

Université de Montréal

**Études structurales et fonctionnelles des interactions de  
SUMO avec des protéines d'échafaudage modèles :  
TIF1 $\beta$ , PIAS1 et PML**

par

Xavier H. Mascle

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en Biochimie

Décembre 2012

© Xavier Mascle, 2012





Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Études structurales et fonctionnelles des interactions de SUMO avec des protéines  
d'échafaudage modèles : TIF1 $\beta$ , PIAS1 et PML

Présentée par :  
Xavier H. Masclé

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Gerardo Ferbeyre, président-rapporteur  
Muriel Aubry, directeur de recherche  
James G. Omichinski, co-directeur  
Luc Desgroseillers, membre du jury  
Gary S. Shaw, examinateur externe  
Lise Coderre, représentant du doyen de la FES



## Résumé

L'adaptation des cellules à leur environnement externe repose sur la transduction adéquate de signaux régulés par une pléthore d'événements moléculaires. Parmi ces événements moléculaires, les modifications post-traductionnelles (MPT) de protéines aident à intégrer, à traduire et à organiser de façon spatiotemporelle ces signaux pour que les cellules puissent réagir aux stimuli externes. Parmi les modifications post-traductionnelles, les petites protéines de la famille de l'Ubiquitine (Ublps, Ubiquitin-like proteins) jouent un rôle majeur dans presque toutes les voies de signalisation. Cette thèse rapporte des études fonctionnelles et structurales des interactions covalentes et non covalentes entre SUMO (Small Ubiquitin related MOdifier), un membre de la famille des Ublps, et trois protéines d'échafaudage, TIF1 $\beta$ , le corépresseur universel des protéines KRAB-multidoigt de zinc, PIAS1, une ligase E3 pour SUMO et PML, un suppresseur de tumeur.

La première étude rapporte l'identification et la caractérisation biochimique des sites de SUMOylation de TIF1 $\beta$ . Nous avons déterminé que la modification covalente de six résidus lysine par SUMO est essentielle à l'activité de répression de la transcription induit par TIF1 $\beta$ . En outre, nous présentons des évidences indiquant que la SUMOylation de TIF1 $\beta$  exige non seulement sa capacité à homo-oligomériser, mais est aussi positivement régulée par son interaction avec le domaine KRAB des protéines à doigts de zinc. Partant de ce constat, nous postulons que les protéines KRAB-multidoigt de zinc recrutent leur corépresseur TIF1 $\beta$  à des gènes cibles, mais aussi accentuent son activité répressive grâce à l'augmentation de sa SUMOylation.

Notre seconde étude révèle qu'en plus de réprimer la transcription en tant que MPT covalente, SUMO joue aussi un rôle important dans la répression en tant que partenaire non covalent d'interactions protéine-protéine. Nous avons montré que SUMO interagit simultanément avec deux enzymes de la machinerie de SUMOylation, l'unique enzyme de conjugaison E2, UBC9, et la ligase E3 PIAS1 au sein d'un complexe ternaire répresseur. En outre, nous révélons que la formation du complexe ternaire PIAS1:SUMO:UBC9 est modulée par le niveau de phosphorylation de résidus sérine juxtaposés à un motif d'interaction avec SUMO (SIM) dans PIAS1. Ainsi, SUMO agit comme un adaptateur

spécifique qui stabilise les interactions UBC9 E2: E3 PIAS1. Partant de ce constat, nous proposons que les enzymes E2 et E3 des autres systèmes Ublps exploitent des mécanismes similaires dans le cadre de leur fonction

Enfin, notre troisième étude explore la régulation des interactions non covalentes de SUMO par la phosphorylation. En utilisant une combinaison d'études *in vivo* et *in vitro*, nous démontrons que l'interaction entre SUMO1 et PML est régi par la phosphorylation dépendant de CK2 sur quatre résidus sérine de PML. Les structures cristallographiques des complexes PML-SIM:SUMO1 révèlent que les phospho-sérines de PML contactent des résidus de la région basique de SUMO1. Sachant que la kinase CK2 peut être induite par des kinases activables par le stress, ces résultats suggèrent que les interactions non-covalentes avec SUMO sont modulées par le stress cellulaire. Sur la base de cette constatation, nous postulons que des événements analogues affectent des protéines contenant des séquences SIM ciblées par CK2.

En résumé, cette étude révèle qu'en plus de son rôle de MPT, SUMO peut fonctionner comme un adaptateur permettant des interactions spécifiques entre protéines tel que pour les enzymes E3 et E2.

**Mots-clés** : MPT, SUMO, TIF1 $\beta$ , PIAS1, UBC9, PML, phosphorylation, CK2

## Abstract

Cell adaptation to the external environment relies on proper signal transduction that is orchestrated by a plethora of molecular events. Among these molecular events, post-translational modifications (PTMs) of proteins help to spatiotemporally integrate, translate and dispatch signals so cells can respond to external stimuli. Among these post-translational modifications, the Ubiquitin-like proteins (Ublps) play a major role in almost all signaling pathways. This thesis reports functional and structural studies of the covalent and non-covalent interactions between the Small Ubiquitin-related MOdifier (SUMO), a member of the Ublps family, and three scaffold proteins, TIF1 $\beta$ , the corepressor of KRAB-Multifinger proteins, PIAS1, a SUMO E3 ligase and the Promyleocytic leukemia (PML) tumor suppressor protein.

The first study reports the identification and the biochemical characterization of TIF1 $\beta$  SUMOylation sites. We mapped six SUMOylation sites in TIF1 $\beta$  and determined that the covalent modification of these sites by SUMO is essential for its transcriptional repression activity. In addition, we present evidence indicating that SUMOylation of TIF1 $\beta$  requires not only its ability to homo-oligomerize, but is positively regulated through its interaction with KRAB domains found in zinc-finger proteins. Based on this finding, we postulate that these KRAB domain containing multifinger proteins not only recruit TIF1 $\beta$  co-repressor to target genes but also increase its repressive activity through enhancement of its SUMOylation.

The work in the second study reveals that in addition to suppressing transcription as a covalent PTM, SUMO plays an important role in repression as a non-covalent protein-protein interaction partner. We determine that SUMO can form a repressive complex by simultaneously forming non-covalent interactions with UBC9 and PIAS1, the E2 and E3 enzymes in the SUMOylation system. In addition, we report that the formation of the PIAS1:SUMO:UBC9 ternary complex is modulated by the phosphorylation of serine residues juxtaposed to a SUMO-Interacting Motif (SIM) found in PIAS1. Thus SUMO acts as a specific adaptor that stabilizes UBC9 E2: PIAS1 E3 interactions. Based on this finding,

we propose that the E2 and E3 enzymes from other Ublps systems exploit similar mechanisms as part of their function

Finally, our third study explores the regulation of SUMO non-covalent interactions by phosphorylation. Using a combination of *in vivo* and *in vitro* studies we demonstrate that the interaction between SUMO1 and PML is governed by CK2-dependent phosphorylation of four serine residues in PML. Crystal structures of PML-SIM:SUMO1 complexes reveal that these PML phospho-serine specifically contact SUMO1 basic patch residues. Since CK2 kinase is induced by stress activated kinases pathways, this indicates that SUMO non-covalent interactions are regulated by cellular stress. Based on this finding, we postulated that analogous events influence other CK2-targeted SIM-containing proteins.

In summary, this study reveals that in addition to its well described function as PTM, SUMO can function as an adaptor enabling specific proteins interactions such as functional E3:E2 enzymes pairs.

**Keywords** : PTM, SUMO, TIF1 $\beta$ , PIAS1, UBC9, PML, phosphorylation, CK2

## Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xxii
Mise en contexte .....	1
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>2</b>
1 Les dessous de la diversité fonctionnelle du protéome.....	2
2 Modifications post-traductionnelles des protéines par les Ublps.....	3
2.1 Les MPTs, source de diversité fonctionnelle des protéines .....	3
3 L'Ubiquitine, un prototype de polypeptides modifiant les protéines.....	4
3.1 L'Ubiquitination, un prototype de MPT .....	8
3.2 Les enzymes impliquées dans l'Ubiquitination des protéines .....	10
3.2.1 Les enzymes d'activation E1 .....	10
3.2.2 Les enzymes de conjugaison E2 .....	12
3.2.3 Les enzymes de ligation E3.....	21
3.2.4 Les enzymes de déconjugaison .....	34
3.3 Les fonctions des interactions de l'Ubiquitine avec les protéines .....	35
3.3.1 Aperçu des fonctions associées à la l'Ubiquitination des protéines .....	36
3.3.2 Aperçu des fonctions associées à l'interaction non-covalente de l'Ubiquitine avec les protéines .....	38
3.4 Les enseignements sur le processus d'Ubiquitination .....	42
4 La SUMOylation.....	43
4.1 La famille des protéines SUMOs .....	44
4.1.1 Caractéristiques des protéines SUMOs.....	44
4.2 Le cycle de SUMO.....	46
4.3 Les enzymes impliquées dans la SUMOylation des protéines .....	47

4.3.1	SAE1:SAE2, l'enzyme d'activation E1 pour SUMO .....	47
4.3.2	UBC9, l'enzyme de conjugaison E2 pour SUMO .....	51
4.3.3	Les enzymes de ligation E3 pour SUMO.....	61
4.3.4	Les SENPs, enzymes de déconjugaison pour SUMO.....	68
4.4	Les sites de modification des protéines par SUMO.....	69
4.4.1	Site de SUMOylation consensus.....	69
4.4.2	Sites de SUMOylation non consensus .....	73
4.4.3	La poly-SUMOylation .....	74
4.5	Les interactions non-covalentes de SUMO avec les protéines .....	77
4.5.1	Le motif d'interaction avec SUMO .....	77
4.5.2	Variantes et extensions du motif d'interaction avec SUMO.....	79
4.5.3	Régulations de l'interaction non-covalente avec SUMO.....	80
4.5.4	Un nouveau domaine d'interaction non-covalente pour SUMO?.....	81
4.6	Fonctions des interactions de SUMO avec les protéines .....	81
4.6.1	Conséquences moléculaires .....	82
4.7	Les processus biologiques nucléaires régulés par SUMO .....	84
4.7.1	Rôles de SUMO dans la régulation de la transcription.....	85
4.7.2	Rôles de SUMO dans l'intégrité du génome .....	87
4.7.3	Implications de SUMO dans le ciblage sub-cellulaire.....	88
5	Les protéines d'échafaudage à domaine RING et la SUMOylation .....	90
5.1	Caractéristiques et fonctions des protéines d'échafaudage.....	90
5.2	Caractéristiques et fonctions du domaine RING.....	91
5.3	PIAS1, un prototype de ligase E3 pour SUMO à domaine RING.....	92
5.3.2	Les fonctions de PIAS1.....	94
5.4	TRIM19 et TRIM28, deux protéines d'échafaudage à motif TRIM/RBCC.....	96
5.4.1	TRIM19/PML, l'organisateur des PML-NBs .....	99
5.4.2	TRIM28/TIF1 $\beta$ , le co-répresseur universel des protéines KRAB-Multidoigt de zinc .....	106
6	Hypothèses et objectifs .....	111
II.	<b>RÉSULTATS</b> .....	113



1	Préambule de la première étude .....	114
	Article 1.....	115
2	Préambule de la seconde étude .....	165
	Article 2.....	166
3	Préambule de la troisième étude .....	238
	Article 3.....	240
	<b>III. DISCUSSION</b> .....	288
1	Stratégie méthodologique.....	291
1.1	Stratégies employées pour l'étude d'interaction protéine:protéine.....	291
1.1.1	Le transfert d'énergie par résonance de bioluminescence dans les interactions E3:E2	293
1.1.2	La microcalorimétrie dans les interactions SIM:SUMO.....	294
1.1.3	La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire et la cartographie des interfaces d'interaction.....	296
1.1.4	La radiocristallographie pour déterminer l'interface d'interaction entre SUMO1 et la séquence SIM phosphorylée de PML.....	299
2	Rôle de SUMO dans la répression de la transcription dépendante de TIF1 $\beta$ .....	300
3	Les Ublps, de possible déterminants spécifiques dans la formation des complexes E3:E2.....	307
4	Les protéines PIAS, des ligases E3 pour SUMO possiblement activables par le stress	309
5	Les relations entre la stabilité de PML et la phosphorylation de son SIM .....	309
6	SUMO et l'Ubiquitine : des processus de conjugaison analogues dictent des fonctions distinctes.....	310
	<b>IV. CONCLUSION</b> .....	313
	Bibliographie.....	317
	Annexe.....	358

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principales Ublps des mammifères, leurs enzymes respectives et les fonctions dans lesquelles elles sont impliquées. ....	8
Tableau 2 : Inventaire et caractéristiques des différents UBDs interagissant avec l'Ubiquitine. ....	41

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Arbre phylogénétique, voies de conjugaison et fonctions associées pour différentes Ublps. ....	5
<b>Figure 2 :</b> Alignement des séquences primaires de NEDD8, de l'Ubiquitine et de SUMO1.6	
<b>Figure 3 :</b> Structures de NEDD8, de l'Ubiquitine et de SUMO1. ....	7
<b>Figure 4 :</b> Cycle de l'Ubiquitine. ....	9
<b>Figure 5 :</b> Les liens covalents peptidiques et iso-peptidiques. ....	10
<b>Figure 6 :</b> Mécanisme de fonctionnement de l'enzyme d'activation E1 pour une Ublp. ...	11
<b>Figure 7 :</b> Schéma tridimensionnel du domaine UBC des enzymes de conjugaison E2. ...	13
<b>Figure 8 :</b> Superposition de structures d'enzymes de conjugaison E2 pour l'Ubiquitine. ....	14
<b>Figure 9 :</b> Structures de deux complexes canoniques E2:E3 RING. ....	15
<b>Figure 10 :</b> Modèles cristallographiques de deux complexes non canoniques E2:E3. ....	16
<b>Figure 11 :</b> Superposition des structures de trois complexes E2-Ubiquitine simulant le complexe E2~Ubiquitine. ....	17
<b>Figure 12 :</b> Structures de deux complexes non-covalents E2:Ubiquitine. ....	18
<b>Figure 13 :</b> Les quatre différentes classes d'enzymes de conjugaison E2 chez l'humain. .	20
<b>Figure 14 :</b> Modèle cristallographique du complexe UBE2K*SUMO1. ....	21
<b>Figure 15 :</b> Représentation du mécanisme de fonctionnement des deux principales familles de ligases E3 pour l'Ubiquitine. ....	23
<b>Figure 16 :</b> Organisation de la séquence primaire du domaine RING-HC. ....	26
<b>Figure 17 :</b> Modèle cristallographique du domaine RING de la E3 CBL. ....	27
<b>Figure 18 :</b> Comparaison de l'organisation structurale des domaines RING, SP-RING et U-box de différentes E3. ....	28
<b>Figure 19 :</b> Modèles cristallographiques de deux complexes canoniques E3:E2. ....	30
<b>Figure 20 :</b> Mécanisme de fonctionnement du domaine RING dans le processus de conjugaison. ....	31
<b>Figure 21 :</b> Position des sites de poly-Ubiquitination sur la structure de l'Ubiquitine. ....	36
<b>Figure 22 :</b> Conséquences fonctionnelles associées à l'Ubiquitination des protéines. ....	37

<b>Figure 23</b> : Position des résidus impliqués dans les interactions non-covalentes de l'Ubiquitine avec les protéines.....	39
<b>Figure 24</b> : Alignement des séquences primaires de SUMO1, SUMO2 et SUMO3.....	45
<b>Figure 25</b> : Le cycle de SUMO.....	47
<b>Figure 26</b> : Modèle cristallographique du complexe entre SUMO1 et l'enzyme d'activation E1 pour SUMO, SAE1:SAE2.....	49
<b>Figure 27</b> : Modèle cristallographique du domaine UBC de UBC9.....	52
<b>Figure 28</b> : Modèle cristallographique du complexe Ubc9:Uba2-SFD.....	54
<b>Figure 29</b> : Modèle cristallographique du complexe RanBP2 IR1-M:UBC9~SUMO1.....	56
<b>Figure 30</b> : Modèle cristallographique du complexe UBC9:SUMO1.....	57
<b>Figure 31</b> : Modèle cristallographique du complexe Ubc9:Rad60 <sub>SLD2</sub> .....	59
<b>Figure 32</b> : Modèle cristallographique du complexe UBC9*SUMO1.....	60
<b>Figure 33</b> : Schéma du complexe UBC9:RanBP2:SUMO*RanGAP1.....	63
<b>Figure 34</b> : Représentations schématiques des protéines PIAS et des isoformes connues.....	65
<b>Figure 35</b> : Superposition des modèles cristallographiques de PIAS2 (H. sapiens) et de Siz1 (S. cerevisiae) (domaines PINIT et SP-RING).....	66
<b>Figure 36</b> : Alignement des séquences SIMs et des extensions phosphorylables/acides des ligases E3 Siz/PIAS.....	67
<b>Figure 37</b> : Les différents motifs de SUMOylation.....	70
<b>Figure 38</b> : Modèle cristallographique du complexe UBC9:RanGAP1*SUMO1.....	71
<b>Figure 39</b> : Localisation des résidus lysine de SUMO2 et de l'Ubiquitine impliquées dans la formation des chaînes poly-SUMO2 et de poly-Ubiquitine <i>in vivo</i> .....	75
<b>Figure 40</b> : Structures de deux complexes non-covalents SUMO1:SIM.....	78
<b>Figure 41</b> : Identification des surfaces de reconnaissance de SUMO et de l'Ubiquitine impliquées dans l'interaction avec les séquences SIMs et les UIMs.....	79
<b>Figure 42</b> : Diagramme de fréquence des résidus constituant le motif d'interaction avec SUMO et des séquences adjacentes.....	80
<b>Figure 43</b> : Les conséquences moléculaires des interactions covalentes et non-covalentes de SUMO avec les substrats.....	82
<b>Figure 44</b> : Représentation schématique de PIAS1.....	93

<b>Figure 45</b> : Les différentes classes de protéines TRIM humaines. ....	98
<b>Figure 46</b> : Représentation schématique des principales isoformes de PML avec l'assemblage des exons. ....	101
<b>Figure 47</b> : Représentation schématique des protéines de la famille TIF1. ....	108
<b>Figure 48</b> : Stratégies méthodologiques pour les études d'interactions. ....	293
<b>Figure 49</b> : Représentation schématique de microcalorimètre et vue d'un thermogramme typique. ....	296
<b>Figure 50</b> : Schématisation de spectres RMN 2D de type $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC lors d'une expérience de titrage de la protéine X par la protéine Y. ....	299
<b>Figure 51</b> : Inhibition de la répression transcriptionnelle de TIF1 $\beta$ et de TIF1 $\beta$ -6KR par Gam1. ....	303
<b>Figure 52</b> : La répression transcriptionnelle de $\Delta\text{N}$ -TIF1 $\beta$ dépend de l'intégrité d'une séquence SIM potentielle. ....	304
<b>Figure 53</b> : Restauration de l'activité répressive de TIF1 $\beta$ -6KR par les protéines fusions TIF1 $\beta$ -6KR-UBC9 et TIF1 $\beta$ -6KR-UBC9-C93S. ....	306
<b>Figure 54</b> : Modèles alternatifs pouvant expliquer la répression transcriptionnelle induite par les interactions SUMO:TIF1 $\beta$ . ....	307

## Liste des abréviations

ADN	Acide DéoxyriboNucléique
AMFR	Autocrine Motility Factor Receptor
AMP	Adénosine Mono-Phosphate
AOS1	Activator Of SUMO1
APC/C	Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
APL	Acute Promyelocytic Leukemia
AR	Androgen Receptor
ARN	Acide RiboNucléique
ATG12	AuTophagy-related protein12
ATP	Adénosine TriPhosphate
ATRA	All TransRetinoic Acid
$\beta$ -TrCP	$\beta$ -Transducin repeat Containing Protein
BARD1	BRCA1 Associated RING Domain protein1
BLM	BLooM syndrom protein
BRCA1	BReast CAncer1
BRCT	BRCA1 C-Terminus
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
CBL	Casitas B-lineage Lymphoma
CBX4	ChromoBoX protein 4
CDC20	Cell Division Control protein20
CDK1	Cyclin Dependent Kinase1
C/EBP	Ccaat/Enhancer Binding Protein

CELO	Chicken Embryo Lethal Orphan
CHD3	CHromo Domain helicase3
CHIP	Carboxy terminus of Hsp70-Interacting Protein
CK2	Casein Kinase2
CM	Consensus Motif
CNOT4	CCr4-NOT
CoREST1	Corepressor of RE1 Silencing Transcription factor
CtBP1	C-terminal Binding Protein1
DUBs	DeUBiquitinases
ERAD	Endoplasmic Reticulum Associted protein Degradation
ER $\beta$	Estrogen Receptor $\beta$
ERK	Extracellular-signal-Regulated protein Kinases
FAT10	human leucocyte antigen-F Associated Transcript10
G2BR	UBE2G2 Binding Region
Gal4-DBD	Galactose4-DNA Binding Domain
GFP	Green Fluorescent Protein
GMP1	GAP-Modifying Protein1
GR	Glucocorticoid Receptor
HCSM	Hydrophobic Cluster SUMO Motif
HDAC2	Histone DeACetylase2
HECT	Homologous to E6-AP Carboxy-Terminus
HERC2	HECT domain and RCC1-like domain-containing protein2
HIPK2	Homeodomain Interacting Protein Kinase2

HP1	Heterochromatin Protein1
HP1BD	Heterochromatin Protein1 Binding Domain
HSF2	Heat Shock Factor2
HSQC	HeteronuclearS Quantum Correlation
ICM	Inverted Consensus Motif
IKK $\alpha$	I $\kappa$ B Kinase $\alpha$
IR1-M-IR2	Inverted Repeat1-Middle domain-Inverted Repeat2
ISG15	Interferon Stimulated Gene15
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
KRAB	KRüppel-Associated Box
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MoaD	Molybdenum cofactorD
MoeB	MolybdopterinB
MCAF1	MBD1-containing Chromatin-Associated Factor1
MCB1	Multiubiquitin Chain-Binding protein1
MDM	Murine Double Minute
MNSF $\beta$	Monoclonal Nonspecific Suppressor Factor $\beta$
MPT	Modification post-traductionnelles
NDSM	Negatively charged amino-acid-Dependent SUMO Motif
NEDD8	Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down-regulated8
NEM	N-EthylMaleimide
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cell
NGFI-B	Nerve Growth Factor IB



NIP45	NFAT-Interacting Protein45
NLS	Nuclear Localization Signal
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NS1	Non-Structural protein1
Nup358	Nucleoporin 358 KDa
NuRD	Nucleosome Remodeling and Deacetylase
NZF	Npl4 Zinc Finger
P53BP1	P53Binding Protein1
Pc2	Polycomb2
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDSM	Phosphorylation-Dependent SUMO Motif
PH	Pleckstrin-Homology
PHD	Plant-Homeo Domain
PIAS	Protein inhibitor of Activated STAT
PIAS1	Protein inhibitor of Activated STAT1
PIC1	PML-Interacting Clone1
PINIT	Proline Isoleucine asparagiNe Isoleucine Threonine
PIP	PCNA-Interacting Protein
PML	Promyelocytic Leukemia
PR	Progesterone Receptor
PRC1	Polycomb Repressive Complex 1
pSuM	phosphorylated SuMOylation Motif
PubMed	Public Medline

R6BD	RAD6 Binding Domain
RAD6B	RADiation sensitivity protein6B
RAD18	RADiation sensitivity protein18
RAD60	Radiation sensivity protein60
RanBP2	Ran Binding Protein2
RanGAP1	Ran GTPase-Activating Protein1
RAR $\alpha$	Retinoic Acid Receptor $\alpha$
RBCC	RING B-box Coiled-Coil
RING	Really Interesting New Gene
RIR	RING In between RING
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNF4	RING Finger protein4
RNF8	RING Finger protein8
RNF168	RING Finger protein168
ROS	Reactive Oxygen Species
SAE1	SUMO Activating Enzyme1
SAE2	SUMO Activating Enzyme2
SAP	Scaffold Attachment factor-A/B/acinus/PIAS
SATB1	Special AT-rich sequence-Binding protein1
SBD	Substrat Binding Domain
SENPs	SENtrin-specific Proteases
SFD	SUMO-Fold Domain
SIM	SUMO-Interacting Motif

Siz1	SAP and mIZ finger domain1
SIZ1N	Smad-Interacting ZiNc finger protein1
SLD	SUMO-Like Domains
Smt3	Suppressor of Mif Two3
Sp3	Specific protein3
SP-RING	Siz/Protein Inhibitor of Activated STAT-RING
SRC1	Steroid Receptor Coactivator1
STAT	Signal Transducer and Activated of Transcription
Ste5	Sterile5
STUbl	SUMO Targeted Ubiquitin Ligase
SUMO	Small Ubiquitin related Modifier
TDG	Thymine DNA Glycosylase
ThiF	ThiamineF
ThiS	ThiamineS
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
Topors	Topoisomerase I-binding arginine/serine-rich protein
TIF1 $\alpha$	Transcription Intermediary Factor1 $\alpha$
TIF1 $\beta$	Transcription Intermediary Factor1 $\beta$
TIF1 $\delta$	Transcription Intermediary Factor1 $\delta$
TIF1 $\gamma$	Transcription Intermediary Factor1 $\gamma$
TRAF	Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor
TRIM	TRI partite Motif
TRIM19	TRI partite Motif19

TRIM28	TRI partite Motif28
TRIP-Br1	Transcriptional Regulator Interacting with PHD-Bromodomain1
UBA	UBiquitin Associated domain
UBA1	UBiquitin Activating1
UBA2	UBiquitin-like Activating2
UBA3	UBiquitin-like Activating3
UBA6	UBiquitin Activating6
UBA7	UBiquitin Activating7
UBC	UBiquitin-Conjugating
UBC7	UBiquitin Conjugating7
UBC9	UBiquitin Conjugating9
UBD	Ubiquitin Binding Domains
UBE2B	UBiquitin-conjugating enzyme E2B
UBE2D1	UBiquitin-conjugating enzyme E2D1
UBE2I	UBiquitin-conjugating enzyme E2I
UBE2K	UBiquitin-conjugating enzyme E2K
UBE2L3	UBiquitin-conjugating enzyme E2L3
UBE2M	UBiquitin-conjugating enzyme E2M
UBE2N	UBiquitin-conjugating enzyme E2N
UBE2R1	UBiquitin-conjugating enzyme E2R1
UBE2R2	UBiquitin-conjugating enzyme E2R2
UBL1	UBiquitin-Like1
UBLD	UBiquitin-Like Domain

Ublps	Ubiquitin-like proteins
U-box	Ubiquitin Fusion Degradation protein2-box
UBP-ZF	Ubiquitin-Binding Protein Zinc Finger
UFD	Ubiquitin-Fold Domain
UIM	Ubiquitin Interacting Motif
ULD	Ubiquitin-Like Domain
UniprotKB	Universal Protein resource KnowledgeBase
UV	Ultra Violet

*À celles et à ceux ayant, de près ou de loin,  
participé à cette aventure*

## Remerciements

Ces années de doctorat furent riches en surprises et m'auront fait passer du statut de jeune étudiant candide et curieux à celui de vieux doctorant réaliste mais malgré tout passionné. À tous, je vous suis gré de m'avoir supporté, même dans les moments où j'étais insupportable.

Je remercie ma directrice de recherche, Muriel Aubry, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir fait partager sa passion puis sa philosophie de la recherche durant ces années de doctorat. Merci à tous les anciens membres du labo que j'ai eu la chance de rencontrer et avec qui j'ai pu travailler. Je tiens tout particulièrement à remercier Patricia pour tous les moments passés au sein ou en dehors du labo. Patricia, j'ai apprécié ton concept labo-philo qui a raccourci nos longues heures de manips de BRET, d'essais de gènes rapporteurs et autres. Un grand merci à l'équipe du département de biochimie. Claudette, Dominique, Elaine, Ernest, Lorraine, Louise et Sylvie, vous m'avez permis de reprendre pieds dans la vie. Durant ce doctorat, j'ai eu la chance de croiser le chemin de James Omichinski. Jim, I would like to thank you for letting me access to your lab but above sharing with me your passion for research. Cette rencontre m'a ouvert de nouveaux horizons et m'a permis de travailler et d'échanger de nombreuses idées et conversations avec plusieurs collègues. Un merci tout particulier à Matthieu et à Laurent pour leur patience, leur aide précieuse et leurs conseils. Thomas, merci pour ta bonne humeur. Matthieu, Philippe, Geneviève, Pierre, les parties de volleyball d'été furent une bouffée d'oxygène. Des amitiés se sont créés au cours de ce doctorat. À ce titre, je tiens à remercier Louise, Patricia et Marc, Karine et Laurent ainsi que Ségolène et Thomas pour les multiples moments passés en leur compagnie dans ou bien en dehors du labo. Même si je donne rarement de mes nouvelles, souvent mes pensées se tournent vers vous. Un grand merci à Mutty, ma grand-mère, pour la nombreuse correspondance reçue depuis mon arrivée au Québec. Merci à mon oncle, Georges, pour les multiples rounds de corrections de cette thèse. À mes parents, Chantal et François, pour leurs nombreux encouragements et leur soutien indéfectible.









## Mise en contexte

Cette thèse s'intéresse à la régulation des protéines par un certain type de modifications post-traductionnelles (*MPTs*). Les *MPTs* des protéines sont de différents types mais toutes affectent les fonctions des substrats qu'elles ciblent par différents mécanismes. Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude d'un type particulier de *MPTs*: les *MPTs* impliquant le couplage covalent à un substrat protéique d'une petite protéine de la famille de l'Ubiquitine et plus particulièrement d'un des membres de cette famille, SUMO (*Small Ubiquitin related MOdifier*). Ainsi, par le biais d'approches biochimiques et biophysiques ainsi que de prédictions basées sur les connaissances de la machinerie enzymatique impliquée dans le couplage de l'Ubiquitine, nous avons exploré les changements structuraux, les impacts fonctionnels et la régulation que peuvent engendrer la liaison covalente ou non-covalente de SUMO sur trois protéines d'échafaudage modèles, PIAS1 (*Protein Inhibitor of Activated STAT1*), PML/TRIM19 (*ProMyelocytic Leukemia/TRIpartite Motif19*) et TIF1 $\beta$ /TRIM28 (*Transcription Intermediary Factor1 $\beta$ / TRIpartite Motif28*).

# I. INTRODUCTION

## 1 Les dessous de la diversité fonctionnelle du protéome

Le protéome se définit comme l'ensemble de toutes les protéines exprimées pour un génome donné (cellule, tissus, organe ou organisme). On distingue le protéome cellulaire de celui d'un organisme. Le premier est l'ensemble des protéines exprimées pour un type cellulaire particulier à un instant T donné, alors que le second englobe les différentes protéines exprimées dans tous les types cellulaires qui constituent cet organisme. Au moins **trois mécanismes** participent à l'augmentation de la diversité fonctionnelle des protéines.

Le **premier** d'entre eux est l'épissage alternatif. Ce processus engendre de nombreuses iso-formes de protéines à partir d'une seule séquence d'ARN. Ainsi, il est admis que près de 70% des gènes humains voient leur ARN pré-messager régulé par épissage alternatif. À titre d'exemple, selon UniProtKB (*Universal Protein resource KnowledgeBase*), une base de données regroupant les informations fonctionnelles de protéines, près de douze isoformes protéiques sont générées par épissage alternatif suite à la transcription du gène encodant PML [1], une des protéines faisant l'objet d'une des sections de cette thèse.

Le **deuxième** mécanisme à la base de la diversité fonctionnelle des protéines repose sur l'existence de protéases. À titre d'exemple, on peut citer la famille des caspases, qui clivent les chaînes poly-peptiques de protéines cibles et génèrent, à partir de ces dernières, de nouveaux fragments protéiques qui sont susceptibles de présenter de nouvelles fonctions.

Le **troisième** mécanisme, qui est probablement le plus répandu, et qui va être abordé dans les prochaines sections de cette introduction ainsi que dans les différents chapitres de cette thèse, repose sur les modifications chimiques que peuvent subir les protéines une fois synthétisées. Ces modifications sont regroupées sous le terme de modifications post-traductionnelles (MPTs). Ainsi, le très grand nombre de modifications différentes qui touche une protéine peut influencer de façon quasi illimitée les fonctions de

cette dernière. En outre, la nature versatile de la plupart de ces modifications en fait des régulateurs précis capables de moduler les propriétés d'une protéine de manière transitoire. Le corps de cette thèse approfondit plus spécifiquement une des classes de modifications post-traductionnelles, les polypeptides de la famille des *Ubiquitin-like proteins* (Ublps).

## **2 Modifications post-traductionnelles des protéines par les Ublps**

### **2.1 Les MPTs, source de diversité fonctionnelle des protéines**

Une MPT est la modification chimique d'un résidu (acide aminé) spécifique d'une protéine le plus souvent à la suite d'un stimulus. Ces modifications induisent, dans la majorité des cas rapportés, des changements dans les propriétés (fonctions) biochimiques des protéines ciblées. On compte plusieurs centaines de MPTs différentes (groupements chimiques, acides gras, glucides, etc...) susceptibles de cibler au moins quinze des vingt acides aminés constituant communément une protéine [2]. De plus, ces modifications peuvent se coordonner (effets d'induction ou d'inhibition) les unes par rapport aux autres, démultipliant ainsi les fonctions de la protéine ciblée, et donc modulant les signalisations qui en découlent. Chacun des types de modifications est pris en charge par des enzymes spécifiques.

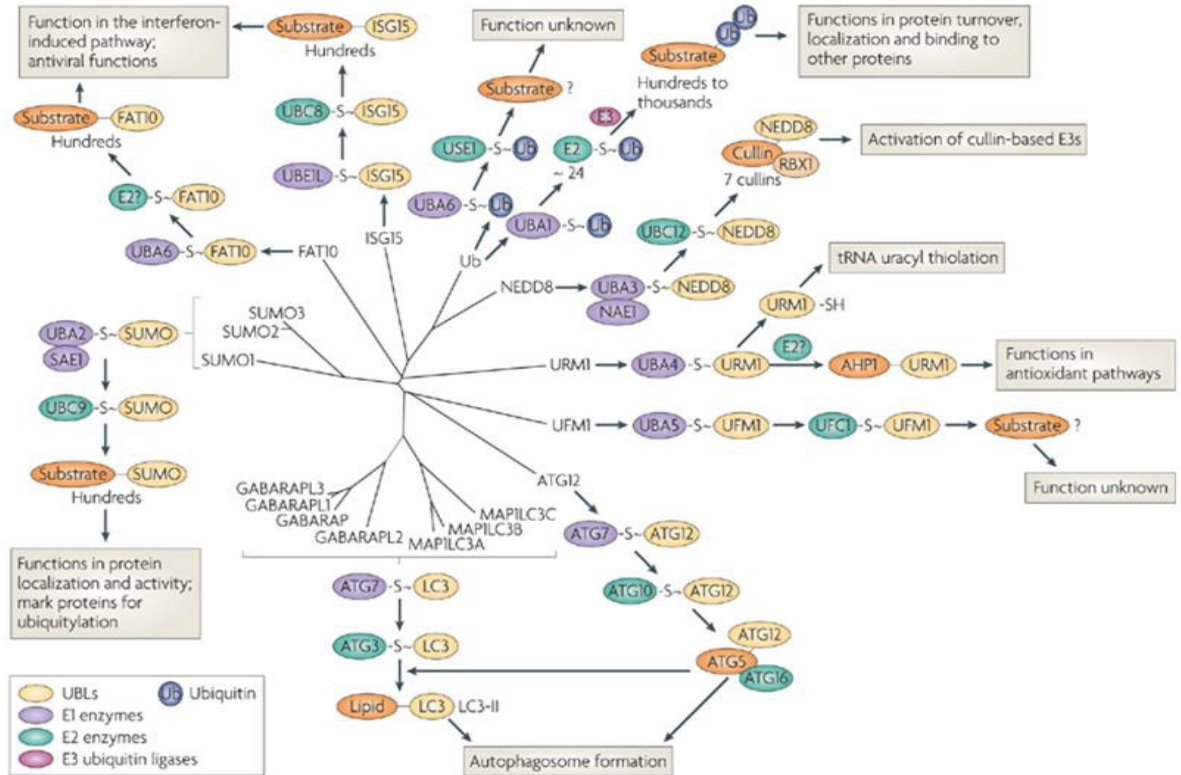
Les MPTs sont donc essentielles à la diversité fonctionnelle des protéines et se situent à la source de l'adaptation des cellules, tissus, organes et organismes à leur environnement. Parmi les différentes classes de MPTs, on retrouve des petites protéines. Ces dernières forment une classe de protéines à part entière, puisqu'il s'agit d'une famille de polypeptides (protéines de moins de 170 acides aminés) qui, en se couplant de manière covalente sur leurs substrats, influencent d'une multitude de façons les propriétés de ces derniers. Tel que développé dans la section suivante (section 3), l'Ubiquitine représente un prototype de cette famille de protéines. Dans le cadre des articles présentés dans cette thèse, l'emphase sera mise sur un second membre de cette famille, SUMO (*Small Ubiquitin-*

*related MOdifier*) dont la découverte est plus récente et dont les caractéristiques principales seront introduites à la section 4 de ce chapitre (chapitre 1).

### 3 L'Ubiquitine, un prototype de polypeptides modifiant les protéines

Parmi les différents types de MPTs des protéines on retrouve donc des polypeptides dont le membre le mieux caractérisé est l'Ubiquitine. En effet, sa découverte, ses modes de régulations, ainsi que la caractérisation des enzymes impliquées dans son processus de conjugaison ont grandement facilité l'identification de plusieurs autres polypeptides modificateurs et des enzymes associées. Dans cette section, la plupart des connaissances actuelles se rattachant à l'Ubiquitine ainsi qu'au processus d'Ubiquitination des protéines sont abordées à titre de prototypes des Ublps et des modifications par les Ublps. De plus, plusieurs membres connus de la famille des petites protéines se couplant de façon covalente à leur substrat sont évoqués. Ces données sont abordées de manière concise et structurée afin de dégager les principaux concepts qui caractérisent la modification post-traductionnelle d'une protéine par un polypeptide.

L'Ubiquitine, une petite protéine de 76 acides aminés (masse moléculaire 8.5 kDa), est le mieux caractérisé de ces polypeptides. Sa découverte, il y a plus de trente ans, et son implication dans une nouvelle voie de dégradation des protéines (dégradation protéique via le protéasome), ont valu le Nobel de chimie aux Drs Hershko, Rose et Ciechanover en 2004 [3]. D'une dizaine d'études publiées en 1982, le nombre de publications s'intéressant aux différentes fonctions reliées à l'Ubiquitine a considérablement augmenté durant ces trente dernières années, avec plus de trente milles articles scientifiques publiés à ce jour dans la base de données PubMed (*Public Medline*). L'Ubiquitine joue le rôle de polypeptide modèle pour cette famille qui compte, à ce jour, dix-sept membres (**Figure 1**). La plupart de ceux-ci modifient des protéines tandis que d'autres se retrouvent conjugués à des lipides. Le membre le plus étudié à ce jour, en dehors de l'Ubiquitine elle-même, est SUMO [4].



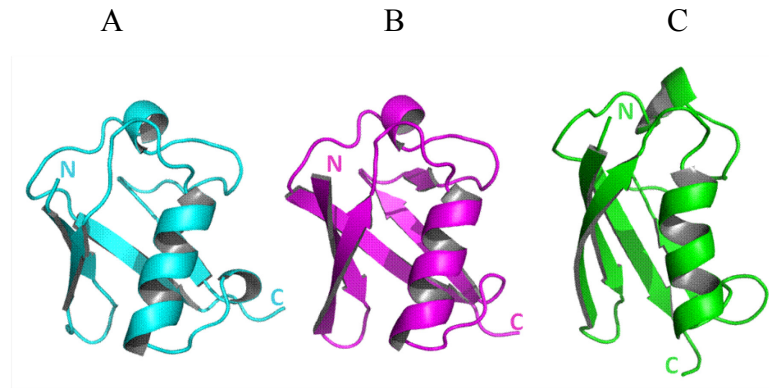
**Figure 1:** Arbre phylogénétique, voies de conjugaison et fonctions associées pour différentes Ublps.

Arbre phylogénétique des différentes Ublps (jaune), incluant l'Ubiquitine (bleu), connues pour être conjuguées à des protéines et à des lipides. Le nom des enzymes d'activation E1 (violet) et des enzymes de conjugaison E2 (vert) spécifiques à chacune des Ublps est mentionné lorsque connu. Les fonctions dans lesquelles sont impliquées les différentes Ublps sont indiquées. D'après Schulman B.A. and Harper J.W., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2009; 10 (5): 319–331 [5]

En dehors de l'Ubiquitine et de SUMO, dont les principales caractéristiques sont développées dans les parties 3 et 4 de ce chapitre (chapitre 1), près de dix autres membres ont été définis pour modifier des protéines. Parmi ceux-ci, NEDD8 (*Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down-regulated8*) [6], ISG15 (*Interferon Stimulated Gene 15*) [7], FAT10 (*human leucocyte antigen-F Associated Transcript10*) [8], MNSFβ (*Monoclonal Nonspecific Suppressor Factorβ*) [9] et ATG12 (*AuTophagy-related*







**Figure 3 :** Structures de NEDD8, de l'Ubiquitine et de SUMO1.

A) Modèle cristallographique de NEDD8 (cyan, PDB: 1NDD), B) Modèle cristallographique de l'Ubiquitine (magenta, PDB: 1UBQ) et C) Modèle de structure par RMN de SUMO1 (vert, PDB: 1A5R). L'extension amino-terminale unique à SUMO1 n'est pas représentée.

Le processus biochimique par lequel l'Ubiquitine est couplée de manière covalente à une protéine est nommé Ubiquitination, ou Ubiquitylation, et est conservé chez tous les eucaryotes. Des processus de modification analogues sont utilisés par les différents membres de la famille des Ublps [15]. Même si le processus de couplage des différentes Ublps est similaire, les conséquences fonctionnelles de ces modifications par les Ublps sur leurs cibles protéiques peuvent être distinctes. Ces différentes fonctions sont dictées, à la fois, par les propriétés intrinsèques de l'Ublp et par les enzymes impliquées dans le processus de couplage (**Tableau 1**).

**Tableau 1** : Les principales Ublps des mammifères, leurs enzymes respectives et les fonctions dans lesquelles elles sont impliquées.

Adapté de van der Veen A.G. and Ploegh H.L., *Annu.Rev.Biochem.*, 2012; 81: 323–357 [4]

Ublp	% d'identité	maturation	E1	E2	E3	protéase	mono-/poly-modification	substrats	fonctions
Ubiquitine	100	oui	UBA1/UBA6	> 37	> 600 (RING,HECT)	~ 80	Mono/Poly	plusieurs milliers	Beaucoup (en fonction du type de chaîne)
NEDD8	55	oui	NAE1-UBA3	UBE2M UBE2F	~10	CSN5 NEDP1	Mono/Poly?	cullines, suppresseurs de tumeurs, oncoprotéines	régule l'Ubiquitination via les ligases E3 cullin-RING, cycle cellulaire
MNSFβ	36	oui						protéines TCRα-like, Bcl-G, Endophilin II	rôle dans l'immunité?
ISG15	28/37	oui	UBE1L	UBCH8 UBCH6	Herc5	UBP43	Mono	protéines de l'hôte et virales	immunité antivirale, induit par l'interféron
FAT10	27/36	non	UBA6	USE2				USE2	dégradation par le protéasome, rôle dans l'immunité?
UFM1	23	oui	UBA5	UFC1	Ufl1	UfSP1 UfSP2		C20orf116	érythropoïèse (différenciation des mégacaryocytes)
SUMO1	14	oui	SAE1-SAE2	UBC9	~ 10	SEN1-2	Mono	plusieurs centaines	module les interactions, la localisation, la conformation
SUMO2/3	13	oui	SAE1-SAE2	UBC9	~ 10	SEN1-3 SEN5-7	Mono/Poly	plusieurs centaines	idem SUMO1 et stabilité de protéines
ATG12	12	non	ATG7	ATG10			Mono	ATG5, ATG3	autophagie, homéostasie des mitochondries

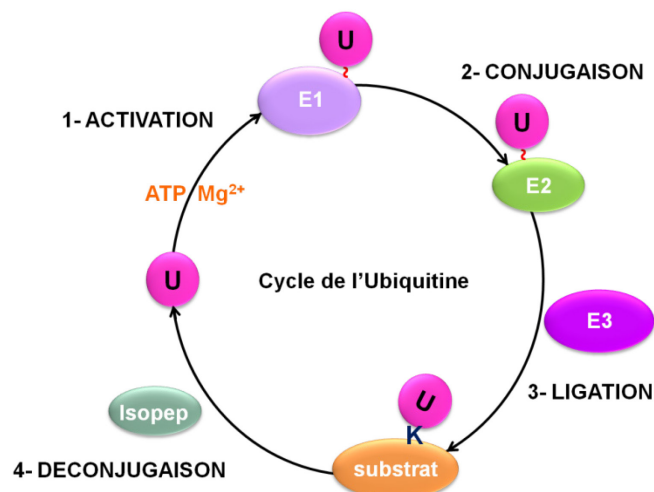
% d'identité: pourcentage d'identité de séquence par rapport à l'Ubiquitine.

E1, E2 et E3: enzymes d'activation, de conjugaison et ligase.

Les sections qui suivent (3.1 à 3.3) abordent plus en détails les caractéristiques relatives à l'Ubiquitine, au processus enzymatique d'Ubiquitination, incluant une description détaillée des enzymes impliquées (E1, E2 et E3) et aux fonctions associées à l'Ubiquitination des protéines. Lorsque la littérature le permet, un parallèle est fait avec les processus impliquant d'autres Ublps.

### 3.1 L'Ubiquitination, un prototype de MPT

Le processus d'Ubiquitination se fait en trois étapes enzymatiques successives (activation, conjugaison et ligation) qui permettent le couplage covalent de l'Ubiquitine sur une protéine cible (**Figure 4**) [16].

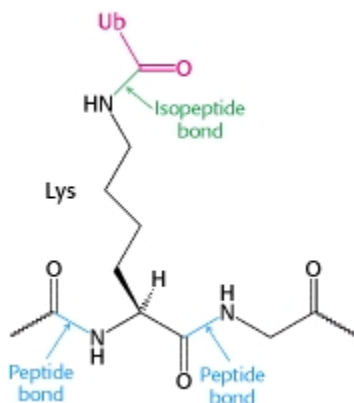


**Figure 4 :** Cycle de l'Ubiquitine.

*Étape 1 :* Activation. L'Ubiquitine (U, rose) est adénylée par l'enzyme E1 (mauve) en présence d'ATP et de Mg<sup>2+</sup>; un lien thioester se forme avec l'enzyme d'activation E1. *Étape 2 :* Conjugaison. L'Ubiquitine est transférée à l'enzyme de conjugaison E2 (vert) via le transfert du lien thioester. *Étape 3 :* Ligation. L'Ubiquitine est liée de manière covalente sur un résidu lysine (K) d'une protéine cible (substrat, orange) à l'aide d'une enzyme de ligation E3 (magenta). *Étape 4 :* Déconjugaison. Le lien covalent entre l'Ubiquitine et le substrat est clivé par une enzyme iso-peptidase (kaki). L'étape de maturation n'est pas représentée.

Encodée par quatre gènes différents, l'Ubiquitine doit subir une étape de maturation avant d'être prise en charge par la machinerie d'Ubiquitination [17]. Dans un premier temps, une enzyme d'activation (E1) assure l'adénylation du résidu glycine G76 de l'Ubiquitine en présence d'Adénosine TriPhosphate (ATP) et d'un ion magnésium (Mg<sup>2+</sup>) [18-20]. L'Ubiquitine activée (adénylée) subit une attaque nucléophile de la cystéine catalytique de l'enzyme E1 suite à la dé-protonation de son groupement sulfhydrile (Cys-SH) donnant un anion thiolate (Cys-S<sup>-</sup>). Un lien thioester covalent (~) de haute énergie est ainsi formé entre l'enzyme E1 et l'Ubiquitine (E1~Ub) [21,22]. Cette dernière est, par la suite, transférée à la cystéine catalytique d'une enzyme de conjugaison (E2) lors d'une réaction de transthioylation. Dans la majorité des cas répertoriés, l'enzyme de conjugaison E2 chargée (E2~Ub) est reconnue par une enzyme de ligation (E3) [23,24]. La

caractéristique générale des enzymes de ligation est de faciliter, par différents mécanismes, la formation du lien iso-peptidique entre l'Ubiquitine et la protéine ciblée [25] (**Figure 5**). Ce lien covalent (iso-peptidique) s'établit entre le groupement carboxyle du dernier résidu de l'Ubiquitine (glycine G76) et le groupement  $\epsilon$  amine d'un résidu lysine (dans la majorité des cas) de la protéine cible.



**Figure 5** : Les liens covalents peptidiques et iso-peptidiques.

Lien peptidique (bleu) entre des résidus adjacents de la chaîne principale (noir) et lien iso-peptidique (vert) entre le groupement carboxyle du dernier résidu glycine de l'Ubiquitine (rose) et le groupement  $\epsilon$  amine (HN) d'un résidu lysine (Lys) de la chaîne principale.

## 3.2 Les enzymes impliquées dans l'Ubiquitination des protéines

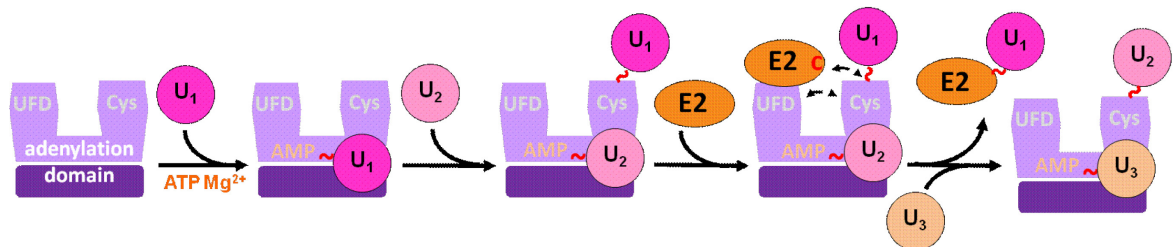
### 3.2.1 Les enzymes d'activation E1

Ce sont les enzymes d'activation E1 qui initient le mécanisme de modification des protéines par les dix-sept Ublps connues, à ce jour [5]. La plupart des enzymes E1 présentent des structures tridimensionnelles et des mécanismes d'activation similaires; elles sont au nombre de huit chez l'humain [5]. En effet, certaines enzymes d'activation E1 présentent la particularité de prendre en charge plusieurs des Ublps de différentes familles [26]. Il semble que le mécanisme d'activation des Ublps soit très conservé, puisqu'on le retrouve chez les procaryotes, comme *E.coli*, où MoeB (*MolybdopterinB*) et ThiF (*ThiamineF*) catalysent l'adénylation de MoaD (*Molybdenum cofactorD*) et ThiS (*ThiamineS*), leurs Ublps respectives [27-30]. Chez l'humain, l'Ubiquitination est le seul

des processus de modification où deux enzymes d'activation E1 (UBA1 et UBA6, *UBiquitin Activating*) interviennent [28].

### 3.2.1.1 Organisation structurale

Les enzymes d'activation E1 pour l'Ubiquitine, NEDD8 et SUMO comportent trois principaux domaines: un domaine d'adénylation, un domaine catalytique Cys et un domaine UFD (*Ubiquitin-Fold Domain*) (**Figure 6**) [31-33]. Le domaine d'adénylation peut être composé de deux protéines tel que mentionné précédemment. C'est au sein du domaine d'adénylation, que se produit l'activation de l'Ublp [34]. Cette dernière est par la suite transférée sur la cystéine catalytique de l'enzyme qui se trouve dans le domaine Cys [34]. Le domaine UFD sert, quant à lui, au recrutement de l'enzyme de conjugaison E2 [31,35]. Ces domaines sont reliés entre eux par des régions flexibles permettant des changements de conformations essentielles à la fonction de l'enzyme E1 [34]. Lors de la réaction de transthiolation, l'Ublp est transférée de la cystéine catalytique de l'enzyme d'activation E1 à la cystéine catalytique de l'enzyme de conjugaison E2 (**Figure 6**). Les caractéristiques des enzymes de conjugaison E2 sont abordées dans la section 3.2.2.



**Figure 6** : Mécanisme de fonctionnement de l'enzyme d'activation E1 pour une Ublp.

L'enzyme d'activation se compose de trois domaines: un domaine d'adénylation, un domaine catalytique (Cys) et un domaine *Ubiquitin-like* (UFD). En présence d'ATP et de  $Mg^{2+}$ , l'Ublp ( $U_1$ ) est liée de façon covalente à une molécule d'Adénosine Mono-Phosphate (AMP) dans le domaine d'adénylation. L'Ublp adénylée ( $AMP\sim U_1$ ) est transférée à la cystéine catalytique de l'enzyme d'activation E1 (Cys). Un lien thioester se crée et une deuxième molécule d'Ublp ( $U_2$ ) est chargée par la E1 pour être adénylée ( $AMP\sim U_2$ ). Le domaine UFD recrute une enzyme de conjugaison (E2) et l'oriente idéalement pour permettre le transfert du lien thioester depuis le domaine catalytique (Cys) vers la cystéine catalytique de l'enzyme de conjugaison (E2 C). Une fois chargée, l'enzyme de conjugaison ( $E2\sim U_1$ ) est relâchée de l'enzyme d'activation. Bien que non représenté, l'activation des

Ublps ( $U_2$ ) et ( $U_3$ ) se fait en présence d'ATP et de  $Mg^{2+}$ . Adapté de Capili A.D. and Lima C.D., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2007; 17(6): 726–735 [36].

### 3.2.1.2 Régulation des enzymes d'activation

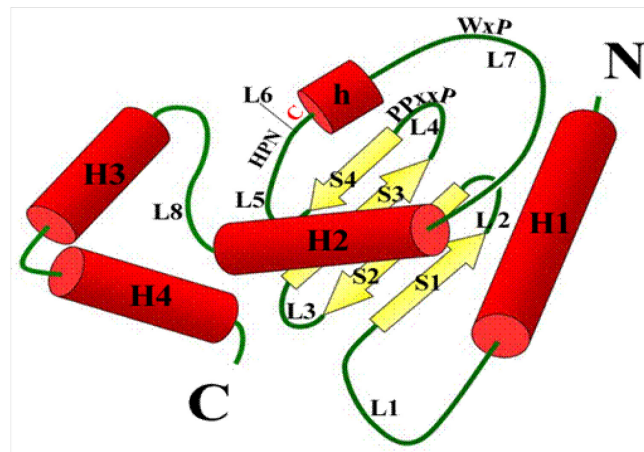
Même si les enzymes d'activation E1 se situent à l'apex du processus de conjugaison de toutes les Ublps, peu d'études se sont penchées sur leur régulation *in vivo*. UBA1, une des deux enzymes d'activation pour l'Ubiquitine, semble être requise dans la prolifération cellulaire ainsi que pour la transition G2/M du cycle cellulaire [37,38]. L'expression de UBA7, l'enzyme E1 de ISG15, est induite par les interférons  $\alpha$  et  $\beta$ , et son activité est inhibée par NS1 (*Non-Structural protein1*), une protéine de l'influenza [39]. Des inhibiteurs sélectifs pour les différentes enzymes d'activation sont en cours de développement et permettront probablement une meilleure caractérisation fonctionnelle de ces activités enzymatiques [40].

### 3.2.2 Les enzymes de conjugaison E2

Alors que la levure ne compte qu'une quinzaine d'enzymes de conjugaison E2, près d'une quarantaine d'enzymes E2 sont répertoriées chez l'humain [41]. La vaste majorité d'entre elles (près de trente) est dédiée au processus d'Ubiquitination [42]. Leur nombre, plus important que celui des enzymes d'activation, reflète probablement une spécialisation de leur fonction au cours du processus de conjugaison. En effet, les enzymes de conjugaison E2 servent d'intermédiaires dans le processus de modification en interagissant, dans un premier temps, avec les enzymes d'activation E1 et, une fois chargées de leur Ublp, avec les multiples enzymes de ligation E3 [43]. Ces interactions sont considérées comme consécutives car les enzymes d'activation E1 et les enzymes de ligation E3 reconnaissent une surface similaire de l'enzyme de conjugaison E2 [44]. À ce jour, toutes les enzymes de conjugaison E2 caractérisées présentent un domaine similaire, c'est le domaine UBC (*UBiquitin-Conjugating*) [45].

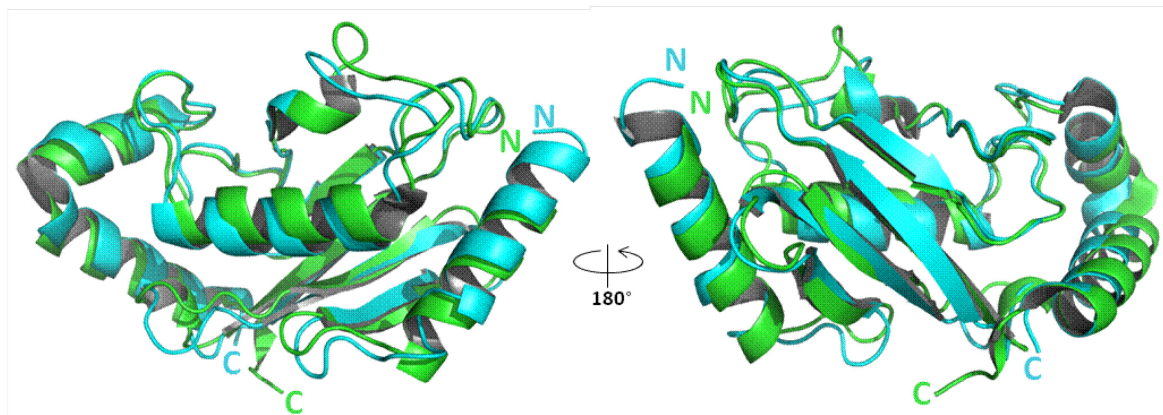
### 3.2.2.1 Le domaine UBC des enzymes de conjugaison

Les enzymes de conjugaison E2 possèdent minimalement un domaine catalytique globulaire, le domaine UBC ou *catalytic core*, de cent cinquante acides aminés environ où réside le site actif [46] (**Figure 7**). Mis à part la poche catalytique constituée de résidus relativement conservés entourant la cystéine active [47], la composition de la séquence primaire du domaine catalytique des enzymes de conjugaison E2 diffère grandement [48]. Néanmoins, le domaine catalytique de toutes les enzymes de conjugaison présente une structure tridimensionnelle similaire et compacte (*UBC fold*) [46]. Ce domaine est constitué de quatre hélices  $\alpha$ , d'une petite hélice  $3_{10}$  située non loin du site actif, et d'un feuillet  $\beta$  formé de quatre brins  $\beta$  antiparallèles (**Figures 7 et 8**).



**Figure 7** : Schéma tridimensionnel du domaine UBC des enzymes de conjugaison E2.

Les hélices  $\alpha$  (H1 à H4) sont représentées par des cylindres rouges. Les brins  $\beta$  (S1 à S4) sont représentés par des flèches jaunes. Les boucles sont numérotées de L1 à L8. Les résidus fortement conservés sont indiqués (cystéine catalytique indiquée par un C rouge). Adapté de Michelle C., *et al.*, *J.Mol.Evol.*, 2009; 68(6):616-628 [49]



**Figure 8:** Superposition de structures d'enzymes de conjugaison E2 pour l'Ubiquitine.

Modèles cristallographiques de UBE2L3 (vert, PDB: 1WZV) et UBE2D1 (cyan, PDB: 2C4P). UBE2L3 et UBE2D1 présentent 42% d'identité de séquence.

### 3.2.2.2 Les interactions du domaine UBC avec les enzymes E1, E3 et les Ublps

Les différentes surfaces du domaine UBC des enzymes E2 sont reconnues par les enzymes d'activation E1, de ligation E3 et les Ublps, tels que décrit dans cette section.

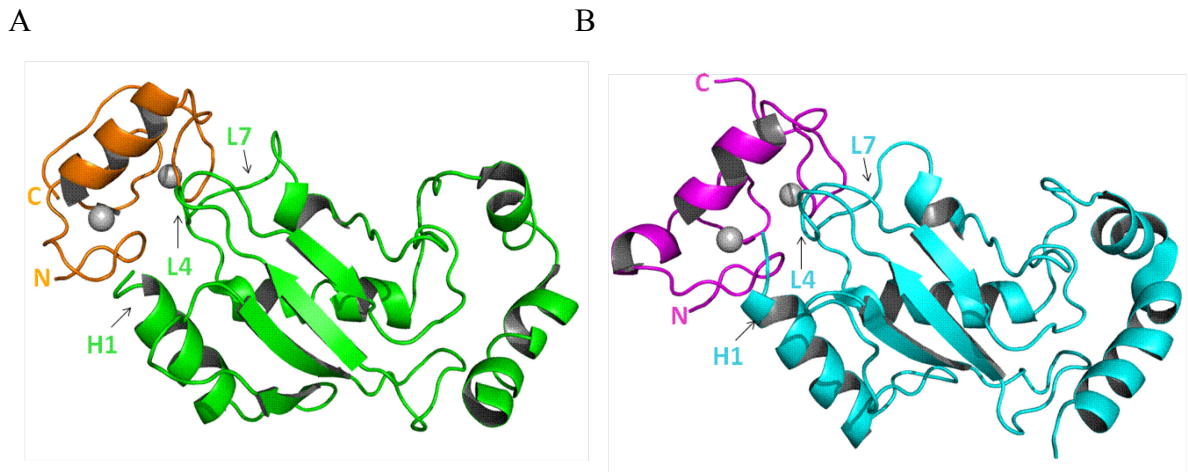
#### 3.2.2.2.1 Les interactions E2:E1

Tel que mentionné dans la section 3.2.1, c'est le domaine UFD de l'enzyme d'activation E1 qui recrute l'enzyme de conjugaison E2 afin de permettre le transfert de l'Ublp sur la cystéine active de l'enzyme E2. En général, la région du domaine UBC de l'enzyme de conjugaison E2 impliquée dans cette interaction est constituée de résidus exposés au solvant et composant la partie carboxy-terminale de l'hélice  $\alpha 1$  ainsi que ceux de la boucle (*Loop*) L2 connectant les brins  $\beta 1$  et  $\beta 2$ . Les interfaces d'interactions ont été caractérisées pour UBE2D1, UBE2I/UBC9 et UBE2M (*UBiquitin-conjugating enzyme E2*), respectivement, des enzymes de conjugaison pour l'Ubiquitine, SUMO et NEDD8, en complexe avec leur enzyme d'activation respective (UBA1, SAE2 pour *SUMO Activating Enzyme2* et UBA3) [31,33,35].



### 3.2.2.2.2 Les interactions E2:E3

La surface du domaine UBC de l'enzyme E2 interagissant avec l'enzyme de ligation E3 se chevauche avec celle reconnue par l'enzyme d'activation E1. En général, celle-ci comprend les résidus exposés au solvant et formant l'hélice  $\alpha 1$  ainsi que ceux des boucles L4 et L7. Cette interface d'interaction est dite « canonique » car identifiée pour tous les couples E2:E3 testés à ce jour (**Figure 9**) [50-55].

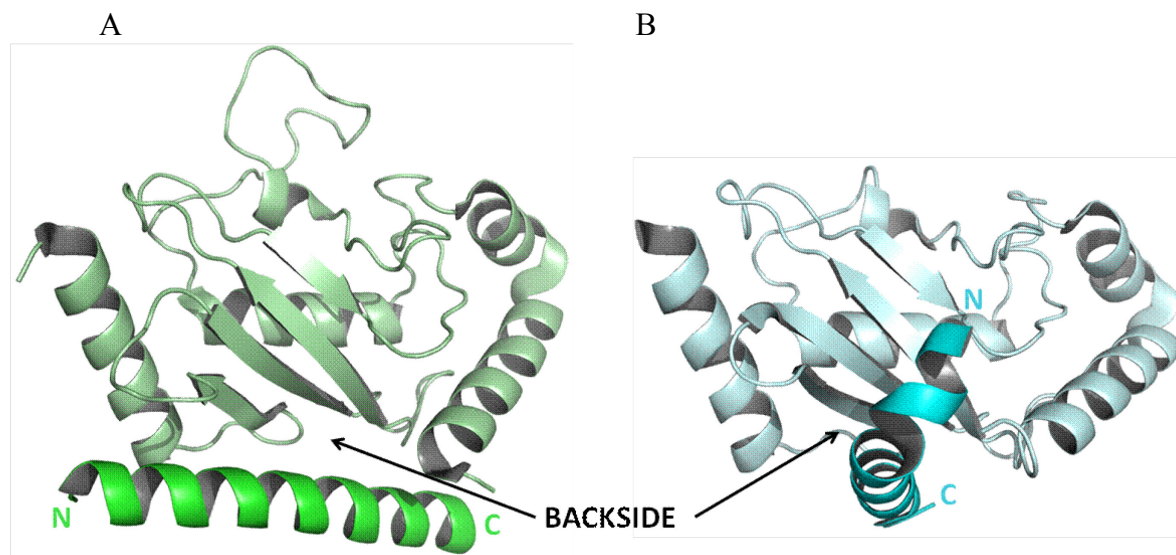


**Figure 9** : Structures de deux complexes canoniques E2:E3 RING.

A) Modèle cristallographique du complexe de la E2 UBE2L3 (vert) avec le domaine RING de la E3 CBL (orange), PDB: 1FBV et B) modèle par RMN de la structure du complexe de la E2 UBE2D2 (cyan) avec le domaine RING de la E3 CNOT4 (*CCr4-NOT*) (magenta), PDB: 1UR6. H1, L4 et L7 correspondent respectivement à l'hélice  $\alpha 1$ , la boucle L4 et la boucle L7 de l'enzyme de conjugaison E2. Les sphères grises représentent les cations zinc.

Néanmoins, une nouvelle surface d'interaction a récemment été caractérisée pour au moins trois enzymes de conjugaison E2 appartenant à différentes familles. En plus d'interagir avec leur enzyme E3 via l'interface « canonique », ces dernières contactent leur enzyme E3 via leur région nommée *backside* (**Figure 10**). Cette région se situe sur la surface opposée au site actif et comprend les résidus de la partie carboxy-terminale de l'hélice  $\alpha 1$ , de la boucle L3 ainsi que ceux des brins  $\beta 2$  et  $\beta 3$ . Il semblerait que cette

interaction régule la fonction processive de l'enzyme E2 par un mécanisme qui reste à expliquer [56-59].

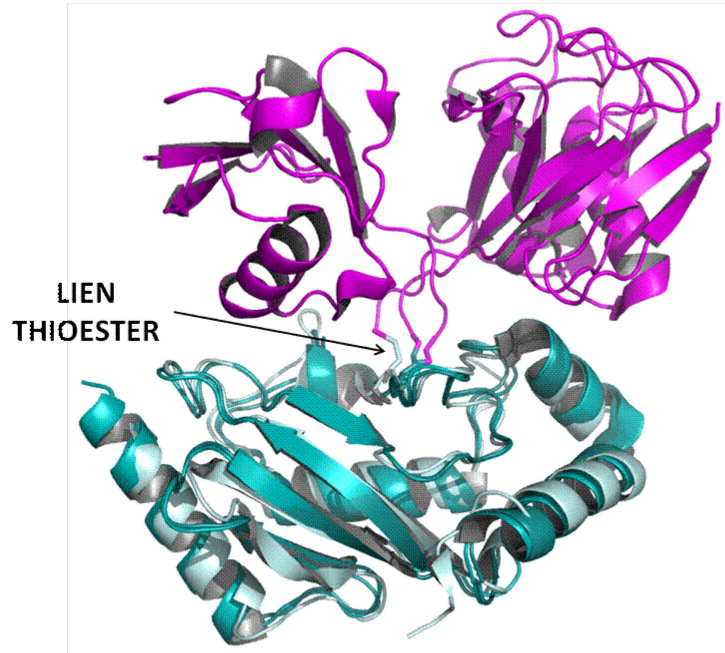


**Figure 10** : Modèles cristallographiques de deux complexes non canoniques E2:E3.

A) La E2 UBE2G2 (vert pâle) avec le domaine G2BR de la E3 GP78 (vert), PDB: 3H8K et  
 B) La E2 UBE2B (bleu pâle) avec le domaine R6BD de la E3 RAD18 (cyan), PDB: 2YBF.

### 3.2.2.2.3 Les interactions des E2 avec les Ublps

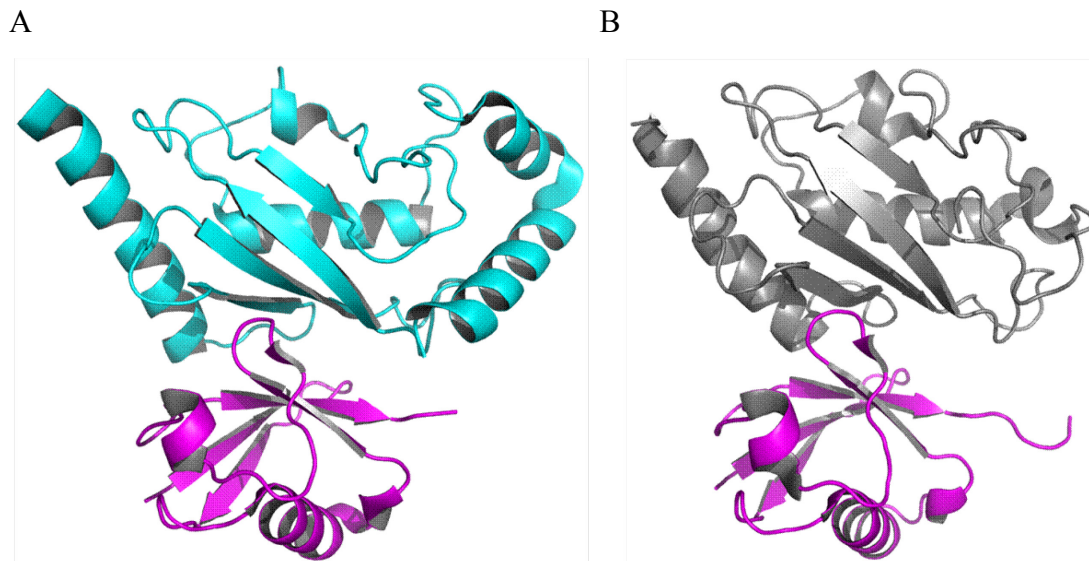
En général, l'affinité entre l'Ublp libre et la poche catalytique de l'enzyme de conjugaison E2 est relativement faible, voir inexistante. Toutefois, suite au processus de transthioylation et à la formation du lien thioester covalent (ou bien, un lien mimant le lien thioester) entre l'enzyme de conjugaison E2 et l'Ublp, des interactions ont été observées pour un certain nombre de résidus proches du site actif et ceux constituant l'hélice  $\alpha 2$  [60-62] (**Figure 11**). De plus, dans le complexe E2~Ub, l'Ubiquitine n'est pas immobile vis-à-vis de son E2. L'Ubiquitine adopte un mouvement de vacillement perpétuel qui semble défavoriser le processus de modification [63].



**Figure 11** : Superposition des structures de trois complexes E2-Ubiquitine simulant le complexe E2~Ubiquitine.

Modèle par RMN de la structure du complexe UBE2L6 (bleu clair) lié à l'Ubiquitine (magenta) par un pont disulfure, PDB: 2KJH. Modèle cristallographique de deux complexes, UBE2D2 (bleu-vert) lié l'Ubiquitine (magenta) par un lien oxy-ester, PDBs: 3A33 et 3UGB. (~) signifie un lien covalent thioester.

Récemment, une interaction non-covalente a été caractérisée entre la région *backside* de certaines enzymes de conjugaison E2 et leur Ublp respectives (**Figure 12**). Fonctionnellement, cette interaction semble réguler la formation de chaînes de poly-Ublps (voir section 3.3) [64-67].



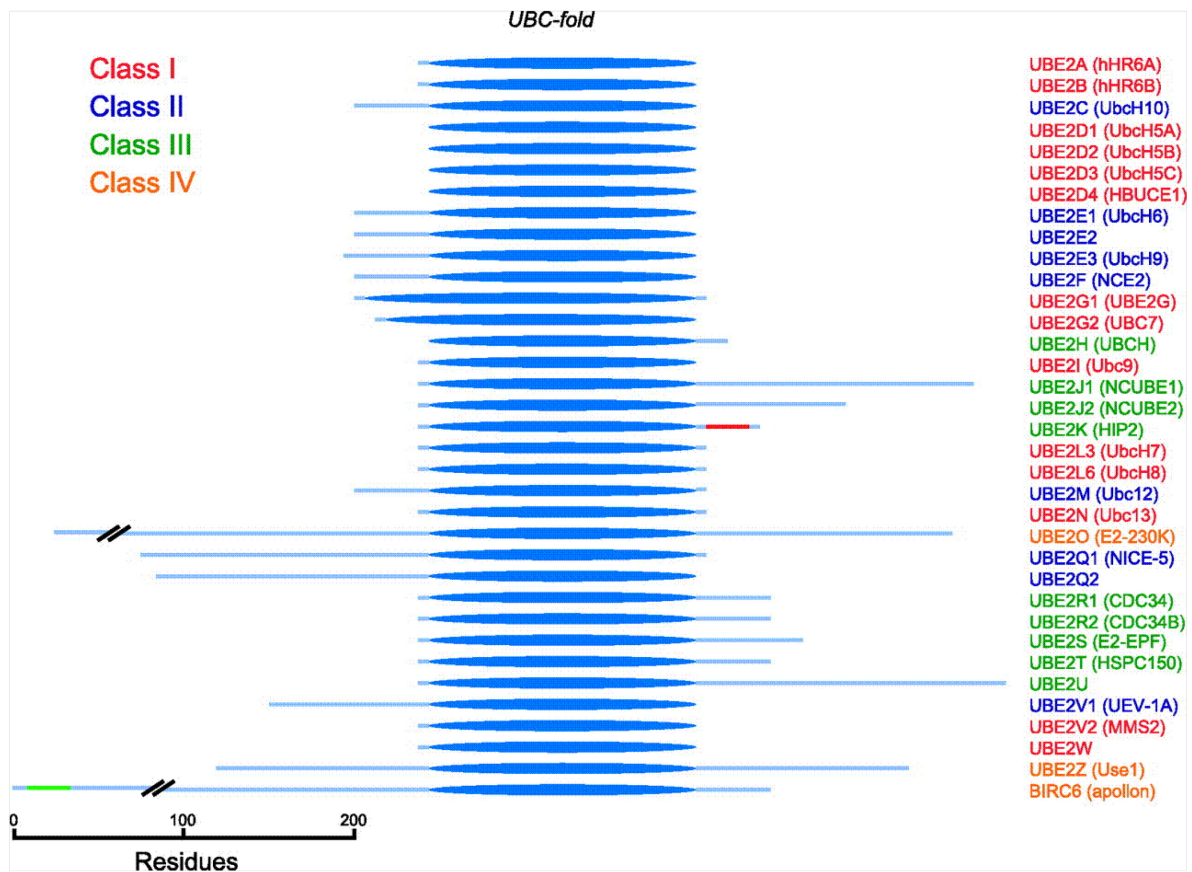
**Figure 12** : Structures de deux complexes non-covalents E2:Ubiquitine.

A) Modèle cristallographique du complexe de la E2 UBE2D1 (cyan) avec l'Ubiquitine (magenta), PDB: 3PTF et B) Modèle par RMN de la structure du complexe UBE2V2, un variant de E2, (gris) avec l'Ubiquitine (magenta), PDB: 1ZGU. (:) signifie interaction non-covalente.

### 3.2.2.3 Les insertions dans le domaine UBC et les extensions du domaine UBC des enzymes de conjugaison E2

Certaines enzymes de conjugaison E2 présentent des particularités au sein ou bien en dehors de leur domaine UBC sous forme d'insertion de régions et d'extensions terminales, respectivement. Une insertion de résidus acides et phosphorylables se retrouve dans la boucle L7 de plusieurs enzymes de conjugaison E2 [68]. La phosphorylation de cette boucle semble impliquée dans l'activation de la E2 UBE2R1 (UBE2R1~Ubiquitine) par son enzyme E1 [69,70]. D'autre part des extensions présentes chez certaines des enzymes E2 peuvent aussi moduler les interactions des enzymes de conjugaison E2 avec les autres membres de la machinerie de modification (Ublp, E1 et E3). Une classification des enzymes de conjugaison a d'ailleurs été élaborée (**Figure 13**). Celle-ci est basée sur la présence et la localisation de régions additionnelles au domaine UBC. Ces extensions, de

composition et de longueur variables, se situent le plus souvent en amino- et/ou en carboxy-terminal du domaine catalytique et sont pour la plupart non structurées. Ceci suggère des mécanismes de spécialisation pour les enzymes E2 qui en sont pourvues. Fonctionnellement, certaines de ces extensions semblent nécessaires pour la spécificité d'interaction E2:E1 [71] mais aussi pour l'interaction avec l'Ubiquitine [72] et peuvent augmenter l'activité processive de l'enzyme de conjugaison, comme dans le cas de UBE2K une enzyme de conjugaison pour l'Ubiquitine [73].



**Figure 13 :** Les quatre différentes classes d'enzymes de conjugaison E2 chez l'humain.

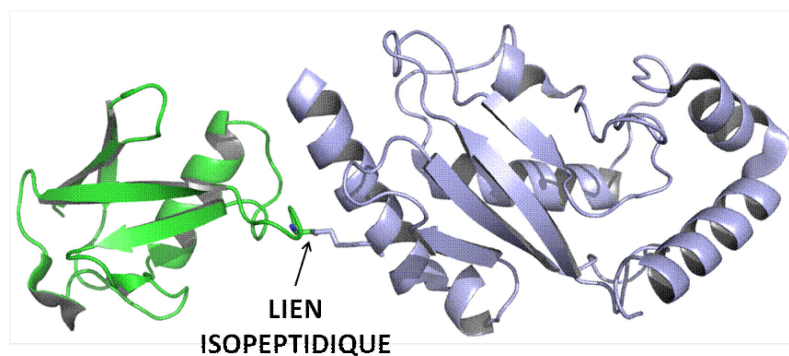
Schématisation du domaine UBC (*UBC fold*) et des extensions pour les différentes enzymes de conjugaison E2 chez l'humain. Pour chaque enzyme, le domaine UBC typique des E2 est représenté sous la forme d'une ellipse bleu foncé et les extensions amino- et carboxy-terminales sont indiquées par les lignes bleu pâle de part et d'autre du domaine UBC. Les différentes classes de E2 sont indiquées par différentes couleurs. L'échelle indique le nombre de résidus (acides-aminés). D'après van Wijk S.J. and Timmers H.T., *FASEB J.*, 2010; 24 (4): 981–993 [41].

#### 3.2.2.4 Régulation des enzymes de conjugaison E2 par les modifications post-traductionnelles

Comme toutes les autres protéines, les enzymes de conjugaison E2 sont les cibles de toute une panoplie de MPTs qui modulent leurs fonctions en altérant leurs interactions. Cette section expose les conséquences fonctionnelles de quelques-unes de ces MPTs sur les enzymes de conjugaison E2.

En effet, sous l'effet de modifications post-traductionnelles (acétylation, phosphorylation, SUMOylation, ISG15ylation, Ubiquitination, etc..), certaines enzymes E2 voient leur activité catalytique modulée [74]. Ainsi, UBC7 est envoyée au protéasome lorsque sa cystéine catalytique est liée à une chaîne de poly-Ubiquitine [75]. La phosphorylation de UBE2R2 par CK2 (*Casein Kinase2*) favorise son interaction avec la ligase E3  $\beta$ -TrCP ( *$\beta$ -Transducin repeat Containing Protein*) et augmente la dégradation de  $\beta$ -catenin [76]. La modification du résidu lysine K92 de UBE2N par ISG15 inhibe sa capacité à former un lien thioester avec l'Ubiquitine [77]. Dans le même ordre d'idée, la SUMOylation de UBE2K sur son résidu lysine K14 inhibe son interaction avec son enzyme d'activation, UBA1 [78] (**Figure 14**). Par contre, la modification de l'unique enzyme de conjugaison de SUMO, UBC9, par SUMO1 sur un résidu lysine analogue (K14) n'altère pas son interaction avec sa propre enzyme d'activation SAE1:SAE2 [79].





**Figure 14** : Modèle cristallographique du complexe UBE2K\*SUMO1.

UBE2K (gris) est modifiée sur sa lysine K14 par SUMO1 (vert). PDB: 2BF8. (\*) signifie un lien covalent iso-peptidique.

### 3.2.3 Les enzymes de ligation E3

Cette section présente la dernière classe d'enzymes impliquées dans le processus de conjugaison. Les enzymes de ligation E3 interviennent juste avant la modification du substrat par une Ublp. Les deux principales familles d'enzymes de ligation E3 à domaine HECT (*Homologous to E6-AP Carboxy-Terminus*) d'une part et à domaine RING (*Really Interesting New Gene*) d'autre part, ainsi que les propriétés les caractérisant sont abordées. Une emphase est mise sur la famille des ligases E3 à domaine RING puisqu'elle correspond à la plus grande famille de ligases et que trois protéines à domaine de type RING font l'objet des études présentées dans cette thèse.

