosphorylates a Tyr

residue near the third WW domain that appears to reduce Itch interaction with JunB (31). In several cell types, JNK is activated by treatment with EGF (14, 26). We thus examined if treatment of cells with EGF lead to Itch activation, and if this activation translated in an effect on Itch substrates. Particularly, two recognized Itch substrates, Endophilin and Cbl, are directly involved in EGF receptor internalization (29), raising the intriguing possibility that by increasing Itch activity, treatment with EGF could lead to Endophilin and Cbl degradation, thereby providing a negative feedback loop toward EGF receptor internalization. To determine if JNK-dependent activation of Itch is a potential mechanism through which ubiquitylation occurs after treatment with EGF, we have examined Itch phosphorylation and activity toward four different substrates: Endophilin, Cbl, Smad7, and Itch itself, in response to treatment with EGF. We demonstrate that Itch activity increases after EGF treatment, and that this activation can be attributed to JNK activity. Further, Endophilin and Cbl are rapidly degraded after treatment with EGF, and Itch activity is directly linked to this downregulation, supporting the role of Itch as a coordinator between receptor internalization and signaling.

## **3.4 MATERIALS AND METHODS**

### ***3.4.1 Plasmids***

All plasmids encoding Itch and Endophilin as well as Myc-Ubiquitin were described before (1). HA-ubiquitin plasmids were a kind gift from TM Dawson, Johns Hopkins University School of Medicine. 6XMyC-Smad7 were a kind gift from A. Afti, Institut National de la Santé

et de la Recherche Médicale, Paris, France. HA-Cbl and HA-Cbl-v were a kind gift from John O'Bryan, University of Illinois College of Medicine. RNA interfering vectors against FAM were described in (23) and are a kind gift from R. Bernards, Netherlands Cancer Institute. ShRNA sequences directed against Itch sequences 5'-GACGTTTGTGGGTGATTTT-3' (Itch siRNA 1.1) and 5'-GGAGCAACATCTGGATTAA-3' (Itch siRNA 1.2) were inserted into pSilencer4.1-CMV neo vector (Ambion) according to the manufacturer recommendations.

### ***3.4.2 Antibodies***

Monoclonal antibodies against the FLAG epitope and  $\beta$ -actin were purchased from Sigma. Monoclonal antibody against Myc and hemagglutinin (HA) epitopes were obtained from Santa Cruz Biotechnology and US Biologicals, respectively. Polyclonal antibody against GFP was purchased from Molecular Probes, Pan-Endophilin polyclonal antibody was purchased from Zymed Laboratories Inc., JNK, Phospho-SAPK/JNK (T183/Y185), Akt, and Phospho-Akt (T308) rabbit polyclonal antibodies were purchased from GenScript Corporation. Affinity-purified polyclonal antibodies against FAM were described previously (24) and are a kind gift of S. A. Wood, National Centre for Adult Stem Cell Research, Griffith University, Nathan, Australia.

### ***3.4.4 Itch phosphorylation assay***

HEK-293T cells were treated with 100 ng/ml EGF for the indicated times, with and without SP600125. Cells were resuspended in 10 mM HEPES pH 7.4 solution containing protease inhibitors and 100 mM of sodium orthovanadate. The cells were lysed by

sonication and extracted with 1% triton-X100 for 20 minutes. Insoluble material was discarded by centrifugation in a refrigerated microcentrifuge. 30 µg proteins from total cell extracts were used for separation in the first dimension on Immobilon Gel strips pH 4-7 (GE Healthcare). The gel strip was equilibrated in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH8.8, 6 M Urea, 30% glycerol and 2% SDS for 15 minutes and loaded on a 3-12 % acrylamide gradient gel. Proteins were transferred on nitrocellulose and blotted for Itch and β-actin.

### ***3.4.5 Cell treatment and Immunoprecipitation***

For EGF treatment, cells were cultured in serum free medium for 24 hours before treatment with 100 ng/ml of recombinant EGF at 37°C for the indicated time. When indicated, cells were treated with 20 mM of proteasome inhibitor Lactacystin or with 30 µM of JNK inhibitor SP600125 for 24 hours prior to utilization. The immunoprecipitation procedure was described previously (1, 23).

### ***3.4.6 Quantitative analysis***

Films were scanned, and band intensities were quantified using GelEval 1.22 software (FrogDance Softwares, UK). Statistical analysis were done using SPSS 16.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL). Statistical significance of the differences was assessed using one-way analysis of variance (ANOVA) and post hoc Tukey's test.

## 3.5 RESULTS

### ***3.5.1 Itch substrates are ubiquitylated following treatment with EGF***

Many proteins have been described as being substrates of the ubiquitin ligase Itch, including Itch itself, Endophilin, Smad7 and Cbl (1, 18, 21, 23). We previously demonstrated that treatment of HEK-293T cells with EGF triggered significant levels of Endophilin ubiquitylation (1). We thus decided to examine other known substrates of Itch to determine if their ubiquitylation could similarly be triggered by treatment with EGF. We first used Endophilin as a control. GFP-Endophilin was coexpressed in HEK-293T cells with Myc-ubiquitin. Cells were treated with recombinant EGF, GFP-Endophilin was immunoprecipitated and the immunoprecipitated proteins blotted with an anti-Myc antibody. This experiment revealed appreciable Endophilin ubiquitylation in response to EGF (Figure 1A). This effect can also be observed by immunoprecipitating ubiquitylated proteins with an anti-Myc antibody followed with immunoblotting against the GFP tag (Figure 1B). This experiment demonstrates that even without Itch overexpression, ubiquitylated Endophilin accumulates in cells treated with EGF.

Using the same approach, we examined whether treatment with EGF could trigger ubiquitylation and HA-Ubiquitin, immunoprecipitation of Smad7 following treatment with EGF showed significant ubiquitylation of Myc-Smad7, as revealed by an anti-HA immunoblot (Figure 1C). Ubiquitylation of Cbl under the same experimental conditions was also confirmed by immunoprecipitation of ubiquitylated proteins with an anti-Myc antibody from HEK-293T cells transfected with Myc-Ubiquitin, FLAG-Itch and HA-Cbl and



immunoblotted with and anti-HA antibody. Ubiquitylated Cbl accumulated in the cells up to 10 min treatment, but then disappeared and could not be detected at 20 min (Figure 1D). Like other ubiquitin ligases, Itch can promote its own ubiquitylation (11, 23), and we therefore used Itch auto-ubiquitylation to monitor its activation following EGF treatment. For this, HEK-293T cells were transfected with FLAG-Itch and Myc-Ubiquitin and treated with EGF as above. FLAG-Itch was immunoprecipitated using an anti-FLAG antibody and ubiquitylated Itch was probed with an anti-Myc antibody. Rapid Itch ubiquitylation was observed (5 minutes) that decayed over time (Figure 1E). In the reciprocal experiment, using an anti-Myc antibody to immunoprecipitate ubiquitylated proteins followed by immunoblotting with an anti-FLAG antibody, Itch ubiquitylation was also seen to increase at 5 minutes and then decayed to baseline levels at 20 minutes (Figure 1F). Itch substrates ubiquitylation measured after treatment with EGF therefore corresponds to a transient increase in Itch activity.

### ***3.5.2 EGF induces degradation of Itch substrates***

Many substrates of Itch are directed toward proteasomal degradation upon their ubiquitylation. To determine if EGF-induced ubiquitylation of Itch substrates is sufficient to induce their proteasomal degradation, we used the proteasome inhibitor lactacystin. In cells overexpressing Itch and ubiquitin, endogenous Endophilin significantly decreased with treatment with EGF, but remained stable in the presence of lactacystin (Figure 2A). This experiment shows that EGF treatment induces Endophilin degradation by the proteasome. EGF-induced degradation of endogenous Endophilin is also seen in

untransfected cells, although to a lesser extent (Figure 3A).

The same result was obtained when cells are transfected with HA-Cbl, Myc-Ubiquitin and GFP-Itch. After treatment of the cells with recombinant EGF, ubiquitylated HA-Cbl detectable in the cell lysate decreased after 20 min of treatment with EGF, but were maintained when the experiment was done in the presence of lactacystin (Figure 2B). Both results are consistent with the hypothesis that EGF treatment induces Itch substrates ubiquitylation and proteasomal degradation. In contrast, inhibition of the proteasome did not allow accumulation of ubiquitylated Itch overtime (Figure 2C). Rather, although treatment with lactacystin allowed more ubiquitylated Itch to be detected at early time points, after 20 minutes in the presence of EGF, both control and lactacystin-treated cells had similar amounts of ubiquitylated Itch. Therefore, proteasomal degradation does not account for the decrease in ubiquitylated Itch.

### ***3.5.3 Itch activity is required for EGF-induced Endophilin degradation***

To more directly address the involvement of the ubiquitin ligase Itch in EGF-induced Endophilin degradation, we explored the effects of down-regulating Itch expression through siRNA in HEK-293T cells. A 3-day incubation with vectors expressing siRNAs specific for Itch strongly reduced the levels of endogenous Itch expression (Figure 3A). As a control, transfection with the plasmid vector expressing a random filling sequence did not result in any changes of Itch expression. Cellular Endophilin levels were measured in the cells following EGF treatment by western blotting of total protein extracts with a polyclonal Endophilin antibody. In control cells, EGF treatment induced a significant reduction in

Endophilin levels (Fig 3A). When Itch levels were reduced by siRNA, no Endophilin degradation occurred in response to EGF, strongly pointing to Itch as the ubiquitin ligase supporting this process (Figure 3A).

#### ***3.5.4 Itch is protected from degradation by the protease FAM***

We reported earlier that Itch is protected from degradation by its interaction with the ubiquitin protease FAM (23). To test the involvement of FAM in Itch deubiquitylation in the context of EGF treatment, we used cells in which FAM had been knocked-down by RNA interference (23). When FAM expression was reduced, ubiquitylated Itch accumulated at 10 and 20 minutes, showing that the reduction in ubiquitylated Itch observed in control conditions is attributable to FAM activity (Figure 3B). This result is consistent with our hypothesis that the ubiquitin-protease FAM functions as a protector for Itch in situations where Itch activity, and self-ubiquitylation, is increased (23).

#### ***3.5.5 EGF treatment activates JNK and Itch***

Activation of EGF receptor signaling by treatment with EGF causes several known substrates of Itch to be ubiquitylated. Itch has been shown to be the substrate of the c-Jun N-terminal kinase (JNK), and phosphorylation of Itch by JNK increases its ubiquitin ligase activity (9-11). Activation of the EGF receptor can lead to JNK activation in certain cell types (5, 20, 26, 32). To verify that JNK is activated by treatment with EGF in HEK-293T cells, we blotted protein extracts of cells treated with EGF with an anti phospho-JNK antibody. JNK

phosphorylation was readily increased in HEK-293T cells treated with EGF, and remained active for at least 20 minutes (Figure 4A and B, bottom panels).

Since treatment with EGF activates JNK in HEK-293T cells, we looked at Itch phosphorylation under the same conditions. We performed two-dimensional separation of proteins extracted from HEK-293T cells treated with EGF. Proteins were blotted for Itch and  $\beta$ -actin as a control (Figure 4A, left panels). A significant shift in the isoelectric point of Itch, as compared to  $\beta$ -actin, was observed, suggesting that Itch is effectively phosphorylated during stimulation with EGF. Inhibition of JNK activity with SP600125 (Bennett et al., 2001) prior to treatment with EGF blocked Itch phosphorylation (Figure 4A, left panels). Therefore, it is plausible that Itch substrates are ubiquitinated after treatment with EGF due to JNK-mediated activation of Itch.

Itch phosphorylation in response to EGF treatment is also demonstrated by immunoblotting Itch immunoprecipitated from treated cells with an anti-phospho-serine antibody. As in the 2D gel experiment, phosphorylated Itch accumulates after 5 and 10 minutes treatment with EGF, but then decreases at 20 minutes. Treatment of HEK-293T cells with SP600125 completely blocked Itch phosphorylation, showing the JNK activity is required in order for Itch to be phosphorylated. However, Itch phosphorylation decreases more rapidly than JNK activity (Figure 4B).

To determine if JNK-mediated phosphorylation of Itch is sufficient to account for its increased activity in HEK-293T cells, we activated JNK independently of EGF, and looked at Itch ubiquitylation as a reporter assay. First, we used JNK overexpression to drive its activation. Under these conditions, JNK is active, as shown previously (23). Itch ubiquitylation is also significantly increased in cells overexpressing FLAG-JNK, as compared

to control cells (Figure 5A).

In a second approach, we used Endophilin and the germinal kinase-like kinase (GLK), to drive JNK activation. In an earlier report, we had shown that when overexpressed together, GLK and Endophilin activate JNK (27). Here, we show that GLK overexpression is sufficient to induce Itch ubiquitylation, but the effect is greater when both GLK and Endophilin are overexpressed (Figure 5B, lane 2 and 3). These results are consistent with the degree of JNK activation observed in similar conditions (27). Itch ubiquitylation could not be observed when a kinase deficient GLK mutant (GLK K-E) was used (Figure 5B lane 4 and 5).

### ***3.5.6 JNK activity is necessary for EGF-induced ubiquitylation of Itch substrates***

Having determined that JNK activation leads to Itch phosphorylation and activity in HEK-293T cells, and knowing that treatment with EGF can induce JNK activation, we sought to determine if JNK activity is necessary for ubiquitylation and degradation of Itch substrates following treatment with EGF. To this end, we examined ubiquitylation of Endophilin, Cbl and Itch ubiquitylation upon treatment with EGF in the presence of the specific JNK inhibitor SP600125. When HEK-293T cells overexpressing GFP-Endophilin and Myc-Ubiquitin are treated with EGF, ubiquitylated GFP-Endophilin accumulates over time. However, treatment of HEK-293T cells with SP600125 prior to application of EGF completely abolishes JNK activation and GFP-Endophilin ubiquitylation (Figure 6A). Similarly, in non-transfected HEK-293T cells, treatment with EGF induces proteasome-dependent degradation of endogenous Endophilin (Ann 3, Figure 3A). However, when HEK-

293T cells have been previously treated with SP600125, the endogenous level of Endophilin is maintained (Figure 6B). Application of SP600125 to HEK-293T cells also prevented EGF-induced ubiquitylation of HA-Cbl (Figure 6C) and of GFP-Itch (Figure 6D). Therefore, JNK activation is necessary for EGF-dependent ubiquitylation of different Itch substrates. A quantitative analysis of these results is presented in Figure 8A.

### ***3.5.7 Modulation of substrate interactions***

The question remains how Itch phosphorylation leads to increased ubiquitylation activity. Gallagher et al (9) suggested that JNK-induced phosphorylation of Itch opens up the structure, allowing access to the substrate interaction domains. An important consideration here is that Itch interacts with most of its substrates through one or several WW domains, but recognizes Endophilin through its proline-rich domain. We thus sought to determine if Itch interaction with its substrates changes during treatment with EGF. When HEK-293T cells are treated with EGF, Endophilin is reduced, but Itch remains stable as shown by western blot of total cell lysates (Figure 7A). Accordingly, immunoprecipitation of endogenous Endophilin with an antipan-Endophilin antibody immunoprecipitated less Endophilin as exposure time of the cells to EGF increased. In contrast, Itch protein coimmunoprecipitated increased slightly with time (Figure 7A). When cells were treated with SP600125 prior to treatment with EGF, the endogenous levels of Endophilin remained stable, as well as coimmunoprecipitated Itch, consistent with the idea that Itch phosphorylation increases its ability to interact with its substrates.

To examine other substrate interactions, we independently transfected Smad7 and Cbl

in HEK-293T cells, and treated with EGF with or without SP600125 prior to immunoprecipitation with an anti-Itch antibody (Figure 7 B for Smad-7, C for Cbl). Using overexpressed proteins, no reduction of substrate was observed (Figure 7 B, C, CLs). However, coimmunoprecipitation of Smad7 and Cbl with endogenous Itch could only be observed after treatment with EGF. Both proteins did not coimmunoprecipitate at time zero, nor in the presence of SP600125 (Figure 7 B, C, IPs). These results are in agreement with the hypothesis that JNK-mediated phosphorylation of Itch is favorable and even necessary for some substrate interactions, as reported in (9).

The protease FAM also interacts with the WW domains of Itch (23) and seems to deubiquitylate Itch after EGF treatment (Figure 3B). We again used coimmunoprecipitation of the endogenous proteins to measure variations in this interaction. Unlike Cbl and Smad7, FAM and Itch interact under baseline conditions. Interestingly, after five minutes in the presence of EGF, no FAM protein was coimmunoprecipitated with Itch by the anti-Itch antibody. After 10 and 20 minutes in the presence of EGF, FAM coimmunoprecipitated with Itch increased as compared to baseline (Figure 7D). In the presence of SP600125, the amount of FAM and Itch in complex in cell extracts remained stable throughout EGF treatment, close to baseline level (Figure 7D). It is also interesting to note that the minimum level of FAM interaction corresponds to the maximum levels of Itch ubiquitylation (compare Figure 7D and Figures 1E and 3B).

Our results demonstrate that Itch interaction with many different proteins is modulated by its phosphorylation via JNK. However, because binding partners do not interact with Itch through a single binding site, they are not all sensitive to Itch phosphorylation in the same manner, as exemplified by Endophilin and FAM binding. It

cannot be excluded at this point that other modifications are responsible for the inhibition of FAM binding at 5 min of treatment with EGF. However, this lack of interaction is also dependent on JNK activation. A quantitative analysis of these results is presented in Figure 8B.

Internalization is recognized as an important regulatory step of EGF receptor activity and signaling (13, 22, 30). Endophilin and Cbl being two important proteins for the EGF receptor internalization (29), we sought to determine if the activation of Itch could interfere with the EGF receptor internalization and signaling. We first assessed the importance of EGF receptor internalization on the activation of two different kinases, Akt and JNK. Since Akt activation depends on membrane bound PI3 kinases signaling, we reasoned that its activation might require membrane-bound activated EGF receptor, whereas JNK activation would depend on the receptor translocation toward the endosomes, reminiscent of PLC and MAPK in (19, 30). To block the EGF receptor endocytosis, we overexpressed the GTPase inactive mutant form of Dynamin (DynK44A) (30). We assessed Akt and JNK kinase activity using antibody against the active form of these kinases (Figure 9A). In control conditions, Akt is rapidly and transiently activated by treatment with EGF, whereas JNK is activated more slowly but persistently (Figure 9A, left panels). Overexpression of DynK44A, which presumably restricts the EGF receptor to the plasma membrane (30), dramatically changed the activation pattern of both Akt and JNK; under these conditions, Akt is persistently activated upon treatment with EGF, whereas JNK activation was almost completely blocked (Figure 9A, right panels). Consistently, inhibition of the EGF receptor internalization blocked EGF-induced Itch activation and Endophilin degradation (Ann 3, Figure 9B), in agreement with our previous results.



To determine if Itch activity may affect on EGF receptor internalization and signaling, we looked at Akt and JNK activation in response to treatment with EGF in cells overexpressing Itch or in which Itch expression was reduced by siRNA. Itch overexpression is expected to reduce Endophilin and Cbl, thereby lowering EGF receptor internalization. Also, when Itch was overexpressed, Akt activation was increased, and persisted longer as compared to control (Figure 9C, right panels). However, in these same cells, JNK activation in response to EGF treatment was lower than in control cells. Conversely, downregulation of Itch is expected to increase EGF internalization since levels of Endophilin and Cbl would be stabilized. Indeed, treatment with EGF of HEK-293T cells transfected with Itch siRNA vectors caused limited Akt activation but significantly increased JNK activation as compared to control cells (Figure 9C, middle panels). Together these results indicate that Itch activity influences downstream EGF signaling, most likely by influencing its internalization and trafficking.

### 3.6 DISCUSSION

The ubiquitin ligase Itch regulates many important targets involved in different aspects of cellular physiology. Importantly, the capacity of Itch to ubiquitylate its target substrates is the subject to different levels of regulation. First, the ligase activity of Itch is enhanced by its phosphorylation by the serine/threonine kinase JNK, that phosphorylates three residues located in the proline-rich region of the ligase (9, 11). Second, the Src tyrosine kinase Fyn targets a specific Tyr residue in the third WW domain, and this

phosphorylation event displaces at least some substrate interactions (31). We show here that treatment of HEK-293T cells with EGF leads to an important increase in the ubiquitylation levels of several recognized substrates of Itch, leading to their proteasomal degradation. Moreover, we demonstrate that this effect is largely dependent on the activation by EGF signaling of the JNK pathway. These observations provide a clear connection between the ubiquitylation machinery and cell signaling, providing a molecular mechanism through which cell signaling directly increases the activity of an ubiquitin ligase, and leads to its substrates degradation.

It has been proposed that the ubiquitin ligase Itch is maintained inactive under resting conditions by intramolecular binding of its WW domains to the proline-rich region(9). Upon JNK-mediated phosphorylation, the intramolecular interaction is displaced, and the WW domains are free for substrate interaction. From our results, clearly the affinity of Itch for its substrates is influenced by its phosphorylation state. For Cbl and Smad7, phosphorylation of Itch even seems necessary to allow the substrate-ligase interactions. However, this explanation cannot account for FAM and endophilin binding to Itch. Endophilin binds to Itch through an SH3/proline-rich domain interaction, and both proteins interact in resting cells. Consistently, Endophilin is ubiquitylated by Itch even without stimulation with EGF, as best illustrated in Figure 8A and in (1). However, this interaction is still modulated by EGF treatment and JNK activation, as both Endophilin ubiquitylation, and Itch interaction are increased upon EGF stimulation, an effect that is blocked by the JNK inhibitor. Therefore, Itch phosphorylation seems to not only favor the availability of the WW domains for interaction, but also facilitates binding and ubiquitylation of substrates that does not depend on WW domain binding.

The situation is even more complex when one considers the relationship between Itch and FAM, although it has been demonstrated that FAM interacts with Itch WW domains. The interaction between Itch and FAM is already present at baseline, where phosphorylation of Itch is low. In the first minutes following treatment with EGF, Itch is already phosphorylated, and the interaction with FAM is almost completely lost. The interaction then recovers but at time points where phosphorylation persists. These data suggest that other phosphorylation events may occur simultaneously, with different effects on Itch interactions with FAM. This is consistent with our own results, where different degrees of Itch phosphorylation are observed on 2D blots, suggesting that multiple residues are modified. Also, phosphorylation at 20 minutes in the 2D gel experiment is significantly higher than in the anti-phospho-serine blot. Clearly, more than one phosphorylation site seems to be modified by treatment with EGF, although all EGF-induced phosphorylation ultimately depends on JNK activity. This is also consistent with Gallagher et al. (9) report that identified at least three different residues phosphorylated by JNK and with reported tyrosine phosphorylation of Itch following treatment with EGF (4).

In conclusion, we propose here that Itch phosphorylation by JNK on at least two or more sites is at least partly responsible for the increased activity and ubiquitylation of Itch substrates, leading to significant downregulation of these proteins, which will naturally impact on their own cellular activity. At this point, we cannot completely exclude that other ubiquitin ligases may also be activated and participate in EGF-dependant protein down regulation, although our siRNA experiments clearly demonstrate that, at least for Endophilin, Itch is the major ubiquitin ligase involved in EGF-induced ubiquitylation and degradation. However, Itch remains the most likely candidate, since it is the only ligase

known to be a substrate of JNK, and we clearly demonstrate that JNK is involved in this process. Furthermore, the proline-rich region where JNK phosphorylation sites are located is not conserved in other HECT-domain ligases closely related to Itch. This reinforces the idea that Itch may very well be unique in its capacity of being regulated by JNK signaling.