On estime à plus de six cent le nombre de gènes humains codant pour des enzymes de ligation E3, dépassant ainsi la totalité de ceux encodant les protéines kinases [80]. L'énorme diversité de substrats (virtuellement, l'ensemble des protéines d'une cellule) explique fort probablement l'explosion du nombre d'enzymes de ligation E3.

L'enzyme de ligation E3 peut être considérée comme une protéine d'échafaudage [81]. En effet, celle-ci interagit à la fois avec l'enzyme de conjugaison E2 chargée de son Ublp (E2~Ublp) et avec une protéine cible (le substrat) via des modules (domaines)

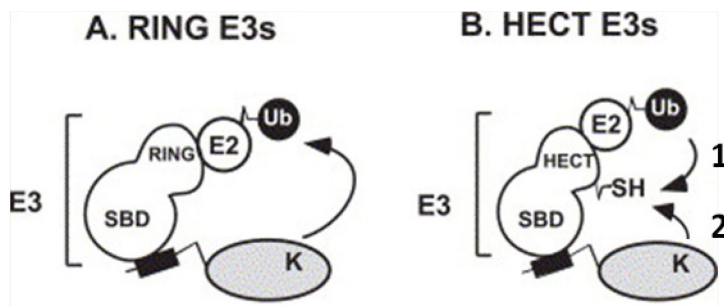
distincts (**Figure 15**). En outre, une des caractéristiques majeures des enzymes de ligation E3 est leur organisation multi-modulaire. Ces différents domaines peuvent faire partie de la même chaîne peptidique ou bien de chaînes peptidiques différentes. Dans le premier cas de figure, la même protéine contient plusieurs domaines responsables des interactions avec différents partenaires; c'est le cas de la ligase E3 RAD18 (*RAD*iation sensitivity protein**18**) [82]. Dans le deuxième cas de figure, plusieurs sous-unités, chacune avec un domaine spécifique, s'organisent en complexe; c'est le cas des ligases E3 Cullin-RING pour l'Ubiquitine [83]. En faisant l'hypothèse simpliste qu'une enzyme de ligation E3 est constituée de deux domaines; un module est destiné à reconnaître l'enzyme E2 chargée de son Ublp, l'autre étant requis pour l'interaction avec le substrat (**Figure 15**).

### 3.2.3.1 Les principales familles d'enzymes de ligation E3

Il est possible de classer les enzymes E3 ligases en deux principales familles: les ligases à domaine RING et celles à domaine HECT [84] [80]. Cette classification est basée sur le type de domaine reconnaissant l'enzyme de conjugaison E2 et sur le processus par lequel le substrat est modifié (**Figure 15**).

Il est à noter que bien que les domaines HECT et RING soient structurellement différents, ceux-ci sont reconnus par la même surface de l'enzyme de conjugaison E2 (cf section 32.2.2).





**Figure 15 :** Représentation du mécanisme de fonctionnement des deux principales familles de ligases E3 pour l'Ubiquitine.

Les deux familles de ligases E3 possèdent plusieurs domaines, elles recrutent un substrat via leur domaine liant le substrat (SBD pour *Subtrat Binding Domain*). A) Le domaine RING recrute le complexe E2~Ub pour modifier le substrat. B) Le domaine HECT recrute le complexe E2~Ub et dans un premier temps, un lien thioester est formé entre la ligase E3 et l'Ubiquitine (1), la lysine (K) du substrat (gris) est subséquemment modifiée par l'Ubiquitine (2). (~) signifie un lien covalent thioester. Adapté de Pickart C.M. and Eddins M.J., *Biochim. Biophys. Acta.*, 2004; 1695 (1-3): 55–72 [85].

### 3.2.3.1.1 Les ligases E3 à domaine HECT

Cette famille de ligase E3 présente un mécanisme de fonctionnement peu répandu. En effet, ces protéines présentent un processus similaire à celui des enzymes d'activation E1 et de conjugaison E2. Ainsi, avant d'aboutir à la modification du substrat, un lien thioester est formé entre l'Ublp et une cystéine active située au sein d'un domaine HECT multilobé [86].

Alors que la région d'interaction avec le substrat, constitué de différents domaines, se retrouve en amino-terminal de la ligase, le domaine HECT (environ trois cent cinquante résidus) qui interagit avec l'enzyme de conjugaison E2 et avec l'Ublp se situe toujours en carboxy-terminal de ce type d'enzyme (Figure 15B) [87,88].

Avec seulement près de trente membres répertoriés chez l'humain, cette famille d'enzyme de ligation ne représente qu'un faible pourcentage de toutes les enzymes de ligation.

### 3.2.3.1.2 Les ligases E3 à domaines de type RING

Les plupart des recherches actuelles se portent sur la famille des protéines à domaine RING [89] et reliées au RING, telles les protéines à domaines U-box (*Ubiquitin Fusion Degradation protein2-box*) [90] et à domaines SP-RING (*Siz/Protein Inhibitor of Activated STAT-RING*) [91]. Ces enzymes représentent plus de 95% de toutes les ligases E3.

Bien que des exceptions se dessinent [92-94], dans la majorité des cas répertoriés, les enzymes E3 à domaine RING semblent participer à la modification du substrat sans former de lien thioester avec l'Ublp. Le modèle actuel, et généralement accepté, propose que le rôle principal des ligases E3 de type RING serait d'augmenter la probabilité de réactions, et ainsi de faciliter la modification du substrat par la stabilisation du complexe substrat:E2~Ublp (**Figure 15A**) [80,95]. En effet, les enzymes de ligation E3 possèdent un domaine RING, qui contacte l'enzyme de conjugaison E2, mais aussi un ou plusieurs autres domaines impliqués de l'interaction avec le substrat. Prises dans leur ensemble, les enzymes E3 ligases à domaines de type RING ne présentent pas d'organisations structurales spécifiques comme c'est le cas pour les enzymes E3 de type HECT (**Figure 15B**).

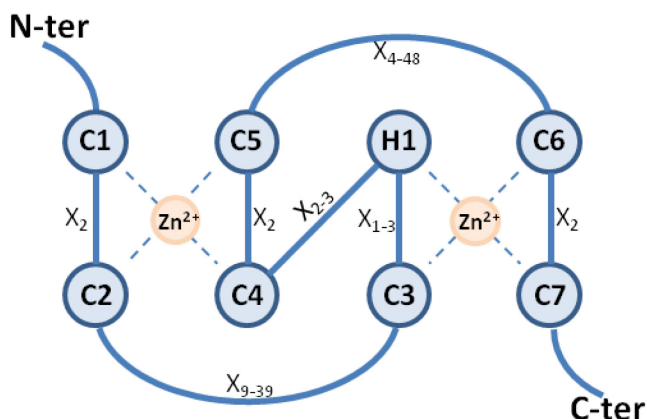
### 3.2.3.2 Caractéristiques des enzymes de ligation E3 à domaine RING

Les enzymes de ligation E3 à domaines RING sont des protéines multi-modulaires. Elles peuvent être classées en une trentaine de sous-familles, selon la nature et l'organisation des domaines ou motifs auxquelles elles sont associées [80]. Parmi celles-ci on retrouve les sous-familles CBL (*Casitas B-lineage Lymphoma*, ex: c-CBL) [96], RIR (*RING In between RING*, ex: parkin) [93], MDM (*Murine Double Minute* ex: MDM2) [97] et TRAF (*Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor*, ex: TRAF6) [98] pour ne citer que les plus connues. De plus, à ce jour, près d'une dizaine de membres des protéines à domaine TRIM (*TRI partite Motif*) agissent comme ligase E3 [99]. D'autres enzymes E3 comme BRCA1 (*BR*east *C*ancer1) ou BARD1 (*BRCA1 Associated RING Domain protein1*) ne sont associées à aucune sous-famille. Chez l'humain, le domaine RING est retrouvé associé à au moins soixante neuf autres domaines ou motifs selon la base de

données SUPERFAMILY qui regroupe les annotations fonctionnelles et structurales pour toutes les protéines et génomes disponibles.

### 3.2.3.2.1 *Les domaines de type RING*

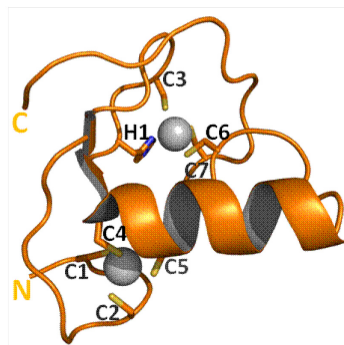
Le domaine RING classique adopte une forme globulaire et peut contenir jusqu'à une soixantaine de résidus [100]. Généralement, le domaine RING forme une structure composée de deux boucles intercalées par une hélice  $\alpha$  amphiphile. Son repliement tridimensionnel requiert la coordination de deux cations zinc ( $Zn^{2+}$ ) par huit résidus. Ces liaisons au zinc se font via des résidus cystéines (groupement sulfhydrile) et/ou histidine (groupement amide) adéquatement espacés dans la séquence primaire définissant le domaine RING (**Figures 16 et 17**) [101,102]. Une séquence consensus a été établie, celle-ci correspond à : C1-X<sub>2</sub>-C2-X<sub>(9-39)</sub>-C3-X<sub>(1-3)</sub>-H1-X<sub>(2-3)</sub>-C4-X<sub>2</sub>-C5-X<sub>(4-48)</sub>-C6-X<sub>2</sub>-C7, où C, H sont respectivement les résidus cystéine, histidine et X, n'importe quel résidu.



**Figure 16 :** Organisation de la séquence primaire du domaine RING-HC.

C1 correspond au premier résidu cystéine liant le zinc ( $Zn^{2+}$ ) et ainsi de suite. H1 correspond au résidu histidine liant le zinc.  $X_n$  correspond au nombre d'acides aminés dans les régions variables entre deux résidus liant le zinc. N-ter et C-ter signifient respectivement, amino-terminal et carboxy-terminal. Adapté de Deshaies R.J. and Joazeiro C.A., *Annu. Rev. Biochem.*, 2009;78:399-434 [80].

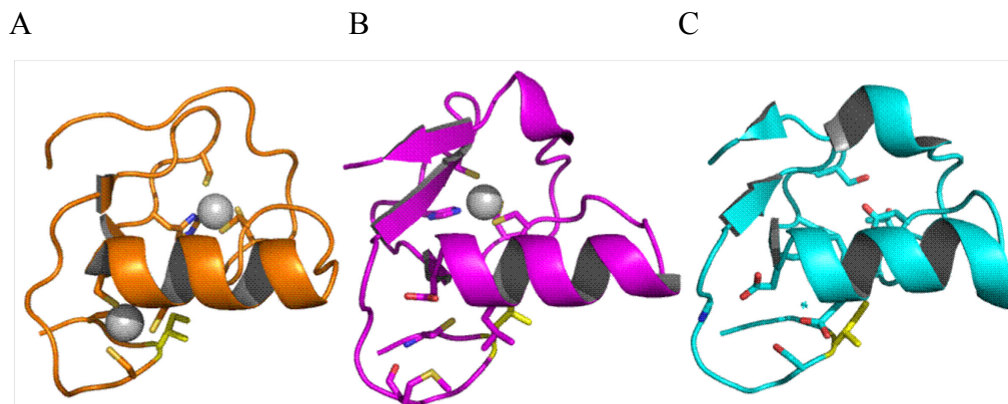
Il est à noter que des variations dans la séquence consensus existent (telles que des permutations de résidus cystéine-histidine, des échanges cystéine-acide aspartique) mais qu'aucune spécificité fonctionnelle liée à ces variations n'a été établie à ce jour. Ces modifications sont à l'origine de différentes sous-classes de domaines RING tels les RING-H<sub>2</sub>, ou les RING-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>C<sub>4</sub>. Les structures tridimensionnelles disponibles des domaines RING révèlent que les résidus conservés et liant le zinc (résidus aliphatiques, cystéines et histidines) se retrouvent dans le centre hydrophobe du domaine (**Figures 17 et 18A**) [94,102,103].



**Figure 17** : Modèle cristallographique du domaine RING de la E3 CBL.

Les résidus cystéine (C1-C7) et histidine (H1) liant le zinc sont représentés et numérotés en accord avec la séquence consensus du domaine RING-HC. Les cations zinc ( $Zn^{2+}$ ) sont représentés par des sphères grises (PDB: 1FBV).

Au moins deux autres domaines de type RING présentant des structures tridimensionnelles similaires aux domaines RING, et pourvus d'une activité ligase E3, ont été caractérisés chez des protéines (**Figure 18B et 18C**). Il s'agit des domaines SP-RING et U-box qui participent respectivement à la modification des protéines par SUMO et l'Ubiquitine. Contrairement au domaine RING classique, le domaine SP-RING des protéines PIAS (*Protein Inhibitor of Activated STATs*) qui agissent comme E3 pour SUMO, ne contient qu'un seul cation zinc lié par quatre résidus (trois cystéines et une histidine) (**Figure 18B**) [104]. Quant au domaine U-box, il ne présente pas de résidus cystéine et/ou histidine adéquatement espacés. Il est à noter qu'aucun cation zinc n'est requis pour le maintien de sa structure. Son repliement tridimensionnel dépend de résidus polaires et conservés (acides aspartiques, sérines et thréonines) dont l'espacement est similaire à celui des résidus cystéines et histidines retrouvés dans le domaine RING. Ainsi, ce sont les ponts hydrogènes et les interactions électrostatiques qui se forment entre ces résidus qui sont requis pour la conformation du domaine U-box de CHIP (*Carboxy terminus of Hsp70-Interacting Protein*), une ligase E3 pour l'Ubiquitine (**Figure 18C**) [105].



**Figure 18** : Comparaison de l'organisation structurale des domaines RING, SP-RING et U-box de différentes E3.

A-C) Modèles cristallographiques de la structure des domaines RING, SP-RING et U-box de CBL (orange), PIAS2 (magenta) et CHIP (cyan). Les résidus cystéine et histidine liant le zinc présents dans les domaines RING et SP-RING sont représentés. Ces résidus sont remplacés par des acides aspartiques, sérines ou thréonine dans le domaine U-box. Un résidu hydrophobe conservé dans les trois types de domaines est représenté et coloré en jaune. Les cations zinc sont représentés par des sphères grises. (PDBs respectifs: 1FBV, 4FO9 et 2OXQ).

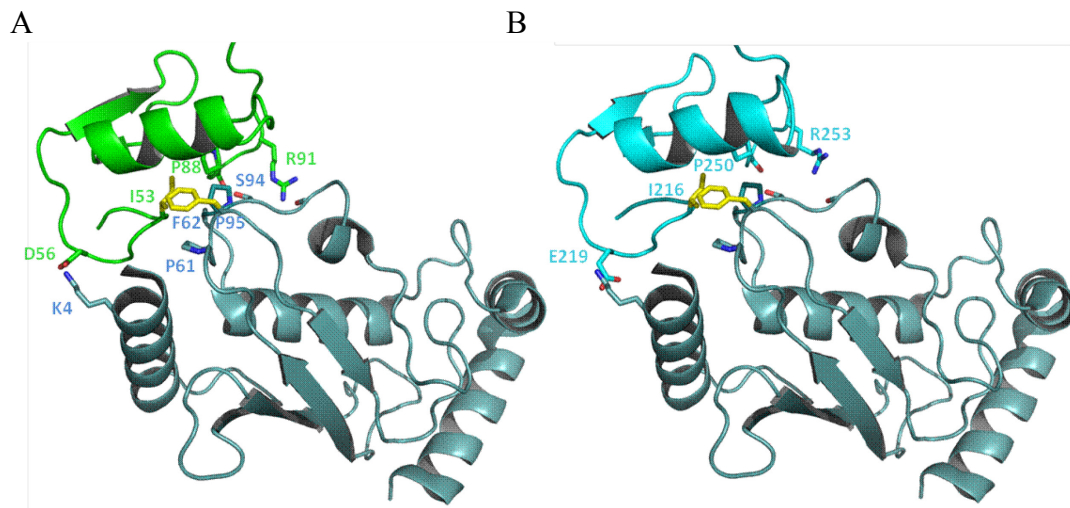
### 3.2.3.3 Interactions des ligases E3 de type RING avec les enzymes de conjugaison E2

Bien que divergeant dans leur séquence primaire respective, ces domaines de type RING présentent cependant une organisation structurale similaire qui leur permet de reconnaître une surface spécifique des enzymes de conjugaison E2, tel que mentionné dans la section suivante (3.2.3.3.1).

Les premières études associant le processus d'Ubiquitination à l'interaction du domaine RING avec une enzyme de conjugaison E2 ont été publiées en 1999 [89,106-113]. Celles-ci furent rapidement suivies de l'identification de l'interface d'interaction RING E3:E2 par des études de cristallographie et pour différents complexes E3:E2 [50,51]. À ce jour, les données structurales et/ou fonctionnelles ont permis d'identifier une interface d'interaction E3:E2 similaire dans tous les couples d'enzymes E2 et E3 testés. L'interaction E3:E2 résultante a donc été définie comme interaction canonique (**Figure 19**).

### 3.2.3.3.1 Interactions canonique RING E3:E2 et conséquences fonctionnelles

Généralement, les résidus cystéines et histidines responsables du maintien de la structure tridimensionnelle du domaine RING ne sont pas directement impliqués dans l'interaction avec l'enzyme de conjugaison E2. Dans la plupart des cas, des interactions hydrophobes et électrostatiques se forment entre les résidus de l'hélice  $\alpha_1$ , des boucles L4, L7 de l'enzyme de conjugaison E2 et un certain nombre de résidus exposés au solvant et constituant les boucles et la partie carboxy-terminale de l'hélice  $\alpha$  du domaine RING de l'enzyme E3 (**Figure 19**) et [50,114]. Il est à noter qu'une certaine plasticité existe dans cette interaction puisque différentes enzymes de conjugaison E2 peuvent être reconnues par un même domaine RING; l'inverse étant également vrai (**Figure 19A et 19B**) [52,55]. Ceci suggère une certaine redondance dans les interactions RING E3:E2. Cependant, la plupart des études ayant été menées avec un domaine RING isolé et une enzyme E2 non chargée de son Ublp, il est fort probable que certains couples RING E3:E2 soient exclus avec l'utilisation de protéines pleine longueur et active. Généralement l'affinité de ces interactions est relativement faible [89].

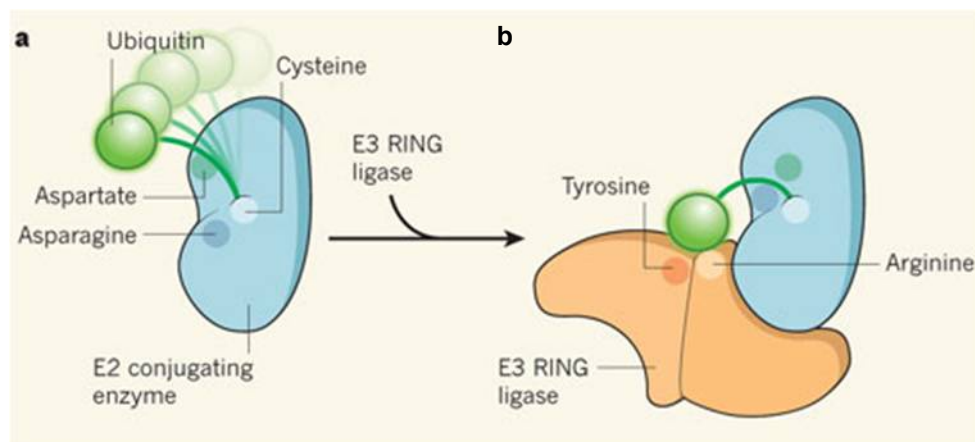


**Figure 19** : Modèles cristallographiques de deux complexes canoniques E3:E2.

Complexes canoniques A) RING1b RING (vert):UBE2D3 (gris), PDB: 3RPG et B) CHIP U-box (cyan):UBE2D1 (gris), PDB: 2OXQ. Les résidus impliqués dans l'interaction E3:E2 sont représentés, identifiés et numérotés. Les résidus hydrophobes sont colorés en jaune. Les cations zinc du domaine RING de RING1b ont été volontairement omis.

Fonctionnellement, l'interaction d'une enzyme E2 chargée de son Ublp (E2~Ublp) avec le domaine RING d'une enzyme E3 active le processus de modification; ceci est démontré pour un grand nombre de couples E3:E2 sans qu'aucune explication mécanistique n'ait été apportée. Sachant que le domaine RING dans un complexe E3:E2 est distant d'environ 20 Å de la cystéine active de l'enzyme E2, il semble improbable que celui-ci soit directement responsable de l'activation du processus de modification. Cependant, de récentes études proposent un rôle secondaire, mais néanmoins primordial, du domaine RING dans l'orientation et la stabilisation de l'Ublp activée (Ub~E2) lors du processus de modification (**Figure 20**) [115-117].





**Figure 20** : Mécanisme de fonctionnement du domaine RING dimérique dans le processus de conjugaison.

(a) La mobilité permanente de l'Ubiquitine dans le complexe E2~Ubi rend le processus de conjugaison inefficace. (b) La stabilisation de l'Ubiquitine par le domaine RING des ligases E3 favorise le processus de conjugaison et conséquemment la modification du substrat. Adapté de Lima C.D. and Schulman B.A., *Nature.*, 2012;489:43-44 [118].

### 3.2.3.3.2 Interactions non canoniques E3:E2 et conséquences fonctionnelles

En plus de former une interaction canonique (RING E3:E2), de nouvelles interfaces d'interaction ont été déterminées pour au moins trois différents couples d'enzymes E3:E2. Ces interactions non canoniques entre ligases E3 et enzyme de conjugaison E2 peuvent présenter une forte affinité. Pour deux d'entre eux, la surface *backside* de l'enzyme de conjugaison E2 contacte une région de l'enzyme E3 localisée en dehors du domaine RING (**Figure 10**) [57,58]. Même si la mécanistique d'interaction de ces deux couples E3:E2 apparaît similaire, leur finalité fonctionnelle respective semble différente puisque n'ayant pas les mêmes conséquences sur la formation de chaînes de poly-Ubiquitine. Ainsi, l'interaction de UBE2G2 avec le domaine G2BR (*UBE2G2 Binding Region*) de la ligase GP78/AMFR (*Autocrine Motility Factor Receptor*) favorise la formation de chaînes de poly-Ubiquitine alors que la formation de ces dernières est inhibée lors de l'interaction de UBE2B (aussi connu sous le nom de RAD6B pour *RADiation sensitivity protein6B*) avec le domaine R6BD (*RAD6 Binding Domain*) de RAD18.

Ainsi, il est possible de constater que les interactions E3:E2 sont multiples. Face, au grand nombre d'enzymes de conjugaison E2 (plus de trente chez l'humain) et à l'explosion du nombre d'enzymes de ligation E3 (près de 600 chez l'humain), il apparaît essentiel de comprendre les déterminants moléculaires qui gouvernent la spécificité des interactions entre les enzymes de conjugaison E2 et les enzymes de ligation E3.

#### 3.2.3.3.3 *Interactions E3:Substrat*

Dans la plupart des cas rapportés, les régions d'interaction de l'enzyme de ligation E3 avec son substrat et avec l'enzyme de conjugaison E2 sont distinctes. Ainsi, la ligase E3 pour SUMO, Siz1 (*SAP and mIZ finger domain1*), utilise son domaine PINIT (*Proline Isoleucine asparagiNe Isoleucine Threonine*) pour interagir avec PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) et son domaine SP-RING pour recruter UBC9, l'enzyme de conjugaison E2 pour SUMO [104]. Des changements dans la conformation du complexe Substrat:E3:E2~Ublp sont parfois requis pour la modification adéquate du substrat [119]. Certaines interactions E3:substrat sont dépendantes de la phosphorylation du substrat celle-ci étant, dans certains cas, spécifiquement reconnue par l'enzyme de ligation E3 [120-122].

Considérant la diversité des enzymes de ligation E3 et des substrats potentiels, il est fort probable qu'il existe de multiples stratégies de reconnaissance E3:substrat.

#### 3.2.3.4 **Régulations des ligases E3**

La fonction des ligases E3 peut être modulée, entre autres, par leur oligomérisation, leurs interactions avec d'autres protéines ou par des modifications pos-traductionnelles.

##### 3.2.3.4.1 *L'oligomérisation des ligases E3*

Une des caractéristiques partagée par de nombreuses enzymes de ligation E3 est leur propension à former des oligomères. Certaines de ces enzymes E3 forment des hétéro-dimères alors que d'autres s'organisent en homo-oligomères [103,123-125]. Néanmoins, les conséquences fonctionnelles de la formation de ces oligomères restent mal caractérisées. Plusieurs hypothèses sont envisagées. Selon certaines études, l'oligomérisation de certaines enzymes E3 pourrait augmenter l'affinité avec leur substrat et stimuler l'activité du complexe ligase E3 [126].

#### 3.2.3.4.2 *Les motifs et domaines associés aux ligases E3*

Tel que mentionné dans la section 3.2.3.1, la plupart des enzymes de ligation E3 présentent, en plus de leur domaine RING, des motifs et/ou domaines qui leur confèrent des propriétés spécifiques d'interaction avec le substrat et/ou avec des partenaires protéiques. Ainsi, l'UBLD (*UBiquitin Like Domain*) de Parkin dicte son interaction avec la sous-unité MCB1 (*Multiubiquitin Chain-Binding protein1*) du protéasome. La Fonction de Parkin se trouve altérée par certaines mutations de son domaine UBLD retrouvées chez des patients [127-129]. La dimérisation de CBL requiert que son domaine UBA (*UBiquitin Associated*) soit intact [130]. Les motifs SIM (*SUMO-Interacting Motif*) en série de RNF4 (*RING Finger protein4*) lui permettent de cibler des substrats poly-SUMOylés [131]. Le domaine BRCT (*BRCA1 C-Terminus*) de BRCA1 reconnaît spécifiquement des protéines phosphorylées [132]. Ces quelques exemples reflètent la diversité des rôles que peuvent présenter ces motifs et/ou domaines sur les fonctions des ligases E3.

#### 3.2.3.4.3 *Les modifications post-traductionnelles des ligases E3*

Les enzymes de ligation E3 sont aussi des cibles de nombreuses modifications post-traductionnelles labiles. Le plus souvent induites par des stimuli, celles-ci modulent transitoirement la fonction de plusieurs enzymes E3. Un des exemples les plus connus étant la régulation de l'activité ligase du complexe Cullin-RING par la NEDD8ylation de la sous-unité Cullin1 [133]. D'autres modifications post-traductionnelles peuvent réguler l'activité ligase. La phosphorylation active l'APC/C, un complexe E3 (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) en régulant son interaction avec l'activateur CDC20 (*Cell Division Control protein20*) [134]. Enfin, certaines modifications post-traductionnelles peuvent inhiber l'activité ligase des enzymes E3, telle que l'acétylation du domaine RING de MDM2 [135].

Ces exemples indiquent que les fonctions des ligases E3 peuvent être modulées d'une multitude de façons. Ceci renforce probablement la versatilité de ces protéines.

### 3.2.3.5 Pathologies associées aux enzymes de ligation E3 à domaine RING

Les enzymes de ligation E3 à domaine RING sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation associées, entre autre, à la régulation du cycle cellulaire, à l'intégrité du génome et à la transduction des signaux; conséquemment, la dérégulation de leurs fonctions suite à des mutations de leur gène est directement ou indirectement reliée à de nombreuses pathologies [136]. Certaines de ces ligases E3 présentent des caractéristiques de suppresseur de tumeur (l'activité de la protéine est inhibée par la/les mutation(s) ou la délétion du gène) tandis que d'autres se comportent en oncogènes (l'activité de la protéine est induite par la/les mutation(s) ou l'amplification du gène). Ainsi, l'APC/C, un complexe de ligases E3 impliquées dans le cycle cellulaire, se comporte comme un complexe suppresseur de tumeurs [137]. Les protéines de type E3 BRCA1 et BARD1, sont aussi des suppresseurs de tumeurs impliqués dans une voie de réparation de l'ADN [138]. Enfin, la translocation du gène encodant le suppresseur de tumeur TRIM19 (*TriPartite Motif19*, aussi connu sous le nom de PML *ProMyelocytic Leukemia*), une possible ligase E3, est la cause directe de la leucémie promyélocytaire aiguë [139]. *A contrario*, la surexpression de l'oncogène MDM2 est fréquente dans de nombreux cancers [140]. Ces enzymes E3 sont donc autant de cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement de pathologies auxquelles elles sont associées.

### 3.2.4 Les enzymes de déconjugaison

L'Ubiquitination des protéines est un processus réversible et une classe d'enzymes, les DUBs (*DeUBiquitinases*), est responsable du clivage du lien iso-peptidique. Il existe plus d'une centaine de DUBs de différents types; celles-ci reconnaissent l'Ubiquitine ou les différentes chaînes de poly-Ubiquitines liées aux substrats. Cette reconnaissance se fait via la présence de motifs d'interaction non-covalente avec l'Ubiquitine. En fonction du type de motifs et de leur agencement, les DUBs reconnaissent différents types de chaînes de poly-Ubiquitine [17].

### 3.3 Les fonctions des interactions de l'Ubiquitine avec les protéines

De nos jours, l'Ubiquitination d'un résidu lysine d'une protéine est encore majoritairement associée à un signal inducteur de dégradation de la protéine modifiée par le protéasome tel que rapporté il y a plus de vingt ans [141-144]. Afin de cibler la protéine Ubiquitinée vers le protéasome, il est nécessaire que celle-ci soit poly-Ubiquitinée (chaîne d'au moins quatre Ubiquitines) [145]. L'Ubiquitine contenant sept résidus lysines, différentes topologies de chaînes peuvent être générées; ces dernières sont associées à différentes fonctions (**Figure 21**) [146]. La dégradation protéique via le protéasome nécessite habituellement la formation de chaînes via le résidu lysine K48 de l'Ubiquitine [143]. Cependant, un nombre croissant d'études révèle que le répertoire des fonctions reliées à l'Ubiquitination d'une protéine est bien plus complexe qu'initialement envisagé, et qu'une multitude d'autres processus cellulaires peuvent y être associés [146]. Le type d'Ubiquitination (mono-Ubiquitination, multi-Ubiquitination, Ubiquitination en amino-terminal ou poly-Ubiquitination des protéines), ainsi que le type de chaîne formée (huit formes de chaînes homogènes différentes, des chaînes hétérogènes ou des chaînes hétérotypiques) font partie des facteurs qui déterminent le sort des protéines modifiées et les processus biologiques qui en résultent [146] (**Figure 22**). À ce jour, ce sont les enzymes impliquées dans le processus d'Ubiquitination qui sont considérées comme les principaux responsables de l'établissement d'un code de l'Ubiquitine.

En plus de sa fonction de modificateur post-traductionnel, l'Ubiquitine se comporte comme un partenaire d'interaction très versatile. On recense, à ce jour, plus d'une vingtaine de motifs ou domaines différents, pour lesquels une interaction non-covalente avec l'Ubiquitine a été déterminée (**Tableau 2**). La majorité des protéines exposant ces motifs/domaines sont associées à la machinerie d'Ubiquitination ou bien à la dégradation protéique via le protéasome [147]. Les molécules qui arborent ces domaines sont donc considérées comme des décodeurs/traducteurs du code de l'Ubiquitine; ces dernières permettent le transfert des messages associés à l'Ubiquitination de telle ou telle protéine.

Les deux prochaines sections abordent de façon succincte les différentes fonctions associées aux interactions covalentes et non-covalentes de l'Ubiquitine avec différents exemples de protéines modèles.



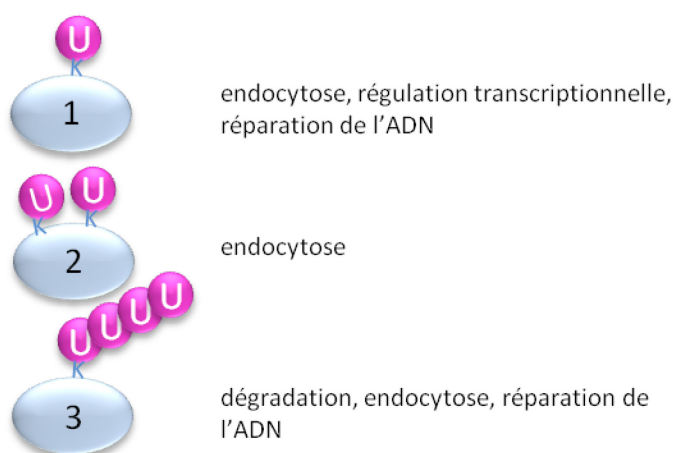
**Figure 21** : Position des sites de poly-Ubiquitination sur la structure de l'Ubiquitine.

Les résidus de l'Ubiquitine modifiés par Ubiquitination sont représentés et numérotés selon leur position dans la séquence primaire de l'Ubiquitine (PDB: 1UBQ).

### 3.3.1 Aperçu des fonctions associées à l'Ubiquitination des protéines

À ce jour, des fonctions spécifiques ont été associées à chacune des formes d'Ubiquitination caractérisée. Ainsi, la mono-Ubiquitination des protéines est associée aux processus d'endocytose, d'activation de la transcription, mais aussi à la réparation de l'ADN [148]. La multi-Ubiquitination est, elle aussi, associée à l'endocytose [149]. Bien que la poly-Ubiquitination des protéines soit majoritairement associée à la dégradation des protéines via la protéasome, celle-ci est aussi reliée à différents processus biologiques en fonction du type de lien formé au sein de la chaîne de poly-Ubiquitines. En effet, la méthionine initiatrice de l'Ubiquitine, ainsi que les sept résidus lysine sont autant de sites de couplage permettant la formation de chaînes de poly-Ubiquitine distinctes [146] et (**Figure 21**). Le positionnement de ces sites de couplage influence la topologie des chaînes de poly-Ubiquitines qui en résultent.

Ainsi, les chaînes d'Ubiquitines issues du couplage covalent sur les résidus lysine K48 et K63 ont été les plus étudiées car étant les plus abondamment formées dans les cellules [150]. Les chaînes de poly-Ubiquitine (K6) sont associées à la réparation et à la réplication de l'ADN [151]. Les chaînes de poly-Ubiquitines via le résidu lysine K11 ont été associées à la dégradation de protéines au cours du cycle cellulaire (APC/C) mais aussi à la dégradation des protéines endosomales (ERAD pour *Endoplasmic Reticulum Associated protein Degradation*) [152,153]. Les chaînes de poly-Ubiquitines (K29) sont, quant à elles, associées à la dégradation via le lysosome [154]. De façon typique, les chaînes de poly-Ubiquitines (K48) sont impliquées dans la dégradation via le protéasome. Finalement, les chaînes (K63) sont, elles, majoritairement impliquées dans les processus de réparation de l'ADN et de régulation de kinases [155]. Les principales fonctions des chaînes d'Ubiquitine sont indiquées dans la figure 22



**Figure 22** : Conséquences fonctionnelles associées à l'Ubiquitination des protéines.

Trois types d'Ubiquitination des protéines et leurs conséquences fonctionnelles associées. (1) Mono-Ubiquitination, (2) Multi-Ubiquitination et (3) Poly-Ubiquitination. L'Ubiquitination en amino-terminal n'est pas représentée.

Cependant, les données de plusieurs études récentes suggèrent que les chaînes d'Ubiquitine sur les résidus lysine K6, K11, K27, K29, K33 ou K63 peuvent aussi être associées à la dégradation de protéines [152,156-158]. Réciproquement, une fonction non

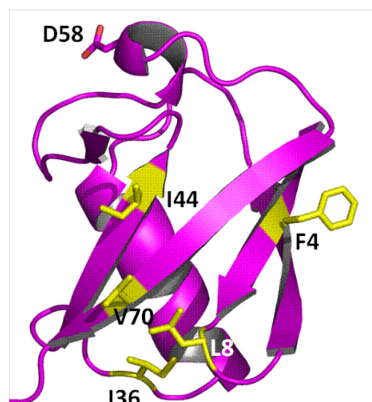
protéolytique a récemment été rapportée pour les chaînes d'Ubiquitine formées sur le résidu lysine K48 [159].

À la lumière de ces données sur les conséquences de l'Ubiquitination des protéines, il est possible de constater que les différents types d'Ubiquitination induisent une multitude de réponses biologiques; ces dernières dépendent du type d'Ubiquitination (mono-, multi- ou poly-Ubiquitination), du type de chaînes formées (chaînes homogènes, hétérogènes ou hétérotypiques) mais aussi des caractéristiques de la protéine ciblée.

### **3.3.2 Aperçu des fonctions associées à l'interaction non-covalente de l'Ubiquitine avec les protéines**

Près de vingt domaines différents sont actuellement reconnus pour interagir avec l'Ubiquitine (**Tableau 2**) [147]. À quelques exceptions près, presque tous ces domaines contactent une région hydrophobe du feuillet  $\beta$  de l'Ubiquitine formée des résidus leucine L8, isoleucine I44 et valine V70 (**Figure 23**) et [147].





**Figure 23** : Position des résidus impliqués dans les interactions non-covalentes de l'Ubiquitine avec les protéines.

Les résidus de l'Ubiquitine impliqués dans les interactions non-covalentes sont représentés colorés en jaune et numérotés selon leur position dans la séquence primaire de l'Ubiquitine (PDB: 1UBQ).

Ces UBDs (*Ubiquitin Binding Domains*) peuvent se classer en cinq groupes, en fonction de la nature du domaine qui lie l'Ubiquitine. Un premier groupe forme des domaines constitués d'une ou plusieurs hélices  $\alpha$  (les UIM, pour *Ubiquitin Interacting Motif* et les UBA, pour *UBiquitin Associated domain*). Ce sont les UBDs les plus répandus. Un second groupe englobe des domaines de type doigts de zinc (*A20 Zinc Finger*, UBP ZF pour *Ubiquitin-Binding Protein Zinc Finger* et NZF pour *Npl4 Zinc Finger*). Une troisième catégorie regroupe des protéines arborant un domaine PH (*Pleckstrin-Homology*). Enfin, tel que précédemment abordé, certaines enzymes de conjugaison E2 interagissent de manière non-covalente avec l'Ubiquitine via la surface *backside* de leur domaine UBC. Finalement, un dernier groupe englobe des protéines distinctes qui interagissent avec l'Ubiquitine via un domaine spécifique à chacune d'entre elles (**Tableau 2**).

Les conséquences moléculaires et fonctionnelles qui résultent de l'interaction de ces domaines avec l'Ubiquitine sont très diverses et dépendent de nombreux facteurs (le type de chaînes d'Ubiquitine, la nature du domaine d'interaction, la voie de signalisation dans laquelle la protéine est impliquée etc...). Ainsi, et pour ne citer que quelques exemples, on retrouve logiquement des domaines d'interaction avec l'Ubiquitine dans beaucoup

d'enzymes associées aux processus d'Ubiquitination. Parmi celles-ci, on compte plusieurs enzymes de conjugaison E2 qui interagissent avec l'Ubiquitine via différentes interfaces [64,67,160]. Ces interactions sont importantes pour la formation de chaînes de poly-Ubiquitines. On compte aussi plusieurs enzymes de ligation E3 de différentes familles qui présentent des domaines/motifs d'interaction avec l'Ubiquitine. Ceux-ci permettent, entre autres, de faciliter l'élongation des chaînes de poly-Ubiquitines, de reconnaître des partenaires poly-Ubiquitinés ou de favoriser l'Ubiquitination de substrats [161-165]. Différents types de domaines d'interaction avec l'Ubiquitine sont aussi retrouvés dans plusieurs des composantes du protéasome [166,167]. Ces domaines sont impliqués dans la reconnaissance spécifique de protéines poly-Ubiquitinées qui seront dégradées par le protéasome.

**Tableau 2** : Inventaire et caractéristiques des différents UBDs interagissant avec l'Ubiquitine.

Adapté de Hunsjak K. and Dikic I., *Annu.Rev.Biochem.*, 2012; 81: 291–322 [147].

UBD	Structure du domaine	Résidu reconnu	Interaction	Protéine modèle	PDB #
UBA	domaine de 3 hélices	I44	Mono-/Poly-Ubi (K48) et UBL	UBC1	1TTE
CUE	domaine de 3 hélices	I44	Mono-Ubi	Vps9	1P3Q
UIM	hélice $\alpha$	I44	Mono-/Poly-Ubi (K48, K63) et UBL	MCB1/S5a	2KDE
MIU/IUIM	hélice $\alpha$	I44	Mono-Ubi	RABEX-5	2C7M
DUIM	hélice $\alpha$	I44	Mono-Ubi	Hrs	2D3G
VHS	longue hélice $\alpha$	I44	Mono-Ubi	STAM2	2LOT
GAT	domaine de 3 hélices	I44	Mono-Ubi	TOM1	1WRD
NZF	doigt de zinc brin $\beta$	I44	Mono-/Poly-Ubi (K63)	HOIP	4DBG
ZnF A20	doigt de zinc	D58	Mono-Ubi	A20	3OJ3
ZnF UBP	doigt de zinc	L8 et I36	Poly-Ubi	HDAC6	3PHD
UBZ	doigt de zinc ( $\beta\beta\alpha$ )	I44	Mono-/Poly-Ubi	Pol eta	-
UBC	feuillet $\beta$	I44	Mono-Ubi	UBE2D3	2FUH
UEV	feuillet $\beta$	I44	Mono-Ubi	UBE2V2	2GMI
UBM	hélice tour hélice	L8	Mono-Ubi	Pol iota	2KWV
GLUE	domaine PH	I44	Mono-Ubi	EAP45	2DX5
PRU	domaine PH	I44	Mono-/Poly-Ubi et UBL	RPN13	2Z59
Jab1/MPN	domaine MPN	I44	Mono-Ubi	Prp8p	-
PFU	4 brins $\beta$ et 2 hélices $\alpha$	I44	Mono-/Poly-Ubi	Doa1	-
SH3	tonneau $\beta$	I44	Mono-Ubi	Slal	2HBP
UBAN	dimère coiled coil	F4 et I44	di-Ubi (M1)	NEMO	2ZVN
WD40 $\beta$ propeller	WD40 $\beta$ propeller	I44	Mono-Ubi	Doa1	-

**UBD** (Ubiquitin Binding Domain): nom du domaine impliqué dans l'interaction  
**Structure du domaine**: type de structure secondaire ou tertiaire impliqué dans l'interaction  
**Résidu reconnu**: résidu ou région de l'Ubiquitine impliquée dans l'interaction  
**Interaction**: type de chaîne d'Ubiquitine impliquée dans l'interaction  
**PDB#**: code de la base de donnée PDB correspondant à la protéine ou au domaine modèle

### **3.4 Les enseignements sur le processus d'Ubiquitination**

Le processus d'Ubiquitination est, de loin, le plus étudié des mécanismes de MPTs impliquant le couplage covalent de polypeptides de la famille de l'Ubiquitine à des protéines cibles. Les nombreuses études se rapportant au processus d'Ubiquitination ont permis de déterminer des lignes directrices quand aux fonctions associées à cette MPT et de mieux cerner les rôles et les modes de régulation des nombreuses enzymes de la machinerie d'Ubiquitination. Même si le principal rôle de l'Ubiquitination des protéines est la dégradation par le protéasome, des exceptions se dessinent. En effet, les multiples chaînes de poly-Ubiquitine qui sont retrouvées dans les cellules sont autant de signaux spécifiques associés à des voies de signalisation particulières. Les recherches effectuées, et celles qui continuent d'être menées sur cette modification post-traductionnelle, servent de cadre de référence aux nombreux chercheurs œuvrant à la compréhension des mécanismes à la source du fonctionnement d'autres Ublps, tel que SUMO.

## 4 La SUMOylation

Identifié au courant des années quatre-vingt dix par différents groupes, SUMO1 [168] aussi baptisé PIC1 (*PML-Interacting Clone1*) [169] UBL1 (*UBiquitin-Like1*) [170], sentrin [171], GMP1 (*GAP-Modifying Protein1*) [172] fût caractérisé comme un polypeptide de la famille de l'Ubiquitine modifiant de façon réversible les protéines. Sa découverte fût rapidement suivie par la caractérisation de trois autres polypeptides de même nature chez l'humain (SUMO2, -3 et -4) et de différentes activités enzymatiques spécifiques et essentielles à son couplage covalent sur des protéines cibles. À ce jour, on compte une seule enzyme d'activation E1, constituée d'un hétéro-dimère formé des sous-unités SAE1 et SAE2 (*SUMO-Activating Enzyme 1 et 2*) (aussi connues sous le nom de AOS1 pour *Activator Of SUMO1* et UBA2 pour *UBiquitin-like Activating2*) [173-176], une enzyme de conjugaison E2 (UBE2I/UBC9 pour *UBiquitin-cojugating enzyme E2I/UBiquitin Conjugating9*) [173,177-179], ainsi que plusieurs iso-peptidases de la famille des SENPs (*SENtrin-specific Proteases*) [180,181]. Une quatrième classe d'enzymes, les ligases E3, non essentielles mais facilitant grandement le processus de SUMOylation *in vitro*, a été identifiée par la suite [182-187]. Ainsi, les mêmes classes d'enzymes sont retrouvées dans les processus de couplage de SUMO et de l'Ubiquitine.

Cependant, à la lumière des recherches qui continuent de s'effectuer, quelques différences se dessinent entre les processus d'Ubiquitination et de SUMOylation. Tout d'abord, et comparativement à la multitude de ligases E3 pour l'Ubiquitine connues, très peu de ligases E3 pour SUMO ont été caractérisées. En effet, la présence de l'enzyme d'activation, SAE1:SAE2, et de l'enzyme de conjugaison, UBC9 est suffisante pour permettre la modification *in vitro* d'un substrat par SUMO. De ce fait, alors que n'importe quel résidu lysine d'une protéine cible peut être modifié par l'Ubiquitine, un biais important existe pour la SUMOylation, puisque une proportion non négligeable de protéines modifiées par SUMO, l'est sur un résidu lysine faisant partie d'un consensus [188]. Cette caractéristique pourrait directement dépendre de UBC9, la seule enzyme de conjugaison pour SUMO, caractérisée à ce jour. De plus, contrairement à l'Ubiquitine qui cible toutes les protéines de la cellule, la majorité des protéines ciblées par la SUMOylation se

retrouvent dans le noyau des cellules [189]. Ceci indique que la SUMOylation pourrait être un processus majoritairement nucléaire. D'autre part, les fonctions associées à la SUMOylation ne sont pas forcément similaires à celles qui sont reliées à l'Ubiquitination des protéines. Ces caractéristiques font de la SUMOylation un processus à part entière, bien qu'il reste apparenté au processus d'Ubiquitination pour ce qui attrait à son mécanisme de conjugaison.

La prochaine section (4.1) traite des caractéristiques principales des protéines SUMOs.

## 4.1 La famille des protéines SUMOs

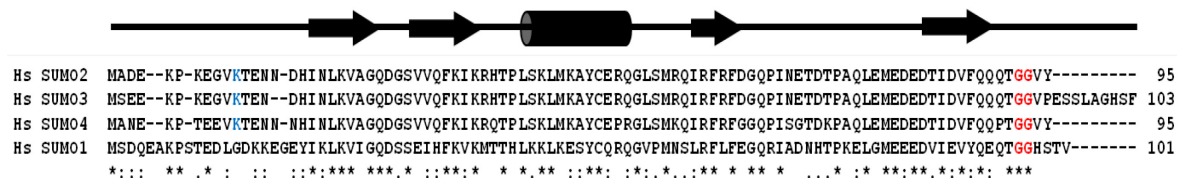
SUMO est présent chez tous les eucaryotes suggérant des rôles fonctionnels soumis à une pression évolutive [190]. Contrairement à l'Ubiquitination où une seule protéine, l'Ubiquitine, cible des substrats, quatre protéines SUMOs (SUMO1 à SUMO4) peuvent être prises en charge par les mêmes enzymes de la voie de SUMOylation chez l'humain [191,192]. Le génome de levures ne code que pour une protéine SUMO, *Smt3* (*Suppressor of Mif Two3*, essentiel chez *S. cerevisiae*, son pendant *Pmt3* ne l'est pas chez *S. Pombe*), alors que de nombreuses protéines SUMOs sont encodées par le génome de *A.thaliana* [193] [194] [195]. Le fait de retrouver plus d'une protéine SUMO chez plusieurs organismes vivants reflète possiblement des fonctions spécialisées pour certaines d'entre elles.

### 4.1.1 Caractéristiques des protéines SUMOs

La structure tridimensionnelle des protéines SUMOs est très similaire à celle de l'Ubiquitine (**Figure 3**). Néanmoins une extension amino-terminale de quinze à vingt résidus est présente chez les protéines SUMOs humaines comme chez celles de levures [196,197]. Cette extension semble fonctionnellement importante puisqu'elle est notamment essentielle au développement embryonnaire de *D. rerio* [198].

En se basant sur le pourcentage d'identité de séquences (46% entre SUMO1 et SUMO2, 47% entre SUMO1 et SUMO3, 41% entre SUMO1 et SUMO4, 86% entre SUMO2 et SUMO3, 86% entre SUMO2 et SUMO4 et 76 % entre SUMO3 et SUMO4), les

protéines SUMOs sont classées en 2 sous-familles chez l'humain: SUMO1, SUMO2/3/4 (Figure 24).



**Figure 24** : Aligment des séquences primaires de SUMO1, SUMO2, SUMO3 et SUMO4.

Le motif di-glycine exposé après l'étape de maturation est coloré en rouge. SUMO2, SUMO3 possèdent dans leur extension amino-terminale un site de SUMOylation consensus (résidu lysine K11, coloré en bleu). Les éléments de structures secondaires sont représentés au dessus de l'alignement par une flèche (brin  $\beta$ ) et un cylindre (hélice  $\alpha$ ). Le degré de conservation des résidus est indiqué par (\*) pour les résidus identiques, par (:) pour les résidus fortement similaires et par (.) pour les résidus faiblement similaires.

Bien que ces sous-familles dépendent du même processus de couplage, il semble qu'elles soient régulées différemment, s'expriment dans des tissus distincts, se conjuguent sur des substrats distincts, et aient des conséquences fonctionnelles pouvant être spécifiques [199-202]. Cependant, une certaine redondance existe dans certaines des fonctions des protéines SUMO, puisque la perte seule de SUMO1, par suppression de son gène (*knockout*), n'est létale ni chez *M. musculus* ni chez *D. rerio* [198,203,204]. Néanmoins, les protéines SUMOs 1, 2 et 3 sont toutes trois indispensables pour le développement embryonnaire adéquat de *D. rerio* [198]. D'autre part, alors que SUMO1 se retrouve principalement sous forme conjuguée, les protéines SUMO2/3 semblent majoritairement libres et sont donc considérées comme des réservoirs pour la SUMOylation de protéines lors de différents stress cellulaires [199,205]. La protéine SUMO4 est majoritairement retrouvée exprimée dans le rein. De plus, il semble qu'une corrélation existe entre le diabète de type 1 et l'expression d'un mutant de SUMO4 (SUMO4 M55V) résultant d'un polymorphisme d'un seul nucléotide [206,207]. En outre, et contrairement à SUMO1, les protéines SUMO2/3 et 4 présentent dans leur séquence un résidu lysine pouvant être modifié par SUMOylation. Des chaînes de poly-SUMO2/3 peuvent donc être générées

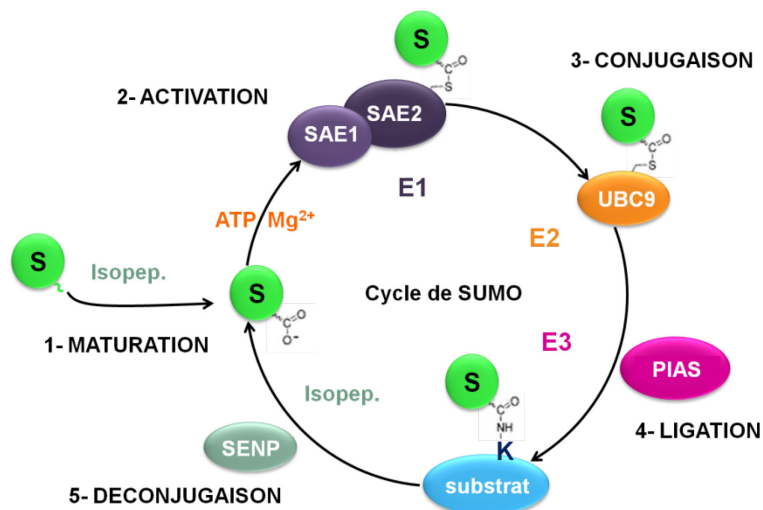
[208]. Des chaînes de poly-SUMOs ont aussi été identifiées pour les SUMO de levures suggérant des rôles fonctionnels possiblement importants pour les chaînes de SUMO au cours du cycle cellulaire [209,210]. Comme toutes autres protéines, les SUMOs sont des cibles de plusieurs modifications post-traductionnelles. Plusieurs études ont identifié des sites de phosphorylation, d'Ubiquitination et d'acétylation pour SUMO1 comme pour SUMO2/3 [211-213]. Bien que les fonctionnalités de ces modifications post-traductionnelles des protéines SUMO ne soient que partiellement comprises, ces dernières semblent influencer différenciellement le métabolisme de chacune des protéines SUMOs.

La prochaine section (4.2) offre un aperçu des étapes du processus de SUMOylation.

## 4.2 Le cycle de SUMO

Le cycle de conjugaison des protéines SUMOs ressemble fortement à celui de l'Ubiquitine (**Figure 25**) [214]. Ainsi, avant d'aboutir à la modification d'un résidu lysine spécifique d'une protéine cible, les protéines SUMO sont prises en charge par une série d'activités enzymatiques distinctes qui leur sont spécifiques. Alors que trois différentes étapes sont généralement essentielles au processus d'Ubiquitination (activation par l'enzyme E1, conjugaison par l'enzyme E2 et ligation par l'enzyme E3), seulement deux sont requises pour la SUMOylation de résidus lysine spécifiques des protéines cibles, c'est à dire l'activation par l'enzyme E1, SAE1:SAE2 et la conjugaison par l'enzyme E2, UBC9. Même si les enzymes de ligation E3 ne sont pas indispensables à la SUMOylation *in vitro*, différentes familles d'enzymes de ligation E3 facilitent ce processus autant *in vitro* qu'*in vivo* [91,215-217]. Une étape préliminaire de maturation des protéines SUMO, effectuée par les iso-peptidases de la famille SENP, est requise pour leur entrée dans le processus de SUMOylation. Ainsi, tout comme l'Ubiquitine, les protéines SUMO sont prises en charge par une série d'enzymes spécialisées qui assurent leur conjugaison.





**Figure 25 :** Le cycle de SUMO.

Une étape préliminaire consiste en la maturation de SUMO par des isopeptidases de la famille des SENPs, aboutissant au clivage de résidus C-terminaux (4, 2 et 11 pour SUMO-1,-2 et -3, respectivement), et à l'exposition d'un motif di-glycine. Au cours de l'étape 1, le SUMO mature est adénylé par le complexe d'activation (E1) SAE1:SAE2 en présence d'ATP et de Mg<sup>2+</sup>; un lien thioester est formé avec la cystéine catalytique de SAE2. Durant l'étape 2, SUMO est transféré à la cystéine catalytique de l'enzyme de conjugaison (E2) UBC9, qui catalyse la conjugaison de SUMO directement sur le substrat, par la reconnaissance de motifs consensus de sumoylation (ΨKxE) contenant le résidu lysine accepteur, ou bien est aidée par des enzymes de ligation (E3) qui facilitent le transfert de SUMO sur le substrat cible au moyen de différents mécanismes (étape 3). Finalement, l'étape 4 de déconjugaison est prise en charge par les iso-peptidases SENP, permettant possiblement le recyclage du SUMO.

### 4.3 Les enzymes impliquées dans la SUMOylation des protéines

Cette section présente les enzymes impliquées dans le processus de SUMOylation ainsi que leurs caractéristiques et leurs régulations.

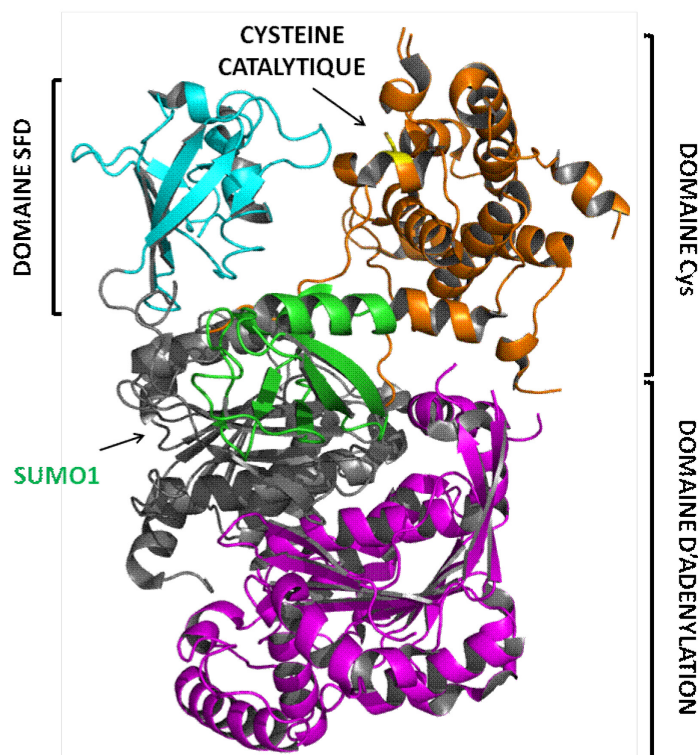
#### 4.3.1 SAE1:SAE2, l'enzyme d'activation E1 pour SUMO

Contrairement au processus d'Ubiquitination dans lequel deux enzymes E1 (UBA1 et UBA6) activent l'Ubiquitine et accomode plus de vingt enzymes de conjugaison E2, le processus de SUMOylation fait appel à une seule enzyme E1 (SAE1:SAE2) qui prend en

charge une seule enzyme de conjugaison E2 (UBC9). En outre, l'enzyme E1 (SAE1:SAE2) peut activer les trois protéines SUMOs (SUMO1, 2 et 3) [174,208]. En effet, les résidus des protéines SUMOs nécessaires à la reconnaissance par l'enzyme d'activation SAE1:SAE2 sont conservés dans les trois SUMOs.

#### 4.3.1.1 Organisation structurelle et processus d'activation

Bien que l'enzyme d'activation E1 pour SUMO soit un hétéro-dimère composé de deux sous-unités SAE1 et SAE2, son organisation structurelle est similaire à celle des autres enzymes d'activation E1 qui ne sont pas nécessairement des hétéro-dimères [36]. La sous-unité SAE1 englobe une partie du domaine d'adénylation alors que la sous-unité SAE2 regroupe la partie, dite, active du domaine d'adénylation ainsi que les domaines catalytique (Cys) et SFD (*SUMO-Fold Domain*) (**Figure 26**). La mécanistique du processus d'activation de SUMO semble en tout point identique à celle des autres Ublps comme l'Ubiquitine et NEDD8. En effet, après sa maturation, SUMO est adénylé en présence de d'ATP et de  $Mg^{2+}$ . Par la suite, un lien thioester est formé entre SAE2 et SUMO (SAE2~SUMO) suite à l'attaque nucléophile de la cystéine catalytique (SAE2-C173) sur la partie carboxy-terminale de la protéine SUMO adénylée. Le processus d'activation s'accompagne de changements de conformations de la sous-unité SAE2 permettant le recrutement de l'enzyme de conjugaison pour SUMO, UBC9 [218] (**Figure 6**).



**Figure 26** : Modèle cristallographique du complexe entre SUMO1 et l'enzyme d'activation E1 pour SUMO, SAE1:SAE2.

SUMO1 (vert) est complexé au domaine d'adénylation formé de SAE1 (magenta):SAE2 (gris foncé). La cystéine catalytique (C173) du domaine Cys (orange) de SAE2 est colorée en jaune. Le domaine SFD (cyan) de SAE2 sert au recrutement de E2 UBC9 (PDB: 3KYC).

#### 4.3.1.2 Interactions de SAE1:SAE2 avec UBC9

L'enzyme d'activation SAE1:SAE2 recrute UBC9 via son interaction avec le domaine SFD de SAE2 [31]. Cette interaction est suivie d'un changement de conformation de SAE2 qui permet le rapprochement des sites actifs de SAE2 et UBC9. Ceci permet le transfert de SUMO, depuis la cystéine catalytique de SAE2 (C173), sur la cystéine catalytique de UBC9 (C93) [34].

### 4.3.1.3 Régulations de SAE1:SAE2

L'enzyme d'activation se situant à l'apex du processus de SUMOylation, toute interférence avec son activité altère donc les étapes subséquentes du cycle de SUMOylation.

#### 4.3.1.3.1 La régulation de l'activité de SAE2 par les ROS (*Reactive Oxygen Species*)

Le stress oxydatif contrôle de nombreuses voies de signalisation cellulaires. Le processus de SUMOylation ne semble pas échapper à cette règle. En effet, la production de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) engendre l'oxydation du résidu catalytique de SAE2, et est à l'origine de la formation d'un pont disulfure entre la cystéine catalytique de SAE2 et celle de UBC9. La formation de ce pont disulfure induit conséquemment l'inactivation du processus de SUMOylation [219].

#### 4.3.1.3.2 La régulation de l'activité de SAE1:SAE2 par l'interaction avec UBC9

Il est à noter que le processus d'activation de SUMO par SAE1:SAE2 requiert la succession d'étapes dans un ordre précis. En effet, l'activité de l'enzyme d'activation est négativement régulée par son interaction avec UBC9 si la protéine SUMO n'est pas préalablement liée au complexe SAE1:SAE2. La formation du complexe SAE1:SAE2:UBC9 inhibe donc la voie de SUMOylation [220]. Cette étude pourrait donc suggérer que les niveaux relatifs d'expression de SAE1:SAE2 et de UBC9 soient possiblement impliqués dans la modulation du processus de SUMOylation.

#### 4.3.1.3.3 La régulation de l'expression de SAE1 dans le cycle cellulaire

L'expression de SAE1 semble être régulée au cours du cycle cellulaire (phase S/G2), entraînant ainsi une régulation du niveau de SUMOylation de certaines protéines en fonction du cycle cellulaire [221].

#### 4.3.1.3.4 La SUMOylation de SAE1:SAE2 altère son interaction avec UBC9

L'enzyme d'activation est modifiée par SUMO au sein du domaine Cys de SAE2. Cette SUMOylation n'altère pas le processus d'activation puisque les étapes d'adénylation et de transfert de SUMO à la cystéine catalytique de SAE2 ne sont pas affectées. Par contre,

l'étape de transthiolation est altérée (transfert de SUMO depuis la cystéine active de SAE2 sur la cystéine active de UBC9); ceci suggère que le recrutement de UBC9 par le complexe SAE1:SAE2\*SUMO n'est pas productif, et que la voie de SUMOylation peut s'auto-inhiber [222].

#### 4.3.1.3.5 La régulation de la stabilité de SAE1:SAE2 par Gam1, une protéine virale

Un certain nombre de virus exprime des protéines qui activent la machinerie de transcription de l'hôte au profit de la réplication virale et, de façon concomitante, altèrent la formation de structures sub-nucléaires, riches en protéines SUMOs, connues sous le nom de corps nucléaires de PML [223]. Gam1 est une protéine virale encodée par l'ADN de l'adénovirus aviaire CELO (*Chicken Embryo Lethal Orphan*) qui interagit avec SAE1. L'expression de Gam1 engendre la disparition des corps nucléaires de PML et induit la dégradation de SAE1 via la voie Ubiquitine/Protéasome. Ce processus requiert le recrutement d'une ligase E3 de la famille cullin-RING. La déstabilisation de complexe SAE1:SAE2 engendre la dégradation de SAE2 [224].

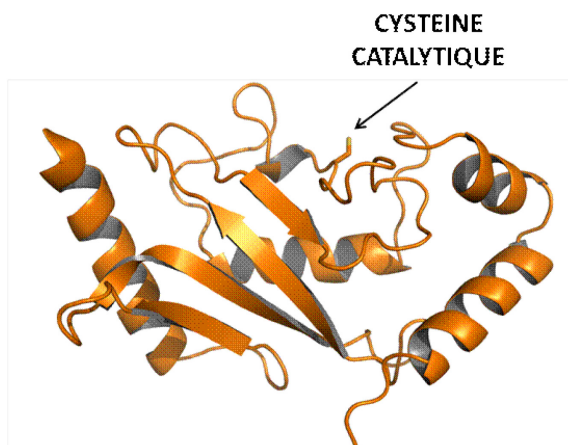
### 4.3.2 UBC9, l'enzyme de conjugaison E2 pour SUMO

Contrairement au processus d'Ubiquitination, où l'on compte près d'une trentaine d'enzymes de conjugaison, le processus de SUMOylation ne repose que sur une seule enzyme de conjugaison: UBE2I, plus communément nommée UBC9 [173,177]. Initialement impliquée dans la dégradation des cyclines S et M [225], la protéine UBC9 est conservée chez tous les organismes eucaryotes. Cette pression évolutive indique qu'UBC9 exercerait des fonctions indispensables dans la plupart des espèces eucaryotes. D'ailleurs, UBC9 est essentielle chez la levure, *S. cerevisiae* [226], comme chez *M. musculus*, où la suppression de son gène entraîne une létalité à un stade précoce du développement [227,228].

#### 4.3.2.1 Le domaine UBC de UBC9

UBC9 présente un domaine catalytique, UBC, composé d'environ cent cinquante résidus qui est structurellement similaire à celui des enzymes de conjugaison E2 de classe I pour l'Ubiquitine, c'est-à-dire sans extension amino- ni carboxy-terminale (**Figures 7, 8 et**

27) [229]. Comme chez les autres enzymes de conjugaison, on retrouve des résidus conservés entourant son site actif qui sont essentiels à l'activité catalytique de UBC9 (**Figure 27**) [47]. Ceci indique que UBC9 partage un processus catalytique qui est similaire à celui des enzymes de conjugaison E2 pour l'Ubiquitine.



**Figure 27** : Modèle cristallographique du domaine UBC de UBC9.

La position de la cystéine active de UBC9 est indiquée par une flèche (PDB:1U9B).

Bien que structurellement similaire aux enzymes de conjugaison E2 pour l'Ubiquitine, le domaine UBC de UBC9 présente une surface électrostatique qui est distincte de ces dernières [230]. Cette particularité explique fort probablement les spécificités d'interactions entre UBC9 et ses partenaires impliqués dans le processus de SUMOylation (l'enzyme d'activation E1, SAE1:SAE2, les enzymes de ligation E3 et les protéines SUMOs), ainsi que la reconnaissance spécifique des sites consensus de SUMOylation au sein des substrats protéiques [231]. Il a d'ailleurs été démontré que certains résidus, entourant le site actif de UBC9 (C93), sont impliqués dans la reconnaissance du site consensus de diverses protéines [232].

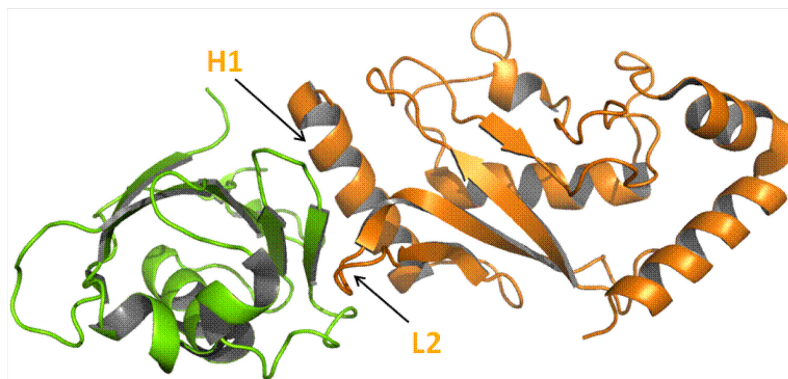
#### 4.3.2.2 Les partenaires d'interaction de UBC9

UBC9 sert de protéine intermédiaire dans le processus de SUMOylation. Ainsi, elle doit pouvoir interagir séquentiellement avec l'enzyme d'activation SAE1:SAE2, située plus en amont, et avec les différentes enzymes de ligation situées en aval de la voie de

SUMOylation. Cette section introduit les différents partenaires d'interactions de UBC9 (les enzymes d'activation E1, de ligation E3 et SUMO).

#### 4.3.2.2.1 *L'interaction de UBC9 avec son enzyme d'activation SAE1:SAE2*

Tel que mentionné précédemment, UBC9 est recrutée par le domaine SFD de SAE2; cette interaction est indispensable au processus de transthiolation ( $E1\sim SUMO + UBC9 \rightarrow E1 + UBC9\sim SUMO$ ) [31]. La structure du complexe UBC9:SAE2-SFD n'a pas été structurellement caractérisée, mais des données structurales concernant son pendant chez la levure (Ubc9:Uba2-SFD) ont été obtenues. Ainsi, la surface de Ubc9 impliquée dans cette interaction comprend les résidus exposés et composant l'hélice  $\alpha 1$  ainsi que ceux de la boucle L2 (**Figure 28**) [233]. Compte tenu des similarités de séquences et de structures entre les protéines de levure et les protéines humaines, le même type d'interaction devrait se produire entre les protéines UBC9 et SAE2-SFD chez l'humain.



**Figure 28** : Modèle cristallographique du complexe Ubc9:Uba2-SFD.

Ubc9 (orange) en complexe avec le domaine SFD de Uba2 (vert). Les positions de l'hélice  $\alpha 1$  (H1) et de la boucle 2 (L2) de UBC9 sont indiquées par des flèches (PDB:3ONG).

Ce mécanisme de recrutement semble en tout point similaire à celui des autres enzymes de conjugaison E2 [35]. Ceci suggère que des stratégies de reconnaissance similaires sont employées lors de la reconnaissance E1:E2 pour les différentes machineries d'Ublps. Cependant, il est à noter que dans le modèle actuel, où UBC9 est recrutée par le domaine SFD de SAE2, les cystéines catalytiques de UBC9 et SAE2 sont distantes de plus de 60 Å. Ceci suggère que d'importants changements de conformations du complexe E1:E2 accompagnent le processus de transthiolation.

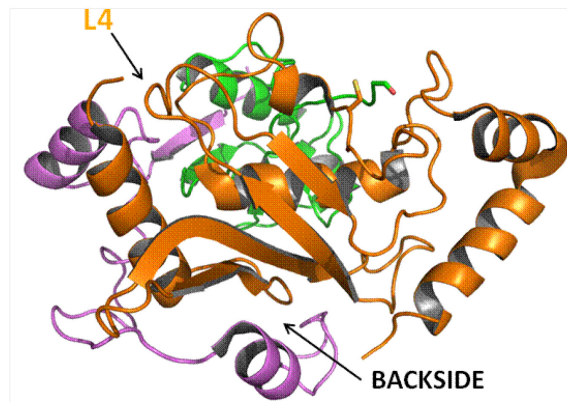
#### 4.3.2.2.2 *L'interaction de UBC9 avec les enzymes de ligation E3*

Les connaissances concernant l'interaction entre UBC9 et ses enzymes de ligation E3 restent encore parcellaires. Cela s'explique, en partie par le fait que ces dernières ne sont pas indispensables au processus de SUMOylation, même si elles le facilitent. À ce jour, et contrairement au processus d'Ubiquitination, peu d'enzymes de ligation E3 pour SUMO ont été caractérisées. Les mieux caractérisées sont RanBP2 (*Ran Binding Protein2*) et les membres de la famille Siz/PIAS. Les études qui suivent, mettent en évidence les nombreux parallèles structuraux qu'il est possible de faire pour les interactions E2:E3 entre les machineries de SUMOylation et d'Ubiquitination, cette dernière servant de modèle car étant la mieux caractérisée.



- Interaction UBC9:RanBP2

Les seules données structurales disponibles d'un complexe entre UBC9 et une enzyme de ligation E3 proviennent d'études caractérisant l'activité de ligase E3 de RanBP2 en complexe avec RanGAP1 (*Ran GTPase-Activating Protein1*) [59]. RanGAP1 et RanBP2 font partie d'un complexe multi-protéique localisé sur la surface cytoplasmique des pores nucléaires et impliqués dans le transport nucléo-cytoplasmique [234]. RanBP2 qui ne possède ni domaine RING ni domaine HECT, contient une région (IR1-M-IR2 pour *Inverted Repeat1-Middle domain-Inverted Repeat2*) qui interagit avec UBC9~SUMO, et qui exhibe une activité de ligase E3 pour SUMO [184,215,235]. La détermination de la structure du complexe révèle que le motif IR1-M de RanBP2 contacte des résidus de la boucle L4 de UBC9, ainsi que ceux de sa région *backside* (**Figure 29**). Tel que mentionné précédemment (section 3.4.2.2.1 **Figures 9 et 10** et section 3.4.3.4.2 **Figure 19**), des régions similaires des enzymes E2 pour l'Ubiquitine interagissent avec leur enzymes E3 respectives. Ceci indique que pour lier une ligase E3, UBC9 utilise des surfaces d'interaction similaires aux autres enzymes de conjugaison E2.



**Figure 29** : Modèle cristallographique du complexe RanBP2 IR1-M:UBC9~SUMO1.

RanBP2 IR1-M (violet) en complexe avec UBC9 (orange) et SUMO1 (vert) en second plan. Les positions du *backside* (BACKSIDE) et de la boucle 4 (L4) de UBC9 sont indiquées par des flèches (PDB:1Z5S).

- Interaction UBC9:Siz1/PIAS

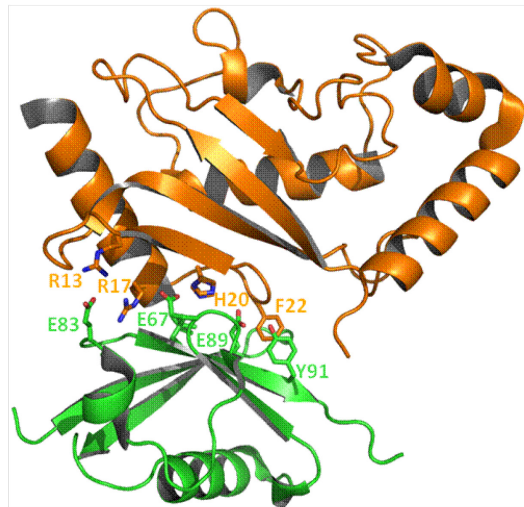
Plusieurs études ont identifié une interaction entre UBC9 et différents membres de la famille Siz/PIAS [186,236,237]. Les protéines PIAS, initialement identifiées comme co-régulateurs des facteurs de transcription STATs (*Signal Transducer and Activated of Transcription*), ont par la suite été caractérisées comme ligases E3 pour SUMO; elles ciblent une panoplie de protéines (différents récepteurs nucléaires, les protéines STATs, p53, etc...) [185,238,239]. Une interaction directe entre UBC9 et le domaine SP-RING de différents membres de la famille Siz/PIAS a été déterminée [183,186]. Compte tenu de la similarité de structures des domaines SP-RING et RING, il est probable que l'organisation tridimensionnelle du complexe UBC9:E3 SP-RING soit similaire à celles des complexes canoniques E2:E3 RING pour l'Ubiquitine (**Figures 18 et 19**).

#### 4.3.2.2.3 L'interaction non-covalente de UBC9 avec SUMO

Tout comme l'Ubiquitine est reconnue par ses enzymes de conjugaison E2, SUMO interagit avec UBC9.

Une interaction non-covalente entre UBC9 et les différentes protéines SUMO a été caractérisée. Similairement à l'Ubiquitine qui interagit avec la région *backside* de certaines

de ses enzymes de conjugaison E2, les protéines SUMOs interagissent avec la région *backside* de UBC9 [240-242] (**Figures 12 et 30**). Cette interaction, conservée pour différentes espèces, est relativement forte puisque la constante d'affinité ( $K_D$ ) du complexe UBC9:SUMO1 est de l'ordre de la centaine de nano-molaires [65,243]. L'interaction non-covalente UBC9:SUMO régule l'activité de UBC9 et la formation de chaînes de poly-SUMO2/3 *in vitro* par un mécanisme moléculaire qui reste à déterminer [65,244,245]. Ces données indiquent des mécanismes de fonctionnement similaires entre UBC9 et certaines des enzymes de conjugaison E2 pour l'Ubiquitine.



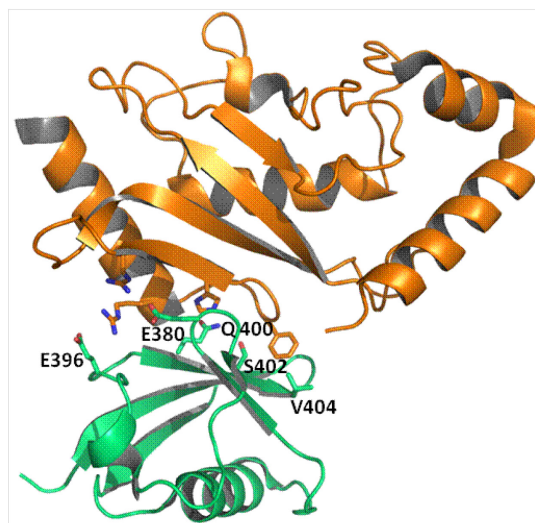
**Figure 30** : Modèle cristallographique du complexe UBC9:SUMO1.

UBC9 (orange) en complexe avec SUMO1 (vert). Les résidus de UBC9 et SUMO1 impliqués dans l'interaction sont représentés et numérotés (PDB:2UYZ).

#### 4.3.2.2.4 *L'interaction de UBC9 avec les protéines contenant des SLDs (SUMO-Like Domains)*

Au même titre que certaines protéines présentent des ULDs (*Ubiquitin-Like Domains*), plusieurs protéines intègrent dans leur séquence des SLDs qui leur permettent d'interagir avec UBC9 comme illustré par les exemples suivants.

Ainsi, UBC9 peut interagir avec NIP45 (*NFAT-Interacting Protein45*), une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN qui contient deux SLDs. Cette interaction de UBC9 avec le domaine SLD2 de NIP45 inhibe la capacité de UBC9 à former des chaînes des poly-SUMO2/3 [246]. Ceci suggère que la surface de UBC9 impliquée dans l'interaction avec un domaine SLD et avec SUMO est similaire. D'autre part, l'interaction de Ubc9 avec le domaine SLD2 de Rad60 (*Radiation protein60*), homologue de NIP45 chez la levure *S. pombe*, est essentielle à la fonction de Rad60 dans la réparation de l'ADN [247]. La résolution des complexes UBC9:NIP45<sub>SLD2</sub> et Ubc9:Rad60<sub>SLD2</sub> par des études cristallographiques révèle que c'est la surface *backside* de UBC9 qui est impliquée dans ces interactions. De plus, la surface des SLDs qui reconnaît UBC9 présente des caractéristiques similaires (chimique et structurale) à celle des protéines SUMOs recrutant UBC9 (**Figure 31**). Ceci indique que des déterminants moléculaires très similaires dictent les interactions non covalentes UBC9:SUMO et UBC9:SLD. A ce jour, Les bases moléculaires permettant à UBC9 de discriminer entre ces deux partenaires (SUMO et un domaine SLD) ne sont pas connues. Il est à noter que de façon similaire, des domaines ULDs ont été caractérisés dans plusieurs protéines associées à l'Ubiquitination et à la dé-Ubiquitination des protéines [127,128,248,249].



**Figure 31** : Modèle cristallographique du complexe Ubc9:Rad60<sub>SLD2</sub>.

Ubc9 (orange) en complexe avec le domaine SLD2 de Rad60 (vert). Les résidus de Ubc9 et du domaine SLD2 de Rad60 impliqués dans l'interaction sont représentés, ceux du domaine SLD2 de Rad60 sont numérotés (PDB:3RCZ).

#### 4.3.2.3 Régulations de UBC9

Différents types de modifications ciblent UBC9 et modulent ainsi son activité et ses interactions. Les prochaines sections présentent les différents modes de régulation de UBC9 qui sont connus à ce jour.

##### 4.3.2.3.1 La régulation de l'activité de UBC9 par les ROS

Comme mentionné précédemment dans la section 4.3.1.3.1, la production de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) engendre l'oxydation de la cystéine catalytique de UBC9, comme celle de l'enzyme d'activation, SAE2, et est à l'origine de l'inactivation du processus de SUMOylation [219].

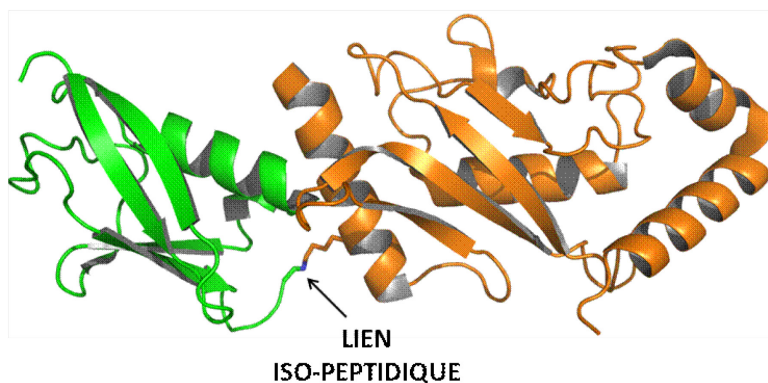
##### 4.3.2.3.2 La régulation de l'activité de UBC9 par la phosphorylation

Une étude a récemment déterminé que l'expression de CDK1 (*Cyclin Dependent Kinase I*), une kinase importante dans la transition G1/S du cycle cellulaire, est significativement augmentée dans différents cancers. Cette induction de l'expression de CDK1 se corrèle avec une hyper-phosphorylation de UBC9 dans ces mêmes cancers. Cette

phosphorylation touche le résidu sérine S71 de la boucle L4 de UBC9 [250]. Des études *in vitro* ont par la suite démontré que la phosphorylation de UBC9 par CDK1 régule positivement le processus de transthiolation, ainsi que l'activité de catalytique de UBC9 [251]. En outre, la modélisation des complexes UBC9:PIAS et Ubc9:Siz1 suggère que la phosphorylation de UBC9 sur ce résidu sérine pourrait moduler aussi son interaction avec le domaine SP-RING des protéines PIAS/Siz.

#### 4.3.2.3.3 La régulation des interactions de UBC9 par la SUMOylation

Récemment, l'auto-SUMOylation de UBC9 a été mise en évidence. Celle-ci cible la lysine K14 qui se situe au sein de l'hélice  $\alpha 1$ ; l'interface de UBC9 impliquée dans l'interaction avec SAE1:SAE2 (**Figure 32**). De façon intéressante, la SUMOylation de UBC9 survenant sur le résidu lysine K14 ne semble pas altérer son interaction avec SAE1:SAE2, puisqu'elle n'affecte pas le processus de transthiolation. Par contre, celle-ci régule sa capacité à modifier des protéines cibles. Cependant, cette régulation n'est pas conservée au cours de l'évolution, puisque la protéine Ubc9 de levure n'est pas modifiée sur ce résidu [79].



**Figure 32** : Modèle cristallographique du complexe UBC9\*SUMO1.

UBC9 (orange) est modifiée sur sa lysine 14 par SUMO1 (vert) (PDB: 2VRR). (\*) signifie un lien covalent iso-peptidique.

### 4.3.3 Les enzymes de ligation E3 pour SUMO

Cette section présente la dernière classe d'enzyme, les enzymes de ligation E3, intervenant juste avant la modification du substrat par les protéines SUMOs. Les principales familles d'enzymes de ligation E3 ainsi que les propriétés les caractérisant sont abordées. Une emphase est mise sur les ligases E3 de la famille PIAS. En effet, en plus d'être une famille de protéines conservées au cours de l'évolution, ce sont les seules ligases E3 possédant un domaine SP-RING, lequel contacte UBC9. Ces caractéristiques en font des protéines qui présentent le plus de similitudes avec les ligases E3 à domaine RING pour l'Ubiquitine, la plus grande classe de ligases E3 pour l'Ubiquitine.

Comme préalablement mentionné, contrairement au processus d'Ubiquitination, une des singularités de la SUMOylation réside dans le fait qu'un substrat protéique peut être modifié par SUMO sans nécessiter l'intervention d'activités ligases E3 [176]. Cependant, la cinétique de SUMOylation d'une protéine est toujours accélérée par la présence d'une enzyme de ligation E3 pour SUMO [168,185]. Cette particularité a rendu la caractérisation de ces enzymes plus difficile; ce sont d'ailleurs les dernières enzymes du processus de SUMOylation à avoir été identifiées. Telles les ligases E3 pour l'Ubiquitine, elles recrutent le complexe UBC9~SUMO, ainsi que le substrat, et facilitent le processus de modification de ce dernier [59,235,252-254].

A ce jour, et comparativement au processus d'Ubiquitination, moins de dix ligases E3 pour SUMO ont été caractérisées chez l'humain. Ainsi, contrairement au processus d'Ubiquitination, la plupart de ces ligases ne présentent que peu de spécificité pour des substrats. Ceci indique que leurs mécanismes de reconnaissance des substrats pourraient être distincts de celui des ligases E3 pour l'Ubiquitine. Il est possible de les classer en deux groupes en fonction de la présence (PIAS et Topors) ou non (PC2 et RanBP2) d'un domaine de type RING. Les caractéristiques importantes de ces enzymes sont revues ci-après.

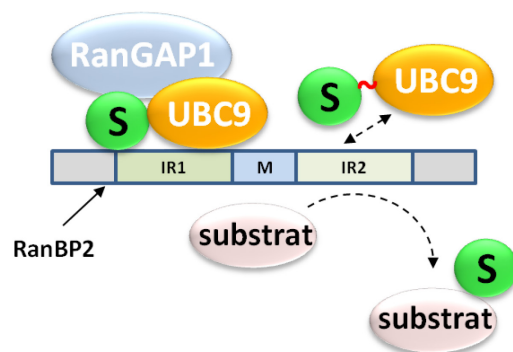
#### 4.3.3.1 RanBP2

RanBP2 (*Ran Binding Protein2*), aussi connue sous le nom de Nup358 (*Nucleoporin 358 KDa*), est une protéine uniquement présente chez les vertébrés [255].

Elle se localise sur la surface cytoplasmique des pores nucléaires, et possède une région IR1-M-IR2 (*Internal Repeat1-Middle domain-Internal Repeat2*) présentant une activité de ligase E3 pour SUMO [184]. Cette région est dépourvue de domaines RING ou HECT, classiquement retrouvés chez une ligase E3 [215]. Néanmoins chacun des motifs IR1 et IR2 interagit à la fois avec UBC9 et SUMO1, et est requis pour la SUMOylation de différentes protéines modèles *in vitro* et *in vivo* (**Figure 33**) [59,235].

Bien que la fonction ligase de RanBP2 ait fait l'objet de nombreuses études, son mécanisme d'action n'est pas encore clairement établi. Selon une récente étude, la fonction ligase E3 de la région IR1-M-IR2 nécessiterait une interaction avec deux molécules d'UBC9 fonctionnellement distinctes. Une molécule d'UBC9 ayant un rôle catalytique, tandis que l'autre molécule aurait un rôle structural, essentiel à la fonction E3 ligase du complexe [256]. RanBP2 serait impliquée dans la SUMOylation des protéines traversant l'enveloppe nucléo-cytoplasmique du cytoplasme vers le noyau cellulaire [179]. Ceci pourrait expliquer que la plupart des protéines connues pour être SUMOylées soient retrouvées dans le noyau des cellules.





**Figure 33** : Schéma du complexe UBC9:RanBP2:SUMO\*RanGAP1.

La formation du complexe IR1-M:UBC9:SUMO:RanGAP1 est important pour la fonction de ligase E3 pour SUMO du motif IR2. Adapté de Flotho A. and Werner A., *Nucleus.*, 2012; 3 (5): 287–298 [256].

#### 4.3.3.2 Pc2/Cbx4

Pc2 (*Polycomb 2*) / CBX4 (*ChromoBoX protein 4*) est une protéine nucléaire associée au complexe PRC1 (*Polycomb Repressive Complex 1*), régulant négativement l'expression de nombreux gènes durant le développement des vertébrés [257]. Comme RanBP2, Pc2 ne contient ni domaine RING ni domaine HECT, mais présente deux régions d'interaction avec UBC9 et SUMO qui sont importantes pour sa fonction de ligase pour SUMO [216,253,254]. À ce jour, Pc2 facilite la SUMOylation *in vitro* et *in vivo* de différents substrats [257].

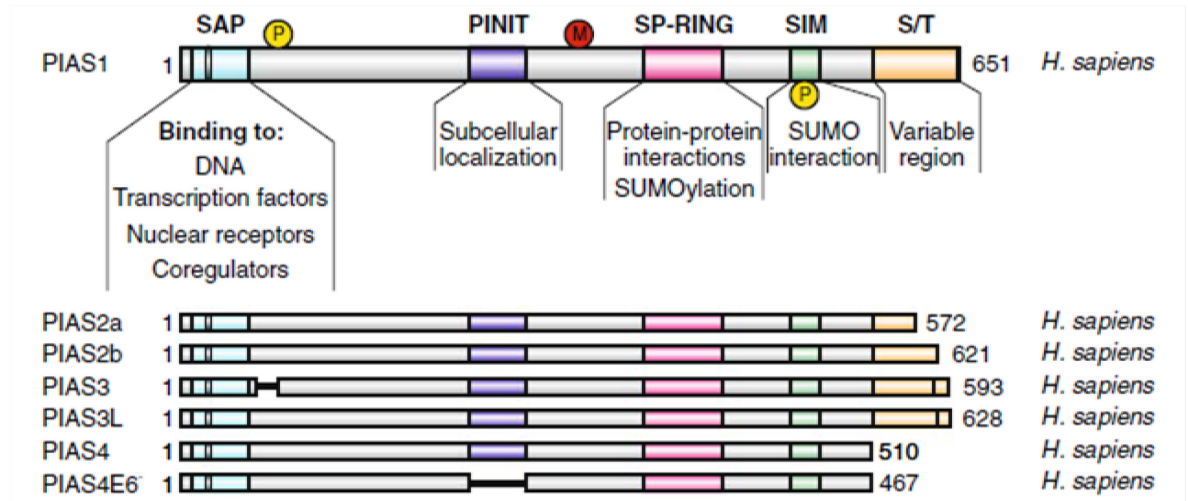
#### 4.3.3.3 Les protéines Siz/PIAS

Les protéines PIAS (*Protein Inhibitor of Activated STAT*) constituent une famille de protéines conservées chez tous les eucaryotes. Un à deux membres sont présents chez les levures (Pli1 chez *S. pombe*; Siz1, Siz2 chez *S. cerevisiae*) alors que quatre membres sont encodés par le génome humain (PIAS1-4) [258]. Initialement, les protéines PIAS ont été caractérisées comme des co-régulateurs d'une famille de facteurs de transcription, les STATs (*Signal Transducer and Activated of Transcription*), impliquée dans la régulation du système immunitaire [259]. La suppression individuelle des gènes encodant pour chacune des protéines PIAS n'est pas létale chez les mammifères comme *M. musculus* ce

qui suggère une redondance dans leurs fonctions [260-263]. Cependant, la double suppression des gènes de PIAS1 et PIAS4 est, elle, létale à un stade précoce du développement chez *M.musculus* [264].

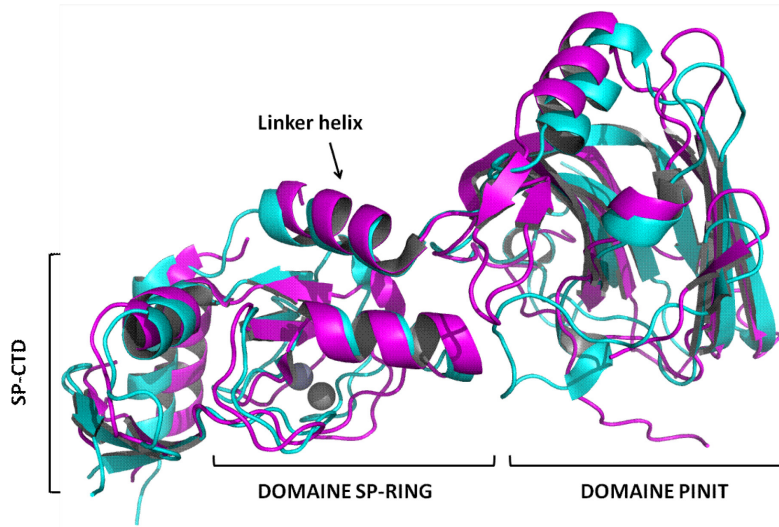
#### 4.3.3.3.1 Organisation structurelle des protéines Siz/PIAS

Tous les membres de la famille Siz/PIAS présentent une organisation structurelle similaire. Ainsi, la partie amino-terminale des PIAS très structurée est composée de trois domaines. On retrouve un domaine SAP (**S**caffold **A**ttachment **f**actor-**A/B/acinus/PIAS**) suivi d'un domaine PINIT (**P**roline **I**soleucine **a**sparagi**N**e **I**soleucine **T**hreonine) et d'un domaine SP-RING (**Siz/Protein Inhibitor of Activated STAT-RING**). Ces domaines semblent relativement bien conservés dans leur séquence comme dans leur organisation spatiale chez *S. cerevisiae* comme chez *H. sapiens*, indiquant des fonctions similaires pour les différents membres Siz/PIAS (**Figure 34 et 35**). Le domaine SAP se retrouve chez plusieurs protéines associées à la chromatine alors que les domaines PINIT et SP-RING semblent uniquement retrouvés chez les protéines PIAS [265]. Les domaines SAP et PINIT des protéines PIAS sont impliqués dans des interactions avec l'ADN et diverses protéines, alors que le domaine SP-RING est requis pour interagir avec l'enzyme de conjugaison pour SUMO, UBC9 [104,183,252,266].



**Figure 34 :** Représentations schématiques des protéines PIAS et des isoformes connues.

Le nom et la taille de chacune des protéines PIAS sont indiqués. Le domaine SAP (cyan), PINIT (mauve), SP-RING (magenta) ainsi que le motif SIM (vert) et la région variable riche en résidus sérine et thréonine S/T (orange) sont positionnés pour chacune des protéines. Les fonctions, dans lesquels ces derniers sont impliqués sont indiquées en dessous de la représentation schématique de PIAS1. Les positions des modifications post-traductionnelles de PIAS1 sont représentées. D'après Rytinki MM., *et al.*, *Cell Mol Life Sci.*, 2009; 66 (18): 3029–3041[258]



**Figure 35 :** Superposition des modèles cristallographiques de PIAS2 (*H. sapiens*) et de Siz1 (*S. cerevisiae*) (domaines PINIT et SP-RING).

PIAS2 (PDB:4FO9, magenta) et Siz1 (PDB:3I2D, cyan). Le nom des différents domaines est indiqué.

D'autre part, la partie carboxy-terminale des protéines PIAS est de longueur et de composition aléatoire mais elle inclut, invariablement, un motif d'interaction avec SUMO SIM (*SUMO Interacting Motif*). Celui-ci est conservé chez tous les membres de la famille Siz/PIAS (**Figure 36**). La présence de ce motif chez tous les membres de la famille des PIAS indique que ce dernier exerce possiblement un rôle important dans les fonctions des protéines PIAS.

Hs PIAS4	460	KPGADVVDLTL	DSSSSSEED	. . EE	492
Hs PIAS3	442	KKKV	EVIDLTI	ESSSDEEDLPPT	464
Hs PIAS2	464	KKKV	DVIDLTI	ESSSDEEEDPPA	486
Hs PIAS1	454	NKKV	EVIDLTI	DSSSDEEEEP	476
Ce Gei17	552	PADD	DIITLS	DDDEELNRGIMN	574
Sp Pli1	442	KRESL	VIDLTI	SDDENVATSTT	464
Sc Siz2	467	HNEP	EIISL	DSDDDEAFIPASKS	489
Sc Siz1	477	PSEPI	IINL	DSDDDEPNGNPHV	499
At Siz1	595	GGNNE	EVIVL	SDSDDENDLVITPG	617

**Figure 36** : Alignement des séquences SIMs et des extensions phosphorylables/acides des ligases E3 Siz/PIAS.

Les motifs d'interaction avec SUMO des protéines Siz/PIAS1 pour plusieurs espèces eucaryotes. Les résidus conservés sont colorés selon un code de couleur (jaune pour les résidus hydrophobes, rouge pour les résidus acides et mauve pour les résidus phosphorylables par CK2).

#### 4.3.3.3.2 Aperçu des fonctions associées aux protéines Siz/PIAS

Tout d'abord identifiés comme des co-régulateurs des protéines STATs ainsi que co-régulateurs pour de nombreux facteurs de transcription, les protéines PIAS furent, par la suite, caractérisées comme ligases E3 pour SUMO [182,183,185]. Dans la majorité des cas, le domaine SP-RING des PIAS est requis pour leurs fonctions de co-régulateurs ainsi que leur activité de ligase E3 pour SUMO [104,267,268]. Les protéines PIAS peuvent avoir un rôle de co-activateur ou de co-répresseur dépendant du facteur de transcription avec lequel ils interagissent. Cette activité co-régulatrice n'est pas toujours reliée à leur fonction de ligases E3, tel que mis en évidence par des études de mutation du domaine SP-RING [258]. D'autre part, des études suggèrent que certains membres des PIAS sont impliqués dans la voie de réparation l'ADN dépendant de BRCA1 [269,270].

Les protéines PIAS semblent donc être des protéines très versatiles impliquées dans de nombreux et divers complexes protéiques.

#### 4.3.3.3.3 Régulation des protéines Siz/PIAS

Les protéines PIAS sont phosphorylées par la kinase CK2 sur des sites consensus conservés et adjacents au motif d'interaction avec SUMO (**Figure 36**). Cette phosphorylation renforce leur interaction avec les protéines SUMOs et semble réguler leur

capacité de régulateur et de co-régulateur de transcription [271]. De plus, telles les ligases E3 pour l'Ubiquitine qui sont sujettes à l'auto-Ubiquitination, les protéines PIAS sont auto-SUMOylées [183]. Cependant, aucune fonction n'a encore été associée à l'auto-SUMOylation de ces ligases E3 pour SUMO.

#### 4.3.3.4 Topors

Topors (*Topoisomerase I-binding arginine/serine-rich protein*) est une protéine nucléaire possédant un domaine RING essentiel à son activité de ligase E3 pour l'Ubiquitine. Récemment, Topors a aussi été identifiée comme ligase E3 pour la SUMOylation de nombreuses protéines associées à la chromatine [217,272]. Ainsi, Topors est, à ce jour, la seule ligase E3 possédant à la fois les activités de ligase E3 pour l'Ubiquitine et pour SUMO. Cependant, il est à noter que le domaine RING de Topors n'est pas requis pour son activité de ligase E3 pour SUMO [217]. Néanmoins, comme pour les différentes E3 pour SUMO, Topors interagit avec UBC9 et aussi avec SUMO [273]. Les recherches actuelles n'ont pas encore établi le rôle des régions d'interaction de Topors avec UBC9 et SUMO dans sa fonction de ligase E3 pour SUMO.

Bien que structurellement différentes, toutes les protéines caractérisées comme ligases E3 pour SUMO présentent plusieurs dénominateurs communs: 1) elles recrutent UBC9, 2) elles favorisent la modification de substrats par SUMO et 3) elles interagissent toutes avec SUMO de manière covalente et/ou non covalente. Ainsi, toutes les protéines abordées dans cette section possèdent au moins un motif d'interaction avec SUMO (SIM). Ceci suggère qu'une des conditions *sine qua non* pour présenter une activité ligase pour SUMO et d'arbore un motif d'interaction avec SUMO. Ce concept pourrait bien s'étendre aux ligases de d'autres Ublps. Ainsi, on retrouve des motifs/domaines d'interaction avec l'Ubiquitine parmi des ligases E3 pour l'Ubiquitine [88,161,163].

#### 4.3.4 Les SENPs, enzymes de déconjugaison pour SUMO

Comme l'Ubiquitination, la SUMOylation est un processus réversible. Ce sont les protéines de la famille des SENPs (*SENP* *specific Proteases*) qui participent à la

déconjugaison des protéines SUMO de leur substrat [274]. Alors que certains des membres de la famille SENP déconjuguent aussi bien SUMO1 que SUMO2/3 (SENP1 et 2) de leur substrats, d'autres exhibent une préférence pour la déconjugaison de SUMO2/3 (SENP3 et 5) [202,275,276]. En plus de déconjuguer les protéines SUMOs de leurs substrats, les SENP remplissent au moins deux autres fonctions. D'une part, elles participent au processus de maturation des protéines SUMOs. Ainsi, par le clivage de résidus situés en carboxy-terminal du motif diglycine des protéines SUMOs, les SENPs permettent l'activation de ces dernières [277,278]. D'autre part, certains membres semblent servir dans l'édition des chaînes de poly-SUMO2/3 [279].

## 4.4 Les sites de modification des protéines par SUMO

Cette section aborde en détail une des spécificités de la SUMOylation: le site de SUMOylation consensus. Les principales caractéristiques ainsi que les régulations du site de SUMOylation consensus seront présentées.

Ainsi, peu de temps après la caractérisation des enzymes impliquées dans le processus de SUMOylation, un site consensus pour la SUMOylation a pu être défini [188]. Ce dernier a été caractérisé pour un très grand nombre de substrats. En ce sens, la SUMOylation diffère de l'Ubiquitination qui, elle, peut cibler n'importe quel résidu lysine d'une protéine. Outre le site consensus canonique, des variations de ce site incluent une extension hydrophobe, une extension acide ou bien la présence d'un résidu sérine ou thréonine qui lorsque phosphorylé participe à la SUMOylation (**Figure 37**).

### 4.4.1 Site de SUMOylation consensus

Dans la majorité des cas, la modification par SUMO d'un résidu lysine s'effectue si celui-ci se trouve au sein d'un motif ou site consensus spécifique qui correspond au consensus canonique  $\Psi K x E/D$  (**Figure 37, CM**).  $\Psi$  correspond à un résidu hydrophobe (généralement V, L ou I mais qui peut aussi être F, M, C, A ou P), K est le résidu lysine ciblé, x correspond à n'importe quel résidu et E/D est un résidu acide (généralement un acide glutamique mais qui peut aussi être un acide aspartique) [188]. Plusieurs algorithmes de prédiction de sites de SUMOylation consensus au sein d'une protéine donnée ont été

conçus dans le but de faciliter leur identification [280-282]. Cependant, le contexte seul du consensus n'est pas suffisant pour valider un site de modification. En effet, certaines protéines, qui possèdent ce consensus, ne sont pourtant pas modifiées par SUMO sur ce site [78]. En effet, pour obtenir une SUMOylation adéquate, des critères structuraux rentrent aussi en ligne de compte.

CM	ΨKxE/D
ICM	E/DxKΨ
HCSM	ΨΨΨKxE
NDSM	ΨKxEExxEEEE
PDSM	ΨKxE/DxxSP
pSuM	ΨKxS

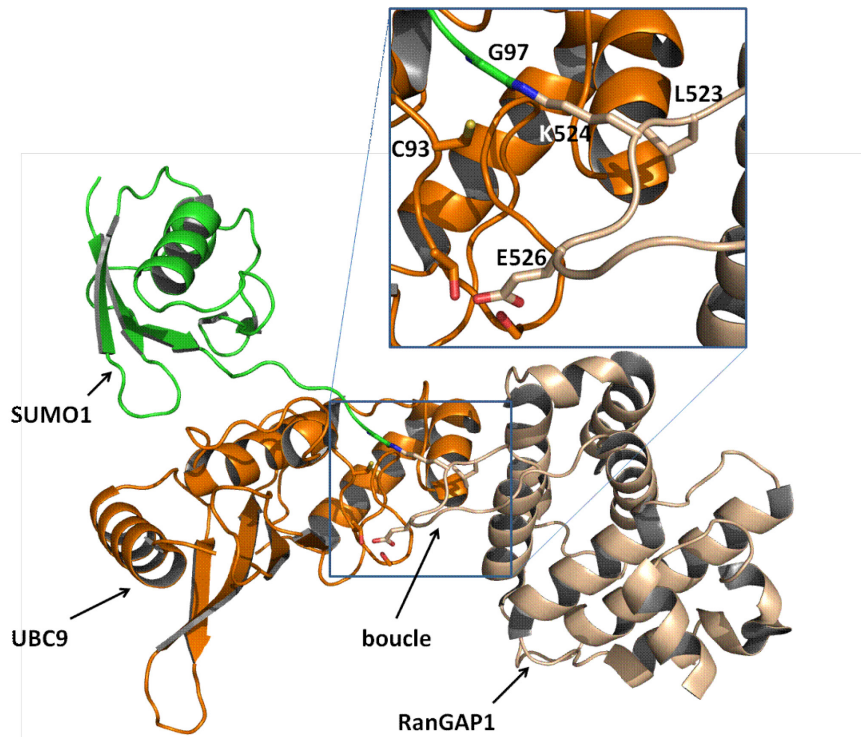
**Figure 37** : Les différents motifs de SUMOylation.

Les résidus du motif consensus sont colorés en fonction de leur nature. Résidu hydrophobe (Ψ), lysine (K, bleu), acide (E/D, rouge) et sérine phosphorylable (S, magenta). x représente n'importe quel résidu. CM: *Consensus Motif*, ICM: *Inverted Consensus Motif*, HCSM: *Hydrophobic Cluster SUMO Motif*, NDSM: *Negatively charged amino-acid-Dependent SUMO Motif*, PDSM: *Phosphorylation-Dependent SUMO Motif* et pSuM: *phosphorylated SuMOylation Motif*. Les séquences sont orientées de l'extrémité amino-terminale vers l'extrémité carboxy-terminale. Adapté de Da Silva-Ferrada E., *et al.*, *Biochem Res Int.*, 2012; 2012: 875148 [283].

Suite à la détermination de la structure du complexe ternaire UBC9:RanGap1\*SUMO1 (\* signifiant un lien iso-peptidique entre SUMO1 et le résidu lysine K524 du substrat RanGAP1), les principales caractéristiques structurales d'un site consensus de SUMOylation ont pu être déterminées et vérifiées par la suite chez d'autres protéines (**Figure 38**) [284]. Ainsi, afin d'être modifié par SUMO, le site de SUMOylation consensus du substrat doit généralement faire partie d'une région non-structurée ou d'une boucle. Les résidus lysine et acide du consensus sont exposés au solvant, et donc susceptibles d'être spécifiquement reconnus par UBC9. De plus, une interaction a pu être déterminée entre plusieurs sites consensus de différentes protéines et certains résidus de



UBC9 [231]. Ainsi, il est suggéré que ce sont les résidus entourant le site actif de UBC9 qui dictent, en partie, la reconnaissance de la séquence consensus de SUMOylation.



**Figure 38** : Modèle cristallographique du complexe UBC9:RanGAP1\*SUMO1.

Lien iso-peptidique (\*) entre le résidu lysine (K524) de RanGAP1 (beige) et le résidu glycine (G97) de SUMO1 (vert) en complexe avec UBC9 (orange). La cystéine catalytique (C93) de UBC9 ainsi que les résidus leucine (L523) et acide glutamique (E526) du site consensus de SUMOylation (LKSE) de RanGAP1 sont représentés. PDB:1Z5S.

Récemment, des sites consensus alternatifs ont été déterminés (**Figure 37**). Tout d'abord, une approche par spectrométrie de masse a identifié deux types de sites pour plusieurs substrats de SUMO2 [285]. Le premier type de site correspond en tout point au site consensus classique, mais en position inversée (ICM pour *Inverted Consensus Motif*). Ceci suggère que l'orientation du site consensus n'est pas nécessaire à sa reconnaissance adéquate par UBC9. Le deuxième type de site contient une séquence (*stretch*) de résidus hydrophobes en amino-terminal du résidu lysine ciblé par SUMO (HCSM pour

*Hydrophobic Cluster SUMO Motif*). Bien qu'alternatifs, ces différents sites présentent les mêmes caractéristiques que le site de SUMOylation consensus classique dans lequel le résidu lysine SUMOylé doit être encadré par des résidus à caractères hydrophobe et acide, caractéristique *sine qua non* pour la reconnaissance par UBC9. Enfin, deux extensions différentes, adjacentes au site de SUMOylation consensus, ont été identifiées comme influençant positivement la SUMOylation du site consensus (**Figure 37**). Dans le premier cas, le motif de SUMOylation consensus est suivi par des résidus chargés négativement (NDSM pour *Negatively charged amino-acid-Dependent SUMO Motif*) [286]. Ces résidus acides favorisent la SUMOylation des résidus lysine présents au sein de ce consensus. Dans le deuxième cas, le site de SUMOylation consensus est, cette fois, régulé par la phosphorylation (PDSM pour *Phosphorylation-Dependent SUMO Motif*) [287,288]. Ici, le site de SUMOylation consensus canonique est suivi par des résidus sérines et/ou thréonines phosphorylables. Lorsque phosphorylés, ces derniers contactent une surface basique de UBC9 ce qui facilite la SUMOylation des substrats protéiques [289]. Le fonctionnement de ces deux motifs repose sur le même concept de charges négatives qui facilitent la reconnaissance du site de SUMOylation par UBC9. Un modèle a été proposé dans lequel plusieurs résidus basiques de UBC9 (K65, K74 et K76) contactent les résidus acides et/ou phosphorylés juxtaposés au site de SUMOylation et ainsi stabilisent l'interaction UBC9:substrat. Plus récemment, une étude a mis à jour un nouveau site de SUMOylation, baptisé pSuM pour *phosphorylated SUMOylation Motif*; ce motif est possiblement présent dans un nombre significatif de protéines (**figure 37**). Quasi identique au site consensus de SUMOylation, celui-ci comporte un résidu sérine phosphorylable à l'emplacement du résidu acide communément trouvé dans le site consensus classique [290]. L'apport de charges négatives par la phosphorylation du résidu sérine crée ainsi un site consensus compétant pour la modification du résidu lysine par SUMO. Du fait de la nature transitoire des évènements de phosphorylation, ce type de site potentiellement hautement régulable.

Si la phosphorylation peut participer à une régulation positive du site consensus de SUMOylation, il est à noter qu'il peut aussi faire l'objet d'une régulation négative. Dans la plupart des cas, c'est le résidu lysine modifié par SUMO qui fait l'objet d'une compétition entre différentes modifications post-traductionnelles. En effet, la SUMOylation n'est pas le

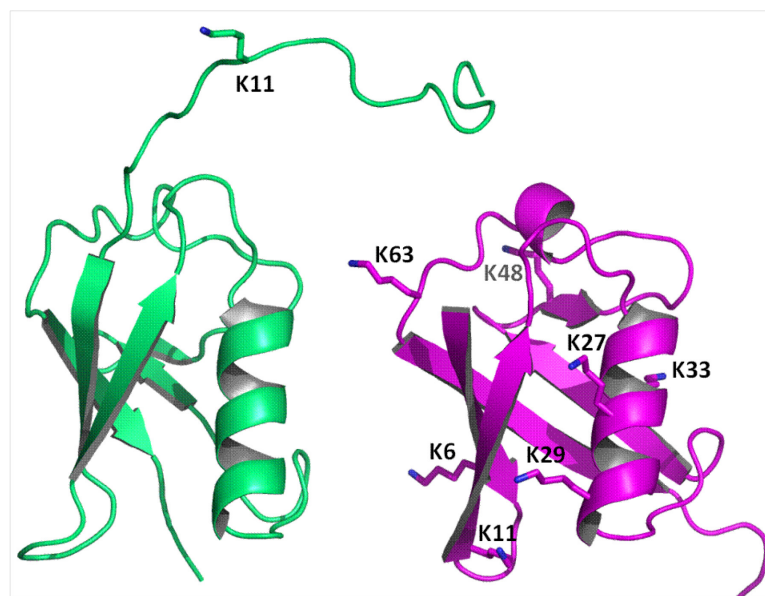
seul processus de modification aboutissant à la modification de résidus lysines. Ces derniers peuvent être la cible d'une panoplie de modifications post-traductionnelles, les plus couramment étudiées étant l'Ubiquitination, l'acétylation et la méthylation. Ainsi, différentes études ont démontré des compétitions SUMOylation-Ubiquitination [290,291] et SUMOylation-acétylation [292] pour un même résidu lysine.

#### 4.4.2 Sites de SUMOylation non consensus

Bon nombre de protéines ciblées par SUMO ne présentent pas de site consensus tandis que d'autres en possèdent qui ne sont pas modifiés par SUMO. Cette diversité de possibilités peut être attribuée à plusieurs facteurs (structure secondaire, encombrement stérique, géométrie, modifications post-traductionnelles, ligases E3 etc...). Alors que les sites consensus SUMOylés se localisent habituellement au sein de régions non structurées, de rares exemples de protéines modifiées par SUMO sur des sites non consensus au sein de structures secondaires (ex: hélice  $\alpha$ ) ont été décrits. Ainsi, UBC9 est SUMOylé sur un résidu lysine non consensus (K14) qui fait partie de son hélice  $\alpha$  H1 (**Figure 32**) [79]. Comme autre exemple, la protéine UBE2K est modifiée par SUMO sur un résidu lysine non consensus au sein d'une hélice  $\alpha$ , mais pas sur son site consensus, situé dans cette même hélice  $\alpha$  (**Figure 14**) [78]. Ces données suggèrent que le résidu lysine modifié de UBE2K est présenté dans le contexte d'un épitope, reproduisant dans l'espace un site de SUMOylation consensus. Enfin, SUMO et l'Ubiquitine ciblent sur PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) un même résidu lysine non consensus qui est localisé au sein d'un  $\beta$ -turn [293]. Dans le cas de SUMO, la modification de ce site chez PCNA est dépendante de l'activité d'une ligase [104]. Ceci indique que le choix des sites de modification peut aussi être déterminé par des ligases E3. Bien qu'une grande majorité de substrats de SUMO soit modifiée au sein de sites consensus, il est possible de penser que les ligases E3 puissent diriger UBC9 ou altérer de manière locale la surface du substrat et permettent ainsi la SUMOylation d'un résidu lysine qui, *a priori*, n'aurait pas été modifié par SUMO.

### 4.4.3 La poly-SUMOylation

Tel que précédemment mentionné, SUMO2/3 peuvent être auto-modifiés et ainsi générer une chaîne de poly-SUMO2/3 [208]. En effet, et contrairement à SUMO1, un site de SUMOylation consensus est présent au sein de l'extension amino-terminale de SUMO2 et de SUMO3 (résidu lysine K11) (**Figure 39**). Bien que les concepts de poly-SUMOylation et de poly-Ubiquitination soient similaires, la topologie d'une chaîne de poly-SUMO2/3 est probablement distincte, car moins complexes, de celles des chaînes de poly-Ubiquitine. En effet, alors que les sept résidus lysine de l'Ubiquitine peuvent être Ubiquitinés *in vivo*, initialement, K11 semble être le seul résidu lysine pouvant être SUMOylé *in vivo* chez SUMO2/3 (**Figure 39**) [208,294].



**Figure 39 :** Localisation des résidus lysine de SUMO2 et de l'Ubiquitine impliqués dans la formation des chaînes poly-SUMO2 et de poly-Ubiquitine *in vivo*.

Les résidus lysine K11 de SUMO2 (vert) et K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63 de l'Ubiquitine (magenta) sont représentés sur les structures de SUMO2 (PDB:1WZ0) et de l'Ubiquitine (PDB: 1UBQ), respectivement.

Selon de nouvelles études *in vivo* et *in vitro* de spectrométrie de masse, les protéines SUMO2/3 sont aussi SUMOylés sur d'autres résidus lysine (K5, K7 et K42) et SUMO1 peut aussi être modifié sur plusieurs résidus lysine (K7, K16, K17, K25, K37, K39 et K46) [212,285,295]. Cependant, ces études ont été effectuées dans des conditions favorisant la SUMOylation. Il est à noter que les protéines SUMO de levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* ont aussi la capacité de former des chaînes de poly-SUMO via des sites consensus présents au sein de leur extension amino-terminale respective.

#### 4.4.3.1 Formation des chaînes de poly-SUMO2/3 *in vitro*

Même si les topologies de chaînes de poly-SUMO2/3 et de poly-Ubiquitines sont distinctes, *in vitro*, leurs mécanismes respectifs de formation semblent similaires. En effet, tout comme la génération d'une chaîne de poly-Ubiquitine (K48) nécessite une interaction non-covalente entre l'Ubiquitine et la surface *backside* d'une enzyme de conjugaison E2

pour l'Ubiquitine, l'assemblage d'une chaîne de poly-SUMO2/3 requiert l'interaction non-covalente de SUMO2/3 avec la surface *backside* de UBC9 [65]. SUMO1 ne possédant pas de sites consensus, même s'il peut former des chaînes de poly-SUMO1 *in vitro*, il est généralement considéré comme un terminateur de chaînes de poly-SUMO2/3 *in vivo*.

#### 4.4.3.2 Aperçu des processus biologiques associés aux chaînes de poly-SUMO2/3

La SUMOylation par SUMO2/3, et potentiellement la poly-SUMOylation de protéines par SUMO2/3, est induite par des stress cellulaires [199]. Selon une récente étude, les substrats poly-SUMOylés sont majoritairement impliqués dans des processus associés au métabolisme de l'ADN comme la réplication, la réparation et la structure de la chromatine [296]. La caractérisation fonctionnelle précise des chaînes de poly-SUMO2/3 n'en n'est qu'à ses balbutiements. Ainsi, la formation de chaînes de poly-SUMO2/3 a été associée à différents processus tels : la formation du complexe synaptonémal entre chromosomes homologues lors de la méiose, chez *S. cerevisiae* et la réplication de l'ADN durant la phase S (*Synthesis*) du cycle cellulaire chez *S. pombe* [209,210]. Cependant, les déterminants moléculaires régulant ces processus restent encore mal caractérisés. Par ailleurs, la poly-SUMOylation a récemment été associée au catabolisme des protéines via la voie de l'Ubiquitine et du protéasome. En effet, l'inhibition du protéasome connue pour stabiliser les formes poly-Ubiquitinées de protéines entraîne aussi l'accumulation de chaînes de poly-SUMO2/3, ainsi que celle de protéines poly-SUMOylées [200]. Différents groupes ont récemment caractérisé, chez les levures comme chez l'humain, une classe de protéines impliquée dans la dégradation des protéines poly-SUMOylées [297]. Ces protéines appartiennent à la famille des ligases E3 à domaine RING et ont été nommées STUbLs (*SUMO Targeted Ubiquitin Ligases*) [131,298]. En plus de posséder un domaine RING, requis pour leur activité de ligase E3 pour l'Ubiquitine, celles-ci présentent des motifs SIMs interagissant de façon non-covalente avec SUMO. La mécanistique sous-jacente sera abordée plus loin en utilisant comme exemple, la dégradation, par le protéasome, de PML poly-SUMOylée via son interaction avec une ligase pour l'Ubiquitine, RNF4 (*RING Finger protein4*). D'autre par, cette classe de protéines a récemment été associée aux processus de réparation de l'ADN [299,300].

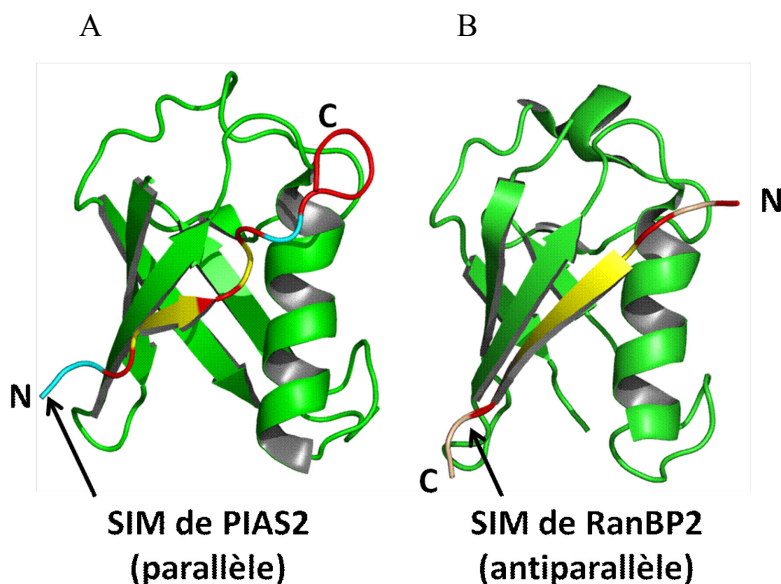
## 4.5 Les interactions non-covalentes de SUMO avec les protéines

Cette section aborde les principales notions reliées aux interactions non-covalentes de SUMO avec les protéines.

En effet, la particularité fondamentale des Ublps comme SUMO, provient de leur dualité fonctionnelle. En effet, les protéines SUMOs non conjuguées fonctionnent comme toutes autres macromolécules de la cellule capables de former des interactions non-covalentes. Cependant, comme présenté tout au long de cette introduction, les protéines SUMOs peuvent aussi se lier de manière covalente à des protéines; elles se classent alors dans la catégorie des modifications post-traductionnelles. Ainsi, la combinaison de ces deux caractéristiques fait des protéines SUMO, comme des autres Ublps, une classe de protéines à part entière.

### 4.5.1 Le motif d'interaction avec SUMO

Un motif de liaison avec SUMO (SIM pour *SUMO Interacting Motif*) a été identifié chez plusieurs protéines isolées sur la base de leur interaction non-covalente avec SUMO [301]. Un consensus de ce motif a par la suite été établi [59,302-304]. Celui-ci correspond à  $\Psi\Psi_X\Psi$  ou  $\Psi_X\Psi\Psi$  (où  $\Psi$  correspond à un résidu hydrophobe, le plus souvent V, I ou L et x correspond à n'importe quel résidu). Contrairement aux différents domaines d'interaction avec l'Ubiquitine, la séquence SIM ne semble pas présenter de structure secondaire sous sa forme non complexée à SUMO [31]. Cependant, lorsque le SIM se lie aux protéines SUMOs, il forme un brin  $\beta$  parallèle ou antiparallèle et prolonge ainsi le feuillet  $\beta$  des protéines SUMOs (**Figure 40**). Il a été suggéré que l'orientation du motif SIM (parallèle vs antiparallèle) dépend de la nature des résidus adjacents à celui-ci [305].



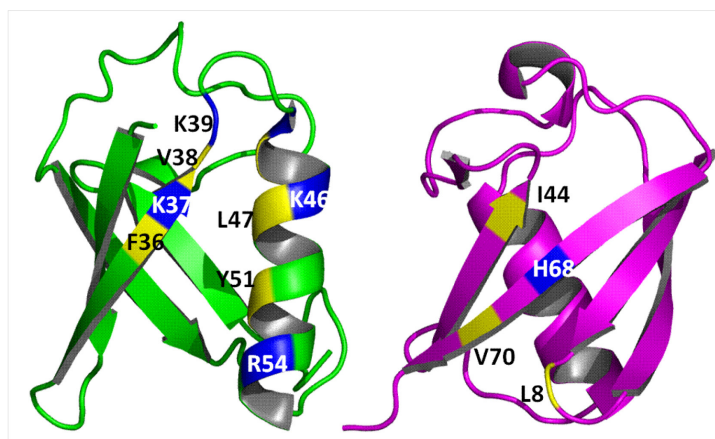
**Figure 40** : Structures de deux complexes non-covalents SUMO1:SIM.

A) Modèle par RMN de la structure du complexe SUMO1 (vert) avec le SIM de PIAS2 (cyan) en orientation parallèle, PDB: 2ASQ. B) Modèle par cristallographique du complexe SUMO1 (vert) avec le SIM de RanBP2 (beige) en orientation anti-parallèle, PDB: 1Z5S et (:) signifie interaction non-covalente. Le brin  $\beta$  de chacun des SIMs est coloré en fonction de la nature des résidus qu'il contient (jaune pour les résidus hydrophobes et rouge pour les résidus acides et/ou phosphorylables).

Même si les motifs d'interaction avec SUMO et les motif/domaines d'interaction avec l'Ubiquitine sont conceptuellement équivalents, des différences structurales existent entre ces deux motifs. Ainsi, alors que les SIMs forment un brin  $\beta$ , les UBDs sont plutôt connus pour adopter des structures hélicoïdales (hélice  $\alpha$ ) (voir **Tableau 2**). D'autre part, ces deux motifs reconnaissent des surfaces distinctes sur chacune de leur Ublp respectives. Alors que les SIMs interagissent avec une région hydrophobe comprenant le second brin  $\beta$  et l'hélice  $\alpha$  des protéines SUMOs, la plupart des UBDs reconnaissent une région du feuillet  $\beta$  de l'Ubiquitine centrée sur l'isoleucine 44 (**Figure 41**). De plus, alors que les interactions SUMO:SIM présentent une constante de dissociation qui varie de la centaine de nanomolaires à la dizaine de micromolaires, selon les couples SUMO:SIM testés, la constante de dissociation des UBI:UIM s'échelonne de la centaine de micromolaires à la



dizaine de millimolaires [302,304,306-308]. Ceci indique que SUMO présente une plus forte affinité d'interaction que l'Ubiquitine pour les protéines.



**Figure 41** : Identification des surfaces de reconnaissance de SUMO et de l'Ubiquitine impliquées dans l'interaction avec les séquences SIMs et les UIMs.

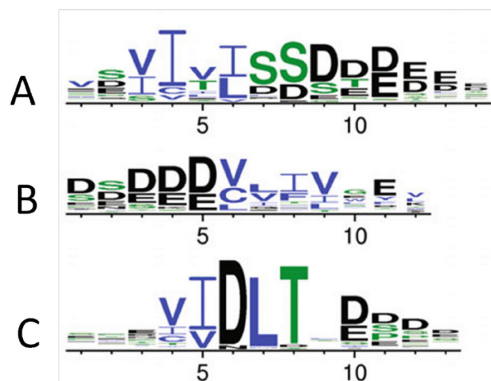
Modèles par RMN de la structure de SUMO1 (vert, PDB: 2ASQ) et de l'Ubiquitine (magenta, PDB:1UBQ). Les résidus de SUMO1 et de l'Ubiquitine qui sont impliqués dans l'interaction avec les séquences SIMs et UIMs sont identifiés et colorés selon leur nature (bleu, résidu chargé positivement et jaune, résidu hydrophobe).

#### 4.5.2 Variantes et extensions du motif d'interaction avec SUMO

Des séquences SIMs sont retrouvées dans deux des classes d'enzymes participant à la SUMOylation des protéines (l'enzyme d'activation et les enzymes de ligase E3 caractérisées à ce jour) [31,302]. Certaines protéines présentent des motifs SIM qui sont spécifiques à une seule des deux sous-familles de SUMOs [201]. Ceci pourrait expliquer le fait que des substrats soient préférentiellement modifiés par SUMO1 *versus* SUMO2/3 [309]. Cependant, à ce jour, aucune rationnelle moléculaire n'a été apportée pour expliquer ce mécanisme de discrimination entre les sous-familles de SUMO. D'autre part, plusieurs protéines (ex: STUbL) présentent des motifs SIM répétés en séries (de deux à quatre répétitions); ceci leur permet de reconnaître spécifiquement des chaînes de poly-SUMOs [310].

En outre, pour un bon nombre de protéines, le noyau hydrophobe du SIM est précédé ou suivi de résidus acides (acides aspartiques et/ou glutamiques) et/ou de résidus

phosphorylables (sérines et/ou thréonine) (**Figure 42**) [311]. Cette caractéristique pourrait dicter l'orientation du motif SIM vis-à-vis de SUMO. Ainsi, lorsque les résidus acides et/ou phosphorylables suivent le noyau hydrophobe, alors le motif SIM adopte alors une configuration parallèle (**Figure 42 A et C**) [304]. Dans le cas contraire (résidus acides et/ou phosphorylables en position amino-terminale), le SIM adopte une configuration antiparallèle (**Figure 42 B**) [59].



**Figure 42** : Diagramme de fréquence des résidus constituant le motif d'interaction avec SUMO et des séquences adjacentes.

A) SIM avec séquence hydrophobe suivie de résidus phosphorylables et acides (ex. SIM de PML) B) SIM avec séquence hydrophobe précédée de résidus phosphorylables et acides (ex. SIM de RanBP2). C) SIM avec séquence hydrophobe interrompue par un acide aspartique suivie d'une thréonine et de résidus phosphorylables et acides (ex. les protéines PIAS). Adapté de Vogt B. and Hofmann K., *Methods Mol Biol.*, 2012; 832: 249-261.[312]

### 4.5.3 Régulations de l'interaction non-covalente avec SUMO

En plus de dicter l'orientation SUMO:SIM, les résidus sérines et/ou thréonines qui sont retrouvés juxtaposés aux motifs SIMs sont dans la grande majorité des cas ciblés par la kinase CK2 (**Figure 42 A**) [271]. L'apport de charges négatives par la phosphorylation de ces résidus semble favoriser les interactions SUMO:SIM. Récemment, il a aussi été déterminé que l'acétylation des protéines SUMOs sur des résidus spécifiques, altère leur interaction avec certains motifs SIM [313].

Ainsi, différentes modifications post-traductionnelles ciblant SUMO et les séquences SIMs se révèlent importantes pour la régulation des interactions non-covalentes entre SUMO et des protéines.

#### **4.5.4 Un nouveau domaine d'interaction non-covalente pour SUMO?**

Une interaction non-covalente entre SUMO1 et le domaine doigt de zinc de la protéine HERC2 (*HECT domain and RCC1-like domain-containing protein2*) a récemment été caractérisée [314]. Celle-ci est importante pour l'interaction de HERC2 avec la ligase pour l'Ubiquitine RNF8 (*RING Finger protein8*) lors de dommages à l'ADN. À ce jour, la surface d'interaction de SUMO1 impliquée dans l'interaction avec HERC2 n'a pas été déterminée. Ceci laisse présager que, tout comme l'Ubiquitine, des domaines structurellement distincts pourraient contacter les protéines SUMOs et ainsi diversifier le répertoire des protéines interagissant avec SUMO.

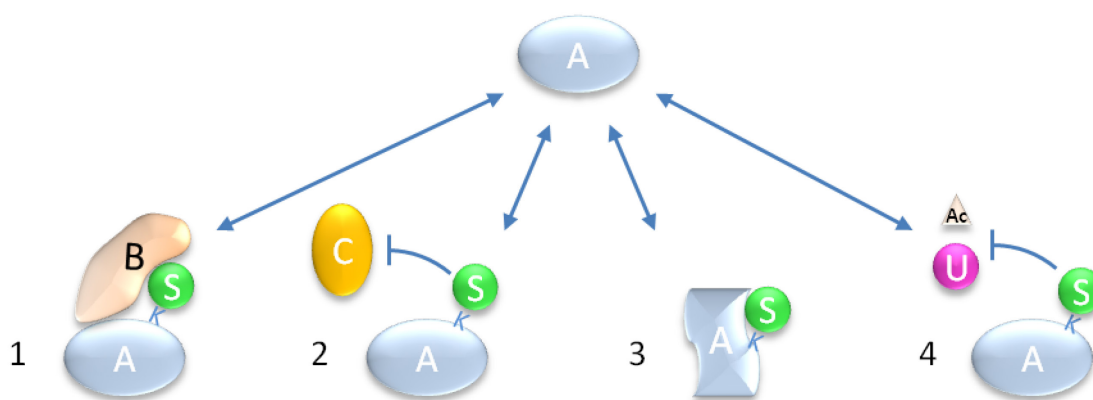
### **4.6 Fonctions des interactions de SUMO avec les protéines**

Cette section présente les conséquences moléculaires associées aux interactions covalentes et non-covalentes de SUMO avec les protéines au travers d'exemples de protéines modèles.

Depuis son identification vers la fin des années quatre-vingt dix, la SUMOylation a fait l'objet d'une attention croissante avec près de deux mille cinq cents études référencées dans la base de donnée PubMed. Les cinq dernières années ont été les plus prolifiques, représentant à elles seules plus de 50% des études publiées sur la SUMOylation. Il est maintenant établi que la SUMOylation est impliquée dans à peu près tous les processus biologiques régulant les fonctions du noyau des cellules [296,309]. Des indices de plus en plus nombreux suggèrent aussi que son rôle s'étend vers le cytoplasme et la membrane cellulaire [315-317]. Des mécanismes moléculaires simples induits par la SUMOylation des protéines sont à la base de conséquences fonctionnelles parfois complexes.

### 4.6.1 Conséquences moléculaires

En se couplant de façon covalente à une protéine, SUMO modifie la surface de cette dernière, et peut influencer les interactions de la protéine avec d'autres macromolécules. À ce jour, quatre mécanismes sont proposés pour expliquer les conséquences que peut avoir la SUMOylation d'une protéine sur ses fonctions (**Figure 43**). Ainsi, la SUMOylation d'une protéine peut (i) faciliter des interactions ou (ii) prévenir des interactions (iii) induire un changement de conformations dans la protéine ciblée et/ou (iv) influencer la demi-vie d'une protéine.



**Figure 43 :** Les conséquences moléculaires des interactions covalentes et non-covalentes de SUMO avec les substrats.

La modification de la protéine A par SUMO (S) sur un résidu lysine (K) peut engendrer différentes conséquences. (1) induire l'interaction avec B, (2) inhiber l'interaction avec C, (3) induire un changement de conformation via des interactions covalente et non covalente de la protéine A avec SUMO et (4) rentrer en compétition avec d'autres MPTs qui ciblent des résidus lysine, comme l'Ubiquitine (U) conduisant éventuellement à la dégradation ou bien le groupement acétyle (Ac).

#### 4.6.1.1 SUMO en tant qu'inducteur d'interaction

SUMO peut aussi agir comme inducteur d'interactions via la formation d'une nouvelle interface d'interaction. Il existe de nombreux exemples dans la littérature démontrant le rôle de SUMO dans la stabilisation des interactions protéiques. Dans la plupart des cas, ces recrutements dépendants de SUMO nécessitent que le partenaire

d'interaction possède un SIM. L'exemple le mieux caractérisé est celui de l'interaction de RanGAP1 avec RanBP2 [59]. La SUMOylation de RanGAP1 par SUMO1 induit son interaction avec RanBP2 via une interaction SUMO1:SIM et est essentielle à l'activité de SUMO E3 ligase du complexe RanBP2:SUMO1\*RanGAP1 [256]. Un autre exemple est celui de la SUMOylation de PML qui semble permettre le recrutement d'une multitude de protéines, présentant toutes un SIM, dans les corps nucléaires de PML [131,318]. Enfin, la SUMOylation de PCNA permet le recrutement de l'hélicase Srs2. En effet, Srs2 possède un motif SIM et un domaine PIP (*PCNA-Interacting Protein*) qui permettent tout deux la reconnaissance spécifique de la forme SUMOylée de PCNA [319]

#### **4.6.1.2 SUMO en tant qu'inhibiteur d'interaction**

La SUMOylation d'une protéine peut l'empêcher d'interagir avec une autre macromolécule. Ainsi, la SUMOylation du résidu lysine K14 de UBE2K, une enzyme de conjugaison E2 pour l'Ubiquitine, inhibe sa capacité à former un lien thioester avec l'Ubiquitine en altérant son interaction avec UBA1, une enzyme d'activation E1 pour l'Ubiquitine [78]. L'inhibition des interactions ne se limite pas qu'aux interactions protéiques puisque la SUMOylation du résidu lysine K82 de HSF2 (*Heat Shock Factor2*) est associée à une inhibition de son interaction avec l'ADN [320].

#### **4.6.1.3 SUMO en tant qu'inducteur de changement de conformation**

Bien qu'à ce jour il n'existe qu'un cas rapporté, il a été démontré que SUMO peut induire un changement de conformation de la protéine cible. Ainsi, la SUMOylation de TDG (*Thymine DNA Glycosylase*) induit une perte d'interaction avec l'ADN suite à son changement de conformation. Le changement de conformation de TDG repose à la fois sur sa SUMOylation et sur son interaction non-covalente avec SUMO [321,322].

#### **4.6.1.4 SUMO en tant que régulateur de la stabilité protéique**

##### *4.6.1.4.1 Inhibition de la dégradation protéique*

Au même titre que d'autres modifications post-traductionnelles, SUMO se retrouve conjugué sur des résidus lysines de protéines cibles. Ainsi, SUMO et l'Ubiquitine peuvent

entrer en compétition pour le même résidu lysine et influencer la demi-vie de la protéine ciblée. I $\kappa$ b $\alpha$  est la première protéine pour laquelle une compétition entre SUMO1 et l'Ubiquitine a été proposée [291]. Récemment, il a été démontré de façon plus définitive que la stabilité de ER $\beta$  est régulée par une compétition entre SUMO1 et l'Ubiquitine pour le même résidu lysine (K4): ainsi, la SUMOylation de ER $\beta$  (*Estrogen Receptor $\beta$* ) sur K4 inhibe sa dégradation par le protéasome suite à la poly-Ubiquitination de ER $\beta$  sur ce même résidu [290].

#### 4.6.1.4.2 Induction de la dégradation protéique

Dans un premier temps, la SUMOylation n'a pas été associée à la dégradation des protéines cependant, de nouvelles évidences suggèrent que ceci n'est pas toujours vrai. Ainsi, la poly-SUMOylation de PML par SUMO2/3 semble être un signal inducteur pour sa dégradation. En outre, une nouvelle famille de ligases E3 pour l'Ubiquitine, les STUBLs ciblent PML polySUMOylé et induisent spécifiquement la poly-Ubiquitination des chaînes de poly-SUMO2/3 [131].

La SUMOylation a aussi récemment été associée à la voie de dégradation protéique par les caspases. Par exemple, la SUMOylation de SATB1 (*Special AT-rich sequence-Binding protein1*) dans les corps nucléaires de PML, entraîne sa dégradation par la caspase 6 [323]. Ce processus nécessite la phosphorylation de SATB1 qui est ensuite reconnu par PIAS1 une des ligases E3 pour SUMO [324]. Les détails moléculaires permettant la reconnaissance de SATB1 SUMOylée par la caspase 6 ne sont à ce jour pas identifiés.

## 4.7 Les processus biologiques nucléaires régulés par SUMO

Comme vu précédemment, la SUMOylation module l'activité des protéines en régulant de différentes façons les interactions avec leurs partenaires. À ce jour, la SUMOylation semble impliquer dans à peu près tous les processus cellulaires. Cependant une très vaste majorité de substrats modifiés par SUMO se localise dans le noyau des cellules. Cette thèse abordant essentiellement les rôles des interactions de SUMO avec trois protéines nucléaires (PIAS1, PML/TRIM19 et TIF1 $\beta$ /TRIM28), les exemples qui vont être

développés dans les sections suivantes se limiteront aux rôles de la SUMOylation dans différents processus nucléaires. Il est à noter que la majorité des cibles de SUMO sont des facteurs de transcriptions, des co-régulateurs, des protéines impliquées dans la régulation de la chromatine et l'intégrité du génome. Cette section abordera donc les impacts de la SUMOylation dans la régulation de la transcription, dans l'intégrité du génome mais aussi dans le ciblage sub-cellulaire.

## 4.7.1 Rôles de SUMO dans la régulation de la transcription

### 4.7.1.1 Inhibition de la transcription

Beaucoup de facteurs de transcription et de co-régulateurs sont ciblés par SUMO. La plupart du temps, leur SUMOylation inhibe l'activité de ces régulateurs transcriptionnels. À ce jour, au moins deux modèles sont proposés pour expliquer l'effet inhibiteur de SUMO sur l'activité de ces protéines. D'une part, la SUMOylation du régulateur de transcription induit le recrutement de facteurs qui inhibent la transcription. D'autre part, la SUMOylation du régulateur altère son interaction avec l'ADN. Au moyen d'exemples de protéines modèles, les deux cas de figures sont abordés dans les sections suivantes.

#### 4.7.1.1.1 Recrutement d'activités répressives

La SUMOylation est, le plus souvent, associée à la répression de la transcription. De nombreux exemples illustrent le rôle direct de la modification par SUMO dans la répression transcriptionnelle. Ainsi, la mutation des sites de SUMOylation de plusieurs facteurs de transcription (Elk1, Sp3 et c-Jun) et de récepteurs nucléaires (AR, GR et PR pour *Androgen Receptor*, *Glucocorticoid Receptor* et *Progesterone Receptor*) induit une augmentation de leur activité transcriptionnelle [325-330]. Ceci indique que SUMO agit comme un régulateur négatif de la transcription. D'ailleurs, le recrutement à l'ADN de SUMO ou de UBC9, sous la forme de protéines de fusion Gal4-DBD (*Galactose4-DNA Binding Domain*), induit une répression de la transcription dans des essais de gènes rapporteurs [331]. Plusieurs études rapportent que la SUMOylation permet le recrutement d'activités

répressives (enzymes déacétylases et/ou de méthyltransférases des histones). Dans le cas de elk1, sa SUMOylation est associée au recrutement de HDAC2 (*Histone DeAcetylase2*) [332]. Souvent, ces protéines régulant négativement la transcription sont elles mêmes modifiées par SUMO et/ou contiennent des motifs d'interaction avec SUMO. Ainsi, la protéine HDAC1 est ciblée par SUMO cependant son activité répressive est indépendante de sa capacité à être SUMOylée [333]. Dans le cas de CoREST1 (*Corepressor of RE1 Silencing Transcription factor*), le co-répresseur des protéines REST, son motif d'interaction avec SUMO2/3 est requis pour son association aux promoteurs de certains gènes et pour la répression de ces derniers [334]. En effet, le caractère répresseur de SUMO dépend de l'intégrité de sa surface qui contacte la séquence SIMs. Souvent, les interactions avec SUMO corrént avec la présence de protéines associées à la compaction de la chromatine, c'est-à-dire à une chromatine réfractaire à la transcription. Ainsi, le recrutement adéquat de CHD3 (*CHromo Domain helicase3*) une hélicase faisant partie du complexe de remodelage de la chromatine NuRD (*Nucleosome Remodeling and Deacetylase*) ainsi que des protéines HP1 (*Heterochromatin Protein1*) au niveau des promoteurs de gènes sous le contrôle du facteur de transcription Sp3, nécessite que Sp3 puisse être SUMOylable [335].

#### 4.7.1.1.2 Altération des interactions avec l'ADN

La SUMOylation d'activateurs de transcription peut être associée à une altération de leur interaction avec l'ADN. Il en résulte une perte d'activation de la transcription lorsque ces activateurs sont ciblés par SUMO. Il semble que cela soit le cas pour STAT1, qui est SUMOylé au sein de son domaine d'interaction avec l'ADN. Ainsi, STAT1 présente une plus grande affinité pour ses éléments de réponse lorsque muté dans son site de SUMOylation. De plus, l'ajout d'une désomoylase, SENP1, augmente l'activité transcriptionnelle induite par STAT1 [336]. De manière similaire, la SUMOylation de HSF2 altère son interaction avec l'ADN [320,337].

#### 4.7.1.2 Activation de la transcription

Bien que peu nombreux, quelques exemples associent SUMOylation et activation de la transcription. Dans ce cas de figures, deux explications sont communément rapportées.



Soit la SUMOylation du régulateur de transcription inhibe le recrutement d'activités répressives ou bien elle favorise son interaction avec l'ADN.

#### 4.7.1.2.1 *Inhibition du recrutement d'activités répressives*

De très rares études ont rapporté une activation de la transcription suite à la SUMOylation de facteurs de transcription. Ainsi, Ikaros est modifié par SUMO sur deux sites majeurs. Il est à noter que la répression de la transcription dépendante de Ikaros est augmentée lorsque les deux sites de SUMOylation de Ikaros sont mutés. Ceci s'explique par le fait que la SUMOylation de Ikaros altère son interaction avec plusieurs co-répresseurs [338]. Dans le même ordre d'idée, la SUMOylation de Dnmt3a (DNA methyltransferase3a) altère son interaction avec les histones déacétylases HDAC1 et HDAC2 [339].

#### 4.7.1.2.2 *Induction des interactions avec l'ADN*

La SUMOylation affecte différenciellement HSF1 et HSF2. Ainsi, la SUMOylation de HSF1, induite suite un choc thermique, entraîne une augmentation de sa liaison à son promoteur. Le mutant de SUMOylation de HSF1 altère sa capacité à lier l'ADN et à induire l'expression de gènes cibles [340].

## **4.7.2 Rôles de SUMO dans l'intégrité du génome**

### **4.7.2.1 Réparation de l'ADN**

Récemment, la machinerie de SUMOylation a été associée au mécanisme de réparation de l'ADN. En effet, les ligases E3 pour SUMO de la famille PIAS sont recrutées à l'ADN suite à des cassures double brin induites par les rayons UV (*Ultra Violet*) et/ou des agents chimiques. Il s'avère que le recrutement des protéines PIAS dans la zone de dommages est essentielle à l'initiation des processus de réparation, suggérant que ces dernières ce situent à l'apex des mécanismes de réparation [269,270]. De manière analogue chez *S. cerevisiae*, il a récemment été proposé qu'une SUMOylation adéquate de plusieurs protéines était requise pour permettre le processus de réparation de l'ADN [341].

### 4.7.3 Implications de SUMO dans le ciblage sub-cellulaire

La régulation des interactions dépendantes de SUMO peut être associée à des variations dans le ciblage sub-cellulaire de protéines. Ainsi, des changements de compartiments cellulaires (noyau-cytoplasme) ou sub-nucléaires (nucléole-nucléoplasme et corps nucléaires-nucléoplasme) seront illustrés par des exemples dans les prochaines sections.

#### 4.7.3.1 SUMO et le transport nucléo-cytoplasmique

L'exemple le mieux étudié de transport nucléo-cytoplasmique est le recrutement de RanGAP1 sur la surface cytoplasmique des pores nucléaires. RanGAP1 fait partie d'un complexe de protéines localisé aux pores nucléaires, lieux de transport bidirectionnel des protéines entre le cytoplasme et le noyau. Ainsi, suite à sa SUMOylation, RanGAP1 est transloqué aux pores nucléaires où elle interagit de façon stable avec RanBP2. La SUMOylation est impliquée dans cette localisation puisqu'un mutant du site de SUMOylation de RanGAP1 (K526) se retrouve uniquement dans le cytoplasme des cellules [168,342]. La formation du complexe RanGAP1\*SUMO1:RanBP2 est essentielle à la fonction de ligase E3 pour SUMO de RanBP2 [256]. Selon le courant de pensées actuel, RanBP2 pourrait être la ligase qui induit la SUMOylation des protéines lorsque ces dernières pénètrent le noyau de la cellule. En effet, la SUMOylation de protéines peut s'effectuer lors de leur transfert du cytoplasme vers le noyau. Ainsi, SP100 requiert une séquence NLS (*Nuclear Localization Signal*) fonctionnelle afin d'être adéquatement SUMOylée [188]. Ceci suggère que l'altération du ciblage au noyau altère le niveau de SUMOylation de certains substrats. D'autre part, la SUMOylation de plusieurs protéines est impliquée dans la rétention de ces dernières au sein du noyau cellulaire. Bien que SRC1 (*Steroid Receptor Coactivator1*), un co-régulateur des récepteurs nucléaires, soit majoritairement présent dans le noyau des cellules, une délocalisation vers le cytoplasme se produit avec le temps. Cependant, un mutant de SUMOylation pour SRC-1 se retrouve plus rapidement dans le cytoplasme que la protéine sauvage [343]. Le même cas de figure est retrouvé avec CtBP1 (*C-terminal Binding Protein1*), un co-répresseur de plusieurs gènes impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire. Alors que CtBP1 se localise

uniquement au noyau cellulaire, son mutant de SUMOylation se retrouve uniformément distribué entre le noyau et le cytoplasme des cellules [344]. Ces exemples indiquent que SUMO est impliqué dans plusieurs processus du transport nucléo-cytoplasmique.

#### 4.7.3.2 Compartimentation sub-nucléaire

Certaines protéines font la navette entre différents compartiments nucléaires et ce transport est régulé par leur SUMOylation. Ainsi, la topoisomerase-1, une enzyme responsable de dérouler la double hélice d'ADN fait la navette entre le nucléoplasme et le nucléole. La SUMOylation de la topoisomerase-I est associée avec sa localisation dans le nucléoplasme puisqu'un mutant de SUMOylation est uniquement retrouvé dans le nucléole. La modification par SUMO de la topoisomerase-1 altérerait son interaction avec la nucléoline, une protéine présente dans le nucléole des cellules [345]. Dans le même ordre d'idées, le noyau des cellules eucaryotes présentent de nombreux territoires ou domaines, parmi ceux-ci, on retrouve les corps nucléaires de PML. Les corps nucléaires de PML sont des structures concentriques impliquées dans un grand nombre de processus biologiques. Ceux-ci regroupent une pléthore de protéines dont le recrutement est régulé par SUMO. D'ailleurs, une SUMOylation adéquate de PML est requise pour la formation de ces corps nucléaires [346]. Au moins deux cas de figures sont rapportés. (i) la SUMOylation de PML induit le recrutement de protéines possédant une séquence SIM. C'est le cas de la kinase HIPK2 (*Homeodomain Interacting Protein Kinase2*) et de la protéine SIZN1 (*Smad-Interacting ZiNc finger protein1*). Ces protéines présentent toutes deux un SIM impliqué dans leur recrutement aux corps nucléaires de PML [347,348]. (ii) la SUMOylation d'une protéine favorise son recrutement aux corps nucléaire de PML. C'est le cas de figure pour l'hélicase BLM (*BLooM syndrom protein*) [349].

## 5 Les protéines d'échafaudage à domaine RING et la SUMOylation

Les quatre articles présentés dans cette thèse portent sur l'étude structurale et fonctionnelle des interactions de SUMO avec trois protéines d'échafaudage modèles appartenant à la grande famille des protéines à domaine RING. Cette section introduit ces trois protéines d'échafaudage que sont la ligase E3 pour SUMO, PIAS1, la protéine centrale de corps nucléaires, TRIM19/PML et le corépresseur de la transcription TRIM28/TRIF1 $\beta$ .

### 5.1 Caractéristiques et fonctions des protéines d'échafaudage

Les cellules doivent répondre de manière adéquate à chaque stimulus qu'elles reçoivent. L'un des moyens mis en place repose sur l'utilisation de « protéines échafaudages » qui participent à la transduction des signaux et permettent l'activation, en série, de cascades de protéines. Une protéine d'échafaudage intervient dans une voie de signalisation en recrutant les protéines appartenant à une cascade moléculaire spécifique (ex: Ste5 pour les MAPKs, *Mitogen Activated Protein Kinases*). En interagissant avec différentes protéines d'une voie de signalisation spécifique, la protéine d'échafaudage intègre divers signaux issus des protéines situées au début de la voie. Ces signaux sont ensuite organisés dans l'espace et le temps, et redistribués vers des protéines situées plus en aval de la voie de signalisation cellulaire. En général, de part leur organisation pluri-modulaire, les protéines d'échafaudage sont versatiles. Cette caractéristique leur permet des interactions multiples via les différents domaines dont elles sont pourvues. Bien que des modifications allostériques puissent contribuer à la fonction des protéines d'échafaudage, il est généralement admis que celles-ci fonctionnent comme des plateformes de recrutement, augmentant de façon locale la concentration des protéines de signalisation avec lesquelles elles interagissent. Ce mécanisme de fonctionnement accroît ainsi les probabilités d'interaction et facilite ainsi le processus de transfert des signaux entre différentes protéines d'une voie de signalisation [350].

Il est possible d'assimiler les protéines à domaine RING à des protéines d'échafaudage. En effet, selon la base de données SUPERFAMILY, le génome humain encode près de 1400 protéines à domaine RING. Ce dernier se retrouve associé à 69 autres classes de domaines pour un nombre total de 205 combinaisons différentes. Ainsi, le nombre de combinaisons de motifs associés au domaine RING suggère que les protéines à domaine RING coordonnent un très grand nombre de voies de signalisation dans la cellule.

Au moins quatre stratégies peuvent être exploitées par les protéines d'échafaudage, telles les protéines à domaine RING, afin d'assurer leur rôle dans la signalisation [351]: (i) l'interaction avec différentes composantes de la voie de signalisation, comme c'est le cas pour la ligase E3 PIAS1, (ii) le recrutement des composantes de la voie de signalisation au sein de domaines cellulaires spécifiques, tel qu'observé pour TRIM19/PML, (iii) la régulation de la transduction du signal par la coordination des signaux, tel que mis en évidence au niveau transcriptionnel pour le corépresseur TRIM28/TIF1 $\beta$ , mais aussi (iv) la prévention de l'interruption des signaux par la protection des composantes de signalisation des activités inhibitrices.

## 5.2 Caractéristiques et fonctions du domaine RING

Tel que précédemment présenté, le domaine de type RING est un domaine globulaire, généralement indépendant, dont le repliement tridimensionnel nécessite, dans la majorité des cas répertoriés, des résidus cystéine et histidine adéquatement espacés qui coordonnent deux cations de zinc. Généralement, un domaine RING contient deux atomes de zinc. Cependant, certaines exceptions existent. Ainsi, les protéines à domaine U-box (sans zinc) et celles à domaine SP-RING (coordonnent un seul zinc) définissent deux sous-familles de protéines à domaine RING [80].

Dans un premier temps, le domaine RING fût classé comme un domaine d'interaction avec les acides nucléiques et potentiellement impliqué dans la dimérisation des protéines [100]. Cependant, depuis le début des années deux-mille, les domaines RING sont reconnus comme des domaines d'interaction avec une classe d'enzymes reliées à des voies de signalisation spécifiques (Ubiquitination, NEDDylation, SUMOylation etc....) et

impliquées dans la modification post-traductionnelle de protéines, les enzymes de conjugaison E2 pour les Ublps. Ainsi, bien que des exceptions existent, les protéines à domaine RING sont donc généralement considérées comme des protéines pouvant avoir ou ayant une activité ligase E3 démontrée [80].

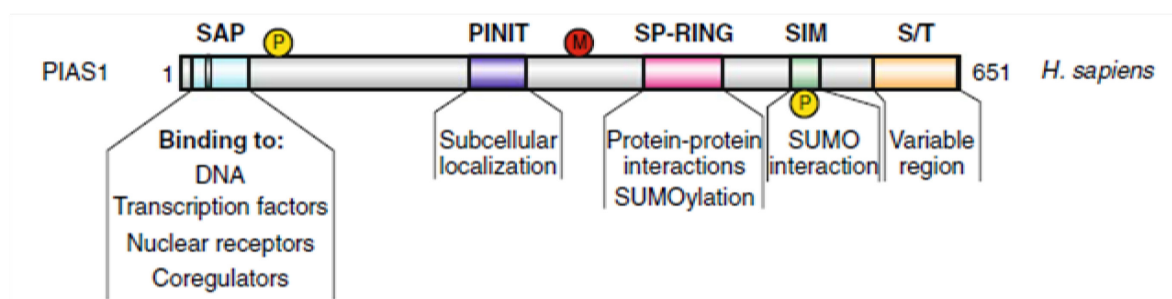
### **5.3 PIAS1, un prototype de ligase E3 pour SUMO à domaine RING**

Bien qu'à titre de prototype, PIAS1 soit l'un des membres les plus étudiés des ligases pour SUMO, peu d'études se sont intéressées aux déterminants moléculaires à la base de ses fonctions de protéine d'échafaudage. La caractérisation de ces déterminants fait l'objet d'une des études présentées dans cette thèse (article 2). Dans cette section, j'aborde les principales caractéristiques reliées à la structure, aux fonctions ainsi qu'à la régulation de PIAS1 et un parallèle est fait avec les autres membres des PIAS lorsque les données sur PIAS1 ne sont pas disponibles.

Initialement, PIAS1 fût identifié comme un inhibiteur du facteur de transcription STAT1 [238]. Tel que présenté dans la section 4.3.3.3, PIAS1 fait partie d'une famille de protéines ubiquistes et présentes chez tous les eucaryotes [258]. Au moins quatre membres (PIAS1-4) sont encodés par le génome humain. Au même titre que les autres membres des PIAS, la délétion du gène de *Pias1* n'est pas létale chez *M. musculus* [260]. Ceci suggère une redondance fonctionnelle des protéines PIAS lors du développement embryonnaire de *M. musculus*. Cependant, ces souris présentent des altérations dans la voie des interférons indiquant un rôle de PIAS1 dans l'immunité innée. En effet, PIAS1 inhibe l'activation de certains des gènes dépendant des cytokines (voie de STAT1) et des chimiokines (voie de NF- $\kappa$ b) associés à l'inflammation [352]. En outre, la protéine PIAS1 semble être finement régulée à différents niveaux puisque son expression se retrouve altérée dans plusieurs cancers et lignées de cellules cancéreuses [353-355].

### 5.3.1.1 Organisation structurale de PIAS1

Toutes les protéines PIAS présentent une organisation similaire de leurs domaines. Ainsi, la partie amino-terminale de PIAS1 contient plusieurs domaines et motifs. De l'extrémité amino-terminale vers l'extrémité carboxy-terminale, PIAS1 contient un domaine SAP, un domaine PINIT, puis un domaine SP-RING. Comme pour tous les membres de la famille PIAS, une séquence SIM est retrouvée en aval du domaine SP-RING [258].



**Figure 44** : Représentation schématique de PIAS1.

La position des domaines, motifs et régions de PIAS1 est représentés et les fonctions dans lesquels ils sont impliqués sont indiquées en dessous. Les domaines SAP (cyan), PINIT (mauve), SP-RING (magenta). Le motif SIM (vert) et la région riche en résidus sérine et thréonine S/T (orange). Les positions de certaines modifications post-traductionnelles de PIAS1 sont représentées (P) phosphorylation. Adapté de Rytinki MM., *et al.*, *Cell Mol Life Sci.*, 2009; 66 (18): 3029–3041[258].

À ce jour, seule la structure du domaine SAP de PIAS1 a été résolue; celle-ci est formée de quatre hélices interagissant entre elles via des interactions hydrophobes [266]. Le domaine SAP de PIAS1 lie des séquences d'ADN riches en A-T et établit des interactions avec plusieurs facteurs de transcription et récepteurs nucléaires [266]. Comme pour PIAS1, des interactions protéiques dépendantes du domaine SAP sont retrouvées pour les autres protéines PIAS et suggèrent donc plusieurs rôles pour ce domaine [356-358]. À ce jour, aucune donnée n'est disponible sur la structure et la fonction du domaine PINIT de PIAS1. Néanmoins, compte tenu de la similarité des séquences primaires de ce domaine chez les différentes protéines PIAS, il est probable qu'il assure des fonctions analogues. Ainsi le

domaine PINIT est requis pour la localisation nucléaire de PIAS3 et pour son interaction avec STAT3 ainsi que pour la SUMOylation adéquate de substrats dépendant de PIAS4 et de Siz1 [104,263,359,360]. Basé sur sa similarité de séquence avec le domaine RING des ligases pour l'Ubiquitine, le domaine SP-RING de PIAS1 a été défini comme un domaine d'interaction avec UBC9, l'enzyme E2 de conjugaison pour SUMO [361]. Finalement, le motif SIM des protéines PIAS est impliqué dans le recrutement des différentes protéines SUMO.

### **5.3.2 Les fonctions de PIAS1**

#### **5.3.2.1 Les rôles de PIAS1 dans la régulation de la transcription**

Peu de temps après avoir été identifiée comme un co-régulateur de STAT1, la protéine PIAS1 a été caractérisée comme co-régulateur de plusieurs récepteurs nucléaires [238,362,363]. D'autre part, plusieurs facteurs de transcription ont été caractérisés comme des protéines interagissant avec PIAS1 [266,364]. Différents éléments semblent moduler les capacités co-régulatrices de PIAS1. Ainsi, en fonction du type cellulaire utilisé et du facteur de transcription étudié, PIAS1 peut agir comme un coactivateur ou comme un corépresseur. Alors que deux mécanismes sont proposés pour expliquer l'activité corépressive des protéines PIAS (inhibition de la liaison aux éléments de réponse ou recrutement d'activités répressives au promoteur de gènes cibles), les déterminants moléculaires à la source de l'activité coactivatrice de PIAS sont moins bien compris [352,365-367]. Différents domaines de PIAS1 sont impliqués dans le recrutement de facteurs de transcription. Ainsi, plusieurs activateurs de transcription interagissent avec le domaine SAP de PIAS1 alors que les interactions avec d'autres facteurs de transcription requièrent le domaine SP-RING et/ou la séquence SIM de PIAS1 [266,364,368]. Ainsi, au même titre que les autres PIAS, il est possible de conclure que PIAS1 est une protéine versatile dont les propriétés semblent dépendre de la nature des complexes protéiques avec lesquels elle interagit.

En plus d'agir comme co-régulateur, les protéines PIAS fonctionnent comme ligases E3 pour SUMO, deux fonctions qui ne sont pas toujours reliées [356-358].



### 5.3.2.2 Le rôle de PIAS1 dans la modification des protéines par SUMO

Compte tenu qu'elle comprend des domaines et motifs recrutant UBC9, SUMO et d'autres protéines, PIAS1 remplit toutes les caractéristiques d'une protéine d'échafaudage ayant la fonction de ligase E3 pour SUMO. À la différence des ligases E3 pour l'Ubiquitine qui présentent une très grande spécificité de substrats, PIAS1 promeut la SUMOylation de nombreux substrats. Beaucoup de facteurs de transcription mais aussi plusieurs récepteurs nucléaires et des co-régulateurs sont ciblés par PIAS1 [183,185,236,326,369-372]. Cette caractéristique est partagée avec les autres membres de la famille PIAS. Le recrutement et la SUMOylation de ces protéines nécessitent que le domaine SP-RING de PIAS1 soit structurellement intact [183,369]. En effet, au même titre que le domaine RING des ligases E3 pour l'Ubiquitine, le domaine SP-RING de PIAS1 pourrait participer au recrutement de l'enzyme de conjugaison E2 activée (UBC9~SUMO) comme il a été proposé pour Siz1 [104]. Ceci est investigué dans le deuxième article de cette thèse.

### 5.3.2.3 Le rôle de PIAS1 dans la voie de réparation de l'ADN dépendant de BRCA1

Récemment, PIAS1 ainsi que PIAS4 ont été impliqués dans la réparation de l'ADN. En effet, suite à divers stress géno-toxiques, PIAS1 est recrutée au site de dommage avec UBC9 et les protéines SUMOs [269,270]. La présence de PIAS1 semble essentielle au recrutement et à la SUMOylation de BRCA1 tandis que PIAS4 permet le recrutement de RNF168 (*RING Finger168*) et de 53BP1 (*P53Binding Protein1*) au site de dommage. À ce jour, les détails moléculaires impliqués dans ces interactions ne sont pas connus.