In the context of EGF receptor signaling, where internalization of the receptor is recognized as an important regulatory step (13), it is particularly relevant to note that Itch activation leads to the downregulation of two proteins involved in EGF receptor internalization, Cbl and Endophilin (29). Limiting free Cbl and Endophilin could serve as an efficient way to limit receptor internalization in certain physiological or pathological contexts, and endogenous Itch is likely to have a major impact on this mechanism. We have previously shown that the expression levels of Itch and FAM are correlated, and that both proteins levels vary significantly in different cell types (23). We have clearly demonstrated here that free Endophilin can be importantly diminished through Itch activity when EGF is applied to HEK-293T cells. Therefore, the proposed mechanism could work to promote prolonged EGF receptor signaling at the cell surface when exposition to EGF is prolonged. It is now largely accepted that signal transduction qualitatively differs whether the signaling receptor is internalized or not. Itch may thus very well be an unexpected cell signal regulator, pushing further the idea of ubiquitylation regulating signal transduction.

### **3.7 ACKNOWLEDGMENT**

We would like to express our gratitude toward the colleagues that gracefully provided reagents: TM Dawson, Johns Hopkins University School of Medicine; A. Afti, Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale, Paris, France; John O'Bryan, University of Illinois College of Medicine; R. Bernards, Netherlands Cancer Institute; S. Wood, National Centre for Adult Stem Cell Research, Griffith University, Nathan, Australia. We also thank P.S. McPherson for critical reading of the manuscript and helpful advices. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Discovery Grant 288238 to AA. AA is supported by a FQRNT young investigator award.

### 3.8 REFERENCES

1. **Angers, A., A. Ramjaun, and P. McPherson.** 2004. The HECT domain ligase Itch ubiquitinates endophilin and localizes to the trans-Golgi network and endosomal system. *J Biol Chem* **279**:11471-9.
2. **Chastagner, P., A. Israel, and C. Brou.** 2006. Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO Rep* **7**:1147-53.
3. **Citri, A., and Y. Yarden.** 2006. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**:505-16.
4. **Courbard, J. R., F. Fiore, J. Adelaide, J. P. Borg, D. Birnbaum, and V. Ollendorff.** 2002. Interaction between two ubiquitin-protein isopeptide ligases of different classes, CBLC and AIP4/ITCH. *J Biol Chem* **277**:45267-75.
5. **Cui, X., H. Kim, I. Kuitse, H. Kim, P. Brown, and A. Lee.** 2006. Epidermal growth factor induces insulin receptor substrate-2 in breast cancer cells via c-Jun NH(2)-terminal kinase/activator protein-1 signaling to regulate cell migration. *Cancer Res* **66**:5304-13.
6. **Duan, L., Y. Miura, M. Dimri, B. Majumder, I. L. Dodge, A. L. Reddi, A. Ghosh, N. Fernandes, P. Zhou, K. Mullane-Robinson, N. Rao, S. Donoghue, R. A. Rogers, D. Bowtell, M. Naramura, H. Gu, V. Band, and H. Band.** 2003. Cbl-mediated ubiquitylation is required for lysosomal sorting of epidermal growth factor receptor but is dispensable for endocytosis. *J Biol Chem* **278**:28950-60.
7. **Fallon, L., C. M. Belanger, A. T. Corera, M. Kontogianna, E. Regan-Klapisz, F. Moreau, J. Voortman, M. Haber, G. Rouleau, T. Thorarinsdottir, A. Brice, P. M. van**

**Bergen En Henegouwen, and E. A. Fon.** 2006. A regulated interaction with the UIM protein Eps15 implicates parkin in EGF receptor trafficking and PI(3)K-Akt signalling. *Nat Cell Biol* **8**:834-42.

8. **Fang, D., C. Elly, B. Gao, N. Fang, Y. Altman, C. Joazeiro, T. Hunter, N. Copeland, N. Jenkins, and Y. C. Liu.** 2002. Dysregulation of T lymphocyte function in Itchy mice: a role for Itch in TH2 differentiation. *Nat Immunol* **3**:281-7.

9. **Gallagher, E., M. Gao, Y. C. Liu, and M. Karin.** 2006. Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:1717-22.

10. **Gao, M., and M. Karin.** 2005. Regulating the regulators: control of protein ubiquitylation and ubiquitin-like modifications by extracellular stimuli. *Mol Cell* **19**:581-93.

11. **Gao, M., T. Labuda, Y. Xia, E. Gallagher, D. Fang, Y. C. Liu, and M. Karin.** 2004. Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science* **306**:271-5.

12. **Haglund, K., N. Shimokawa, I. Szymkiewicz, and I. Dikic.** 2002. Cbl-directed monoubiquitylation of CIN85 is involved in regulation of ligand-induced degradation of EGF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:12191-6.

13. **Holler, D., and I. Dikic.** 2004. Receptor endocytosis via ubiquitin-dependent and -independent pathways. *Biochem Pharmacol* **67**:1013-7.

14. **Hurd, C., and E. Rozengurt.** 2001. Protein kinase D is sufficient to suppress EGF-induced c-Jun Ser 63 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **282**:404-8.

15. **Ikeda, A., R. G. Caldwell, R. Longnecker, and M. Ikeda.** 2003. Itchy, a Nedd4 ubiquitin ligase, downregulates latent membrane protein 2A activity in B-cell signaling. *J Virol*

77:5529-34.

16. **Katzmann, D. J., G. Odorizzi, and S. D. Emr.** 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:893-905.
17. **Klapisz, E., I. Sorokina, S. Lemeer, M. Pijnenburg, A. J. Verkleij, and P. M. van Bergen en Henegouwen.** 2002. A ubiquitin-interacting motif (UIM) is essential for Eps15 and Eps15R ubiquitylation. *J Biol Chem* **277**:30746-53.
18. **Lallemand, F., S. Seo, N. Ferrand, M. Pessah, S. L'Hoste, G. Rawadi, S. Roman-Roman, J. Camonis, and A. Atfi.** 2005. AIP4 restricts transforming growth factor-beta signaling through a ubiquitylation-independent mechanism. *J Biol Chem* **280**:27645-53.
19. **Le Roy, C., and J. Wrana.** 2005. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:112-26.
20. **Liu, B., M. Fang, Y. Lu, G. B. Mills, and Z. Fan.** 2001. Involvement of JNK-mediated pathway in EGF-mediated protection against paclitaxel-induced apoptosis in SiHa human cervical cancer cells. *Br J Cancer* **85**:303-11.
21. **Magnifico, A., S. Ettenberg, C. Yang, J. Mariano, S. Tiwari, S. Fang, S. Lipkowitz, and A. M. Weissman.** 2003. WW domain HECT E3s target Cbl RING finger E3s for proteasomal degradation. *J Biol Chem* **278**:43169-77.
22. **McPherson, P. S., B. K. Kay, and N. K. Hussain.** 2001. Signaling on the endocytic pathway. *Traffic* **2**:375-84.
23. **Mouchantaf, R., B. Azakir, P. McPherson, S. Millard, S. Wood, and A. Angers.** 2006. The ubiquitin ligase Itch is auto-ubiquitylated in vivo and in vitro but is protected from degradation by interacting with the deubiquitylating enzyme FAM/USP9X. *J Biol Chem* **281**:38738-47.



24. **Murray, R. Z., L. A. Jolly, and S. A. Wood.** 2004. The FAM deubiquitylating enzyme localizes to multiple points of protein trafficking in epithelia, where it associates with E-cadherin and beta-catenin. *Mol Biol Cell* **15**:1591-9.
25. **Normanno, N., A. De Luca, C. Bianco, L. Strizzi, M. Mancino, M. Maiello, A. Carotenuto, G. De Feo, F. Caponigro, and D. Salomon.** 2006. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* **366**:2-16.
26. **Oda, K., Y. Matsuoka, A. Funahashi, and H. Kitano.** 2005. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* **1**:2005.0010.
27. **Ramjaun, A. R., A. Angers, V. Legendre-Guillemain, X. K. Tong, and P. S. McPherson.** 2001. Endophilin regulates JNK activation through its interaction with the germinal center kinase-like kinase. *J Biol Chem* **276**:28913-9.
28. **Rossi, M., V. De Laurenzi, E. Munarriz, D. R. Green, Y. C. Liu, K. H. Vousden, G. Cesareni, and G. Melino.** 2005. The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *Embo J* **24**:836-48.
29. **Soubeyran, P., K. Kowanetz, I. Szymkiewicz, W. Y. Langdon, and I. Dikic.** 2002. Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature* **416**:183-7.
30. **Vieira, A. V., C. Lamaze, and S. L. Schmid.** 1996. Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* **274**:2086-9.
31. **Yang, C., W. Zhou, M. Jeon, D. Demydenko, Y. Harada, H. Zhou, and Y. Liu.** 2006. Negative regulation of the E3 ubiquitin ligase Itch via Fyn-mediated tyrosine phosphorylation. *Mol Cell* **21**:135-41.
32. **Zhang, X., and A. H. Neufeld.** 2007. Signal transduction pathways for epidermal growth

factor stimulated cyclooxygenase-2 induction in astrocytes. *Exp Eye Res* **85**:280-8.

### 3.9 FIGURES

Figure 3-1 : Treatment with EGF induces ubiquitylation of several substrates of Itch.

(A) HEK-293T cells were cotransfected with GFP-Endophilin and Myc-Ubiquitin. Cells were serum starved then stimulated with 100 ng/ml of recombinant EGF for the indicated time. Lysates from cells were immunoprecipitated with anti-GFP and proteins were blotted to reveal ubiquitylation of GFP-Endophilin with an anti-Myc antibody. (B) HEK-293T cells were transfected and treated as in A. Ubiquitylated proteins from the total cell lysates were immunoprecipitated with an anti-Myc antibody and blotted with an anti-GFP antibody to reveal ubiquitylated GFP-Endophilin. (C) Cells were transfected with 6xMyc-Smad7, FLAG-Itch and HA-ubiquitin and treated as in A. Lysates from cells were immunoprecipitated with anti-Myc and proteins were blotted to reveal ubiquitylation of Myc-Smad7 with an anti-HA antibody. (D) HEK-293T cells were transfected with HA-Cbl, FLAG-Itch and Myc-Ubiquitin and treated as in A. Ubiquitylated proteins from the total cell lysates were immunoprecipitated with an anti-Myc antibody and blotted with an anti-HA antibody to reveal ubiquitylated HA-Cbl. (E) Cells were transfected with FLAG-Itch and Myc-ubiquitin and treated as in A. Lysates from cells were immunoprecipitated with anti-FLAG and proteins were blotted to reveal ubiquitylation of FLAG-Itch with an anti-Myc antibody. (F) HEK-293T cells were transfected and treated as in E. Ubiquitylated proteins from the total cell lysates were immunoprecipitated with an anti-Myc antibody and blotted with an anti-FLAG antibody to reveal ubiquitylated FLAG-Itch. CL: cell lysate.

Azakir and Angers  
Figure 1

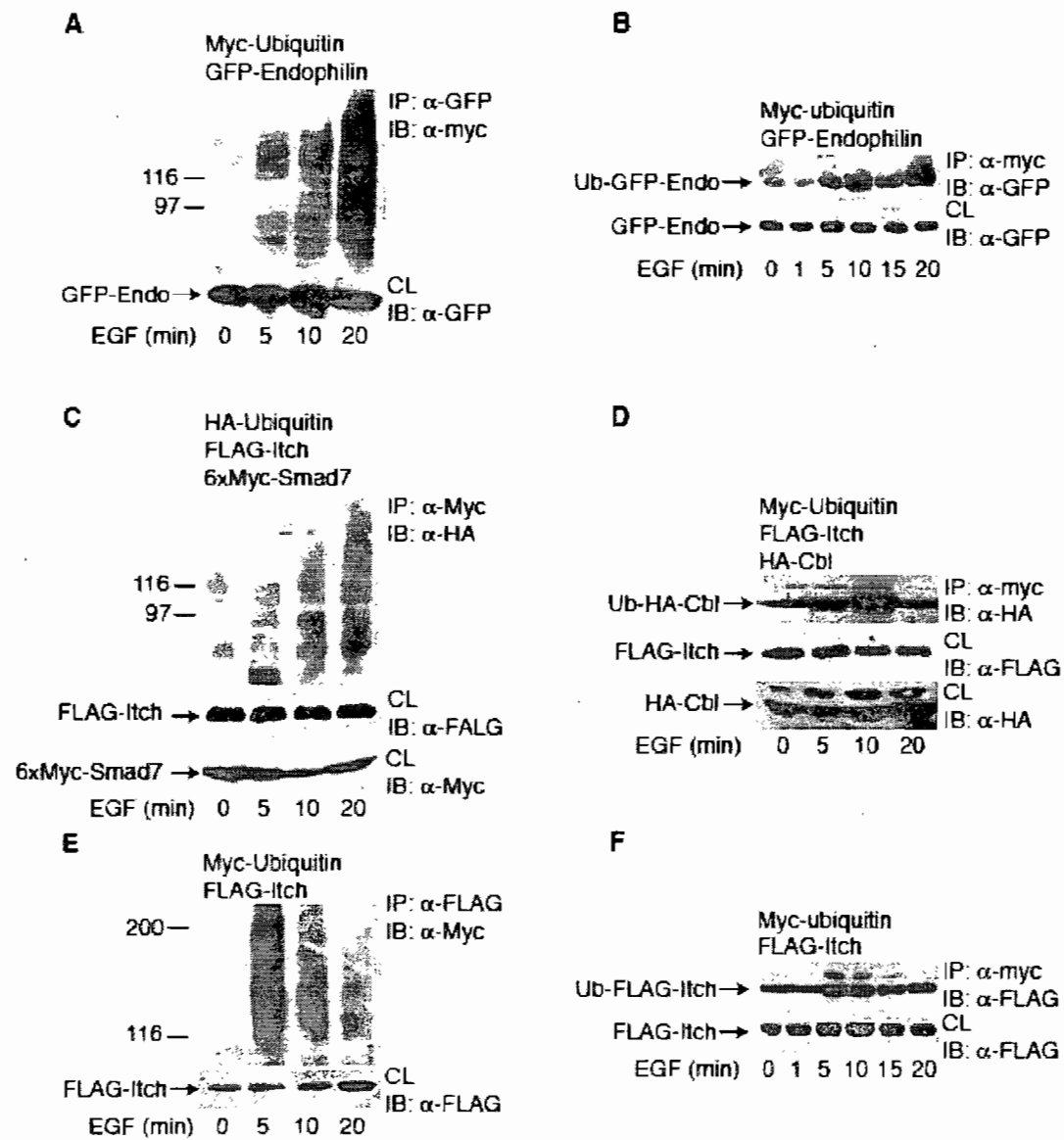


Figure 3-2 : Treatment with EGF induces proteasome-dependent degradation of Endophilin and Cbl, but not Itch. HEK-293T cells cotransfected with the indicated constructs and treated with EGF in control conditions or in the presence of 10 mM Lactacystin. The total cell lysates were then immunoblotted for (A) endogenous Endophilin, or (B) transfected HA-Cbl to reveal ubiquitylation and/or degradation. (C) HEK-293T cells transfected with FLAG-Itch and Myc-Ubiquitin were treated as above. FLAG-Itch was immunoprecipitated and blotted with an anti-Myc antibody. Graphs on the right represent average pixel density of at least three similar experiments for (A) endogenous endophilin bands (B) ubiquitylated HA-Cbl or (C) ubiquitylated FLAG-Itch. Open circles: Control cells; Filled squares: Lactacystin treated cells. Error bars represent standard deviation.

Azakir and Angers  
Figure 2

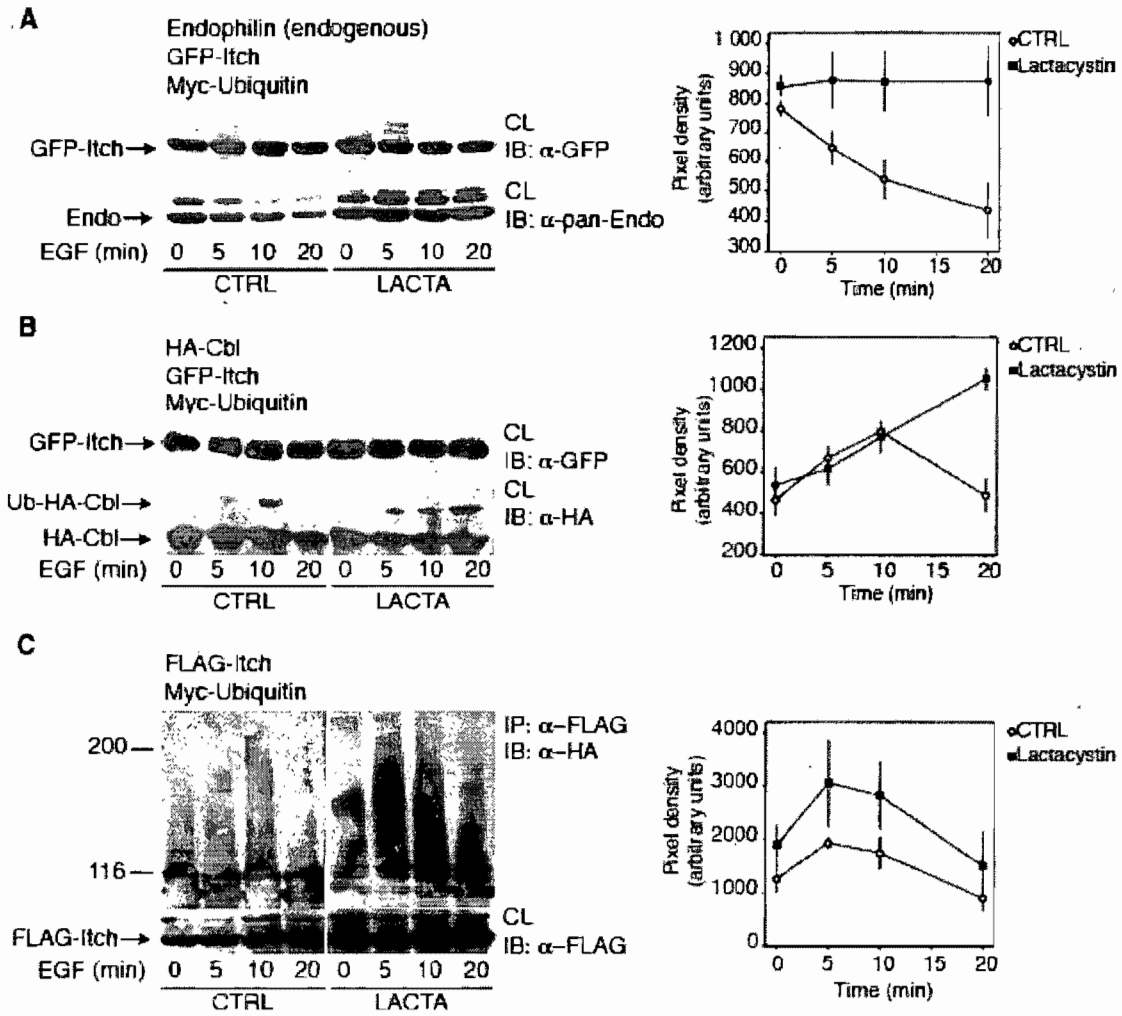


Figure 3-3 : siRNA experiments demonstrate Itch as the ligase in Endophilin degradation, and show that FAM rescue Itch from its own EGF-induced ubiquitylation

(A) HEK-293T cells were transfected with plasmids encoding control hairpin sequence or sequence targeted against Itch. Seventy-two hours after transfection, cells were treated with EGF and protein extracts blotted with the indicated antibodies. (B) HEK-293T cells were transfected with plasmids encoding control hairpin sequence or sequence targeted against FAM. Cells were further transfected with FLAG-Itch and Myc-Ubiquitin and treated with EGF as indicated. Lysates were blotted with an anti-FAM antibody to show the efficacy of the knock-down (upper panel). After immunoprecipitation with anti-FLAG, proteins were blotted with anti-Myc to show Itch ubiquitylation (middle panel), and anti-FLAG to show total Itch immunoprecipitation. Graphs on the right represent average pixel density, relative to t=0 of at least three similar experiments for (A) endogenous endophilin bands, or (B) ubiquitylated FLAG-Itch. Open circles: Control cells; Filled squares: siRNA cells. Error bars represent standard deviation.

Azakar and Angers  
Figure 3

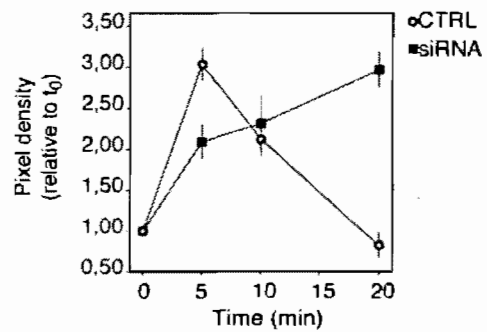
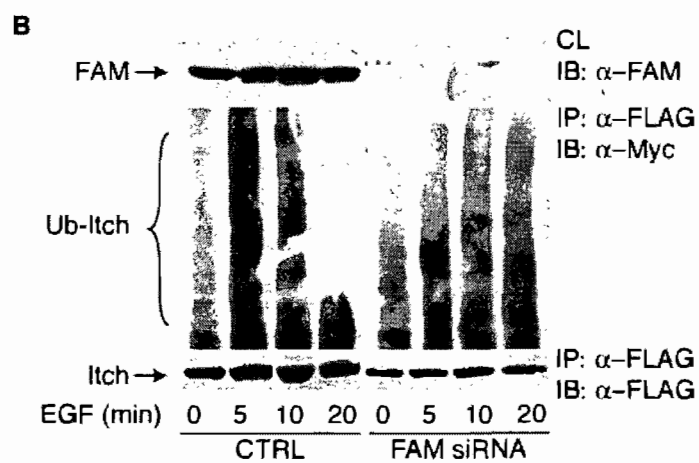
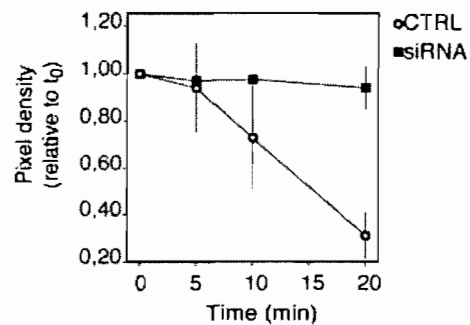
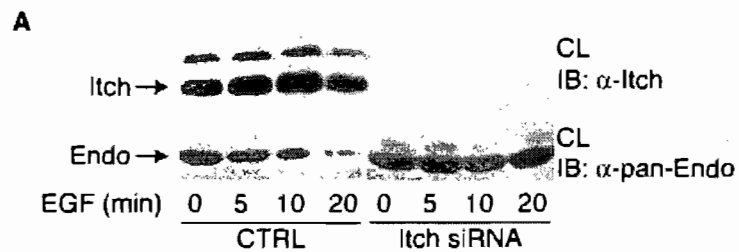




Figure 3-4 : : Itch is phosphorylated in a JNK dependent manner following treatment with EGF. (A) Non-transfected HEK-293T cells were treated or not with 30 mM of SP600125 for 24 hours in serum-free media and treated with 100 ng/ml of EGF for the indicated times. Proteins from the total cell lysates were separated by 2D gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose for immunoblotting with an anti-Itch monoclonal antibody or anti- $\beta$ -actin as a control. Itch position in the pH gradient is shown relative to  $\beta$ -actin. The same cell lysate separated on a 3-12% SDS-PAGE was blotted with anti-P-JNK antibody to show JNK activation.

(B) Protein extracts of cells treated as in A were immunoprecipitated with an anti-Itch antibody. Immunoprecipitated proteins were then immunoblotted with an anti-phosphoserine antibody to show Itch phosphorylation. The same blot was then probed with an anti-Itch antibody to show the efficacy of the immunoprecipitation. The crude cell lysates were immunoblotted with an anti-P-JNK antibody to show JNK activation.

Azakar and Angers  
Figure 4

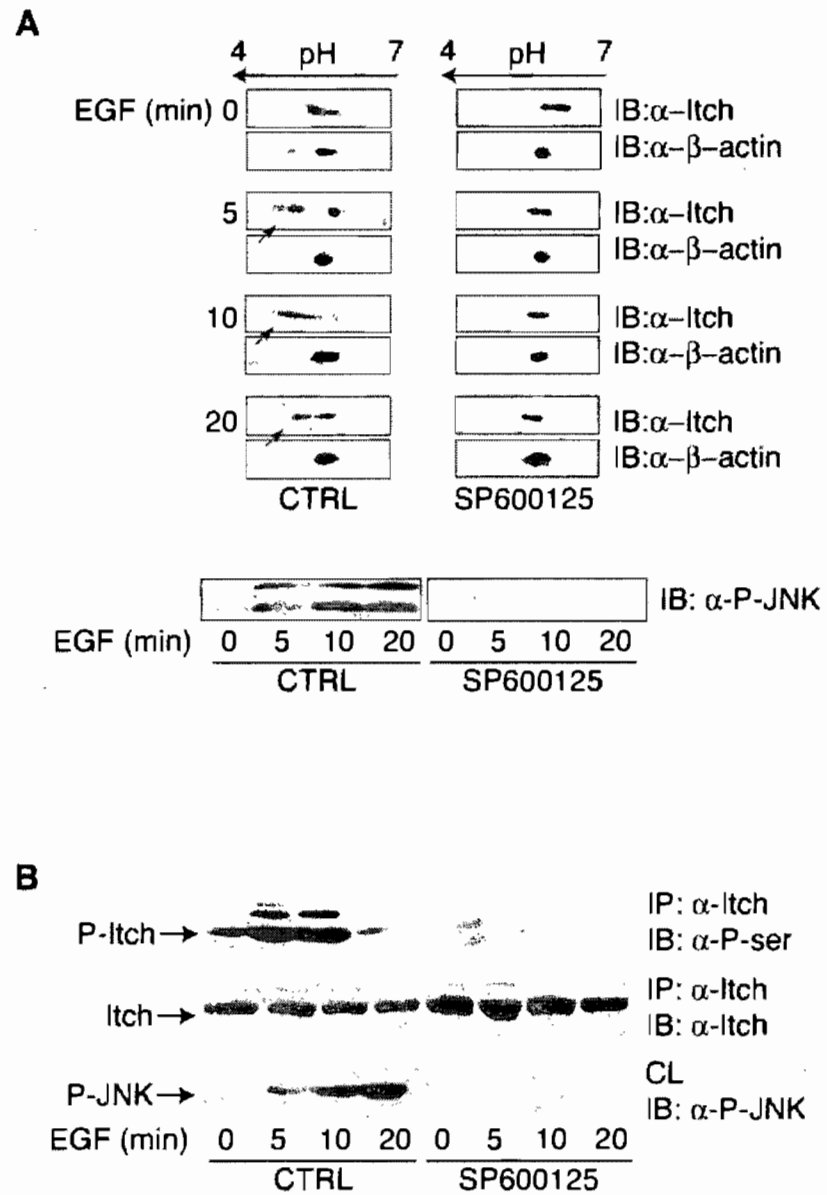
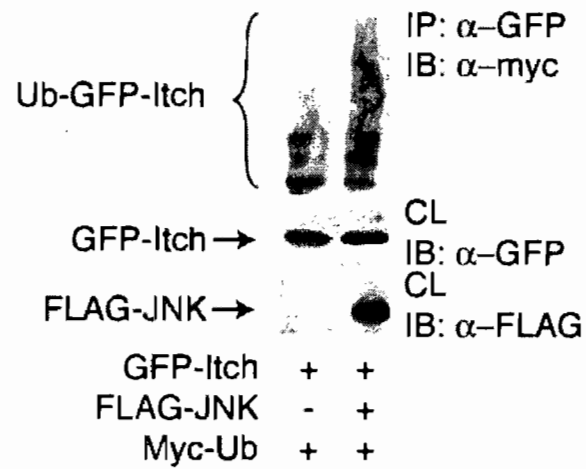


Figure 3-5 : Itch ubiquitylation is triggered by JNK activation. (A) HEK-293T cells were transfected with GFP-Itch and Myc-Ubiquitin only, or with GFP-Itch, FLAG-JNK and Myc-Ubiquitin. The total cell lysates were immunoprecipitated with anti-GFP and blotted with anti-Myc to show Itch ubiquitylation. The cell lysates were also blotted with anti-GFP and anti-FLAG to assess protein expression. (B) HEK-293T cells were transfected with GFP-Itch and Myc-Ubiquitin and the indicated combinations of FLAG-GLK, kinase inactive FLAG-GLK (K->E) and non-tagged Endophilin A1. Ubiquitylated proteins were immunoprecipitated with an anti-Myc antibody and immunoprecipitated proteins were blotted with an anti-GFP antibody. The cell lysates were blotted with the indicated antibodies to assess transfections. GLK and Endophilin were previously reported to cooperate to activate JNK (27).

Azakir and Angers  
**Figure 5**

**A**



**B**

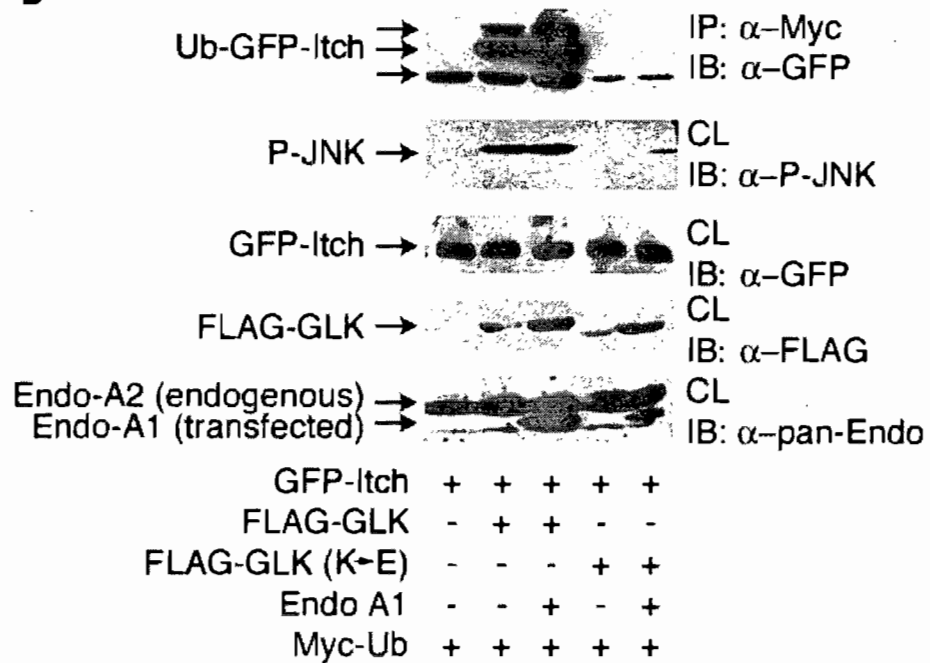


Figure 3-6 : Treatment with SP600125 blocks EGF-induced ubiquitylation. (A) HEK-293T cells were transfected with GFP-Endophilin, FLAG-Itch and Myc-ubiquitin and treated for 24 hr with 30 mM SP600125 or vehicle (CTRL) in serum-free media before treatment with EGF as above. The cell lysates were immunoprecipitated with a polyclonal anti-GFP antibody and blotted with a monoclonal anti-Myc antibody. The cell lysates were further blotted with anti-GFP to assess for GFP-Endophilin expression and anti-PO4-JNK to show JNK activation. (B) HEK-293T cells transfected with FLAG-Itch were treated as in A. The cell lysates were blotted with anti-Pan-Endophilin or anti-P-JNK. The endogenous level of Endophilin is reduced following treatment with EGF, but not when JNK activity is blocked by SP600125. (C) Cell transfected with GFP-Itch and Myc-Ubiquitin were treated as in A. The cell lysates were immunoprecipitated with a polyclonal anti-GFP antibody and blotted with a monoclonal anti-Myc antibody. The cell lysates were further blotted with anti-GFP to assess for GFP-Itch expression and anti-P-JNK to show JNK activation.

Azakir and Angers  
Figure 6

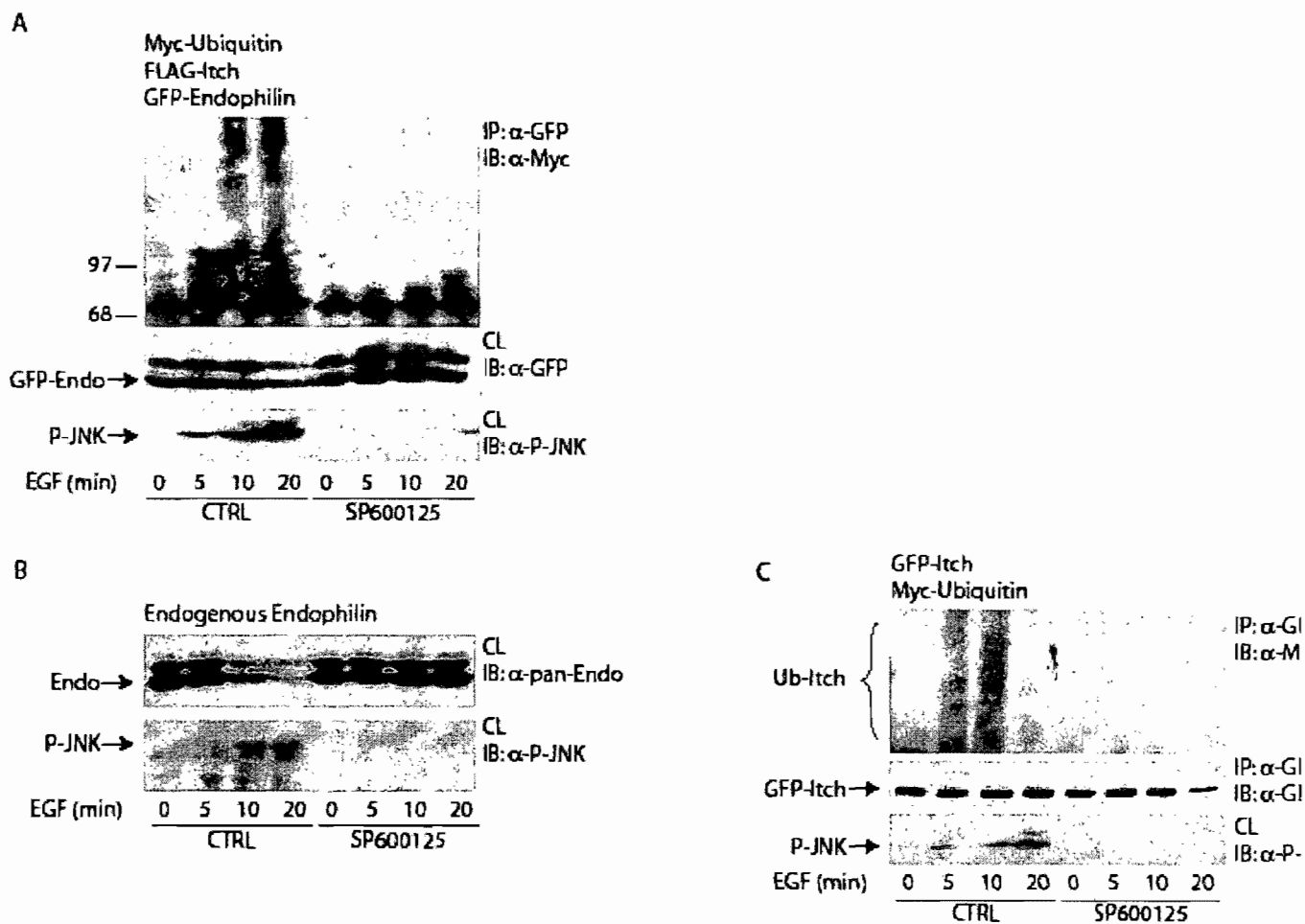


Figure 3-7 : The interaction between Itch and other proteins are modulated after treatment with EGF in a JNK-dependant manner. Coimmunoprecipitation was used to measure the interaction between Itch and different proteins after treatment with EGF in control conditions and in the presence of SP600125. Cell treatment with EGF and SP600125 was as in Fig. 6. (A) Lysates from non-transfected treated cells were immunoprecipitated with an anti-pan-Endophilin polyclonal antibody. Immunoprecipitated proteins and cell lysates were blotted as indicated. (B) Cell transfected with 6xMyc-Smad7 were treated as above and immunoprecipitated with a monoclonal anti-Itch antibody. Immunoprecipitated proteins and cell lysates were blotted as indicated. (C) Cell transfected with HA-Cbl were treated as above and immunoprecipitated with a monoclonal anti-Itch antibody. Immunoprecipitated proteins and cell lysates were blotted as indicated. (D) Non-transfected HEK-293T cells were treated with SP600125 and EGF as above and the cell lysates were immunoprecipitated with a monoclonal anti-Itch antibody. Immunoprecipitated proteins and cell lysates were blotted as indicated.

Azakir and Angers  
**Figure 7**

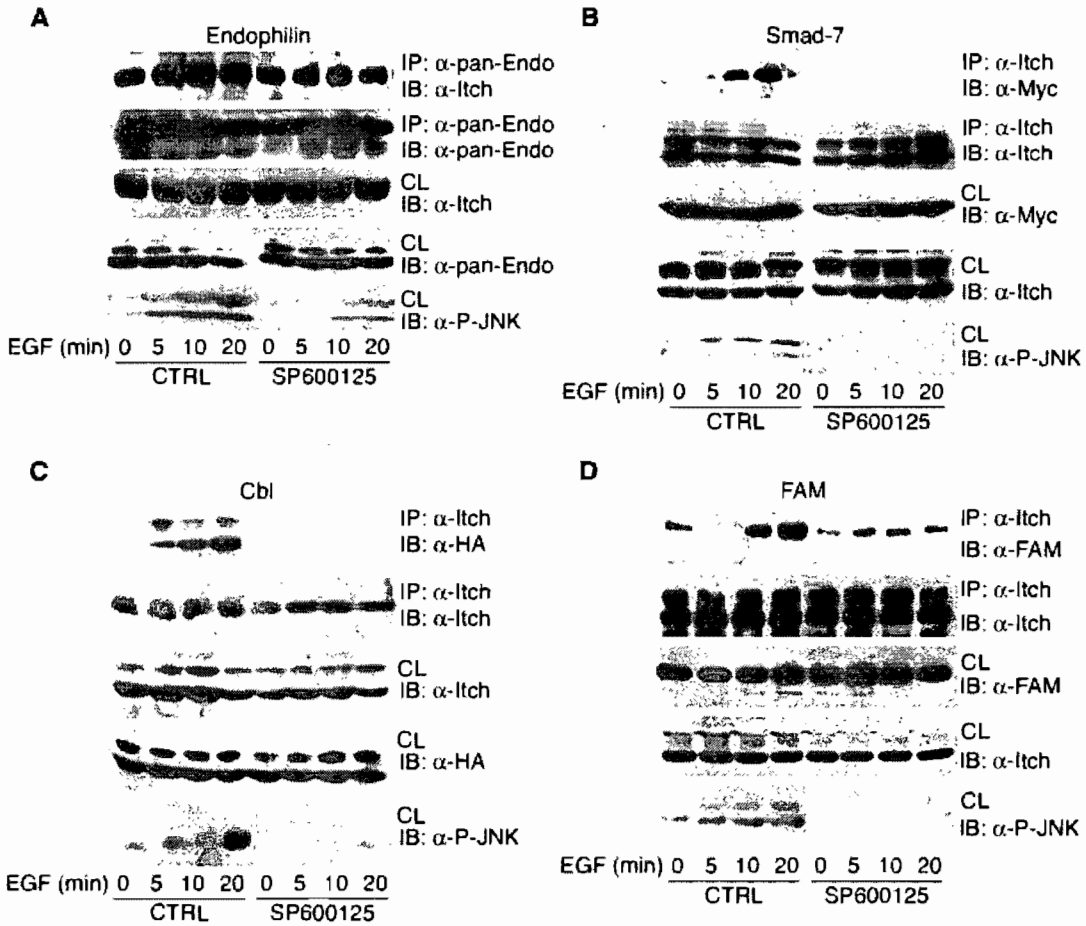




Figure 3-8: Quantitative analysis of the effect of the JNK inhibitor SP600125 on Itch substrates ubiquitylation and Itch co-immunoprecipitation. (A) Quantitative analysis of ubiquitylated Endophilin, Cbl or Itch accumulating after treatment with EGF in control conditions or in the presence of SP600125. The bars represent the average pixel density from at least three Western blot analysis similar to those presented in Figure 6. (B) Quantitative analysis of proteins co-immunoprecipitating with Itch from cells treated with EGF in control conditions or in the presence of SP600125. The bars represent the average pixel density from at least three Western blot analysis similar to those presented in Figure 7, expressed relative to immunoprecipitated Itch. Error bars represent standard deviation.

Azakir and Angers  
Figure 8

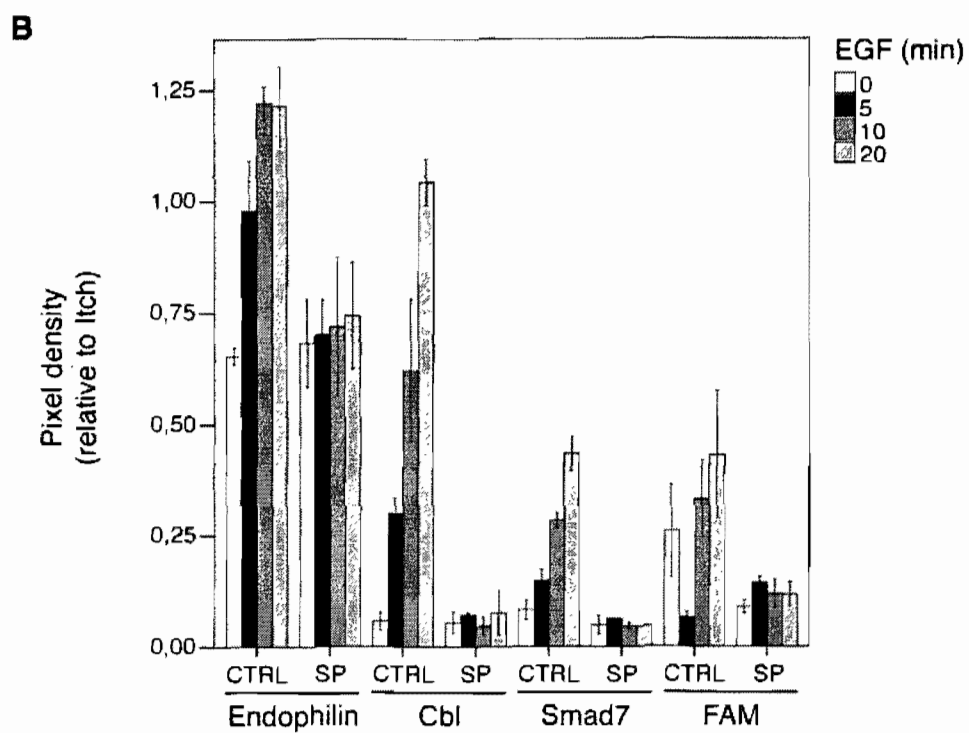
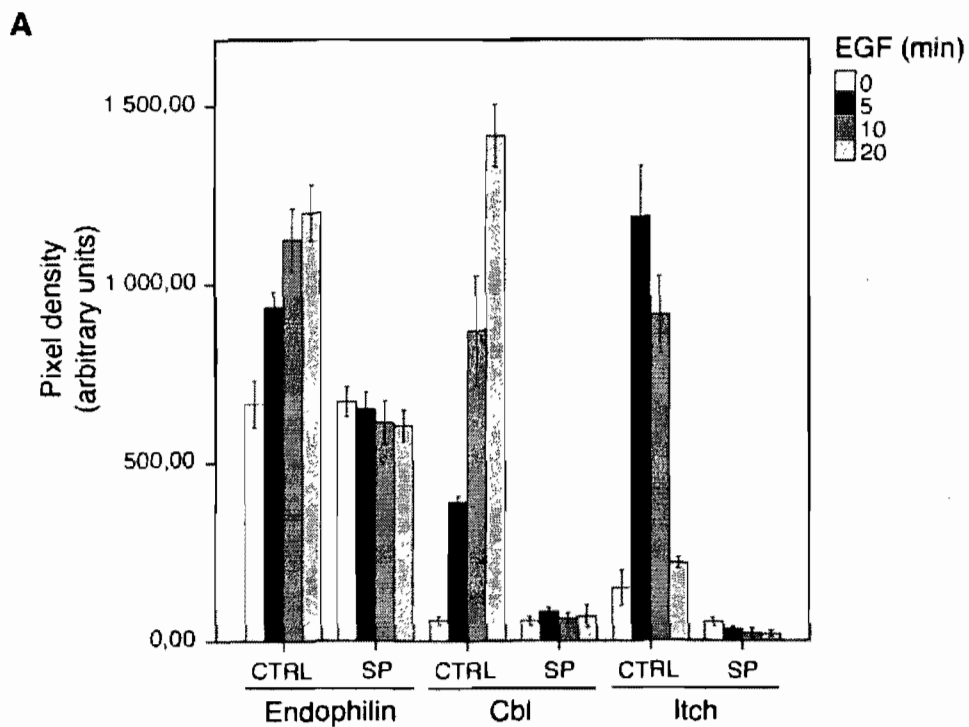
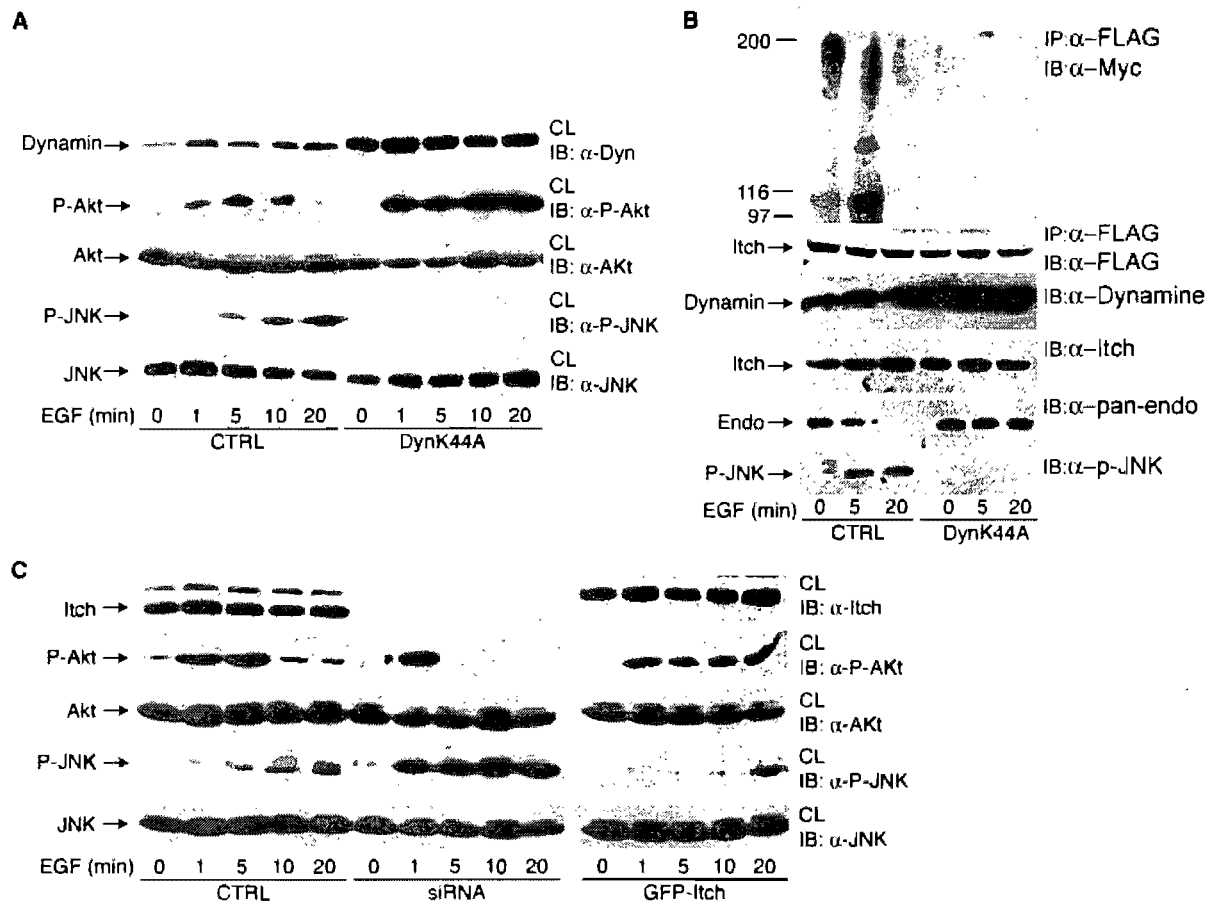