### 5.3.2.4 Régulations de PIAS1 par des modifications pos-traductionnelles

Suite à l'induction des voies de l'inflammation (lipo-polysaccharides et TNF $\alpha$ ) PIAS1 est phosphorylée sur son résidu sérines S90 par IKK $\alpha$  [373]. PIAS1 phosphorylée se lie aux promoteurs et réprime la transcription de certains gènes régulés par STAT1 et NF- $\kappa$ B. Plus récemment, une phosphorylation de PIAS1 sur plusieurs résidus sérine (S466, S467 et S468) ciblés par CK2 a été mise en évidence [271]. Ces sites de phosphorylation par CK2 sont conservés chez tous les PIAS et leur statut de phosphorylation semble important dans l'activité de co-régulateur de PIAS1. Ces résidus sérines sont adjacents à la

séquence SIM des protéines PIAS. Dans le cas de PIAS1, il a été proposé que la phosphorylation de ces résidus sérines augmente l'affinité d'interaction entre PIAS1 et les protéines SUMO [271]. Ceci suggère que l'interaction non-covalente des protéines SUMOs avec PIAS1 pourrait être impliquée dans la régulation de l'activité de co-régulateur de PIAS1. De plus, au même titre que les autres membres de la famille des PIAS, PIAS1 est modifiée par SUMO. Cependant, le ou les sites de modification de PIAS1 n'ont pas été identifiés et conséquemment aucune fonction associée à la SUMOylation de PIAS1 n'a été caractérisée. La stabilité de PIAS1 est régulée par le protéasome suite à sa poly-Ubiquitination induite par Siah2, une ligase E3 pour l'Ubiquitine [374]. Ni les signaux inducteurs de l'Ubiquitination de PIAS1 ni les conséquences fonctionnelles associées à cette Ubiquitination n'ont été clarifiés.

#### 5.4 TRIM19 et TRIM28, deux protéines d'échafaudage à motif TRIM/RBCC

TRIM19/PML ainsi que TRIM28/TIF1 $\beta$  font l'objet de trois autres études présentées dans cette thèse. TRIM19/PML et TRIM28/TIF1 $\beta$  sont des protéines modèles qui appartiennent à une même sous-famille, les protéines TRIM (*TRIPartite Motif*)/RBCC (*RING B-box Coiled-Coil*) et dont le motif TRIM inclut, entre autres, un domaine RING. Chacun des membres de cette famille semble occuper des territoires subcellulaires distincts et être impliqué dans des processus cellulaires spécialisés qui rappellent le mécanisme de fonctionnement de protéines d'échafaudage [375]. Cette section introduit les caractéristiques communes à TRIM19/PML ainsi qu'à TRIM28/TIF1 $\beta$  et qui sont retrouvées chez la plupart des protéines TRIM.

Les protéines TRIM sont uniquement retrouvées chez les eucaryotes et, à ce jour, le génome humain encode 70 membres [376]. Toutes les protéines TRIM/RBCC exhibent, dans leur portion amino-terminale, un agencement similaire de domaines. Ainsi le motif TRIM/RBCC, qui inclue invariablement un domaine RING, se définit par la succession de deux ou trois domaines qui coordonnent tous des cations de zinc. Généralement, le domaine RING est suivi par un ou deux domaines B-box, puis par un domaine *coiled-coil*. Le

domaine B-box se définit par un arrangement de résidus cystéine et histidine de type CHC3H2. Comme le domaine RING, le domaine B-box est un domaine globulaire indépendant. Basé sur la nature des résidus liant le zinc, deux type de domaines B-box (B-box 1 et B-box 2) ont été caractérisés (B-box 1 et B-box 2) [377,378]. Les fonctions des domaines B-box restent encore très mal caractérisées. Ce dernier semble avoir la capacité d'interagir avec les protéines phosphorylées et les acides nucléiques. Le domaine *coiled-coil*, impliqué dans l'oligomérisation des macromolécules, se définit par la présence de résidus hydrophobes (souvent leucine et/ou isoleucine) adéquatement espacés dans la séquence primaire des protéines TRIM et permettent de former une hélice  $\alpha$  de longueur variable. Des cas d'homo et d'hétéro-oligomérisation ont été rapportés pour un certain nombre de protéines TRIM [99,379,380].

Alors que la portion amino-terminale des protéines TRIM présente une organisation similaire de domaines (domaines RING, B-box et *coiled-coil*), une grande variabilité est retrouvée dans la partie carboxy-terminale des protéines TRIM. Ainsi, basé sur la nature des domaines présents dans leur partie carboxy-terminale, les protéines TRIM peuvent être classées en une dizaine de sous-familles. TRIM19/PML appartient à la classe V alors que TRIM28/TIF1 $\beta$  appartient à la classe VI (**figure 45**). Cette diversité de domaines retrouvés en carboxy-terminale pourrait déterminer des fonctions spécialisées pour chacune des sous-classes de protéines TRIM.



Ainsi, certaines études les ont classées comme des ligases E3 pour l'Ubiquitine, tandis que d'autres les classent comme ligases E3 pour SUMO [383,384]. Ces activités n'ont cependant pas été confirmées pour toutes les protéines de type TRIM. Néanmoins, il semble que les protéines TRIM puissent se comporter comme des protéines présentant diverses activités dépendant de la nature des protéines avec lesquelles elles interagissent

#### **5.4.1 TRIM19/PML, l'organisateur des PML-NBs**

TRIM19/PML est une protéine uniquement présente chez les vertébrés et impliquée dans une multitude de processus cellulaires (régulation de l'apoptose, de la sénescence, de la réparation de l'ADN, de la réponse antivirale, etc....) [385-387]. PML est définie comme suppresseur de tumeur et de croissance cellulaire et est directement impliquée dans le développement d'une pathologie rare (~100 nouveaux cas par an en France) mais agressive: la leucémie promyélocytaire aiguë (APL pour *Acute Promyelocytic Leukemia*) [388-390]. En outre, l'expression de la protéine PML, et non celle de son ARN messager, se trouve altérée dans de nombreux autres types de cancers suggérant un possible lien entre le développement de ces pathologies et la stabilité de la protéine [391-394]. Ainsi, contrairement à des souris sauvages, les souris *Pml*<sup>-/-</sup> développent plusieurs types de cancers (papillomes, carcinomes et lymphomes) suite à différents traitements carcinogènes [395].

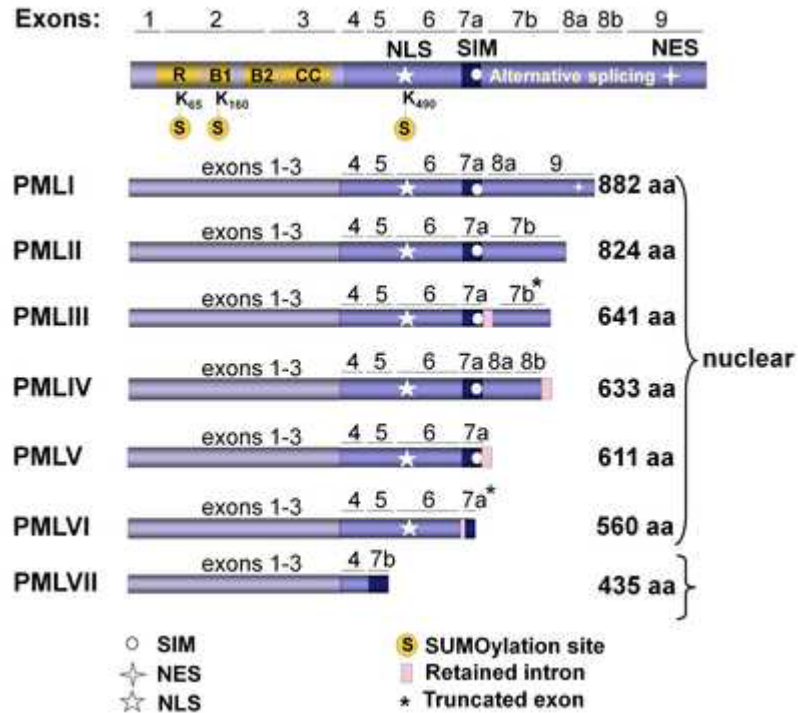
##### **5.4.1.1 PML et la leucémie promyélocytaire aiguë**

La leucémie promyélocytaire aiguë est une maladie mono-génique qui se traduit par l'arrêt de la différenciation des promyélocytes [390,396]. Dans les cellules de la moelle osseuse de patients atteints de leucémie promyélocytaire aiguë, la protéine PML est retrouvée fusionnée au récepteur nucléaire  $\alpha$  de l'acide rétinoïque ( $RAR\alpha$ ). Cette protéine de fusion est issue de la translocation chromosomique t(15:17), où le gène tronqué de *PML* se retrouve juxtaposé à celui de *RAR\alpha* [139,389,397-399]. Comme pour d'autres pathologies induites par des protéines de fusion, PML- $RAR\alpha$  agit comme dominant négatif dans les deux voies de signalisation auxquelles sont associés  $RAR\alpha$  et PML aboutissant au blocage de la différenciation des promyélocytes en myélocytes [400]. De ce fait, la protéine

fusion PML-RAR $\alpha$  agit comme répresseur dans la voie des récepteurs nucléaires aux hormones et altère la formation et la dynamique de structures sub-nucléaires, les corps nucléaires de PML. De façon intéressante, le traitement des cellules pathologiques avec deux agents thérapeutiques, le trioxyde d'arsenic (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) et l'acide tout transrétinoïque (ATRA pour *All TransRetinoic Acid*) induit une rémission de la maladie [401]. L'acide tout transrétinoïque permet la réactivation du processus de différenciation des cellules de la moelle osseuse [402]. Cependant, cette rémission n'est que transitoire lors d'un traitement à l'acide rétinoïque alors qu'elle semble permanente (taux de guérison de 70 à 95% après cinq ans) chez des patients traités par le trioxyde d'arsenic qui cible la fusion via son action sur PML [403,404]. Ceci s'explique par l'apoptose des cellules leucémiques soumises à un traitement au trioxyde d'arsenic.

#### 5.4.1.2 L'organisation structurale de PML

PML fait partie de la famille des protéines contenant un motif TRIM/RBCC qui possède en amino-terminal l'organisation classique des domaines constituant le motif TRIM [1], c'est à dire, un domaine RING, deux domaines B-box et un domaine *coiled-coil*. Ces domaines sont responsables de son oligomérisation et impliqués dans son interaction avec UBC9, l'enzyme E2 de conjugaison pour SUMO [405-407]. Plusieurs isoformes de la protéine PML (isoformes majeures PMLI-VII) sont générées par épissage alternatif de son ARN pré-messager. Toutes présentent le même motif TRIM/RBCC mais différent dans leur extrémités carboxy-terminales [1]. La majorité des isoformes de PML sont des protéines nucléaires du fait de la présence d'un signal de localisation nucléaire [406]. Une séquence SIM est retrouvée dans la plupart des isoformes nucléaires [302,408]. Ainsi, les différences dans la portion carboxy-terminale des isoformes de PML expliquent des localisations subcellulaires (noyau vs cytoplasme) ainsi que des dynamiques sub-nucléaires spécifiques et suggèrent donc des fonctionnalités en partie distinctes pour chacune d'entre elles [409-411].



**Figure 46 :** Représentation schématique des principales isoformes de PML avec l'assemblage des exons.

Les domaines de PML constituant le motif TRIM sont représentés et colorés en jaune, RING (R), B-box1 (B1), B-box2 (B2) et *coiled-coil* (CC), ainsi que le signal de localisation nucléaire (NLS), le signal d'exclusion nucléaire (NES), les sites majeurs de SUMOylation (K65, K160 et K490) et le motif d'interaction avec SUMO (SIM). Le numéro des exons constituant chacune des isoformes est indiqué au dessus de chacune des isoformes. D'après Maroui, MA., *et al.*, *PloS One.*, 2012; 7 (9) [412]

### 5.4.1.3 Les corps nucléaires de PML

Bien que principalement retrouvées diffuses dans le noyau des cellules, les protéines PML sont aussi à l'origine de la formation « d'organelles nucléaires » sphériques appelées corps nucléaires de PML régulés au cours du cycle cellulaire [413-416]. Généralement, le noyau d'une cellule saine de mammifère compte une quinzaine de corps nucléaires de PML. Leur nombre, leur taille et leur composition varient en fonction de nombreux stimuli [417-421]. Ces organelles sont retrouvées associées à la matrice nucléaire, réseau dynamique de fibres qui semble jouer un rôle dans le métabolisme et l'organisation spatiale

de l'ADN [417]. Ceci indique un rôle possible de ces corps nucléaires dans la régulation de l'ADN [422]. À ce jour, près de deux cents protéines ont été répertoriées pour être recrutées de manière plus ou moins transitoire aux corps nucléaires de PML [423]. Ces protéines sont impliquées dans divers processus (la sénescence, l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN, la réponse antivirale). Il est à noter que la formation adéquate de ces corps nucléaires nécessite la modification post-traductionnelle de PML par SUMO, mais aussi, son interaction non-covalente avec SUMO [346,408]. Ainsi, divers stress, et notamment des protéines virales, sont connus pour désorganiser les corps nucléaires de PML en ciblant la machinerie de SUMOylation mais aussi la SUMOylation de PML [223,424,425].

#### **5.4.1.4 Les fonctions associées aux corps nucléaires de PML**

À ce jour, les corps de PML restent des structures nucléaires énigmatiques. Un temps, définis comme réservoirs de stockage de protéines, plus ou moins inertes, les corps nucléaires de PML sont en fait des structures dynamiques, régulées au cours du cycle cellulaire mais aussi par plusieurs stimuli [387,426]. De part la nature des fonctions des protéines s'associant au corps nucléaires de PML, ceux-ci ont été caractérisés comme des sites actifs régulant la transcription, des senseurs des dommages à l'ADN et des infections virales, des zones de dégradation des protéines par le protéasome et par la voie des caspases [427]. Ceci indique que les corps nucléaires de PML sont des structures multifonctionnelles. Une récente étude *in silico* visant à mieux cerner les fonctions des corps nucléaires de PML a associé ces structures à des *hot spots* pour la SUMOylation des protéines [423]. En effet, parmi toutes les protéines connues pour interagir avec PML ou pour s'associer avec les corps nucléaires de PML (près de 200 à ce jour), on retrouve toutes les enzymes impliquées dans la voie de SUMOylation. De plus, UBC9, l'enzyme de conjugaison E2 pour SUMO, est essentielle à la formation des corps nucléaires de PML [227]. Ainsi, près de la moitié des protéines associées à ces structures nucléaires sont modifiées par SUMO et/ou interagissent de manière non-covalente avec SUMO. D'ailleurs, un grand nombre d'entre elles dépend de leurs interactions avec les protéines SUMO pour interagir avec PML ou bien être recrutée aux corps nucléaires de PML [273,318,428-432].



Ceci suggère que la SUMOylation joue un rôle primordial dans la composition et la dynamique de formation des corps nucléaires de PML. Ainsi, il est suggéré ici que TRIM19/PML rempli toutes les fonctions d'une protéine d'échafaudage en regroupant toutes les activités enzymatiques de la voie de SUMOylation et de nombreuses protéines interagissant avec SUMO au sein de ses corps nucléaires.

#### **5.4.1.5 Régulation de la stabilité de PML par les modifications post-traductionnelles**

Il a été démontré que PML est la cible de plusieurs modifications post-traductionnelles qui semblent étroitement liées au contrôle de son expression, et notamment sa phosphorylation [417]. Le trioxyde d'arsenic ciblant spécifiquement la portion PML dans la protéine fusion PML-RAR $\alpha$ , la plupart des travaux se sont concentrés sur les effets du trioxyde d'arsenic sur la stabilité de PML [433]. Le trioxyde d'arsenic est connu pour activer la voie des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) et notamment celles des ERKs (*Extracellular-signal-Regulated protein Kinases*) et de p38 MAPK. Ainsi, il a été montré que PML est phosphorylé sur plusieurs résidus, adjacents à son domaine RING, suite à un traitement par le trioxyde d'arsenic [433]. La phosphorylation de ces résidus régule positivement le niveau de SUMOylation de PML et augmente de façon concomitante l'apoptose des cellules. Ce phénomène est aussi observé lorsque des cellules leucémiques sont traitées par le trioxyde d'arsenic, traitement induisant la dégradation de la protéine fusion PML-RAR $\alpha$  [433,434]. A ce jour, aucune étude n'a adressé l'impact de la phosphorylation de ces résidus sur l'interaction du domaine RING de PML avec UBC9 et/ou une ligase E3 pour SUMO. Récemment PIAS1, une des ligases E3 pour SUMO, été caractérisée comme impliquée dans la SUMOylation et la dégradation de PML [372]. Outre l'induction de la phosphorylation, le trioxyde d'arsenic induit la SUMOylation de PML. Ceci corrèle avec la co-localisation de PML avec plusieurs des sous-unités du protéasome et sa dégradation par le trioxyde d'arsenic [412,435]. De plus, le traitement de différentes lignées cellulaires cancéreuses par des inhibiteurs du protéasome induit une stabilisation de l'expression de PML [391,436-438]. De façon intéressante, plusieurs ligases E3 pour l'Ubiquitine ont été caractérisées pour interagir avec PML et pour induire sa dégradation dépendante de son Ubiquitination via différents mécanismes [439]. Notamment, RNF4 a

été proposée comme importante dans la dégradation de PML induite par l'arsenic en interagissant spécifiquement avec PML poly-SUMOylé [131,440,441]. Il a été proposé que les séquences SIM en série de RNF4 lui permettent d'interagir avec les chaînes de poly-SUMO couplées à PML et d'induire l'Ubiquitination de PML poly-SUMOylée [131]. Toutes ces données indiquent que la stabilité de PML en présence de trioxyde d'arsenic est sous le contrôle de la voie de l'Ubiquitine et du protéasome. Il est à noter que le SIM de PML, est requis pour la dégradation de PML induite par le trioxyde d'arsenic [412,441].

Récemment, PML a été identifiée comme une cible de la kinase CK2 [437]. CK2 est une kinase constitutivement active pouvant être suractivée par la voie p38 MAPK lors de stress cellulaires (choc osmotique, UV) [391,437,442,443]. PML présente une séquence de résidus sérine adjacente au SIM qui est ciblée par CK2 et l'induction de la phosphorylation par CK2 engendre une dégradation de PML par la voie de l'Ubiquitine et du protéasome. Sachant que la phosphorylation de ces résidus n'est pas requise pour la dégradation de PML dépendante du trioxyde d'arsenic mais qu'elle l'est pour la dégradation de PML induite par CK2, il est possible que différentes voies de dégradation soient mises à contribution [441]. .

#### **5.4.1.6 Les évènements moléculaires à la base de la dégradation de PML-RAR $\alpha$ par le trioxyde d'arsenic**

La dégradation de la protéine fusion PML-RAR $\alpha$  étant une condition *sine qua non* pour la rémission de la maladie chez les patients atteints de leucémie promyélocytaire aiguë, plusieurs études ont été menées dans le but de mieux caractériser les déterminants moléculaires impliqués dans la régulation de sa stabilité.

Comparativement aux cellules non-pathologiques, ces cellules leucémiques présentent une altération de la quantité, de la taille et de la distribution sub-cellulaire des corps de PML (nombreux corps nucléaires de petites tailles) [444]. Cette caractéristique est directement liée à l'expression de la protéine fusion PML-RAR $\alpha$  qui altère probablement les fonctions de PML et de RAR $\alpha$ . Il est à noter que le traitement de cellules leucémiques par l'acide tout transrétinoïque ou le trioxyde d'arsenic conduit à la reformation des corps nucléaires. Cette réorganisation est à corréluer avec la dégradation de la protéine fusion

PML-RAR $\alpha$  [445-447]. En outre, le trioxyde d'arsenic cible le fragment PML de la protéine fusion PML-RAR $\alpha$  et induit une apoptose des cellules leucémiques [445,448]. Cependant, il est à noter que l'apoptose induite par le trioxyde d'arsenic n'est pas dépendante de PML ou de PML-RAR $\alpha$  puisque des cellules embryonnaire de souris *Pml*<sup>-/-</sup> entrent aussi en apoptose lorsque soumises au trioxyde d'arsenic [449].

D'un point de vue moléculaire, le trioxyde d'arsenic induit, comme pour la protéine PML sauvage, la phosphorylation, l'oligomérisation et la relocalisation de PML-RAR $\alpha$  à la matrice nucléaire [433,450,451]. Par analogies avec PML, ces évènements seraient à la base de la SUMOylation suivie de la dégradation de la protéine fusion PML-RAR $\alpha$  par la voie de l'Ubiquitine et du protéasome [435]. En effet, le trioxyde d'arsenic induit une co-localisation de PML-RAR $\alpha$  avec RNF4, la ligase E3 pour l'Ubiquitine [440]. Il est à noter que le niveau de SUMOylation de PML-RAR $\alpha$  est moins important que celui de la protéine sauvage [452,453]. En conséquence, la cinétique de dégradation de PML-RAR $\alpha$  pourrait être altérée tel que proposé [450]. De façon intéressante, et comparativement à la protéine PML sauvage, la protéine de fusion PML-RAR $\alpha$  ralentie le processus d'apoptose de cellules traitées par le trioxyde d'arsenic [433]. Cette particularité pourrait être directement reliée à la cinétique de SUMOylation de la protéine fusion.

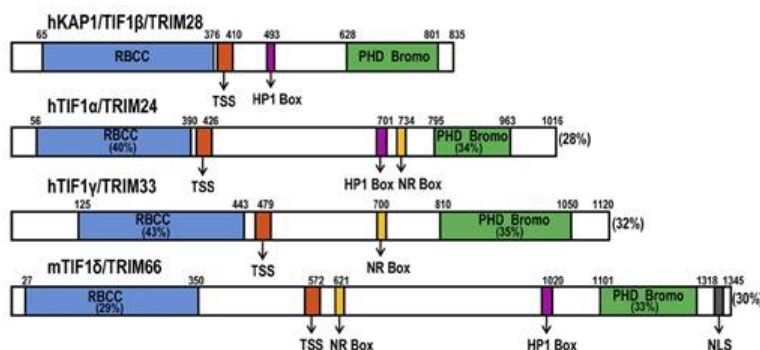
## 5.4.2 TRIM28/TIF1 $\beta$ , le co-répresseur universel des protéines KRAB-Multidoigt de zinc

TIF1 $\beta$  est une protéine nucléaire ubiquiste retrouvée chez les vertébrés et elle est indispensable au développement embryonnaire chez *M.musculus* [454]. TIF1 $\beta$  est principalement considéré comme le corépresseur universel des protéines KRAB-Multidoigt de zinc comprenant un domaine KRAB (*KRüppel-Associated Box*) et un domaine Multidoigt de zinc de type C2H2 (domaine dans lequel deux résidus Cystéine et deux résidus Histidine coordonnent un atome de zinc) [455-458]. Ces derniers constituent une des plus grandes classes de facteurs de transcription potentiels chez les vertébrés [459]. À ce jour, le domaine KRAB des protéines KRAB-Multidoigt de zinc est le domaine répresseur connu qui présente l'activité de répression la plus forte [460-462]. Selon le modèle courant, la capacité de répression transcriptionnelle des protéines KRAB-Multidoigt de zinc dépend de l'interaction de leur domaine KRAB avec la protéine TIF1 $\beta$  [456,463]. Ainsi, les protéines KRAB-Multidoigt de zinc se lient aux acides nucléiques via leur domaine doigts de zinc et répriment la transcription via le recrutement de TIF1 $\beta$  par leur domaine KRAB [464]. En outre, TIF1 $\beta$  pourrait se comporter comme un oncogène. En effet, TIF1 $\beta$  favorise la dégradation de P53 par MDM2 et son expression est significativement élevée dans des cellules cancéreuses [465,466].

### 5.4.2.1 L'organisation structurale et les partenaires d'interaction de TIF1 $\beta$

Tel que mentionné précédemment, la protéine TIF1 $\beta$  appartient à la classe VI des protéines TRIM (**Figure 45**). Cette classe comprend trois autres membres qui sont TIF1 $\alpha$ , TIF1 $\delta$  et TIF1 $\gamma$  [455,467,468]. Tous présentent le même agencement de domaines. Ceux-ci comprennent un motif TRIM/RBCC, précédemment décrit, un motif HP1BD (*Heterochromatin Protein1 Binding Domain*) ainsi qu'un domaine PHD (*Plant-Homeo Domain*) qui interagit fonctionnellement de façon intramoléculaire avec le domaine Bromo qui lui est adjacent (**Figure 47**). Comme TIF1 $\beta$ , toutes les protéines TIF1 présentent des capacités de régulation de la transcription.

Les domaines RING et B-box du motif TRIM de TIF1 $\beta$  sont requis pour l'interaction avec le domaine KRAB des protéines KRAB-Multidoigt de zinc alors que le domaine *coiled-coil* est impliqué dans l'homo-oligomérisation de TIF1 $\beta$ , et la formation d'hétéro-oligomères avec les autres membres de la famille TIF1 [380,469-471]. Comme pour plusieurs co-régulateurs de transcription, TIF1 $\beta$  interagit avec les protéines de l'hétérochromatine HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$  et HP1 $\delta$  via son motif HP1BD. Cette interaction est importante pour le processus de différenciation cellulaire et pour l'activité répressive de TIF1 $\beta$  [472-475]. Les domaines PHD et Bromo sont généralement retrouvés chez les protéines associées à la chromatine et peuvent reconnaître certaines modifications post-traductionnelles des histones. Dans le cas de TIF1 $\beta$ , les domaines PHD et Bromo n'ont pas d'affinité pour les histones, que ces derniers soient modifiés ou non par des MPTs [476]. La résolution des structures tridimensionnelles des domaines PHD et Bromo de TIF1 $\beta$  révèle une interconnexion fonctionnelle de ces deux domaines [476,477]. En effet, les domaines PHD et Bromo de TIF1 $\beta$  sont impliqués dans le recrutement de complexes participant au remodelage de la chromatine, à la déacétylation et à la méthylation des histones [478,479]. Ainsi, TIF1 $\beta$  permet une répression de la transcription en agissant comme une protéine d'échafaudage qui coordonne le recrutement plusieurs protéines inhibant la transcription.



**Figure 47** : Représentation schématique des protéines de la famille TIF1.

Les noms et les positions des domaines TRIM/RBCC (bleu), TSS (*TIF1 Signature Sequence*, orange), HP1 box (domaine d'interaction avec les protéines HP1, mauve), NR box (domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires, jaune), NLS (gris) et PHD-Bromo (vert) sont indiquées. Les pourcentages d'identités de séquences totales et entre domaines sont indiquées entre parathensèse. D'après Iyengar S. and Farnham PJ., *J Biol Chem.*, 2011; 286(30):26267-76 [480]

#### 5.4.2.2 Les fonctions de TIF1β dans la transcription

De par la nature et la fonction des différents domaines présents dans la portion carboxy-terminale de TIF1β, il est possible de le cataloguer dans la liste des co-régulateurs de transcription. Ainsi, dépendamment du type de facteur transcriptionnel avec lequel il interagit, TIF1β présente la fonction soit de corépresseur soit dans certains cas de co-activateur.

##### 5.4.2.2.1 *TIF1β*, le corépresseur universel des KRAB-Multidoigt de zinc

TIF1β agit comme le corépresseur universel des membres d'une très grande sous-famille de facteurs de transcription, les protéines à domaines doigt de zinc de la famille KRAB-Multidoigt, dont on retrouve près de 350 membres encodés par le génome humain [481]. En effet, TIF1β interagit avec le domaine KRAB de toutes les protéines KRAB-Multidoigt de zinc caractérisées à ce jour. Ces protéines contiennent des domaines doigt de zinc, de type C2H2, répétés en tandem qui assurent leur liaison à l'ADN et un domaine de régulation de la transcription situé en amino-terminal, le domaine KRAB [482]. Ce dernier présente une très forte affinité d'interaction pour le motif TRIM/RBCC de TIF1β. Lorsque

liées à leur promoteur, les protéines KRAB-Multidoigt de zinc recrutent leur corépresseur, TIF1 $\beta$ , qui induit une répression de la transcription. Cette répression dépend de l'intégrité des domaines PHD et Bromo présents dans la partie carboxy-terminale de TIF1 $\beta$  [478,479]. Ces derniers recrutent de partenaires répresseurs qui induisent une inhibition de la transcription via la formation d'hétérochromatine (chromatine réfractaire à la transcription) [472,483].

De plus, le motif HP1BD de TIF1 $\beta$  interagit directement avec le domaine chromo-shadow des protéines de l'hétérochromatine (HP1 $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) [472,473,484]. Ces dernières sont requises dans le processus de compaction de la chromatine via la reconnaissance de marques épi-génétiques spécifiques (H3K9me3 pour tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3) [485]. Ces marques sont généralement retrouvées dans les régions réprimées de l'euchromatine ainsi que dans les régions d'hétérochromatine réfractaires à la transcription. Fait intéressant, les domaines PHD et Bromo de TIF1 $\beta$  sont requis pour le recrutement de KMD1/SETDB1, une enzyme méthyl-transférase responsable des marques épi-génétiques spécifiquement reconnues par les protéines HP1 [478]. Ces données sont corroborées par la cartographie génomique des sites de liaison de TIF1 $\beta$  [480]. Celle-ci révèle que TIF1 $\beta$  est présent sur deux catégories de sites de liaison sur l'ADN indiquant deux fonctions potentiellement différentes pour TIF1 $\beta$ . La première catégorie de site de liaison de TIF1 $\beta$  correspond généralement à la région promotrice des gènes encodant des protéines à Multidoigt de zinc et présente des marques épi-génétiques permissives à la transcription. En outre, le recrutement de TIF1 $\beta$  sur ces sites est indépendant de sa capacité à interagir avec les protéines KRAB-Multidoigt de zinc. En effet, un mutant de TIF1 $\beta$  délété de son domaine d'interaction avec les protéines KRAB est toujours présent sur ce type de site. Le deuxième type de site correspond généralement à la région 3' codante de la plupart des gènes de protéines à Multidoigt de zinc. Dans ce cas, le site de liaison de TIF1 $\beta$  corrèle avec celui de SETDB1 et les marques épi-génétiques répressives qui lui sont associées (H3K9me3, HP1 $\beta$ ). De plus, le recrutement de TIF1 $\beta$  sur ces sites nécessite son interaction avec le domaine KRAB des protéines KRAB-Multidoigt de zinc et engendre une compaction de la chromatine sur plusieurs dizaine de kilo paires de bases

[480,486]. Ces données indiquent un mécanisme d'autorégulation des protéines KRAB-Multidoigt de zinc et suggèrent que différents facteurs sont responsables de la présence de TIF1 $\beta$  sur les deux catégories de sites.

#### 5.4.2.2.2 *TIF1 $\beta$ agit comme co-activateur*

Bien que la fonction de corépresseur soit la plus étudiée et donc la mieux caractérisée quelques études ont défini TIF1 $\beta$  en tant que co-activateur transcriptionnel. Ainsi, TIF1 $\beta$  agit comme coactivateur de la transcription dépendante de deux facteurs de transcription, les récepteurs nucléaires (GR et NGFI-B pour *Nerve Growth Factor IB*) et de deux régulateurs de transcription C/EBP (*Ccaat/Enhancer Binding Protein*) et TRIP-Br1 (*Transcriptional Regulator Interacting with PHD-Bromodomain1*) lorsque recruté à leurs promoteurs cibles [487-489]. Cependant, les mécanismes moléculaires à l'origine de la fonction activatrice de TIF1 $\beta$  restent, à ce jour, inexplorés.

Il est donc tentant de suggérer que les fonctions de coactivateur et de corépresseur de TIF1 $\beta$  soient dictées par la nature des facteurs de transcription avec lesquels il interagit.



## 6 Hypothèses et objectifs

Dans les sections précédentes, nous avons vu que plusieurs stratégies sont employées par des protéines d'échafaudage à domaine RING afin de coordonner des événements moléculaires permettant la transduction de signaux. Parmi ces stratégies, les MPTs de la famille de l'Ubiquitine, telles les petites protéines SUMOs, jouent un rôle essentiel. Sachant que les protéines SUMO peuvent agir de manière covalente et non-covalente sur leur substrat, nous avons exploré les impacts fonctionnels ainsi que la régulation que peuvent engendrer la liaison covalente ou non-covalente de SUMO sur les trois protéines d'échafaudage modèles que sont TIF1 $\beta$ /TRIM28, PIAS1 et PML/TRIM19. Notre principale hypothèse est que l'interaction de ces protéines d'échafaudage avec les protéines SUMO est requise pour leurs fonctions.

Sachant que la SUMOylation est souvent associée à l'inhibition de l'activité de nombreux régulateurs transcriptionnels, notre hypothèse secondaire est que la SUMOylation du corépresseur de la transcription TIF1 $\beta$  survient au niveau de son domaine de répression.

Les objectifs de l'étude sur TIF1 $\beta$  sont donc :

- 1- D'identifier les sites de SUMOylation de TIF1 $\beta$ .
- 2- De déterminer la contribution de SUMO dans l'activité répressive de TIF1 $\beta$ .
- 3- D'identifier les déterminants structuraux de TIF1 $\beta$  importants dans la régulation de sa SUMOylation.

Il a été proposé que SUMO, lorsque couplé de façon covalente à des facteurs de transcription, puisse recruter des complexes répresseurs. Ceci expliquerait le rôle de répression de la SUMOylation. D'autre part, plusieurs des enzymes de la machinerie de SUMOylation, tel PIAS1 ou UBC9, répriment la transcription indépendamment de leur

activité catalytique lorsque recrutées par de nombreux facteurs de transcription. Nous postulons que les interactions non-covalentes avec SUMO participe à la stabilisation du complexe PIAS1:UBC9 et dicte son activité répressive.

L'objectif principal de ce projet sur PIAS1 est de déterminer le rôle des interactions non-covalentes avec SUMO dans la formation et dans l'activité répressive du complexe PIAS1:UBC9.

Les objectifs spécifiques de l'étude sur PIAS1 sont donc :

- 1- La caractérisation des interactions non-covalentes de SUMO avec PIAS1 et UBC9 par des études *in vitro* (ITC, RMN) et *in vivo* (BRET).
- 2- L'étude du rôle de la phosphorylation du SIM de PIAS1 dans ces interactions.
- 3- L'étude de la contribution de l'interaction non-covalente de SUMO dans la répression.

Enfin, sachant que la séquence SIM de PML est requise pour sa dégradation induite par le trioxyde d'arsenic (article en annexe) et que la phosphorylation de résidus sérine adjacents au SIM est requise pour sa dégradation induite par le stress, nous postulons que l'interaction de SUMO avec le SIM de PML peut être modulé par la phosphorylation.

Les objectifs de l'étude sur PML sont donc :

- 1- La caractérisation des interactions non-covalentes de SUMO avec PML par des études *in vitro* (ITC, RMN) et *in vivo* (BRET).
- 2- La détermination des structures cristallographiques des complexes entre SUMO1 et le SIM phosphorylé de PML.
- 3- L'étude du rôle de la phosphorylation du SIM de PML dans ces interactions.

## II. RÉSULTATS

## 1 Préambule de la première étude

À la date à laquelle nos recherches ont débuté, TIF1 $\beta$ , le corépresseur des KRAB-Multidoigt de zinc, n'était pas connu pour être modifié par SUMO. Cependant, la SUMOylation de plusieurs protéines TRIM, dont celle de PML et TIF1 $\alpha$  avait été caractérisée [452,490]. Ainsi, sachant que SUMO était surtout associé à la répression transcriptionnelle de plusieurs co-régulateurs, nous avons postulé que TIF1 $\beta$  était un substrat pour SUMO et que sa SUMOylation dictait la fonction corépressive de TIF1 $\beta$ . Ce projet s'est inscrit dans la continuité des recherches effectuées au laboratoire sur des protéines de la famille des KRAB-Multidoigt de zinc et sur leur régulation notamment par la SUMOylation.

Les résultats présentés dans ce chapitre sont exposés sous la forme d'un article scientifique publié dans la revue *The Journal of Biological Chemistry* en février 2007. Avec Muriel Aubry, j'ai contribué à la conception des expériences, à l'analyse des résultats ainsi qu'à la rédaction du manuscrit. Celui-ci a par la suite été révisé par Delphine Germain-Desprez. Lors de ces travaux, j'ai généré toutes les constructions (mutants ponctuels et mutants de délétion) qui ont permis l'identification des sites de SUMOylation de TIF1 $\beta$  et j'ai réalisé les expériences de SUMOylation in vivo (Figures 1, 2 5 et 7) ainsi que la majorité des essais de gènes rapporteurs (Figure 3 et 4A). Delphine Germain-Desprez a effectué les expériences de BRET et les sous-clonages s'y rapportant. Phuong Huynh une stagiaire de premier cycle et Patricia Estephan ont généré différents mutants ponctuels et participé aux essais de gènes rapporteurs et de BRET.

## Article 1

Cette étude a été publiée dans *The Journal of Biological Chemistry*.

Xavier H. Mascle., Delphine. Germain-Desprez., Phuong. Huynh., Patricia. Estephan and Muriel. Aubry. SUMOylation of TIF1 $\beta$  co-repressor of KRAB multifinger proteins is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007; Vol :10190-10202. © The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

**SUMOYLATION OF TIF1 $\beta$  CO-REPRESSOR OF KRAB MULTIFINGER PROTEINS IS REQUIRED FOR ITS TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY AND IS MODULATED BY THE KRAB DOMAIN**

*Xavier H. Mascle., Delphine. Germain-Desprez., Phuong. Huynh., Patricia. Estephan and Muriel. Aubry\**

Département de Biochimie, Université de Montréal C.P. 6128 Succursale Centre-Ville,  
Montréal, QC H3C 3J7 Canada

**\*Correspondence:**

Muriel Aubry, Département de Biochimie, Université de Montréal C.P. 6128 Succursale  
Centre-Ville, Montréal, QC H3C 3J7 Canada.

Telephone: 514-343-6322

Fax: 514-343-2210

Running Title: KRAB-regulated TIF1 $\beta$  sumoylation is required for repression

**ABSTRACT**

Small ubiquitin-related modifier (SUMO) has emerged as a key posttranslational modulator of protein functions. Here we show that TIF1 $\beta$ , a developmental regulator proposed to act as a universal co-repressor for the large family of KRAB domain-containing zinc finger proteins, is a heavily SUMO-modified substrate. A combined analysis of deletion and punctual mutants identified TIF1 $\beta$  as a multi-lysine acceptor for SUMO which specifically targets six lysine residues (Lys<sup>554</sup>, Lys<sup>575</sup>, Lys<sup>676</sup>, Lys<sup>750</sup>, Lys<sup>779</sup> and Lys<sup>804</sup>) within TIF1 $\beta$  carboxy-terminal repressive region. Reporter gene assays indicate that TIF1 $\beta$  requires SUMO-modification for its repressive activity. Indeed, sumoylation-less mutants failed to recapitulate TIF1 $\beta$ -dependent repression. TIF1 $\beta$  homo-dimerization properties and interaction with the KRAB domain are preserved in the mutants with lysine to arginine substitutions as confirmed by *in vivo* bioluminescence resonance energy transfer (BRET). Using histone deacetylase (HDAC) inhibitors, we also demonstrate that TIF1 $\beta$  sumoylation is a pre-requisite for the recruitment of HDAC and that TIF1 $\beta$  SUMO-dependent repressive activity involves both HDAC-dependent and HDAC-independent components. Finally, we report that, in addition to rely on the integrity of its PHD finger and on its self-oligomerization, TIF1 $\beta$  sumoylation is positively regulated by its interaction with KRAB domain-containing proteins. Altogether, our results provide new mechanistic insights into TIF1 $\beta$  transcriptional repression and suggest that KRAB multifinger proteins not only recruit TIF1 $\beta$  co-repressor to target genes but also increase its repressive activity through enhancement of its sumoylation.

## INTRODUCTION

TIF1 $\beta$  (KRIP-1, KAP-1, TRIM 28) is an essential developmental regulator belonging to the TIF1 (Transcription intermediary factors 1) family and is believed to act as the universal transcriptional co-repressor for the large family of vertebrate-specific Krüppel-associated box (KRAB) domain-containing zinc finger transcription factors (Bellefroid, Poncelet et al. 1991; Friedman, Fredericks et al. 1996; Kim, Chen et al. 1996; Moosmann, Georgiev et al. 1996; Cammas, Mark et al. 2000; Looman, Abrink et al. 2002; Urrutia 2003). All TIF1 family members (TIF1 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  and bonus) are characterized by an amino-terminal Tri-partite Motif (named TRIM or RBCC) composed of a RING (Really Interesting New Genes) finger followed by 2 B-boxes and a coiled-coil domain as well as a carboxy-terminal bi-partite motif encompassing a PHD (Plant HomeoDomain) finger and a bromo-domain (Friedman, Fredericks et al. 1996; Le Douarin, Nielsen et al. 1996; Venturini, You et al. 1999; Beckstead, Ortiz et al. 2001; Khetchoumian, Teletin et al. 2004). The RBCC motif of TIF1 $\beta$  is known to homo-dimerize and to specifically interact with the KRAB domain of KRAB multifinger proteins (Peng, Begg et al. 2000; Peng, Feldman et al. 2002; Germain-Desprez, Bazinet et al. 2003). The TIF1 $\beta$  PHD finger and bromo-domain were reported to cooperate in transcriptional repression via recruitment of repressive enzymatic activities such as histone deacetylase complexes (NurD/Mi2- $\alpha$ ) and a methyltransferase protein (SETDB1) (Schultz, Friedman et al. 2001; Schultz, Ayyanathan et al. 2002). Moreover, TIF1 $\beta$  (like all TIF1 family members) displays the canonical amino acid motif, PxVxL, interacting with HP1 heterochromatin proteins (HP1 $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) involved in gene silencing (Nielsen, Ortiz et al. 1999; Lechner, Begg et al. 2000; Lechner, Schultz et al. 2005). Recently, the TIF1 $\beta$ /HP1 interaction was shown to be essential for histone modifications associated with transcriptional repression and progression through cellular differentiation (Cammass, Oulad-Abdelghani et al. 2002; Ayyanathan, Lechner et al. 2003; Cammass, Herzog et al. 2004; Sripathy, Stevens et al. 2006).



In attempts to unveil other determinants involved in the strong repressive activity mediated by TIF1 $\beta$ , we found that this co-repressor is a SUMO target protein. Recent studies have demonstrated that post-translational modification of transcription factors and their co-regulators by the small ubiquitin-related modifier protein, SUMO, can modulate their transcriptional activity (Gill 2003; Verger, Perdomo et al. 2003; Girdwood, Tatham et al. 2004; Ohshima, Koga et al. 2004; Sentis, Le Romancer et al. 2005). The four mammalian SUMO, SUMO1, -2, -3 and -4, all resemble ubiquitin in terms of tertiary structure and their mechanism of conjugation to protein substrate. However, unlike ubiquitination, the main known functional consequences of SUMO modification appear not to be degradation (Bayer, Arndt et al. 1998; Tatham, Jaffray et al. 2001; Bohren, Nadkarni et al. 2004; Gill 2004; Huang, Ko et al. 2004). Several reports illustrate the direct involvement of SUMO modification in gene regulation and in particular in gene repression (Girdwood, Bumpass et al. 2003; Shio and Eisenman 2003; Long, Wang et al. 2004; Nakagawa and Kuzumaki 2005; Perdomo, Verger et al. 2005; Fernandez-Lloris, Osses et al. 2006; Gong, Brackertz et al. 2006; Hsu, Sarker et al. 2006; Motohashi, Katsuoka et al. 2006; Nathan, Ingvarsdottir et al. 2006; Tiefenbach, Novac et al. 2006). To explain the transcriptional repression induced by SUMO modified proteins, some studies have suggested that SUMO proteins display intrinsic repressive activity, whereas others have proposed that SUMO modified transcription factors can recruit HDAC proteins or HDAC-containing complexes (Ross, Best et al. 2002; Shio and Eisenman 2003; Yang and Sharrocks 2004; Chupreta, Holmstrom et al. 2005; Gill 2005; Binda, Roy et al. 2006; Gong, Brackertz et al. 2006; Motohashi, Katsuoka et al. 2006; Rosendorff, Sakakibara et al. 2006).

SUMO proteins form an isopeptide bond between their carboxy-terminal glycine and a  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-amino group of a lysine residue on their target proteins (Saitoh, Pu et al. 1997). The target lysine to which SUMO is conjugated is usually contained within a short consensus sequence,  $\psi$ KXE/D (where  $\psi$  represents a large hydrophobic residue) (Melchior 2000). The SUMO conjugation process, so called sumoylation, involves SUMO-activating E1 enzyme (SAE1/SAE2 hetero-dimer) and a SUMO-conjugating E2 enzyme (UBC9)

(Okuma, Honda et al. 1999). Furthermore, SUMO-specific E3 ligases that enhance SUMO conjugation have also been described. The known E3 ligases belong to three structurally independent protein classes represented by RanBP2, Pc2 and PIAS family members (protein inhibitor of activated STAT) (Azuma and Dasso 2002; Kotaja, Karvonen et al. 2002; Kagey, Melhuish et al. 2003; Pichler, Knipscheer et al. 2004). SUMO E3 ligases display limited substrate specificity and are reported to stabilize the interaction between the E2 conjugating enzyme, UBC9, and the target substrates to be sumoylated (Okuma, Honda et al. 1999; Melchior, Schergaut et al. 2003; Matunis and Pickart 2005; Reverter and Lima 2005). Like ubiquitination, sumoylation is a dynamic and reversible process due to the existence of several SUMO-specific proteases, referred to as members of the SENP (Sentrin proteases) family. These proteases are involved both in the maturation of SUMO as carboxy-terminal hydrolases and in the removal of SUMO from its target protein as isopeptidases (Melchior, Schergaut et al. 2003).

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

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Expression vectors:*

*TIF1 $\beta$*  constructs: Full-length TIF1 $\beta$  (GenBank Accession Number NM\_011588; aa 1–834) was derived from pMFH-Gal4-TIF1 $\beta$  construct (generous gift from Dr. J. V. Bonventre) (Witzgall, O'Leary et al. 1994; Kim, Chen et al. 1996). It was subcloned as an EcoRV-NotI fragment into the blunted BamHI site of pCGN (Tanaka and Herr 1990) (HA-TIF1 $\beta$ ), as an EcoRI-NotI fragment into pBluescript SK+ (SK+-TIF1 $\beta$ ) and as an EcoRI-NotI blunted fragment into the EcoRI-SmaI sites of the yeast pGBT9 vector (encoding the first 1-147 amino acids of the yeast transcription factor Gal4, that corresponds to the DNA binding domain) (Clontech) (Gal4DBD-TIF1 $\beta$ ). To generate myc-tagged TIF1 $\beta$ , a ClaI-NotI blunted fragment was transferred from SK+-TIF1 $\beta$  into the blunted XbaI site of pcDNA3.1-myc (pcDNA3.1-myc-TIF1 $\beta$ ). Flag-HA-TIF1 $\beta$  was obtained by subcloning an EcoRV-NotI fragment from SK+-TIF1 $\beta$  into pcDNA3-Flag-HA (pcDNA3-Flag-HA-TIF1 $\beta$ ). pcDNA3.1-Gal4DBD-TIF1 $\beta$  construct was obtained by subcloning Gal4DBD-TIF1 $\beta$  as an HindIII-SalI fragment from pGBT9 vector (Clontech) into the HindIII-XhoI sites of pcDNA3.1 (Invitrogen). Carboxy-terminal deletion mutants Gal4DBD-TIF1 $\beta$  aa1-735 ( $\Delta$ 1) or Gal4DBD-TIF1 $\beta$  aa1-675 ( $\Delta$ 2) were generated from pcDNA3.1-Gal4DBD-TIF1 $\beta$  owing to the removal of the KpnI-XbaI or EcoNI-XbaI carboxy-terminal fragments, respectively. Gal4DBD-TIF1 $\beta$  aa1-563 ( $\Delta$ 3) or Gal4DBD-TIF1 $\beta$  aa1-482 ( $\Delta$ 4) were obtained by subcloning a HindIII-SacI or HindIII-AflII fragments from pGBT9-TIF1 $\beta$  into the HindIII-EcoRV sites of pcDNA3.1, respectively. TIF1 $\beta$  devoid of the N-terminal homo-dimerization RBCC motif and encoding the HP1 binding domain, the PHD finger and the bromo-domain ( $\Delta$ N-TIF1 $\beta$ ; from nucleotides 1806 to the stop codon of TIF1 $\beta$  at position 3063) was amplified by PCR and cloned in phase as a BamHI fragment into the BamHI site of pCGN and as a BamHI-SalI fragment into pGBT9 to generate pGBT9  $\Delta$ N-TIF1 $\beta$ . A Gal4DBD- $\Delta$ N-TIF1 $\beta$  construct was obtained by subcloning the HindIII-SalI

fragment from pGBT9  $\Delta$ N-TIF1 $\beta$  into the HindIII-XhoI sites of pCDNA3.1. TIF1 $\beta$  point mutations were generated using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) starting with fragments of the wild type cDNA cloned in pBluescript SK<sup>+</sup>. Only the sense oligonucleotides are indicated here for L271P (5'gggacaagcatgccacacctcagaaaaac3' where a silent *SphI* restriction enzyme site is incorporated), L307P (5'tcatgaaggagccgaataagcggg3'), K554R (5'cctggcatggcaattgtcagggagaagag3' where a silent *MunI* restriction enzyme site is incorporated), K575R (5'cgagggtccggaaccaggcctgtgttc3' where a silent *BspEI* restriction enzyme site is incorporated), K676R (5'gtgctcccggacctaaggaggagaagatgg3' where a silent *PfoI* restriction enzyme site is incorporated), K750R (5'cgtgctcgtctccaagagaggctgtcacc3' where a silent *BsmBI* restriction enzyme site is incorporated), K779R (5'ctgaggacagggcagatgtacagtcacc3' where a silent *BsRGI* restriction enzyme site is incorporated) and K804R (5'ggtgacaccaggttttcagctgtgtg3' where a *PvuII* restriction enzyme site is incorporated), H,C648,651A,A (5'atcttgcttcgccctggatgccacctcc3') mutations. All mutants were verified by DNA sequencing and mutated fragments were subcloned in replacement of the wild type fragment in appropriate vectors containing the full length or truncated TIF1 $\beta$  cDNA.

*KRAB domain-containing protein constructs:* The 75 amino-acid repressive KRAB domain from ZNF74-II isoform was used as a prototype for the conserved KRAB domain (Cote, Boisvert et al. 2001). A 43 amino acid truncated and non-repressive domain (KRAB tr) derived from another ZNF74 isoform (ZNF74-I) (Cote, Boisvert et al. 2001) was used as a control which does not interact with TIF1 $\beta$  (Germain-Desprez, Bazinet et al. 2003). KRAB domains in fusion with Gal4DBD aa1-147 (which encodes a nuclear localization signal) were cloned as XbaI fragments in pRSV (Cote, Boisvert et al. 2001) or as a BsrGI-BamHI fragment in pCDNA3.1-Gal4DBD. The Myc tagged ZNF74 constructs were obtained by cloning the cDNAs coding for ZNF74-I (GenBank Accession Number X71623 ; aa 1–572) (Grondin, Bazinet et al. 1996) or ZNF74-II (GenBank Accession Number X92715; aa 1–643) (Cote, Boisvert et al. 2001) as an XbaI fragment into the XbaI site of the Myc tagged version of pCDNA3.1 vector.

*BRET<sup>2</sup> constructs:* Rluc-TIF1 $\beta$ , GFP-TIF1 $\beta$  and GFP-NLS, which target GFP to the nucleus via a nuclear localization signal (NLS), were previously described in (Germain-Desprez, Bazinet et al. 2003). TIF1 $\beta$  4KR, TIF1 $\beta$  L271P and TIF1 $\beta$  L307P were subcloned as an EcoRI-PmeI fragment from pcDNA3.1Gal4DBD into the EcoRI-EcoRV sites of pRluc and pGFP10 (Perkin Elmer Life Sciences). The GFP-KRAB-NLS construct, targeted to the nucleus by a NLS, was prepared by subcloning a SacI-ApaI fragment from pBleuscript SK<sup>+</sup> in phase into the SacI-ApaI sites of pGFP10.

*Other constructs:* The FLAG epitope-tagged PIASy is described in (Sachdev, Bruhn et al. 2001) (generous gift from Dr. R. Grosschedl). The FLAG epitope-tagged wild type SENP1 and catalytically inactive SENP1C603S (generous gift from Dr. D. Bailey) are described in (Bailey and O'Hare 2004). SUMO1 (GenBank Accession Number U67122) cloned in pcDNA3.1-myc (myc-SUMO1) (generous gift from Dr. F-M. Boisvert) was subcloned as an XhoI fragment in pGFP10 (Perkin Elmer Life Sciences). SUMO2 was subcloned as a BstY1-NotI fragment from the pGEX4T-1 vector containing EGFP-SUMO2 (generous gift from Dr. M. Dasso) into the BglII-NotI site of pGFP10.

***Antibodies:***

The following mouse monoclonal antibodies 12CA5 anti-HA (Niman, Houghten et al. 1983), 9E10 anti-myc 9E10 (Evan, Lewis et al. 1985), M2 anti-flag (Sigma), anti-GFP (Roche), anti-Gal4 (Santa Cruz) and polyclonal antibody anti-TIF1 $\beta$  (amino acid 381 to 564) were used (Germain-Desprez, Bazinet et al. 2003).

***Cell culture and transfection:***

Human embryonic kidney 293T cells (HEK 293T) maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent), 100  $\mu$ g/ml penicillin and streptomycin, 1 mM L-glutamine were seeded at a density of  $3 \times 10^5$  cells per 60-mm dish for cell extracts and immunoprecipitation experiments,  $1 \times 10^6$  cells per 100-mm dish

for BRET experiments and  $2 \times 10^5$  in 6-well plates for transcriptional assays. Transient transfections of plasmids were performed on the following day using the calcium phosphate precipitation method except for transcription assays where Fugene transfection reagent (3  $\mu$ l/1  $\mu$ g DNA) (Roche) was used. The total amount of transfected DNA was kept constant (10  $\mu$ g for 100-mm dishes, 6  $\mu$ g for 60-mm dishes and 1-1.3  $\mu$ g for 6-well plates).

### ***Cells extracts and immunoprecipitations:***

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

***BRET<sup>2</sup> experiments:***

The BRET assays were conducted as we previously described in (Germain-Desprez, Bazinet et al. 2003). In brief, transiently transfected cells were resuspended and distributed in 96-well microplates (white Optiplate from Packard). Upon addition of the cell permeant luciferase substrate (coelenterazine deep blue, PerkinElmer Life Sciences), the bioluminescence signal resulting from its degradation was detected using a 370–450-nm band pass filter (donor emission peak 400 nm). The energy transferred resulted in a fluorescence signal emitted by the GFP10 acceptor (excitation peak 400 nm and emission peak 510 nm) that was detected using a 500–530-nm band pass filter. The BRET signal (BRET ratio) was quantified by calculating the acceptor fluorescence /donor bioluminescence ratio as previously reported. Expression level of each construct was determined by direct measurements of total fluorescence and luminescence on aliquots of transfected cell samples. The GFP10 total fluorescence was measured using a FluoroCount (PerkinElmer Life Sciences) with an excitation filter at 400 nm, an emission filter at 510 nm. The total luminescence was measured using the same cells incubated with coelenterazine H for 10 min (Molecular Probes) (emission peak 485 nm). The BRET ratios were plotted as a function of the GFP/LUC fusion protein expression ratio, both fusion proteins expression being assessed with the same cells as described above, to take into account the potential variations in the expression of individual constructs from transfection to transfection. As a negative control, the Rluc-TIF1 $\beta$ /GFP-NLS BRET pair evaluating random collision was used as in (Germain-Desprez, Bazinet et al. 2003).

***Transcriptional assays:***

Transient transfections were done as described above. The firefly luciferase reporter plasmid pGL3-5xGal4 corresponds to pGL3 vector under the control of the SV40 promoter (Promega) and a multimerized Gal4 DNA binding sequence (AGGGTATATAATG) x5. The Renilla luciferase vector phRluc-C1 (Perkin Elmer) (20 ng) was co-transfected to normalize for transfection efficiency. The effector plasmid corresponds to pcDNA3.1

(Invitrogen) in which Gal4DBD aa1-147 was cloned and fused to TIF1 $\beta$ , the KRAB domain or their mutants (see description above). The total amount of transfected DNA was kept constant by addition of the pcDNA3.1 empty vector. Histone deacetylase inhibitor treatments were done 24 h post-transfection either with 5 mM sodium butyrate (NaBut) (from a 3 M stock solution resuspended in PBS pH 7.5) or with 200 nM trichostatin A (from a 300 mM stock solution resuspended in ethanol). Cell lysates were prepared 48 h after transfection and split into two samples for determination of the luciferase activity and assessment of the level of protein expression by Western blotting. The equivalent of 35  $\mu$ g of cell lysates was processed for the luciferase activity using the Dual Glo<sup>TM</sup> luciferase assay kit (Promega).



## RESULTS

### *SUMO modification of TIF1 $\beta$ in vivo.*

Considering that sumoylation is often associated with a change in the activity of transcriptional regulators, we wondered if TIF1 $\beta$  co-repressor could be a target of SUMO protein as previously shown for TIF1 $\alpha$ , another member of the TIF1 family (Seeler, Marchio et al. 2001). To determine whether TIF1 $\beta$  could be covalently modified by SUMO in mammalian cells, human 293T cells were transfected with HA-tagged TIF1 $\beta$  in the presence or absence of GFP-SUMO1, considering that free SUMO-1 is limited in the cells (Saitoh and Hinchey 2000). Western blot using anti-TIF1 $\beta$  revealed that the addition of GFP-SUMO1 results in the appearance of several bands migrating above the unmodified TIF1 $\beta$  (**Figure 1A**, lanes 3 and 4). These bands of reduced mobility are predicted to correspond to TIF1 $\beta$  species covalently linked to GFP-SUMO1. Accordingly, these SUMO modified forms were lost in cells co-transfected with a SUMO specific isopeptidase, SENP1 that cleaves SUMO from its protein substrate, but not in cells expressing its catalytically inactive form, SENP1C603S (**Figure 1B**, lanes 3 and 4) (Bailey and O'Hare 2004). Further confirmation was obtained in immunoprecipitation experiments where five slow migrating Flag-HA-tagged TIF1 $\beta$  species revealed by an anti-Flag antibody were also detected by an anti-GFP antibody recognizing the GFP-SUMO1-modified TIF1 $\beta$  (**Figure 1D**, lane 6 in left and right panels).

We then obtained evidence that endogenous TIF1 $\beta$  was a substrate for SUMO. Endogenous TIF1 $\beta$  sumoylation was detected with a specific anti-TIF1 $\beta$  antibody only when we overexpressed either myc-SUMO1 or GFP-SUMO1, or when endogenous SUMO-modification of TIF1 $\beta$  was enhanced by using the E3 ligase, PIASy (**Figure 1E**, lanes 2, 4 and 6). This suggests that only a small percentage of TIF1 $\beta$  is normally covalently linked by SUMO at steady state as also reported for other sumoylated proteins (Hay 2006).

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

### ***Identification of TIF1 $\beta$ SUMO modification sites.***

Depending mostly on the exposure times, four to five sumoylated species were easily detected in cells co-transfected with TIF1 $\beta$  and either GFP-SUMO1 or GFP-SUMO2 (**Figure 1C**). Thus, at least four main sumoylated sites are predicted to be present on TIF1 $\beta$ . SUMO1 is less likely to give rise to poly-sumoylation chain formation *in vivo* than SUMO2 since its sequence does not include a bona fide SUMO acceptor lysine involved in SUMO chain formation (Tatham, Jaffray et al. 2001). Accordingly, even if the sumoylation patterns obtained with SUMO1 and SUMO2 were similar (**Figure 1C**), our studies to identify TIF1 $\beta$  sumoylation sites were done with SUMO1. TIF1 $\beta$  primary sequence encodes 42 lysine residues with only two being part of a classical sumoylation consensus (K554 and K676). In an attempt to delimit the TIF1 $\beta$  region(s) subjected to sumoylation, carboxy-terminal deletion mutants were generated and subjected to sumoylation *in vivo* either in cells co-transfected with GFP-SUMO1 or not (**Figure 2A-B**). To ensure that all deletion mutants are efficiently targeted to the nucleus, deletion constructs were all fused to Gal4 DNA binding domain (Gal4DBD) which includes a nuclear localization signal. The sumoylation pattern of deletion mutants was compared to that of wild type TIF1 $\beta$  also fused to Gal4DBD. Analysis of the number and intensity of sumoylated species observed for each deletion mutant suggest that sumoylation sites are progressively lost from  $\Delta 1$  to  $\Delta 4$  deletion mutants (**Figure 2A-B**). Only the unmodified TIF1 $\beta$  was detected with the  $\Delta 4$  mutant suggesting that all sumoylation sites are located in the carboxy-terminal part of TIF1 $\beta$  between amino acids 482 and 834. This region of around 350 amino acids contains 13 lysine residues, including K554 and K676 (**Figure 2C**).

To determine which of the 13 carboxy-terminal lysine residues of TIF1 $\beta$  serve as a substrate for sumoylation, each of them were mutated to arginine residue (R) individually or in combination. A detailed analysis of the sumoylation profile of these mutants suggested that the first two bands migrating above the unmodified TIF1 $\beta$  correspond to mono-sumoylated forms exhibiting different apparent molecular weight as also reported for other sumoylated proteins (Long, Zuo et al. 2005; Perdomo, Verger et al. 2005). Accordingly, as seen in **Figure 2D** (compare lanes 1 and 2), the second band above the unmodified TIF1 $\beta$  was strongly reduced by mutating K554 and the faint remaining signal was completely abolished in the double K554,575R mutant (**Figure 2D, lane 3**). This suggests that two distinct populations of mono-sumoylated species comigrate, one being monosumoylated on K554 and one on K575. Considering the relative abundance of these mono-sumoylated species, K554 appears as a major sumoylation site compared to K575. Two additional major sumoylation sites were evidenced with the use of K779R and double K779,804R mutants (compare lane 4 with lanes 5 and 6). These mutants led to significant reduction in the first sumoylation band migrating just above the unmodified TIF1 $\beta$ . Only a faint doublet of bands closely migrating with the species mono-sumoylated on K779 or K804 were seen with the K779,804R mutant (lane 6). These remaining bands (less than 5% of the sumoylation detected with wild type TIF1 $\beta$ ) are likely to correspond respectively to the mono-sumoylation of K750 (lower band) and K676 (higher band) as demonstrated with mutants containing five (5KR mutant) and six (6KR mutant) mutated lysines (**Figure 2D, lanes 7-9**). The above results demonstrate that TIF1 $\beta$  includes six SUMO acceptor sites. Our deletion and punctual mutant results also suggest that the bands migrating above the mono-sumoylated species correspond to multi-sumoylated forms of TIF1 $\beta$  with potentially two to six SUMO moieties linked to any of the different acceptor lysines (schema on **Figure 2D**). The TIF1 $\beta$  species expected to contain five SUMO moieties was seen on longer exposure of some gels. However, we have never observed the one predicted to contain six SUMO moieties presumably because this modified species represents a very minor product not detectable at the level of sensitivity of our assay and/or because the sumoylation of some lysine residues is mutually exclusive. Consistent with the multi-

sumoylation of TIF1 $\beta$ , the removal of any sumoylation site by mutation of one target lysine leads to a decrease in the intensity or in the disappearance of the highest migrating band. Altogether, our results show that among the six potential sumoylation sites, three of them are major sumoylation sites (K554, K779, K804) and three are minor sumoylation sites (K575, K676 and K750).

### ***Regulation of TIF1 $\beta$ transcriptional repression by sumoylation.***

Knowing that TIF1 $\beta$  is a strong transcriptional co-repressor involved in gene silencing, we assessed the potential impact of TIF1 $\beta$  sumoylation on its transcriptional repressive properties. We used a gene reporter assay to compare the transcriptional repressive activity of wild type TIF1 $\beta$  with that of various sumoylation-deficient mutants containing target lysines mutated to arginines. Since TIF1 $\beta$  needs to be recruited to DNA to repress transcription (Friedman, Fredericks et al. 1996; Kim, Chen et al. 1996; Moosmann, Georgiev et al. 1996), both wild type and SUMO deficient mutant TIF1 $\beta$  effectors were fused to Gal4DBD. This fusion protein recognizes the Gal4 response element (5xGal4UAS) placed in front of the SV40 strong promoter that drives the expression of the luciferase reporter gene (**Figure 3A**). As seen in **Figure 3C**, the repressive activity of wild type TIF1 $\beta$  is dose-dependent, reaching a maximum of approximately 20-fold. At comparable maximal doses, TIF1 $\beta$  4KR (K554,575,779,804R), that includes mutations of the three major sumoylation sites, represses transcription 4- to 5-fold less than wild type TIF1 $\beta$ . At doses of transfected TIF1 $\beta$  varying in the 10-fold range, a change limited to  $\sim$ 1.5-fold was observed in the repressive activity elicited by TIF1 $\beta$  4KR in contrast to  $\sim$ 4-fold increase obtained with the wild type. This suggests that the TIF1 $\beta$  sumoylation deficient mutant is unable to fully repress the luciferase reporter in our assay. A comparison of the transcriptional repression activity of various mutants that impair sumoylation was also carried out (**Figure 3B**). Interestingly, TIF1 $\beta$  repressive activity was progressively lost by increasing the number of mutated sumoylation sites as observed in conditions where all

sumoylation deficient mutants are expressed at comparable levels. These above results strongly suggest a correlation between TIF1 $\beta$  repressive activity and its sumoylation capacity.

While controversial, some studies suggested that the repressive activity of TIF1 $\beta$  was partially sensitive to histone deacetylase (HDAC) inhibitors (Nielsen, Ortiz et al. 1999; Lorenz, Koczan et al. 2001; Schultz, Friedman et al. 2001). Our results using wild type TIF1 $\beta$  or a deletion mutant ( $\Delta$ N-TIF1 $\beta$ ), containing the previously characterized repressive region of TIF1 $\beta$  including the six SUMO-targeted lysines (schema on **Figure 2 B**), confirmed that treatment with sodium butyrate (**Figure 3D**) and another inhibitor for class I and II HDAC, Trichostatin A (data not shown), reduces the repressive activity of TIF1 $\beta$  by approximately 30-50% (HDAC-dependent repression) (**Figure 3D**). In order to investigate if there is a potential functional link between HDAC recruitment and TIF1 $\beta$  sumoylation, we compared the sodium butyrate sensitivity of  $\Delta$ N-TIF1 $\beta$  and its 6KR derivative that is refractory to sumoylation. Clearly, the residual 1.5-fold repressive activity of the  $\Delta$ N-TIF1 $\beta$  6KR mutant was not modulated by the HDAC inhibitor suggesting that the recruitment of HDAC is SUMO-dependent (**Figure 3D** - left panel). Furthermore, comparative analysis of the repression of  $\Delta$ N-TIF1 $\beta$  with that of the  $\Delta$ N-TIF1 $\beta$  6KR sumoylation-less mutant in the presence of HDAC inhibitor revealed that the SUMO-related repression (see arrow on **Figure 3D**) involves both HDAC-dependent and HDAC-independent components (see dotted arrows on **Figure 3D**).

Since TIF1 $\beta$  acts as a co-repressor indirectly recruited to DNA via DNA-binding KRAB multifinger proteins (Friedman, Fredericks et al. 1996; Sripathy, Stevens et al. 2006), we also compared the co-repressive activity of wild type TIF1 $\beta$  and its sumoylation-deficient mutant following its indirect recruitment to DNA using a Gal4-KRAB fusion protein (**Figure 4A**). Interestingly, in the presence of Gal4-KRAB, the co-repressive activity elicited by the endogenous TIF1 $\beta$  was enhanced by up to 30% by adding increasing amounts of wild type TIF1 $\beta$  (**Figure 4A**). In contrast, the co-repressive activity was decreased by 10% in the presence of comparable amounts of 4KR mutant suggesting that

this sumoylation deficient mutant exerts a dominant negative effect over the repression induced by endogenous TIF1 $\beta$  proteins (**Figure 4A**). Thus, TIF1 $\beta$  co-repressor activity is clearly impaired by mutation of its major sumoylation sites. This loss of co-repressive activity of the 4KR mutant is not due to a change in its sub-cellular localization since TIF1 $\beta$  sumoylation deficient mutants display the same nuclear localization patterns as the wild-type TIF1 $\beta$  (observed by immunolocalization with Flag-HA- or GFP-tagged constructs - data not shown) nor to an impaired interaction with the KRAB domain as shown by a BRET interaction assay in living cells (**Figure 4B**) (Mercier, Salahpour et al. 2002; Germain-Desprez, Bazinet et al. 2003). This is evidenced by the fact that similar BRET saturation curves were obtained when a fixed amount of Rluc-TIF1 $\beta$  or -TIF1 $\beta$  4KR was co-expressed with increasing amount of GFP-KRAB-NLS (**Figure 4B**). As typically seen when specific interactions occur, these curves showed an increase in the energy transfer (BRET<sup>2</sup> ratio) between the RLuc fusion donor and GFP fusion acceptor until a plateau is reached when the amount of acceptor is no longer limiting compared to the donor. Noticeably, the BRET<sup>2</sup> ratio of Rluc-TIF1 $\beta$  or -TIF1 $\beta$  4KR at the maximal dose of GFP-KRAB-NLS is 4-fold higher than the one obtained with the negative control BRET pair Rluc-TIF1 $\beta$ L307P/GFP-KRAB-NLS. The TIF1 $\beta$  L307P mutant was previously shown to have an abrogated interaction with a KRAB domain in an *in vitro* experiment using the RBCC fragment of TIF1 $\beta$  (Peng, Begg et al. 2000). We also ruled out that the differential co-repressive activity elicited by TIF1 $\beta$  and its 4KR mutant was due to an impaired homo-dimerization since they exhibit similar BRET saturation curves (**Figure 6A**)

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

***Regulation of TIF1 $\beta$  sumoylation by the KRAB domain of multifinger proteins.***

Based on observations mentioned above, we investigated the possibility that the KRAB domain could modulate the sumoylation of TIF1 $\beta$ . Strikingly, co-transfection of wild type TIF1 $\beta$  together with a prototypical KRAB domain (derived from ZNF74 zinc finger protein) significantly boosts the sumoylation level of TIF1 $\beta$  in condition in which GFP-SUMO was limiting (**Figure 5A**, left panel compare lanes 1 and 2). Such enhancement was neither observed using a non-repressive truncated version of this KRAB domain (KRAB tr) which does not interact *in vivo* with TIF1 $\beta$  (Cote, Boisvert et al. 2001; Germain-Desprez, Bazinet et al. 2003) nor with the TIF1 $\beta$  L307P mutant which failed to bind the KRAB domain as shown *in vitro* (Peng, Begg et al. 2000) and confirmed here in living cells by BRET (**Figures 4B and 5A**, left and middle panels). Importantly also, in the presence of Gal4-KRAB, a higher molecular weight band characteristic of TIF1 $\beta$  sumoylated by endogenous SUMO appeared above the endogenous TIF1 $\beta$  (**Figure 5B**). These results suggest that the sumoylation of TIF1 $\beta$  co-repressor is favoured by its interaction with the KRAB domain. To confirm that such a domain can regulate sumoylation of TIF1 $\beta$  in the context of a full length KRAB multifinger protein, we used two isoforms of a prototypical KRAB multifinger protein, ZNF74, that include the full length repressive KRAB domain (ZNF74-II isoform) and the non-repressive truncated KRAB domain (ZNF74-I isoform) used above (Cote, Boisvert et al. 2001). Only ZNF74-II interacts with TIF1 $\beta$  as previously shown in living cells by BRET (Germain-Desprez, Bazinet et al. 2003). Clearly also, only ZNF74-II repressive isoform increases TIF1 $\beta$  sumoylation (Figure 5A, right panel).

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

***Requirement RBCC oligomerization motif and PHD finger integrity for efficient TIF1 $\beta$  sumoylation.***

TIF1 $\beta$  and other members of the TRIM family are suggested to function as oligomers homo-dimerizing via their RBCC motif (Cao, Borden et al. 1997; Borden 2000; Reymond, Meroni et al. 2001; Peng, Feldman et al. 2002; Germain-Desprez, Bazinet et al. 2003). Interestingly, we noticed that the sumoylation of TIF1 $\beta$  RBCC punctual mutants, L271P and L307P, was significantly reduced compared to that of the wild type TIF1 $\beta$  (**Figure 6A**). These mutants were previously found to be deficient for homo-dimerization *in vitro* and to exhibit a reduced homo-dimerization in cell extracts while only L307P was found to be deficient for interaction with the KRAB domain as shown by Peng et al. (Peng, Begg et al. 2000). Since our BRET studies also indicate altered homo-dimerization properties of the RBCC mutants compared to the wild type TIF1 $\beta$  (or the 4KR mutant) (**Figure 6A**), we suspected that efficient sumoylation of TIF1 $\beta$  may require its oligomerization. In agreement with this, a HA-tagged deletion mutant lacking the RBCC dimerization motif,  $\Delta$ N-TIF1 $\beta$ , did not show any significant sumoylation despite the presence of the six possible SUMO-acceptor sites (Figure 6B, left panel). In contrast, a version of  $\Delta$ N-TIF1 $\beta$  fused to the heterologous Gal4 dimerization domain exhibits a ladder of sumoylated bands (Figure 6B, lane 1 in middle panel) as typically observed for the wild type protein. Considering these results and the fact that HA- $\Delta$ N-TIF1 $\beta$  retains a nuclear localization (data not shown), this suggests that homo-dimerization of TIF1 $\beta$  is required for its sumoylation.

As demonstrated here, the RBCC motif of TIF1 $\beta$  appears dispensable for its sumoylation when replaced by a heterologous dimerization domain. Recently however, sumoylation of another RBCC motif-containing protein, PML, was found to depend on the integrity of part of its RBCC motif, the RING finger (Quimby, Yong-Gonzalez et al. 2006; Shen, Lin et al. 2006). Interestingly, Capili et al. suggested structure similarity between PML RING finger and TIF1 $\beta$  PHD finger which are both cysteine-rich, zinc-binding domains (Capili, Schultz et al. 2001). To assess the potential involvement of the PHD



finger in the sumoylation of TIF1 $\beta$ , we generated mutants where the PHD finger structure was disrupted by mutating two amino acids responsible for zinc-binding (H648A,C651A) (Capili, Schultz et al. 2001). Interestingly, the intensity of sumoylated species was strongly reduced when the PHD finger mutations were introduced either in the Gal4- $\Delta$ N-TIF1 $\beta$  or in the full length TIF1 $\beta$  (**Figure 6B**, middle and right panels, lanes 1 and 2).

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

## DISCUSSION

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

### *TIF1 $\beta$ , a substrate rich in lysine residues targeted by SUMO.*

Using TIF1 $\beta$  lysine-acceptor and carboxy-terminal deletion mutants, we provided evidences that TIF1 $\beta$  possesses six SUMO-acceptor sites involved in multi-sumoylation events. Noticeably, in the conditions of our assays using SUMO1, we ruled out that TIF1 $\beta$  is poly-sumoylated through the formation of SUMO chains on individual lysine residues. While the vast majority of SUMO target proteins were described to contain one or two SUMO modification sites, TIF1 $\beta$  appears as a multi-acceptor protein for SUMO such as PML, Daxx and N-CoR (Kamitani, Kito et al. 1998; Lin, Huang et al. 2006; Tiefenbach, Novac et al. 2006). Interestingly, all TIF1 $\beta$  sumoylation sites are positioned in its repressive region which contains a PHD finger and a bromo-domain. As it has been observed for several transcription factors, SUMO modification frequently occurs within inhibitory or repression domains (Bies, Markus et al. 2002; Kim, Cantwell et al. 2002; Yang, Jaffray et al. 2003).

Only two of the six TIF1 $\beta$  sumoylation sites are part of the classic sumoylation consensus sequence ( $\psi$ KXE/D). Among these two sites, one is characterized here as a major (K554) and one as a minor sumoylation site (K676). No specific consensus motif could be identified surrounding the four other SUMO acceptor sites, characterized as two major (K779, K804) and two minor (K575, K750) sumoylation targets. During the completion of this manuscript, three of the six sumoylation sites characterized here were also identified by others (Lee, Thomas et al. 2006).

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

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

### ***TIF1 $\beta$ sumoylation, a pre-requisite for transcriptional repression.***

Our functional assays strongly suggest that the transcriptional repression mediated by TIF1 $\beta$  requires its post-translational modification by SUMO, an observation also made for other transcriptional regulators such as Sp3, Elk-1 and BKLF transcription factors (Ross, Best et al. 2002; Yang and Sharrocks 2004; Perdomo, Verger et al. 2005) or co-regulators such as p300, CtBP and N-CoR (Girdwood, Bumpass et al. 2003; Lin, Sun et al. 2003; Tiefenbach, Novac et al. 2006). Reducing the number of TIF1 $\beta$  SUMO acceptor sites by mutating single, double and multiple sumoylation target lysine residues progressively decreased TIF1 $\beta$ - dependent transcriptional repression to near a basal repressive level.

Remarkably, a TIF1 $\beta$  sumoylation deficient mutant in which all the target lysine residues were mutated to arginine residues prevents almost completely the TIF1 $\beta$ -dependent repression activity. This is suggesting that the TIF1 $\beta$  repressive ability is mostly dependent on its capacity to be covalently modified by SUMO proteins.

Since no obvious difference has been observed in the sub-cellular localization of wild type TIF1 $\beta$  and its various sumoylation deficient mutants (TIF1 $\beta$  4KR and -6KR) (data not shown), it is unlikely that a variation in their sub-cellular distribution contributes to their differential transcriptional repressive activity. Previous studies trying to decipher the mechanisms involved in the repressive activity of sumoylated proteins have suggested that SUMO displays an intrinsic repressive activity when directly targeted to DNA as a Gal4-SUMO fusion (Ross, Best et al. 2002; Chupreta, Holmstrom et al. 2005). Furthermore, it was shown that the covalent attachment of SUMO promotes recruitment of HDAC complexes and thus inhibition of transcription both in conditions where SUMO is fused with transcriptional regulators to generate a chimera (Ross, Best et al. 2002; Shiio and Eisenman 2003) or is conjugated to the  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> group of a lysine residue from target proteins (Girdwood, Bumpass et al. 2003; Yang and Sharrocks 2004; Gong, Brackertz et al. 2006). Importantly, we found that the SUMO-dependent repressive activity of TIF1 $\beta$  is accounted both by HDAC-dependent and HDAC-independent mechanisms. This is consistent with the recent results of Lee et al. showing that TIF1 $\beta$  sumoylation correlates with both an attenuation of histone H3 acetylation (H3-K9, -K14) and with an enhancement of histone H3 di-methylation (H3-K9) at a specific TIF1 $\beta$  targeted promoter (Lee, Thomas et al. 2006). Since TIF1 $\beta$  is known to interact with Mi2- $\alpha$ , a zinc finger helicase which is part of NuRD histone deacetylase complexes, as well as with the SETDB1 methyltransferase (Schultz, Friedman et al. 2001; Schultz, Ayyanathan et al. 2002), it is tempting to speculate that the recruitment of these repressive enzymatic activities is modulated by TIF1 $\beta$  sumoylation status. This may occur as a result of a differential interaction of the sumoylated and un-sumoylated forms of TIF1 $\beta$  with these enzymatic complexes. Interestingly, a recent paper identified SETDB1 as a protein which directly

interacts with SUMO2 (Rosendorff, Sakakibara et al. 2006). Since the interaction of TIF1 $\beta$  and SETDB1 has been previously characterized by yeast-two hybrid and co-immunoprecipitation experiments (Schultz, Ayyanathan et al. 2002), it remains to be determined whether this interaction is direct or indirect and if it requires TIF1 $\beta$  sumoylation.

***TIF1 $\beta$  sumoylation is regulated by its interaction with KRAB-containing proteins and requires TIF1 $\beta$  oligomerization.***

TIF1 $\beta$ , a ubiquitous and abundant protein, is believed to function as the obligate co-repressor for KRAB multifinger proteins which are mostly expressed in stage-specific and tissue-specific manner during vertebrate's development (Kim, Chen et al. 1996). In the present study, we demonstrate that KRAB domain-containing proteins positively modulate TIF1 $\beta$  sumoylation, owing to their direct interaction with TIF1 $\beta$  RBCC motif. Thus, the recruitment of TIF1 $\beta$  to gene promoters regulated by KRAB multifinger proteins and its subsequent KRAB-induced sumoylation may represent a specific and unique way to enhance the repressive activity of TIF1 $\beta$  at selected promoters. This could explain why only a small proportion of endogenous TIF1 $\beta$  is SUMO modified at a steady state. It must be acknowledged that most of our work was done with transient transfections and Gal4-based systems. Thus, further studies should confirm the importance of TIF1 $\beta$  sumoylation in gene repression and its regulation by KRAB-containing proteins at promoters in chromatinized and natural chromatin contexts.

While it is generally recognized that TIF1 $\beta$  can repress gene transcription when targeted to DNA through KRAB domain interaction, a few studies have found that TIF1 $\beta$  could also behave as a transcriptional co-activator (Chang, Chen et al. 1998; Hsu, Yang et al. 2001). More specifically, TIF1 $\beta$  has been characterized as a co-activator when recruited by transcriptional regulators such as C/EBP $\beta$ , the glucocorticoid nuclear hormone receptor and the TRIP-Br family members (Chang, Chen et al. 1998; Hsu, Yang et al. 2001). Thus,

one could propose that specific protein interactors such as KRAB multifinger proteins may regulate TIF1 $\beta$  repressive activity by stimulating its sumoylation, a pre-requisite for efficient recruitment of repressive enzymatic complexes. In contrast, other protein complexes, such those described above, may prevent TIF1 $\beta$  sumoylation and switch this co-regulator into a co-activator with the capacity to recruit activating enzymatic complexes. In such case, sumoylation may represent a critical determinant by which TIF1 $\beta$  is regulated.