Figure 3-9 : Itch expression influences EGF receptor downstream signaling. (A) HEK-293T cells transfected with control vector (CTRL) or with GTPase inactive Dynamin K44A (DynK44A) were treated with EGF as above. Akt and JNK activation was measured using phospho-specific antibodies against active Akt (P-Akt) or active JNK (P-JNK), as indicated. (B) HEK-293T cells were transfected with FLAG-Itch, Myc-Ubiquitin and with or without DynK44A, as indicated, and treated with EGF. Lysates from cells were immunoprecipitated with anti-FLAG and proteins were blotted to reveal ubiquitylation of FLAG-Itch with an anti-Myc antibody. Endophilin degradation was measured by blotting with an anti-pan-endophilin antibody. (C) HEK-293T cells were transfected with plasmids encoding control hairpin sequence (CTRL) or sequence targeted against Itch (siRNA) or GFP-Itch. Seventy-two hours after transfection, cells were treated with EGF and protein extracts blotted with the indicated antibodies.

Azakir and Angers  
Figure 9



## **4. CHAPITRE 4**

***The ubiquitin ligase Itch plays an anti-apoptotic role by promoting tBID ubiquitylation and proteasomal degradation***

Running title: Itch promotes tBID degradation

Bilal A. Azakir and Annie Angers

Ce chapitre va être soumis au "Journal of Cell death and differentiation" en Juillet 2008

Dans ce chapitre, nous avons identifié un nouveau substrat de Itch, la protéine proapoptotique tBID. Par coimmunoprecipitation, nous avons montré que Itch interagit avec la forme clivée active de BID, tBID. Cette interaction est suffisante pour que tBID soit ubiquitylée par Itch. Par contre, Itch n'interagit pas et n'ubiquityle pas la forme intacte de BID. Le résultat de cette ubiquitylation est la dégradation protéasomale de tBID. Nous avons aussi étudié l'effet de l'ubiquitylation de tBID par Itch sur l'apoptose. Premièrement, nous avons démontré que Itch augmente la survie cellulaire en diminuant l'activité endogène des caspases 3. Deuxièmement, nous avons démontré que la surexpression de tBID amène à l'augmentation de l'activité des caspases 3 et diminue la survie cellulaire. Cette action est réduite significativement lorsque Itch était surexprimé. En outre, la diminution de l'expression de Itch par interférence d'ARN (siRNA) diminue la survie cellulaire en augmentant l'activité des caspases 3 et augmente la réponse apoptotique à une surexpression de tBID. Aussi, Itch protège les cellules contre l'apoptose induite par l'activation des récepteurs à TNF- $\alpha$  et la protection devient plus significative une fois que Itch est activée par le traitement des cellules avec l'EGF. Ces résultats montrent que Itch peut protéger la cellule contre l'effet apoptotique de tBID clivée en réponse à TNF- $\alpha$ . Dans cette étude, j'ai réalisé toutes les expériences ainsi que l'écriture de la première version de l'article.

## 4.1 Résumé

Itch est une ligase de l'ubiquitine appartenant à la famille de Nedd4 dont l'activité enzymatique et la reconnaissance des substrats sont régulées par phosphorylation. Nous avons identifié tBID comme un substrat de Itch. La forme complète de la protéine, BID, n'est pas reconnue ni ubiquitylée par Itch. tBID est produit par le clivage de BID par les caspases 8 en réponse à un ligand proapoptotique et provoque l'apoptose cellulaire par le recrutement de Bax et Bak vers la mitochondrie ce qui induit le relargage du cytochrome c vers le cytoplasme. Itch protège les cellules contre l'apoptose par l'ubiquitylation et la dégradation protéasomale de tBID. Itch est aussi activée par l'EGF et responsable partiellement au moins de l'effet protectif de l'EGF. Nos résultats identifient Itch comme une molécule clé entre la signalisation de l'EGF et la résistance à l'apoptose, offrant des détails supplémentaires sur la façon dont l'EGFR et les inhibiteurs de protéasomes sont capable de contribuer ensemble dans l'induction de l'apoptose et le traitement du cancer.

## 4.2 Abstract

Itch is an ubiquitin ligase of the Nedd4 family whose substrate binding and enzymatic activity is stimulated by phosphorylation by JNK. Using a candidate approach, we identified tBID as a substrate of Itch. Full-length BID is not recognized nor ubiquitylated by Itch. tBID is produced by cleavage of BID by caspase 8 in response to pro-apoptotic ligand binding and promotes cell apoptosis by recruiting Bax or Bak to mitochondria which induce cytochrome-c liberation. Itch protects cells from apoptosis by directly ubiquitylating tBID and promoting its proteasomal degradation. Itch is also activated by treatment with EGF and is at least partly responsible for the EGF protective effect. Our findings identify Itch as a key molecule between EGF signaling and resistance to apoptosis, providing further details on how EGFR and proteasome inhibitors can both contribute to induction of apoptosis and treatment of cancer.



### 4.3 Introduction

Itch is a HECT domain ubiquitin ligase of the Nedd4 family, characterized by an N-terminal C2 domain responsible for guiding intracellular localization to endosomes, four WW domains involved in substrate recognition, and a C-terminal catalytic domain (1). Itch is best known for its role in immune system development through regulation of the level of its target substrates, c-jun and junB (2, 3). However, other substrates have been identified, and Itch action is not limited to the immune system (4-11).

Epidermal growth factor (EGF) is well known for its ability to promote cell growth (12). It is also a key regulator of cell survival (13). Maintaining the balance between cell survival and apoptosis is critical in the maintenance of a healthy organism, and tipping the equilibrium in one or another direction results in either degenerative disease or malignant cell development. EGF activates several receptors and a very complex signaling network with multiple cross-talks with the apoptotic pathways (13). One specific point on which EGF has been shown to influence cell survival is through the downregulation of the proapoptotic protein Bid in hepatocytes (14). Bid and its truncated active form, tBid, are both reported as targets of the ubiquitin/proteasome system, and their proteasomal degradation has a major influence on cell sensitivity to apoptotic signals (15, 16). We previously showed that the ubiquitin ligase Itch ability to ubiquitylate one of its target, endophilin, is increased following treatment of cells with EGF (4). We thus sought to determine if there could be a link between EGF induced reduction in Bid and tBid levels and the ubiquitin ligase activity of Itch.

The Bcl-2-homology domain-3 (BH3) only protein Bid is an abundant pro-apoptotic protein of the Bcl-2 family that is crucial for death receptor-mediated apoptosis in many cell systems (17, 18). The BH3 domain only proteins are a subfamily of the Bcl-2 family involved in the initiation of apoptosis through the mitochondrial pathway. The key event in the mitochondrial pathway is the release of proapoptotic factors from the mitochondrial intermembrane space into the cytosol resulting in the downstream activation of a family of cytosolic cysteine proteases, caspases, that are required for many of the morphological changes that occur during apoptosis. The mitochondrial release of cytochrome-c and Smac/DIABLO allows for the formation of the apoptosome, a complex that enables the activation of caspases within the cell (19, 20).

In this pathway, Bid is activated by caspase-8-mediated cleavage to produce a truncated form, tBid (16, 18, 21). This cleavage unmasks the BH3 domain, facilitating its accessibility for protein-protein interactions. tBid is subsequently myristoylated and translocates to mitochondria (22) where it oligomerizes with Bax or Bak to alter membrane integrity and promote cytochrome *c* release (23, 24). The subsequent release of caspase-activating factors strongly amplifies caspase 3 activation thorough the cleavage of its precursor, the pro-caspase-3, and results in cell apoptosis (19).

In this paper, we first examined the ability of Itch to interact with Bid and tBid. We found that Itch specifically interacts with tBid, but not with Bid. Itch ubiquitylates tBid and promotes its proteasomal degradation. We then demonstrated that Itch has an

antiapoptotic effect in cells, apparently through the induction of tBid proteasomal degradation. Itch also prevents TRAIL induced apoptosis, and is necessary for the anti-apoptotic response following EGF treatment. In fact, Itch activity is increased by treatment with EGF, promoting further tBid degradation. Together, our results provide a clear link between the regulation of an ubiquitin ligase and apoptosis and provide a crucial pathway linking EGF stimulation to apoptosis.

## 4.4 Results

### 4.4.1 *Itch interacts with tBID*

tBid is the active fragment resulting from the cleavage of Bid by activated caspase 8 in response to apoptotic stimulation. We used HEK-293T cells co-transfected with FLAG-Itch and Bid-GFP or tBid-GFP, and performed coimmunoprecipitation experiments to assess interaction of both proteins with Itch. Immunoprecipitation of Flag-Itch failed to coimmunoprecipitate Bid-GFP, but substantial amounts of tBid-GFP were coimmunoprecipitated with FLAG-Itch (Figure 1A).

Similar results were obtained by bioluminescent resonance energy transfer (BRET) using HEK-293T cells cotransfected with Rluc-Itch and Bid-GFP or tBid-GFP. When the two fusion proteins are in close proximity ( $\leq 100\text{\AA}$ ) as a consequence of protein interaction, non-radiative resonance energy is transferred from the emitting Rluc to GFP which becomes excited and in turn emits fluorescence. A BRET ratio is calculated for each transfection condition (see Methods). Significant interaction was obtained only in cells cotransfected with Rluc-Itch and tBid-GFP, whereas only background level signal was obtained in cells co-transfected with Rluc-Itch and Bid-GFP (Figure 1B).

Upon overexpression of Bid-GFP in HEK-293T cells tBid-GFP is spontaneously generated (Figure 1C, first lane). Interestingly, when Itch is co-expressed with Bid-GFP, little tBid-GFP is produced (Figure 1B, lane 2). This observation, coupled with the interaction between Itch and tBid suggests that this lack of tBid production in the presence of Itch might be due to proteasomal degradation of tBid-GFP. Consistently, treatment of

cells with the proteasomal inhibitor lactacystine leads to a significant increase in the amount of tBid-GFP present in the extract, both in control conditions and in the presence of FLAG-Itch (Figure 1C, lane 3 and 4).

#### ***4.4.2 tBID is a substrate of Itch***

Since Itch appears to promote proteasomal degradation of tBid, we sought to explore Itch-induced tBid ubiquitylation. We thus transfected HEK-293T cells with Myc-ubiquitin and tBid-GFP, with or without FLAG-Itch. Forty-eight hours after transfection, cells were lysed and tBid-GFP immunoprecipitated from the cell extracts. Western blotting with anti-GFP antibody revealed approximately equal levels of tBid-GFP in all immunoprecipitates (Fig. 2A). We then immunoblotted the proteins with a monoclonal anti-Myc antibody to detect ubiquitylation. Bands corresponding to mono- and poly-ubiquitylated tBid-GFP were detected only in cells expressing FLAG-Itch (Figure 2A, lane 2 and 4). Treating the cells with lactacystin prior to immunoprecipitation increased the level of detectable ubiquitylated tBid-GFP both in cells expressing Itch and in control cells (Figure 2A, lane 3 and 4), demonstrating further that ubiquitylated tBid is degraded in the proteasome.

Full-length Bid was not found to interact with Itch in the previous experiments. Consistently, co-expression of Bid-GFP, FLAG-Itch and Myc-Ubiquitin did not lead to Bid-GFP ubiquitylation (Figure 2B). Inhibition of the proteasome did not lead to any accumulation of ubiquitylated Bid, consistent with previous observations (15, 16).

#### ***4.4.3 Itch levels influence cell survival***

If tBid is the target of Itch activity, then Itch expression in cells is expected to protect them from apoptosis. To verify this hypothesis, we compared cell survival and caspase 3 activity in control HEK-293T cells, cells overexpressing GFP-Itch, and cells in which endogenous Itch expression was decreased by siRNA (Figure 3, insets). Overexpression of Itch caused a small but significant ( $10.0 \pm \text{S.E.} 4.0\%$ ;  $p=0.043$ ) increase in cell survival as compared to control. In contrast, cells in which itch was reduced showed a large decrease in cell survival ( $73.0 \pm \text{S.E.} 1.9\%$ ;  $p<0.001$ ) (Figure 3A).

Apoptosis was also influenced by Itch expression, as demonstrated by measurement of caspase 3 activity. In cells expressing GFP-Itch, caspase 3 activity was reduced to  $0.56 \pm 0.07$  fold of control ( $p=0.003$ ), whereas Itch downregulation by siRNA increased caspase 3 activity to  $1.50 \pm 0.06$  fold of control ( $p=0.004$ ) (Figure 3B).

#### ***4.4.4 Itch protects cells from tBID induced apoptosis***

The cleaved form of Bid, tBid, directly induces cell apoptosis by triggering the aggregation of Bax and Bak on mitochondrial membranes, which liberates cytochrome c and ultimately activates caspase 3 (24). Transfection of tBid directly triggers mitochondrial dependent apoptosis and caspase 3 activation (18). We used this assay to trigger apoptosis in HEK-293T cells and looked at the capacity of Itch to protect cells from tBid-induced apoptosis. In cell survival assays, transfection of increasing amounts of tBid leads to reciprocally lower cell survival (Figure 4A, CTRL bars). Cell survival is significantly increased at all levels of tBid expression when cells were also transfected with GFP-Itch (Figure 4A, Itch bars). Reduction of Itch levels by siRNA had the opposite effect, further decreasing cell survival over transfection of tBid alone (Figure 4A, siRNA bars).

Since tBid directly leads to caspase 3 activation, we looked at the effect of Itch levels on caspase 3 activity in response to tBid expression. Figure 4 B demonstrates that increasing the amount of tBid-GFP transfected in HEK-293T cells leads to increased caspase 3 activity. When GFP-Itch is co-transfected with tBid, caspase 3 activity is dramatically reduced (Figure 4B, Itch bars). In contrast, reducing Itch expression by siRNA leads to additional increased caspase 3 activity triggered by tBid overexpression. Together, these results show that Itch can significantly reduce cell apoptosis induced by tBid activity.

#### ***4.4.5 Itch protects cells from TRAIL-induced apoptosis***

We next examined if Itch protects cells from apoptosis induced by treatment with recombinant TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), a key pro-apoptotic ligand under physiological conditions (25). Treatment of HEK-293T cells with TRAIL leads to significant loss of cell viability ( $33.1 \pm 3.3\%$  of control;  $p < 0.001$ ) and increased caspase 3 activity ( $1.46 \pm 0.01$  fold increase;  $p < 0.001$ ) (Figure 5A, NT bars). In cells expressing GFP-Itch, treatment with TRAIL leads to a significantly smaller decrease in cell survival ( $75.4 \pm 3.3\%$  of control;  $p < 0.001$ ) and a significantly smaller increase in caspase 3 activity ( $0.9 \pm 0.02$  fold increase;  $p = 0.01$ ) (Figure 5A, Itch bars). In contrast, reducing Itch significantly increased TRAIL induce cell death, as measured in the cell survival assay ( $16.3 \pm 1.7\%$  of control;  $p < 0.001$ ) and caspase 3 activation ( $1.74 \pm 0.02$  fold increase;  $p < 0.001$ ) (Figure 5A, siRNA bars). Itch can thus protect cells from TRAIL-induced apoptosis.

#### ***4.4.6 EGF treatment activates Itch and increases tBID ubiquitylation and degradation***

Treatment of cells with EGF triggers an intricate signaling network, which leads to the activation of several kinases (26). In HEK-293T cells, EGF triggers robust activation of JNK (see Figure 6D), which was recently shown to phosphorylate and activate Itch (27, 28). Previously, we showed that treatment of HEK-293T cells with EGF increased ubiquitylation of endophilin, another substrate of Itch (4). We thus examined the effect of treatment with EGF on tBid ubiquitylation and proteasomal degradation. To this end, we transfected HEK-293T cells with tBid-GFP, FLAG-Itch and Myc-Ubiquitin and treated them with EGF. After exposure to EGF, transfected cells were lysed and tBid-GFP was immunoprecipitated from the extracts with an anti-GFP antibody (Figure 6A). Ubiquitylated tBid-GFP was detected by blotting immunoprecipitated proteins with an anti-Myc antibody. Under these conditions, ubiquitylated tBid increased with prolonged exposure to EGF.

Phosphorylation of Itch by JNK is proposed to increase the ability of Itch to interact with some of its substrates (27). We thus examined Itch interaction with Bid and tBid after treatment with EGF. Cells transfected with Bid-GFP and FLAG-Itch, or tBid-GFP and FLAG-Itch were treated as above. Itch was immunoprecipitated using an anti-FLAG antibody, and interaction with Bid or tBid was examined by blotting the immunoprecipitated proteins with an anti-GFP antibody. No co-immunoprecipitation of Bid-GFP was detected, even after treatment with EGF, confirming that Itch is unable to interact with Bid in its intact form (Figure 6B). However, Co-immunoprecipitated tBid-GFP consistently increased after treatment with EGF (Figure 6C).

We also examined whether or not treatment of cells with EGF affected the level of tBid produced upon overexpression of Bid-GFP. In control cells, transfected only with Bid-GFP,



spontaneously produced tBid-GFP decreased slightly after treatment with EGF (Figure 6D, first panel). When Itch expression was reduced by siRNA, the amount of tBid-GFP remained stable, and when Itch was overexpressed, much less tBid accumulated (Figure 6D, panels 2 and 3). To support the hypothesis that Itch activation following EGF treatment depends on JNK activity, we treated cells with SP600125, a specific JNK inhibitor (28, 29). Treatment of HEK-293T cells with SP600125 also stabilized tBid-GFP after treatment with EGF, consistent with the idea that Itch induces tBid degradation when it is activated following treatment with EGF (Figure 6D, fourth panel).

#### ***4.4.7 The anti-apoptotic effect of EGF stimulation depends in part on the function of Itch***

Because Itch activity is increased by treatment of cells with EGF and causes a decrease in tBid, we tested the influence of Itch expression on TRAIL-induced apoptosis in the presence of EGF. A previous report suggested that the protective effect of EGF is due to modulation of Bid expression (14). We examined cell survival and caspase 3 activity after treatment of cells with TRAIL or TRAIL and EGF in control cells, cells expressing GFP-Itch, or cells with reduced Itch expression, to assess if EGF protection could at least in part be attributable to Itch activation in HEK-293T cells (Figure 5B). Treatment of cells with EGF significantly reduced TRAIL induced apoptosis as assessed by cell survival measurement ( $78.1 \pm 4.0\%$  of control;  $p < 0.001$ ) and caspase 3 activity ( $1.12 \pm 0.03$  fold increase;  $p = 0.312$ ), recapitulating previous results (14). When cells were transfected with Itch, little additional protection was gained from EGF treatment alone, neither in cell survival ( $88.4 \pm 2.0\%$  of control;  $p = 0.001$ ) nor caspase 3 activity ( $0.80 \pm 0.01$  fold increase;  $p = 0.023$ ). Caspase 3

activity reduction in the presence of TRAIL and EGF was however significantly lower when cells were transfected with GFP-Itch ( $p < 0.001$ ). Reducing Itch expression significantly impacted the capacity of treatment with EGF to protect cells from apoptosis. Cell survival of Itch-deprived cells after treatment with TRAIL and EGF was reduced to  $22.4 \pm 3.6\%$  of control ( $p < 0.001$ ) and caspase 3 activity increased to  $1.53 \pm 0.08$  fold increase ( $p < 0.001$ ) (Figure 5B). Together, these results clearly demonstrate that Itch activation in response to EGF significantly contributes to improved cell survival in the presence of the growth factor.

Our previous results (Figure 6D) and reports from others (27, 28) suggests that the increased activity of Itch after treatment with EGF is at least partly due to JNK activation. If this is the case, then the protective effect of EGF on TRAIL-induced apoptosis should also depend on JNK activity. To test this hypothesis, we treated HEK-293T cells with TRAIL and EGF in the presence of the JNK inhibitor SP600125 or in control conditions (Figure 5C). Whereas the presence of the inhibitor had no significant effect on cell survival or caspase activity in control cells or after induction of apoptosis with TRAIL, it significantly impaired the ability of EGF to protect cells from TRAIL apoptosis ( $p < 0.001$  for both the MTT and caspase 3 activity assays).