At least two hypotheses, not mutually exclusive, can be proposed to explain how the KRAB domain increases TIF1 $\beta$  sumoylation. First, it could induce a TIF1 $\beta$  conformational change favouring its interaction with the sumoylation machinery and/or a better accessibility of TIF1 $\beta$  sumoylation sites. We ruled out however the possibility that the KRAB domain itself recruits UBC9, the E2 conjugating enzyme for SUMO (data not shown). Second, since the present study demonstrates that efficient sumoylation of TIF1 $\beta$  requires its oligomerization, an attractive possibility, is that KRAB domains may enhance TIF1 $\beta$  sumoylation by reinforcing its oligomerization. Consistent with this hypothesis, an other group suggested that KRAB domain can stabilize TIF1 $\beta$  homo-oligomers formation *in vitro* (Peng, Begg et al. 2000). Our previous results also demonstrated that a KRAB domain-containing protein, ZNF74, can bind to TIF1 $\beta$  oligomers in living cells suggesting that oligomers represent the transcriptionally active species (Germain-Desprez, Bazinet et al. 2003). Interestingly, a dimerization-dependent sumoylation has also been reported for at least two other proteins, namely HDAC4 and PML (Kirsh, Seeler et al. 2002; Kim, Kim et al. 2005). In the case of PML, it was recently suggested that its dimerization favours its auto-sumoylation, a process requiring the presumed intrinsic SUMO E3 ligase activity of the PML RING finger (Quimby, Yong-Gonzalez et al. 2006; Shen, Lin et al. 2006). Since we found here that TIF1 $\beta$  efficient sumoylation also requires the integrity of its PHD finger, a domain reported to be structurally related to the RING finger of PML (Capili, Schultz et al. 2001), further studies will determine if the TIF1 $\beta$  PHD finger may exhibit a

SUMO E3 ligase activity allowing the auto-sumoylation of this strong co-repressor of transcription.

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

**ACKNOWLEDGEMENTS**

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



**REFERENCES**

- Ayyanathan, K., M. S. Lechner, et al. (2003). "Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation." Genes Dev **17**(15): 1855-1869.
- Azuma, Y. and M. Dasso (2002). "A new clue at the nuclear pore: RanBP2 is an E3 enzyme for SUMO1." Dev Cell **2**(2): 130-131.
- Bailey, D. and P. O'Hare (2004). "Characterization of the localization and proteolytic activity of the SUMO-specific protease, SENP1." J Biol Chem **279**(1): 692-703.
- Bayer, P., A. Arndt, et al. (1998). "Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1." J Mol Biol **280**(2): 275-286.
- Beckstead, R., J. A. Ortiz, et al. (2001). "Bonus, a Drosophila homolog of TIF1 proteins, interacts with nuclear receptors and can inhibit betaFTZ-F1-dependent transcription." Mol Cell **7**(4): 753-765.
- Bellefroid, E. J., D. A. Poncelet, et al. (1991). "The evolutionarily conserved Kruppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(9): 3608-3612.
- Bies, J., J. Markus, et al. (2002). "Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity." J Biol Chem **277**(11): 8999-9009.
- Binda, O., J. S. Roy, et al. (2006). "RBP1 family proteins exhibit SUMOylation-dependent transcriptional repression and induce cell growth inhibition reminiscent of senescence." Mol Cell Biol **26**(5): 1917-1931.
- Bohren, K. M., V. Nadkarni, et al. (2004). "A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus." J Biol Chem **279**(26): 27233-27238.

- Borden, K. L. (2000). "RING domains: master builders of molecular scaffolds?" J Mol Biol **295**(5): 1103-1112.
- Cammas, F., M. Herzog, et al. (2004). "Association of the transcriptional corepressor TIF1beta with heterochromatin protein 1 (HP1): an essential role for progression through differentiation." Genes Dev **18**(17): 2147-2160.
- Cammas, F., M. Mark, et al. (2000). "Mice lacking the transcriptional corepressor TIF1beta are defective in early postimplantation development." Development **127**(13): 2955-2963.
- Cammas, F., M. Oulad-Abdelghani, et al. (2002). "Cell differentiation induces TIF1beta association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction." J Cell Sci **115**(Pt 17): 3439-3448.
- Cao, T., K. L. Borden, et al. (1997). "Involvement of the rfp tripartite motif in protein-protein interactions and subcellular distribution." J Cell Sci **110** ( Pt 14): 1563-1571.
- Capili, A. D., D. C. Schultz, et al. (2001). "Solution structure of the PHD domain from the KAP-1 corepressor: structural determinants for PHD, RING and LIM zinc-binding domains." Embo J **20**(1-2): 165-177.
- Chang, C. J., Y. L. Chen, et al. (1998). "Coactivator TIF1beta interacts with transcription factor C/EBPbeta and glucocorticoid receptor to induce alpha1-acid glycoprotein gene expression." Mol Cell Biol **18**(10): 5880-5887.
- Chupreta, S., S. Holmstrom, et al. (2005). "A small conserved surface in SUMO is the critical structural determinant of its transcriptional inhibitory properties." Mol Cell Biol **25**(10): 4272-4282.
- Cote, F., F. M. Boisvert, et al. (2001). "Alternative promoter usage and splicing of ZNF74 multifinger gene produce protein isoforms with a different repressor activity and nuclear partitioning." DNA Cell Biol **20**(3): 159-173.
- Evan, G. I., G. K. Lewis, et al. (1985). "Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product." Mol Cell Biol **5**(12): 3610-3616.

- Fernandez-Lloris, R., N. Osses, et al. (2006). "Repression of SOX6 transcriptional activity by SUMO modification." FEBS Lett **580**(5): 1215-1221.
- Friedman, J. R., W. J. Fredericks, et al. (1996). "KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain." Genes Dev **10**(16): 2067-2078.
- Germain-Desprez, D., M. Bazinet, et al. (2003). "Oligomerization of transcriptional intermediary factor 1 regulators and interaction with ZNF74 nuclear matrix protein revealed by bioluminescence resonance energy transfer in living cells." J Biol Chem **278**(25): 22367-22373.
- Gill, G. (2003). "Post-translational modification by the small ubiquitin-related modifier SUMO has big effects on transcription factor activity." Curr Opin Genet Dev **13**(2): 108-113.
- Gill, G. (2004). "SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?" Genes Dev **18**(17): 2046-2059.
- Gill, G. (2005). "Something about SUMO inhibits transcription." Curr Opin Genet Dev **15**(5): 536-541.
- Girdwood, D., D. Bumpass, et al. (2003). "P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification." Mol Cell **11**(4): 1043-1054.
- Girdwood, D. W., M. H. Tatham, et al. (2004). "SUMO and transcriptional regulation." Semin Cell Dev Biol **15**(2): 201-210.
- Gong, Z., M. Brackertz, et al. (2006). "SUMO modification enhances p66-mediated transcriptional repression of the Mi-2/NuRD complex." Mol Cell Biol **26**(12): 4519-4528.
- Grondin, B., M. Bazinet, et al. (1996). "The KRAB zinc finger gene ZNF74 encodes an RNA-binding protein tightly associated with the nuclear matrix." J Biol Chem **271**(26): 15458-15467.
- Hay, R. T. (2006). "Role of ubiquitin-like proteins in transcriptional regulation." Ernst Schering Res Found Workshop(57): 173-192.

Hsu, S. I., C. M. Yang, et al. (2001). "TRIP-Br: a novel family of PHD zinc finger- and bromodomain-interacting proteins that regulate the transcriptional activity of E2F-1/DP-1." Embo J **20**(9): 2273-2285.

Hsu, Y. H., K. P. Sarker, et al. (2006). "Sumoylated SnoN represses transcription in a promoter-specific manner." J Biol Chem.

Huang, W. C., T. P. Ko, et al. (2004). "Crystal structures of the human SUMO-2 protein at 1.6 Å and 1.2 Å resolution: implication on the functional differences of SUMO proteins." Eur J Biochem **271**(20): 4114-4122.

Kagey, M. H., T. A. Melhuish, et al. (2003). "The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3." Cell **113**(1): 127-137.

Kamitani, T., K. Kito, et al. (1998). "Identification of three major sumoylation sites in PML." J Biol Chem **273**(41): 26675-26682.

Khetchoumian, K., M. Teletin, et al. (2004). "TIF1delta, a novel HP1-interacting member of the transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) family expressed by elongating spermatids." J Biol Chem **279**(46): 48329-48341.

Kim, J., C. A. Cantwell, et al. (2002). "Transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding proteins is controlled by a conserved inhibitory domain that is a target for sumoylation." J Biol Chem **277**(41): 38037-38044.

Kim, S. S., Y. M. Chen, et al. (1996). "A novel member of the RING finger family, KRIP-1, associates with the KRAB-A transcriptional repressor domain of zinc finger proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15299-15304.

Kim, Y. E., D. Y. Kim, et al. (2005). "Requirement of the coiled-coil domain of PML-RARalpha oncoprotein for localization, sumoylation, and inhibition of monocyte differentiation." Biochem Biophys Res Commun **330**(3): 746-754.

Kirsh, O., J. S. Seeler, et al. (2002). "The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase." Embo J **21**(11): 2682-2691.

- Kotaja, N., U. Karvonen, et al. (2002). "PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases." Mol Cell Biol **22**(14): 5222-5234.
- Le Douarin, B., A. L. Nielsen, et al. (1996). "A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors." Embo J **15**(23): 6701-6715.
- Lechner, M. S., G. E. Begg, et al. (2000). "Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interaction is essential." Mol Cell Biol **20**(17): 6449-6465.
- Lechner, M. S., D. C. Schultz, et al. (2005). "The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain." Biochem Biophys Res Commun **331**(4): 929-937.
- Lee, Y. K., S. N. Thomas, et al. (2006). "Doxorubicin downregulates KAP1 SUMOylation that relieves its transcription repression on p21WAF1/CIP1 in breast cancer MCF-7 cells." J Biol Chem.
- Lin, D. Y., Y. S. Huang, et al. (2006). "Role of SUMO-Interacting Motif in Daxx SUMO Modification, Subnuclear Localization, and Repression of Sumoylated Transcription Factors." Mol Cell **24**(3): 341-354.
- Lin, X., B. Sun, et al. (2003). "Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding." Mol Cell **11**(5): 1389-1396.
- Long, J., G. Wang, et al. (2004). "Repression of Smad4 transcriptional activity by SUMO modification." Biochem J **379**(Pt 1): 23-29.
- Long, J., D. Zuo, et al. (2005). "Pc2-mediated sumoylation of Smad-interacting protein 1 attenuates transcriptional repression of E-cadherin." J Biol Chem **280**(42): 35477-35489.
- Looman, C., M. Abrink, et al. (2002). "KRAB zinc finger proteins: an analysis of the molecular mechanisms governing their increase in numbers and complexity during evolution." Mol Biol Evol **19**(12): 2118-2130.

- Lorenz, P., D. Koczan, et al. (2001). "Transcriptional repression mediated by the KRAB domain of the human C2H2 zinc finger protein Kox1/ZNF10 does not require histone deacetylation." Biol Chem **382**(4): 637-644.
- Matunis, M. J. and C. M. Pickart (2005). "Beginning at the end with SUMO." Nat Struct Mol Biol **12**(7): 565-566.
- Melchior, F. (2000). "SUMO--nonclassical ubiquitin." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 591-626.
- Melchior, F., M. Schergaut, et al. (2003). "SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores." Trends Biochem Sci **28**(11): 612-618.
- Mercier, J. F., A. Salahpour, et al. (2002). "Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer." J Biol Chem **277**(47): 44925-44931.
- Moosmann, P., O. Georgiev, et al. (1996). "Transcriptional repression by RING finger protein TIF1 beta that interacts with the KRAB repressor domain of KOX1." Nucleic Acids Res **24**(24): 4859-4867.
- Motohashi, H., F. Katsuoka, et al. (2006). "MafG sumoylation is required for active transcriptional repression." Mol Cell Biol **26**(12): 4652-4663.
- Nakagawa, K. and N. Kuzumaki (2005). "Transcriptional activity of megakaryoblastic leukemia 1 (MKL1) is repressed by SUMO modification." Genes Cells **10**(8): 835-850.
- Nathan, D., K. Ingvarsdottir, et al. (2006). "Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications." Genes Dev **20**(8): 966-976.
- Nielsen, A. L., J. A. Ortiz, et al. (1999). "Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family." Embo J **18**(22): 6385-6395.

- Niman, H. L., R. A. Houghten, et al. (1983). "Generation of protein-reactive antibodies by short peptides is an event of high frequency: implications for the structural basis of immune recognition." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(16): 4949-4953.
- Ohshima, T., H. Koga, et al. (2004). "Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification." J Biol Chem **279**(28): 29551-29557.
- Okuma, T., R. Honda, et al. (1999). "In vitro SUMO-1 modification requires two enzymatic steps, E1 and E2." Biochem Biophys Res Commun **254**(3): 693-698.
- Peng, H., G. E. Begg, et al. (2000). "Reconstitution of the KRAB-KAP-1 repressor complex: a model system for defining the molecular anatomy of RING-B box-coiled-coil domain-mediated protein-protein interactions." J Mol Biol **295**(5): 1139-1162.
- Peng, H., I. Feldman, et al. (2002). "Hetero-oligomerization among the TIF family of RBCC/TRIM domain-containing nuclear cofactors: a potential mechanism for regulating the switch between coactivation and corepression." J Mol Biol **320**(3): 629-644.
- Perdomo, J., A. Verger, et al. (2005). "Role for SUMO modification in facilitating transcriptional repression by BKLf." Mol Cell Biol **25**(4): 1549-1559.
- Pichler, A., P. Knipscheer, et al. (2004). "The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type." Nat Struct Mol Biol **11**(10): 984-991.
- Quimby, B. B., V. Yong-Gonzalez, et al. (2006). "The promyelocytic leukemia protein stimulates SUMO conjugation in yeast." Oncogene **25**(21): 2999-3005.
- Reverter, D. and C. D. Lima (2005). "Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex." Nature **435**(7042): 687-692.
- Reymond, A., G. Meroni, et al. (2001). "The tripartite motif family identifies cell compartments." Embo J **20**(9): 2140-2151.

Rosendorff, A., S. Sakakibara, et al. (2006). "NXP-2 association with SUMO-2 depends on lysines required for transcriptional repression." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(14): 5308-5313.

Ross, S., J. L. Best, et al. (2002). "SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization." Mol Cell **10**(4): 831-842.

Sachdev, S., L. Bruhn, et al. (2001). "PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies." Genes Dev **15**(23): 3088-3103.

Saitoh, H. and J. Hinchev (2000). "Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3." J Biol Chem **275**(9): 6252-6258.

Saitoh, H., R. T. Pu, et al. (1997). "SUMO-1: wrestling with a new ubiquitin-related modifier." Trends Biochem Sci **22**(10): 374-376.

Schultz, D. C., K. Ayyanathan, et al. (2002). "SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins." Genes Dev **16**(8): 919-932.

Schultz, D. C., J. R. Friedman, et al. (2001). "Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD." Genes Dev **15**(4): 428-443.

Seeler, J. S., A. Marchio, et al. (2001). "Common properties of nuclear body protein SP100 and TIF1alpha chromatin factor: role of SUMO modification." Mol Cell Biol **21**(10): 3314-3324.

Sentis, S., M. Le Romancer, et al. (2005). "Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity." Mol Endocrinol **19**(11): 2671-2684.

Shen, T. H., H. K. Lin, et al. (2006). "The mechanisms of PML-nuclear body formation." Mol Cell **24**(3): 331-339.



- Shiio, Y. and R. N. Eisenman (2003). "Histone sumoylation is associated with transcriptional repression." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13225-13230.
- Sripathy, S. P., J. Stevens, et al. (2006). "The KAP1 corepressor functions to coordinate the assembly of de novo HP1 demarcated microenvironments of heterochromatin required for KRAB zinc finger protein mediated transcriptional repression." Mol Cell Biol.
- Tanaka, M. and W. Herr (1990). "Differential transcriptional activation by Oct-1 and Oct-2: interdependent activation domains induce Oct-2 phosphorylation." Cell **60**(3): 375-386.
- Tatham, M. H., E. Jaffray, et al. (2001). "Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9." J Biol Chem **276**(38): 35368-35374.
- Tiefenbach, J., N. Novac, et al. (2006). "SUMOylation of the corepressor N-CoR modulates its capacity to repress transcription." Mol Biol Cell **17**(4): 1643-1651.
- Urrutia, R. (2003). "KRAB-containing zinc-finger repressor proteins." Genome Biol **4**(10): 231.
- Venturini, L., J. You, et al. (1999). "TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family." Oncogene **18**(5): 1209-1217.
- Verger, A., J. Perdomo, et al. (2003). "Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation." EMBO Rep **4**(2): 137-142.
- Witzgall, R., E. O'Leary, et al. (1994). "The Kruppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4514-4518.
- Yang, S. H., E. Jaffray, et al. (2003). "Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity." Mol Cell **12**(1): 63-74.
- Yang, S. H. and A. D. Sharrocks (2004). "SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression." Mol Cell **13**(4): 611-617.

The abbreviations used are: aa, amino acid(s); BRET, bioluminescence resonance energy; GFP, green fluorescent protein; transfer; HA, hemagglutinin; HDAC, histone deacetylases.

Keywords: Sumoylation, TIF1 $\beta$ , KAP-1, KRIP-1, TRIM 28, KRAB domain, Transcriptional repression, BRET.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1- SUMO modification of TIF1 $\beta$ *in vivo*.

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

### Figure 2- Identification of TIF1 $\beta$ sumoylation sites.

**A)** Sumoylation profiles of Gal4DBD-TIF1 $\beta$  and C-terminal deletion mutants ( $\Delta$ 1- $\Delta$ 4) (3  $\mu$ g) co-transfected (left) or not (right) with GFP-SUMO1 (3  $\mu$ g) revealed by immunoblot of 293T whole cell extracts; the faster migrating dark band corresponds to the unmodified TIF1 $\beta$ . For the GFP sumoylation, a longer exposure is shown for  $\Delta$ 1 and  $\Delta$ 2 mutants (last two lanes). For the wild type protein and C-terminal deletion mutants (lane 1-5, right panel), stars identify TIF1 $\beta$  species modified by endogenous SUMO. **B)** Schematic representation of the full length 834 amino acids TIF1 $\beta$  and mutants. The characterized domains represented are the RING finger, B box 1, B box 2, coiled-coil domain, HP1BD

(HP1 Binding Domain), PHD (Plant-Homeo Domain) finger and Bromo-domain. Mutated residues used in this study are indicated. **C)** Illustration of the amino acid context surrounding TIF1 $\beta$  sumoylation target lysines. Target lysine residues are in bold and those that are part of a classical  $\psi$ KXE consensus sequence are underlined. **D)** Sumoylation profiles of lysine to arginine mutants of Gal4DBD-TIF1 $\beta$  (2-3  $\mu$ g) in the presence of GFP-SUMO1 (2  $\mu$ g) revealed by immunoblot of 293T whole cell extracts. Arrow head points to the unmodified TIF1 $\beta$ . Arrows point to the bands containing mono-sumoylated species and the modified lysine is indicated. A schematization of the sumoylation profile is provided on the right. Brackets identify mono- and multi-sumoylated species and bands in parentheses correspond to TIF1 $\beta$  species containing potentially five (observed on some blots) or six SUMOs (never detected).

### **Figure 3- Regulation of TIF1 $\beta$ transcriptional repression by sumoylation.**

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

constructs for untreated cells. Considering the observed ~ five-fold increase in the expression of TIF1 $\beta$  and the normalizing *Renilla* luciferase in sodium butyrate treated cells, the amount of Gal4DBD-effectors (Gal4DBD- $\Delta$ TIF1 $\beta$  100 ng or Gal4DBD-TIF1 $\beta$  20 ng) was adjusted to obtain similar protein expression in treated and untreated cells. Expression of the reporter plasmid was unaffected by the sodium butyrate treatment as seen on the figure. Cells were treated with sodium butyrate 24 h post-transfection and recovered 24 h later for transcriptional assays. Error bars represent the standard deviation for at least three independent experiments performed in duplicate. SUMO-related repression (arrow) is composed of HDAC-dependent and HDAC-independent components (dotted arrows). For all assays (B-D), the expression level of TIF1 $\beta$  was assessed by immunoblots of 293T whole cell extracts from pooled duplicate or triplicate samples derived from one independent experiment.

**Figure 4- Regulation of TIF1 $\beta$  transcriptional co-repression by sumoylation.**

**A)** Co-repressor activity of TIF1 $\beta$  wild type and sumoylation-less mutant recruited to the luciferase reporter by a KRAB domain. Transfections were done in conditions where the endogenous TIF1 $\beta$  becomes limiting using 600 ng of luciferase reporter, 200 ng of Gal4DBD-KRAB and increasing amounts of wild type or 4KR Flag-HA-TIF1 $\beta$  (up to 480 ng). The percentage of change in repression due to the transfected TIF1 $\beta$  and KRAB domain constructs was evaluated relative to the observed 10-fold repression of the reporter luciferase activity elicited by the KRAB domain construct alone. A typical experiment out of three performed in duplicate is presented. The duplicate are within 5,5%. The expression level of TIF1 $\beta$  or KRAB domain proteins was assessed by immunoblots of 293T whole cell extracts from pooled duplicate samples derived from one independent experiment. ). Stars identify TIF1 $\beta$  species modified by endogenous SUMO. **B)** BRET<sup>2</sup> titration curves showing interaction in living mammalian cells between the KRAB domain and full length wild type TIF1 $\beta$  and mutants. The BRET<sup>2</sup> pairs tested were Rluc-TIF1 $\beta$  (●), Rluc-TIF1 $\beta$  4KR (O) or Rluc-TIF1 $\beta$  L271P (◇) used in fixed amount (in the range of 1-2  $\mu$ g) with

increasing amounts of GFP-KRAB-NLS (from 0,2 to 8  $\mu\text{g}$ ). Rluc-TIF1 $\beta$  L307P/GFP-KRAB-NLS BRET<sup>2</sup> pair ( $\Delta$ ) was used as negative control. For each pair, data of three independent experiments performed in duplicate were pooled. The data were represented as described in EXPERIMENTAL PROCEDURES.

**Figure 5- Regulation of TIF1 $\beta$  sumoylation by KRAB domain-containing proteins.**

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

**Figure 6- TIF1 $\beta$  sumoylation status depends on the integrity of its homo-dimerization domain and of its PHD finger domain.**

**A)** TIF1 $\beta$  optimal sumoylation requires an intact RBCC motif. Sumoylation profiles of wild type HA-tagged-TIF1 $\beta$  (1,5  $\mu\text{g}$ ) and coiled-coil mutants (L271P or L307P, 2,5  $\mu\text{g}$ ) in the presence of GFP-SUMO1 (1  $\mu\text{g}$ ) revealed by immunoblot of 293T whole cell extracts. BRET<sup>2</sup> titration analysis showing homo-dimeric interaction of TIF1 $\beta$  wild type, its coiled-coil domain mutants or its sumoylation-less mutant in living 293T cells. The BRET<sup>2</sup> pairs

tested were Rluc-TIF1 $\beta$ /GFP-TIF1 $\beta$  ( $\bullet$ ), Rluc-TIF1 $\beta$  L271P/GFP-TIF1 $\beta$  L271P ( $\diamond$ ), Rluc-TIF1 $\beta$  L307P/GFP-TIF1 $\beta$  L307P ( $\Delta$ ), Rluc-TIF1 $\beta$  4KR/GFP-TIF1 $\beta$  4KR (O) and the negative control pair Rluc-TIF1 $\beta$ /GFP-NLS ( $\ast$ ). Briefly, 293T cells were transfected with fixed amount of Rluc fusion protein (in the range of 1-2  $\mu$ g) and increasing amounts of GFP fusion protein (from 0,05 to 6  $\mu$ g). For each pair, data of at least three independent experiments performed in duplicate were pooled. The data were represented as described in EXPERIMENTAL PROCEDURES. **B)** TIF1 $\beta$  sumoylation depends on its homo-dimerization and on the integrity of the PHD finger domain. Comparison of the sumoylation profiles obtained in 293T cell extracts between wild type HA-tagged-TIF1 $\beta$  (2  $\mu$ g) and an HA-tagged- $\Delta$ N-TIF1 $\beta$  mutant devoid of the RBCC homo-dimerization motif (2  $\mu$ g) (left panel), Gal4- $\Delta$ N-TIF1 $\beta$  (10  $\mu$ g) and its derivative mutated in the PHD finger (middle panel) as well as Gal4-TIF1 $\beta$  and its derivative mutated in the PHD finger combined as shown in the right panel. GFP-SUMO1 (1  $\mu$ g in right panel or 2  $\mu$ g) was co-transfected with TIF1 $\beta$  constructs. For each experiment, the total GFP fluorescence was measured to confirm equivalent GFP-SUMO1 expression level. Arrow heads point to the unmodified TIF1 $\beta$ .

FIGURES

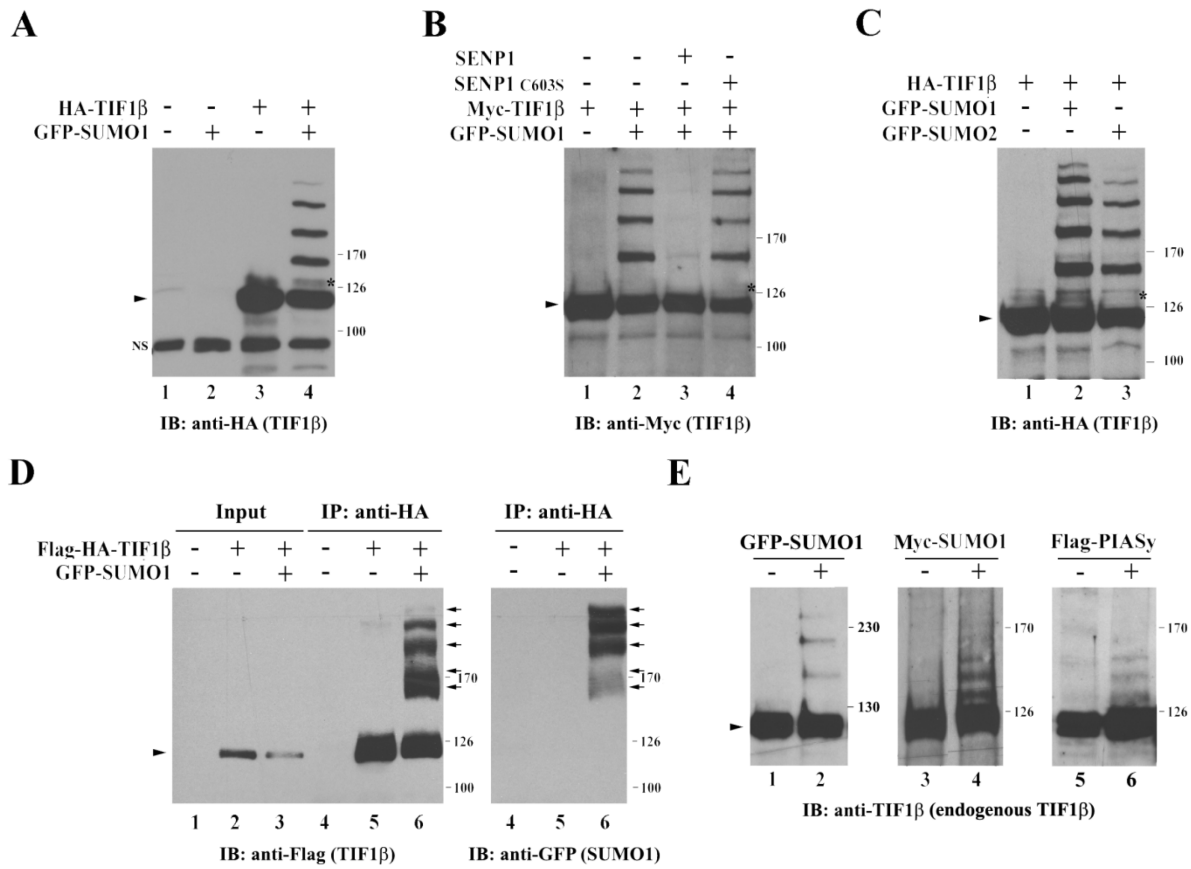
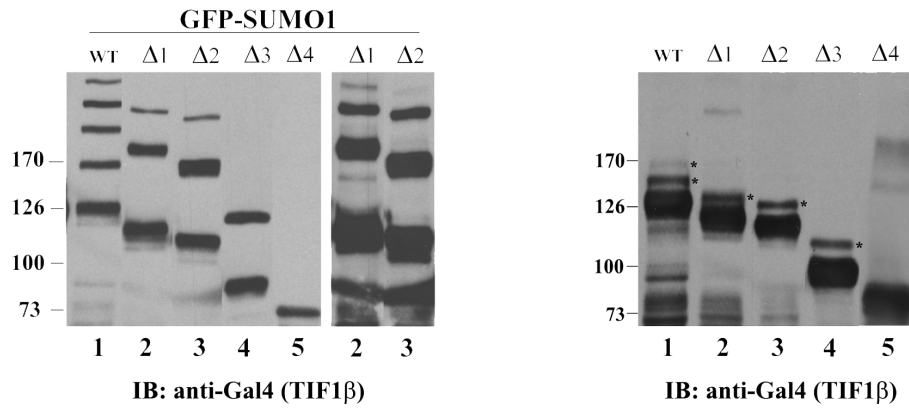


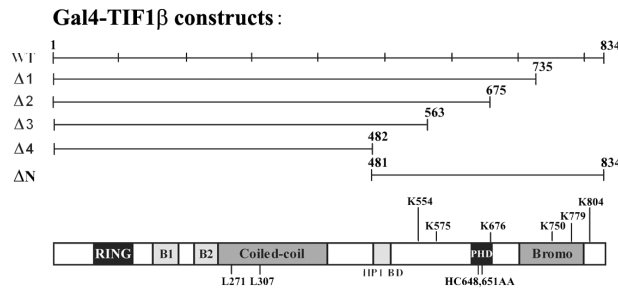
Figure 1



**A**



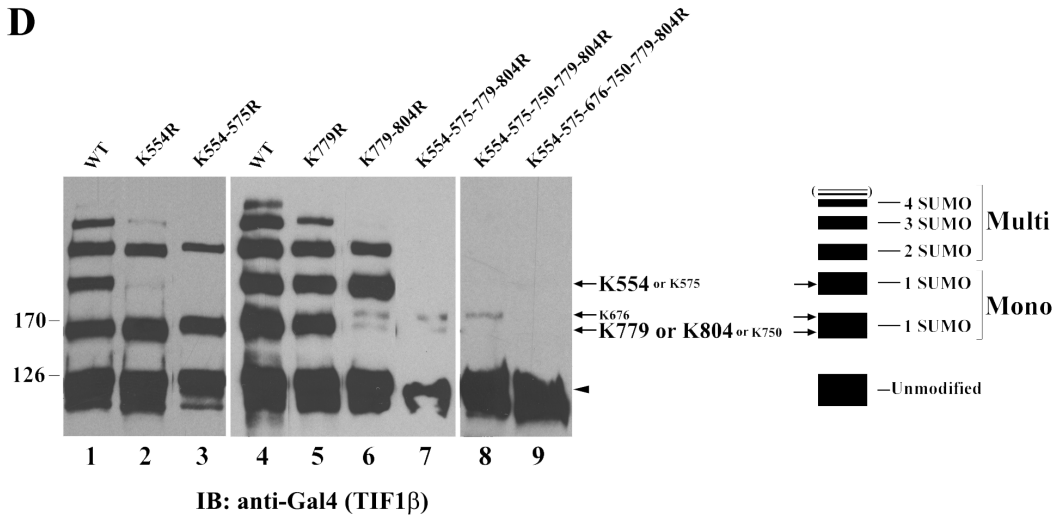
**B**



**C**

544 APPLPGMAIVK<sup>554</sup>EEETEAAIGA 564  
 565 PPAAPEGPETK<sup>575</sup>PVLMPLTEGP 585  
 666 CSLCHVLPDLK<sup>676</sup>EEDGSLSLDG 686  
 760 LTLIRARLQEK<sup>750</sup>LSPPYSSPQE 770  
 769 FKQFNKLTEDK<sup>779</sup>ADVQSIIGLQ 789  
 794 TRMNDAFGDTK<sup>804</sup>FSAVLVEPPP 814

**D**



**Figure 2**

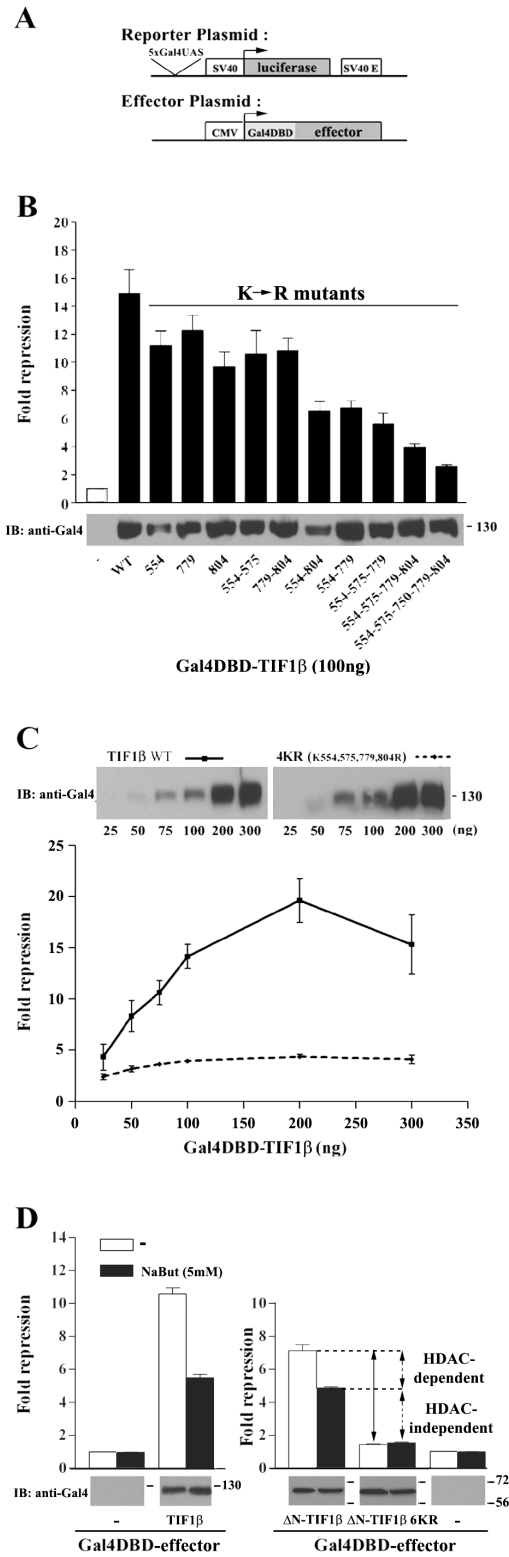
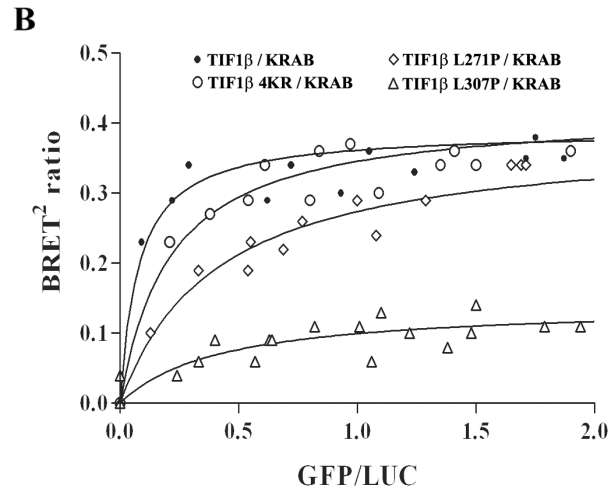
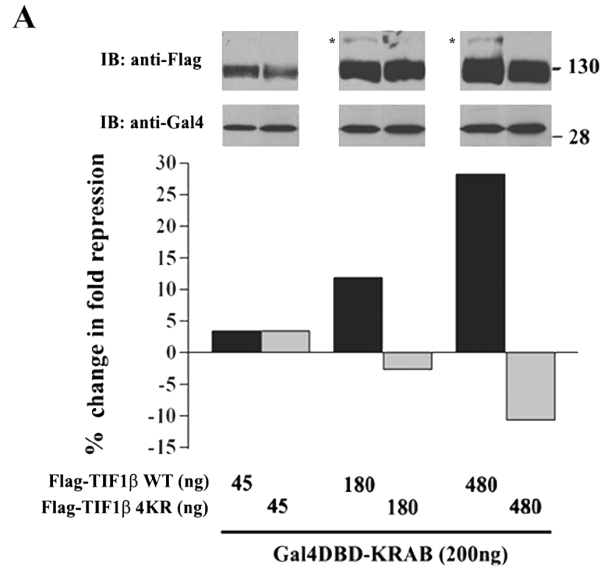


Figure 3



**Figure 4**

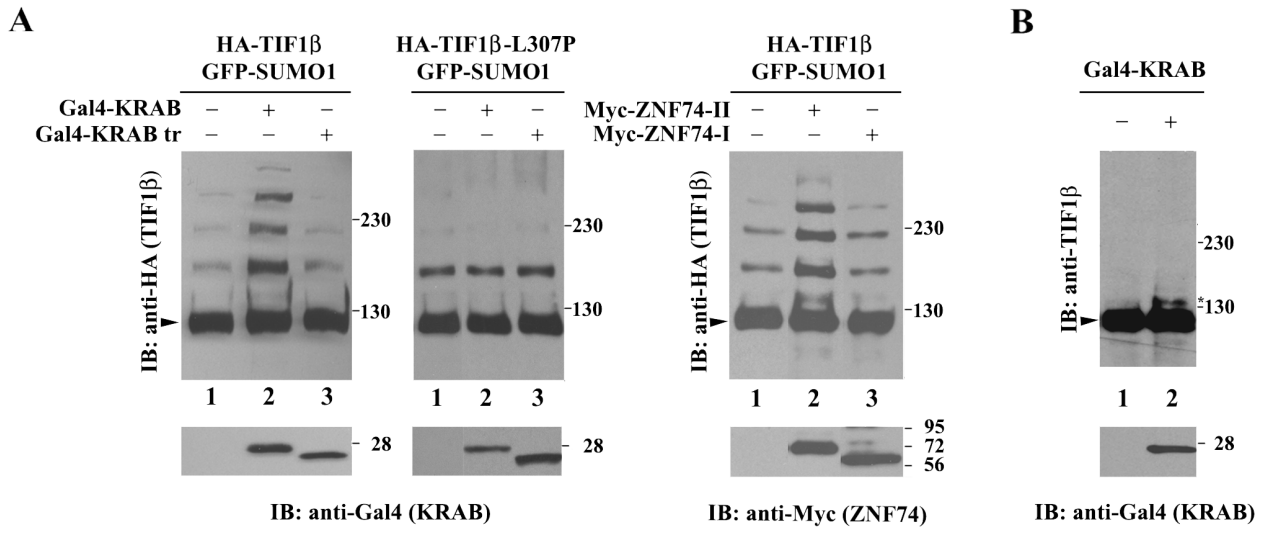


Figure 5

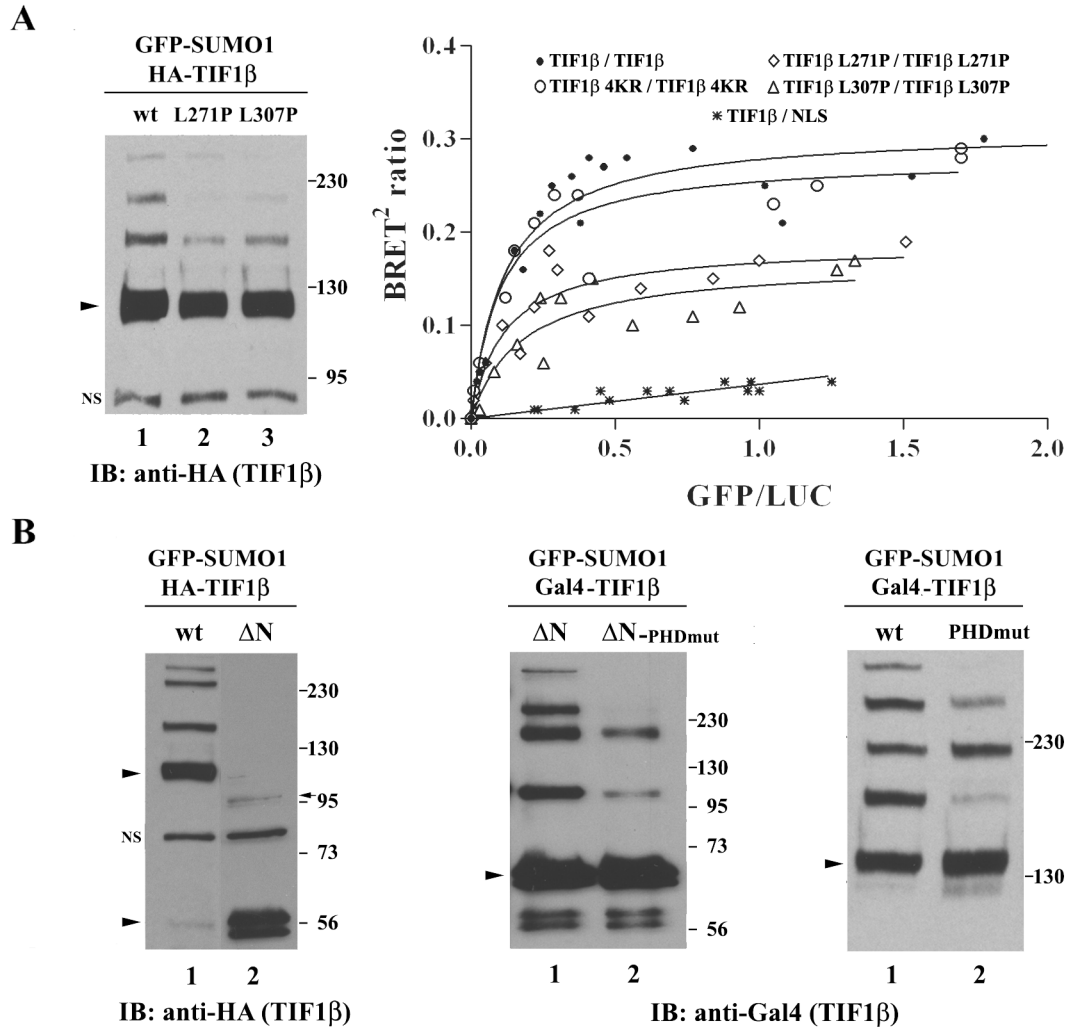


Figure 6



## 2 Préambule de la seconde étude

Dans le premier manuscrit nous avons déterminé que la modification par SUMO du co-régulateur TIF1 $\beta$  régule ses capacités de corépresseur. De plus, nos résultats suggèrent que la SUMOylation de TIF1 $\beta$  est impliquée dans la formation de complexes répresseurs. Ainsi, sachant que la plupart des protéines de la machinerie de SUMOylation (SUMO, UBC9 et les protéines PIAS) sont associées à des complexes répresseurs, nous avons postulé que SUMO régulate la formation de ces complexes et plus spécifiquement l'interaction entre UBC9 et PIAS1. De plus, en utilisant UBC9 et PIAS1 comme couple modèle d'enzymes E2 et E3 ce projet s'est inscrit dans la continuité des recherches visant à identifier les déterminants moléculaires qui gouvernent la spécificité des interactions entre les enzymes de conjugaison E2 et les enzymes de ligation E3.

Les résultats présentés dans ce chapitre sont exposés sous la forme d'un article scientifique prêt à être soumis dans la revue *EMBO*. Avec Muriel Aubry, j'ai conçu les expériences, généré les constructions, réalisé les expériences et analysé les résultats se rapportant aux essais de BRET et de gènes rapporteurs. Patricia Estephan a reproduit certaines des expériences de BRET et de gènes rapporteurs. Avec James G. Omichinski, j'ai contribué à la conception et à l'analyse des résultats ayant attiré aux expériences de calorimétrie à titrage isotherme et de RMN ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC) et j'ai généré les constructions s'y rapportant. Avec Matthieu Lussier-Price et Laurent Cappadocia, j'ai participé à la production ainsi qu'à la purification des protéines d'intérêt. Luca Raiola et Laurent Cappadocia ont été impliqués dans l'acquisition des spectres RMN. Finalement, j'ai rédigé le présent manuscrit qui a, par la suite, été corrigé par James G. Omichinski et Muriel Aubry.

**Article 2**



**PHOSPHORYLATION OF PIAS1 ENHANCES FORMATION OF A NON-COVALENT PIAS1:SUMO1:UBC9 TERNARY COMPLEX**

Xavier H. Mascle, Matthieu Lussier-Price, Laurent Cappadocia, Patricia Estephan, Luca Raiola, James G. Omichinski\* and Muriel Aubry\*

Département de Biochimie, Université de Montréal C.P. 6128 Succursale Centre-Ville, Montréal, QC H3C 3J7 Canada

**\*Correspondence:**

Muriel Aubry, Département de Biochimie, Université de Montréal C.P. 6128 Succursale Centre-Ville, Montréal, QC H3C 3J7 Canada.

James G. Omichinski, Département de Biochimie, Université de Montréal C.P. 6128 Succursale Centre-Ville, Montréal, QC H3C 3J7 Canada.

Telephone: 514-343-7341

Fax:514-343-2210

Running Title: *A non-covalent PIAS-SUMO:UBC9 ternary complex.*

**SUMMARY**

Post-translational modifications with Ubiquitin-like proteins (Ublps) require three sequentially acting enzymes (E1, E2 and E3) that unambiguously recognize each other. In humans, more than twenty E2s and at least five hundred RING-type E3s function in Ubiquitination. In contrast, the SUMOylation machinery utilizes a single E2 (UBC9) and a limited number of RING-type E3s (PIAS proteins). Therefore, the SUMOylation machinery represents an ideal model for investigating the pairing of E2 and E3 enzymes. Our biochemical and functional studies reveal that UBC9 and PIAS1 engage both in a canonical E2:E3 interaction as well as assembling into a non-covalent ternary complex with SUMO proteins. In the ternary complex, SUMO functions as a bridge by forming non-overlapping interfaces with both UBC9 and PIAS1. Moreover, our data indicates phosphorylation of serine residues adjacent to the PIAS1 SUMO-interacting Motif (SIM) enhances formation of the ternary complex and that UBC9-dependent transcriptional repression is dependent on its non-covalent interactions with both SUMO and PIAS. Taken together, the data enhances our knowledge concerning the mode of action of the E2 and E3 enzymes of the SUMO pathway and establishes a framework for investigations in other Ublps systems.

## INTRODUCTION

Post-translational modifications (PTMs) by ubiquitin-like proteins (ublp) occur on a large number of target proteins altering their functions or metabolism and subsequently cell response to stimuli. The covalent coupling of ublp family members (ubiquitin, NEDD8, SUMO, ISG15) to specific substrate proteins is achieved through a series of sequential steps involving three distinct enzymatic activities (E1 activating enzyme, E2 conjugating enzyme and E3 ligase) (Schulman 2011). The ubiquitination machinery has been extensively studied and it is currently known that the human genome encodes two E1 enzymes, more than twenty E2 enzymes and approximately five hundred RING-type E3 ligases (Deshaies and Joazeiro 2009; Schulman and Harper 2009; van Wijk and Timmers 2010). The appropriate pairing of E2 and E3 enzymes is an important determinant for target recognition specificity and subsequent ubiquitination (Christensen and Klevit 2009). Considering the number of possible combination of E2 and E3 enzymes, it is a challenging process to identify the functional ubiquitin E2:E3 pair required for ubiquitination of a given substrate and to understand the molecular basis that control specific interactions by ublp.

Human cells possess at least three functional SUMO proteins (SUMO1, 2 and 3) that share a similar three-dimensional structure with ubiquitin and NEDD8 despite having ~20% sequence identity (Boddy, Howe et al. 1996; Matunis, Coutavas et al. 1996; Okura, Gong et al. 1996; Shen, Pardington-Purtymun et al. 1996; Mahajan, Delphin et al. 1997; Saitoh, Pu et al. 1997; Bayer, Arndt et al. 1998; Chen, Mannen et al. 1998; Kamitani, Kito et al. 1998; Liu, Jin et al. 1999). In comparison to other known ublp systems, the SUMOylation machinery appears to be the simplest in terms of possible E2:E3 combinations (Gareau and Lima 2010). In the SUMOylation pathway, there is a single E1 activating enzyme (SAE1/SAE2 heterodimer), a single E2 conjugating enzyme (UBC9) and a limited number of RING-type E3 ligases [the Siz/PIAS (yeast/human) family members] (Desterro, Thomson et al. 1997; Gong, Kamitani et al. 1997; Johnson and Blobel 1997; Johnson, Schwienhorst et al. 1997; Okuma, Honda et al. 1999; Johnson and Gupta 2001; Kahyo, Nishida et al. 2001; Takahashi, Kahyo et al. 2001; Takahashi, Toh-e et al. 2001).

Like ubiquitin and NEDD8, SUMO proteins need to be activated prior to their conjugation to target proteins (Hay 2007). This maturation step, performed by the SUMO-specific proteases (SENPs), results in the cleavage of the carboxyl-terminal residues to expose a di-glycine motif that is required for SUMO adenylation in an  $Mg^{2+}$  and ATP-dependent reaction by the SUMO E1 enzyme SAE1/SAE2 (Johnson, Schwienhorst et al. 1997). Similar to the activation step for ubiquitin, the adenylated SUMO is attacked by the catalytic cysteine residue of the E1 enzyme resulting in the formation of a thioester bond (Olsen, Capili et al. 2010). The thioester-bound SUMO is then transferred to the catalytic cysteine residue of the SUMO E2 conjugating enzyme, UBC9, before being covalently linked to the target lysine residue of the substrate protein (Johnson, Schwienhorst et al. 1997; Desterro, Rodriguez et al. 1999; Okuma, Honda et al. 1999). Unlike what is observed with ubiquitination sites, a large proportion of SUMO-modified lysine residues are found within consensus motifs corresponding to the sequence  $\psi KxE/D$  (Rodriguez, Dargemont et al. 2001). This is consistent with the fact that a single E2-conjugating enzyme functions in the SUMOylation pathway and with the uniqueness of the catalytic cleft of UBC9 (Sampson, Wang et al. 2001).

The SUMO E2 conjugating enzyme UBC9 shares a similar catalytic core and tertiary structure (the UBC fold) with all other known ublp E2 conjugating enzymes (van Wijk and Timmers 2010). However, the surface electrostatic potentials of the UBC9 interfaces involved in interactions with the E1 enzyme and SUMO differ considerably from those found in other ublp E2s (Giraud, Desterro et al. 1998; Liu, Jin et al. 1999). These differences appear to allow UBC9 to form specific interactions with various components of the SUMOylation machinery including the E3 ligases. To date, four structurally unrelated SUMO E3 ligases have been identified in mammalian cells. These include the PIAS family members, RanBP2, PC2 and Topors (Sachdev, Bruhn et al. 2001; Kotaja, Karvonen et al. 2002; Pichler, Gast et al. 2002; Schmidt and Muller 2002; Kagey, Melhuish et al. 2003; Weger, Hammer et al. 2005). Among them, the members of the Siz/PIAS family (PIAS-1 to -4, Siz1 and -2) belong to the SP-RING-type (for Siz/PIAS-RING) SUMO E3 ligases that share a number of characteristics with the RING-type ubiquitin E3 ligases. In

particular, RING E3 ligases appear to act as scaffold proteins that position both the ublp loaded E2 conjugating enzyme and the substrate in order to allow modification of the target lysine residue (Yunus and Lima 2009). Moreover, a unifying theme among the SUMO E3 ligases is their ability to interact non-covalently with SUMO proteins via their SUMO Interacting Motifs (SIMs), which appears to be required for the activity of select SUMO E3 ligases (Takahashi, Kahyo et al. 2001; Kotaja, Karvonen et al. 2002; Weger, Hammer et al. 2003; Reverter and Lima 2005; Tatham, Kim et al. 2005; Merrill, Melhuish et al. 2010). These non-covalent interactions between SUMO proteins and their cognate E3 ligases seems to be shared among other ublp E3 ligases, since several ubiquitin E3 ligases display ubiquitin Binding Domains (UBDs) that contribute to specificity of the ubiquitination process (Davies, Ettenberg et al. 2004; Gyrd-Hansen, Darding et al. 2008; Smit, Monteferrario et al. 2012).

To better understand the mechanisms that govern the correct selection of E2:E3 combinations in ublps, we attempted to identify key determinants that regulate interactions between the SUMO E3 ligase PIAS1 and the SUMO E2 conjugating enzyme UBC9. Based on structure and sequence guided mutational analysis, we performed a series of *in vivo* and *in vitro* experiments to help define the interaction interfaces formed between SUMO, PIAS1 and UBC9. Based on our results, we conclude that PIAS1, UBC9 and SUMO form a ternary complex through a series of non-covalent interactions, where SUMO functions as a bridge to link PIAS1 and UBC9. While the covalent modifications of UBC9 by SUMO are not required for the formation of the ternary complex, the SUMO:UBC9 non-covalent interactions appear to enhance the ability of UBC9 to interact with PIAS1 within the ternary complex. In addition to their non-covalent interactions with SUMO in the ternary complex, PIAS1 and UBC9 also engage in a canonical E2:E3 RING interaction with each other, where specific residues of the PIAS1 SP-RING domain directly interact with the L4 loop of UBC9 loop. Moreover, our data support a model whereby the formation of a PIAS1:SUMO:UBC9 ternary complex has the capacity to function in transcriptional repression and its formation is regulated by the phosphorylation status of the SIM module of PIAS1.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Expression vectors*

#### *BRET constructs*

Human UBC9 cDNA (GenBank<sup>TM</sup> accession number U45328.1) was isolated from a human fetal brain MATCHMAKER cDNA library (Clontech) and cloned as a blunted NotI-SpeI fragment into a blunted BamHI digested pBluescript SK<sup>+</sup> vector. A SK<sup>+</sup>-UBC9-ΔSTOP codon construct was generated using site directed mutagenesis (Stratagene). UBC9-ΔSTOP was cloned as a SacI-ApaI fragment into pGFP2N2 vector (PerkinElmer Life Sciences) and as a blunted SacI-ApaI fragment into a EcoRV-ApaI digested pHRLucN2 vector (PerkinElmer Life Sciences). All the UBC9 mutants (UBC9-ΔSTOP, UBC9-R13A, UBC9-K14R, UBC9-R17A, UBC9-H20D, UBC9-F22A, UBC9-P69A, UBC9-C93S, UBC9-C93A, UBC9-P105A) were generated by site directed mutagenesis and verified by DNA sequencing. Human PIAS1 cDNA (GenBank<sup>TM</sup> accession number NM\_016166.1) was isolated from a human fetal brain MATCHMAKER cDNA library and cloned as a EcoRI-XhoI fragment into pBluescript SK<sup>+</sup> vector. PIAS1 was sub-cloned as a EcoRI-KpnI fragment into pHRLucC1 vector (PerkinElmer Life Sciences). All the PIAS1 mutants [PIAS1-L337A, PIAS1-SIMmt (PIAS1-V457A-V459A-I460A-L462A-I464A), PIAS1-3SA (PIAS1-S466A-S467A-S468A), PIAS1-3SD (PIAS1-S466D-S467D-S468D)] were generated by site directed mutagenesis and verified by DNA sequencing. PIAS1-5EA (PIAS1-E470A-E471A-E472A-E473A-E474A) was ordered (Bio Basic) as a XbaI-KpnI fragment and sub-cloned into pHRLuc-PIAS1 in replacement of the wild-type fragment and verified by DNA sequencing. The non conjugable version of human SUMO1 (GenBank<sup>TM</sup> accession number U67122.1) and of human SUMO2 (GenBank<sup>TM</sup> accession number X99585.1) fused to pGFP10 were generated by site directed mutagenesis from pGFP10-SUMO1 and pGFP10-SUMO2 (Masclé, Germain-Desprez et al. 2007), mutating the SUMO di-glycine motif to alanine residues. All the SUMO1 mutants [SUMO1mt (SUMO1-F36A-K37A-K39A-K45A-K46A) and SUMO1-E67R] and the SUMO2 mutant (SUMO2-D63R) were generated by site directed mutagenesis starting from the cDNAs

encoding the non-conjugable forms of SUMO1 and SUMO2 respectively. All the SUMO constructs were verified by DNA sequencing.

#### *Recombinant protein constructs*

The sequences encoding for the human PIAS1-SIM peptide (residues 456-480), PIAS2-SIM peptide (residues 466-489, GenBank<sup>TM</sup> accession number NM\_173206.3) and the PIAS1-SIM-3SD peptide (S466, S467, S468 mutated to aspartic acid) were ordered as oligo-nucleotides (Integrated DNA Technologies) with BamHI and EcoRI restriction enzymes sites, 5'phosphorylated, annealed and cloned as BamHI-EcoRI fragments into pGEX-2T vector (GE Healthcare). SUMO1 (residues 2-97 of human SUMO1) cDNA was PCR amplified from pGFP10-SUMO1 (Masclé, Germain-Desprez et al. 2007) and cloned as a XbaI fragment into pGEX-4T3 vector (GE Healthcare). A SUMO1-C52A point mutant was generated using site directed mutagenesis. SUMO2 (residues 1-93 of human SUMO2) cDNA was PCR amplified from pGFP10-SUMO2 (Masclé, Germain-Desprez et al. 2007) and cloned as a BamHI-EcoRI fragment into pGEX-2T vector. UBC9 (residues 1-158 of human UBC9) cDNA was PCR amplified and cloned as a BamHI-EcoRI fragment into pGEX-2T vector. All the constructs were verified by DNA sequencing.

#### *Transcriptional assay constructs*

Human UBC9 cDNA sequence in fusion with Gal4DBD-(1-147) (which encodes a nuclear localization signal) was cloned as a BsrGI-BamHI fragment in pcDNA3.1-Gal4DBD vector. All the UBC9 mutants (UBC9-K14R, UBC9-R17A, UBC9-H20D, UBC9-C93S, UBC9-C93A, UBC9-D100A-K101A, UBC9-P128A, UBC9-Y134A) were generated by site directed mutagenesis and verified by DNA sequencing.

#### *Transient transfections*

Human embryonic kidney 293T cells (HEK 293T) maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent), 100 µg/ml penicillin and streptomycin, 1 mM L-glutamine were seeded at a density of  $\sim 1 \times 10^6$  cells per 100-

mm dish for BRET experiments, and  $\sim 2 \times 10^5$  in 6-well plates for transcriptional assays. Transient transfections of plasmids were performed on the following day using the calcium phosphate precipitation method except for transcription assays where FuGENE transfection reagent (3  $\mu$ l/1  $\mu$ g DNA) (ThermoFisher) was used. The total amount of transfected DNA was kept constant (10  $\mu$ g for 100-mm dishes and 1  $\mu$ g for 6-well plates).

### ***BRET experiments***

The BRET assays were conducted as previously described in (Germain-Desprez, Bazinet et al. 2003). Cells transiently transfected with the luciferase donor and GFP acceptor were resuspended and distributed in 96-well plates. Upon addition of the cell permeant luciferase substrate (coelenterazine deep blue, PerkinElmer Life Sciences), the bioluminescence signal resulting from its degradation was detected using a 370–450-nm band pass filter (donor emission peak 400 nm). The energy transferred resulting in a fluorescence signal emitted by the GFP acceptor (excitation peak 400 nm, emission peak 510 nm) was detected using a 500–530-nm band pass filter. The BRET signal (BRET ratio) was quantified by calculating the acceptor fluorescence/donor bioluminescence ratio as previously reported in (Mercier, Salahpour et al. 2002). Expression level of each construct was determined by direct measurements of total fluorescence and luminescence on aliquots of transfected cell samples. The GFP total fluorescence was measured using a Fusion alpha FP (Packard) with an excitation filter at 425 nm, an emission filter at 515 nm. The total luminescence was measured using the same cells incubated with coelenterazine H for 10 min (Molecular Probes) (emission peak 485 nm). The BRET ratios were plotted as a function of the GFP/Luc fusion protein expression ratio, both fusion proteins expression being assessed with the same cells as described above, to take into account the potential variations in the expression of individual constructs from transfection to transfection.

### ***Transcriptional Assays***

Transient transfections were done as described above. The firefly luciferase reporter plasmid pGL3–5xGal4 corresponds to pGL3 vector under the control of the SV40 promoter



(Promega) and a multimerized Gal4 DNA binding sequence (AGGGTATATAATG) ×5. The *Renilla* luciferase vector phRluc-C1 (PerkinElmer Life Sciences) (20 ng) was co-transfected to normalize for transfection efficiency. The effector plasmid corresponds to pcDNA3.1 (Invitrogen) in which Gal4DBD-(1–147) was cloned and fused to UBC9 and mutants (see description above). The total amount of transfected DNA was kept constant by addition of the pcDNA3.1 empty vector. Cell lysates were prepared 48 h after transfection and split into two samples for determination of the luciferase activity and assessment of the level of protein expression by Western blotting. The equivalent of 35 µg of cell lysates was processed for the luciferase activity using the Dual Glo™ luciferase assay kit (Promega).

#### ***Induction and Purification of Glutathione S-Transferase (GST) Fusion Proteins***

SUMO1, SUMO2, UBC9, PIAS1-SIM, PIAS1-SIM-3SD, and PIAS2-SIM were expressed as GST-fusion proteins in *E. coli* host strain TOPP2 (Stratagene). The cells were grown at 37°C in Luria Broth media, and protein expression was induced for ~4 h at 30°C with 0.7 mM isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Inalco). The cells were harvested by centrifugation and resuspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 M NaCl, 0.2 mM EDTA, and 1 mM DTT). The cells were then lysed by being passed through a French press and centrifuged at 35,000 g for 1 h at 4°C. The supernatant was then collected and incubated for 1 h with glutathione–Sepharose (GSH) resin (GE Healthcare) at 4°C. Following incubation, the resin was collected by centrifugation and extensively washed with lysis buffer and phosphate-buffered saline (PBS) (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4), 140 mM NaCl, and 3 mM KCl). The resin bound proteins were incubated 2 h with 100 units of Thrombin (Calbiochem) in order to cleave the GST tag from proteins. The SUMO and UBC9 proteins were then eluted in PBS and dialyzed against Sodium Phosphate buffer (20 mM Sodium Phosphate, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) at an appropriate pH. For further purification, a Q-Sepharose High Performance column (GE Healthcare) was used for SUMO proteins while a SP-Sepharose High Performance column (GE Healthcare) was used for UBC9. After elution, the PIAS peptides were dialyzed against acetic acid 5% and purified over a C<sub>4</sub>-reverse phase HPLC column (Vydac). An

additional purification step on a Sephadex-75 gel filtration column (GE Healthcare) was performed for SUMO and UBC9 proteins. Proteins and peptides were then desalted, lyophilized (for SUMOs and SIM-containing peptides) and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until being processed for ITC or NMR experiments.  $^{15}\text{N}$ -labeled proteins were prepared as previously described, but the *E. coli* host strain was grown in a M9-minimal media containing  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  (Sigma) as the sole nitrogen source.

### ***Isothermal Titration Calorimetry (ITC) experiments***

Prior to the day of ITC experiment, lyophilized proteins were resuspended in ultra pure MilliQ water and dialysed over night at  $4^{\circ}\text{C}$  against Tris buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4). The concentration of proteins was determined from absorbance at a wavelength of 280 nm. ITC measurements of filtered degassed samples were performed at  $25^{\circ}\text{C}$  by using a Microcal VP-ITC calorimeter (MicroCal). The ratio of the concentration of the protein or peptide in the syringe over the one in the sample cell was adjusted to 10. All titrations experiments were done at least in duplicates and were fit to a single binding site interaction with 1:1 stoichiometry. The baseline-corrected data were fit with the Origin 7 software.

### ***NMR Spectroscopy***

For the NMR chemical shift perturbation experiments of SUMO1, 0.5 mM  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 was used in 20 mM sodium phosphate (pH 6.5) and 90%  $\text{H}_2\text{O}$ , 10%  $\text{D}_2\text{O}$ . To map the PIAS1-SIM peptides binding site on SUMO1, unlabeled PIAS1-SIM or PIAS1-SIM-3SD peptides were sequentially added to a final ratio of 1:1.5. To map the UBC9 binding site on SUMO1, unlabeled UBC9 protein was sequentially added to a final ratio of 1:1. For the NMR chemical shift perturbation experiments of the PIAS1-SIM-3SD peptide, 0.5 mM  $^{15}\text{N}$ -labeled PIAS1-SIM-3SD was used in 20 mM sodium phosphate (pH 6.5) and 90%  $\text{H}_2\text{O}$ , 10%  $\text{D}_2\text{O}$ . The  $^{15}\text{N}$ -PIAS1-SIM-3SD:SUMO1 complex was obtained by sequential addition of unlabeled SUMO1 to a final ratio of 1:2. The PIAS1-SIM-3SD:UBC9 interactions was assessed by either sequential addition of unlabeled UBC9 in 0.5 mM of  $^{15}\text{N}$ -labeled PIAS1-SIM-3SD to a final ratio of 1:3 or by sequential addition of unlabeled

PIAS1-SIM-3SD peptide in 0.5 mM of  $^{15}\text{N}$ -labeled UBC9 to a final ratio of 1:4. For the PIAS1-SIM-3SD:SUMO1:UBC9 ternary complex, two set of independent experiments were performed. 0.5 mM  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 was used in 20 mM sodium phosphate (pH 6.5) and 90%  $\text{H}_2\text{O}$ , 10%  $\text{D}_2\text{O}$  supplemented with either, 0.75 mM of unlabeled PIAS1-SIM-3SD peptide and then unlabeled UBC9 to a final concentration of 0.5 mM, or with 0.5mM of unlabeled UBC9 and then unlabeled PIAS1-SIM-3SD peptide to a final concentration of 0.75 mM. NMR experiments were carried out at 300 K on Varian Unity Inova 500- and 600-MHz spectrometers. The backbone assignment of SUMO1 and UBC9 were obtained from the Biological Magnetic Resonance Data Bank (accession numbers 6304 and 4132 respectively). The NMR data were processed with NMRPipe/NMRDraw and analyzed with CcpNMR.

## RESULTS

### *A conserved hydrophobic residue in PIAS1 is required for interaction with UBC9.*

The Siz/PIAS family SUMO E3 ligases possess a SP-RING that displays both sequence and structure homology with the RING and U-box domains from ubiquitin E3 ligases (Yunus and Lima 2009) (**Figure 1A and Supplementary figures S1.1A, S1.1B, S1.2B-D**). Several *in vitro* binding studies have shown that SP-RING domains are capable of directly interacting with UBC9, but very little is known regarding the determinants for this interaction (Takahashi, Kahyo et al. 2001; Takahashi, Toh-e et al. 2001; Kotaja, Karvonen et al. 2002; Schmidt and Muller 2002). In order to better understand the role of the SP-RING domain of PIAS proteins in binding to UBC9, we searched for highly conserved sequences in known SP-RING domains that might mediate this interaction. Based on the sequence alignments (**Figure 1B and supplemental figure 1.1A-B**), we identified several residues that are either identical or homologous in all SP-RING domains. From these residues, we chose to mutate a conserved hydrophobic residue (L337) to assess its role in the binding of PIAS1 to UBC9 in a cellular context. This particular residue was chosen because a similar residue in Siz1 (I363) has been shown to be essential for its *in vitro* enzymatic activity (Yunus and Lima 2009).

The interaction between PIAS1-L337A and UBC9 was monitored in HEK293T cells using a Bioluminescent Resonance Energy Transfer (BRET) assay as a method for measuring protein-protein interactions in a cellular context (**Figure 1C**). HEK293T cells were co-transfected with a fixed amount of a DNA construct coding for either the full length wild-type PIAS1 or the PIAS1-L337A mutant fused to Renilla luciferase (Rluc-PIAS1) along with increasing amounts of a DNA construct coding for UBC9 fused to the Green Fluorescent Protein (UBC9-GFP). For wild-type Rluc-PIAS1, the BRET ratio increases as a function of UBC9-GFP concentration and reaches a maximum when the UBC9-GFP expression levels (BRET acceptor) are no longer limiting relative to the Rluc-PIAS1 expression levels (BRET donor). The saturation curve is indicative of a specific interaction between PIAS1 and UBC9 under these experimental conditions (**Figure 1C**). In

contrast, a much lower BRET signal is obtained for the interaction between UBC9-GFP and the Rluc-PIAS1-L337A mutant (**Figure 1C**). This is indicative of a weaker interaction and suggests that L337 within the SP-RING domain of PIAS1 is an important determinant for the interaction with UBC9. This result demonstrates that L337 is required for efficient PIAS1:UBC9 interaction in a cellular context and is consistent with the fact that an equivalent residue is essential for the *in vitro* SUMO E3 activity of Siz1 (Yunus and Lima 2009). Moreover, this result suggests that different classes of RING-related E3 ligases use similar molecular determinants to recognize their cognate E2-conjugating enzyme (Zheng, Wang et al. 2000; Albert, Hanzawa et al. 2002; Brzovic, Keefe et al. 2003; Dominguez, Bonvin et al. 2004).

***A conserved proline residue in UBC9 is required for binding to PIAS1.***

Next, we attempted to identify the region of UBC9 involved in the interaction with the SP-RING domain of PIAS1. Structural studies indicate that UBC9 shares a common three-dimensional structure with Ubiquitin E2 enzymes. Furthermore, the integrity of the L4 and/or L7 loops of several ubiquitin E2 enzymes have been shown to mediate their interaction with the RING domain of their ubiquitin E3 ligases (Christensen, Brzovic et al. 2007; Mace, Linke et al. 2008; Xu, Kohli et al. 2008; Yin, Lin et al. 2009; Bentley, Corn et al. 2011) (**Supplementary figures S1.1B-D**). In an attempt to identify residues in either the L4 or L7 loop of UBC9 that might mediate interaction with the SP-RING domain of PIAS1, we aligned UBC9 sequences from several species along with various ubiquitin E2-conjugating enzymes (**Figure 1D and Supplementary figure 1.1C**). Based on the alignments, we identified two highly conserved proline residues that correspond to P69 in loop 4 and P105 in loop 7 of human UBC9 (**Figure 1D and Supplementary figure 1.1C**). Based on the analysis of available UBC9 crystal structures, these two proline residues are solvent exposed and thus potentially available to form interactions with the SP-RING domain of PIAS1. To validate this hypothesis, we generated UBC9-P69A and UBC9-P105A mutants to test them for interaction with PIAS1 using our BRET assay (**Figure 1E**). In comparison to wild type UBC9, only a slight reduction in the BRET signal is obtained

with the UBC9-P105A (**Figure 1E**). In contrast, a significant reduction in the BRET signal is observed for the interaction between PIAS1 and the UBC9-P69A (**Figure 1E**). Based on these results, it appears that the conserved P69 residue in the L4 loop of UBC9 is crucial for the interaction with PIAS1. Furthermore, superimposition of the three-dimensional structures of UBC9 and Siz1 onto the structures of several ubiquitin E2:E3 RING or U-box complexes, indicates that the conserved proline residue in the L4 loop of UBC9 should be positioned at the interface with the SP-RING domain of Siz1 (**Supplementary figure 1.2B-D**). Taken together, these data indicate that PIAS1 and UBC9 share a similar type of interaction interface with ubiquitin RING-type E3 and E2 enzymes where specific residues within the SP-RING of PIAS1 contact the L4 loop of UBC9.

***PIAS1 is capable of binding to non-SUMO modified UBC9.***

Several *in vitro* studies indicate that ubiquitin E2-conjugating enzymes must be charged with ubiquitin before interacting with their E3 ligases (Levin, Eakin et al. 2010; Spratt, Wu et al. 2012) To explore the role of the SUMO moiety conjugated to the catalytic cysteine residue of UBC9 in the interaction with SUMO E3 ligases, two catalytically inactive UBC9 mutants (UBC9-C93S, UBC9-C93A) were generated and their respective ability to bind to PIAS1 measured using the BRET assay (**Figure 2A-B**). Surprisingly, the two catalytically inactive UBC9 mutants interact with PIAS1 in a similar manner as the wild-type UBC9 in the BRET assay (**Figure 2A**). In addition, SUMOylation of UBC9 at K14 is also not required for the PIAS1:UBC9 interaction since the UBC9-K14R mutant interacts to the same level with PIAS1 in the BRET assay as wild-type UBC9 (**Figure 2C**). These results demonstrate that in a cellular context, neither SUMO-modification of UBC9 nor the formation of a thioester linkage between SUMO and UBC9 are essential for PIAS1 to bind UBC9. These results suggest that PIAS proteins are able to specifically interact with free UBC9 in a non-covalent fashion.

***Cellular evidence for a non-covalent PIAS1:SUMO:UBC9 ternary complex.***

Previous studies have characterized the *in vitro* formation of non-covalent binary complexes between SUMO proteins and UBC9 (SUMO:UBC9) as well as between SUMO1 and PIAS2 (PIAS2:SUMO1) (Liu, Jin et al. 1999; Tatham, Kim et al. 2003; Song, Durrin et al. 2004; Song, Zhang et al. 2005) (**Supplementary Figures 3.1G and 3.2D-E**). In the non-covalent complex between SUMO and UBC9, a region of UBC9 spanning from the end of the first  $\alpha$ -helix (R13) to the second loop (V26) (human numbering) forms the interface with a region encompassing the first, the fourth and the fifth  $\beta$ -strands ( $\beta$ 1,  $\beta$ 4 and  $\beta$ 5) of SUMOs (residues L24-S31, L65-Q69 and M82-V90 in human SUMO1). In the PIAS2:SUMO1 non-covalent complex, the SIM of PIAS2 (V467-T473 in human PIAS2) forms the interface with the region of SUMO1 commencing at the first residue of the  $\beta$ 2-strand (D33 in human SUMO1) and ending at the last residue of the  $\alpha$ -helix (R54 in human SUMO1). Since the residues of SUMO that form the interfaces with UBC9 and PIAS proteins are located on non-overlapping surfaces, we posited that SUMO mediates the formation of a non-covalent ternary complex by specifically bridging the UBC9 and PIAS proteins.

In order to address the possibility of a non-covalent PIAS1:SUMO:UBC9 ternary complex, we first confirmed the SUMO:UBC9 and PIAS1:SUMO non-covalent interactions in the cell-based BRET assay (**Supplementary figures 3.1C-F and 3.2B-C**). Next, we tested several UBC9 mutants including R13A, R17A, H20D and F22A for binding to PIAS1 by BRET (**Figures 3B-D**). These UBC9 mutants were chosen because they are strictly conserved and are not found in other ubiquitin-like E2-conjugating enzymes. Moreover, they have been found to alter UBC9 binding to SUMO *in vitro* (Capili and Lima 2007; Knipscheer, van Dijk et al. 2007). When compared to the BRET signal obtained for the wild type PIAS1:UBC9 complex (**Figures 3B, 3C and 3D**), a significant reduction in signal is obtained with the UBC9-R17A, UBC9-H20D and UBC9-F22A mutants (**Figures 3B and 3D**). In addition, a less dramatic, but significant effect is also observed with the UBC9-R13A mutant (**Figure 3C**). These results strongly suggest that the SUMO:UBC9 non-covalent interaction is required for the stabilization and possibly for the

*in vivo* formation of the PIAS1:UBC9 non-covalent complex and supports the possible existence of a PIAS1:SUMO:UBC9 ternary complex.

Recently, PIAS1 was found to form a non-covalent interaction with SUMO through its SIM (Stehmeier and Muller 2009). In order to define the role of the PIAS1 SIM in the formation of the PIAS1:SUMO:UBC9 ternary complex, a PIAS1 protein mutated in its SIM was generated (PIAS1-SIMmt) and its interaction with UBC9 assessed in the BRET assay (**Figure 3F**). As expected, a significant decrease is observed in the BRET signal for the PIAS1-SIMmt:UBC9 complex in comparison to the signal with the wild-type PIAS1:UBC9 complex. This result is consistent with those previously obtained when testing the role of the SUMO:UBC9 non-covalent interaction in the PIAS1:UBC9 complex formation. In addition, it strongly argues that the non-covalent recruitment of SUMO proteins to PIAS1 is required for stabilization and/or formation of the PIAS1:UBC9 interaction and again these results strongly support the possible importance of a PIAS1:SUMO:UBC9 ternary complex.

To further verify the role of a PIAS1:SUMO:UBC9 ternary complex, we tested several UBC9 mutants (R13, R17, H20 and F22) for their binding to SUMO. As expected, these UBC9 mutants all disrupt or alter the SUMO:UBC9 non-covalent interaction in the cell-based BRET assay (**Figure 3A and Supplementary figures 3.1A, 3.1C, 3.1E-F**). Similarly, the specific interaction between UBC9 and SUMO is also greatly diminished by either a SUMO1-E67R mutant or SUMO2-D63R mutant in the BRET assay (**Supplementary figures 3.1 C and D**). This acidic residue is also conserved across evolution within the SUMO family members, but is not present in other ublps such as ubiquitin and NEDD8 (**Supplementary figure 3.1 B**). Taken together, these results support the existence of a PIAS1:SUMO:UBC9 ternary complex where SUMO bridges UBC9 with PIAS1 and stabilizes their non-covalent interactions.

### ***Phosphorylation of the PIAS1 SIM enhances formation of the ternary complex***

Recent studies have shown that CK2-dependent phosphorylation of residues immediately adjacent to the SIM sequences in DAXX, (Death-associated protein 6) and



PML (ProMyelocytic Leukemia protein) play an important role in their function (Lin, Huang et al. 2006; Scaglioni, Yung et al. 2006). Interestingly, three serine residues immediately adjacent to the SIM sequence of PIAS1 have also been shown to be phosphorylated by CK2 and to influence the PIAS1:SUMO interaction (Stehmeier and Muller 2009) (**Figures 4C-D and Supplementary figures 4.1B-C**). Based on these results, we postulated that phosphorylation of these serine residues of PIAS1 might enhance the formation of a PIAS1:SUMO:UBC9 ternary complex. To test this possibility, we generated PIAS1 mutants where all three-serine residues were modified to either a phosphomimetic aspartic acid residue (PIAS1-3SD) or a non phosphorylatable alanine residue (PIAS1-3SA). Interestingly, BRET saturation curves indicate that UBC9 binds more efficiently to the PIAS1-3SD mutant than to the PIAS1-3SA mutant. In contrast, only a small increase in binding efficiency is observed in the UBC9 binding to the PIAS1-3SD mutant compared to the wild-type PIAS1 (**Figure 4A**). This small difference between the PIAS1-3SD mutant and the wild-type protein suggests that PIAS1 may be constitutively phosphorylated in HEK293T cells. To explore this possibility, a PIAS1 mutant containing five alanine substitutions for five glutamic acid residues (PIAS1-5EA) was generated in order to alter the three CK2 consensus sites without mutating the serine residues that undergo phosphorylation (**Supplementary figure 4.1A**). In agreement with what is obtained with the PIAS1-3SA mutant, a decrease in the BRET signal is observed for the interaction between the PIAS1-5EA mutant and UBC9 in comparison to wild-type PIAS1 (**Figure 4B**). Taken together, these results support a model where the formation of the PIAS1:SUMO:UBC9 ternary complex is positively regulated by CK2-dependent phosphorylation of serine residues adjacent to the PIAS1 SIM.

***Phosphomimetic substitutions in the PIAS1 SIM enhance in vitro binding to SUMO.***

To address the impact of the PIAS1 phosphorylation status on the formation of the PIAS1:SUMO:UBC9 ternary complex *in vitro*, chemical shift perturbations studies were performed using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy. In these studies we mapped the binding sites on SUMO1 for a 25-residue peptide encompassing the SIM of

PIAS1 (PIAS1-SIM) and compared it to a phosphomimetic PIAS1-SIM peptide (PIAS1-SIM-3SD) (**Figure 5A and 5C**). In the PIAS1-SIM-3SD peptide, the three serine residues of PIAS1 that have been shown to be phosphorylated by CK2 were changed to aspartic acid as done previously in our BRET assay (**Figure 4A**).  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experiments were conducted using  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 titrated with either the native PIAS1-SIM peptide or the PIAS1-3SD peptide. As expected, sequential addition of either the PIAS1-SIM or the PIAS1-SIM-3SD peptides resulted in significant chemical shift changes [ $\Delta\delta(\text{ppm}) > 0.2$ ] for specific signals of SUMO1 (**Figure 5B and Supplementary figures 5.2A, 5.3A, 5.3B**). Interestingly, superimposition of the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra from the two titrations allowed us to identify the signals of SUMO1 that are specifically changed due to the presence of the three phosphomimetic residues (**Figure 5C and supplementary figure 5.2B**). The SUMO1 signals displaying phosphomimetic dependent changes are associated with residues located mainly in a region spanning from the end the  $\beta$ 2-strand to the start of the  $\alpha$ -helix of SUMO1. Within this region, H43 and K46 undergo the most dramatic chemical shift changes [ $\Delta\delta(\text{ppm}) > 0.07$ ] (**Figure 5C and supplemental figure 5.2B**). To confirm that the PIAS1-SIM peptide binds only to SUMO1 and not to UBC9, a second set of NMR mapping studies were conducted using  $^{15}\text{N}$ -labeled PIAS1-SIM-3SD peptide titrated with either unlabeled SUMO1 or unlabeled UBC9. As expected, chemical shift changes are observed for signals of the  $^{15}\text{N}$ -labeled PIAS1-SIM-3SD peptide upon sequential additions of SUMO1 (**Figure 5D**). In contrast, no significant changes are observed for either the  $^1\text{H}$  or  $^{15}\text{N}$  chemical shifts of the  $^{15}\text{N}$ -labeled PIAS1-SIM-3SD peptide when UBC9 is added (**Figure 5E**). To further confirm that UBC9 specifically binds only to SUMO1 and not the PIAS1 SIM peptide,  $^{15}\text{N}$ -labeled UBC9 was titrated with the PIAS1-SIM-3SD peptide. As expected, no significant chemical shift changes are observed for the  $^{15}\text{N}$ -labeled UBC9 upon addition of PIAS1-SIM-3SD (data not shown). Together, these results confirm that the PIAS1 SIM directly binds SUMO1 and that a basic patch in SUMO1 (**Supplementary figure 3.2A**) is the region involved in the recognition of the negative charges mimicking the phosphorylation of the PIAS1 SIM module.

To more quantitatively assess the potential role of phosphorylation in PIAS1, we determined the dissociation constants for the binding of SUMO1 to the PIAS1-SIM and PIAS1-SIM-3SD peptides using Isothermal Titration Calorimetry (ITC) studies. By ITC, the PIAS1-SIM peptide binds to SUMO1 with an apparent dissociation constant ( $K_D$ ) of  $2.0 \pm 0.5 \mu\text{M}$  whereas the PIAS1-SIM-3SD peptide binds with a  $K_D$  of  $0.50 \pm 0.15 \mu\text{M}$  (**Figures 4C, 4D**). Thus, the PIAS phospho-SIM module binds SUMO1 with approximately 4-fold higher affinity. The binding of the PIAS1-SIM peptide is similar to what was previously observed in ITC studies examining the binding of the PIAS2-SIM peptide to SUMO1 (Song, Durrin et al. 2004) (**Supplementary figures 3.2D, 3.2E**). Thus, the ITC studies are consistent with our BRET results and suggest that phosphorylation of CK2 sites adjacent to the SIM of PIAS1 enhances the interaction between SUMO1 and PIAS1.

***Two distinct interfaces of SUMO are required for the non-covalent ternary complex.***

In order to confirm that PIAS1, SUMO and UBC9 coexist within a non-covalent ternary complex bridged by SUMO, we performed NMR chemical shift mapping experiments using  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1, unlabeled UBC9 and unlabeled PIAS1-SIM-3SD peptide.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experiments were conducted by sequentially adding either unlabeled UBC9 or unlabeled PIAS1-SIM-3SD to  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1. Increasing amounts of unlabeled UBC9 or PIAS1-SIM-3SD were added into two distinct  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 samples and their respective 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrums were recorded. As anticipated, upon formation of the SUMO1:UBC9 and PIAS1-SIM-3SD:SUMO1 complexes, the  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 residues exhibiting significant chemical shift changes in  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  dimensions were located at two distinct SUMO1 surfaces [ $\Delta\delta(\text{ppm}) > 0.2$ ] (**Figure 5B and Supplementary Figures 5.3B and 5.4A-B**). Superimposition of the resultant 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrums revealed differences for numerous chemical shifts of a number of SUMO1 signals, confirming that non-overlapping SUMO1 surfaces were involved in the formation of the two binary complexes (**Figure 6A**). To form the ternary complexes, PIAS1-SIM-3SD was added to the sample containing the  $^{15}\text{N}$ -labeled

SUMO1:UBC9 proteins and reciprocally, UBC9 was added to the  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1:PIAS1-3SD complex. As expected, the two resultant 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrums obtained were similar and resulted in perturbations induced by both PIAS1-SIM-3SD and UBC9 (**Figure 6B, 6C**). This indicates that we obtained identical ternary complexes as these spectrums were clearly distinct from those obtained with either free  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 or the two binary complexes ( $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1:UBC9 and  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1:PIAS1-SIM-3SD) (**Supplementary Figure 6**). These results clearly demonstrates that a non-covalent ternary complex can form between PIAS1-SIM-3SD, SUMO1 and UBC9 with SUMO1 acting as a bridge that is specifically recognized by both the SIM module of the PIAS1 E3 ligase and the backside of the UBC9 E2-conjugating enzyme.

***UBC9 transcriptional repression activity requires formation of the ternary complex.***

Previous studies have shown that both PIAS1 and UBC9 have transcription regulatory properties and the phospho-SIM module has been shown to be required for the co-regulatory properties of the PIAS proteins (Shiio and Eisenman 2003; Stehmeier and Muller 2009). Since this same phospho-SIM motif of SUMO is needed for non-covalent interactions with UBC9, we were interested to determine if the transcriptional regulatory properties of UBC9 are governed by its non-covalent interactions with SUMO proteins. In an attempt to test this hypothesis, UBC9 was fused to a heterologous DNA-binding domain (Gal4DBD-UBC9) and its effect on transcription was determined by monitoring the expression of a luciferase reporter gene juxtaposed to a Gal4-response element (5xGal4UAS) (**Figure 7A**). HEK293T cells were co-transfected with DNAs encoding for the Gal4DBD-UBC9 fusion protein along with the reporter gene plasmid under the control of the SV40 promoter. In this assay, the Gal4DBD-UBC9 fusion, but not the Gal4DBD alone, significantly represses the expression of the luciferase reporter in a dose-dependent manner (up to 5-fold) (**Figure 7B**). This result suggests that, like the E3 enzymes of the SUMO pathway, the SUMO E2-conjugating enzyme has a repressive activity on transcription under our experimental conditions. In order to gain insights into the mechanism of this UBC9-mediated transcriptional repression, several UBC9 mutants were

generated and their relative transcriptional activity measured. We first assessed the repressive activity of the catalytically inactive UBC9 mutant (UBC9-C93S), since SUMOylation of several transcriptional regulatory factors leads to repression of their target genes (Ross, Best et al. 2002; Perdomo, Verger et al. 2005; Hsu, Sarker et al. 2006; Rytinki and Palvimo 2008). Intriguingly, UBC9-C93S exerts almost the same repressive activity as the wild-type UBC9 (**Figure 7C**). In addition, UBC9 proteins with mutations of specific residues near the catalytic cysteine that are known to prevent and/or alter substrate recognition all retain full repressive activity (Tatham, Chen et al. 2003; Yunus and Lima 2006) (**Supplementary figure 6**). Thus, covalent SUMOylation of transcriptional regulatory factors is unlikely required for the observed UBC9-dependent repressive activity. Moreover, SUMOylation of UBC9 on lysine residue 14 is not required for its repressive activity since the UBC9-K14R mutant also retains full repressive activity (**Figure 7C**). In contrast, a complete loss of repressive activity is observed with both the UBC9-R17A and the UBC9-H20D mutants, two mutants known to alter non-covalent binding of UBC9 to SUMO as well as the formation of the PIAS1:SUMO1:UBC9 ternary complex (**Figure 7C**). These results correlate with the role of the PIAS SIM in the regulation of the transcriptional co-regulatory potential of PIAS family members (Stehmeier and Muller 2009). Together, these results demonstrate that the backside interface of UBC9 is required to induce a repressive transcriptional response when directly targeted to DNA. Furthermore, the results suggest that the UBC9-dependent repression is not coupled to its enzymatic activity, but it does require the non-covalent formation of the PIAS:SUMO:UBC9 ternary complex.

## DISCUSSION

Although the enzymes of the SUMOylation pathway were characterized more than a decade ago, the molecular determinants regulating the interactions between the E2:E3 enzymes have not been well defined. In this study, we use a combination of *in cellular* and *in vitro* experiments to establish that the interaction between PIAS1 and UBC9 is stabilized

by their ability to non-covalently bind distinct surfaces on SUMO1 leading to the formation of a functional ternary complex. In the PIAS1:SUMO1:UBC9 ternary complex, SUMO1 bridges its cognate E2 and E3 enzymes by concomitantly binding to the SIM of PIAS1 and the backside interface of UBC9. Our data also suggests that phosphorylation of serine residues adjacent to the SIM of PIAS1 facilitates the formation of the ternary complex by increasing the affinity between PIAS1 and SUMO1. We also demonstrate that PIAS1 and UBC9 can engage in canonical E2:E3 RING interactions that require conserved residues located in the PIAS1 SP-RING domain and the L4 loop of UBC9. In addition, we show that formation of the covalent thioester bond between SUMO1 and UBC9 is not an absolute prerequisite for this interaction since free UBC9 can be specifically recruited to PIAS1. Moreover, we provide evidence that UBC9-dependent transcriptional repression of a reporter gene correlates directly with the ability of UBC9 to help form the PIAS1:SUMO:UBC9 ternary complex.

### ***SUMO acts to bridge PIAS1 and UBC9 in the ternary complex***

While the functions of ublps including SUMO, NEDD8 or ubiquitin as modifiers of protein targets has been intensively studied, less effort has been devoted to unraveling the roles these proteins play as non-covalent interacting partners in macromolecular complexes. SUMO2/3 are mainly found in their unconjugated form in unstressed cells and a recent study reports significant levels of free ubiquitin in different cell lines (Saitoh and Hinchey 2000; Kaiser, Riley et al. 2011). Here, we present convincing evidence that SUMO proteins function in part by bridging a non-covalent interaction between its E2:E3 enzymes. The simplest model, supported by our in cellular BRET data as well as our *in vitro* ITC and NMR results, argues that a ternary complex is formed between PIAS1, SUMO1 and UBC9. In this ternary complex, the SIM of PIAS1 and the backside of UBC9 bind to two distinct surfaces of SUMO1. This suggests that SUMO1 operates as a hub bridging together its own E3 ligase and E2-conjugating enzyme. Since both the SIM of PIAS1 and the backside of UBC9 have been shown to bind to different SUMO paralogs, all SUMO family members could, in principal, form a similar ternary complex with PIAS1 and UBC9. This result is

also consistent with what has been recently found for the *in vitro* interaction between ubiquitin and either the ZNF216:p62 or ZNF4:UBE2D1 complexes. In the ZNF216:p62 and ZNF4:UBE2D1 complexes, the A20 zinc-finger domain of either ZNF216 or ZNF4 contacts the ubiquitin polar patch, whereas the ubiquitin hydrophobic surface binds to either the UBA domain of p62 or the backside of UBE2D1 (Bosanac, Wertz et al. 2010; Garner, Strachan et al. 2011). This demonstrates that both SUMO and ubiquitin are highly versatile proteins that can function either as posttranslational modifying factors or as scaffolding proteins in non-covalent macromolecular assemblies.

***Non-SUMO modified UBC9 interacts with PIAS1.***

It has been generally accepted that in order to form an active E2:E3 complex capable of posttranslationally modifying a given substrate, the E3 ligase must interact with its E2-conjugating enzyme after it has been charged with its cognate ublp. Using our cellular BRET assay, we demonstrate that PIAS1 is capable of interacting with free UBC9. Using catalytically inactivated forms of UBC9, we clearly demonstrate that free (uncharged) UBC9 is able to also specifically interact with PIAS1. Although, some E2-conjugating enzymes must be charged before being recruited by their cognate E3 ligases, other studies have also reported similar direct interactions between the E3 ligase and free E2-conjugating enzymes (Purbeck, Eletr et al. 2010). Overall, this non-covalent recruitment of UBC9 to PIAS1 by SUMO is likely to be a conserved process amongst the PIAS family proteins. However, it is not shared by all the SUMO E3 ligases since RanBP2 recognizes the SUMO1:UBC9 complex only when SUMO1 is covalently attached to UBC9 through a thioester linkage (Reverter and Lima 2005). Thus, it appears that different classes of E3 ligases can exploit different strategies to interact with their corresponding E2 conjugating enzyme.

***PIAS1 and UBC9 also engage in canonical E2:E3 interactions.***

In addition to the non-covalent interaction mediated by SUMO1, we find that UBC9 directly binds to PIAS1 through a canonical E2:E3 RING interaction similar to the one

used by the E2:E3 enzymes of the ubiquitination pathway. We demonstrate that L337 within the SP-RING domain of PIAS1 and P69 within the L4 loop of UBC9 make significant contributions to the interaction between PIAS1 and UBC9. Interestingly, equivalent residues are conserved in the RING E3 and E2 enzymes of the ubiquitination pathway and structural models demonstrate that these residues are crucial for E2:E3 interactions (Zheng, Wang et al. 2000; Dominguez, Bonvin et al. 2004; Zhang, Windheim et al. 2005; Christensen, Brzovic et al. 2007; Xu, Kohli et al. 2008). This suggests that PIAS1 and UBC9 use a strategy similar to the one employed by E2:E3 enzymes of the ubiquitination pathway. Moreover, our results also suggest that the interaction interface used by UBC9 (L4 loop) to bind the PIAS1 SP-RING domain overlaps with the one used to bind the IR1 motif of RanBP2 (Reverter and Lima 2005). Interestingly, the RanBP2 IR1 motif and the PIAS/Siz SP-RING domain show no sequence or structural similarities. This indicates that UBC9 can recognize two structurally distinct SUMO E3 ligases using the same interface. A similar characteristic is also observed for enzymes of the ubiquitination pathway, where the E2 conjugating enzyme, UbcH7 (UBE2L3) uses a similar surface to contact two structurally distinct E3 ligases (Huang, Kinnucan et al. 1999; Zheng, Wang et al. 2000).

### ***Phosphorylation of PIAS1 enhances formation of the PIAS1:SUMO:UBC9 complex.***

All members of the PIAS family of SUMO E3 ligases possess an extended SIM which is juxtaposed to a cluster of serine residues located within consensus CK2 phosphorylation sites (Stehmeier and Muller 2009). The phosphorylation of these serine residues in PIAS1 has been proposed to dictate its binding to SUMO-family proteins (Stehmeier and Muller 2009). However, we detect a relatively strong binding between SUMO1 and the native PIAS1-SIM peptide by ITC and this is in agreement with a previous study examining the interaction between the SIM of PIAS2 and SUMO1 (Song, Durrin et al. 2004). Interestingly, the affinity of SUMO1 for the PIAS1-SIM peptide is enhanced when three serine residues are changed to phosphomimetic aspartic acid residues in the PIAS-SIM-3SD peptide. These results are further supported by our NMR data where we



observe more pronounced chemical shift changes for signals of SUMO1 residues with the PIAS1-SIM-3SD peptide in comparison with the PIAS1-SIM peptide. In addition, we observe specific changes in the signals corresponding to H43 and K46 of SUMO1 with the PIAS1-SIM-3SD peptide. This suggests that although CK2-dependent phosphorylation is not a prerequisite for the PIAS1:SUMO interaction, it significantly increases the affinity. This regulation of SUMO binding by CK2-dependent phosphorylation is consistent what has been observed for DAXX (Chang, Naik et al. 2011). Moreover, these *in vitro* studies are consistent with our in cellular BRET data suggesting that the phosphorylation status of the PIAS1 SIM regulates the PIAS1:UBC9 interaction in a SUMO-dependent manner. Altogether, these results provide strong evidence suggesting that the phosphorylation status of the PIAS1 SIM helps regulate the formation of the PIAS1:SUMO:UBC9 ternary complex.

***UBC9 mediated transcriptional repression requires formation of the ternary complex***

So far, the functional roles of SUMOylation have been largely connected to regulating nuclear processes including transcription, DNA repair and the formation of PML-Nuclear Bodies. For example, members of the PIAS family have been found to repress the activity of several transcriptional activators (Nishida and Yasuda 2002; Ross, Best et al. 2002; Perdomo, Verger et al. 2005; Hsu, Sarker et al. 2006). Consistent with the role of PIAS family members in transcriptional repression, we show that UBC9 also induces the transcriptional repression of a Luciferase reporter gene, when directly recruited to DNA. Interestingly, we show that neither the catalytic activity of UBC9 nor the residues involved in the recognition of the SUMOylation consensus are required for this UBC9-dependent repression. Moreover, covalent coupling of SUMO to K14 of UBC9 is not required for the repressive activity. This is consistent with the fact that transcriptional repression induced by the PIAS proteins can occur independently of their SUMO ligase activity (Zhou, Si et al. 2008). In addition, we establish that inhibiting the non-covalent SUMO:UBC9 binding, which concomitantly impairs formation of the PIAS1:SUMO:UBC9 ternary complex, disrupts the ability of UBC9 to repress

transcription. Taken together, this suggests that the PIAS proteins work with UBC9 and SUMO as part of a repression complex on specific genes that function independently of their SUMOylation activity.

***The SUMO:UBC9 non-covalent interaction recruits UBC9 to SIM-containing proteins.***

To date, most of the proteins targeted by SUMO contain a SIM within their sequence (Shen, Lin et al. 2006). For the vast majority of these proteins, a functional SIM is required for an efficient SUMO-modification (Lin, Huang et al. 2006; Chang, Izumiya et al. 2010; Merrill, Melhuish et al. 2010; Saether, Pattabiraman et al. 2011; Sung, Lee et al. 2011). This suggests that SIMs function by recruiting the SUMOylation machinery to proteins. Interesting, parallels have been drawn in work studying E3-independent mono-ubiquitination (Hochstrasser 2007). Therefore, it has generally been accepted that SIMs interacts with SUMO that is covalently bound to UBC9 through a thioester linkage at C93. However, an alternative explanation is that the SIM-dependent SUMOylation process comes from the ability of UBC9 to be targeted by SUMO on K14 (Knipscheer, Flotho et al. 2008). Recently, SUMO-modification of UBC9 has been shown to enhance SP100 SUMOylation, a process that also requires the SIM of SP100. However, this is not a universal mechanism since the SUMOylation of both PML and DAXX, two additional SIM-containing proteins, is not up regulated by covalent modification of UBC9 by SUMO. Moreover, UBC9 is a poor substrate for SUMOylation and its modification site is not functionally conserved across evolution (Knipscheer, Flotho et al. 2008). Therefore, it appears that there are at least two distinct mechanisms functioning for SUMOylation of SIM-containing proteins.

Based on our findings, it is tempting to speculate that a third system might operate for the SUMOylation of SIM-containing proteins. In this process, SUMO acts as a scaffold bridging UBC9 to SIM-containing proteins to achieve a number of specific functions. In support of this idea, it has been shown that the SUMO E3 ligase Pc2 requires a functional SIM to relocalize UBC9 to sub-nuclear foci and reciprocally, UBC9 defective for non-covalent interaction with SUMO fails to be re-localized to these sub-nuclear structures by

Pc2 (Merrill, Melhuish et al. 2010; Yang and Sharrocks 2010). Future studies are needed to determine whether or not SUMO-dependent recruitment of UBC9 to SUMO E3 ligases is important for the functions associated with other SIM-containing proteins.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Pascale Legault for critical review of the manuscript. This work was supported by a grant from the Canadian Cancer Society (J.G.O) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (M.A.). L.C. is a postdoctoral fellow of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada CREATE program.

**REFERENCES**

- Albert, T. K., H. Hanzawa, et al. (2002). "Identification of a ubiquitin-protein ligase subunit within the CCR4-NOT transcription repressor complex." EMBO J **21**(3): 355-364.
- Bayer, P., A. Arndt, et al. (1998). "Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1." J Mol Biol **280**(2): 275-286.
- Bentley, M. L., J. E. Corn, et al. (2011). "Recognition of UbcH5c and the nucleosome by the Bmi1/Ring1b ubiquitin ligase complex." EMBO J **30**(16): 3285-3297.
- Boddy, M. N., K. Howe, et al. (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**(5): 971-982.
- Bosanac, I., I. E. Wertz, et al. (2010). "Ubiquitin binding to A20 ZnF4 is required for modulation of NF-kappaB signaling." Mol Cell **40**(4): 548-557.
- Brzovic, P. S., J. R. Keefe, et al. (2003). "Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 5646-5651.
- Capili, A. D. and C. D. Lima (2007). "Structure and analysis of a complex between SUMO and Ubc9 illustrates features of a conserved E2-Ubl interaction." J Mol Biol **369**(3): 608-618.
- Chang, C. C., M. T. Naik, et al. (2011). "Structural and functional roles of Daxx SIM phosphorylation in SUMO paralog-selective binding and apoptosis modulation." Mol Cell **42**(1): 62-74.
- Chang, P. C., Y. Izumiya, et al. (2010). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) encodes a SUMO E3 ligase that is SIM-dependent and SUMO-2/3-specific." J Biol Chem **285**(8): 5266-5273.

- Chen, A., H. Mannen, et al. (1998). "Characterization of mouse ubiquitin-like SMT3A and SMT3B cDNAs and gene/pseudogenes." Biochem Mol Biol Int **46**(6): 1161-1174.
- Christensen, D. E., P. S. Brzovic, et al. (2007). "E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages." Nat Struct Mol Biol **14**(10): 941-948.
- Christensen, D. E. and R. E. Klevit (2009). "Dynamic interactions of proteins in complex networks: identifying the complete set of interacting E2s for functional investigation of E3-dependent protein ubiquitination." FEBS J **276**(19): 5381-5389.
- Davies, G. C., S. A. Ettenberg, et al. (2004). "Cbl-b interacts with ubiquitinated proteins; differential functions of the UBA domains of c-Cbl and Cbl-b." Oncogene **23**(42): 7104-7115.
- Deshaies, R. J. and C. A. Joazeiro (2009). "RING domain E3 ubiquitin ligases." Annu Rev Biochem **78**: 399-434.
- Desterro, J. M., M. S. Rodriguez, et al. (1999). "Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1." J Biol Chem **274**(15): 10618-10624.
- Desterro, J. M., J. Thomson, et al. (1997). "Ubc9 conjugates SUMO but not ubiquitin." FEBS Lett **417**(3): 297-300.
- Dominguez, C., A. M. Bonvin, et al. (2004). "Structural model of the UbcH5B/CNOT4 complex revealed by combining NMR, mutagenesis, and docking approaches." Structure **12**(4): 633-644.
- Gareau, J. R. and C. D. Lima (2010). "The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(12): 861-871.
- Garner, T. P., J. Strachan, et al. (2011). "Independent interactions of ubiquitin-binding domains in a ubiquitin-mediated ternary complex." Biochemistry **50**(42): 9076-9087.

- Germain-Desprez, D., M. Bazinet, et al. (2003). "Oligomerization of transcriptional intermediary factor 1 regulators and interaction with ZNF74 nuclear matrix protein revealed by bioluminescence resonance energy transfer in living cells." J Biol Chem **278**(25): 22367-22373.
- Giraud, M. F., J. M. Desterro, et al. (1998). "Structure of ubiquitin-conjugating enzyme 9 displays significant differences with other ubiquitin-conjugating enzymes which may reflect its specificity for sumo rather than ubiquitin." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **54**(Pt 5): 891-898.
- Gong, L., T. Kamitani, et al. (1997). "Preferential interaction of sentrin with a ubiquitin-conjugating enzyme, Ubc9." J Biol Chem **272**(45): 28198-28201.
- Gyrd-Hansen, M., M. Darding, et al. (2008). "IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis." Nat Cell Biol **10**(11): 1309-1317.
- Hay, R. T. (2007). "SUMO-specific proteases: a twist in the tail." Trends Cell Biol **17**(8): 370-376.
- Hochstrasser, M. (2007). "Ubiquitin ligation without a ligase." Dev Cell **13**(1): 4-6.
- Hsu, Y. H., K. P. Sarker, et al. (2006). "Sumoylated SnoN represses transcription in a promoter-specific manner." J Biol Chem **281**(44): 33008-33018.
- Huang, L., E. Kinnucan, et al. (1999). "Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade." Science **286**(5443): 1321-1326.
- Johnson, E. S. and G. Blobel (1997). "Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p." J Biol Chem **272**(43): 26799-26802.
- Johnson, E. S. and A. A. Gupta (2001). "An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins." Cell **106**(6): 735-744.

- Johnson, E. S., I. Schwienhorst, et al. (1997). "The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer." EMBO J **16**(18): 5509-5519.
- Kagey, M. H., T. A. Melhuish, et al. (2003). "The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3." Cell **113**(1): 127-137.
- Kahyo, T., T. Nishida, et al. (2001). "Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53." Mol Cell **8**(3): 713-718.
- Kaiser, S. E., B. E. Riley, et al. (2011). "Protein standard absolute quantification (PSAQ) method for the measurement of cellular ubiquitin pools." Nat Methods **8**(8): 691-696.
- Kamitani, T., K. Kito, et al. (1998). "Characterization of a second member of the sentrin family of ubiquitin-like proteins." J Biol Chem **273**(18): 11349-11353.
- Knipscheer, P., A. Flotho, et al. (2008). "Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination." Mol Cell **31**(3): 371-382.
- Knipscheer, P., W. J. van Dijk, et al. (2007). "Noncovalent interaction between Ubc9 and SUMO promotes SUMO chain formation." EMBO J **26**(11): 2797-2807.
- Kotaja, N., U. Karvonen, et al. (2002). "PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases." Mol Cell Biol **22**(14): 5222-5234.
- Levin, I., C. Eakin, et al. (2010). "Identification of an unconventional E3 binding surface on the UbcH5 ~ Ub conjugate recognized by a pathogenic bacterial E3 ligase." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(7): 2848-2853.
- Lin, D. Y., Y. S. Huang, et al. (2006). "Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors." Mol Cell **24**(3): 341-354.
- Liu, Q., C. Jin, et al. (1999). "The binding interface between an E2 (UBC9) and a ubiquitin homologue (UBL1)." J Biol Chem **274**(24): 16979-16987.



- Mace, P. D., K. Linke, et al. (2008). "Structures of the cIAP2 RING domain reveal conformational changes associated with ubiquitin-conjugating enzyme (E2) recruitment." J Biol Chem **283**(46): 31633-31640.
- Mahajan, R., C. Delphin, et al. (1997). "A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2." Cell **88**(1): 97-107.
- Masclé, X. H., D. Germain-Desprez, et al. (2007). "Sumoylation of the transcriptional intermediary factor 1beta (TIF1beta), the Co-repressor of the KRAB Multifinger proteins, is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain." J Biol Chem **282**(14): 10190-10202.
- Matunis, M. J., E. Coutavas, et al. (1996). "A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex." J Cell Biol **135**(6 Pt 1): 1457-1470.
- Mercier, J. F., A. Salahpour, et al. (2002). "Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer." J Biol Chem **277**(47): 44925-44931.
- Merrill, J. C., T. A. Melhuish, et al. (2010). "A role for non-covalent SUMO interaction motifs in Pc2/CBX4 E3 activity." PLoS One **5**(1): e8794.
- Nishida, T. and H. Yasuda (2002). "PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription." J Biol Chem **277**(44): 41311-41317.
- Okuma, T., R. Honda, et al. (1999). "In vitro SUMO-1 modification requires two enzymatic steps, E1 and E2." Biochem Biophys Res Commun **254**(3): 693-698.
- Okura, T., L. Gong, et al. (1996). "Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin." J Immunol **157**(10): 4277-4281.
- Olsen, S. K., A. D. Capili, et al. (2010). "Active site remodelling accompanies thioester bond formation in the SUMO E1." Nature **463**(7283): 906-912.

- Perdomo, J., A. Verger, et al. (2005). "Role for SUMO modification in facilitating transcriptional repression by BKLF." Mol Cell Biol **25**(4): 1549-1559.
- Pichler, A., A. Gast, et al. (2002). "The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity." Cell **108**(1): 109-120.
- Purbeck, C., Z. M. Eletr, et al. (2010). "Kinetics of the transfer of ubiquitin from UbcH7 to E6AP." Biochemistry **49**(7): 1361-1363.
- Reverter, D. and C. D. Lima (2005). "Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex." Nature **435**(7042): 687-692.
- Rodriguez, M. S., C. Dargemont, et al. (2001). "SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting." J Biol Chem **276**(16): 12654-12659.
- Ross, S., J. L. Best, et al. (2002). "SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization." Mol Cell **10**(4): 831-842.
- Rytinki, M. M. and J. J. Palvimo (2008). "SUMOylation modulates the transcription repressor function of RIP140." J Biol Chem **283**(17): 11586-11595.
- Sachdev, S., L. Bruhn, et al. (2001). "PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies." Genes Dev **15**(23): 3088-3103.
- Saether, T., D. R. Pattabiraman, et al. (2011). "A functional SUMO-interacting motif in the transactivation domain of c-Myb regulates its myeloid transforming ability." Oncogene **30**(2): 212-222.
- Saitoh, H. and J. Hincley (2000). "Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3." J Biol Chem **275**(9): 6252-6258.
- Saitoh, H., R. T. Pu, et al. (1997). "SUMO-1: wrestling with a new ubiquitin-related modifier." Trends Biochem Sci **22**(10): 374-376.

- Sampson, D. A., M. Wang, et al. (2001). "The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification." J Biol Chem **276**(24): 21664-21669.
- Scaglioni, P. P., T. M. Yung, et al. (2006). "A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor." Cell **126**(2): 269-283.
- Schmidt, D. and S. Muller (2002). "Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 2872-2877.
- Schulman, B. A. (2011). "Twists and turns in ubiquitin-like protein conjugation cascades." Protein Sci **20**(12): 1941-1954.
- Schulman, B. A. and J. W. Harper (2009). "Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(5): 319-331.
- Shen, T. H., H. K. Lin, et al. (2006). "The mechanisms of PML-nuclear body formation." Mol Cell **24**(3): 331-339.
- Shen, Z., P. E. Pardington-Purtymun, et al. (1996). "UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins." Genomics **36**(2): 271-279.
- Shiio, Y. and R. N. Eisenman (2003). "Histone sumoylation is associated with transcriptional repression." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13225-13230.
- Smit, J. J., D. Monteferrario, et al. (2012). "The E3 ligase HOIP specifies linear ubiquitin chain assembly through its RING-IBR-RING domain and the unique LDD extension." EMBO J **31**(19): 3833-3844.
- Song, J., L. K. Durrin, et al. (2004). "Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(40): 14373-14378.
- Song, J., Z. Zhang, et al. (2005). "Small ubiquitin-like modifier (SUMO) recognition of a SUMO binding motif: a reversal of the bound orientation." J Biol Chem **280**(48): 40122-40129.

Spratt, D. E., K. Wu, et al. (2012). "Selective recruitment of an E2~ubiquitin complex by an E3 ubiquitin ligase." J Biol Chem **287**(21): 17374-17385.

Stehmeier, P. and S. Muller (2009). "Phospho-regulated SUMO interaction modules connect the SUMO system to CK2 signaling." Mol Cell **33**(3): 400-409.

Sung, K. S., Y. A. Lee, et al. (2011). "Role of the SUMO-interacting motif in HIPK2 targeting to the PML nuclear bodies and regulation of p53." Exp Cell Res **317**(7): 1060-1070.

Takahashi, Y., T. Kahyo, et al. (2001). "Yeast Ull1/Siz1 is a novel SUMO1/Smt3 ligase for septin components and functions as an adaptor between conjugating enzyme and substrates." J Biol Chem **276**(52): 48973-48977.

Takahashi, Y., A. Toh-e, et al. (2001). "A novel factor required for the SUMO1/Smt3 conjugation of yeast septins." Gene **275**(2): 223-231.

Tatham, M. H., Y. Chen, et al. (2003). "Role of two residues proximal to the active site of Ubc9 in substrate recognition by the Ubc9.SUMO-1 thiolester complex." Biochemistry **42**(11): 3168-3179.

Tatham, M. H., S. Kim, et al. (2005). "Unique binding interactions among Ubc9, SUMO and RanBP2 reveal a mechanism for SUMO paralog selection." Nat Struct Mol Biol **12**(1): 67-74.

Tatham, M. H., S. Kim, et al. (2003). "Role of an N-terminal site of Ubc9 in SUMO-1, -2, and -3 binding and conjugation." Biochemistry **42**(33): 9959-9969.

van Wijk, S. J. and H. T. Timmers (2010). "The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins." FASEB J **24**(4): 981-993.

Weger, S., E. Hammer, et al. (2003). "The DNA topoisomerase I binding protein topors as a novel cellular target for SUMO-1 modification: characterization of domains necessary for subcellular localization and sumolation." Exp Cell Res **290**(1): 13-27.

- Weger, S., E. Hammer, et al. (2005). "Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo." FEBS Lett **579**(22): 5007-5012.
- Xu, Z., E. Kohli, et al. (2008). "Interactions between the quality control ubiquitin ligase CHIP and ubiquitin conjugating enzymes." BMC Struct Biol **8**: 26.
- Yang, S. H. and A. D. Sharrocks (2010). "The SUMO E3 ligase activity of Pc2 is coordinated through a SUMO interaction motif." Mol Cell Biol **30**(9): 2193-2205.
- Yin, Q., S. C. Lin, et al. (2009). "E2 interaction and dimerization in the crystal structure of TRAF6." Nat Struct Mol Biol **16**(6): 658-666.
- Yunus, A. A. and C. D. Lima (2006). "Lysine activation and functional analysis of E2-mediated conjugation in the SUMO pathway." Nat Struct Mol Biol **13**(6): 491-499.
- Yunus, A. A. and C. D. Lima (2009). "Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 ligase Siz1 and determinants required for SUMO modification of PCNA." Mol Cell **35**(5): 669-682.
- Zhang, M., M. Windheim, et al. (2005). "Chaperoned ubiquitylation--crystal structures of the CHIP U box E3 ubiquitin ligase and a CHIP-Ubc13-Uev1a complex." Mol Cell **20**(4): 525-538.
- Zheng, N., P. Wang, et al. (2000). "Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases." Cell **102**(4): 533-539.
- Zhou, S., J. Si, et al. (2008). "PIASy represses CCAAT/enhancer-binding protein delta (C/EBPdelta) transcriptional activity by sequestering C/EBPdelta to the nuclear periphery." J Biol Chem **283**(29): 20137-20148.

**FIGURE LEGENDS****Figure 1: Conserved residues within PIAS1 and UBC9 play a key role in the PIAS1-UBC9 complex formation.**

(A) Schematic representation of the full-length 651 amino acids of human PIAS1. Key domains and regions of the protein are highlighted with boxes including the SAP (SAF-A/B, Acinus and PIAS) domain (black), PINIT (Proline-Isoleucine-asparagiNe-Isoleucine-Threonine) motif-containing domain (grey), SP-RING (Siz/PIAS-Really Interesting New Gene) domain (magenta) and SIM (SUMO Interacting Motif) module (orange). (B) Structure based amino acid sequence alignment for the PIAS1/Siz SP-RING domains from different eukaryotic species. (C) BRET titration curves showing interaction between wild-type UBC9 and either wild-type PIAS1 or the PIAS1-L337A mutant in HEK293 cells. The BRET pairs were tested with a fixed amount of either RLuc-PIAS1 (■) or RLuc-PIAS1-L337A (◇) and increasing amounts of UBC9-GFP. For each pair tested, the data of two independent experiments (40 independent transfections) were pooled. (D) Structure based amino acid sequence alignment of the L4 and L7 loops of UBC9 from different eukaryotic species. (E) BRET titration curves showing the interaction between wild-type PIAS1 and either wild-type UBC9 or UBC9 loop mutants. The BRET pairs were tested using a fixed amount of wild-type RLuc-PIAS1 and increasing amounts of UBC9-GFP (■), RLuc-PIAS1:UBC9-P105A-GFP (L7 loop mutant) (○) or RLuc-PIAS1:UBC9-P69A-GFP (L4 loop mutant) (◇). For each pair, data of at least two independent experiments were pooled. For (B) and (D), the ▼ indicates the residue of human PIAS1 or UBC9 subjected to mutational analysis. The zinc-coordinating residues are underlined and conserved aliphatic and proline residues residing at the potential SUMO E3:E2 interface are colored in red and blue, respectively. (\*) indicates identical residues, (:) indicates homologous residues and (.) indicates weakly homologous residues.

**Figure 2: SUMO modification of UBC9 K14 is not required for the PIAS1:UBC9 interaction.**

(A) BRET titration curves showing the interaction between wild-type PIAS1 and either wild-type UBC9 or a catalytically inactive UBC9-C93S mutant. The BRET pairs were tested with a fixed amount of wild-type RLuc-PIAS1 and increasing amounts of either UBC9-GFP (■) or UBC9-C93S-GFP (◇). For each pair, data of at least two independent experiments were pooled. (B) BRET bar graph showing the interaction between wild-type PIAS1 and either wild-type UBC9 or the UBC9-C93A mutant. Data are derived from a BRET titration assay at similar GFP acceptor/Luc donor expression ratios. (C) BRET bar graph showing interaction between wild-type PIAS1 and either wild-type UBC9 or SUMOylation-deficient UBC9-K14R mutant. Data are derived from a BRET titration assay at similar GFP acceptor/Luc donor expression ratios.

**Figure 3: SUMO forms distinct interactions with PIAS1 and UBC9 that stabilize the PIAS1:UBC9 complex.**

(A) Structure based amino acid sequence alignment of the first  $\alpha$ -helix for UBC9 from different eukaryotic species. Conserved positively charged residues implicated in the SUMO:UBC9 non-covalent interaction are colored in blue. (B) BRET titration curves showing interaction between wild-type PIAS1 and either wild-type UBC9, the UBC9-R17A mutant or the UBC9-H20D mutant. The BRET pairs were tested with a fixed amount of wild-type RLuc-PIAS1 and increasing amounts of wild-type UBC9-GFP (■), UBC9-R17A-GFP (□) or UBC9-H20D-GFP (◇). For each pair, data of at least three independent experiments were pooled. (C) BRET titration curves showing interaction between wild-type PIAS1 and either the wild-type UBC9 or the UBC9-R13A mutant. The BRET pairs were tested with a fixed amount of wild-type RLuc-PIAS1 with increasing amounts of wild-type UBC9-GFP (■) or UBC9-R13A-GFP (□). (D) BRET bar graph showing interaction between wild-type PIAS1 and either the wild-type UBC9 or the UBC9-F22A mutant. Data are derived from a BRET titration assay at similar GFP acceptor/Luc donor expression ratios. (E) Amino acid sequence alignment of the SUMO Interacting Motifs (SIM) for Siz/PIAS SUMO E3 ligases from different eukaryotic species. Conserved hydrophobic residues within the minimal SIM core are colored in yellow. (F) BRET

titration curves showing interaction between wild-type UBC9 and either wild-type PIAS1 or PIAS1-SIMmt mutant. The BRET pairs were tested using a fixed amount of either wild-type RLuc-PIAS1 (■) or RLuc-PIAS1-SIMmt (△) with increasing amounts UBC9-GFP. For each pair, data of two independent experiments were pooled. For (A) and (E), the ▼ indicates the residue of human PIAS1 and UBC9 subjected to mutational analysis. (\*) indicates identical residues, (:) indicates homologous residues and (.) indicates weakly homologous residues.

**Figure 4: Phosphorylation of the PIAS1 SIM positively regulates the PIAS1:UBC9 interaction.**

(A) BRET titration curves showing interaction between wild-type UBC9 and either wild-type PIAS1, PIAS1-3SD or PIAS1-3SA. The BRET pairs were tested using increasing amounts of UBC9-GFP with a fixed amount of either wild-type RLuc-PIAS1 (■), RLuc-PIAS1-3SD (△) or RLuc-PIAS1-3SA (◇). For each pair, data of two independent experiments were pooled. (B) BRET bar graph showing interaction between wild-type UBC9-GFP and either wild-type RLuc-PIAS1 or RLuc-PIAS1-5EA. Data are derived from a BRET titration assay at similar GFP acceptor/Luc donor expression ratios. (C) and (D) Representative ITC thermograms for the interaction between the wild-type PIAS1-SIM or PIAS1-SIM-3SD peptides and SUMO1.

**Figure 5: Characterization of the PIAS1-SIM-3SD:SUMO1 interaction.**

(A) Amino-acid sequences of the PIAS1-SIM and the PIAS1-SIM-3SD peptides used in the NMR studies. The CK2-targeted serine residues are underlined in the wild-type PIAS1 SIM peptide and have been mutated to aspartic acid residues (colored in red) in the PIAS1-SIM-3SD peptide. (B) Overlay from the 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 (0.5 mM) in the free form (black) and in presence of unlabeled PIAS1-SIM -3SD peptide (up to 0.75 mM; orange). SUMO1 residues significantly shifting [ $\Delta\delta$  (ppm) > 0.2] are identified according to the human SUMO1 numbering. Arrows depict the direction of the change (free  $\rightarrow$  bound). (C) Histogram of the differences in chemical shifts between  $^{15}\text{N}$ -labeled



SUMO1:PIAS1-SIM-3SD and  $^{15}\text{N}$  labeled SUMO1:PIAS1-SIM. The differences were calculated with the formula  $\Delta\delta = [(0.17\Delta N_H)^2 + (\Delta H_N)^2]^{1/2}$  and are given in parts per million. SUMO1 residues significantly shifting [ $\Delta\delta$  (ppm) > 0.07] are identified according to the human SUMO1 numbering. **(D)** Overlay from the 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -labeled PIAS1-SIM-3SD (0.5 mM) in the free form (black) and in presence of unlabeled SUMO1 (up to 1 mM; violet). Arrowheads indicate significantly shifting PIAS1-SIM-3SD signals. **(E)** Overlay from the 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -labeled PIAS1-SIM-3SD (0.5 mM) in the free form (black) and in presence of unlabeled UBC9 (up to 1.5 mM; magenta).

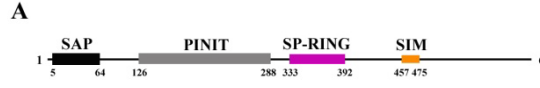
**Figure 6: In vitro characterization of a ternary complex between PIAS1, SUMO1 and UBC9.**

**(A)** Overlay from the 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 (0.5 mM) in the free form (black) and in the presence of either unlabeled PIAS1-SIM-3SD peptide (0.75 mM; orange) or unlabeled UBC9 (0.75 mM, purple). **(B)-(C)** Selected regions of 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 (0.5 mM; black) illustrating perturbations to specific SUMO1 residues upon formation of either binary (PIAS1-SIM-3SD: $^{15}\text{N}$ -SUMO1; left panels and  $^{15}\text{N}$ -SUMO1:UBC9; middle panels) or ternary complexes (PIAS1-SIM-3SD: $^{15}\text{N}$ -SUMO1:UBC9; right panels). Asterisks (\*) indicate the position of free  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 signals and arrows depict the direction of the change (free  $\rightarrow$  bound). **(B)** Signals of residues L65 and G68 from SUMO1 are significantly shifted upon binding to unlabeled UBC9 (0.75 mM; purple; middle panels) but unaffected upon binding to unlabeled PIAS1-SIM-3SD peptide (0.75 mM; orange; left panels). **(C)** Signals of residues T42 and L47 from SUMO1 are significantly shifted upon binding to unlabeled PIAS1-SIM-3SD peptide (0.75 mM; orange; left panels) but unaffected upon binding to unlabeled UBC9 (0.75 mM; purple; middle panels). **(B)-(C)** In the formation of the ternary complex (TERNARY COMPLEX; red; right panels), the four SUMO1 residues (T42, L47, L65 and G68) are perturbed, indicating simultaneous binding of unlabeled UBC9 and PIAS1-SIM-3SD peptide to  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1.

**Figure 7: Regulation of UBC9-dependent repression by SUMO non-covalent interactions.**

(A) Schematic drawing of firefly luciferase reporter plasmid and Gal4-effector constructs. The luciferase reporter is under the control of the strong SV40 promoter containing five consensus Gal4 UAS (5xGal4UAS) and the SV40 enhancer sequence (SV40E). Effectors proteins correspond to wild-type UBC9 or its mutants fused to Gal4DBD. (B) Transcriptional activity of increasing amounts of wild type UBC9 directly recruited to the luciferase reporter (C) Transcriptional activity of wild type UBC9 and its SUMO interactions deficient mutants (UBC9-C93S, UBC9-K14R, UBC9-R17A and UBC9-H20D) directly recruited to the luciferase reporter.

FIGURES

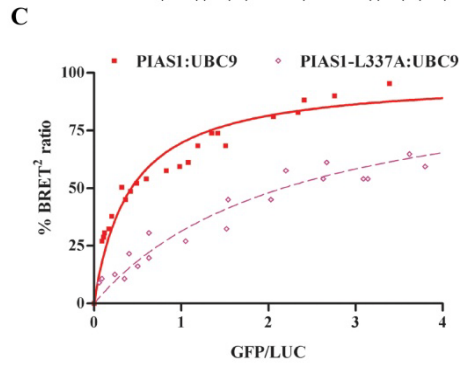


**B**

*Siz/PIAS SP-RING domains*

Hs	PIAS1	335	CP LGKRLITPCRALTCSHLQCFD	ATLYIQMNEK	PTWVCFVCD	378
Mm	Pias1	335	CP LGKRLITPCRALTCSHLQCFD	ATLYIQMNEK	PTWVCFVCD	378
Gg	Pias1	335	CP LGKRLITPCRALTCSHLQCFD	ATLYIQMNEK	PTWVCFVCD	378
Xl	Pias1	334	CP LGKRLITPCRSITCSHLQCFD	ATLYIQMNEK	PTWVCFVCD	377
Dr	Pias1	326	CP LGKRLITPCRALTCSHLQCFD	ATLYIQMNEK	PTWVCFVCD	369
Dm	Pias1	325	CP LGKRMILLPCRASTCSHLQCFD	ATLYIQMNEK	PTWVCFVCD	368
Ce	Gei17	428	DP LCKRMTTPSRCQDCTHLQCFD	LLSYLMNEK	PTWVCFVCS	471
Sp	Pl11	305	CP LFSFRISLFPVRSVFCFHLQCFD	ASAFLEMMNK	QTPSWMCFVCA	348
Sc	Siz1	361	CP ISYTRMKYPSKINCKHLQCFD	ALWFLHSQ	QIPTWVCFVCC	404
Sc	Siz2	338	CP ISCTRMKYPAKTDCKHLQCFD	ALWFLHSQ	SQVPTWVCFVCC	381
At	Siz1	363	CP HSGSRIKVAGRFLPCVHMGC	FDDLVEVELNQR	SRKIQCFVCL	406

\*: : : : \* \*: \*\*\* : : : . \* \*\* : \*



**D**

*Loops of SUMO E2 conjugating enzyme*

		L4 loop		L7 loop	
Hs	UBC9	63 LFKDDYFSSPEK	74	101 KDWRFAITTI	109
Mm	Ubc9	63 LFKDDYFSSPEK	74	101 KDWRFAITTI	109
Gg	Ubc9	63 LFKDDYFSSPEK	74	101 KDWRFAITTI	109
Xl	Ubc9	63 LFKDDYFSSPEK	74	101 KDWRFAITTI	109
Dr	Ubc9	63 LFKDDYFSSPEK	74	101 KDWRFAITTI	109
Dm	Ubc9	63 LFKDDYFSSPEK	74	101 KDWRFAITTI	109
Ce	Ubc9	63 LFKDDYFSSPEK	74	101 KDWRFAITTI	109
Sp	Ubc9	63 AFPEEYFTRPEK	74	101 EGWKFAITTI	109
Sc	Ubc9	63 EYFNEYFSKPEK	74	101 QDWRFAITTI	109
At	Ubc9	55 HFFPDYFVKPEK	66	91 EQWSFAITTI	99

: : : \* \*\* : \* \* : : : \*

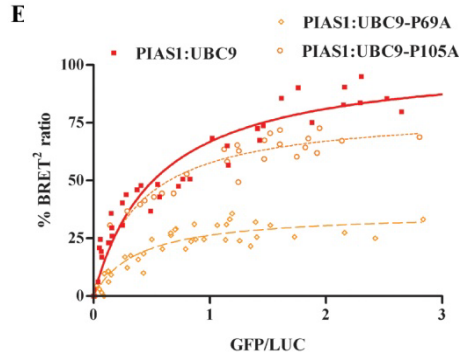


Figure 1

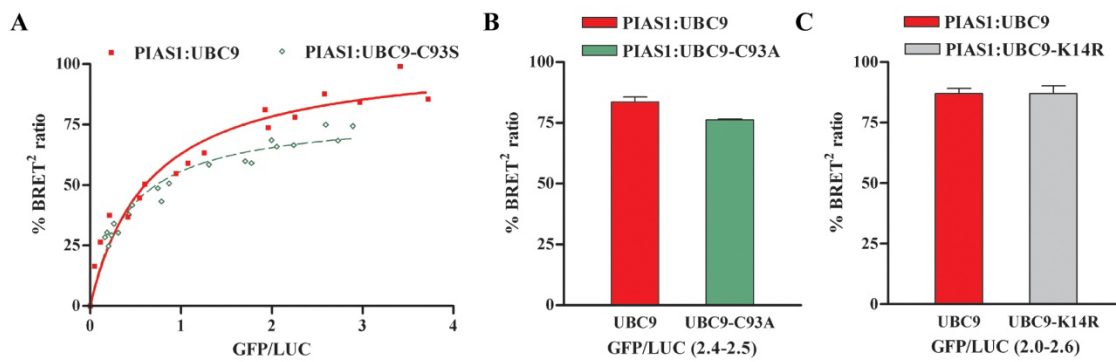


Figure 2

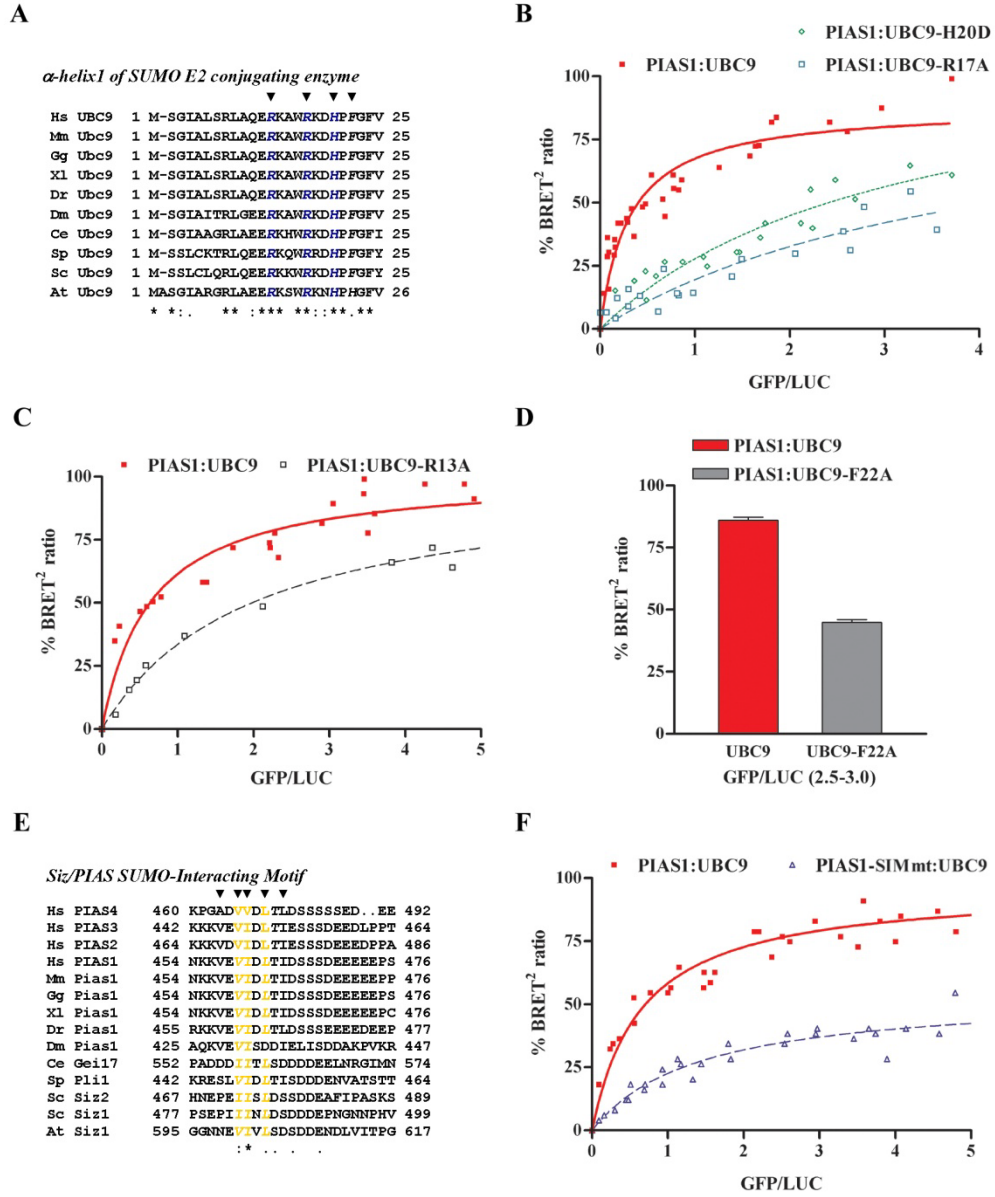


Figure 3

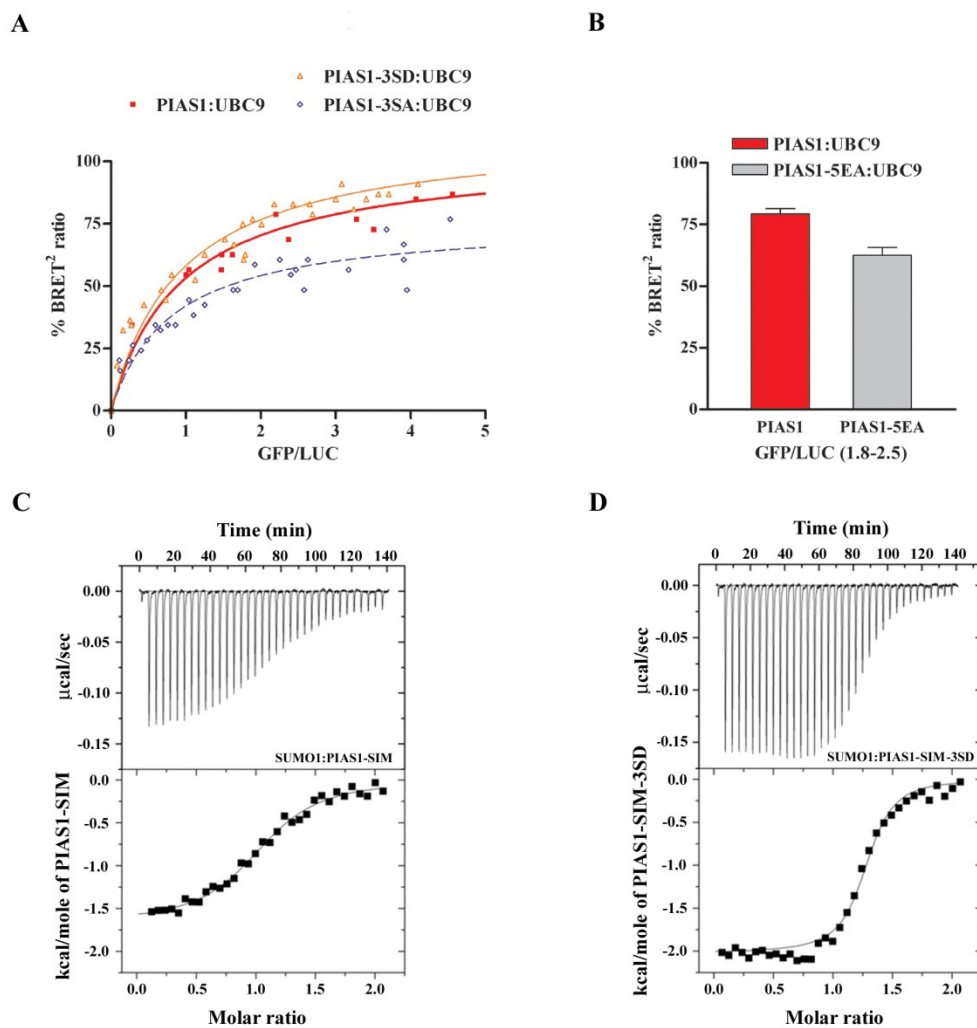


Figure 4

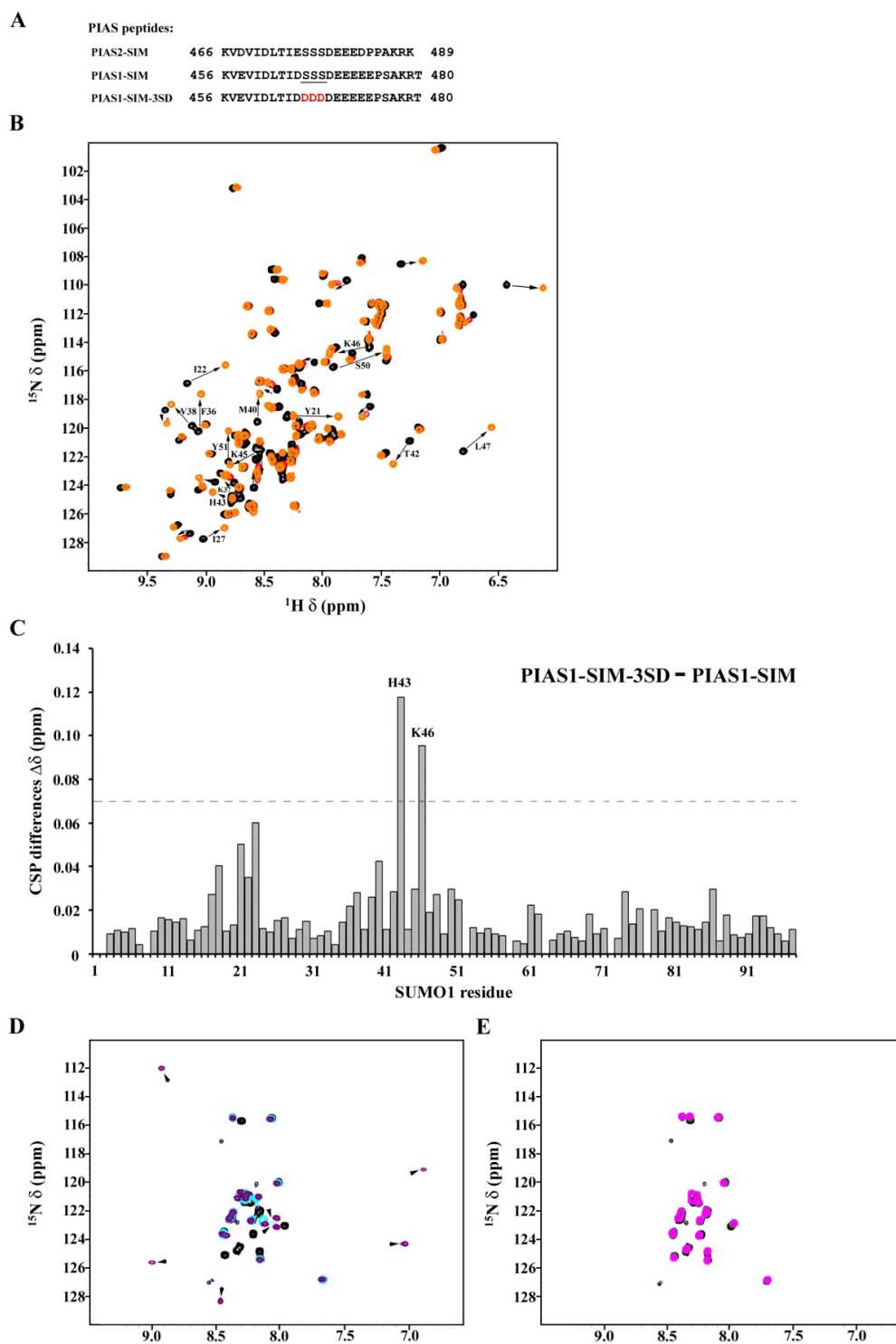
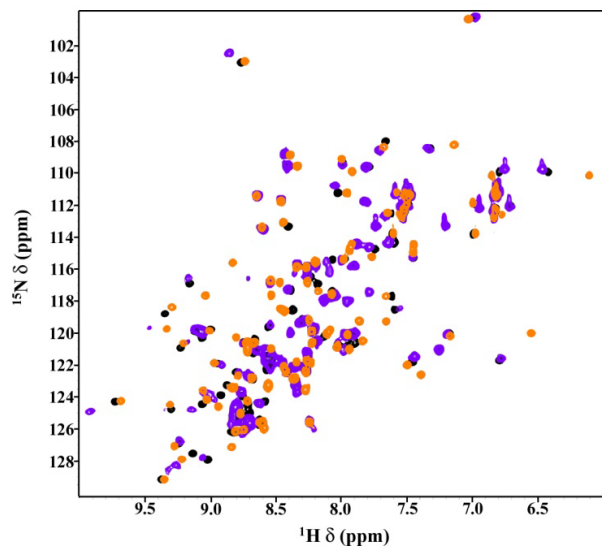
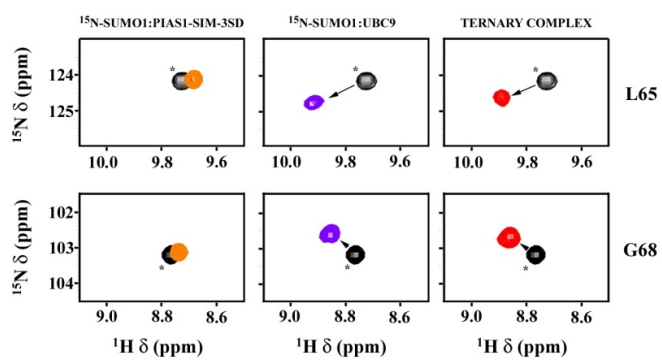


Figure 5

A



B



C

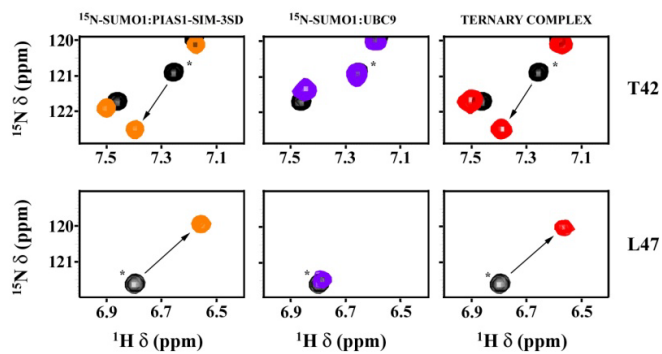
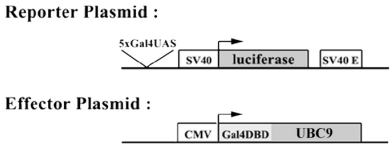


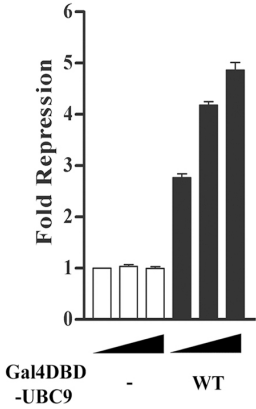
Figure 6



A



B



C

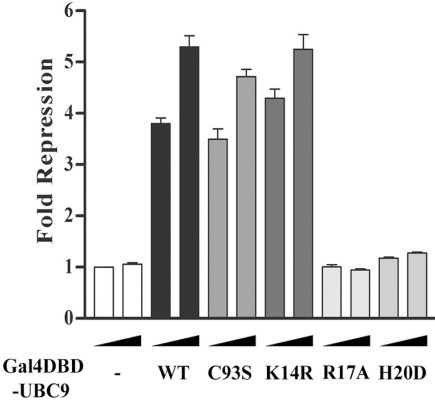


Figure 7

## SUPPLEMENTARY FIGURES AND LEGENDS

**A** *RING-finger related domains*

*SP-RING*

Hs PIAS1 335 CP L G K M R L T I P C R A L T C S H L Q C F D A T L Y I Q M N E K K P T W V C P V C D 378  
 :  
 \*

*U-box*

Hs CHIP 233 G K I S F E L M R E P C I T - P S G I T Y - D R K D I E E H L Q R - - V G H - F D P V T R 271

*RING*

Hs BRCA1 24 C P T C L E L I K E P V S T - K C D H I F - C K F C M L K L L N Q K K G P S - Q C F L C K 65  
 Hs BIRC3 557 C K V C M D K E V S I V F I - P C G H L V V C K D C A P S L R K - - - - - C P I C R 592  
 Hs CBL 381 C K I C A E N D K D V K I E - P C G H L M - C T S C L I T S W Q E S - - E G Q - G C P F C R 420  
 Hs RING2 51 C P I C L D M L K N T M T T K E C L H R F - C A D C I I T A L R S - - G N K - E C P F C R 91  
 Hs TRAF6 70 C P I C L M A L R E A V Q T - P C G H R F - C K A C I I K S I R D - - A G H - K C P V D N 109

Hs TRAF2 34 C S C R N V L R R P F Q A - Q C G H R Y - C S F C L A S I L S S - - G P Q - N C A C V 73

**B** *SP-RING domains*

Hs PIAS1 335 CP L G K M R L T I P C R A L T C S H L Q C F D A T L Y I Q M N E K K P T W V C P V C 377  
 Hs PIAS2 346 CP L G K M R L T I P C R A V T C H L Q C F D A A L - Y L Q M N E K K P - T W I C P - V - C 388  
 Hs PIAS3 327 CP L G K M R L T V P C R A L T C A H L Q S F D A A L - Y L Q M N E K K P - T W T C P - V - C 369  
 Hs PIAS4 326 CP L V K M R L S V P C R A E T C A H L Q C F D A V F - Y L Q M N E K K P - T W M C P - V - C 368  
 Hs NSE2 169 CP I T F K E E M K K P V K N K V C G H T Y E E D A I V R M I E S R Q R K R K K A Y C P Q I G C 215  
 Hs ZMI21 742 CP I T F F R I Q L P A R G H D C R H V Q C F D L E S - Y L Q L N C E R G - T W R C P - V - C 784  
 Hs ZMI22 600 CP I T F F R I Q L P A R G H D C R H I Q C F D L E S - Y L Q L N C E R G - T W R C P - V - C 642  
 \*\*: \* : \* \* . \* : . . : \*\* : \*

**C** *Loops of E2 conjugating enzymes*

*L4 loop* *L7 loop*

*SUMO E2*

Hs UBC9 63 L F K D D Y F S S P P K 74 101 K D W R P A I T I 109  
 : \* \* \*

*UBI E2*

Hs UBE2G1 60 T F P K D Y F L R P P K 71 109 E R W L P I H T V 117  
 Hs UBE2B 59 E F S E E Y F N K P P T 68 94 N R W S P T Y D V 102  
 Hs UBE2C 84 E F P S G Y F Y N A P T 95 120 E K W S A L Y D V 128  
 Hs UBE2S 65 L L G K D F P A S P P K 76 101 R D W T A E L G I 109  
 Hs UBE2D1 55 H F P T D Y F F K P P K 66 91 S Q W S P A L T V 99  
 Hs UBE2E1 101 T F T P E Y F F K P P K 112 137 D N W S P A L T I 141  
 Hs UBE2N 57 F L P E E Y F K A A P K 68 93 D K W S P A L Q I 101  
 Hs UBE2K 61 K I P E R Y F F N P P K 72 98 D Q W A A M T L 106  
 Hs UBE2T 56 I I P E R Y F F E P P Q 67 103 G A W R P S L N I 104  
 Hs UBE2L3 56 N F P A E Y F F K P P K 67 93 E N W K P A T K T 101  
 Hs UBE2Q1 320 S F K D N F F F D P P F 331 358 Q G W S S A Y S I 366  
 Hs UBE2H 56 D L P D K Y F F K S P S 67 93 Q T W T A L Y D L 101

*Nedd8 E2*

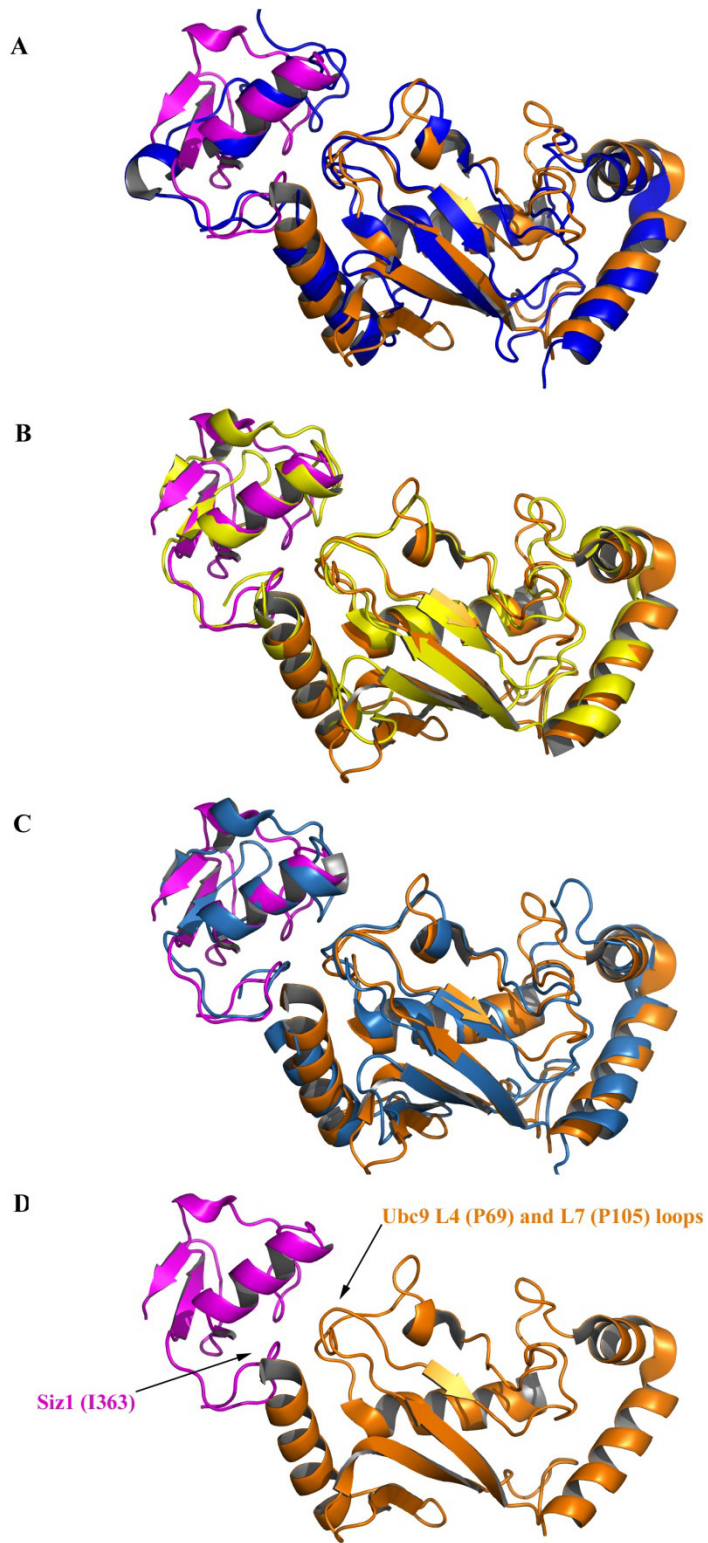
Hs UBC12 81 K V G Q G Y F H D P P K 92 117 E D W K P V L T I 125

*ISG15 E2*

Hs UBE2L6 56 S F P P E Y F F K P P M 67 92 E N W K P C T K T 100

**Supplementary figure 1.1: Sequence alignments comparing the RING-related domains and loops for several E3 ligases and E2-conjugating enzymes.**

(A) Structure based amino acid sequence alignment of several RING-finger related domains of characterized human E3 ligases (TRAF2 excepted). Note that the aliphatic and proline residues conserved in SP-RING, RING and U-box domains of E3 ligases are absent from the RING-finger domain of TRAF2, which lacks ubiquitin E3 ligase activity (Yin, Q *et al.*, *Biochemistry* 2009,48:10558). (B) Structure based amino acid sequence alignment for SP-RING domains from human SUMO E3 ligases of the PIAS family and from other SP-RING domain containing proteins (NSE and ZMIZ family). (C) Structure based amino acid sequence alignment of the L4 and L7 loops from several human ubiquitin-like proteins E2-conjugating enzymes. Note that the proline residues are more preferentially conserved in the L4 loop than in the L7 loop. For (A) to (C), the ▼ indicates the residue of human PIAS1 or UBC9 subjected to mutational analysis. The zinc-coordinating residues are underlined and conserved aliphatic and proline residues residing in the potential SUMO E3:E2 interaction interface are colored in red and blue, respectively. (\*) indicates identical residues, (:) indicates strongly homologous residues and (.) indicates weakly homologous residues.



**Supplementary figure 1.2: Structure model of the Siz1 SP-RING:Ubc9 complex based on different characterized ubiquitin E3 RING-type:E2.**

(A) to (C) Superposition of the Siz1 SP-RING (magenta):Ubc9 (orange) complex on to the: (A) NMR solution structure of the CNOT4 RING:UBE2D2 complex (blue, PDB:1UR6); (B) X-ray crystal structure of the CHIP Ubox:UBE2D1 complex (yellow, PDB:2OXQ); and (C) X-ray crystal structure of the TRAF6 RING:UBE2N complex (pale blue, PDB:3HCT). (D) Proposed model of the Siz1 SP-RING (PDB:3I2D; magenta):Ubc9 (PDB:2EKE; orange) complex based on structural alignment with A-C.

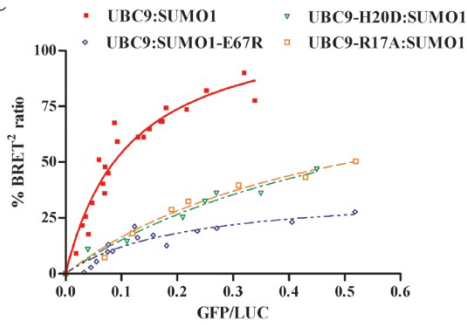
### A $\alpha$ -helix1 of E2 conjugating enzymes

<i>SUMO E2</i>		▼ ▼ ▼ ▼	
Hs UBC9	1	MSGIALSR <b>LAQER</b> KAWKDHHPFGFV	25
UBI E2		*	
Hs UBE2G1	5	QSALLLR <b>RLAEL</b> LNKNPVEGFSAGL	29
Hs UBE2B	1	MSTPARR <b>RLMRDF</b> KRLQEDFPVGV	25
Hs UBE2C	27	ARGPVGK <b>RLQQEL</b> MTLMSGDKGIS	52
Hs UBE2D1	1	--MALKR <b>RIQKEL</b> SDLQRDPPFAHCS	22
Hs UBE2E1	44	LLSTSAK <b>RIQKEL</b> ADITLDPPFNCS	69
Hs UBE2N	1	--MAGL <b>PRRIKETQ</b> RLLAEPVVGIK	24
Hs UBE2K	1	MANLAV <b>QRIKRE</b> FVLLKSEETSKN	25
Hs UBE2T	1	--MQRAS <b>RLKRE</b> LHMLATEPPPGIT	23
Hs UBE2L3	1	--MAAS <b>RRIMKEL</b> EEIRKCGMGNFR	23
Hs UBE2H	3	SPSPG <b>KRRMDT</b> VVVKLIESKHEVTI	27
<i>Nedd8 E2</i>			
Hs UBC12	26	KASAA <b>QLRIQKQ</b> INELNLPKTCDIS	51
<i>ISG15 E2</i>			
Hs UBE2L6	1	--M <b>ASMRV</b> VK <b>LE</b> LDLQKPPPYLR	23

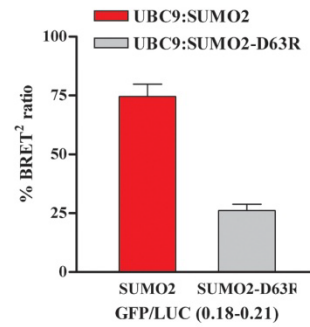
### B Ubiquitin-like modifiers

		L4 loop	
<i>SUMOs</i>		▼	
Hs SUMO1	63	R <b>FLFEG</b> QRI	71
Mm SUMO1	63	R <b>FLFEG</b> QRI	71
Gg SUMO1	63	R <b>FLFEG</b> QRI	71
Xl SUMO1	64	R <b>FLFEG</b> QRI	72
Dr SUMO1	62	R <b>FLFEG</b> QRI	70
Ce SUMO1	56	R <b>FLFDG</b> RRI	64
Dm SUMO1	54	R <b>FRFDG</b> QPI	62
At SUMO1	59	A <b>FLFDG</b> RRL	67
sc Smt3	64	R <b>FLYDG</b> IRI	72
Sp Pmt3	77	R <b>FLVDG</b> ERI	85
Hs SUMO2	59	R <b>FRFDG</b> QPI	67
Hs SUMO3	58	R <b>FRFDG</b> QPI	66
Ubiquitin		*	
Hs UBI	42	R <b>LIFAG</b> KQL	50
<i>Nedd8</i>			
Hs Nedd8	42	R <b>LISG</b> KQM	50

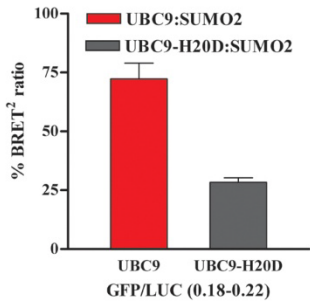
### C



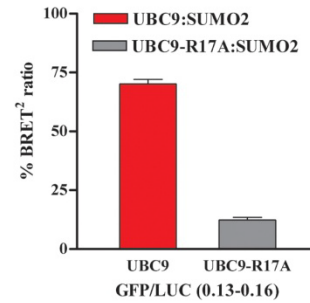
### D



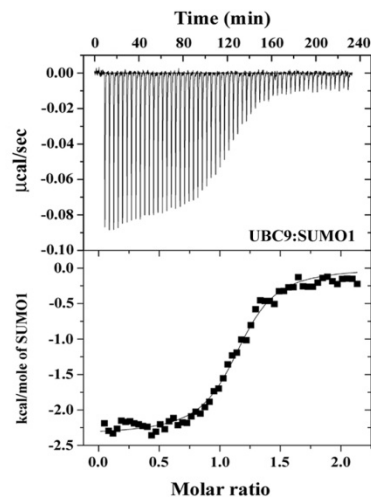
### E



### F



### G



**Supplementary figure 3.1: SUMO:UBC9 non-covalent interactions.**

(A) Structure based amino acid sequence alignment of the first  $\alpha$ -helix from human ubiquitin-like proteins E2-conjugating enzymes. Conserved positively charged and negatively charged residues are colored in blue and red respectively. Note that the positively charged residues (blue) of UBC9 implicated in the SUMO:UBC9 non-covalent interaction are not conserved in other E2-conjugating enzymes. (B) Structure based amino acid sequence alignment of the L4 loop for SUMO1 from different eukaryotic species and several other human ubiquitin-like proteins. A conserved negatively charged residue implicated in the SUMO:UBC9 non-covalent interaction is colored in red for the SUMO proteins. Note that this residue is not conserved in either ubiquitin or NEDD8 proteins. (C) BRET titration curves showing interaction between UBC9 and a non-conjugable version of SUMO1. The BRET pairs tested using fixed amounts of wild-type UBC9-RLuc (■), UBC9-R17A-RLuc (□) or UBC9-H20D-RLuc (▽) with increasing amounts of GFP-SUMO1 or a fixed amount of wild-type UBC9-RLuc with increasing amount of GFP-SUMO1-E67R (◇). For each pair, data of two independent experiments were pooled. (D) BRET bar graph showing interaction between UBC9-RLuc and non-conjugable GFP-SUMO2 or GFP-SUMO2-D63R. Data are derived from a BRET titration assay at similar GFP acceptor/Luc donor expression ratios. (E) BRET bar graph showing interaction between non-conjugable GFP-SUMO2 and either the wild-type UBC9-RLuc or UBC9-H20D-RLuc. Data are derived from a BRET titration assay at similar GFP acceptor/Luc donor expression ratios. (F) BRET bar graph showing interaction between non-conjugable GFP-SUMO2 and either the wild-type UBC9-RLuc or UBC9-R17A-RLuc. Data are derived from a BRET titration assay at similar GFP acceptor/Luc donor expression ratios. (G) Representative ITC thermogram for the interaction between SUMO1 and UBC9. Experimental details are provided in Materials and Methods. For (A) and (B), the ▼ indicates residues of human UBC9 and SUMO subjected to mutational analysis. (\*) indicates identical residues, (:) indicates homologous residues and (.) indicates weakly homologous residues. For (D) to (F) data from at least two independent experiments are pooled.

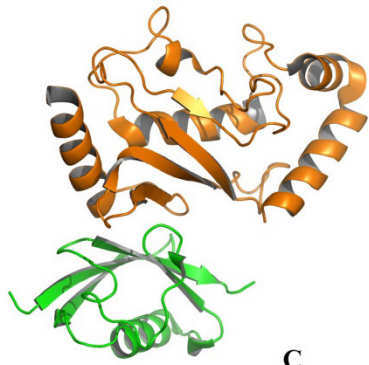




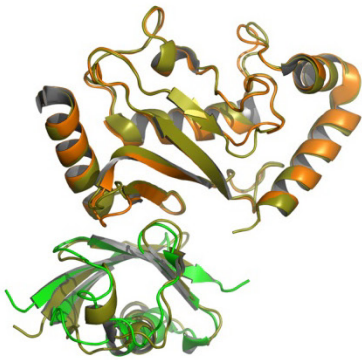
**Supplementary figure 3.2: PIAS1:SUMO non-covalent interactions.**

(A) Structure based amino acid sequence alignment of the SIM interacting region for SUMO1 (from the second  $\beta$ -strand to the end of the  $\alpha$ -helix) from different eukaryotic species and other ubiquitin-like proteins. For SUMO proteins, conserved aromatic and positively charged residues implicated in the PIAS1:SUMO non-covalent interaction are colored in yellow and blue respectively. Note that the positively charged residues are switched to negatively charged residues (colored in red) in ubiquitin and NEDD8 proteins. The ▼ indicates residues of human SUMO1 subjected to mutational analysis. (:) indicates homologous residues and (.) indicates weakly homologous residues. (B) BRET titration curves showing interaction between wild-type PIAS1 and non-conjugable SUMO1 or non-conjugable SUMO1 mutated in the SIM binding surface (SUMO1mt; F36A, K37A, K39A, K45A and K46A). The BRET pairs were tested using a fixed amount of RLuc-PIAS1 with increasing amounts of either wild-type GFP-SUMO1 (■) or GFP-SUMO1mt (□). For each pair, data of two independent experiments were pooled. (C) BRET bar graph showing interaction between non-conjugable GFP-SUMO2 and either the wild-type Rluc-PIAS1 or Rluc-PIAS1-SIMmt. Data are derived from a BRET titration assay at similar GFP acceptor/Luc donor expression ratios. (D) and (E) Representative ITC thermograms for the interaction between either the PIAS2 or the PIAS1 SIM-containing peptides and SUMO1.