## 4.5 Discussion

The present study identifies a new pathway by which ubiquitylation is linked to apoptosis. We demonstrate an interaction between Itch and the pro-apoptotic protein, tBid. Itch activation decreases tBid by causing tBid degradation in proteasomes. Further, we demonstrate that Itch protects cells from the apoptotic effect of tBid. Itch overexpression

decreases tBid-induced caspase 3 activity, increasing cell viability and importantly, when endogenous Itch is downregulated by siRNA, cell viability is decreased. These results are consistent with earlier reports stating that tBid, but not Bid, is ubiquitylated in cells, and that inhibition of the proteasome increases apoptosis by increasing tBid levels (15). Thus, we have identified the ligase responsible for limiting the extent of tBid-induced apoptosis. This conclusion is strengthened by our observation that reducing the basal level of Itch reduces cell survival and increases caspase 3 activity, consistent with increased tBid levels in these cells.

Interestingly, Itch interacts specifically with tBid, and not with Bid. This is also consistent with observations from (15) that showed that only tBid is ubiquitylated and stabilized by proteasome inhibition, not Bid. Similarly, it was recently reported that the N-terminal portion of Bid needs to be cleaved and degraded to allow tBid to interact with its partners (16). Removal of the N-terminal portion also seems to be necessary to allow the interaction of tBid with Itch.

Phosphorylation of Itch by JNK increases its activity and ability to interact with its substrates (27, 28). Here we show that the ability of Itch to interact with and ubiquitylate tBid significantly increases following treatment with EGF, which also triggers JNK activation. These findings shed new light on the protective effect of EGF against ligand-induced apoptosis (14). Ethiet et al. (14) Observed that treatment of hepatocytes with EGF induced a dose-dependent reduction of Bid, but did not affect Bid mRNA levels. They also reported that although blocking EGFR signaling totally abolished the effect, inhibiting PI3K signalling only partially reverted the EGF-induced downregulation of Bid (14). We have demonstrated here that Itch activity is necessary for EGF protective effect, at least in HEK-

293T cells, an effect likely due to JNK or another kinase activation. Interestingly, constitutive JNK activation is correlated with EGF receptor expression in numerous diffuse gliomas (30). Moreover, inhibition of EGF receptor is largely used to increase proapoptotic treatment of cancer (13, 31). Our findings provide a potential direct link between EGF signaling, JNK activation and antiapoptotic reaction through the downregulation of tBid by Itch. They also provide a more detailed mechanism toward the possible mean of action of popular cancer therapy, providing cues as to how to refine further those treatments.

Several apoptotic molecules are the target of ubiquitin ligases and are downregulated by proteasomal degradation. These include the inhibitory Bcl-2 family members Bcl-2, Mcl-1, the proapoptotic proteins Bax, BH3-only proteins Bim, and Bik and the C-terminal fragment of Bid. The ubiquitin ligases responsible for these ubiquitylation are in most cases not known (32). Here, we identify Itch as the ubiquitin ligase responsible for the ubiquitylation and downregulation of tBid. More importantly, we show how this ubiquitylation reaction can be modulated by EGF signaling and provide cues toward a more general mechanism of control of apoptosis by ubiquitin ligases.

## **4.6 Materials and Methods**

### ***4.6.1 Plasmids, antibodies and Reagents***

All plasmids encoding Itch and Myc-Ubiquitin were described before (Angers et al., 2004). Downregulation of Itch expression using shRNA encoding plasmids are described in (Azakir and Angers, submitted). Bid-GFP and GFP-TBidtBid-GFP plasmids were a kind gift

from D. Du Pasquier, Université Paris-Sud, Orsay, France (33).

Monoclonal antibodies against the FLAG and Myc epitopes were purchased from Sigma-Aldrich and Santa Cruz Biotechnology, respectively. Polyclonal antibody against GFP was purchased from Invitrogen. Monoclonal antibody against Phospho-SAPK/JNK (T183/Y185) was purchased from GenScript Corporation. MTT reagents and recombinant human TRAIL/APO 2 ligand were purchased from Invitrogen and Feldan Bio, respectively. The caspase-3 substrate (Ac-DEVD-AMC) and the inhibitor substrate (Ac-DEVD-CHO) were purchased from Biomol International.

#### ***4.6.2 Immunoprecipitation and ubiquitylation assays***

Cells were co-transfected with plasmids as indicated using calcium/phosphate. For EGF treatment, cells were cultured in serum free medium for 24 hours before treatment with 100 ng/ml recombinant EGF at 37°C for the indicated time. When indicated, cells were treated with 20 mM of the proteasome inhibitor Lactacystin or with 30mM of the JNK inhibitor SP600125 for 24 hours prior to utilization. For cultured cells, 100-mm dishes of transfected HEK-293T cells were washed in phosphate-buffered saline and resuspended in 1 ml/dish buffer A (20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, protease inhibitors). The cells were sonicated and Triton X-100 was added to a final concentration of 1%. Extracts were incubated for 20 min at 4 °C and centrifuged at 14,000 rpm in a microcentrifuge at 4°C. For immunoprecipitation assays, extracts of transfected cells were immunoprecipitated using protein A-Sepharose beads and antibodies against the target proteins for 16 h at 4°C. Beads were washed extensively with buffer A/1% Triton X-100 and prepared for Western blot analysis.

#### ***4.6.3 Cell survival assay***

HEK-293T cells were plated in 6 well plates and transfected with the indicated vectors. Cells were then plated in 96 well plates at a concentration of 10,000 cells/well with 100  $\mu$ l of medium. After 24 h of incubation, 15  $\mu$ l of MTT reagent at a final concentration of 100 mg/ml was added to the cultured cells and incubated for 1 h at 37°C or until the blue formazane product became visible to the naked eye. The reaction was ended by adding of 115  $\mu$ l of solubilisation buffer to each well (20% SDS, 20% acetic acid, pH 4) for 1 h at 37°C. Samples OD was read at 540nm and 690 nm in a micro plate reader. The specific MTT signal = OD540-OD690, and cell survival was determined by comparing the OD readings from the transfected cells to the non transfected control.

#### ***4.6.4 Measurement of caspase 3 activity***

To measure caspase 3 activity, variously transfected and treated HEK-293T cells were lysed by sonication in buffer A and centrifuged at 14,000 rpm for 15 min. Caspase 3 was measured by the cleavage of Ac-DEVD-AMC colorimetric substrate (100  $\mu$ M) in a reaction mixture containing 100  $\mu$ g protein from extracted cells in 96 wells plate for over a period of 1 h at 37°C in the dark. Optical density of the sample was measured in a microplate reader at 405 nm. For background determination, cells were preincubated with 0,1  $\mu$ M of the caspase-3 inhibitor Ac-DEVD-CHO for 10 minutes at room temperature prior to treatment with the caspase 3 substrate. Background readings were subtracted from all samples and caspase 3 activity expressed as fold increase over non-transfected and non-treated control cells.

#### **4.6.5 BRET analysis**

For bioluminescence resonance energy transfer (BRET) analysis, HEK-293T cells ( $2 \times 10^6$ ) were cotransfected with cDNAs coding for Rluc-Itch and different GFP fusion proteins. Forty hours posttransfection, the cells were washed in PBS, collected in 1 ml of PBS containing 5 mM EDTA, and then diluted to 106 cells/ml. Coelenterazine (Molecular Probes) was added at a final concentration of 5  $\mu$ M. Luminescence and fluorescence were quantitated with a Fusion -FP apparatus (Perkin-Elmer-Canberra Packard BioScience). Three measures were obtained: first, light emitted at 475 to 480 nm by Renilla luciferase; second, emission fluorescence at 525 to 530 nm without excitation due to energy transfer from Renilla luciferase to GFP; third, emission fluorescence at 525 to 530 nm after excitation at 485 nm to measure total expression of GFP fusion proteins. The BRET ratio was defined as  $[(\text{emission at 510 to 590 nm}) - (\text{emission at 440 to 500 nm}) \times C_f] / (\text{emission at 440 to 500 nm})$ , where  $C_f$  corresponds to  $(\text{emission at 510 to 590 nm}) / (\text{emission at 440 to 500 nm})$  for Renilla luciferase-fused Itch expressed alone in the same experiments (34).

#### **4.6.6 Statistical analysis**

Statistical analyses were done using SPSS 16.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL). Statistical significance of the differences was assessed using one-way analysis of variance (ANOVA) and post hoc Tukey's test

#### **4.7 Acknowledgment**

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Discovery Grant 288238 to AA. AA is supported by a FQRNT young investigator

award. We thank D. Du Pasquier for the kind gift of the BID vectors, and P.S. McPherson and P.A. Barker for useful discussion and advice.



#### 4.8 REFERENCES

1. Rotin D, Staub O, Haguenaer-Tsapis R. Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol* 2000 Jul 1; **176** (1): 1-17.
2. Fang D, Elly C, Gao B, Fang N, Altman Y, Joazeiro C, *et al.* Dysregulation of T lymphocyte function in itchy mice: a role for Itch in TH2 differentiation. *Nat Immunol* 2002 Mar; **3** (3): 281-287.
3. Parravicini V, Field AC, Tomlinson PD, Basson MA, Zamoyska R. Itch<sup>-/-</sup> alphabeta and gammadelta T cells independently contribute to autoimmunity in Itchy mice. *Blood* 2008 Apr 15; **111** (8): 4273-7282.
4. Angers A, Ramjaun A, McPherson P. The HECT domain ligase itch ubiquitinates endophilin and localizes to the trans-Golgi network and endosomal system. *J Biol Chem* 2004 Mar 19; **279** (12): 11471-11479.
5. Bai Y, Yang C, Hu K, Elly C, Liu Y. Itch E3 ligase-mediated regulation of TGF-beta signaling by modulating smad2 phosphorylation. *Mol Cell* 2004 Sep 10; **15** (5): 825-831.
6. Chastagner P, Israel A, Brou C. Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the

formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO Rep* 2006 Nov; **7** (11): 1147-1153.

7. Chen X, Wen S, Fukuda MN, Gavva NR, Hsu D, Akama TO, *et al.* Human ITCH is a coregulator of the hematopoietic transcription factor NF-E2. *Genomics* 2001 Apr 15; **73** (2): 238-241.

8. Feng L, Guedes S, Wang T. Atrophin-1-interacting protein 4/human Itch is a ubiquitin E3 ligase for human enhancer of filamentation 1 in transforming growth factor-beta signaling pathways. *J Biol Chem* 2004 Jul 9; **279** (28): 29681-29690.

9. Ikeda A, Caldwell RG, Longnecker R, Ikeda M. Itchy, a Nedd4 ubiquitin ligase, downregulates latent membrane protein 2A activity in B-cell signaling. *J Virol* 2003 May; **77** (9): 5529-5534.

10. Qiu L, Joazeiro C, Fang N, Wang HY, Elly C, Altman Y, *et al.* Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 2000 Nov 17; **275** (46): 35734-35737.

11. Rossi M, De Laurenzi V, Munarriz E, Green DR, Liu YC, Vousden KH, *et al.* The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *Embo J* 2005 Feb 23; **24** (4): 836-848.

12. Xian CJ. Roles of epidermal growth factor family in the regulation of postnatal somatic growth. *Endocr Rev* 2007 May; **28** (3): 284-296.

13. Henson ES, Gibson SB. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cell Signal* 2006 Dec; **18** (12): 2089-2097.
14. Ethier C, Raymond VA, Musallam L, Houle R, Bilodeau M. Antiapoptotic effect of EGF on mouse hepatocytes associated with downregulation of proapoptotic Bid protein. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003 Aug; **285** (2): G298-308.
15. Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S. Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bid. A functional consequence on apoptosis induction. *J Biol Chem* 2000 Jul 14; **275** (28): 21648-21652.
16. Tait SW, de Vries E, Maas C, Keller AM, D'Santos CS, Borst J. Apoptosis induction by Bid requires unconventional ubiquitination and degradation of its N-terminal fragment. *J Cell Biol* 2007 Dec 31; **179** (7): 1453-1466.
17. Esposti MD. The roles of Bid. *Apoptosis* 2002 Oct; **7** (5): 433-440.
18. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998 Aug 21; **94** (4): 491-501.
19. Deng Y, Lin Y, Wu X. TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev* 2002 Jan 1; **16** (1): 33-45.

20. Scarabelli TM, Stephanou A, Pasini E, Comini L, Raddino R, Knight RA, *et al.* Different signaling pathways induce apoptosis in endothelial cells and cardiac myocytes during ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 2002 Apr 5; **90** (6): 745-748.
21. Zhai D, Huang X, Han X, Yang F. Characterization of tBid-induced cytochrome c release from mitochondria and liposomes. *FEBS Lett* 2000 Apr 28; **472** (2-3): 293-296.
22. Degli Esposti M, Ferry G, Masdehors P, Boutin JA, Hickman JA, Dive C. Post-translational modification of Bid has differential effects on its susceptibility to cleavage by caspase 8 or caspase 3. *J Biol Chem* 2003 May 2; **278** (18): 15749-15757.
23. Epand RF, Martinou JC, Fornallaz-Mulhauser M, Hughes DW, Epand RM. The apoptotic protein tBid promotes leakage by altering membrane curvature. *J Biol Chem* 2002 Sep 6; **277** (36): 32632-32639.
24. Grinberg M, Sarig R, Zaltsman Y, Frumkin D, Grammatikakis N, Reuveny E, *et al.* tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *J Biol Chem* 2002 Apr 5; **277** (14): 12237-12245.
25. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, *et al.* Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995 Dec; **3** (6): 673-682.

26. Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* 2005; **1**: 2005.0010.
27. Gallagher E, Gao M, Liu YC, Karin M. Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Feb 7; **103** (6): 1717-1722.
28. Gao M, Labuda T, Xia Y, Gallagher E, Fang D, Liu YC, *et al.* Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science* 2004 Oct 8; **306** (5694): 271-275.
29. Bennett B, Sasaki D, Murray B, O'Leary E, Sakata S, Xu W, *et al.* SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Nov 20; **98** (24): 13681-13686.
30. Li JY, Wang H, May S, Song X, Fueyo J, Fuller GN. Constitutive activation of c-Jun N-terminal kinase correlates with histologic grade and EGFR expression in diffuse gliomas. *J Neurooncol* 2008 May; **88** (1): 11-17.
31. Astsaturov I, Cohen RB, Harari P. EGFR-targeting monoclonal antibodies in head and neck cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2007 Nov; **7** (7): 650-665.

32. Thompson SJ, Loftus LT, Ashley MD, Meller R. Ubiquitin-proteasome system as a modulator of cell fate. *Curr Opin Pharmacol* 2008 Feb; **8** (1): 90-95.
  
33. Du Pasquier D, Rincheval V, Sinzelle L, Chesneau A, Ballagny C, Sachs LM, *et al.* Developmental cell death during *Xenopus* metamorphosis involves BID cleavage and caspase 2 and 8 activation. *Dev Dyn* 2006 Aug; **235** (8): 2083-2094.
  
34. Hamdan FF, Percherancier Y, Breton B, Bouvier M. Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr Protoc Neurosci* 2006 Feb; **Chapter 5**: Unit 5 23.

## 4.9 FIGURE LEGENDS

Figure 4-1: Itch interacts with tBID and promotes its proteasomal dégradation. (A) HEK-293T cells were cotransfected with either Bid-GFP or tBid-GFP in the presence of FLAG-Itch. Total cell lysates were blotted with anti-GFP and anti-FLAG to show protein expression and the total cell lysates were immunoprecipitated with anti-FLAG and blotted with anti-GFP to reveal Bid and tBid co-immunoprecipitation. (B) 293T cells were cotransfected with constant amounts of Rluc-Itch and various amounts of either Bid-GFP or tBid-GFP. The graph presented here is a representative example of the saturation studies performed to provide evidence for a specific interaction between the proteins. BRET ratios were plotted as a function of the excited GFP activity to total Renilla luciferase activity ratio, allowing comparison of BRET ratios between Bid-GFP and tBid-GFP when expressed at the same levels. The bar graph represents average BRET ratios at identical total YFP/Rluc ratio of four different experiments. The corrected BRET ratio for Rluc-Itch and wild tBid-GFP coexpression was arbitrarily set to 100%. (C) HEK-293T cells were transfected with Bid-GFP and Myc-Ubiquitin and with or without FLAG-Itch. Cells were treated when indicated with 20  $\mu$ M of Lactacystin for 24 hours. Total cell lysates were then immunoblotted for GFP to reveal Bid- and tBid-GFP.

Figure 1

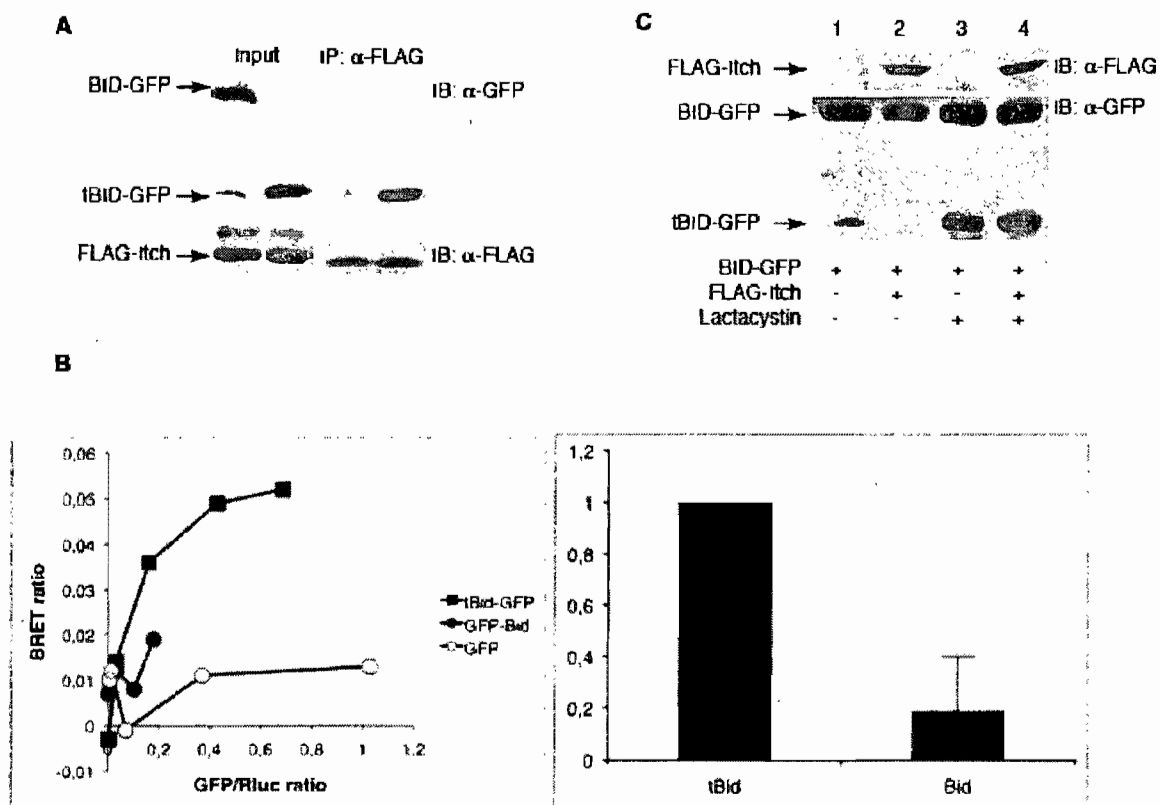




Figure 4-2 : Itch ubiquitylates tBID but not BID. (A) HEK-293T cells were transfected with tBid-GFP and Myc-ubiquitin in the presence or absence of FLAG-Itch and treated for 24 hr with 20  $\mu$ M Lactacystine or vehicle. The total cell lysates were immunoprecipitated with an anti-GFP antibody and blotted with a monoclonal anti-Myc antibody to reveal tBid ubiquitylation. Cell lysates were further blotted with anti-GFP to assess for tBid-GFP expression, and anti-FLAG to assess FLAG-Itch expression. (B) Cells were transfected and treated as in A, except that Bid-GFP replaced tBid-GFP.

Figure 2

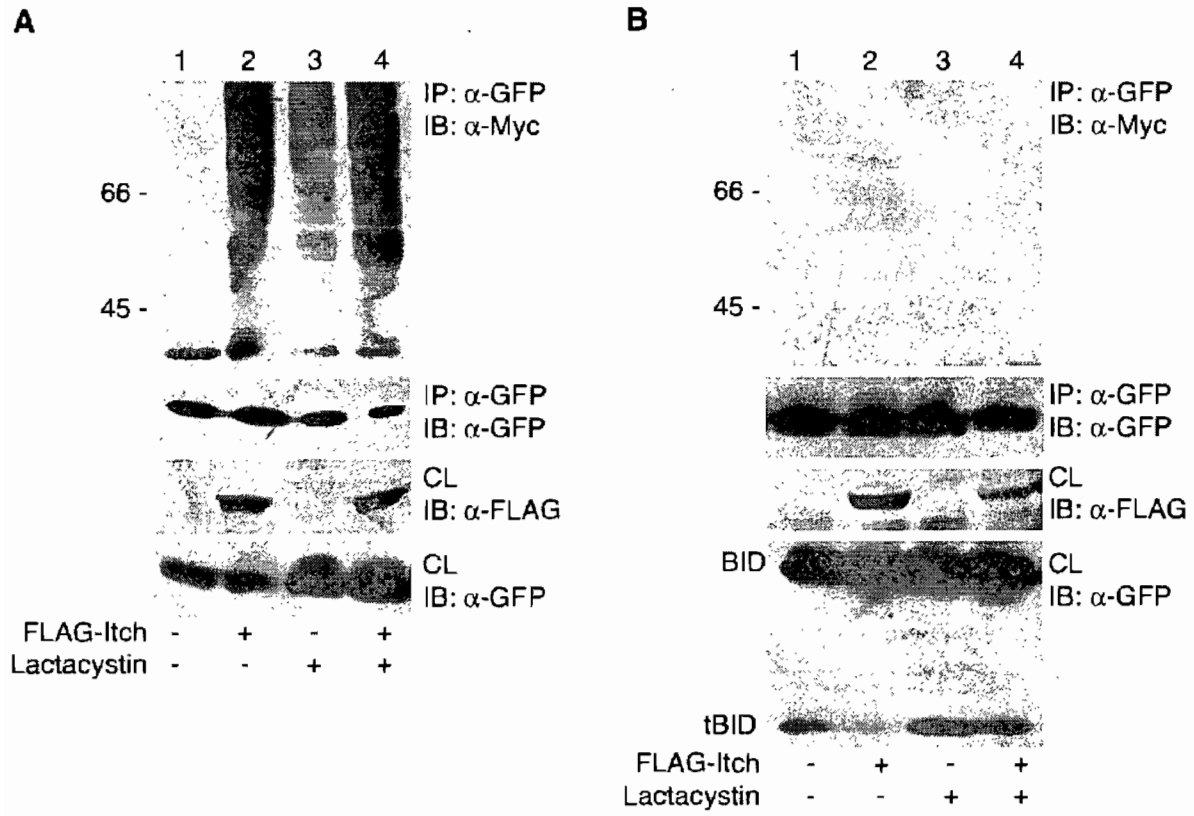


Figure 4-3 : Itch promotes cell survival. (A) HEK 293T cells were transfected with GFP-Itch or plasmids encoding hairpin sequences targeted against Itch sequence (siRNA) and analysed for survival using the MTT method. Graphs represents average cell survival in percent of control. Error bars represent standard deviation. A part of the cells were lysed and immunoblotted with anti-Itch or anti-GFP to reveal endogenous Itch or GFP-Itch overexpression (inset). (B) HEK-293T cells transfected as above were lysed and analyzed for caspase 3 activity. Graphs represents average fold increase of caspase 3 activity relative to control cells. Error bars represent one standard deviation. n=4.

Figure 3

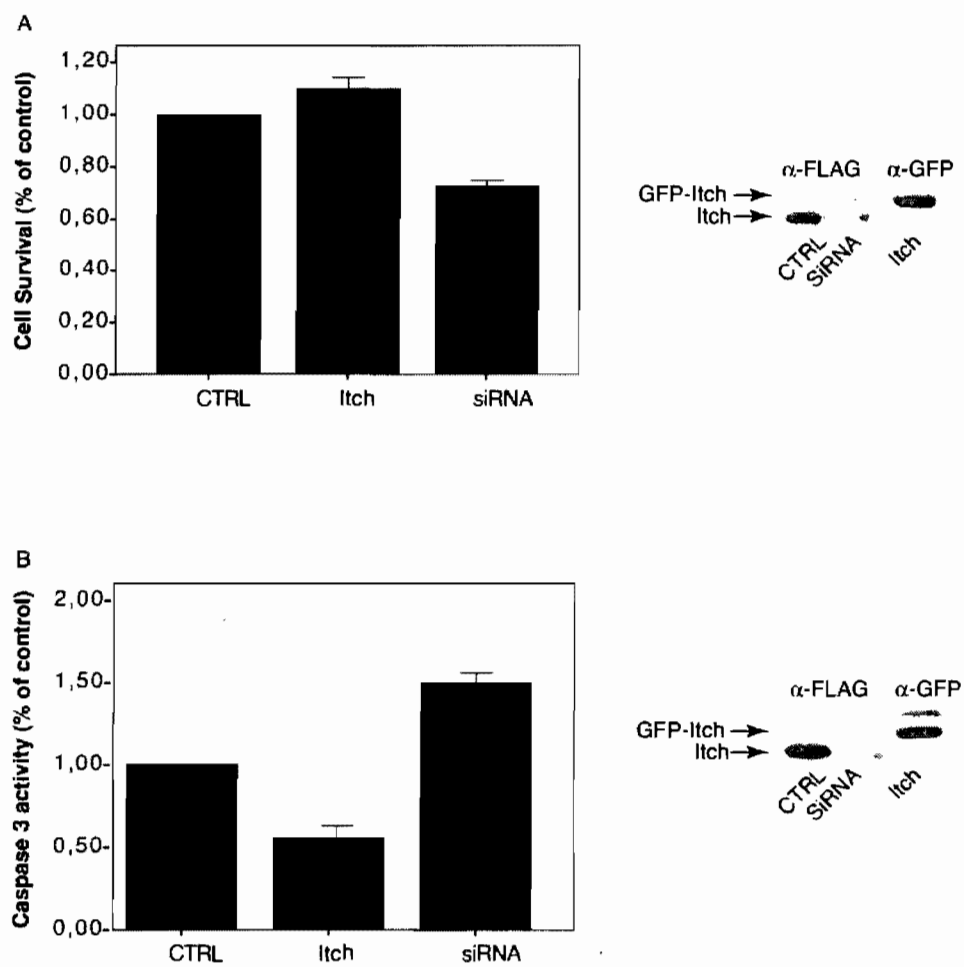


Figure 4-4: Itch protects cells from tBID induced apoptosis. HEK-293T cells were transfected with increasing concentrations of tBid-GFP alone (CTRL), with FLAG-Itch (Itch), or with plasmids encoding shRNA sequence targeted against Itch (siRNA). Cells were then analysed for cell survival (A) or caspase 3 activity (B). Bars represent average percent cell survival or average fold caspase 3 activity increase relative to control, untransfected cells (not shown). Error bars represent one standard deviation. n=4.

Figure 4

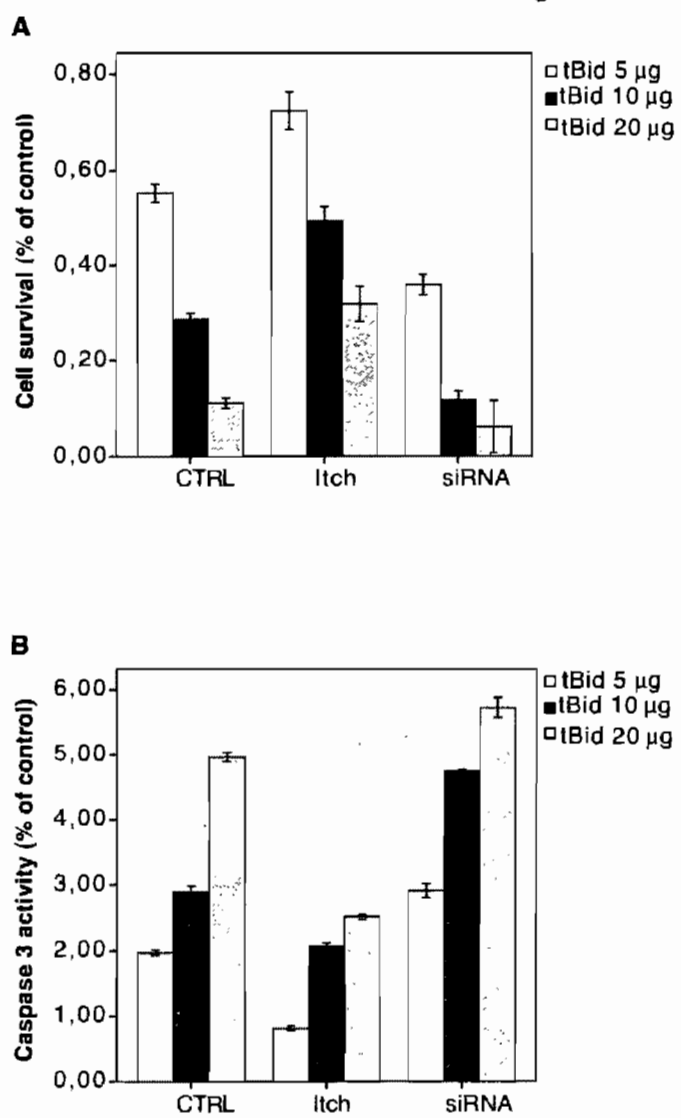


Figure 4-5 : EGF treatment protects HEK-293T cells from apoptosis, partly depending on Itch. (A) HEK-293T cells transfected as indicated were treated with recombinant human TRAIL for 4 hours and cell survival was assessed using the MTT assay. Caspase 3 activity was assessed by measuring degradation of the Ac-DEVD-pNA peptide. Open bars: Control cells; Filled Bars: TRAIL treated cells. Error bars represent one standard deviation. (B) HEK-293T cells transfected as above were treated with 250ng/ml of recombinant human TRAIL for 4 hour in combination or not with 100 ng/ml EGF. Cell survival was assessed using the MTT assay. Caspase 3 activity was assessed by measuring degradation of the Ac-DEVD-pNA peptide. Open bars: Control cells; Filled Bars: TRAIL treated cells. Shaded bars: TRAIL and EGF treated cells. Error bars represent one standard deviation. (C) Non-transfected HEK-293T cells were treated with TRAIL or TRAIL and EGF as above in the presence of 20 $\mu$ M SP600125 or vehicle (DMSO). Cell survival was assessed using the MTT assay. Caspase 3 activity was assessed by measuring degradation of the Ac-DEVD-pNA peptide. Open bars: Control cells; Filled Bars: SP600125 treated cells. Error bars represent one standard deviation. n=3 for all of these experiments.

Figure 5

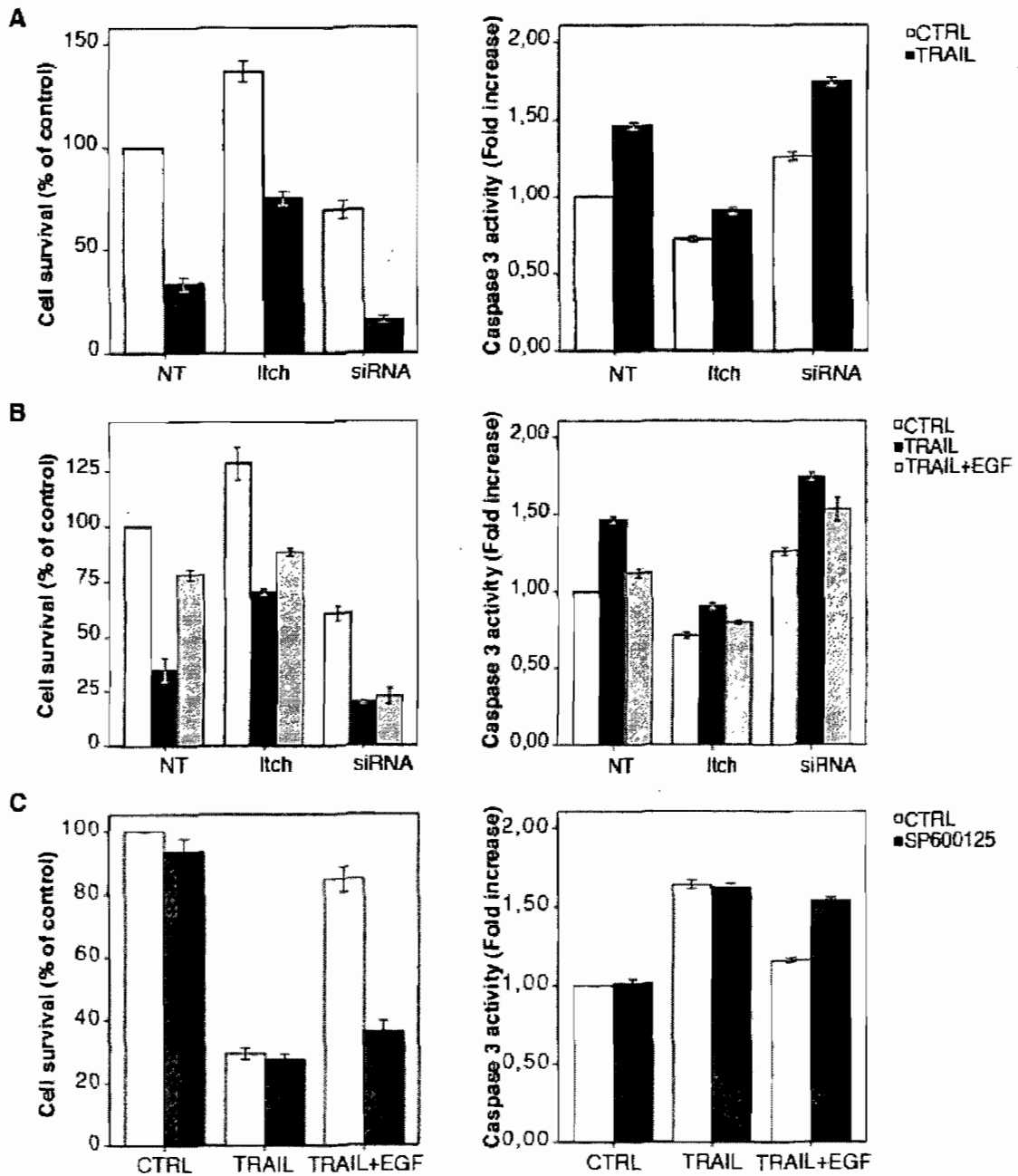
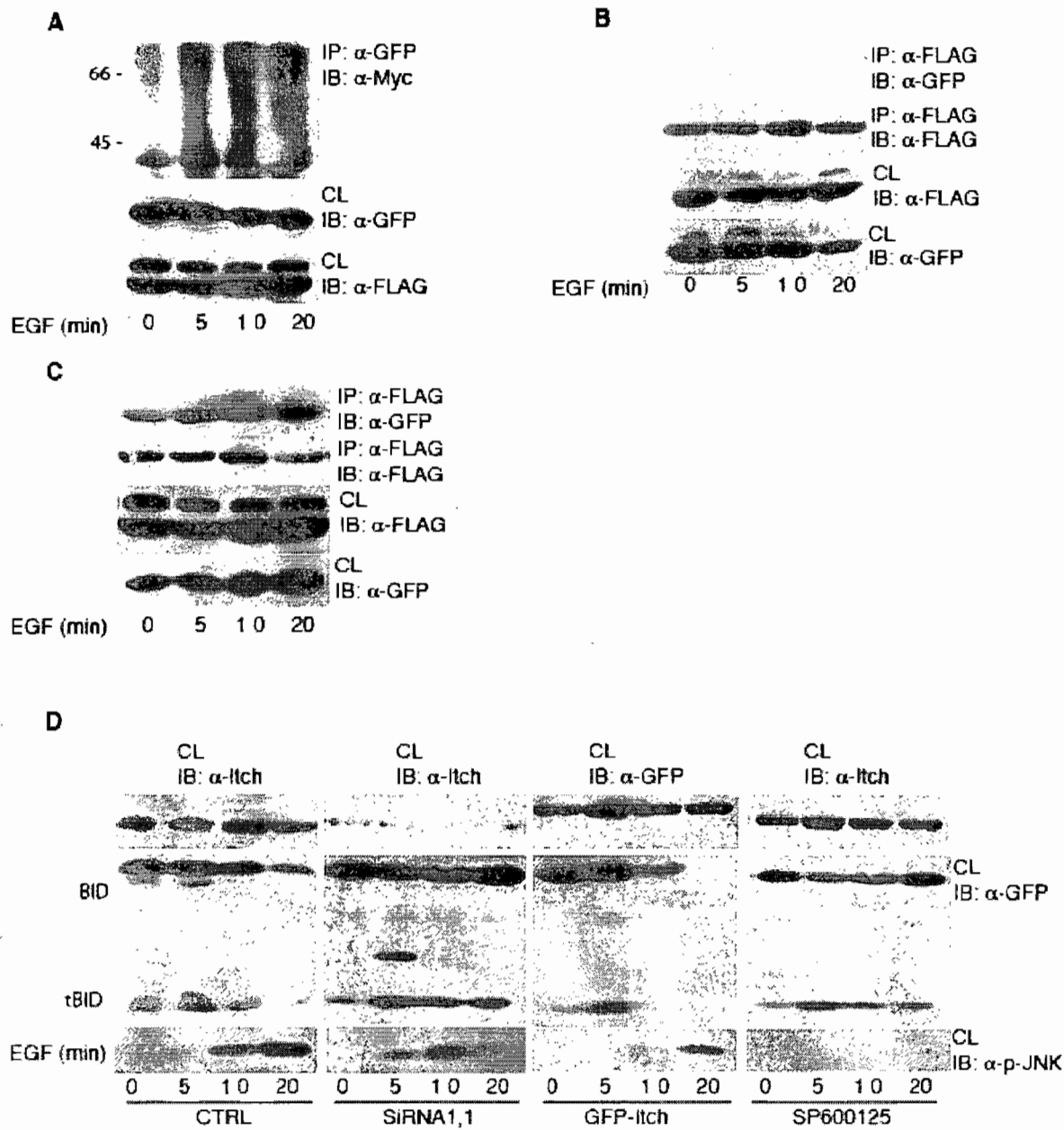




Figure 4-6 : EGF treatment activates Itch and increases tBid ubiquitylation and dégradation.

(A) HEK-293T cells were transfected with tBid-GFP, FLAG-Itch and Myc-ubiquitin plamids. Cells were treated with 100 ng/ml EGF for the indicated time. Total cell lysates were immunoprecipitated with anti-GFP and blotted with anti-Myc to reveal tBid ubiquitylation. Cell lysate were then blotted with anti-GFP and anti-FLAG to reveal tBid and Itch expression. CL: Cell lysates. (B) HEK-293T cells were cotransfected with Bid-GFP and FLAG-Itch and treated with 100 ng/ml EGF. FLAG-Itch was immunoprecipitated from total cell lysates with anti-FLAG and Bid co-immunpricipitation was revealed with anti-GFP. FLAG-Itch and Bid-GFP expression was detected in the total cell lysates with anti-FLAG and anti-GFP antibody respectively. (C) Same as in B but cells were co-transfected with FLAG-Itch and tBid-GFP. (D) HEK-293T cells were transfected with control vector, GFP-Itch, or plasmids encoding hairpin sequences targeted against Itch sequence. Where indicated, cells were treated the JNK inhibitor SP600125 for 24 hours. Cells were then treated with 100 ng/ml of EGF for the indicated time, and protein extracts blotted with anti-Itch to detect Itch expression or anti-FLAG to detect FLAG-Itch expression. Protein extracts were also immunoblotted with anti-GFP to detect Bid cleavage and tBid degradation, as well as with monoclonal antibody against Phospho-SAPK/JNK (T183/Y185) to show JNK activity.

Figure 6



## **5. CHAPITRE 5**

### ***DISCUSSION***

Nous avons pu démontrer un nouveau mécanisme de régulation de Itch par les EGFR. Nos résultats suggèrent que l'activation de Itch suite à la stimulation des EGFR peut réguler la voie de signalisation de l'EGFR par le biais de son internalisation. Nous avons aussi montré que Itch peut protéger les cellules par la dégradation de la protéine proapoptotique tBID.

## Chapitre 2 : La régulation de la ligase de l'ubiquitine Itch par la protéase FAM

L'aspect le plus important de cette partie est qu'elle représente une démonstration unique d'un mécanisme de régulation positive d'une HECT ligase par une protéase de l'ubiquitine. La plupart des ligases de l'ubiquitine de la famille des HECT sont capables de produire leur propre ubiquitylation. Par des essais d'ubiquitylation *in vivo* et *in vitro*, nous avons été capable de montrer que Itch est aussi autoubiquitylé. Pourtant, l'observation de l'ubiquitylation avec la forme mutée de Itch peut être attribué à l'activité de Itch endogène présente dans l'extrait cellulaire. L'autoubiquitylation de Itch était suffisante pour causer sa dégradation dans les protéasomes comme la plupart des protéines. Mais la question était est ce que Itch est autoubiquitylé juste sur une lysine ou il peut aussi être multiubiquitylé. Nous avons utilisé des molécules d'ubiquitines dont tous les sites de lysines ont été mutés et nous avons montré que Itch est capable de polyubiquityler mais aussi de se multiubiquityler lui-même (résultats non présenté). Dans le but d'identifier des protéines interagissant avec Itch, Dr. Angers a réalisé un criblage à partir d'une banque d'ADNc d'un cerveau de rat et elle a identifié endophiline et FAM. D'autres bandes ont été observées

Nous avons pu démontrer un nouveau mécanisme de régulation de Itch par les EGFR. Nos résultats suggèrent que l'activation de Itch suite à la stimulation des EGFR peut réguler la voie de signalisation de l'EGFR par le biais de son internalisation. Nous avons aussi montré que itch peut protéger les cellules par la dégradation de la protéine proapoptotique tBID.

## Chapitre 2 : La régulation de la ligase de l'ubiquitine Itch par la protéase FAM

L'aspect le plus important de cette partie est qu'elle représente une démonstration unique d'un mécanisme de régulation positive d'une HECT ligase par une protéase de l'ubiquitine. La plupart des ligases de l'ubiquitine de la famille des HECT sont capables de produire leur propre ubiquitylation. Par des essais d'ubiquitylation *in vivo* et *in vitro*, nous avons été capable de montrer que Itch est aussi autoubiquitylé. Pourtant, l'observation de l'ubiquitylation avec la forme mutée de Itch peut être attribué à l'activité de Itch endogène présente dans l'extrait cellulaire. L'autoubiquitylation de Itch était suffisante pour causer sa dégradation dans les protéasomes comme la plupart des protéines. Mais la question était est ce que Itch est autoubiquitylé juste sur une lysine ou il peut aussi être multiubiquitylé. Nous avons utilisé des molécules d'ubiquitines dont tous les sites de lysines ont été mutés et nous avons montré que Itch est capable de polyubiquityler mais aussi de se multiubiquityler lui-même (résultats non présenté). Dans le but d'identifier des protéines interagissant avec Itch, Dr. Angers a réalisé un pull down en incubant des protéines de fusion GST-Itch avec un extrait d'un cerveau de rat total. D'autres bandes ont été observées

mais ils peuvent être attribués aux plusieurs formes ubiquitylées d'endophiline ou d'autres protéines.

Deux domaines de Itch sont responsables de ses interactions, le domaine PRD et les domaines WW. Nous avons montré que l'interaction entre Itch et FAM est médiée par les domaines WW. Mais Itch est constituée de 4 domaines WW ce qui impose plusieurs questions. Est ce que FAM interagit avec un seul domaine WW ou plusieurs? et si plusieurs domaines WW sont responsables de cette interaction, est ce qu'il y a un ordre dans l'organisation ou la conformation de ces domaines nécessaires pour maintenir cette interaction? Pour répondre à ces questions, nous pourrions muter d'une façon combinatoire les domaines WW de Itch afin de produire toutes les combinaisons possibles puis réaliser une immunoprécipitation avec un extrait cellulaire total. Les seuls mutants qui ne présentent pas une interactions vont être les domaines responsables de l'interaction. Cependant, l'interaction entre Itch et FAM peut être directe ou médiée indirectement par une troisième protéine adaptatrice. Nos études ont montré que l'interaction entre Itch et FAM est directe alors que par contre l'interaction entre FAM et endophiline est médié par Itch. Est ce que le rapprochement de l'endophiline à FAM est suffisant pour induire son désubiquitylation reste à être déterminer. Le problème est le suivant : l'ubiquitylation de l'endophiline en présence d'une surexpression de Itch n'est pas saturé d'où la difficulté de trouver une différence lorsque FAM est surexprimée.

L'étape suivante était de déterminer le rôle de l'interaction entre FAM et Itch. une conséquence prévisible était la désubiquitylation de Itch et l'ubiquitylation de FAM. Nous avons démontré que la surexpression de FAM stabilise le niveau endogène de Itch en le

désubiquitylant et bloquant sa propre dégradation dans les protéasomes. En plus, il est apparue une corrélation entre l'expression de Itch et celle de FAM dans les différentes lignées cellulaires et différents tissus de rat. Mais nous n'avons pas été capable de détecter une ubiquitylation de FAM en présence de Itch. Ceci peut être expliqué une autodésubiquitylation rapide de FAM, ce qui rend difficile d'observer sa forme ubiquitylée une fois précipitée. Plusieurs lysines dans FAM peuvent présenter des sites potentiels pour l'ubiquitylation. Cependant la taille de FAM peut contribuer à l'encombrement de l'activité du domaine HECT de Itch. Pour répondre à cette question, nous pourrions muter le site catalytique de FAM afin de créer une forme incapable de désubiquityler pour tester son ubiquitylation en présence d'une surexpression de Itch.

La signalisation cellulaire peut réguler l'activité et les interactions de Itch. En effet, l'équipe de Gao a montré que la phosphorylation de Itch dans le domaine PRD change sa conformation intrinsèque et modifie son interaction avec ses substrats. Nous avons montré que la phosphorylation de Itch par JNK inhibe son interaction avec FAM. L'effet de la phosphorylation sur Itch a été étudié dans le chapitre 3.