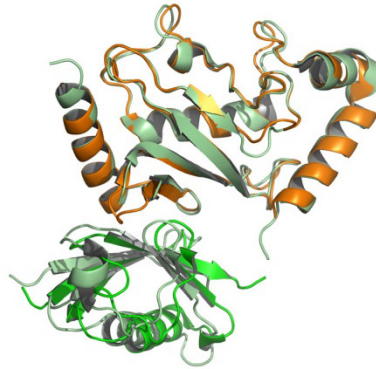
A



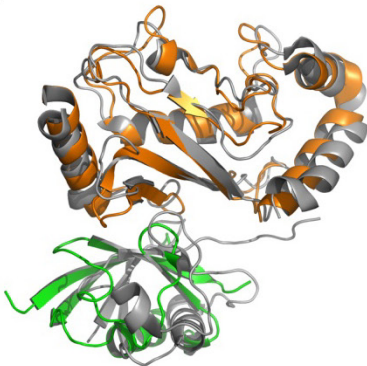
B



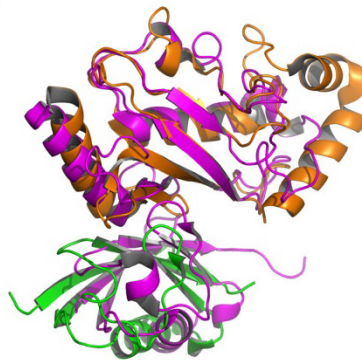
C



D



E



**Supplementary figure 3.3: Overlay of the structure of the SUMO:UBC9 complex onto structures of the UBC9:SLD and ubi E2:UBI complexes.**

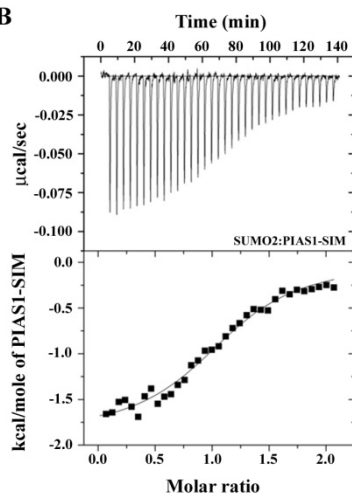
(A) X-ray crystal of UBC9 (orange):SUMO (green) complexes (PDBs:2UYZ, 2PE6 and 2EKE); (B) to (E) Superposition of the SUMO:UBC9 complex on to the: (B) X-ray crystal structure of the Ubc9:Rad60-SLD2 complex (gold, PDB:3RCZ); (C) X-ray crystal structure of the UBC9:Nip45-SLD2 complex (pale green, PDB:3A4S); (D) NMR solution structure of the UBE2D3:UBI complex (grey, PDB:2FUH); (E) X-ray crystal structure of the UB2V2:UBI complex (magenta, PDB:1ZGU).

A

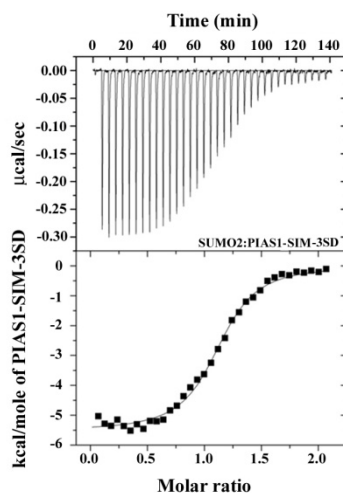
*Siz/PIAS SUMO-Interacting Motif*

			▼▼▼ ▼▼▼▼▼	
Hs PIAS4	460	KPGAD	VDITLDSSESSED	EE 492
Hs PIAS3	442	KRKVE	VDITLDSSEDELDLPT	464
Hs PIAS2	464	KRKVD	VDITLDSSEDEEDPFA	486
Hs PIAS1	454	NKKVE	VDITLDSSEDEEEEP	476
Mm Pias1	454	NKKVE	VDITLDSSEDEEEEP	476
Gg Pias1	454	NKKVE	VDITLDSSEDEEEEP	476
Xl Pias1	454	NKKVE	VDITLDSSEDEEEPC	476
Dr Pias1	455	RKKVE	VDITLDSSEDEEEEP	477
Dm Pias1	425	AQKVE	VSDDLELISDIAKPKR	447
Ce Gei17	552	PADDL	ITLSDDDDEELNRGIMN	574
Sp P111	442	KRESL	VDITLSDDEENVATSTT	464
Sc Siz2	467	HNEPE	LSLSDSDDDAFIPASKS	489
Sc Siz1	477	PSEPI	LNLSDDDDPEPGRNHEV	499
At Siz1	595	GGRNE	VVLSDDDENLVLITPG	617

B



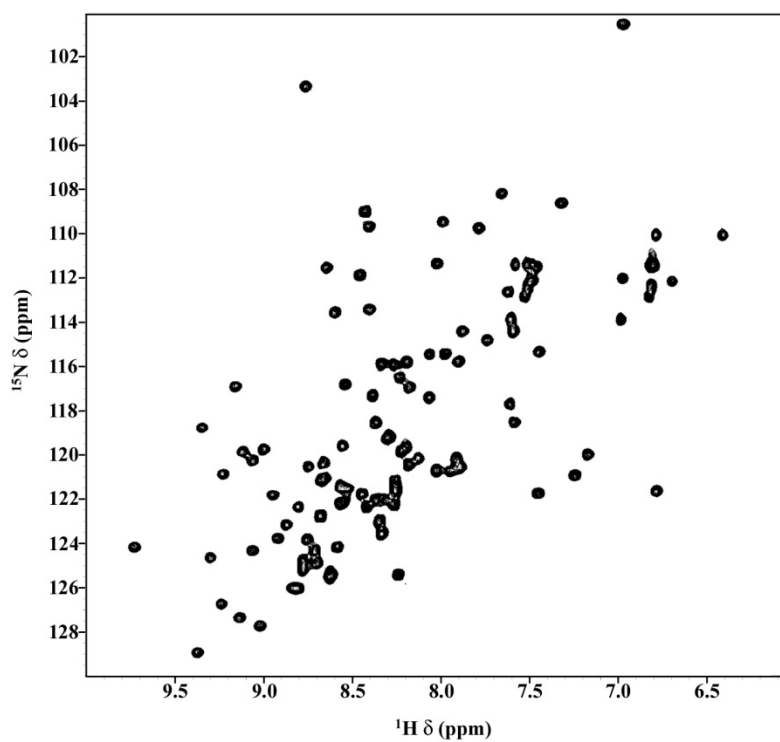
C



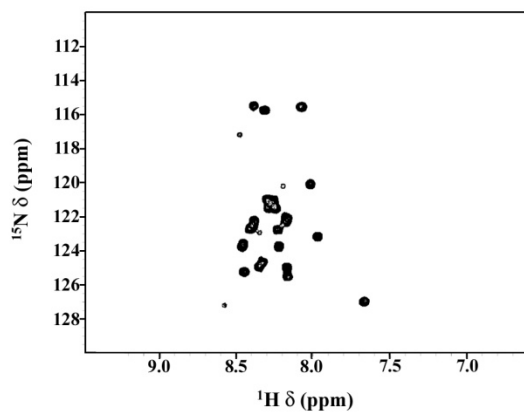
### Supplementary figure 4.1: The phosphorylation status of the PIAS1 SIM regulates its interaction with SUMO2.

(A) Amino acid sequence alignment of the SUMO Interacting Motifs for Siz/PIAS SUMO E3 ligases from different eukaryotic species. Conserved hydrophobic residues, CK2-targeted serine residues and the glutamic/aspartic acidic cluster are colored in yellow, magenta and red respectively. The ▼ indicates residues from human PIAS1 subjected to mutational analysis. (\*) indicates identical residues, (:) indicates strongly homologous residues and (.) indicates weakly homologous residues. (B) and (C) Representative ITC thermograms for the interaction between the wild-type PIAS1-SIM or phosphomimetic PIAS1-SIM-3SD peptides and SUMO2.

A



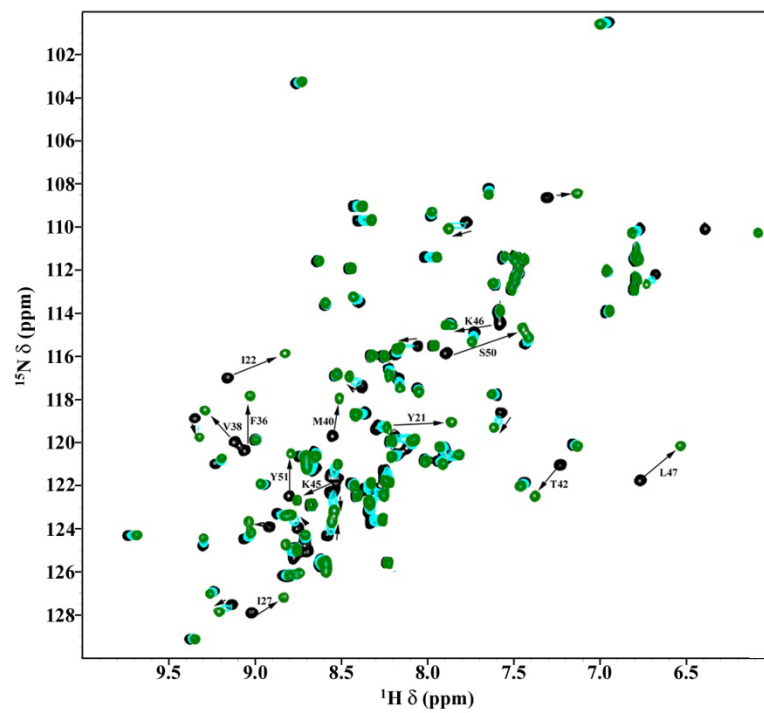
B



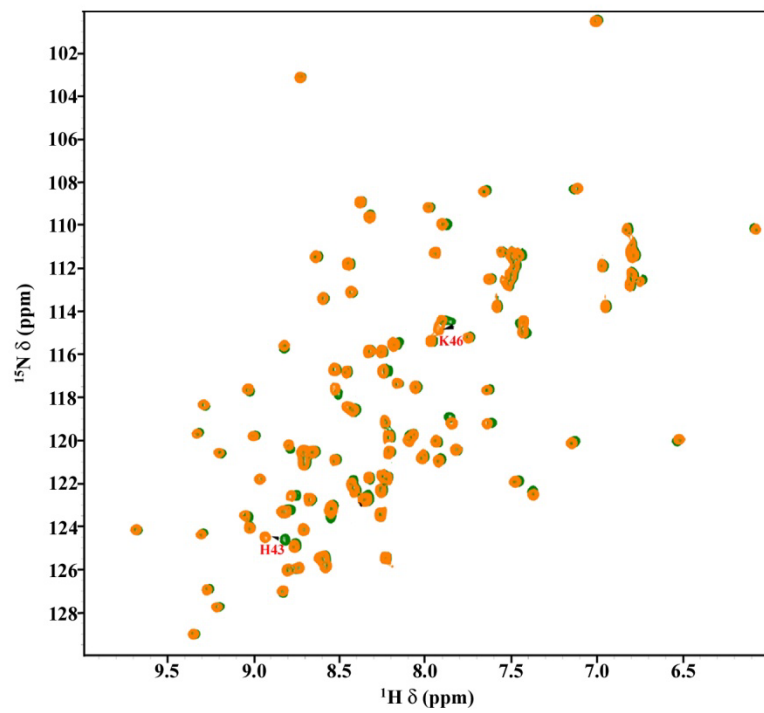
**Supplementary Figure 5.1: 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of free SUMO1 and of free PIAS1-SIM-3SD peptide.**

(A) 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 (0.5 mM) in the free form. (B) 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -labeled PIAS1-SIM-3SD peptide (0.5 mM) in the free form.

A



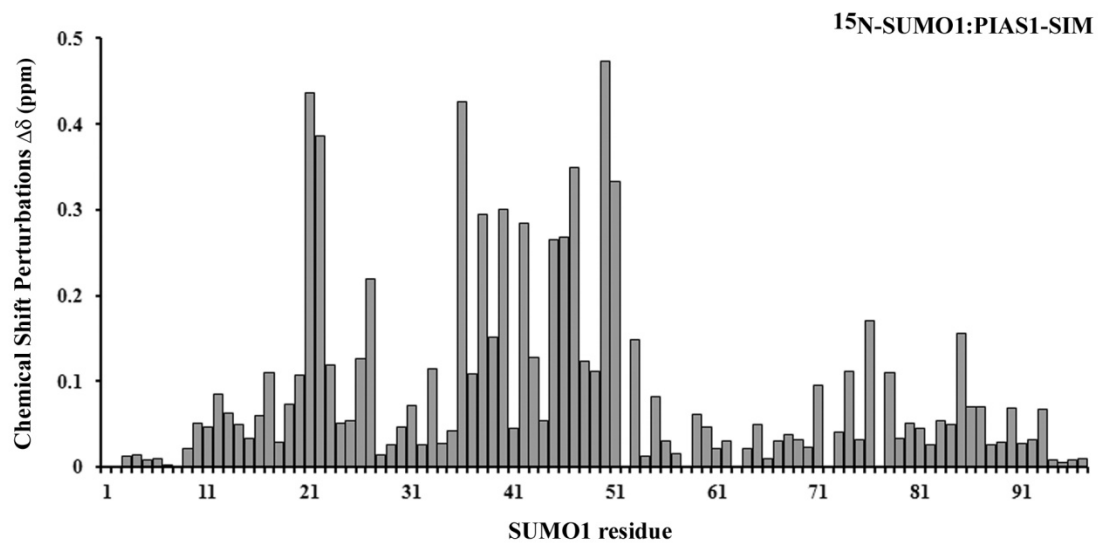
B



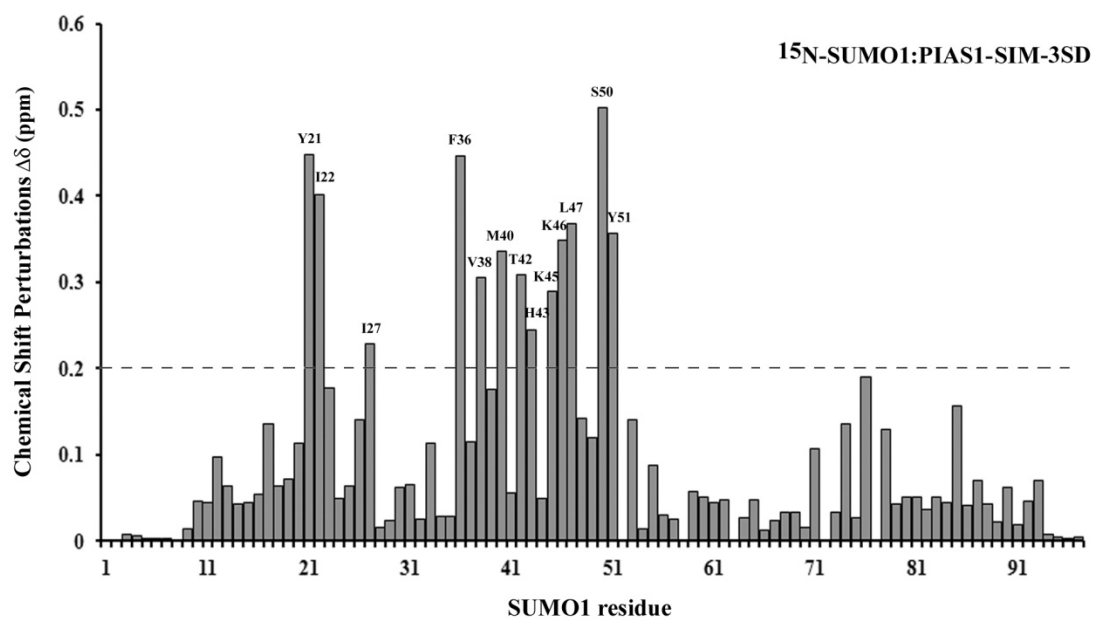
**Supplementary Figure 5.2: Mapping of PIAS1-SIM and PIAS1-SIM-3SD peptides binding sites on SUMO1.**

(A) Overlay of 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 (0.5 mM) in the free form (black) and in the presence of increasing concentration of unlabeled PIAS1-SIM peptide (up to 0.75 mM; green). SUMO1 residues significantly shifting [ $\Delta\delta$  (ppm) > 0.2] are identified according to the human SUMO1 numbering. Arrows indicate the direction of the shift. (B) Overlay from the 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 (0.5 mM) in the presence of unlabeled PIAS1-SIM (0.75 mM; green) and PIAS1-SIM-3SD (0.75 mM; orange) peptides. Residues of SUMO1 that shift are identified according to human SUMO1 numbering and significantly shifting residues are colored in red [ $\Delta\delta$  (ppm) > 0.07].

A



B

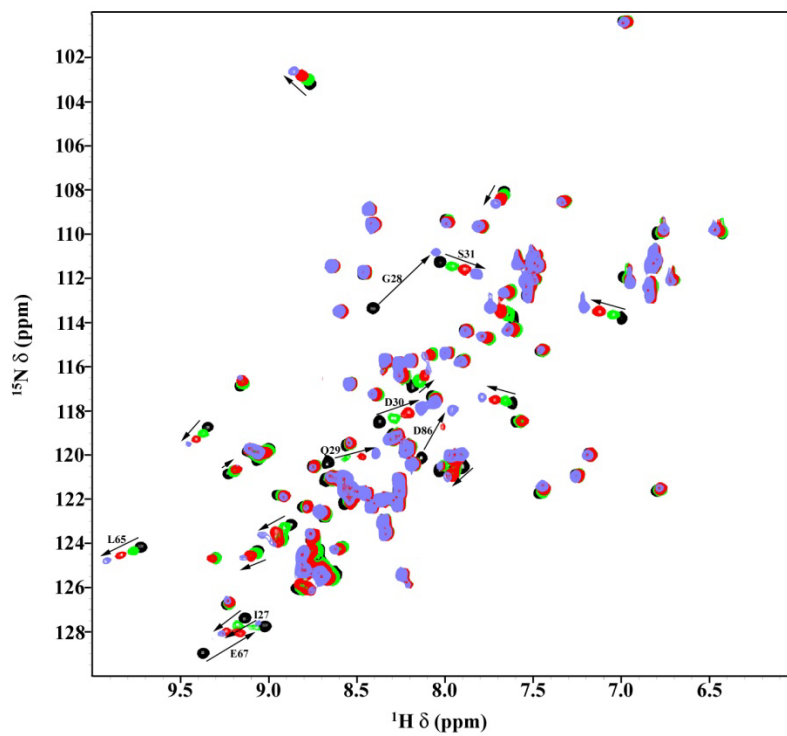




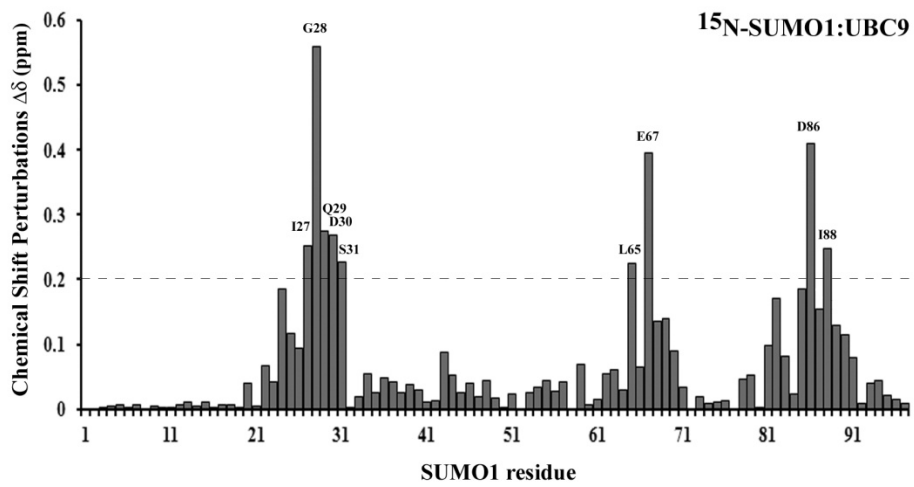
**Supplementary Figure 5.3: Identification of the PIAS1-SIM and PIAS1-SIM-3SD binding sites on SUMO1**

(A) Histogram of the variation in chemical shifts [ $\Delta\delta$  (ppm)] observed in the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -SUMO1 upon formation of the PIAS1-SIM:SUMO1 complex. The chemical shifts were calculated with the formula  $\Delta\delta = [(0.17\Delta N_{\text{H}})^2 + (\Delta H_{\text{N}})^2]^{1/2}$  and are given in parts per million. (B) Histogram of the variation in chemical shifts [ $\Delta\delta$  (ppm)] observed in the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -SUMO1 upon the formation of the PIAS1-SIM-3SD:SUMO1 complex. The chemical shifts were calculated with the formula  $\Delta\delta = [(0.17\Delta N_{\text{H}})^2 + (\Delta H_{\text{N}})^2]^{1/2}$  and are given in parts per million.

A

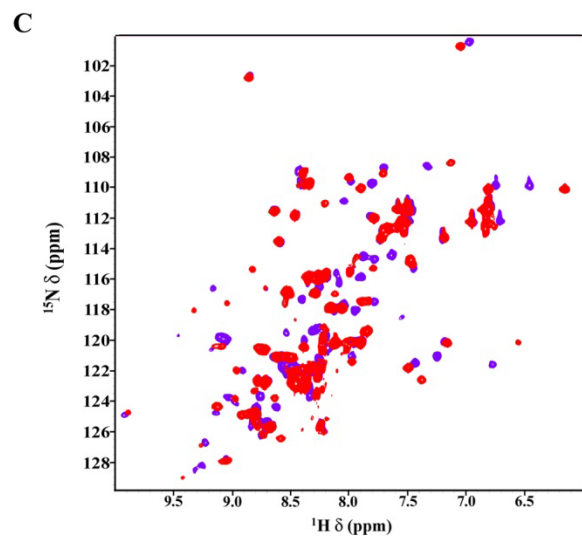
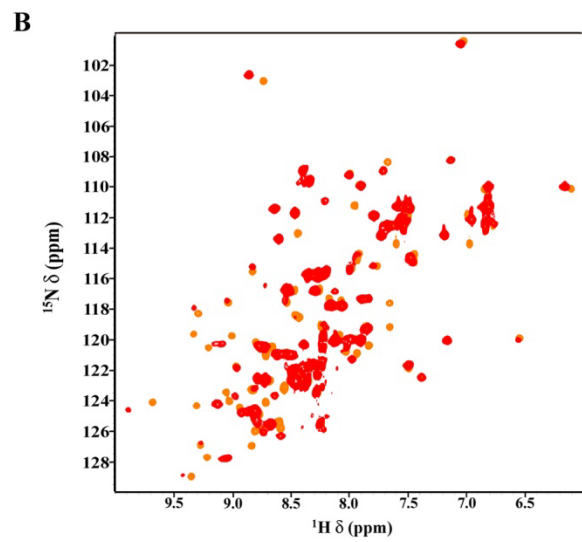
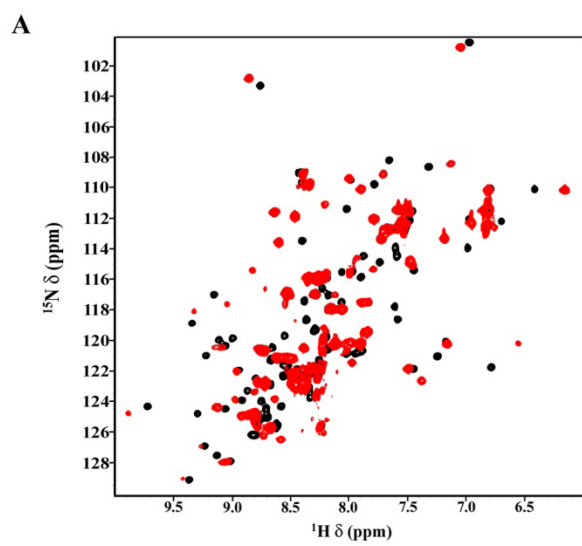


B



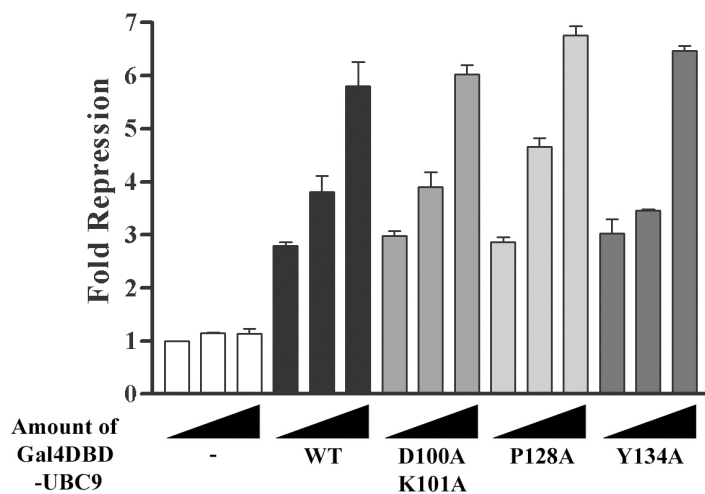
**Supplementary Figure 5.4: Identification of the UBC9 binding sites on SUMO1**

(A) Overlay of 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 (0.5 mM) in the free form (black) and in the presence of increasing concentration of unlabeled UBC9 (up to 0.5 mM; purple). SUMO1 residues significantly shifting [ $\Delta\delta$  (ppm) > 0.2] are identified according to the human SUMO1 numbering. Arrows depict the direction of the shift. (B) Histogram of the variation in chemical shifts [ $\Delta\delta$  (ppm)] observed in the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -SUMO1 upon the formation of the SUMO1:UBC9 complex. The chemical shifts were calculated with the formula  $\Delta\delta = [(0.17\Delta N_{\text{H}})^2 + (\Delta H_{\text{N}})^2]^{1/2}$  and are given in parts per million.



**Supplementary Figure 6: Characterization of the PIAS1-SIM:SUMO1:UBC9 ternary complex**

(A) Overlay of 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 (0.5 mM) in the free form (black) and in complex with unlabeled UBC9 and PIAS1-SIM-3SD peptide (0.75 mM each; red). (B) Overlay of 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 (0.5 mM) in complex with unlabeled PIAS1-SIM-3SD peptide (0.75 mM; orange) and in complex with unlabeled UBC9 and PIAS1-SIM-3SD peptide (0.75 mM each; red). (C) Overlay of 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 (0.5 mM) in complex with unlabeled UBC9 (0.75 mM; purple) and in complex with unlabeled UBC9 and PIAS1-SIM-3SD peptide (0.75 mM each; red).



**Supplementary Figure 7: Regulation of UBC9-dependent repression is independent of its substrate binding capacity**

Transcriptional activity of increasing amounts of wild type UBC9 and its substrate interactions deficient mutants (UBC9-C93S, UBC9-D100A-K101A, UBC9-P128A and UBC9-Y134A) directly recruited to the luciferase reporter.



### 3 Préambule de la troisième étude

Dans le deuxième manuscrit nous avons déterminé que le recrutement adéquat de UBC9 à PIAS1 nécessite l'interaction non-covalente de SUMO avec la séquence SIM de PIAS1. De plus, nos résultats indiquent que la phosphorylation de résidus sérines juxtaposées au SIM de PIAS1 régule positivement le recrutement de UBC9 en renforçant l'affinité d'interaction SUMO:SIM. Ainsi, sachant qu'un nombre significatif de protéines possède des résidus phosphorylables juxtaposés à leur séquence SIM, nous avons postulé que la phosphorylation de ces résidus renforce la liaison SUMO:SIM en établissant de nouvelles interactions avec des résidus spécifiques de SUMO. Pour ce faire nous avons utilisé PML comme protéine modèle contenant un SIM régulable par la phosphorylation. En effet, dans une autre étude, présentée en annexe de cette thèse compte tenu de ma participation comme co-auteur, il a été mis en évidence que le SIM de PML est requis pour la dégradation de PML induite par le trioxyde d'arsenic. De plus, un autre groupe de recherche a mis en évidence que la phosphorylation des résidus sérines jouxtant le SIM de PML est impliquée pour la dégradation induite par le stress. Ces études soulignent l'importance fonctionnelle du SIM de PML et de la phosphorylation des sérines adjacentes dans différentes conditions. Les études faisant l'objet de ce troisième manuscrit s'intéressent au rôle de la phosphorylation dans l'interaction de SUMO1 avec le SIM de PML dans des conditions basales.

Les résultats présentés dans ce chapitre sont exposés sous la forme d'un article scientifique qui sera soumis dans une revue scientifique de haut calibre dès sa complétion. Les données présentées dans cette étude sont le fruit d'une étroite collaboration avec Laurent Cappadocia qui est co-auteur de ce manuscrit. J'ai conçu et réalisé les expériences et analysé les résultats se rapportant aux essais de BRET et ai généré les clones de SUMO s'y rapportant. J'ai généré les constructions de PML nécessaires à la production et à la purification des protéines d'intérêt. Avec Laurent Cappadocia et deux stagiaires de premier cycle, Malik Chaker-Margot et Samuel Tremblay-Belzile, j'ai contribué à la production et à la purification des protéines d'intérêt nécessaires aux expériences de calorimétrie à titrage



isotherme ainsi qu'à la génération de cristaux de protéines. Laurent Cappadocia a été impliqué dans l'acquisition des spectres RMN ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC) que j'ai par la suite analysé. J'ai participé aux collectes de données qui ont permis à Laurent Cappadocia de résoudre les structures cristallographiques des différents complexes présentés dans cette étude. Finalement, mis à part la figure 5 et les résultats s'y rapportant, j'ai rédigé le présent manuscrit qui a, par la suite, été corrigé par James. G Omichinski et Muriel Aubry.

**Article 3**

**STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF THE  
PHOSPHORYLATION DEPENDENT INTERACTION BETWEEN PML AND  
SUMO**

*Xavier H. Mascle<sup>1</sup>, Laurent Cappadocia<sup>1</sup>, Malik Chaker-Margot, Samuel Tremblay-Belzile,  
Muriel Aubry and James G. Omichinski\**

Département de Biochimie, Université de Montréal C.P. 6128 Succursale Centre-Ville,  
Montréal, QC H3C 3J7 Canada

**\*Correspondence:**

James G. Omichinski, Département de Biochimie, Université de Montréal C.P. 6128  
Succursale Centre-Ville, Montréal, QC H3C 3J7 Canada.

Telephone: 514-343-7341

Fax:514-343-2210

<sup>1</sup>These two authors contributed equally to the manuscript.

Running Title: Structure of a phosphorylated PML-SUMO1 complex.

**SUMMARY**

SUMO proteins control a wide range of biological processes through their ability to function either as a post-translation modification or through participation in non-covalent protein-protein interactions. Some of the best-characterized non-covalent interactions involving SUMO proteins occur during PML-dependent recruitment of transcriptional regulatory proteins into sub-nuclear bodies known as PML-Nuclear Bodies (PML-NBs). Like PML, these proteins often contain a cluster of serine/acidic residues immediately adjacent to a series of hydrophobic residues within their SUMO-Interacting Motifs (SIM). Using cellular and biochemical studies, we demonstrate that the interaction between SUMO1 and PML is governed by the Casein Kinase 2 (CK2)-dependent phosphorylation of four serine residues in PML. The crystal structures of SUMO1 in complex with both an unphosphorylated and tetraphosphorylated PML-SIM peptide indicates that three of the four phospho-serines make direct contacts with residues of SUMO1. In support of the functional importance of these interactions, mutation of lysine residues within the two basic patches of SUMO1 significantly decreases the interaction with PML in human cells. Taken together, these results provide an atomic level description of the role of CK2-dependent phosphorylation in PML function, as well as important insights into the potential role of the phospho-SIM regions of other proteins recruited to the PML-NBs.

## INTRODUCTION

Promyelocytic Leukemia (PML) protein is a tumor suppressor protein implicated in a wide range of biological processes including transcriptional regulation, cell cycle control and maintenance of genome integrity (Zhong, Salomoni et al. 2000; Delleire and Bazett-Jones 2007; Salomoni, Dvorkina et al. 2012). Due to alternative splicing, the *PML* gene gives rise to several protein isoforms (Jensen, Shiels et al. 2001), but all PML isoforms contain an N-terminal Tri-partite motif (TRIM) responsible for their dimerization as well as a variable C-terminal region that imparts isoform specific properties (Fogal, Gostissa et al. 2000; Jensen, Shiels et al. 2001; Nguyen, Pandolfi et al. 2005). Even though a high percentage of the total PML protein is distributed diffusely within the nucleus, a significant fraction forms the fundamental component of nuclear matrix associated structures commonly referred to as PML-Nuclear Bodies (PML-NBs) (Daniel, Koken et al. 1993; Ishov, Sotnikov et al. 1999; Lang, Jegou et al. 2010). Of the various PML isoforms all are known to be important components of PML-NBs except isoform VII due to the fact that it is only found within the cytosol (Condemine, Takahashi et al. 2006; Bernardi and Pandolfi 2007; Weidtkamp-Peters, Lenser et al. 2008; Brand, Lenser et al. 2010). Although the precise physiological functions of the PML-NBs remain enigmatic, a wide array of proteins transit in and out of the bodies in a cell cycle dependent fashion. This highly dynamic process occurs in response to a number of different factors including radiation damage, oxidative stress, viral infection and following exposure to heavy metals (Everett, Lomonte et al. 1999; Eskiw, Delleire et al. 2003; Nefkens, Negorev et al. 2003; Salomoni, Bernardi et al. 2005; Delleire, Ching et al. 2006; Bernardi and Pandolfi 2007; Everett and Chelbi-Alix 2007; Chen, Kappel et al. 2008; Weidtkamp-Peters, Lenser et al. 2008; Jeanne, Lallemand-Breitenbach et al. 2010).

Several years ago, the PML protein was identified as a component of a fusion protein with the retinoic acid receptor alpha (PML-RAR $\alpha$ ) as a result of the t(15;17) chromosomal translocation in patients with Acute Promyelocytic Leukemia (APL) (Rowley, Golomb et al. 1977; de The, Chomienne et al. 1990; Kakizuka, Miller et al. 1991;

Pandolfi, Grignani et al. 1991; Melnick and Licht 1999). This finding led to numerous studies that established the role of PML in a wide array of cellular functions including apoptosis, senescence and antiviral defense (Quignon, De Bels et al. 1998; Wang, Ruggero et al. 1998; Ferbeyre, de Stanchina et al. 2000; Zhong, Salomoni et al. 2000; Geoffroy and Chelbi-Alix 2011; Vernier, Bourdeau et al. 2011). While non-pathological cells typically display a limited number of PML-NBs, cells derived from APL patients containing the translocation contain a large number of smaller bodies and this is directly associated with high expression levels of the PML-RAR $\alpha$  fusion protein (Dyck, Maul et al. 1994; Weis, Rambaud et al. 1994). Interestingly, treatment with arsenic trioxide induces the reorganization of the PML-NBs in APL cells expressing high levels of the PML-RAR $\alpha$  fusion protein and this is consistent with arsenic trioxide being a successful therapeutic agent for patients with certain forms of APL (Zhu, Koken et al. 1997; Soignet, Maslak et al. 1998; Wang, Rivi et al. 1998; Zhu, Gianni et al. 1999). This reorganization of PML-NBs following arsenic trioxide treatment is directly associated with an increase in the SUMOylation of both the native PML and the PML-RAR $\alpha$  fusion protein (Muller, Matunis et al. 1998; Lallemand-Breitenbach, Zhu et al. 2001). In addition, PML-NBs are also enriched with the enzymes required for SUMOylation as well as a number of other proteins that are post-translationally modified by SUMO (Van Damme, Laukens et al. 2010).

The SUMO family proteins are ubiquitin-like proteins that transiently modify a wide array of proteins such as PML and adopt a core tertiary structure similar to ubiquitin (Boddy, Howe et al. 1996; Bayer, Arndt et al. 1998; Chen, Mannen et al. 1998). Like ubiquitin, SUMO proteins can be covalently attached to lysine residues in target proteins through a posttranslational modification that involves three enzymatic reactions (SAE1:SAE2 E1 activating enzyme, UBC9 E2 conjugating enzyme and E3 ligases) (Desterro, Thomson et al. 1997; Desterro, Rodriguez et al. 1999; Kahyo, Nishida et al. 2001; Kotaja, Karvonen et al. 2002; Pichler, Gast et al. 2002; Kagey, Melhuish et al. 2003; Weger, Hammer et al. 2005). One important feature that regulates the overall SUMOylation pathway is the existence of SUMO-binding domains (SBDs) that recognize SUMO proteins and mediate non-covalent protein-protein interactions. Although numerous ubiquitin

Binding Domains (UBDs) have been identified (Husnjak and Dikic 2012), only two types of SBDs have been characterized to date; a SUMO-specific zinc-finger domain (ZZ zinc finger) (Danielsen, Povlsen et al. 2012) and a short recognition sequence referred to as a SUMO-interacting motif (SIM) (Song, Durrin et al. 2004; Song, Zhang et al. 2005). SIMs, also known as SUMO Binding Motifs (SBMs), constitute a majority of the known SBDs. SIMs have been characterized within both E1 and E3 enzymes of the SUMOylation pathway as well as in a number of SUMO substrates (Weger, Hammer et al. 2003; Song, Durrin et al. 2004; Reverter and Lima 2005; Hecker, Rabiller et al. 2006; Merrill, Melhuish et al. 2010; Olsen, Capili et al. 2010). The minimal core of the SIM is typically characterized by a short sequence composed of hydrophobic residues,  $\Psi_x\Psi\Psi$  and  $\Psi\Psi_x\Psi$  (where  $\Psi$  is either V, I or L). Upon binding to SUMO proteins, the SIM forms either a parallel or an anti-parallel  $\beta$ -strand configuration with the 2<sup>nd</sup>  $\beta$ -strand of SUMO proteins and the orientation of the SIM (parallel vs anti-parallel) towards a specific SUMO protein is believed to be dependent on acidic and/or phosphorylated amino acid residues adjacent to the hydrophobic core of the SIM (Song, Zhang et al. 2005).

The SIM found in the various PML isoforms is composed of four hydrophobic residues followed by a cluster of serine and acidic residues (Song, Durrin et al. 2004; Shen, Lin et al. 2006). Within the serine/acidic rich cluster, there are three consensus casein kinase 2 (CK2)-phosphorylation sites and a fourth CK2-phosphorylation site is generated subsequent to phosphorylation of the C-terminal site (Scaglioni, Yung et al. 2006). Several studies have implicated CK2-dependent phosphorylation in a number of PML functions. Initially, it was suggested that PML degradation rates are significantly enhanced by CK2-dependent phosphorylation of these serine residues based on the observation that mutating these four-serine residues to alanine significantly enhances PML stability by blocking phosphorylation (Scaglioni, Yung et al. 2006). In addition, several tumor-derived cell lines display an inverse relationship between their CK2 activity and their levels of PML protein (Koken, Linares-Cruz et al. 1995; Zhang, Chin et al. 2000; Gurrieri, Capodiecici et al. 2004; P, Rusch et al. 2004; Scaglioni, Yung et al. 2008). Moreover, mutating the four serines to alanines leads to a decrease in PML binding to SUMO1 as well as an enhancement of

PML-driven senescence and apoptosis (Scaglioni, Yung et al. 2006; Percherancier, Germain-Desprez et al. 2009; Stehmeier and Muller 2009). Taken together, these results suggest that the several PML functions are regulated by varying the phosphorylation status of the serine residues adjacent to the hydrophobic residues of the SIM of PML.

Given the importance of CK2-dependent phosphorylation sites within the SIM of PML in regulating its function, we have used a combination of functional, biochemical and structural studies to characterize the role that phosphorylation of PML plays in regulating its interaction with SUMO1. We established that the interaction between SUMO1 and PML is strongly enhanced by CK2-dependent phosphorylation of serine residues immediately adjacent to the SIM of PML both *in vivo* and *in vitro*. Structural characterization of SUMO1 in complex with a phosphorylated PML-SIM peptide indicates that three phosphoserines make distinct interaction with residues of SUMO1. In addition, mutation of select lysine residues within SUMO1 implicated in the interaction with the phosphoserine residues of PML significantly decreases the interaction in human cells. These results provide not only an atomic level description of the role of CK2-dependent phosphorylation of PML in PML interaction with SUMO, but important insights into the potential role of the phospho-SIM regions of other proteins recruited to the PML-NBs such as DAXX and SP100.



## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Expression vectors*

#### *BRET constructs*

The PML BRET constructs (PMLIII-RLuc, PMLIII-4SA-RLuc and PMLIII-4SD-RLuc) were previously described (Percherancier, Germain-Desprez et al. 2009). The non conjugable version of human SUMO1 cDNA (GenBank<sup>TM</sup> accession number U67122.1) and of human SUMO2 cDNA (GenBank<sup>TM</sup> accession number X99585.1) fused to pGFP10 were generated by site directed mutagenesis from pGFP10-SUMO1 and pGFP10-SUMO2 (Masclé, Germain-Desprez et al. 2007), mutating the SUMO diglycine motif to alanine residues. All the SUMO1 mutants [SUMO1-K37A-K39A, SUMO1-K45A-K46A and SUMO1-4KA (SUMO1-K37A-K39A-K45A-K46A)] were generated by site directed mutagenesis starting from the cDNAs encoding the non-conjugable forms of SUMO1 and SUMO2 respectively. All the SUMO constructs were verified by DNA sequencing.

#### *Recombinant protein constructs*

The sequences encoding for the human PML-SIM peptide (residues 547-573 of PML Isoform I: GenBank<sup>TM</sup> accession number NM\_033238.2) and the PML-SIM-4SD peptide (S560, S561, S562 and S565 mutated to aspartic acid) were ordered as oligo-nucleotides (Integrated DNA Technologies) with BamHI and EcoRI restriction enzymes sites, 5'phosphorylated, annealed and cloned as BamHI-EcoRI fragments into pGEX-2T vector (Amersham). SUMO1 (residues 2-97 of human SUMO1) cDNA was PCR amplified from pGFP10-SUMO1 and cloned as an XbaI fragment into pGEX-4T3 vector (Amersham). A SUMO1-C52A point mutant was generated using site directed mutagenesis. A  $\Delta$ N-SUMO1 construct (residues 17-97 of human SUMO1 with the C52A mutation) was cloned into a modified pGEX-2T vector with a Tobacco Etch Virus (TEV) protease cut site instead of the Thrombin protease cut site. All the constructs were verified by DNA sequencing.

***Transient transfections***

Human Embryonic Kidney 293T cells (HEK 293T) maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent), 100 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 1 mM L-glutamine were seeded at a density of  $\sim 1 \times 10^6$  cells per 100-mm dish for BRET experiments. Transient transfections of plasmids were performed on the following day using the calcium phosphate precipitation method. The total amount of transfected DNA was kept constant (10 µg per dish).

***BRET Experiments***

The BRET assays were conducted as previously described (Germain-Desprez, Bazinet et al. 2003). Cells transiently transfected with the luciferase donor and GFP acceptor were resuspended and distributed in 96-well plates. Upon addition of the cell permeable luciferase substrate (coelenterazine deep blue, PerkinElmer Life Sciences), the bioluminescence signal resulting from its degradation was detected using a 370–450-nm band pass filter (donor emission peak 400 nm). The energy transferred results in a fluorescence signal emitted by the GFP acceptor (excitation peak 400 nm, emission peak 510 nm) that was detected using a 500–530-nm band pass filter. The BRET signal (BRET ratio) was quantified by calculating the acceptor fluorescence/donor bioluminescence ratio as previously reported (Mercier, Salahpour et al. 2002). Expression level of each construct was determined by direct measurements of the total fluorescence and luminescence on aliquots of transfected cell samples. The GFP total fluorescence was measured using a Fusion alpha FP (Packard) with an excitation filter at 425 nm and an emission filter at 515 nm. The total luminescence was measured using the same cells incubated with coelenterazine H (Molecular Probes; emission peak 485 nm) for 10 min. The BRET ratios were plotted as a function of the GFP/Luc fusion protein expression ratio, the expression of both fusion proteins was assessed with the same cells as described above, to take into account the potential variations in the expression of individual constructs from transfection to transfection.

### ***Expression and Purification of Proteins***

SUMO1,  $\Delta$ N-SUMO1, PML-SIM and PML-SIM-4SD were expressed as GST fusion proteins in *E. coli* host strain TOPP2 (Stratagene). The cells were grown at 37°C in Luria Broth media, and protein expression was induced for 4h at 30°C with 0.7 mM isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Inalco). The cells were harvested by centrifugation and resuspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 M NaCl, 0.2 mM EDTA, and 1 mM DTT). The cells were then lysed by being passed through a French press and centrifuged at 35,000 g for 1h at 4°C. The supernatant was then collected and incubated for 1h with glutathione–Sepharose (GSH) resin (GE Healthcare) at 4°C. Following incubation, the resin was collected by centrifugation and extensively washed with lysis buffer and either phosphate-buffered saline (PBS) [10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.4), 125 mM NaCl, and 5 mM DTT] for SUMO1, PML-SIM, PML-SIM-4SD, or TEV buffer [25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4), 140 mM NaCl, and 3 mM KCl] for  $\Delta$ N-SUMO1. The resin bound proteins were incubated 2h with 100 units of either Thrombin (Calbiochem) (SUMO1, PML-SIM, PML-SIM-4SD) or 100 units of TEV protease ( $\Delta$ N-SUMO1), in order to cleave GST tag from proteins. The SUMO1 proteins were then eluted by extensive washes in PBS and dialyzed against Sodium Phosphate buffer (20 mM Sodium Phosphate, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) at an appropriate pH. For further purification, a Q-Sepharose High Performance column (GE Healthcare) was used for the SUMO1 proteins. After elution, the PML peptides were dialyzed against acetic acid 5% and purified over a C<sub>4</sub>-reverse phase HPLC column (Vydac). An additional step on a gel filtration column was done for the SUMO1 proteins. Proteins and peptides were then desalted, sampled, flash frozen and lyophilized and kept at -80°C until being processed for ITC or NMR experiments. <sup>15</sup>N-labeled proteins were prepared as previously described, but the *E. coli* host strain was grown in a M9-minimal media containing <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl (Sigma) as the sole nitrogen source.

### ***In vitro phosphorylation and purification***

To generate the tetra-phosphorylated peptide (PML-SIM-PO<sub>4</sub>- S560, S561, S562 and S565 as phosphoserines), the purified PML-SIM peptide was incubated overnight at room

temperature with CK2 enzyme (New England BioLabs) with the manufacturer's buffer supplemented with an ATP regenerating system composed of creatinine-phosphate and creatinine kinase (Sigma). The phosphorylated PML-SIM-PO<sub>4</sub> was purified over a C<sub>4</sub>-reverse phase HPLC column (Vydac).

### ***Isothermal titration calorimetry experiments***

Prior to the day of ITC experiment, lyophilized proteins were resuspended in ultra pure MilliQ water and dialysed over night at 4°C against Tris buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4). The concentration of proteins was determined from absorbance at a wavelength of 280 nm. ITC measurements of filtered degassed samples were performed at 25°C by using a VP-ITC calorimeter (MicroCal). The ratio of the concentration of the peptides in the syringe over the protein in the sample cell was adjusted to 10. All titrations experiments were done at least in duplicates and were fit to a single binding site interaction with 1:1 stoichiometry. The baseline-corrected data were fit with Origin 7 software.

### ***NMR spectroscopy***

For the NMR chemical shift perturbation experiments the sample consisted in 0.5 mM <sup>15</sup>N-SUMO1 in 20 mM sodium phosphate (pH 6.5) and 90% H<sub>2</sub>O, 10% D<sub>2</sub>O. Unlabeled PML-SIM or PML-SIM-4SD peptides were progressively added to a final ratio of 1:2. NMR experiments were carried out at 300K on either a Varian Unity Inova 500- or 600-MHz spectrometer. The backbone assignment of SUMO1 was obtained from the Biological Magnetic Resonance Data Bank (accession number 6304). The NMR data were processed with NMRPipe/NMRDraw and analyzed with CcpNMR.

### ***Crystallization and data collection***

Lyophilized ΔN-SUMO1 protein was suspended in water at a final concentration of 2 mM. PML-SIM-PO<sub>4</sub> was added to a final ration of 1:1.2. Crystals of the ΔN-SUMO1:PML-SIM-PO<sub>4</sub> complex were obtained by the hanging drop vapor diffusion method using a precipitant solution containing 100 mM cacodylate pH 6.5, 20 % (w/v) PEG3350 and 10 mM CaCl<sub>2</sub>.

Crystals were cryoprotected by increasing the PEG3350 to a final concentration of 26%, mounted in a loop and flashed-cooled in a stream of nitrogen gas at 100K. Diffraction data were collected using a Rayonix MX300 detector at beamline 08-ID at the Canadian Light Source (CLS), indexed and integrated using XDS and scaled with Scala (CCP4).

### ***Structure determination and refinement***

Initial phases were obtained by molecular replacement using the crystal structure of  $\Delta$ N-SUMO1 (PDB: 2UYZ) as a search template. Phases were improved by iterative cycles of model building with Coot and refinement with Phenix. Test data sets were randomly selected from the observed reflections prior to refinement. The figures were prepared with PyMOL.

## RESULTS

### *Phosphorylation of PML increases its non-covalent binding to SUMO proteins in cells.*

Previous studies have shown that PML is phosphorylated on four serine residues (S560, S561, S562 and S565 based on numbering of PML isoform I) in a CK2-dependent manner and replacing these residues with the phosphomimetic aspartic acid enhanced PML binding to SUMO1 in a yeast-two-hybrid assay (Scaglioni, Yung et al. 2006; Stehmeier and Muller 2009). Interestingly, the region encompassing these serine residues and the hydrophobic SIM is highly conserved across different eukaryotes species including most PML isoforms (**Figure 1A and Supplementary Figure 1**). To confirm the importance of PML phosphorylation to SUMO1 binding in cells, we used a Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) assay to measure the interaction between of full length wild-type PML, a non-phosphorylatable mutant (PML-4SA) and a phosphomimetic mutant (PML-4SD) with SUMO1 in human HEK293T cells. In the mutants, the serine residues that correspond to the known CK2-dependent phosphorylation sites of PML were mutated to either alanine (PML-4SA) or aspartic acid (PML-4SD) (**Figure 1B**). HEK293T cells were co-transfected with a fixed quantity of DNA coding for either the full length wild-type PML (PML-Rluc), the non-phosphorylatable mutant (PML-4SA-RLuc) or the phosphomimetic mutant (PML-4SD-Rluc) fused to Renilla luciferase along with increasing amounts of a DNA coding for a non-conjugable version of GFP-SUMO1. For wild-type PML, the BRET ratio increases as a function of GFP-SUMO1 concentration and reaches a maximum when the GFP-SUMO1 expression levels (BRET acceptor) are no longer limiting relative to the PML-Rluc expression levels (BRET donor) (**Figure 1C**). The saturation curve is indicative of a specific non-covalent interaction between PML and SUMO1 under our experimental conditions since the GFP-SUMO1 is a non-conjugable form of SUMO1 where the two C-terminal glycine residues have been mutated to alanine. In contrast, a significantly lower BRET signal is obtained for the interaction between PML-4SA-Rluc and GFP-SUMO1 (**Figure 1C**). This is indicative of a weaker interaction between PML-4SA and SUMO1 and suggests that phosphorylation events targeting the serines of PML modulate the

SUMO1:PML non-covalent interactions in human cells. Next, we measured the interaction between SUMO1 and the phosphomimetic PML mutant (PML-4SD). As expected, a BRET saturation curve similar to the one with wild-type PML is obtained when measuring the interaction between PML-4SD-Rluc and GFP-SUMO1 (**Figure 1C**). This result demonstrates that replacing the alanine residues with the negatively charged aspartic acid fully restores the ability of PML to interact with SUMO1 in HEK293T cells. Moreover, it suggests that the serine residues within the SIM module of wild-type PML are constitutively phosphorylated in a CK2-dependent manner in HEK293T cells under our assay conditions.

It has been proposed that the negative charges associated with acidic or phosphorylated residues following the hydrophobic stretch of the SIM of PML help determine binding specificity to distinct SUMO-family proteins (Chang, Naik et al. 2011). To test this hypothesis, we used the BRET assay to measure the interaction between the full length wild-type PML, the PML-4SA mutant and the PML-4SD mutant with SUMO2 in human HEK293T cells. The wild-type PML-RLuc, the PML-4SD-RLuc and the PML-4SA-RLuc gave BRET saturation curves with GFP-SUMO2 similar to what is observed with GFP-SUMO1 (**Data not shown**). This result demonstrates that as seen with SUMO1 replacing the alanine residues with the negatively charged aspartic acid fully restores the ability of PML to interact with SUMO2 in HEK293T cells.

***Phosphomimetic mutants of the PML SIM display enhanced binding to SUMO1 in vitro.***

Next, we attempted to quantitatively address the role that the phosphorylation status had on the binding of PML to SUMO1 *in vitro*. For these studies, two peptides corresponding to residues 547-573 of PML (Isoform I) were prepared and their apparent dissociation constants ( $K_D$ ) for binding to SUMO1 measured by Isothermal Titration Calorimetry (ITC) (**Figure 2**). These peptides encompass the SIM of PML as well as the four adjacent serine residues that are phosphorylated by CK2 (**Figure 2B**). The first peptide contained the wild-type PML sequence (PML-SIM) and the second peptide corresponded to the phosphomimetic analog (PML-SIM-4SD) with the four-serine residues mutated to

aspartic acid as described above for the BRET assay. In the ITC assay, the PML-SIM peptide binds SUMO1 with  $K_D$  of  $36 \pm 12 \mu\text{M}$  whereas the PML-SIM-4SD peptide binds SUMO1 with a 5-fold higher affinity and a  $K_D$  of  $6.9 \pm 1.1 \mu\text{M}$  (**Figure 2C**). Consistent with what was observed in the cellular BRET studies, the phosphomimetic aspartic acid residues increase the binding affinity of the PML-SIM peptide to SUMO1 in the ITC studies (**Figure 2A and 2C**). Taken together, the BRET and ITC studies strongly support that CK2-dependent phosphorylation of the PML SIM significantly enhances its binding to SUMO1 and suggest that the phosphorylation status of the PML plays an important role in the SUMO1:PML interaction.

***Lysine residues of SUMO1 make specific contacts with the PML-SIM-4SD peptide.***

To address the impact of the PML phosphorylation status on the formation of the PML:SUMO1 complex and identify SUMO1 residues specifically involved in the binding to PML-SIM-4SD, chemical shift perturbation studies were performed using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy. In these studies, the SUMO1 interaction surfaces for both the PML-SIM and the PML-SIM-4SD peptides were mapped on the basis of significant changes in chemical shift.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experiments were conducted using  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 and either the native PML-SIM peptide or the PML-SIM-4SD peptide. As expected, sequential addition of either peptide resulted in significant changes in both the  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shifts for several residues of SUMO1 (**Supplementary Figures 2 and 3**). Superimposition of the final  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra from the two titrations revealed several important differences (**Figure 3A**). These differences indicate that specific chemical shift perturbations are occurring in SUMO1 upon interaction with the PML-SIM-4SD peptide (**Figure 3B**) due to the presence of the four phosphomimetic residues. The most significant differences occur at signals corresponding to residues located primarily in the region of SUMO1 spanning from the end of its second  $\beta$  strand ( $\beta 2$ ) strand to the middle of its  $\alpha$  helix ( $\alpha 1$ ) (**Figure 3B and 3C**). This region contains a number of positively charged residues (K37, K39, K45 and K46) that could enhance binding of the PML-SIM-4SD peptide and K39, H43 and K46 from this region show the most dramatic differences



when comparing the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ - HSQC spectra obtained with the PML-SIM peptide with the PML-SIM-4SD peptide (**Figure 3B**). Consistent with the BRET and ITC studies, the NMR chemical shift perturbation studies demonstrate the potential importance of PML phosphorylation in the binding to SUMO1.

***SUMO1 lysine residues are essential for the SUMO1:PML interaction***

The SUMO1 region spanning from the end of  $\beta 2$  to the start of the  $\alpha 1$  contains two distinct positively charged patches and NMR studies confirmed that residues in these patches undergo dramatic chemical shift changes in the presence of the PML-SIM-4SD peptide. The first positively charged patch of SUMO1 includes K37 and K39 while the second one contains K45 and K46 (**Figure 4A**). To determine the importance of positively charged residues for SUMO1 binding to full-length PML, we generated a series of lysine to alanine mutants within these two positively charged patches of SUMO1 (SUMO1-K37A-K39A, SUMO1-K45A-K46A and SUMO1-K37A-K39A-K45A-K46A) and tested their ability to bind PML in a cellular context using our BRET assay. In comparison to the BRET signal observed between full length wild-type PML-RLuc and GFP-SUMO1 in HEK293T cells, a significant decrease is observed in the BRET signals for the interactions between PML-RLuc and either the GFP-SUMO1-K37A-K39A, GFP-SUMO1-K45A-K46A or GFP-SUMO1-K37A-K39A-K45A-K46A mutant (**Figure 4B**). Interestingly, the decrease in the intensity of the BRET signal is similar for all three basic patch mutants tested and this suggests that the two basic patches function in unison to achieve optimal binding to PML with all four-lysine residues of SUMO1 possibly contributing to the binding either directly or indirectly.

***Structure of the SUMO1:PML-SIM-PO<sub>4</sub> complex.***

In order to gain structural insights on the role that CK2-dependent phosphorylation of PML has on its interactions with SUMO1, we crystallized an N-terminal truncated form of SUMO1 ( $\Delta$ N-SUMO1; residues 17-97 of human SUMO1), in complex with a PML-SIM-PO<sub>4</sub> peptide (S560, S561, S562 and S565 as phosphoserines). The crystals belong to the P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> space group, diffract to 1.40-Å resolution, and contain one  $\Delta$ N-SUMO1:PML-SIM-PO<sub>4</sub> complex in the asymmetric unit. Clear density is visible for residues 19-94 of SUMO1, residues 552-562 of PML (**Figure 5A**) and residues 569-573 of PML (**Supplementary Figure 4**). In the complex, SUMO1 adopts a canonical ubiquitin-like fold while PML expands the SUMO1  $\beta$ -sheet by adopting a parallel  $\beta$ -strand conformation with respect to the second  $\beta$ -strand ( $\beta$ 2) of SUMO1 (**Figure 5B**). This portion of the  $\beta$ -sheet is stabilized by a network of hydrogen bonds between the backbone of PML (residues 555-559), and the backbone of SUMO1 (residues 35-37). In this configuration, the side chains of PML residues V556 and V558 are partially exposed to the solvent, whereas those of residues V557 and I559 are buried within a hydrophobic groove of SUMO1 composed of the first  $\alpha$ 1 helix and  $\beta$ 2. Residues of the SIM motifs are mainly stabilized by hydrophobic contacts provided by the side chains of SUMO1 residues Y21, K23, I34, H35, F36, K37, V38, K46, L47 and R54. In addition, several contacts from residues located outside of the PML SIM are provided by E554 and R555. Notably, the N $\epsilon$  atom of R555 of PML forms a hydrogen bond with the backbone of E33 from SUMO1 while the terminal guanidino group participates in a water-mediated hydrogen bond network with SUMO1. In addition, there are hydrophobic contacts between the aliphatic portion of R555 of PML and I34 of SUMO1.

Three phosphoserine residues (S560, S561 and S562) immediately adjacent to the SIM motif are clearly visible in the electron density maps (**Figure 5A**) and the phosphate moiety of each of the three serine residues is making contacts with SUMO1 residues in the crystal structure (**Figure 5B**). More precisely, the phosphate moiety of S560 is forming hydrogen bonds with K46, the phosphate moiety of S561 forms an electrostatic interaction with K39 and the phosphate moiety of S562 forms hydrogen bonds with H43. A fourth

serine residue (S565) whose phosphorylation is crucial for the subsequent phosphorylation of S562 does not appear to be stabilized by SUMO1 in the crystal structure.

To verify that the phosphates groups of S560, S561 and S562 specifically contribute to stabilization of the serine residues, we obtain crystals of the same SUMO1 construct in complex with the wild-type PML peptide (PML-SIM). These crystals belong to the same  $P2_12_12_1$  space group and diffract to 1.46-Å resolution. In contrast to what is observed in the structure of the complex with PML-SIM-PO<sub>4</sub> where the four phosphoserine residues are clearly visible in the electron density maps, S560 is the only one of the four serine residue visible in the electron density map of the SUMO1: PML-SIM complex (**Figure 5C**). This, in addition to the absence of an interaction between S560 of PML and K46 of SUMO1 (**Figure 5D**), indicates that phosphorylation effectively contributes to the stabilization of the serine residues adjacent to the SIM. Importantly, the positions of the four hydrophobic residues preceding the three serine residues are identical for PML-SIM and for PML-SIM-PO<sub>4</sub>. Globally, the structures are in good agreement with previous reports describing the mode of interaction of the four hydrophobic residues of the SIM motif. Importantly, the specific interactions involving the three phosphoserine residues in the SUMO1: PML-SIM-PO<sub>4</sub> structure are consistent with the idea that PML phosphorylation increases its affinity for SUMO1 and highlights the roles that K39, H43 and K46 of SUMO1 contribute to the interaction interface.

## DISCUSSION

Although the role of covalent attachment of SUMO-family proteins to substrates has been extensively studied, less effort has been dedicated to understanding the biological functions regulated by non-covalent interactions involving SUMO and SIM-containing proteins. Previous studies have suggested that phosphorylation of residues adjacent to the hydrophobic SIM sequences for different proteins is important for their binding to SUMO, but the precise molecular determinants required for these interactions as well as the associated functions are not clearly understood (Stehmeier and Muller 2009; Chang, Naik et al. 2011). Using the PML protein as a model of a SIM-containing protein, we have characterized, at the molecular level, the key determinants in the binding of SUMO1 to the PML phospho-SIM module using a combination of functional, biophysical and structural experiments. We established that the binding of SUMO1 to PML is strongly enhanced by CK2-dependent phosphorylation of serine residues immediately adjacent to the SIM of PML. Consistent with the increased in the binding affinity observed both in vitro with peptide models of the PML SIM and with full-length PML in a cellular context, the crystal structures of the SUMO1:PML-SIM complexes revealed that three phosphorylated serine residues within the PML SIM make specific contacts with a series of basic residues located in two positively charged patches on SUMO1.

Like PML, several other proteins found in PML-NBs contain SIM modules that are adjacent to regions rich in either acidic and/or amino acids that can be phosphorylated in a CK2-dependent manner (Rasheed, Saleem et al. 2002; Lin, Huang et al. 2006; Cho, Lim et al. 2009; Sung, Lee et al. 2011). In previous studies, it was proposed that these negative charges associated with acidic or phosphorylated residues following the hydrophobic stretch of the SIM help determine binding specificity to distinct SUMO-family proteins (Hecker, Rabiller et al. 2006; Chang, Naik et al. 2011). However, our BRET data indicate that PML binds with similar affinity to the various SUMO proteins in cells. In addition, mutants containing alanines that block CK2-dependent phosphorylation of the four key serine residues of PML significantly alters PML binding to both SUMO1 and SUMO2.

These results suggest that phosphorylation of the PML SIM module increases its interaction with both SUMO1 and SUMO2. In addition, our ITC data indicate that SUMO1 displays low affinity for the PML-SIM peptide, in comparison to other previously characterized SUMO1:SIM interactions (Song, Durrin et al. 2004; Sekiyama, Ikegami et al. 2008; Escobar-Cabrera, Okon et al. 2011). However, the affinity of PML for SUMO1 is significantly increased when the four-serine residues are mutated to aspartic acid residues in the PML-SIM-4SD peptide in order to mimic the CK2-dependent phosphorylation that occurs *in vivo*. These results with the PML-SIM-4SD peptide are further supported by our NMR data where we observed more pronounced chemical shift changes for specific signals of SUMO1 residues in comparison with the PML-SIM peptide. These significant chemical shift changes observed with the PML-SIM-4SD peptide occurred in two positively charged patches on SUMO1 and the signals corresponding to K39, H43 and K46 of SUMO1 displayed the most dramatic differences. Interestingly, these *in vitro* studies are consistent with our BRET data in cells and together suggest that positively charged residues of SUMO1 (K37, K39, K45 and K46) play a key role in the SUMO1:PML interaction following phosphorylation. Altogether, these data strongly support that the CK2-dependent phosphorylation of four serine residues, adjacent to the PML SIM sequence, dictate the PML:SUMO binding by generating key interactions with positively charged residues of SUMO.

Although previous studies have indicated that phosphorylation of residues adjacent to the hydrophobic residues in the SIM of several proteins is implicated in the binding to SUMO1, the molecular bases of this interaction have never been clearly defined. Our structural characterization of the SUMO1:PML-SIM-PO<sub>4</sub> complex provides the first atomic level description of the role that phosphorylation plays in the binding of SIM motifs to a SUMO family protein. The PML-SIM-PO<sub>4</sub> peptide makes extensive contacts with SUMO1 in a groove composed of the  $\beta$ 2 strand, the  $\alpha$ 1 helix as well as the connecting loop. Like other SIM-containing peptides, the PML-SIM-PO<sub>4</sub> peptide binds in an extended conformation and contacts the SUMO1  $\beta$ -sheet by forming an additional  $\beta$ -strand in a parallel orientation relative to the  $\beta$ 2 strand. This extended interaction module can be

perceived as two distinct sub-modules, one corresponding to the hydrophobic core (V556-V557-V558-I559) and the other one encompassing the three phosphorylated serine residues (S560<sub>PO4</sub>-S561<sub>PO4</sub>-S562<sub>PO4</sub>). Indeed, the unphosphorylated PML SIM sequence does not display an extended interaction interface with SUMO1. Comparison of our SUMO1:PML-SIM peptide complexes to previously characterized SUMO:SIM containing complexes reveals several similarities and differences between the PML SIM and other canonical SIMs. Indeed, the PML SIM hydrophobic core occupies a position analogous to other canonical SIMs, by contacting hydrophobic residues in the groove of SUMO1 (Reverter and Lima 2005; Song, Zhang et al. 2005; Sekiyama, Ikegami et al. 2008; Olsen, Capili et al. 2010; Armstrong, Mohideen et al. 2012). Moreover, as also observed for the SIMs of PIAS2, DAXX and MCAF1, in complex with SUMO1 and SUMO3 respectively, the PML SIM adopts a parallel orientation with respect to the  $\beta$ 2 strand of SUMO1. In addition, the hydrophobic portion of the SIM sequence is followed immediately by a cluster of serine and/or negatively charged residues which might contribute to their orientation on SUMO through electrostatic interactions (Song, Zhang et al. 2005; Sekiyama, Ikegami et al. 2008; Chang, Naik et al. 2011). Conversely, in the case of RanBP2, the hydrophobic core of the SIM is preceded by an acidic stretch and, consequently, it binds in the opposite orientation and adopts an anti-parallel orientation relative to the  $\beta$ 2 strand of SUMO (Reverter and Lima 2005; Gareau, Reverter et al. 2012). Although the relative position (C-terminal or N-terminal) of the serine/acidic rich sequence might contribute to the orientation of the native PML SIM, the absence of density for these residues suggest that they do not strongly participate in the stabilization of the interaction with SUMO1. This is consistent with the NMR structure of the SUMO1:PIAS2-SIM peptide complex. Indeed, no specific contacts are observed between SUMO1 and the cluster of serine/acidic residues adjacent to the PIAS2 SIM sequence (Song, Zhang et al. 2005). Thus, the extended interaction interface seen in the SUMO1: PML-SIM-PO<sub>4</sub> complex requires the CK2-dependent phosphorylation of three serine residues immediately adjacent to the PML-SIM hydrophobic stretch. Indeed, the SUMO1:PML-SIM-PO<sub>4</sub> structure reveals that phosphorylation of S560, S561 and S562 generates three additional interactions with three distinct residues of SUMO1, respectively

K46, K39 and H43. The structure is consistent with our ITC data where the phosphomimetic version of the PML-SIM displays an increased binding to SUMO1 when compared to the native PML SIM sequence. Interestingly, phosphorylation of a fourth serine residue (S565) in the PML serine/acidic cluster does not appear to make a specific interaction with SUMO1 in the crystal structure since no corresponding density can be observed in the electron density maps. This suggests that phosphorylation of S565 is not implicated for the binding of the PML-SIM to SUMO1 but rather is required for the subsequent phosphorylation of S562 which does contribute to the binding to SUMO1.

Although the biological functions of PML-NBs remain enigmatic, one characteristic shared by a significant proportion of proteins found to reside and/or to transiently interact within these sub-nuclear structures is their capacity to be post-translationally modified by SUMO (Van Damme, Laukens et al. 2010). Compelling evidences indicate that these proteins interact with PML and associate in PML-NBs only after they have been SUMOylated (Goodson, Hong et al. 2001; Weger, Hammer et al. 2003; Dahle, Bakke et al. 2004; Fernandez-Lloris, Osses et al. 2006; Lin, Huang et al. 2006; Janssen, Hofmann et al. 2007; Karvonen, Jaaskelainen et al. 2008). Interestingly, a number of proteins interacting with the PML-NBs also contain phospho-SIM modules similar to the one in PML, including DAXX and the PIAS proteins (Lin, Huang et al. 2006; Stehmeier and Muller 2009; Rabellino, Carter et al. 2012). Moreover, bio-informatic searches have identified potential similar phospho-SIM modules in a number of transcription factors and co-activators that are SUMOylated prior to transiently interacting with the PML-NBs (**Supplementary Figure 1**). This strongly suggests that the homeostasis of the PML-NBs is governed by SUMO-dependent non-covalent binding and that these interactions are regulated by phosphorylation events. Interestingly, it was proposed that PML SIM:SUMO non-covalent interactions were needed for the proper formation of the PML-NBs. Indeed, whereas cells expressing wild-type PML proteins typically present less than 20 spherical-shaped PML-NBs, a small number of large aggregates are observed when the PML SIM is mutated (Shen, Lin et al. 2006). In contrast, cells expressing a PML phosphomimetic mutant (PML-S565D) display low numbers of small PML-NBs (Scaglioni, Yung et al.

2006). These small PML-NBs are consistent with decreased levels of the PML-S565D mutant protein due to enhanced degradation (Scaglioni, Yung et al. 2006). Moreover, this is also consistent with an increase in number and size of the PML-NBs upon different proteasome inhibitor treatments or knock-down of RNF4, a recently characterized SUMO-targeted ubiquitin ligase (Everett, Earnshaw et al. 1999; Bailey and O'Hare 2005; Tatham, Geoffroy et al. 2008). Altogether, this suggests that the phosphorylation status of serine residues adjacent to the PML SIM sequence tightly controls the degradation of the PML protein via a mechanism dependent on a SUMO:SIM interaction. This phospho-SIM dependent protein degradation process might also be applicable to other phospho-SIM containing proteins. Indeed, several proteins found to interact with the PML-NBs also contain similar phospho-SIM modules. Strikingly, most of these phospho-SIM modules contain CK2-consensus sites. Since CK2 is under the control of stress-activated kinases such as p38 MAPK and ERK kinases (Sayed, Kim et al. 2000; Roux and Blenis 2004; Scaglioni, Yung et al. 2006; Scaglioni, Yung et al. 2008), it indicates that cellular stresses are controlling the phospho-SIM dependent interactions in PML-NBs. Indeed, exposure to sub-toxic concentration of cadmium induces the release of DAXX from the PML-NBs and this leads to a decrease in the size of the PML-NBs. Interestingly, pre-treating cells exposed to cadmium with inhibitors of stress-activated kinases prevent the disruption of these PML-NBs components (Nefkens, Negorev et al. 2003). Together, this suggests that stress-activated phosphorylation events are controlling the composition of PML-NBs through regulation of phospho-SIM modules.



## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by a grant from the Canadian Cancer Society (J.G.O) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (M.A.). L.C. is a postdoctoral fellow of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada CREATE program. Research described in this work was carried out in part at the National Synchrotron Light Source, Brookhaven National Laboratory, which is supported by the United States Department of Energy, Division of Materials Sciences and Division of Chemical Sciences under contract DE-AC02-98CH10886 and at the Canadian Light Source (CLS), which is supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the National Research Council Canada, the Canadian Institutes of Health Research, the Province of Saskatchewan, Western Economic Diversification Canada, and the University of Saskatchewan.

**REFERENCES**

Armstrong, A. A., F. Mohideen, et al. (2012). "Recognition of SUMO-modified PCNA requires tandem receptor motifs in Srs2." Nature **483**(7387): 59-63.

Bailey, D. and P. O'Hare (2005). "Comparison of the SUMO1 and ubiquitin conjugation pathways during the inhibition of proteasome activity with evidence of SUMO1 recycling." Biochem J **392**(Pt 2): 271-281.

Bayer, P., A. Arndt, et al. (1998). "Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1." J Mol Biol **280**(2): 275-286.

Bernardi, R. and P. P. Pandolfi (2007). "Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(12): 1006-1016.

Boddy, M. N., K. Howe, et al. (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**(5): 971-982.

Brand, P., T. Lenser, et al. (2010). "Assembly dynamics of PML nuclear bodies in living cells." PMC Biophys **3**(1): 3.

Chang, C. C., M. T. Naik, et al. (2011). "Structural and functional roles of Daxx SIM phosphorylation in SUMO paralog-selective binding and apoptosis modulation." Mol Cell **42**(1): 62-74.

Chen, A., H. Mannen, et al. (1998). "Characterization of mouse ubiquitin-like SMT3A and SMT3B cDNAs and gene/pseudogenes." Biochem Mol Biol Int **46**(6): 1161-1174.

Chen, Y. C., C. Kappel, et al. (2008). "Live cell dynamics of promyelocytic leukemia nuclear bodies upon entry into and exit from mitosis." Mol Biol Cell **19**(7): 3147-3162.

Cho, G., Y. Lim, et al. (2009). "SUMO interaction motifs in Sizn1 are required for promyelocytic leukemia protein nuclear body localization and for transcriptional activation." J Biol Chem **284**(29): 19592-19600.

- Condemine, W., Y. Takahashi, et al. (2006). "Characterization of endogenous human promyelocytic leukemia isoforms." Cancer Res **66**(12): 6192-6198.
- Dahle, O., O. Bakke, et al. (2004). "c-Myb associates with PML in nuclear bodies in hematopoietic cells." Exp Cell Res **297**(1): 118-126.
- Daniel, M. T., M. Koken, et al. (1993). "PML protein expression in hematopoietic and acute promyelocytic leukemia cells." Blood **82**(6): 1858-1867.
- Danielsen, J. R., L. K. Povlsen, et al. (2012). "DNA damage-inducible SUMOylation of HERC2 promotes RNF8 binding via a novel SUMO-binding Zinc finger." J Cell Biol **197**(2): 179-187.
- de The, H., C. Chomienne, et al. (1990). "The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus." Nature **347**(6293): 558-561.
- Dellaire, G. and D. P. Bazett-Jones (2007). "Beyond repair foci: subnuclear domains and the cellular response to DNA damage." Cell Cycle **6**(15): 1864-1872.
- Dellaire, G., R. W. Ching, et al. (2006). "Promyelocytic leukemia nuclear bodies behave as DNA damage sensors whose response to DNA double-strand breaks is regulated by NBS1 and the kinases ATM, Chk2, and ATR." J Cell Biol **175**(1): 55-66.
- Desterro, J. M., M. S. Rodriguez, et al. (1999). "Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1." J Biol Chem **274**(15): 10618-10624.
- Desterro, J. M., J. Thomson, et al. (1997). "Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin." FEBS Lett **417**(3): 297-300.
- Dyck, J. A., G. G. Maul, et al. (1994). "A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein." Cell **76**(2): 333-343.

Escobar-Cabrera, E., M. Okon, et al. (2011). "Characterizing the N- and C-terminal Small ubiquitin-like modifier (SUMO)-interacting motifs of the scaffold protein DAXX." J Biol Chem **286**(22): 19816-19829.

Eskiw, C. H., G. Dellaire, et al. (2003). "Size, position and dynamic behavior of PML nuclear bodies following cell stress as a paradigm for supramolecular trafficking and assembly." J Cell Sci **116**(Pt 21): 4455-4466.

Everett, R. D. and M. K. Chelbi-Alix (2007). "PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence." Biochimie **89**(6-7): 819-830.

Everett, R. D., W. C. Earnshaw, et al. (1999). "A dynamic connection between centromeres and ND10 proteins." J Cell Sci **112** ( Pt 20): 3443-3454.

Everett, R. D., P. Lomonte, et al. (1999). "Cell cycle regulation of PML modification and ND10 composition." J Cell Sci **112** ( Pt 24): 4581-4588.

Ferbeyre, G., E. de Stanchina, et al. (2000). "PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence." Genes Dev **14**(16): 2015-2027.

Fernandez-Lloris, R., N. Osses, et al. (2006). "Repression of SOX6 transcriptional activity by SUMO modification." FEBS Lett **580**(5): 1215-1221.

Fogal, V., M. Gostissa, et al. (2000). "Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform." EMBO J **19**(22): 6185-6195.

Gareau, J. R., D. Reverter, et al. (2012). "Determinants of small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO1) protein specificity, E3 ligase, and SUMO-RanGAP1 binding activities of nucleoporin RanBP2." J Biol Chem **287**(7): 4740-4751.

Geoffroy, M. C. and M. K. Chelbi-Alix (2011). "Role of promyelocytic leukemia protein in host antiviral defense." J Interferon Cytokine Res **31**(1): 145-158.

Germain-Desprez, D., M. Bazinet, et al. (2003). "Oligomerization of transcriptional intermediary factor 1 regulators and interaction with ZNF74 nuclear matrix protein

revealed by bioluminescence resonance energy transfer in living cells." J Biol Chem **278**(25): 22367-22373.

Goodson, M. L., Y. Hong, et al. (2001). "Sumo-1 modification regulates the DNA binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor." J Biol Chem **276**(21): 18513-18518.

Gurrieri, C., P. Capodici, et al. (2004). "Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins." J Natl Cancer Inst **96**(4): 269-279.

Hecker, C. M., M. Rabiller, et al. (2006). "Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs." J Biol Chem **281**(23): 16117-16127.

Husnjak, K. and I. Dikic (2012). "Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions." Annu Rev Biochem **81**: 291-322.

Ishov, A. M., A. G. Sotnikov, et al. (1999). "PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1." J Cell Biol **147**(2): 221-234.

Janssen, K., T. G. Hofmann, et al. (2007). "Apoptin is modified by SUMO conjugation and targeted to promyelocytic leukemia protein nuclear bodies." Oncogene **26**(11): 1557-1566.

Jeanne, M., V. Lallemand-Breitenbach, et al. (2010). "PML/RARA oxidation and arsenic binding initiate the antileukemia response of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>." Cancer Cell **18**(1): 88-98.

Jensen, K., C. Shiels, et al. (2001). "PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif." Oncogene **20**(49): 7223-7233.

Kagey, M. H., T. A. Melhuish, et al. (2003). "The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3." Cell **113**(1): 127-137.

Kahyo, T., T. Nishida, et al. (2001). "Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53." Mol Cell **8**(3): 713-718.

- Kakizuka, A., W. H. Miller, Jr., et al. (1991). "Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML." Cell **66**(4): 663-674.
- Karvonen, U., T. Jaaskelainen, et al. (2008). "ZNF451 is a novel PML body- and SUMO-associated transcriptional coregulator." J Mol Biol **382**(3): 585-600.
- Koken, M. H., G. Linares-Cruz, et al. (1995). "The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis." Oncogene **10**(7): 1315-1324.
- Kotaja, N., U. Karvonen, et al. (2002). "PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases." Mol Cell Biol **22**(14): 5222-5234.
- Lallemant-Breitenbach, V., J. Zhu, et al. (2001). "Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation." J Exp Med **193**(12): 1361-1371.
- Lang, M., T. Jegou, et al. (2010). "Three-dimensional organization of promyelocytic leukemia nuclear bodies." J Cell Sci **123**(Pt 3): 392-400.
- Lin, D. Y., Y. S. Huang, et al. (2006). "Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors." Mol Cell **24**(3): 341-354.
- Masclé, X. H., D. Germain-Desprez, et al. (2007). "Sumoylation of the transcriptional intermediary factor 1beta (TIF1beta), the Co-repressor of the KRAB Multifinger proteins, is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain." J Biol Chem **282**(14): 10190-10202.
- Melnick, A. and J. D. Licht (1999). "Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia." Blood **93**(10): 3167-3215.
- Mercier, J. F., A. Salahpour, et al. (2002). "Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer." J Biol Chem **277**(47): 44925-44931.