FAM, par la régulation de la stabilité de Itch, peut jouer un rôle indirect dans les mécanismes cellulaires régulés par Itch notamment l'endocytose dont Itch est relié par l'ubiquitylation de deux protéines endocytiques endophiline et Cbl.

En conclusion, nous avons identifié un nouveau mécanisme qui régule l'activité ainsi que la stabilité de Itch intracellulaire. La protection de Itch contre la dégradation dans les protéasomes peut contribuer à la compréhension des mécanismes intracellulaires reliés à un niveau élevé de Itch et qui cause des pathologies comme le cancer.

### Chapitre 3 : La ligase de l'ubiquitine Itch est régulé par les récepteurs à l'EGF

La régulation de la signalisation des EGFR est critique pour un développement et une croissance normale. La réponse biologique de l'EGFR est la conséquence d'une signalisation cellulaire régulée et du trafic intracellulaire. Comme déjà mentionné, notre laboratoire a déjà montré que l'endophiline est transloquée au niveau des endosomes suite à la stimulation des EGFR et ceci est accompagné par une augmentation de son ubiquitylation.

Cependant, la stimulation des EGFR déclenche une panoplie de voies intracellulaires, notamment l'activation de JNK. Gao et al. ont montré que JNK est capable d'augmenter l'activité de la ligase de l'ubiquitine Itch en modulant sa capacité d'interaction avec ses substrats. En effet, l'activation de JNK augmente la phosphorylation de Itch qui a une conséquence positive sur l'ubiquitylation de ses substrats Junb et c-Jun.

L'objectif de ce chapitre était d'évaluer le rôle de l'activation des EGFR sur l'activité et le fonctionnement de Itch. Nous avons postulé que l'augmentation de l'ubiquitylation de l'endophiline en réponse à l'EGF peut être causée par Itch qui a été activé par la voie JNK dépendante de l'EGFR.

Nous avons montré que l'ubiquitylation de l'endophiline qui augmente en réponse à l'EGF et sa dégradation dans les protéasomes est spécifiquement causée par Itch parce que la diminution de niveau de Itch bloque la dégradation de l'endophiline. Puisque l'endophiline est recrutée vers le complexe Cbl-CIN85 lors l'activation de l'EGFR, Cbl peut être une ligase potentielle de l'endophiline. Nous avons éliminé cette possibilité en



montrant que Cbl n'ubiquitine pas endophiline et qu'elle n'affecte pas son ubiquitylation par Itch. En plus, Cbl étant connu pour être un substrat de Itch, nous avons observé une augmentation de son ubiquitylation par Itch en réponse à l'EGF. Cette ubiquitylation est suffisante pour causer sa dégradation dans les protéasomes.

Le mécanisme exact qui cause l'augmentation de l'ubiquitylation de l'endophiline et Cbl par Itch suite à la stimulation de l'EGFR est mal compris. Est ce que l'endophiline et Cbl sont ubiquitylées à la surface plasmique? est ce que ceci pourrait être dû à une augmentation de l'activité de Itch seulement ou aussi à une augmentation d'interaction entre les protéines en question? Nous avons observé que la localisation de Itch au niveau de l'endosome ne change pas en réponse à l'EGF mais que Cbl et endophiline sont transloquées au niveau des endosomes ce qui nous laisse croire que l'ubiquitylation se déroule au niveau des endosomes. Nous avons montré que l'interaction entre Itch et l'endophiline et Cbl augmente en réponse à l'EGF. Mais pour être sur que l'interaction est due à l'augmentation de l'ubiquitylation de ces 2 substrats, nous avons utilisé un troisième substrat indépendant de la voie de l'EGF, Smad-7. L'augmentation de l'ubiquitylation de Smad-7 en réponse à l'EGF montre que l'activation de Itch est aussi essentielle pour l'ubiquitylation observée dans le cas de Cbl et l'endophiline.

L'équipe de Karin a expliqué l'effet de la phosphorylation sur le fonctionnement de Itch. Ils suggéraient qu'à l'état initial, Itch existe sous forme inactive et adopte une conformation fermée dans laquelle le domaine catalytique HECT est replié sur les domaines WW et PRD ce qui crée un encombrement stérique au site d'interaction des substrats. Une fois phosphorylée dans le domaine PRD, le domaine HECT s'ouvre et rend accessible les

domaines PRD et WW. Nos résultats suggèrent plutôt que Itch demeure sous forme active même sans l'activation de la voie JNK au moins dans les cellules HEK293. La stimulation des EGFR augmentent la phosphorylation de Itch par la voie de JNK et cause une augmentation de son activité. Cependant, pendant que son interaction augmente avec l'endophiline qui interagit avec le domaine PRD, l'interaction de FAM avec les domaines WW diminue ce qui montre que la phosphorylation module aussi négativement les interactions de Itch. L'effet de phosphorylation à 5 minutes de traitement avec l'EGF explique pourquoi Itch est plus ubiquitylé à ce temps de traitement. Cette divergence entre nous et l'équipe de Karin peut être expliquée par le fait que nous regardons l'activité de Itch *in vivo* où il existe toujours un niveau de base de la signalisation cellulaire notamment celle de l'EGFR alors que l'équipe de Karin ont utilisé un système *in vitro*. Déterminer lequel des domaines WW de Itch est responsable de son interaction avec FAM nous permettrait de mieux comprendre l'effet sélectif de la phosphorylation sur les interactions de Itch. Alors que Itch peut être phosphorylé par JNK sur plusieurs sites, il peut l'être aussi par d'autres kinases puisque des études ont montré que Itch est aussi phosphorylé sur des résidus tyrosines en réponse à l'EGF.

Cbl est responsable de l'ubiquitylation, de la régulation négative et de la dégradation des EGFR actifs. Avec l'endophiline qui est recrutée vers les EGFR activés, elle forme un complexe permettant la fission de la vésicule et l'internalisation des EGFR. Nos études suggèrent que Itch peut réguler l'internalisation des EGFR par la dégradation de Cbl et endophiline. Nous pensons que Itch peut augmenter le niveau de l'EGFR sur la surface plasmique par la dégradation de ces 2 protéines. Cependant, à quel niveau Itch intervient ? Itch peut causer une diminution de niveau endogène de Cbl et endophiline et causer une

inhibition de l'internalisation des récepteurs au niveau de la membrane plasmique. Un autre scénario est qu'une fois au niveau des endosomes, Itch va dénaturer le complexe Cbl-Cin85-endophiline et augmente le recyclage des EGFR vers la surface plasmique. De même, Itch pourrait causer ces 2 mécanismes qui aboutissent au même résultat qui est d'augmenter le niveau de l'EGFR sur la membrane plasmique. Nous avons été en mesure d'observer une augmentation du niveau de EGFR à la membrane suite à une surexpression de Itch. D'autres études doivent être réalisées pour confirmer ces observations.

L'activité de Itch est régulée par les EGFR et à son tour Itch régule l'internalisation des EGFR, mais est ce que Itch module la signalisation de l'EGFR?. Afin de répondre à cette question, nous avons montré que l'inhibition de l'internalisation de l'EGFR au niveau de la membrane module sa signalisation. L'activation de la voie de JNK nécessite l'internalisation des récepteurs au niveau des endosomes parce que le blocage de son internalisation inhibe cette voie de signalisation et favorise la voie de l'Akt. Basé sur ces résultats, nous avons montré que l'expression de Itch influence la signalisation de l'EGFR. En effet, la surexpression de Itch retarde l'activation de la voie de JNK et augmente l'activation de la voie de l'Akt. Au contraire, la diminution de l'expression de Itch favorise la voie de JNK par rapport à la voie de l'Akt.

Ces études constituent la base de notre travail et montrent une régulation rétroactive entre un récepteur membranaire et une ligase de l'ubiquitine. Pour la première fois, il est démontré qu'une ligase de l'ubiquitine est régulée par un récepteur et est capable de moduler la signalisation de ce dernier. Itch constitue alors la clé qui permet la balance entre la voie de JNK ou l'activation de la voie de l'Akt. Itch pourrait donc favoriser la

prolifération cellulaire et causer une inhibition de la voie apoptotique et dans certaines conditions jouer un rôle anti-apoptotique. Cette hypothèse a été explorée plus en détail dans le chapitre 4 (figure 5-1).

#### Chapitre 4: Itch protège les cellules contre l'apoptose induite par tBID suite à la stimulation des TNF- $\alpha$

Plusieurs études ont démontré que les protéines apoptotiques de la famille de Bcl-2 sont ubiquitylées mais les ligases responsables de l'ubiquitylation de ces protéines restent mal connus. La régulation de la stabilité des protéines de la famille des Bcl-2 contrôle la réponse cellulaire déclenchée par l'activation de ces protéines. Par exemple, il a été démontré que tBID est ubiquitylé et dégradé dans les protéasomes. Ainsi, l'inhibition du protéasome favorise la réponse apoptotique. La ligase de l'ubiquitine responsable de cette ubiquitylation n'est pas connue.

Nous avons identifié Itch comme étant la ligase de l'ubiquitine responsable de l'ubiquitylation de tBID. Nous avons montré que Itch ubiquityle tBID mais pas la BID. Cette ubiquitylation est suffisante pour assurer sa dégradation dans les protéasomes. En présence ou en absence de Itch, BID n'est pas dégradé et son niveau intracellulaire reste stable. Suite à l'activation des caspases, BID est clivée et son extrémité c-terminale de 15

Kda est recrutée vers la mitochondrie et déclenche la réponse apoptotique. Nos études montrent qu'il n'y a pas une interaction entre BID et Itch, mais entre tBID et Itch. Nous suggérons alors que le site d'interaction et d'ubiquitylation par Itch réside dans l'extrémité c-terminal de BID et que la conformation spatiale de la protéine BID bloque l'interaction de son domaine c-terminal avec Itch. Une fois BID clivé, son extrémité c-terminale devient accessible pour une interaction avec Itch. tBID peut interagir avec 2 domaines de Itch, le domaine PRD parce que la structure des domaines BH3 est similaire aux domaines SH3 trouvé dans l'endophiline ou par les domaines WW parce que tBID contient beaucoup de sérines et thréonines qui peuvent être potentiellement phosphorylés. Cependant, le domaine exact d'interaction reste à être élucidé.

Dans le chapitre 3, nous avons postulé l'hypothèse que Itch peut avoir un rôle anti-apoptotique par l'inhibition partielle de la voie de JNK et l'activation continue de la voie de l'Akt. Ici, nous avons montré que l'expression de Itch avait un effet direct sur la survie cellulaire et l'activation des caspases 3. De plus, Itch peut protéger les cellules contre l'apoptose induite par la surexpression de tBID. Ceci peut être expliqué par la dégradation de tBID dans les protéasomes. Bien sûr nous pensons que ce mécanisme n'est pas le seul qui explique l'augmentation de la survie cellulaire par Itch. Dans des fibroblastes, il a été démontré que Itch dégrade la protéine c-FLIP et protège les cellules contre l'activation de JNK et l'induction de l'apoptose. Nous suggérons que Itch intervient avant l'étape mitochondriale et qu'il peut inhiber l'activation des Bax et la diminution du potentiel mitochondrial transmembranaire et donc la libération du cytochrome c et l'activation des caspases 3.

L'équipe de Bilodeau a montré que l'expression de BID diminue après le traitement des hépatocytes par l'EGF, mais ils n'ont pas déterminé la raison. Ils ont suggéré que l'expression de BID est affectée par le traitement à l'EGF. Nous montrons aussi que l'EGF cause une diminution du niveau de BID surexprimé et cette diminution corrèle directement avec son clivage en tBID. En regardant le niveau de tBID formé, nous avons remarqué qu'il diminue jusqu'à sa disparition complète après 20 minutes de traitement à l'EGF. Il est probable que Bilodeau et al. n'aient pas vu la formation de tBID parce qu'ils ont utilisé des temps de traitement à l'EGF plus longs. Nous avons relié la diminution de tBID à sa dégradation par Itch. En effet lorsque nous diminuons l'expression de Itch ou inhibant son activité, nous bloquons le clivage de BID et stabilisons son niveau intracellulaire. Quoique nos expériences ont été réalisées dans des cellules vivantes, les résultats obtenus restaient indirects lorsque nous surexprimions tBID puisque tBID n'existe pas à l'état de base mais nécessite l'activation des récepteurs TNF- $\alpha$ . Nous avons donc aussi suivi l'effet de tBID endogène sur la survie cellulaire en présence de Itch. Nous avons montré que Itch protège les cellules contre l'apoptose induite par l'activation de TNF- $\alpha$ . Ceci est dû à la dégradation de tBID endogène clivée par les caspases 8 activées par TNF- $\alpha$ . Ces études appuient notre hypothèse de base : Itch protège les cellules contre l'effet apoptotique induit par le clivage de BID en tBID en réponse à la stimulation des récepteurs TNF- $\alpha$ .

### Perspectives

Plusieurs études restent à faire pour mieux comprendre le mécanisme de régulation de Itch par l'EGFR ainsi que l'effet rétrograde de Itch sur l'internalisation et la signalisation de l'EGFR. Je les résume dans ces points.

- 1- Déterminer le domaine d'interaction de FAM et Itch est essentielle pour déterminer le rôle de la phosphorylation sur la confirmation de Itch.
- 2- Déterminer le niveau nécessaire d'endophiline et de Cbl pour induire l'internalisation des EGFR
- 3-Déterminer le niveau de l'intervention de Itch dans l'internalisation des EGFR : l'inhibition de l'internalisation au niveau de la surface plasmique ou l'augmentation du recyclage au niveau des endosomes.
- 4- Comprendre l'effet de la boucle de régulation Itch-JNK-EGFR sur la survie cellulaire.
- 5- Identifier le domaine d'interaction entre Itch et tBID ainsi qu'identifier le site d'ubiquitylation de tBID.
- 6- Mieux comprendre l'effet de Itch sur la survie par la détermination d'autres partenaires qui peuvent être impliqués dans l'apoptose comme dans le cas de c-Flip.
- 7-Comprendre comment Itch peut accélérer le clivage de BID en tBID et déterminer l'activité des caspases 8 dépend de l'expression de Itch.

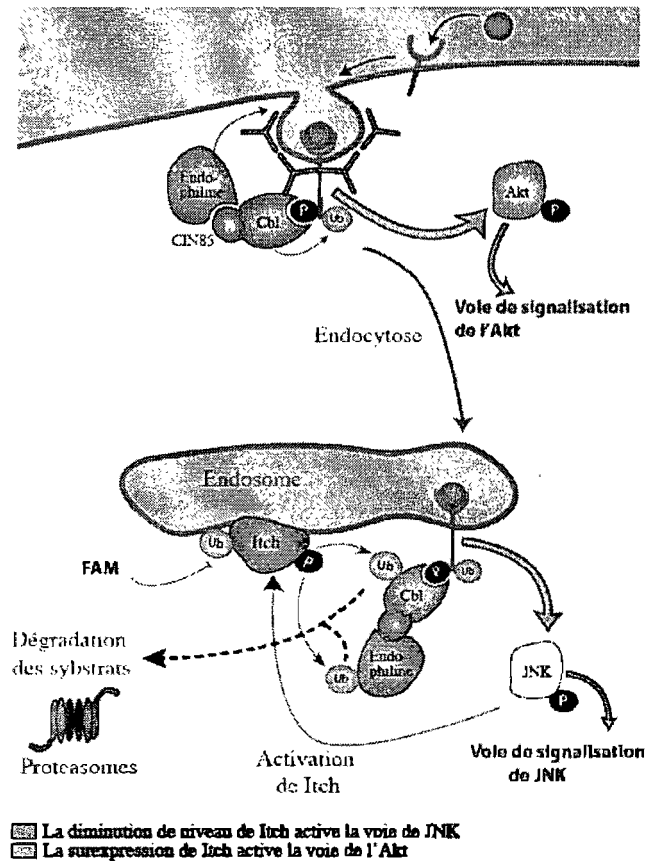


Figure 5-1 : **Modèle général du mécanisme de régulation réciproque de Itch et EGFR.**

L'activation des EGFR par l'EGF recrute Cbl et endophiline vers la membrane où elles interagissent avec le récepteur activé et induisent son internalisation. En même temps, JNK est activé en réponse à l'EGF et active Itch. Itch augmente l'ubiquitylation de Cbl et endophiline et provoque leur dégradation protéasomale. Itch alors bloque l'internalisation de l'EGFR et favorise la voie de l'Akt activée au niveau de la membrane par rapport à la voie de JNK activée au niveau des endosomes.



## 6. Références

- Amerik A, Swaminathan S, Krantz BA, Wilkinson KD, Hochstrasser M (1997) In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *EMBO J* 16:4826-4838.
- Angers A, Ramjaun A, McPherson P (2004) The HECT domain ligase Itch ubiquitinates endophilin and localizes to the trans-Golgi network and endosomal system. *J Biol Chem* 279:11471-11479.
- Angileri FF, Aguenouz M, Conti A, La Torre D, Cardali S, Crupi R, Tomasello C, Germano A, Vita G, Tomasello F (2008) Nuclear factor-kappaB activation and differential expression of survivin and Bcl-2 in human grade 2-4 astrocytomas. *Cancer* 112:2258-2266.
- Ardley HC, Robinson PA (2005) E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem* 41:15-30.
- Assefa Z, Vantieghem A, Declercq W, Vandenabeele P, Vandenheede JR, Merlevede W, de Witte P, Agostinis P (1999) The activation of the c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways protects HeLa cells from apoptosis following photodynamic therapy with hypericin. *J Biol Chem* 274:8788-8796.
- Bache KG, Raiborg C, Mehlum A, Stenmark H (2003) STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *J Biol Chem* 278:12513-12521.
- Baek KH (2003) Conjugation and deconjugation of ubiquitin regulating the destiny of proteins. *Exp Mol Med* 35:1-7.

- Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, Elledge SJ (1996) SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 86:263-274.
- Bai Y, Yang C, Hu K, Elly C, Liu Y (2004) Itch E3 ligase-mediated regulation of TGF-beta signaling by modulating smad2 phosphorylation. *Mol Cell* 15:825-831.
- Bayer P, Arndt A, Metzger S, Mahajan R, Melchior F, Jaenicke R, Becker J (1998) Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280:275-286.
- Benmerah A, Begue B, Dautry-Varsat A, Cerf-Bensussan N (1996) The ear of alpha-adaptin interacts with the COOH-terminal domain of the Eps 15 protein. *J Biol Chem* 271:12111-12116.
- Benmerah A, Lamaze C, Begue B, Schmid SL, Dautry-Varsat A, Cerf-Bensussan N (1998) AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 140:1055-1062.
- Boddy MN, Howe K, Etkin LD, Solomon E, Freemont PS (1996) PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene* 13:971-982.
- Bonifacino JS, Dell'Angelica EC (1999) Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol* 145:923-926.
- Borodovsky A, Kessler BM, Casagrande R, Overkleeft HS, Wilkinson KD, Ploegh HL (2001) A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14. *Embo J* 20:5187-5196.
- Brazhnik P, Kohn KW (2007) HAUSP-regulated switch from auto- to p53 ubiquitination by

- Mdm2 (in silico discovery). *Math Biosci* 210:60-77.
- Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S (2000) Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bid. A functional consequence on apoptosis induction. *J Biol Chem* 275:21648-21652.
- Brodsky FM, Chen CY, Knuehl C, Towler MC, Wakeham DE (2001) Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:517-568.
- Calderwood DA, Fujioka Y, de Pereda JM, Garcia-Alvarez B, Nakamoto T, Margolis B, McGlade CJ, Liddington RC, Ginsberg MH (2003) Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2272-2277.
- Cavigelli M, Dolfi F, Claret FX, Karin M (1995) Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO J* 14:5957-5964.
- Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo JL, Maeda S, Venuprasad K, Liu YC, Karin M (2006) The E3 ubiquitin ligase Itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* 124:601-613.
- Chastagner P, Israel A, Brou C (2008) AIP4/Itch regulates Notch receptor degradation in the absence of ligand. *PLoS ONE* 3:e2735.
- Chen C, Matesic L (2007) The Nedd4-like family of E3 ubiquitin ligases and cancer. *Cancer Metastasis Rev.*
- Chen C, Sun X, Guo P, Dong XY, Sethi P, Cheng X, Zhou J, Ling J, Simons JW, Lingrel JB, Dong JT (2005) Human Kruppel-like factor 5 is a target of the E3 ubiquitin ligase WWP1 for proteolysis in epithelial cells. *J Biol Chem* 280:41553-41561.

- Chen H, Fre S, Slepnev VI, Capua MR, Takei K, Butler MH, Di Fiore PP, De Camilli P (1998) Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature* 394:793-797.
- Chiu RK, Brun J, Ramaekers C, Theys J, Weng L, Lambin P, Gray DA, Wouters BG (2006) Lysine 63-polyubiquitination guards against translesion synthesis-induced mutations. *PLoS Genet* 2:e116.
- Chong PA, Lin H, Wrana JL, Forman-Kay JD (2006) An expanded WW domain recognition motif revealed by the interaction between Smad7 and the E3 ubiquitin ligase Smurf2. *J Biol Chem* 281:17069-17075.
- Chowdhury S, Shepherd J, Okuno H, Lyford G, Petralia R, Plath N, Kuhl D, Huganir R, Worley P (2006) Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron* 52:445-459.
- Clague MJ, Urbe S (2006) Endocytosis: the DUB version. *Trends Cell Biol* 16:551-559.
- Cobb MH, Hepler JE, Cheng M, Robbins D (1994) The mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2. *Semin Cancer Biol* 5:261-268.
- Confalonieri S, Di Fiore PP (2002) The Eps15 homology (EH) domain. *FEBS Lett* 513:24-29.
- Croall DE, Ersfeld K (2007) The calpains: modular designs and functional diversity. *Genome Biol* 8:218.
- Cullen SP, Luthi AU, Martin SJ (2008) Analysis of apoptosis in cell-free systems. *Methods* 44:273-279.
- Dallaporta B, Pablo M, Maise C, Daugas E, Loeffler M, Zamzami N, Kroemer G (2000) Proteasome activation as a critical event of thymocyte apoptosis. *Cell Death Differ* 7:368-373.

- Damke H, Baba T, Warnock DE, Schmid SL (1994) Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol* 127:915-934.
- Daniels PR, Sanders CM, Maitland NJ (1998) Characterization of the interactions of human papillomavirus type 16 E6 with p53 and E6-associated protein in insect and human cells. *J Gen Virol* 79 ( Pt 3):489-499.
- Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG (2006) Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res* 7:53.
- Deng Y, Lin Y, Wu X (2002) TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev* 16:33-45.
- Dent P, Yacoub A, Fisher PB, Hagan MP, Grant S (2003) MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene* 22:5885-5896.
- Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76:1025-1037.
- Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC (1999) BID-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 144:891-901.
- Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC (1999) Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* 18:5242-5251.
- Dikic I (2003) Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation. *Biochem Soc Trans* 31:1178-1181.

- Drexler HC (1997) Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:855-860.
- Duan L, Miura Y, Dimri M, Majumder B, Dodge IL, Reddi AL, Ghosh A, Fernandes N, Zhou P, Mullane-Robinson K, Rao N, Donoghue S, Rogers RA, Bowtell D, Naramura M, Gu H, Band V, Band H (2003) Cbl-mediated ubiquitylation is required for lysosomal sorting of epidermal growth factor receptor but is dispensable for endocytosis. *J Biol Chem* 278:28950-28960.
- Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, Miyazono K (2001) Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* 276:12477-12480.
- Egan JE, Hall AB, Yatsula BA, Bar-Sagi D (2002) The bimodal regulation of epidermal growth factor signaling by human Sprouty proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6041-6046.
- Elsasser S, Gali RR, Schwickart M, Larsen CN, Leggett DS, Muller B, Feng MT, Tubing F, Dittmar GA, Finley D (2002) Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol* 4:725-730.
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC (2000) BID induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20:929-935.
- Fang D, Elly C, Gao B, Fang N, Altman Y, Joazeiro C, Hunter T, Copeland N, Jenkins N, Liu YC (2002) Dysregulation of T lymphocyte function in itchy mice: a role for Itch in TH2 differentiation. *Nat Immunol* 3:281-287.
- Fang S, Jensen JP, Ludwig RL, Vousden KH, Weissman AM (2000) Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem* 275:8945-8951.
- Feng L, Guedes S, Wang T (2004) Atrophin-1-interacting protein 4/human Itch is a

ubiquitin E3 ligase for human enhancer of filamentation 1 in transforming growth factor-beta signaling pathways. *J Biol Chem* 279:29681-29690.

Flasza M, Nguyen Huu NS, Mazaleyrat S, Clemence S, Villemant C, Clarke R, Baron M (2006) Regulation of the nuclear localization of the human Nedd4-related WWP1 protein by Notch. *Mol Membr Biol* 23:269-276.

Fletcher JI, Huang DC (2008) Controlling the cell death mediators Bax and Bak: puzzles and conundrums. *Cell Cycle* 7:39-44.

Fuchs SY, Adler V, Buschmann T, Wu X, Ronai Z (1998) Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene* 17:2543-2547.

Gallagher E, Gao M, Liu YC, Karin M (2006) Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1717-1722.

Gallop J, Jao C, Kent H, Butler P, Evans P, Langen R, McMahon H (2006) Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *EMBO J* 25:2898-2910.

Gao M, Labuda T, Xia Y, Gallagher E, Fang D, Liu YC, Karin M (2004) Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science* 306:271-275.

Gibson EM, Henson ES, Haney N, Villanueva J, Gibson SB (2002) Epidermal growth factor protects epithelial-derived cells from tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by inhibiting cytochrome c release. *Cancer Res* 62:488-496.

Gomez-Martin D, Diaz-Zamudio M, Alcocer-Varela J (2008) Ubiquitination system and autoimmunity: the bridge towards the modulation of the immune response.

Autoimmun Rev 7:284-290.

Grimm LM, Goldberg AL, Poirier GG, Schwartz LM, Osborne BA (1996) Proteasomes play an essential role in thymocyte apoptosis. *Embo J* 15:3835-3844.

Haglund K, Dikic I (2005) Ubiquitylation and cell signaling. *Embo J* 24:3353-3359.

Haglund K, Shimokawa N, Szymkiewicz I, Dikic I (2002) Cbl-directed monoubiquitination of CIN85 is involved in regulation of ligand-induced degradation of EGF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12191-12196.

Haines DS, Landers JE, Engle LJ, George DL (1994) Physical and functional interaction between wild-type p53 and mdm2 proteins. *Mol Cell Biol* 14:1171-1178.

Haucke V (2006) Cargo takes control of endocytosis. *Cell* 127:35-37.

Hawkins CJ, Ekert PG, Uren AG, Holmgren SP, Vaux DL (1998) Anti-apoptotic potential of insect cellular and viral IAPs in mammalian cells. *Cell Death Differ* 5:569-576.

Hayami R, Sato K, Wu W, Nishikawa T, Hiroi J, Ohtani-Kaneko R, Fukuda M, Ohta T (2005) Down-regulation of BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase by CDK2. *Cancer Res* 65:6-10.

Henson ES, Gibson SB (2006) Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cell Signal* 18:2089-2097.

Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67:425-479.

Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA (1980) Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:1783-1786.

Hicke L (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:195-201.

Hicke L, Dunn R (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and



- ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:141-172.
- Hochstrasser M (1995) Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr Opin Cell Biol* 7:215-223.
- Honda K, Mihara H, Kato Y, Yamaguchi A, Tanaka H, Yasuda H, Furukawa K, Urano T (2000) Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex-ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* 19:2812-2819.
- Honda R, Yasuda H (2000) Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene* 19:1473-1476.
- Horak J (1997) Yeast nutrient transporters. *Biochim Biophys Acta* 1331:41-79.
- Hurley JH, Lee S, Prag G (2006) Ubiquitin-binding domains. *Biochem J* 399:361-372.
- Ingham RJ, Gish G, Pawson T (2004) The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene* 23:1972-1984.
- Jackson MW, Berberich SJ (2000) MdmX protects p53 from Mdm2-mediated degradation. *Mol Cell Biol* 20:1001-1007.
- Johannessen LE, Ringerike T, Molnes J, Madshus IH (2000) Epidermal growth factor receptor efficiently activates mitogen-activated protein kinase in HeLa cells and Hep2 cells conditionally defective in clathrin-dependent endocytosis. *Exp Cell Res* 260:136-145.
- Jun T, Gjoerup O, Roberts TM (1999) Tangled webs: evidence of cross-talk between c-Raf-1 and Akt. *Sci STKE* 1999:PE1.
- Kaneki H, Guo R, Chen D, Yao Z, Schwarz EM, Zhang YE, Boyce BF, Xing L (2006) Tumor necrosis factor promotes Runx2 degradation through up-regulation of Smurf1 and Smurf2 in osteoblasts. *J Biol Chem* 281:4326-4333.

- Karin M, Lin A (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3:221-227.
- Kawane K, Fukuyama H, Adachi M, Sakahira H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkin NA, Nagata S (1999) Structure and promoter analysis of murine CAD and ICAD genes. *Cell Death Differ* 6:745-752.
- Kee Y, Munoz W, Lyon N, Huijbrechtse JM (2006) The deubiquitinating enzyme Ubp2 modulates Rsp5-dependent Lys63-linked polyubiquitin conjugates in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281:36724-36731.
- Kharbanda S, Saxena S, Yoshida K, Pandey P, Kaneki M, Wang Q, Cheng K, Chen YN, Campbell A, Sudha T, Yuan ZM, Narula J, Weichselbaum R, Nalin C, Kufe D (2000) Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *J Biol Chem* 275:322-327.
- Kirchhausen T (2002) Clathrin adaptors really adapt. *Cell* 109:413-416.
- Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israel A, Wallach D, Courtois G (2003) The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* 424:801-805.
- Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israel A, Wallach D, Courtois G (2003) The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* 424:801-805.
- Kramer ER, Scheuringer N, Podtelejnikov AV, Mann M, Peters JM (2000) Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Mol Biol Cell* 11:1555-1569.
- Kudla G, Montessuit S, Eskes R, Berrier C, Martinou JC, Ghazi A, Antonsson B (2000) The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase 8-

- cleaved bid is inhibited by the N-terminal fragment. *J Biol Chem* 275:22713-22718.
- Kuratomi G, Komuro A, Goto K, Shinozaki M, Miyazawa K, Miyazono K, Imamura T (2005) NEDD4-2 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2) negatively regulates TGF-beta (transforming growth factor-beta) signalling by inducing ubiquitin-mediated degradation of Smad2 and TGF-beta type I receptor. *Biochem J* 386:461-470.
- Laine A, Ronai Z (2007) Regulation of p53 localization and transcription by the HECT domain E3 ligase WWP1. *Oncogene* 26:1477-1483.
- Lallemand F, Seo S, Ferrand N, Pessah M, L'Hoste S, Rawadi G, Roman-Roman S, Camonis J, Atfi A (2005) AIP4 restricts transforming growth factor-beta signaling through a ubiquitination-independent mechanism. *J Biol Chem* 280:27645-27653.
- Lamirault L, Guillou JL, Micheau J, Jaffard R (2001) Intrahippocampal injections of somatostatin dissociate acquisition from the flexible use of place responses. *Eur J Neurosci* 14:567-570.
- Lapenta V, Chiurazzi P, van der Spek P, Pizzuti A, Hanaoka F, Brahe C (1997) SMT3A, a human homologue of the *S. cerevisiae* SMT3 gene, maps to chromosome 21qter and defines a novel gene family. *Genomics* 40:362-366.
- Le Roy C, Wrana J (2005) Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:112-126.
- Lemmon MA, Bu Z, Ladbury JE, Zhou M, Pinchasi D, Lax I, Engelman DM, Schlessinger J (1997) Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J* 16:281-294.
- Li B, Tournier C, Davis RJ, Flavell RA (1999) Regulation of IL-4 expression by the

- transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *EMBO J* 18:420-432.
- Li M, Chen D, Shiloh A, Luo J, Nikolaev AY, Qin J, Gu W (2002) Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* 416:648-653.
- Liang B, Wang S, Yang X, Ye Y, Yu Y, Cui Z (2003) Expressions of cyclin E, cyclin dependent kinase 2 and p57(KIP2) in human gastric cancer. *Chin Med J (Engl)* 116:20-23.
- Lim SK, Shin JM, Kim YS, Baek KH (2004) Identification and characterization of murine mHAUSP encoding a deubiquitinating enzyme that regulates the status of p53 ubiquitination. *Int J Oncol* 24:357-364.
- Lisztwan J, Marti A, Sutterluty H, Gstaiger M, Wirbelauer C, Krek W (1998) Association of human CUL-1 and ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 with the F-box protein p45(SKP2): evidence for evolutionary conservation in the subunit composition of the CDC34-SCF pathway. *EMBO J* 17:368-383.
- LoPiccolo J, Granville CA, Gills JJ, Dennis PA (2007) Targeting Akt in cancer therapy. *Anticancer Drugs* 18:861-874.
- Lutz RJ (2000) Role of the BH3 (Bcl-2 homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2-related proteins. *Biochem Soc Trans* 28:51-56.
- Magnifico A, Ettenberg S, Yang C, Mariano J, Tiwari S, Fang S, Lipkowitz S, Weissman AM (2003) WW domain HECT E3s target Cbl RING finger E3s for proteasomal degradation. *J Biol Chem* 278:43169-43177.
- Marchese A, Raiborg C, Santini F, Keen JH, Stenmark H, Benovic JL (2003) The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Dev Cell* 5:709-722.
- Marmor MD, Yarden Y (2004) Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of

- receptor tyrosine kinases. *Oncogene* 23:2057-2070.
- Massoumi R, Chmielarska K, Hennecke K, Pfeifer A, Fassler R (2006) Cylind inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling. *Cell* 125:665-677.
- Matesic LE, Haines DC, Copeland NG, Jenkins NA (2006) Itch genetically interacts with Notch1 in a mouse autoimmune disease model. *Hum Mol Genet* 15:3485-3497.
- McCormick JA, Feng Y, Dawson K, Behne MJ, Yu B, Wang J, Wyatt AW, Henke G, Grahmmer F, Mauro TM, Lang F, Pearce D (2004) Targeted disruption of the protein kinase SGK3/CISK impairs postnatal hair follicle development. *Mol Biol Cell* 15:4278-4288.
- Meluh PB, Koshland D (1995) Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. *Mol Biol Cell* 6:793-807.
- Micheva KD, Kay BK, McPherson PS (1997) Synaptojanin forms two separate complexes in the nerve terminal. Interactions with endophilin and amphiphysin. *J Biol Chem* 272:27239-27245.
- Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, Derynck R (1995) Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 376:337-341.
- Milano G, Magne N (2003) [Pharmacological consequences of the targeting of epidermal growth factor receptor]. *Bull Cancer* 90 Spec No:S197-201.
- Miranda M, Sorkin A (2007) Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms. *Mol Interv* 7:157-167.
- Miyazaki K, Ozaki T, Kato C, Hanamoto T, Fujita T, Irino S, Watanabe K, Nakagawa T, Nakagawara A (2003) A novel HECT-type E3 ubiquitin ligase, NEDL2, stabilizes p73

- and enhances its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 308:106-113.
- Motyckova G, Weilbaecher KN, Horstmann M, Rieman DJ, Fisher DZ, Fisher DE (2001) Linking osteopetrosis and pycnodysostosis: regulation of cathepsin K expression by the microphthalmia transcription factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5798-5803.
- Mousavi SA, Malerod L, Berg T, Kjekens R (2004) Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J* 377:1-16.
- Odaka M, Kohda D, Lax I, Schlessinger J, Inagaki F (1997) Ligand-binding enhances the affinity of dimerization of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor. *J Biochem* 122:116-121.
- Ogunjimi AA, Briant DJ, Pece-Barbara N, Le Roy C, Di Guglielmo GM, Kavsak P, Rasmussen RK, Seet BT, Sicheri F, Wrana JL (2005) Regulation of Smurf2 ubiquitin ligase activity by anchoring the E2 to the HECT domain. *Mol Cell* 19:297-308.
- Pan MH, Huang MC, Wang YJ, Lin JK, Lin CH (2003) Induction of apoptosis by hydroxydibenzoylmethane through coordinative modulation of cyclin D3, Bcl-X(L), and Bax, release of cytochrome c, and sequential activation of caspases in human colorectal carcinoma cells. *J Agric Food Chem* 51:3977-3984.
- Perry WL, Hustad CM, Swing DA, O'Sullivan TN, Jenkins NA, Copeland NG (1998) The itchy locus encodes a novel ubiquitin protein ligase that is disrupted in a18H mice. *Nat Genet* 18:143-146.
- Peruzzi F, Prisco M, Morrione A, Valentini B, Baserga R (2001) Anti-apoptotic signaling of the insulin-like growth factor-I receptor through mitochondrial translocation of c-

- Raf and Nedd4. *J Biol Chem* 276:25990-25996.
- Pickart C (2004) Back to the future with ubiquitin. *Cell* 116:181-190.
- Pickart CM (1997) Targeting of substrates to the 26S proteasome. *Faseb J* 11:1055-1066.
- Pickart CM (2001a) Ubiquitin enters the new millennium. *Mol Cell* 8:499-504.
- Pickart CM (2001b) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70:503-533.
- Polo S, Sigismund S, Faretta M, Guidi M, Capua MR, Bossi G, Chen H, De Camilli P, Di Fiore PP (2002) A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 416:451-455.
- Qiu L, Joazeiro C, Fang N, Wang HY, Elly C, Altman Y, Fang D, Hunter T, Liu YC (2000) Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 275:35734-35737.
- Qiu L, Joazeiro C, Fang N, Wang HY, Elly C, Altman Y, Fang D, Hunter T, Liu YC (2000) Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 275:35734-35737.
- Ramjaun AR, Angers A, Legendre-Guillemain V, Tong XK, McPherson PS (2001) Endophilin regulates JNK activation through its interaction with the germinal center kinase-like kinase. *J Biol Chem* 276:28913-28919.
- Ravid T, Heidinger JM, Gee P, Khan EM, Goldkorn T (2004) c-Cbl-mediated ubiquitinylation is required for epidermal growth factor receptor exit from the early endosomes. *J Biol Chem* 279:37153-37162.
- Regan-Klapisz E, Sorokina I, Voortman J, de Keizer P, Roovers RC, Verheesen P, Urbe S, Fallon L, Fon EA, Verkleij A, Benmerah A, van Bergen en Henegouwen PM (2005) Ubiquitin recruits Eps15 into ubiquitin-rich cytoplasmic aggregates via a UIM-UBL

- interaction. *J Cell Sci* 118:4437-4450.
- Reutens AT, Begley CG (2002) Endophilin-1: a multifunctional protein. *Int J Biochem Cell Biol* 34:1173-1177.
- Richter BW, Duckett CS (2000) The IAP proteins: caspase inhibitors and beyond. *Sci STKE* 2000:PE1.
- Riezman H (1998) Down regulation of yeast G protein-coupled receptors. *Semin Cell Dev Biol* 9:129-134.
- Rossi M, De Laurenzi V, Munarriz E, Green DR, Liu YC, Vousden KH, Cesareni G, Melino G (2005) The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *Embo J* 24:836-848.
- Rotin D, Staub O, Haguenaer-Tsapis R (2000) Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol* 176:1-17.
- Roy C, Brown DL, Little JE, Valentine BK, Walker PR, Sikorska M, Leblanc J, Chaly N (1992) The topoisomerase II inhibitor teniposide (VM-26) induces apoptosis in unstimulated mature murine lymphocytes. *Exp Cell Res* 200:416-424.
- Sabapathy K, Jochum W, Hochedlinger K, Chang L, Karin M, Wagner EF (1999) Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech Dev* 89:115-124.
- Schmidt A, Wolde M, Thiele C, Fest W, Kratzin H, Podtelejnikov AV, Witke W, Huttner WB, Soling HD (1999) Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* 401:133-141.
- Schmidt MH, Dikic I (2006) Assays to monitor degradation of the EGF receptor. *Methods Mol Biol* 327:131-138.



- Schmidt MH, Hoeller D, Yu J, Furnari FB, Cavenee WK, Dikic I, Bogler O (2004) Alix/AIP1 antagonizes epidermal growth factor receptor downregulation by the Cbl-SETA/CIN85 complex. *Mol Cell Biol* 24:8981-8993.
- Schwarz SE, Rosa JL, Scheffner M (1998) Characterization of human hect domain family members and their interaction with UbcH5 and UbcH7. *J Biol Chem* 273:12148-12154.
- Sehra S, Dent AL (2006) Caspase function and the immune system. *Crit Rev Immunol* 26:133-148.
- Seol JH, Feldman RM, Zachariae W, Shevchenko A, Correll CC, Lyapina S, Chi Y, Galova M, Claypool J, Sandmeyer S, Nasmyth K, Deshaies RJ (1999) Cdc53/cullin and the essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define a ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34. *Genes Dev* 13:1614-1626.
- Setuie R, Wada K (2007) The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases. *Neurochem Int* 51:105-111.
- Shupliakov O, Low P, Grabs D, Gad H, Chen H, David C, Takei K, De Camilli P, Brodin L (1997) Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science* 276:259-263.
- Sibilia M, Wagner EF (1995) Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 269:234-238.
- Siegel RM, Lenardo MJ (2002) Apoptosis signaling pathways. *Curr Protoc Immunol* Chapter 11:Unit 11 19C.
- Simpson F, Hussain NK, Qualmann B, Kelly RB, Kay BK, McPherson PS, Schmid SL (1999) SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle

- formation. *Nat Cell Biol* 1:119-124.
- Slagsvold T, Marchese A, Brech A, Stenmark H (2006) CISK attenuates degradation of the chemokine receptor CXCR4 via the ubiquitin ligase AIP4. *EMBO J* 25:3738-3749.
- Snyder PM, Olson DR, Thomas BC (2002) Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* 277:5-8.
- Soeda J, Miyagawa S, Sano K, Masumoto J, Taniguchi S, Kawasaki S (2001) Cytochrome c release into cytosol with subsequent caspase activation during warm ischemia in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:G1115-1123.
- Soubeyran P, Kowanetz K, Szymkiewicz I, Langdon WY, Dikic I (2002) Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature* 416:183-187.
- Sweitzer SM, Hinshaw JE (1998) Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* 93:1021-1029.
- Szymkiewicz I, Kowanetz K, Soubeyran P, Dinarina A, Lipkowitz S, Dikic I (2002) CIN85 participates in Cbl-b-mediated down-regulation of receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 277:39666-39672.
- Takei K, McPherson PS, Schmid SL, De Camilli P (1995) Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature* 374:186-190.
- Tanos B, Pendergast AM (2006) Abl tyrosine kinase regulates endocytosis of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 281:32714-32723.
- Thien CB, Walker F, Langdon WY (2001) RING finger mutations that abolish c-Cbl-directed

polyubiquitination and downregulation of the EGF receptor are insufficient for cell transformation. *Mol Cell* 7:355-365.

- Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantia C, Mourton T, Herrup K, Harris RC, et al. (1995) Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269:230-234.
- Traweger A, Fang D, Liu YC, Stelzhammer W, Krizbai IA, Fresser F, Bauer HC, Bauer H (2002) The tight junction-specific protein occludin is a functional target of the E3 ubiquitin-protein ligase itch. *J Biol Chem* 277:10201-10208.
- Treisman R (1995) Journey to the surface of the cell: Fos regulation and the SRE. *EMBO J* 14:4905-4913.
- Trompouki E, Hatzivassiliou E, Tschirritzis T, Farmer H, Ashworth A, Mosialos G (2003) CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature* 424:793-796.
- Wada H, Yeh ET, Kamitani T (2000) A dominant-negative UBC12 mutant sequesters NEDD8 and inhibits NEDD8 conjugation in vivo. *J Biol Chem* 275:17008-17015.
- Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412:346-351.
- Wang TH, Wang HS, Soong YK (2000) Regulation and functions of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. *Chang Gung Med J* 23:57-72.
- Warren CM, Landgraf R (2006) Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control. *Cell Signal* 18:923-933.
- Waterman H, Katz M, Rubin C, Shtiegman K, Lavi S, Elson A, Jovin T, Yarden Y (2002) A mutant EGF-receptor defective in ubiquitylation and endocytosis unveils a role for

- Grb2 in negative signaling. *EMBO J* 21:303-313.
- Waterman H, Yarden Y (2001) Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases. *FEBS Lett* 490:142-152.
- Wells A (1999) EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 31:637-643.
- Wertz I, O'Rourke K, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, Wu P, Wiesmann C, Baker R, Boone D, Ma A, Koonin E, Dixit V (2004) De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* 430:694-699.
- Wertz IE, Dixit VM (2008) Ubiquitin-mediated regulation of TNFR1 signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 19:313-324.
- Wiley HS, Burke PM (2001) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. *Traffic* 2:12-18.
- Wing SS (2003) Deubiquitinating enzymes--the importance of driving in reverse along the ubiquitin-proteasome pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 35:590-605.
- Wood SA, Pascoe WS, Ru K, Yamada T, Hirchenhain J, Kemler R, Mattick JS (1997) Cloning and expression analysis of a novel mouse gene with sequence similarity to the *Drosophila fat facets* gene. *Mechanisms of Development* 63:29-38.
- Yang C, Zhou W, Jeon M, Demydenko D, Harada Y, Zhou H, Liu Y (2006) Negative regulation of the E3 ubiquitin ligase Itch via Fyn-mediated tyrosine phosphorylation. *Mol Cell* 21:135-141.
- Yang QH, Du C (2004) Smac/DIABLO selectively reduces the levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and livin in HeLa cells. *J Biol Chem* 279:16963-16970.
- Yang Y, Yu X (2003) Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *FASEB J* 17:790-799.
- Yin XM (2006) Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and

death. *Gene* 369:7-19.

Yoshida H, Jono H, Kai H, Li JD (2005) The tumor suppressor cylindromatosis (CYLD) acts as a negative regulator for toll-like receptor 2 signaling via negative cross-talk with TRAF6 AND TRAF7. *J Biol Chem* 280:41111-41121.

Zhang X, Srinivasan SV, Lingrel JB (2004) WWP1-dependent ubiquitination and degradation of the lung Kruppel-like factor, KLF2. *Biochem Biophys Res Commun* 316:139-148.

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC (2001) HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 3:973-982.