- Merrill, J. C., T. A. Melhuish, et al. (2010). "A role for non-covalent SUMO interaction motifs in Pc2/CBX4 E3 activity." PLoS One **5**(1): e8794.
- Muller, S., M. J. Matunis, et al. (1998). "Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus." EMBO J **17**(1): 61-70.
- Nefkens, I., D. G. Negorev, et al. (2003). "Heat shock and Cd<sup>2+</sup> exposure regulate PML and Daxx release from ND10 by independent mechanisms that modify the induction of heat-shock proteins 70 and 25 differently." J Cell Sci **116**(Pt 3): 513-524.
- Nguyen, L. A., P. P. Pandolfi, et al. (2005). "Physical and functional link of the leukemia-associated factors AML1 and PML." Blood **105**(1): 292-300.
- Olsen, S. K., A. D. Capili, et al. (2010). "Active site remodelling accompanies thioester bond formation in the SUMO E1." Nature **463**(7283): 906-912.
- P, O. c., V. Rusch, et al. (2004). "Casein kinase II alpha subunit and C1-inhibitor are independent predictors of outcome in patients with squamous cell carcinoma of the lung." Clin Cancer Res **10**(17): 5792-5803.
- Pandolfi, P. P., F. Grignani, et al. (1991). "Structure and origin of the acute promyelocytic leukemia myl/RAR alpha cDNA and characterization of its retinoid-binding and transactivation properties." Oncogene **6**(7): 1285-1292.
- Percherancier, Y., D. Germain-Desprez, et al. (2009). "Role of SUMO in RNF4-mediated promyelocytic leukemia protein (PML) degradation: sumoylation of PML and phospho-switch control of its SUMO binding domain dissected in living cells." J Biol Chem **284**(24): 16595-16608.
- Pichler, A., A. Gast, et al. (2002). "The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity." Cell **108**(1): 109-120.
- Quignon, F., F. De Bels, et al. (1998). "PML induces a novel caspase-independent death process." Nat Genet **20**(3): 259-265.

- Rabellino, A., B. Carter, et al. (2012). "The SUMO E3-ligase PIAS1 regulates the tumor suppressor PML and its oncogenic counterpart PML-RARA." Cancer Res **72**(9): 2275-2284.
- Rasheed, Z. A., A. Saleem, et al. (2002). "The topoisomerase I-binding RING protein, topors, is associated with promyelocytic leukemia nuclear bodies." Exp Cell Res **277**(2): 152-160.
- Reverter, D. and C. D. Lima (2005). "Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex." Nature **435**(7042): 687-692.
- Roux, P. P. and J. Blenis (2004). "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." Microbiol Mol Biol Rev **68**(2): 320-344.
- Rowley, J. D., H. M. Golomb, et al. (1977). "15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia." Lancet **1**(8010): 549-550.
- Salomoni, P., R. Bernardi, et al. (2005). "The promyelocytic leukemia protein PML regulates c-Jun function in response to DNA damage." Blood **105**(9): 3686-3690.
- Salomoni, P., M. Dvorkina, et al. (2012). "Role of the promyelocytic leukaemia protein in cell death regulation." Cell Death Dis **3**: e247.
- Sayed, M., S. O. Kim, et al. (2000). "Stress-induced activation of protein kinase CK2 by direct interaction with p38 mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem **275**(22): 16569-16573.
- Scaglioni, P. P., T. M. Yung, et al. (2006). "A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor." Cell **126**(2): 269-283.
- Scaglioni, P. P., T. M. Yung, et al. (2008). "CK2 mediates phosphorylation and ubiquitin-mediated degradation of the PML tumor suppressor." Mol Cell Biochem **316**(1-2): 149-154.



- Sekiyama, N., T. Ikegami, et al. (2008). "Structure of the small ubiquitin-like modifier (SUMO)-interacting motif of MBD1-containing chromatin-associated factor 1 bound to SUMO-3." J Biol Chem **283**(51): 35966-35975.
- Shen, T. H., H. K. Lin, et al. (2006). "The mechanisms of PML-nuclear body formation." Mol Cell **24**(3): 331-339.
- Soignet, S. L., P. Maslak, et al. (1998). "Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide." N Engl J Med **339**(19): 1341-1348.
- Song, J., L. K. Durrin, et al. (2004). "Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(40): 14373-14378.
- Song, J., Z. Zhang, et al. (2005). "Small ubiquitin-like modifier (SUMO) recognition of a SUMO binding motif: a reversal of the bound orientation." J Biol Chem **280**(48): 40122-40129.
- Stehmeier, P. and S. Muller (2009). "Phospho-regulated SUMO interaction modules connect the SUMO system to CK2 signaling." Mol Cell **33**(3): 400-409.
- Sung, K. S., Y. A. Lee, et al. (2011). "Role of the SUMO-interacting motif in HIPK2 targeting to the PML nuclear bodies and regulation of p53." Exp Cell Res **317**(7): 1060-1070.
- Tatham, M. H., M. C. Geoffroy, et al. (2008). "RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation." Nat Cell Biol **10**(5): 538-546.
- Van Damme, E., K. Laukens, et al. (2010). "A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics." Int J Biol Sci **6**(1): 51-67.
- Vernier, M., V. Bourdeau, et al. (2011). "Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies." Genes Dev **25**(1): 41-50.

Wang, Z. G., R. Rivi, et al. (1998). "Arsenic trioxide and melarsoprol induce programmed cell death in myeloid leukemia cell lines and function in a PML and PML-RARalpha independent manner." Blood **92**(5): 1497-1504.

Wang, Z. G., D. Ruggero, et al. (1998). "PML is essential for multiple apoptotic pathways." Nat Genet **20**(3): 266-272.

Weger, S., E. Hammer, et al. (2003). "The DNA topoisomerase I binding protein topors as a novel cellular target for SUMO-1 modification: characterization of domains necessary for subcellular localization and sumolation." Exp Cell Res **290**(1): 13-27.

Weger, S., E. Hammer, et al. (2005). "Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo." FEBS Lett **579**(22): 5007-5012.

Weidtkamp-Peters, S., T. Lenser, et al. (2008). "Dynamics of component exchange at PML nuclear bodies." J Cell Sci **121**(Pt 16): 2731-2743.

Weis, K., S. Rambaud, et al. (1994). "Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells." Cell **76**(2): 345-356.

Zhang, P., W. Chin, et al. (2000). "Lack of expression for the suppressor PML in human small cell lung carcinoma." Int J Cancer **85**(5): 599-605.

Zhong, S., P. Salomoni, et al. (2000). "The transcriptional role of PML and the nuclear body." Nat Cell Biol **2**(5): E85-90.

Zhong, S., P. Salomoni, et al. (2000). "Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis." J Exp Med **191**(4): 631-640.

Zhu, J., M. Gianni, et al. (1999). "Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and oncogenic RARalpha fusion proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 14807-14812.

Zhu, J., M. H. Koken, et al. (1997). "Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3978-3983.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1: Phosphorylation of the PML SIM enhances the interaction with SUMO1 in HEK293T cells.**

(A) Schematic representation of domains in the full-length PML protein (isoform 1 of human PML) and sequence alignment of the highly conserved phospho-SIM region. The domains and regions represented as boxes include the RING (Really Interesting New Gene) domain (light grey), the B1 and B2 B-boxes domains (medium grey), the coiled-coil domain (CC, dark grey) and the phospho-SIM (SUMO Interacting Motif) module (black). The alignment of the PML phospho-SIM region includes sequences from different eukaryotic species. (§) indicates CK2-targeted serine residues, (★) indicates identical residues in the aligned sequences and (.) indicates homologous residues. (B) Amino-acid sequence of phospho-SIM mutants used in BRET studies. The residues that were mutated in the context of the full-length PML protein for the BRET studies are in italics and underlined. (C) BRET titration curves, of a representative experiment, showing interaction between SUMO1 and either wild-type PML or mutants in HEK293T cells. The BRET pairs tested were PML-RLuc (■), PML-4SD-Rluc (△) and PML-4SA-Rluc (▽) used in a fixed amount with increasing amounts of GFP-SUMO1.

### **Figure 2: Phosphomimetic substitutions in the PML SIM enhance PML interaction with SUMO1 *in vitro*.**

(A) Representative ITC thermogram for the interaction between SUMO1 and the PML-SIM-4SD peptide. (B) Amino-acid sequences of the PML-SIM and the PML-SIM-4SD peptides used in the ITC studies. The phosphomimetic substitutions are in italics and underlined. (C) Comparison of the dissociation constant ( $K_D$ ) values for SUMO1 binding to the PML-SIM and PML-SIM-4SD peptides in the ITC studies.

### **Figure 3: Lysine residues in SUMO1 basic patches are specifically involved in the interaction with the PML-SIM-4SD *in vitro*.**

(A) Overlay from the 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 in the presence 2 molar equivalents of either the unlabeled PML-SIM or PML-SIM-4SD peptide. (B) Histogram of the differences in chemical shift changes that occur in the titration between  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 and the PML-SIM-4SD peptide with those obtained in the titration between  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 and the PML-SIM peptide. The differences chemical shift changes for the two individual titrations were calculated using the formula  $\Delta\delta = [((0.17\Delta N_{\text{H}})^2 + (\Delta H_{\text{N}})^2)^{1/2}]$  and the values obtained with the PML-SIM peptide were subtracted from the ones obtained with the PML-SIM-4SD peptide. The differences are reported in parts per million. (C) Ribbon model of the 3D structure of SUMO1 (light grey; PDB: 2UYZ). The amino acids of  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 showing a significant chemical shift change [ $\Delta\delta$  (ppm)  $> 0.15$ ;  $\Delta\delta = [((0.17\Delta N_{\text{H}})^2 + (\Delta H_{\text{N}})^2)^{1/2}]$ ] upon formation of a complex with PML-SIM-4SD are highlighted in green.

**Figure 4: SUMO1 lysine residues are critical for the PML:SUMO1 interaction in HEK293T cells.**

(A) Ribbon model of the 3D structure of SUMO1 (light grey; PDB: 2UYZ) with the lysine residues from the two basic patches showing significant chemical shift changes in the NMR titration ( $\Delta\delta$  (ppm)  $> 0.15$ ) highlighted as sticks. (B) Representative BRET titration curves showing interaction between PML and either wild type SUMO1 or the SUMO1 basic patch mutants in HEK293T cells. The BRET pairs were tested with a fixed amount of wild type PML-RLuc and increasing amounts of GFP-SUMO1 (■), PML-RLuc:GFP-SUMO1 K37A-K39A (○), PML-RLuc:GFP-SUMO1-K45A-K46A (+) or PML-RLuc:GFP-SUMO1-4KA (SUMO1-K37A-K39A-K45A-K46A) (\*).

**Figure 5: Crystal structure of the SUMO1:PML-SIM-PO<sub>4</sub> and SUMO1:PML-SIM complexes.**

(A) Electron density map corresponding to PML-SIM-PO<sub>4</sub> peptide residues 552 to 562. The peptide is in stick representation with carbon atoms colored in yellow. The  $2F_oF_c$  electron density map, contoured at  $1.2\sigma$  is represented by a grey mesh. (B) Overall structure of the

$\Delta$ N-SUMO1:PML-SIM-PO<sub>4</sub> complex highlighting the interactions between SUMO1 and PML residues 552 to 562. The proteins are in cartoon representation with SUMO1 carbon atoms colored in grey and PML-SIM-PO<sub>4</sub> carbon atoms colored in yellow. SUMO1 residues interacting with PML-SIM-PO<sub>4</sub> are in stick representation. **(C)** Electron density map corresponding to PML-SIM residues 552 to 560 and using the same representation mode as in **(A)** with PML carbon atoms colored in green. **(D)** Overall structure of the SUMO1:PML-SIM complex highlighting the interactions between SUMO1 and PML residues 552 to 560. The presentation is similar as in **(C)** with PML carbon atoms colored in green.

## FIGURES

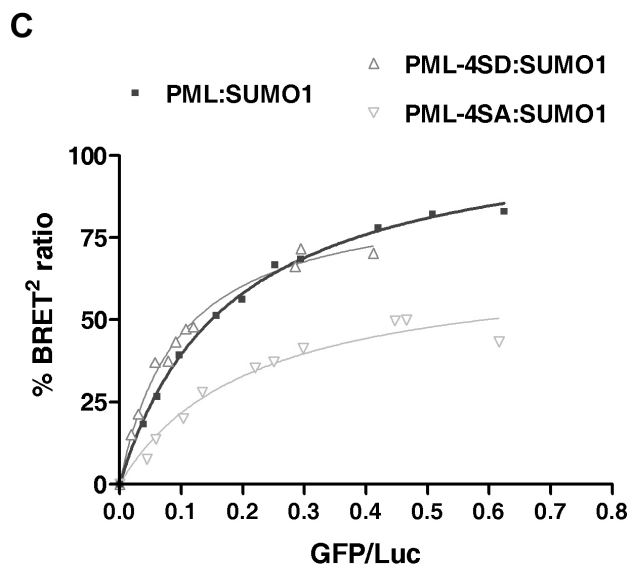
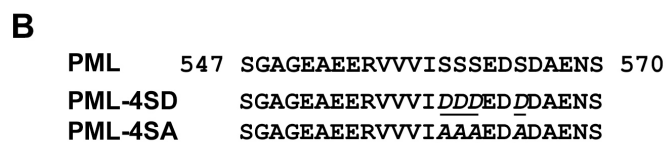
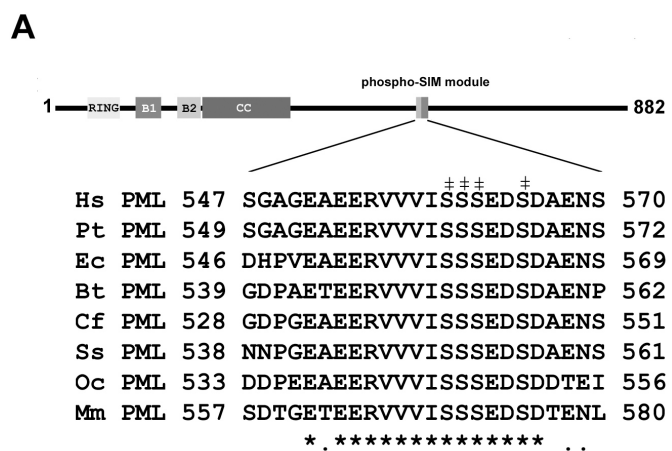


Figure 1

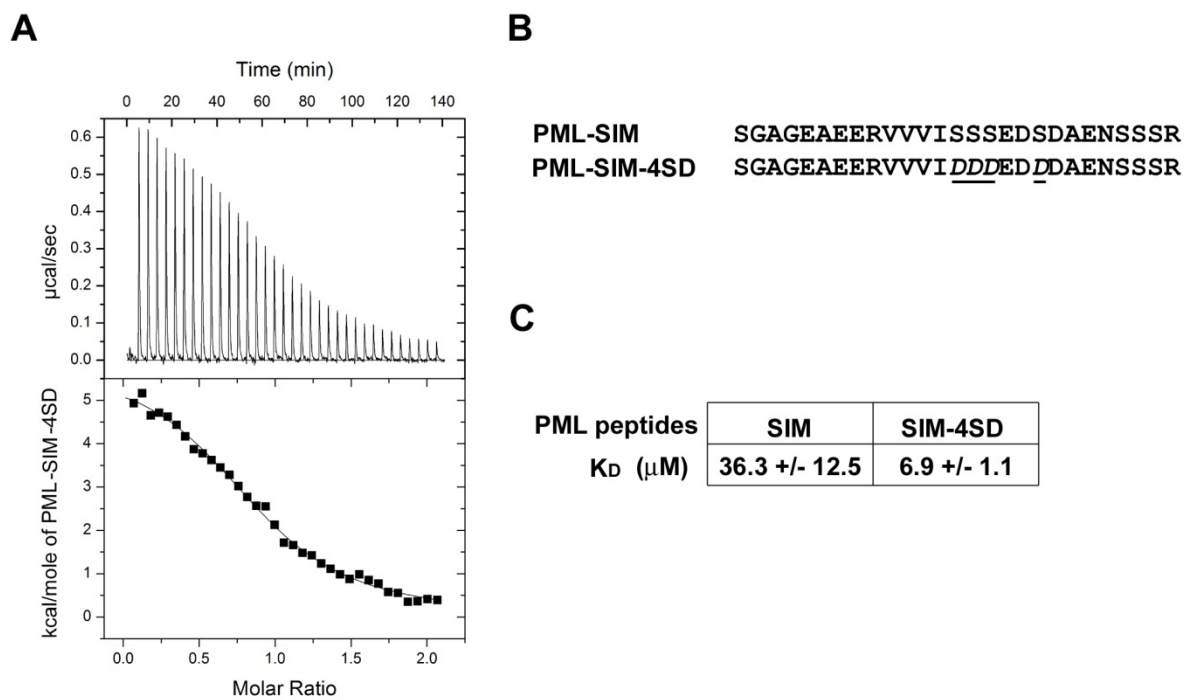


Figure 2

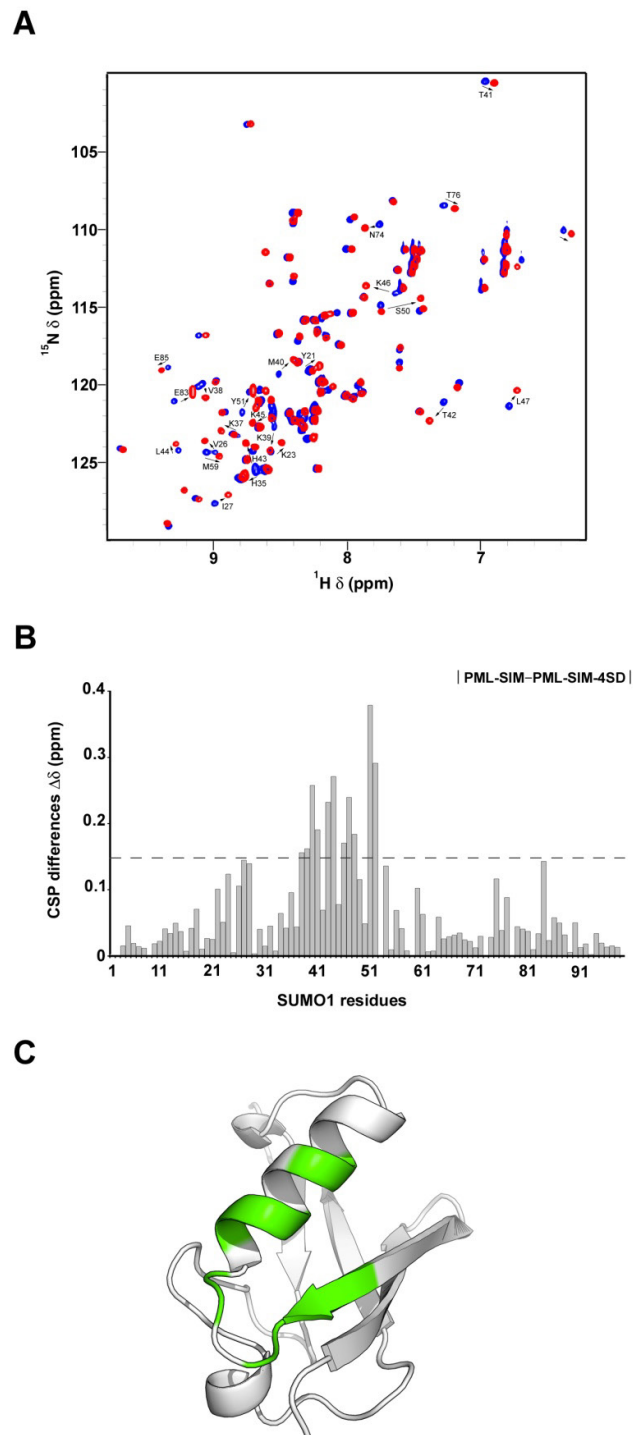
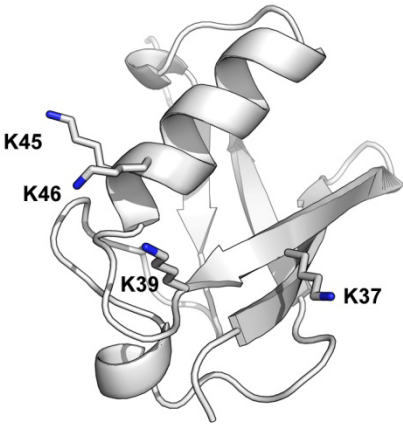


Figure 3



A



B

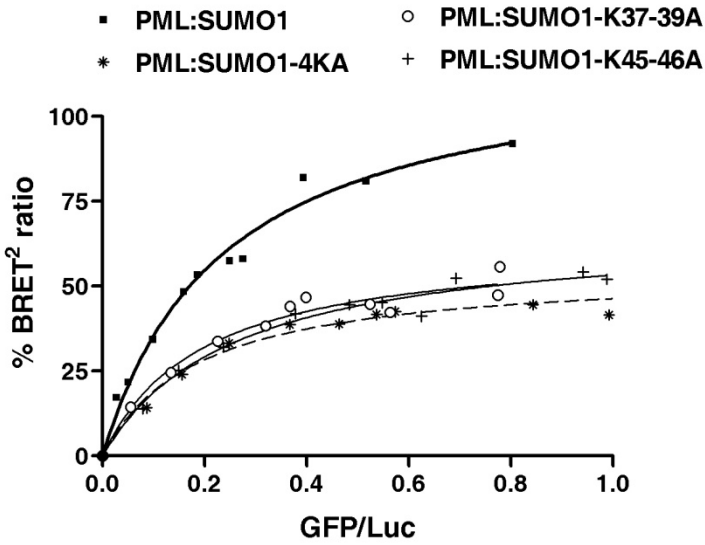


Figure 4

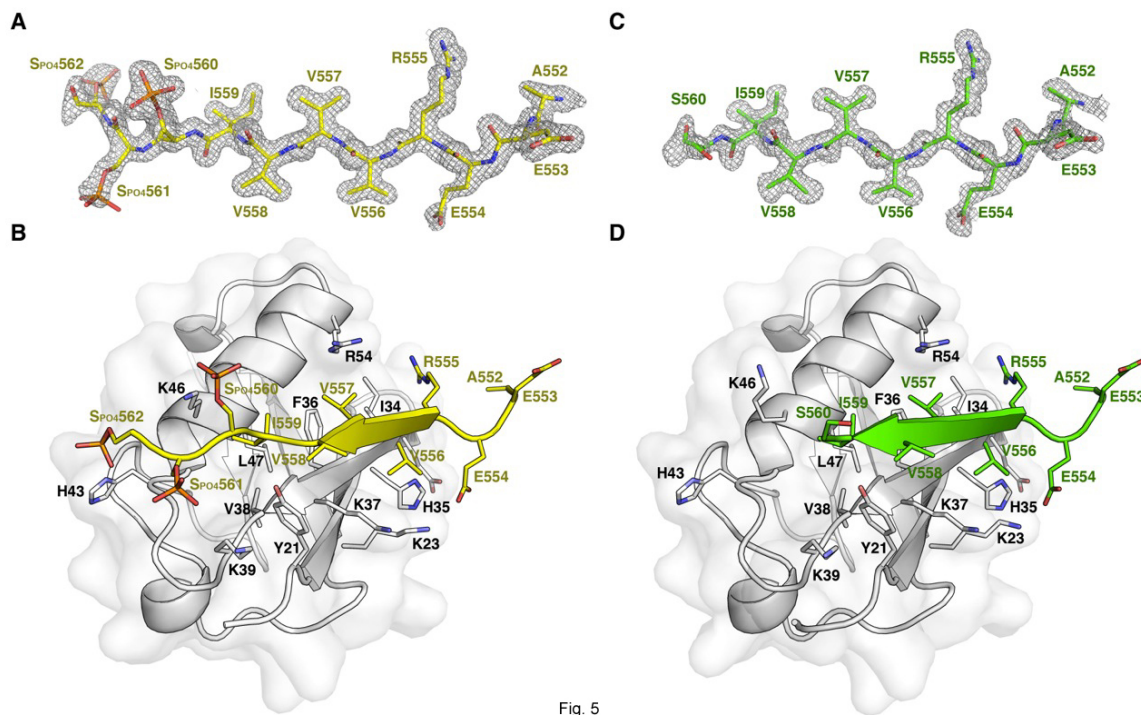


Fig. 5

Figure 5

## SUPPLEMENTARY FIGURES AND LEGENDS

## A

PML-I to -V and PML-IIG  
 551 EAEERVVVISSESDAE 558

PML-IA, PML-IIA and PML-IVA  
 503 EAEERVVVISSESDAE 520

## B

PML	551	EAEERVVVISSESDAE	568
DAXX	2	ATANSIIVLDDDEDEAA	19
DAXX	728	CDPEEIIVLSDS*	740
SP100	318	NQASDIIVISSESEGST	335
HIPK1	900	SPPVSVITIRSDTDEEED	917
HIPK2	881	SPTVSVITISSDTDEEEE	889
HIPK3	864	SPAVSVITISSDTDEEET	881
RNF4	41	TAGDEIVDITCESLEPVV	58
RNF4	53	SLEPVVDLTHNDSVVIV	70
RNF4	62	THNDSVVVDERRRPRRN	89
BLM	212	SSESEQIDITEEQKDDSE	229
BLM	230	WLSSDVICIDDGPIAEVH	247
PIAS1	454	NKKVEVIDLTIDSSSDEE	471
PIAS4	460	KPGADVVDLTLSSSSSE	477
TOPORS	902	SRSPVITIDSDSDKDSE	919
SIZ1N	258	SACNVIEIDDTLDDSE	275
SIZ1N	272	DSDEDVILVESQDPPLPS	289
TTRAP	275	GLPNNIVDVWEFLGKPKH	292
FLASH	1732	DTVGAFFIDLTQDASSEAK	1749

## C

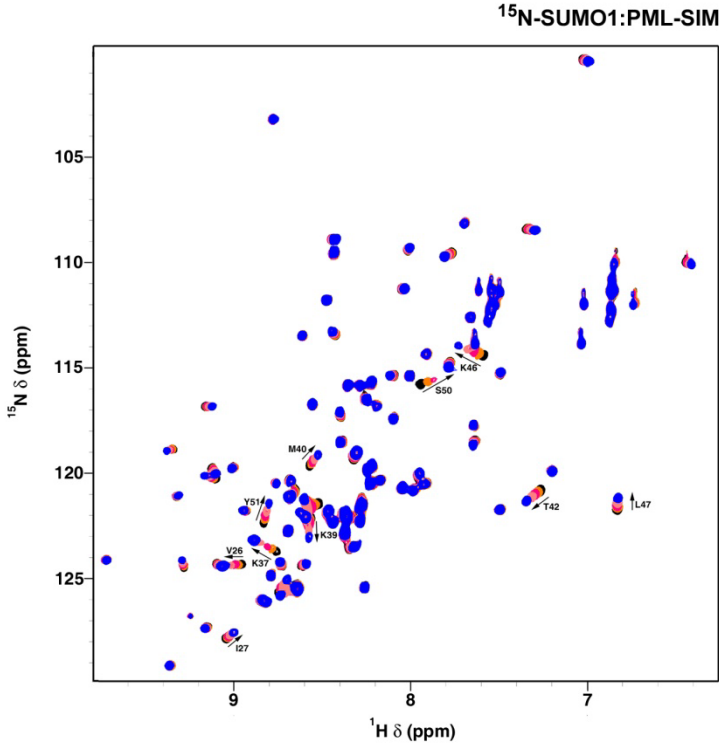
SIM consensus: YΨxΨ

c-MYB	264	ALHVNIVNVPQAAAAIQ	281
GATA2	365	PSTPTINVLESKDTDSR	382
HSF2	279	SQYPDIVIEDDNEDEYAP	297
ELF4	292	EMPKDLVVIEDEDESSEA	309
E2F1	28	LDSSQIVIISAAQDASAP	45
NFAT	652	KPNSLVVEIPFRNQRIT	669
PLZF	32	TLCDVVMVDSQEFHAHR	49
RB	747	EEYDSIIVFYNSVFMQRL	764
RB	827	PRSRILVSI GESFGTSEK	844
TRIM24	709	THKVPVVMLEPIRIKQEN	726
TRIM24	732	NYDFPVVIVKQESDEESR	749
ZNF198	55	RDDDDVVFIEPVQPPPS	72
ZNF451	40	RPVLEYIDLVSDDDEEPS	57

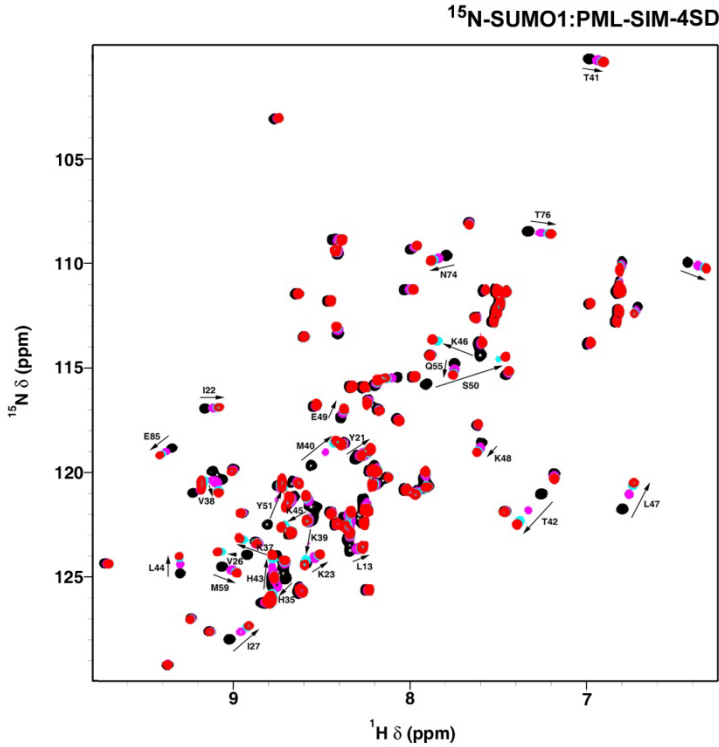
**Supplemental Figure 1: Characterized and potential phospho-SIM module in several proteins known to reside and/or to transiently interact with the PML-NBs.**

(A) Amino acid numbering of the phospho-SIM module according to the different PML isoforms. (B) Characterized SIM and phospho-SIM modules of proteins known to reside and/or to interact in the PML-NBs. (C) Potential SIM and phospho-SIM modules of known SUMOylated transcriptional regulators transiently interacting with the PML-NBs.

A

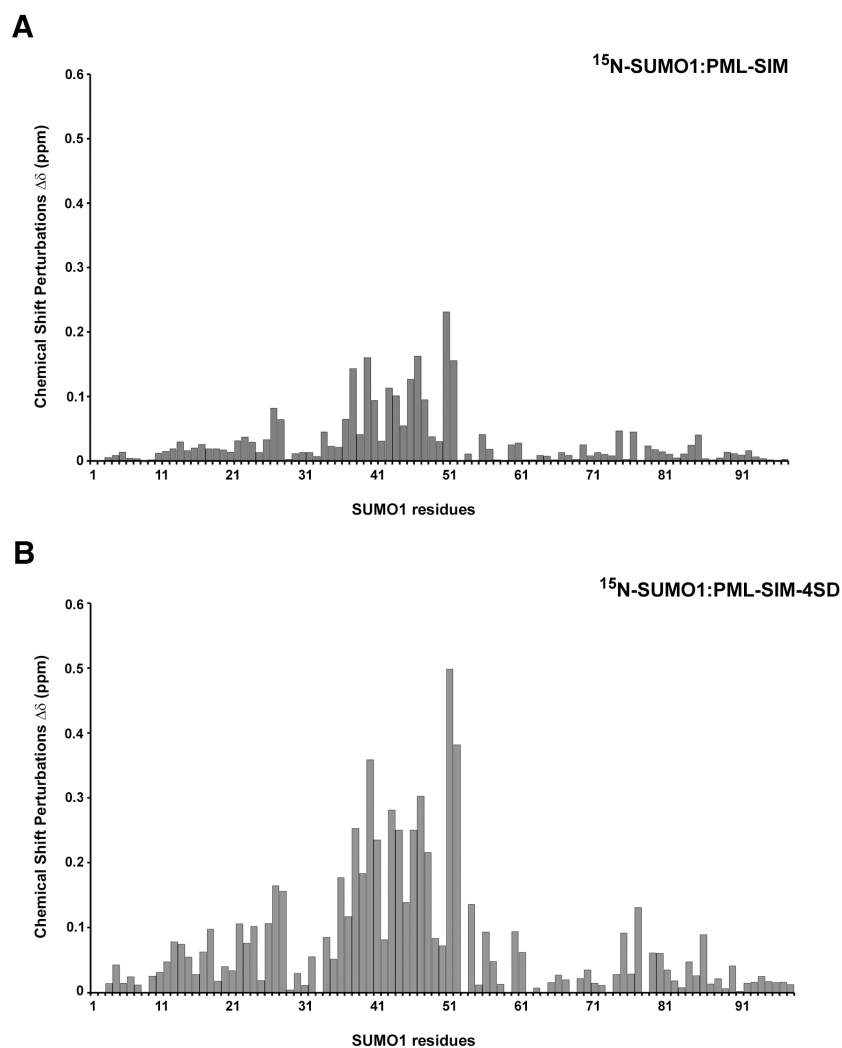


B



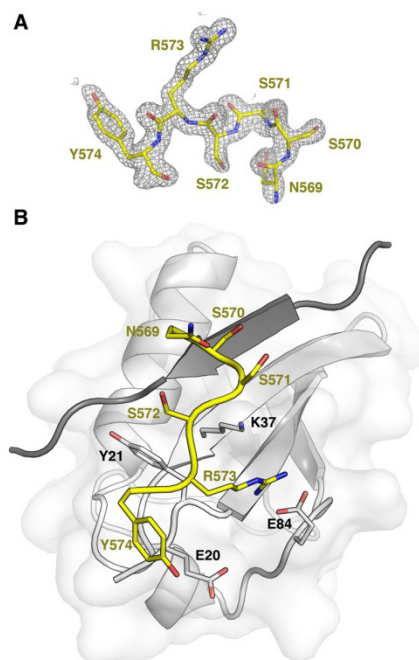
**Supplemental Figure 2: Mapping of the PML-SIM and PML-4SD binding sites on SUMO1**

(A) Overlay of 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 (0.5 mM) in the free form (black) and in the presence of increasing concentration (up to 1 mM; blue) of unlabeled PML-SIM peptide. (B) Overlay of 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -labeled SUMO1 (0.5 mM) in the free form (black) and in the presence of increasing concentration (up to 1 mM; red) of unlabeled PML-SIM-4SD peptide.



**Supplemental Figure 3: Identification of the PML-SIM and PML-4SD binding sites on SUMO1**

(A) Histogram of the variation in chemical shifts [ $\Delta\delta$  (ppm)] observed in the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -SUMO1 upon the formation of the SUMO1:PML-SIM complex. The chemical shifts were calculated with the formula  $\Delta\delta = [(0.17\Delta N_{\text{H}})^2 + (\Delta N_{\text{N}})^2]^{1/2}$  and are given in parts per million. (B) Histogram of the variation in chemical shifts [ $\Delta\delta$  (ppm)] observed in the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -SUMO1 upon the formation of the SUMO1:PML-SIM-4SD complex. The chemical shifts were calculated with the formula  $\Delta\delta = [(0.17\Delta N_{\text{H}})^2 + (\Delta N_{\text{N}})^2]^{1/2}$  and are given in parts per million.

**Supplemental Figure 4:**

(A) Electron density map corresponding to PML-SIM-PO<sub>4</sub> residues 559 to 574. The peptide is in stick representation with carbon atoms colored in yellow. The 2F<sub>o</sub>F<sub>c</sub> electron density map, contoured at 1.2σ, is represented by a grey mesh. (B) Overall structure of the ΔN-SUMO1:PML-SIM-PO<sub>4</sub> complex highlighting the interactions between SUMO1 and PML residues 559 to 574. The proteins are in cartoon representation with SUMO1 carbon atoms colored in grey and PML residues 559 to 574 carbon atoms colored in yellow. SUMO1 residues interacting with PML-SIM-PO<sub>4</sub> residues 559 to 574 are in stick representation. PML-SIM-PO<sub>4</sub> residues 552 to 562 are colored in dark gray.



**Table 1.** Data collection and refinement statistics

<b>Data set</b>	<b>SUMO1:PML-SIM-WT</b>	<b>SUMO1:PML-SIM-PO<sub>4</sub></b>
<b>Data Collection</b>		
Beamline	X29, NSLS	08-ID, CLS
Wavelength (Å)	1.075 Å	0.9794 Å
Space group	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Unit-cell parameter (Å)	a=38.39, b=47.25, c=63.91	a=38.27, b=47.08, c=63.99
Resolution (Å)	50-1.46 (1.54-1.46)	50-1.40 (1.48-1.40)
No. of unique reflections	20770	20730
Multiplicity	6.8 (5.6)	9.3 (4.3)
Completeness (%)	99.2 (95.4)	89.4 (51.4)
R <sub>merge</sub>	0.092 (0.597)	0.115 (1.422)
I/σ(I)	11.6 (2.7)	10.3 (0.9)
<b>Refinement Statistics</b>		
Resolution (Å)	50-1.46	50-1.40
Reflections (total/test)	20720/1037	20674 /1034
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub> (%)	18.27/20.24	19.46/21.92
Number of atoms (excluding hydrogens)		
Protein	753	766
Water	146	139
B-factors		
Protein	24.9	24.7
Water	36.8	35.5
RMSDs		
Bond lengths (Å)	0.007	0.006
Bond angles (°)	1.192	1.131
Ramachandran		
Favored (%)	100.0	100.0
Outliers (%)	0	0

Values in parentheses are for highest-resolution shell.  $R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl,i} - \bar{I}_{hkl}|}{\sum_{hkl,i} I_{hkl,i}}$ , where  $I_{hkl,i}$  is the intensity of an individual measurement of the reflection with Miller indices  $hkl$  and  $\bar{I}_{hkl}$  is the mean intensity of that reflection.  $R_{\text{work}} = \frac{\sum_{hkl} |F_o| - |F_c|}{\sum_{hkl} |F_o|}$ , where  $|F_o|$  is the observed structure-factor amplitude and  $|F_c|$  is the calculated structure-factor amplitude.  $R_{\text{free}}$  is the R factor based on at least 500 test reflections that were excluded from the refinement.

<sup>a</sup> Reflections with  $F_o > 0$ .

<sup>b</sup> MolProbity analysis.

### III. DISCUSSION

Le sujet principal de cette thèse fût l'étude d'un mode de régulation des protéines: la modification chimique des protéines par SUMO, une MPT de la famille des Ublps. Notre but a été de cerner les impacts fonctionnels et structuraux ainsi que la régulation que peuvent engendrer la liaison covalente ou non-covalente de SUMO sur trois protéines d'échafaudage à domaine RING. TIF1 $\beta$ /TRIM28, PIAS1 et PML/TRIM19. Ces études se sont appuyées sur l'analyse de nombreux parallèles structuraux et mécanistiques avec le processus d'Ubiquitination qui a servi de guide de réflexions pour nos recherches. Le but ultime était d'améliorer la compréhension des modes d'action de SUMO.

Les travaux présentés dans la première étude relatent la découverte ainsi que la caractérisation de la SUMOylation de TIF1 $\beta$ , le corépresseur universel des protéines KRAB-Multidoigt de zinc. La SUMOylation de TIF1 $\beta$  cible spécifiquement plusieurs résidus lysine regroupés dans son domaine répresseur. Ainsi, des études de gènes rapporteurs nous ont permis de déterminer que la SUMOylation de TIF1 $\beta$  est essentielle à son activité répressive et corépressive via, notamment, le recrutement d'activités HDACs. De plus, la SUMOylation de TIF1 $\beta$  est positivement régulée par son interaction avec le domaine KRAB, caractérisé comme un domaine conférant une activité répressive aux protéines Multidoigt de zinc. À la lumière de ces résultats, nous suggérons que les protéines KRAB-Multidoigt recrutent TIF1 $\beta$  à l'ADN et augmentent sa capacité répressive en favorisant sa SUMOylation. La SUMOylation de TIF1 $\beta$  lui permet d'interagir avec plusieurs protéines directement impliquées dans la répression de la transcription.

La machinerie de SUMOylation (SUMO, l'enzyme de conjugaison UBC9 et les enzymes de ligation de la famille des PIAS) étant impliquée dans la répression de l'activité de plusieurs facteurs de transcription, nous avons investigué les déterminants moléculaires requis dans la formation, la régulation et la fonction répressive associée à cette machinerie enzymatique. Ainsi, les travaux de la deuxième étude indiquent que PIAS1, SUMO1 et UBC9 peuvent s'assembler en un complexe ternaire (PIAS1:SUMO1:UBC9) répresseur. C'est la première fois qu'un tel complexe est mis en évidence pour la machinerie de

SUMOylation. Au sein de ce complexe, SUMO1 joue le rôle de protéine adaptatrice spécifique en reconnaissant simultanément la surface *backside* de son enzyme de conjugaison, UBC9, et la séquence SIM de PIAS1, une des enzymes E3 de ligation de la machinerie de SUMOylation. Nos résultats révèlent que l'activité répressive induite par UBC9 corrèle avec sa capacité d'interagir de manière non-covalente avec SUMO1 et conséquemment PIAS1 au sein de ce complexe ternaire. En outre, des approches *in vivo* et *in vitro* indiquent que la phosphorylation par CK2, de trois résidus sérines adjacents à la séquence SIM de PIAS1 favorise la formation du complexe ternaire PIAS1:SUMO:UBC9 en renforçant l'interaction de SUMO avec PIAS1. Ainsi, à la lumière de ces données, nous proposons que les interactions non-covalentes de PIAS1 et UBC9 avec SUMO soient requises pour leur interaction spécifique et la formation d'un complexe ternaire possédant une activité répressive.

Enfin, les travaux présentés dans la troisième étude portent sur la caractérisation structurale et fonctionnelle du complexe entre SUMO1 et la séquence SIM phosphorylée de PML, l'organisateur de corps nucléaires. Cette étude révèle, pour la première fois, un complexe entre SUMO1 et la séquence SIM de PML sous ses formes native et phosphorylée. Ces résultats, issus d'une combinaison d'approches *in vivo* et *in vitro*, indiquent que la phosphorylation d'une séquence de résidus sérine, juxtaposée au SIM de PML et ciblée *in vivo* par la kinase CK2 augmente significativement l'affinité d'interaction entre PML et les protéines SUMO. L'obtention des structures cristallographiques des complexes SUMO1:PML-SIM et SUMO1:PML-SIM-PO<sub>4</sub> nous a permis d'identifier avec une résolution quasi atomique l'interface d'interaction entre SUMO1 et le SIM de PML dans ses formes native et phosphorylée. Alors qu'aucun contact n'est observé entre SUMO1 et les résidus sérine du SIM natif de PML, trois des quatre phospho-sérines forment des ponts hydrogènes et des interactions électrostatiques avec plusieurs résidus basiques de SUMO1. À la lumière de ces données, nous proposons que la phosphorylation des résidus sérines adjacents à la séquence SIM de PML participe à l'homéostasie des corps nucléaires de PML en régulant de façon dynamique les interactions de PML dépendant de SUMO.



Les prochaines sections de cette discussion abordent :

1- Les méthodologies employées pour étudier les interactions des protéines d'échafaudage étudiées dans cette thèse. Outre un rappel des principes des méthodes, les spécificités et les avantages de leur utilisation dans le cadre de nos études sont discutés.

2- La mise en perspective pour chacune des études présentées.

## 1 Stratégie méthodologique

Dans le but d'appréhender au mieux les déterminants moléculaires à la base des différentes interactions dépendantes de SUMO, notre stratégie a reposée sur l'emploi de plusieurs méthodes semi-quantitatives *in vivo*, tels le transfert d'énergie par résonance de bioluminescence, la co-immunoprécipitation et l'essai de gène rapporteur, dans le contexte de protéines pleines longueurs. Ces techniques ont été combinées à des approches *in vitro* plus quantitatives, telle la microcalorimétrie et la résonance magnétique nucléaire, faisant souvent appel à des fragments isolés des protéines d'intérêt. Finalement une approche radiocristallographie a été utilisée pour identifier avec une résolution quasi atomique certaine des interfaces d'interaction d'intérêt. Une brève description de la stratégie méthodologique employée est présentée ci-dessous (**Figure 48**).

### 1.1 Stratégies employées pour l'étude d'interaction protéine:protéine

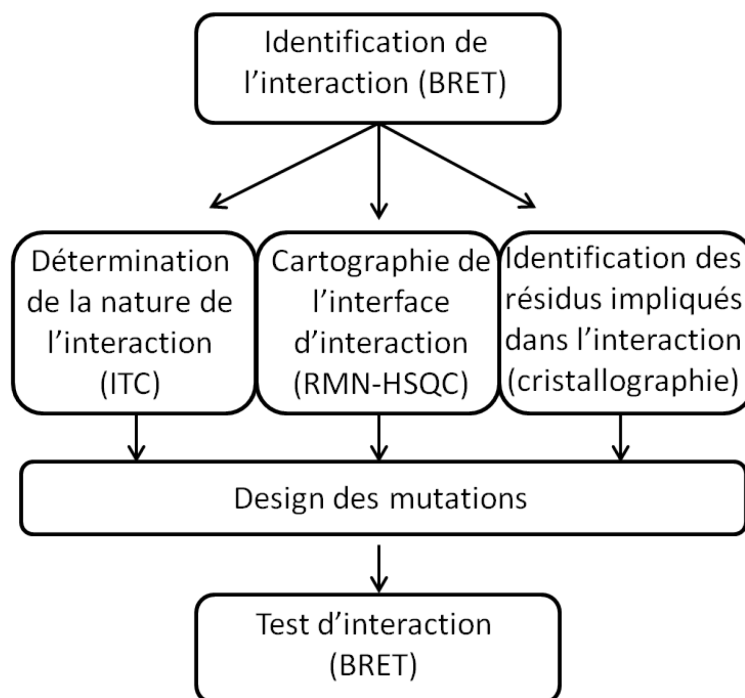
Une spécificité de nos études réside dans l'utilisation d'une combinaison d'approches biophysiques ayant permis de cerner les déterminants moléculaires impliqués dans les interactions protéines:protéines étudiées dans cette thèse. Toutes les techniques utilisées possèdent leurs avantages et leurs inconvénients mais leur utilisation combinée permet l'obtention d'informations différentes et complémentaires essentielles à la caractérisation des interactions protéiques. Ces techniques sont brièvement décrites ci-dessous après une revue de leurs avantages.

La première technique est le transfert d'énergie par résonance de bioluminescence ou BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*). Il s'agit d'une technique *in vivo* relativement puissante lorsque comparée aux autres approches communément utilisées lors de la caractérisation d'interactions *in vivo*. Ainsi, le BRET nous permet d'appréhender les interactions protéine:protéine dans le contexte de cellules intactes [491].

De plus, contrairement à nombre de techniques *in vitro* faisant appel à des fragments de protéines, le BRET permet l'étude de protéines pleine longueur. Si cette approche donne une indication de l'affinité relative et de la proximité relative entre deux protéines et permet l'identification d'interactions directes, elle ne permet pas d'exclure de façon définitive la possibilité d'interactions indirectes. En conséquence, une fois l'interaction détectée par BRET, celle-ci a été confirmée au moyen de méthodes *in vitro*.

Les techniques utilisées *in vitro* sont, la microcalorimétrie ou ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*) et la spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) [492]. Ces deux approches quantitatives complètent bien les études de BRET et permettent de caractériser plus précisément les déterminants moléculaires à la base de l'interaction et de conclure si l'interaction est de type direct ou indirect. De plus, ces approches permettent (i) d'appréhender la nature (hydrophobicité) des forces qui dictent l'interaction, (ii) de mesurer l'affinité de l'interaction (constante de dissociation) mais aussi, (iii) d'identifier les surfaces et les résidus de chacune des protéines impliquées dans l'interaction. Néanmoins, si l'ITC et la RMN offrent ces avantages, leur limitation concerne la taille des complexes étudiés. En général, seules les protéines de moins de 30 kDa peuvent être étudiées par RMN.

Enfin, une approche de radiocristallographie a été utilisée dans le but de d'obtenir, avec une résolution quasi atomique, la structure de complexes protéiques d'intérêts et ainsi d'identifier les déterminants moléculaires régissant leur formation. Une fois l'interaction caractérisée structurellement, des mutations ponctuelles sont générées dans le but d'affecter la liaison tout en évitant de perturber le repliement du domaine ou de la protéine donnée. Les rôles de ces interactions peuvent finalement être adressés au moyen d'études fonctionnelles.



**Figure 48 :** Stratégies méthodologiques pour les études d'interactions.

### 1.1.1 Le transfert d'énergie par résonance de bioluminescence dans les interactions E3:E2

Les approches utilisant le transfert d'énergie par résonance non radiative (FRET, BRET) exploitent toutes le même principe basé sur l'utilisation de protéines fluorescentes (ex: GFP pour *Green Fluorescent Protein*) et/ou d'enzymes bioluminescentes (ex: Renilla Luciferase) qui sont génétiquement fusionnées à des macromolécules d'intérêt [491]. Lors d'une expérience de BRET, un transfert d'énergie se produit entre les protéines bioluminescentes et fluorescentes si les macromolécules auxquelles elles sont fusionnées interagissent dans une orientation dite permissive. Ainsi, l'énergie émise par le donneur d'énergie (la Renilla Luciférase dans le cas du BRET) est transférée sous forme de photons à un fluorophore accepteur d'énergie. L'efficacité du transfert d'énergie dépend principalement de la distance séparant le donneur et l'accepteur d'énergie, et est

inversement proportionnelle à la sixième puissance de cette distance [493]. Donc, un accroissement de la distance entre les deux fluorophores peut entraîner une perte de transfert d'énergie. Selon les approches, le transfert d'énergie entre les deux fluorophores est efficace jusqu'à environ 100 Å.

La plupart des études publiées s'intéressant aux interactions E3:E2 utilisent, tout comme dans notre deuxième étude, des approches *in vitro* (RMN et radiocristallographie), le plus souvent avec des fragments des protéines d'intérêt [50,87,494]. Compte tenu de la nature transitoire des interactions E3:E2, quelques études ont aussi exploité des approches de type double hydride chez la levure [495,496]. Notre étude est la première qui emploie le BRET pour définir les déterminants moléculaires à la base de l'interaction entre des enzymes E3 et E2 impliquées dans la voie de SUMOylation. De façon unique, cette approche nous a permis de caractériser les interactions directes et indirectes de nos protéines d'intérêt dans leur forme pleine longueur et dans des cellules intactes de mammifères.

### 1.1.2 La microcalorimétrie dans les interactions SIM:SUMO

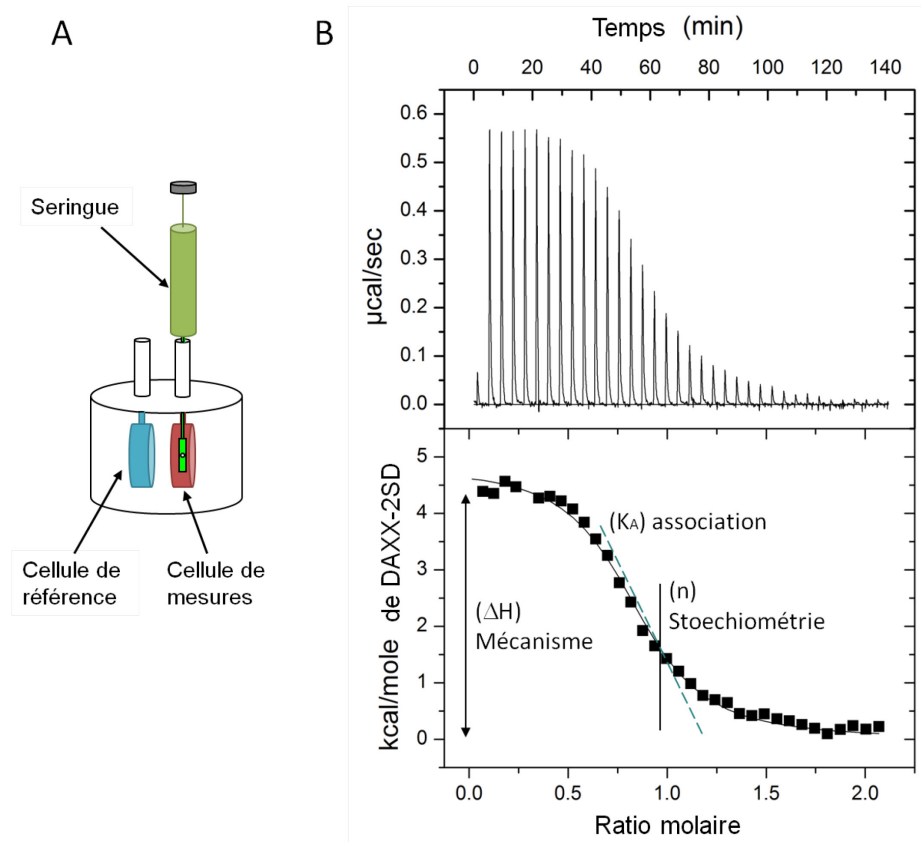
La microcalorimétrie (ITC pour *Isothermal Titration Calorimetry*) a été utilisée pour déterminer de manière quantitative les constantes d'affinité ainsi que les paramètres thermodynamiques qui régissent les interactions entre les séquences SIM de nos protéines d'intérêt (PIAS1 et PML) et SUMO. Cette technique se base sur les lois de la thermodynamique. En effet, toute réaction chimique échange de la chaleur avec l'environnement [492].

Techniquement, le microcalorimètre isotherme est formé de deux compartiments, appelés cellules ainsi que d'une seringue d'injection (**Figure 49**). Une des deux cellules sert de référence tandis que l'autre renferme un des deux partenaires protéiques d'intérêt (molécule A). La seringue est chargée de l'autre partenaire protéique (molécule B). Lors d'un titrage ITC, réalisé à température et à pression constantes, le partenaire protéique contenu dans la seringue (molécule B) est graduellement injectée dans la cellule contenant la molécule A. Suite à chaque injection, la chaleur échangée dans le milieu est mesurée et



comparée à celle de la cellule de référence. Ainsi, la différence de chaleur entre les cellules s'exprime comme la puissance électrique permettant de maintenir une température constante entre ces deux cellules. Au fur et à mesure que les sites de liaison de la molécule A sont saturés par la molécule B, l'échange de chaleur diminue jusqu'à ce que plus aucun échange ne soit détecté. Le système se retrouve donc à l'équilibre. Cette technique est très sensible puisque l'appareil ITC permet de détecter de très petits changements de chaleur (de l'ordre de la microcalorie) et donc de détecter des interactions présentant des faibles échanges de chaleur.

Ainsi, au moins deux cas de figures se rencontrent lors d'une interaction entre macromolécules. L'interaction peut s'accompagner (i) d'une émission de chaleur (réaction exothermique), comme observé pour l'interaction entre le SIM de PIAS1 et SUMO1 ou (ii) d'une absorption de chaleur (réaction endothermique) tel qu'obtenu pour l'interaction entre le SIM de PML et SUMO1. Ces résultats nous suggèrent que la nature des interactions impliquées dans la liaison SIM:SUMO sont différentes chez PIAS1 et PML. De plus, lors d'une expérience d'ITC, les échanges de chaleurs induits lors de la formation d'un complexe protéique sont quantifiés et permettent de déterminer la constante d'association ( $K_A$ ) et la stœchiométrie (n) du système en solution (**Figure 49**). Nos expériences nous ont permis de déterminer que le SIM de PIAS1 présente une affinité ( $K_D$ ) pour SUMO1 dix-huit fois plus importante que le SIM de PML (PIAS1:SUMO1  $K_D = 2 \mu\text{M}$  versus PML:SUMO1  $K_D = 36 \mu\text{M}$ ). De plus, il est possible d'obtenir les paramètres thermodynamiques de la réaction (variations d'enthalpie libre  $\Delta G$ , d'enthalpie  $\Delta H$ , d'entropie  $\Delta S$ ) qui nous renseignent sur la nature de l'interaction. Par exemple, une interaction présentant une enthalpie positive, comme c'est le cas entre le SIM de PML et SUMO1, est principalement dictée par des interactions hydrophobes et des déplacements de molécules d'eau. L'enthalpie négative obtenue pour l'interaction entre le SIM de PIAS1 et SUMO1 indique que leur liaison est dictée par des interactions hydrophobes et la formation de ponts hydrogènes. Tous ces résultats corrélerent avec une étude de bioinformatique qui a proposé l'existence de plusieurs familles de séquences SIM en se basant sur la nature des résidus retrouvés au sein du motif hydrophobe et juxtaposés à celui-ci [312].



**Figure 49 :** Représentation schématique de microcalorimètre et vue d'un thermogramme typique.

A) La seringue (vert) est connectée à la cellule de mesures (rouge). La cellule de référence est colorée en bleu. B) Thermogramme typique d'une réaction endothermique. Les paramètres (variation d'enthalpie ( $\Delta H$ ), constante d'association ( $K_A$ ) et stoechiométrie ( $n$ )) sont représentés.

### 1.1.3 La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire et la cartographie des interfaces d'interaction

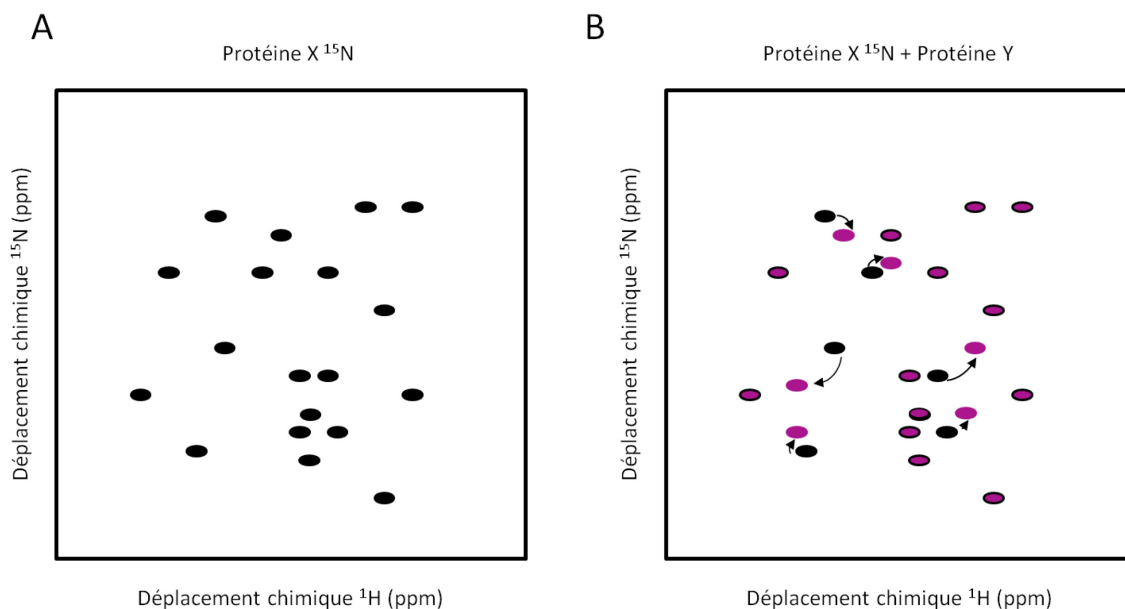
La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire permet d'obtenir différents types de spectres dont l'analyse peut aboutir à la résolution de structures tridimensionnelles de protéines. Dans le cadre de nos études et compte tenu que la structure RMN de SUMO1 est disponible, nous avons utilisé la RMN pour identifier les zones d'interaction de UBC9

et des séquences SIM de PIAS1 et de PML sur la surface de SUMO1 en utilisant une approche  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (*HeteronuclearS Quantum Correlation*). Durant l'expérience nous avons détecté les déplacements chimiques des résidus de SUMO1 lorsque complexé soit au SIM de PIAS1 ou à celui de PML ou bien à UBC9. De plus, cette approche nous a permis de confirmer les données de nos expériences de BRET qui nous suggéraient l'existence d'un complexe ternaire *in vivo* entre PIAS1, SUMO1 et UBC9.

Le principe de cette technique repose sur les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques qui lorsque placés dans un puissant champ magnétique voient leurs spins adopter un état d'équilibre en s'orientant le long de l'axe principal de ce champ. Des séquences d'impulsions électromagnétiques spécifiques perturbent l'état d'équilibre de ces spins en les faisant passer d'un état de basse énergie à un état à haute énergie. Un signal de résonance (RMN) de ces spins est mesuré lors de leur retour à l'état d'équilibre. Il est à noter que chaque atome d'une macromolécule résonne à une fréquence spécifique dépendamment de son environnement chimique immédiat. La fréquence de résonance, mesurée en Hertz (Hz), est convertie en partie par million (ppm); on parle alors de déplacements chimiques ( $\delta$ ). Ainsi, les déplacements chimiques des résidus de SUMO1 sont différents si SUMO1 est libre ou bien complexé à un partenaire (par exemple le SIM de PIAS1, le SIM de PML ou UBC9) qui change l'environnement chimique de SUMO1. Il est donc possible de cartographier les régions d'interaction de SUMO1

Cette technique nous a donc permis de cartographier les interfaces d'interaction de UBC9 et des séquences SIM de PIAS1 et de PML sur SUMO1 marqué à l'azote 15 ( $^{15}\text{N}$ ) tel que représenté schématiquement dans la **figure 50**. Pour ce faire, des expériences de RMN hétéronucléaire de type  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC qui aboutissent à l'acquisition de spectre à deux dimensions ( $^1\text{H}$  et  $^{15}\text{N}$ ) ont été entreprises. Lors de ce type d'expériences, un signal est obtenu pour chacune des liaisons amides (H-N) de la chaîne principale ainsi que pour les résidus asparagine et glutamine de SUMO1 marqué. L'acquisition de nouveaux spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC, lorsque SUMO1 marqué est complexé à la séquence SIM de PIAS1 ou bien à celle de PML, nous a permis d'établir une liste des déplacements chimiques de SUMO1 qui surviennent lors de la formation de chacun des complexes et donc d'identifier les

résidus de SUMO1 impliqués dans l'interaction. Le même principe s'est appliqué lorsque nous avons cartographié l'interface d'interaction entre  $^{15}\text{N}$ -SUMO1 et UBC9. Ces études nous ont permis de mettre définitivement en évidence la formation du complexe ternaire entre le SIM de PIAS1, SUMO1 et UBC9 et d'exclure une interaction directe entre UBC9 et le SIM de PIAS1. En conséquence, cette technique nous a permis de cartographier les zones d'interaction de SUMO1 avec plusieurs partenaires protéiques comme UBC9, le SIM de PIAS1 et le SIM de PML.



**Figure 50 :** Schématisation de spectres RMN 2D de type  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC lors d'une expérience de titrage de la protéine X par la protéine Y.

A) Spectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de la protéine X marquée, sous sa forme libre (noir). B) Superposition des spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de la protéine X marquée, sous sa forme libre (noir) et sous sa forme complexée à la protéine Y (mauve). Les déplacements chimiques des résidus de la protéine X sont indiqués par des flèches.

#### 1.1.4 La radiocristallographie pour déterminer l'interface d'interaction entre SUMO1 et la séquence SIM phosphorylée de PML

L'approche par radiocristallographie nous a permis d'obtenir des modèles tridimensionnels des complexes protéiques entre SUMO1 et le SIM de PML dans sa forme native et dans sa forme phosphorylée à une résolution atomique.

À ce jour, tous les modèles de structures tridimensionnelles disponibles entre SUMO et une séquence SIM ont été résolus au moyen de la technique de RMN. Notre troisième étude présente, pour la première fois, un modèle de structure tridimensionnelle entre SUMO1 et une séquence SIM obtenue par radiocristallographie. De plus, c'est la première fois qu'un complexe est isolé entre SUMO1 et une séquence SIM phosphorylée, le motif SIM de PML. Il est à noter que le modèle radiocristallographique du complexe

entre SUMO1 avec le motif SIM de PML corrobore les modèles RMN des complexes entre SUMO1 et le SIM de PIAS2 et entre SUMO3 et le SIM de MCAF1 (*MBD1-containing Chromatin-Associated Factor1*) [304,306]. À savoir, la séquence aliphatique du SIM de PML, s'insère avec une orientation parallèle dans le sillon hydrophobe formé du second brin  $\beta$  et de l'hélice  $\alpha$  de SUMO1. De plus, la structure du complexe entre SUMO1 et le motif SIM de PML phosphorylé nous permet d'identifier les résidus de SUMO1 spécifiquement impliqués dans la reconnaissance des groupements phosphates issus des résidus sérines phosphorylés de PML.

Théoriquement, la technique de radiocristallographie se base sur le haut degré d'organisation interne d'un cristal. Ainsi, et contrairement à des protéines en solution qui peuvent s'agencer de manière aléatoire, l'organisation périodique du cristal lui confère un fort pouvoir diffractant lorsque celui-ci est soumis à un faisceau de rayons X. Ceci aboutit à l'obtention de patrons de diffraction dont le traitement mathématique a permis de calculer des cartes de densité électroniques qui ont été par la suite interprétées afin d'obtenir des modèles tridimensionnels des complexes entre SUMO1 et le SIM de PML dans sa forme native et dans sa forme phosphorylée à une résolution atomique.

Il est à noter que de nombreux tests ont aussi été effectués dans le but d'obtenir des cristaux entre SUMO1 et les séquences SIM de plusieurs protéines. Cependant, les seules conditions cristallisantes fructueuses ont été obtenues entre SUMO1 et le SIM de PML.

## **2 Rôle de SUMO dans la répression de la transcription dépendante de TIF1 $\beta$**

Tel que présenté dans l'article 1 de cette thèse, nous avons montré que l'activité répressive de TIF1 $\beta$  est directement dépendante de sa capacité à être SUMOylé sur six résidus lysines cibles que nous avons identifiées dans sa région carboxy-terminale. L'activité répressive est directement proportionnelle au nombre de résidus lysine SUMOylables tel que mis en évidence après leur mutation séquentielle et combinatoire en arginine. Ces données corrélerent avec des résultats non publiés qui relient la faible activité

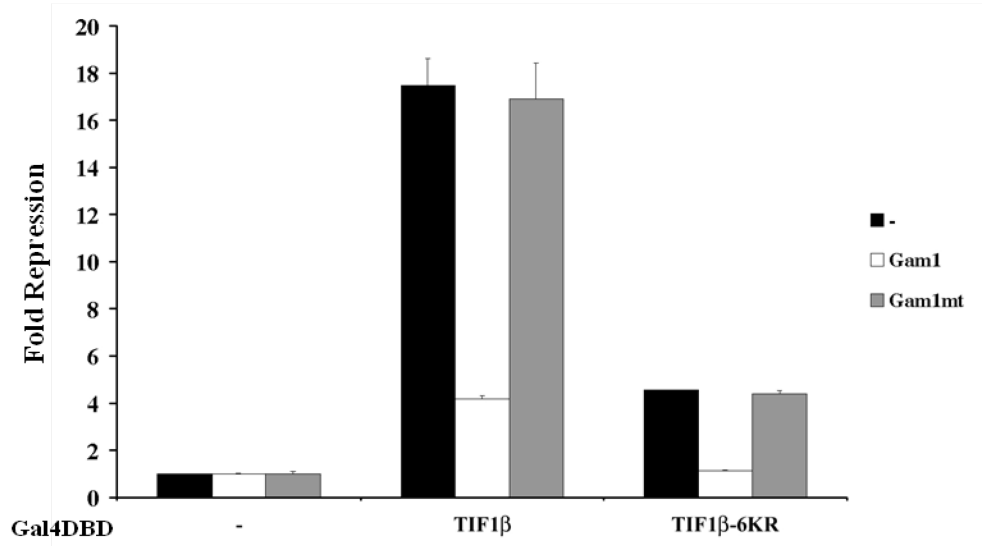
répressive de TIF1 $\alpha$ , un autre membre de la famille TIF1, à sa capacité d'être SUMOylé sur seulement deux résidus lysine. Il est à noter que tous ces résidus lysine sont localisés au sein du domaine répresseur de TIF1 $\beta$ . De manière analogue, divers facteurs et corégulateurs transcriptionnels présentent des sites de SUMOylation au sein de leur domaine inhibiteur, indiquant que la SUMOylation de ces régions dicte leur capacité répressive [371,497-499].

De plus, nous avons montré que la SUMOylation de TIF1 $\beta$  dépend de son interaction avec le domaine KRAB des protéines KRAB-Multidoigt de zinc. Ce résultat est intéressant car il suggère un mécanisme par lequel la SUMOylation de TIF1 $\beta$  peut être régulée. Il est possible d'envisager que la SUMOylation de TIF1 $\beta$  pourrait être favorisée par un recrutement à l'ADN via une interaction avec les protéines KRAB-Multidoigt de zinc. Si la modification par SUMO de TIF1 $\beta$  intervient suite à son recrutement à l'ADN, les formes SUMOylées de TIF1 $\beta$  pourraient correspondre aux formes transcriptionnellement fonctionnelles au niveau de l'ADN. Ainsi, sachant que la SUMOylation est un phénomène dynamique et réversible, ceci expliquerait pourquoi seule une faible proportion de TIF1 $\beta$  est SUMOylée dans la cellule, comme c'est le cas pour bon nombre d'autres protéines de la cellule [500]. L'identification du domaine KRAB comme un facteur stimulant la SUMOylation de TIF1 $\beta$  est intéressant sachant, qu'hormis les composantes de la machinerie de SUMOylation, peu d'agents spécifiques sont actuellement connus pour favoriser la SUMOylation de protéines en particulier.

Selon le courant de pensées actuelles, il apparaît que SUMO, lorsque couplé à un régulateur de la transcription, permet le recrutement de protéines répressives présentant des séquences SIM [318,501,502]. Ainsi, de récentes études ont proposé que la SUMOylation de TIF1 $\beta$  permette le recrutement de SETDB1 et CHD3, deux protéines présentant des séquences SIM et impliquées dans l'établissement de marques épigénétiques associées à la répression transcriptionnelle [503]. Dans cette thèse, nous avons pu démontrer que la SUMOylation de TIF1 $\beta$  permettait aussi de recruter des activités HDACs. Ce mécanisme de recrutement d'activités répressives de types HDACs a aussi été rapporté pour plusieurs autres régulateurs transcriptionnels lorsque SUMOylés [332,334].

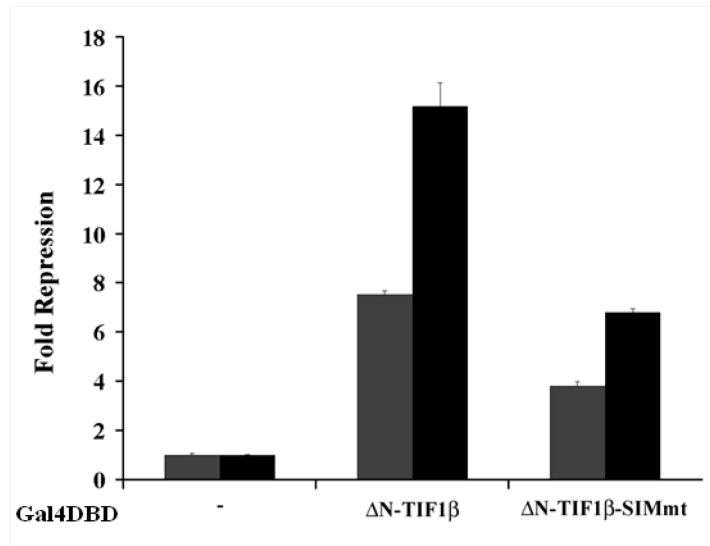
Plusieurs expériences de gènes rapporteurs non publiées nous ont suggéré que d'autres possibilités peuvent être envisagées pour expliquer le rôle de SUMO dans l'activité répressive induite par TIF1 $\beta$ . En effet, bien que le mutant de SUMOylation de TIF1 $\beta$  (TIF1 $\beta$ -6KR) présente une capacité de répression cinq fois moins élevée que TIF1 $\beta$  sauvage, lorsque directement recruté à l'ADN, il induit une répression de l'expression du gène rapporteur luciférase de près de quatre fois (**Figure 51**). Ceci indique que même lorsque non SUMOylé, TIF1 $\beta$  présente encore une capacité de répression. Il est à noter que cette activité de répression résiduelle de TIF1 $\beta$ -6KR est complètement abrogée lorsque nous co-exprimons Gam1, une protéine virale qui inhibe le processus de SUMOylation de la cellule en induisant la dégradation de l'enzyme E1 d'activation (SAE1:SAE2) pour SUMO [224] (**Figure 51**). Ces résultats indiquent que l'activité résiduelle de répression de la forme non SUMOylable de TIF1 $\beta$  dépend de la SUMOylation d'autres protéines dans la cellule.





**Figure 51** : Inhibition de la répression transcriptionnelle de TIF1β et de TIF1β-6KR par Gam1.

Ces protéines pourraient correspondre à des protéines répressives SUMOylées, recrutées par un motif potentiel d'interaction avec SUMO de TIF1β. L'inspection de la séquence primaire de TIF1β a révélé l'existence d'au moins deux séquences SIM potentielles, toutes deux situées dans la portion carboxy-terminale répressive de TIF1β. La mutation d'une de ces séquences SIM potentielles altère l'activité répressive de TIF1β dans des essais de gènes rapporteurs (**Figure 52**). Il est donc envisageable que la répression induite par TIF1β passe aussi par le recrutement de protéines répressives SUMOylées.

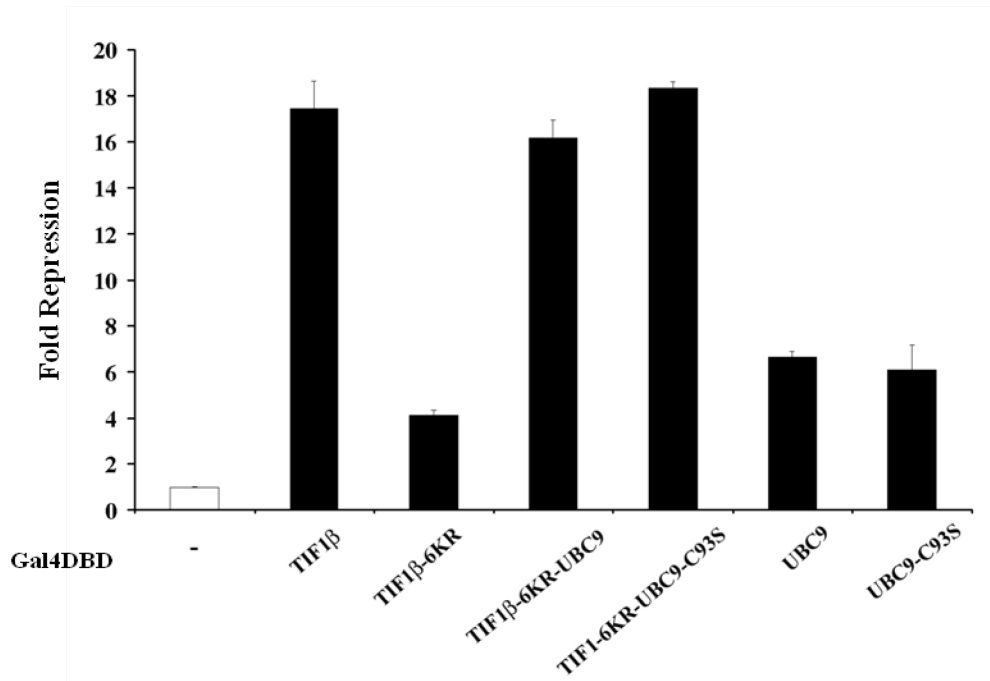


**Figure 52 :** La répression transcriptionnelle de  $\Delta N$ -TIF1 $\beta$  dépend de l'intégrité d'une séquence SIM potentielle.

Dans un premier temps, il serait important de confirmer que ce motif est effectivement une séquence SIM. Des essais d'ITC et de RMN, tels qu'effectués dans les études de cette thèse, permettraient de répondre à cette hypothèse en confirmant l'interaction directe de ce motif avec SUMO. Si la séquence SIM potentielle de TIF1 $\beta$  s'avère être un motif d'interaction avec SUMO, il serait important d'identifier les partenaires SUMOylés impliqués dans cette interaction. Pour ceci, deux approches complémentaires peuvent être envisagées. Dans un premier temps, répertorier les partenaires de TIF1 $\beta$  connus pour être SUMOylés grâce à une revue de la littérature. Parmi les partenaires connus de TIF1 $\beta$ , les protéines HP1 $\alpha$  et CHD3, qui sont des substrats de SUMO, représentent des candidats potentiels ([504] et données non publiées). En effet, une fois SUMOylés, ceux-ci pourraient interagir avec le motif SIM de TIF1 $\beta$ . En parallèle, des co-purifications de type TAP-tag dans des conditions qui préservent la SUMOylation (par exemple avec du NEM, *N-EthylMaleimide*) peuvent aussi être envisagées.

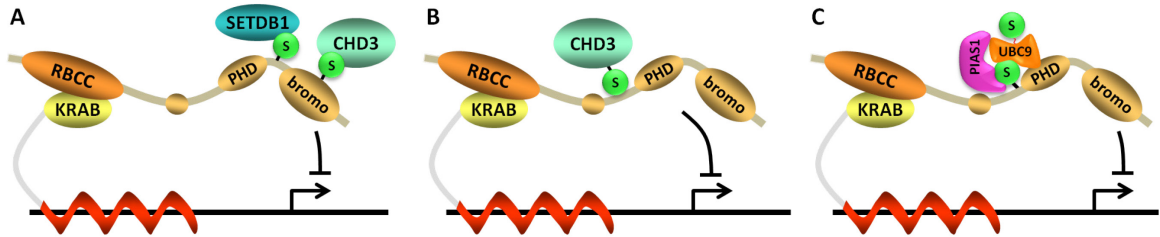
Au cours de nos études, afin d'accroître le niveau cellulaire de SUMOylation de TIF1 $\beta$  et de permettre ainsi la purification des complexes protéiques recrutés par TIF1 $\beta$  SUMOylé, nous avons construit un clone chimère encodant une protéine de fusion entre

TIF1 $\beta$  et UBC9 (TIF1 $\beta$ -UBC9). Des constructions contrôles avaient aussi été préparées dans le cadre de ce projet soit TIF1 $\beta$ -6KR fusionné à UBC9 (TIF1 $\beta$ -6KR-UBC9) ou au mutant catalytiquement inactif de UBC9 (TIF1 $\beta$ -6KR-UBC9-C93S). Des essais de gènes rapporteurs avaient été entrepris pour caractériser l'activité répressive de chacune de ces constructions. De façon paradoxale, tel qu'observé dans la **figure 53**, les protéines de fusion TIF1 $\beta$ -6KR-UBC9 et TIF1 $\beta$ -6KR-UBC9-C93S récapitulent la répression transcriptionnelle induite par la protéine TIF1 $\beta$  sauvage alors que la répression induite par le mutant de SUMOylation de TIF1 $\beta$  (TIF1 $\beta$ -6KR) est 4 à 5 fois moins élevée que celle de la protéine TIF1 $\beta$  sauvage. Ce résultat indique que l'interaction forcée avec UBC9 obtenue dans le cadre de la fusion est suffisante pour accroître la répression transcriptionnelle et souligne que cette activité répressive est indépendante de l'activité catalytique de UBC9. Ainsi, on ne peut exclure que la SUMOylation de TIF1 $\beta$  puisse stabiliser son interaction avec la machinerie de SUMOylation et que cette stabilisation puisse aussi contribuer à son rôle de corépresseur transcriptionnel.



**Figure 53 :** Restauration de l'activité répressive de TIF1 $\beta$ -6KR par les protéines fusions TIF1 $\beta$ -6KR-UBC9 et TIF1 $\beta$ -6KR-UBC9-C93S.

Sachant qu'UBC9, SUMO et les membres de la famille des PIAS exercent tous une activité répressive lorsque directement recrutés à l'ADN et que dans le cas d'UBC9 et de PIAS, cette activité répressive est indépendante de leur activité enzymatique à titre de E2 et de E3, les études citées dans le paragraphe précédent ont orienté nos recherches pour tenter de mieux comprendre le rôle des interactions de SUMO avec PIAS1 et UBC9 dans la répression (article 2). En effet, aucun mécanisme moléculaire n'avait été suggéré pour expliquer les activités répressives de ces trois composantes de la machinerie de SUMOylation. Des modèles alternatifs sont proposés dans la **figure 54** pour expliquer la répression transcriptionnelle induite par les interactions SUMO:TIF1 $\beta$ .



**Figure 54 :** Modèles alternatifs pouvant expliquer la répression transcriptionnelle induite par les interactions SUMO:TIF1β.

A) La SUMOylation de TIF1β permet le recrutement de protéines répressives contenant des séquences SIMs (SETDB1 et CHD3). B) La séquence SIM potentielle de TIF1β permet le recrutement de protéines répressives SUMOylées (CHD3). C) la SUMOylation de TIF1β stabilise son interaction avec les enzymes répressives de la voie de SUMOylation.

### 3 Les Ublps, de possible déterminants spécifiques dans la formation des complexes E3:E2

Notre étude a mis en évidence le rôle d'adaptateur joué par SUMO et l'importance de ses interactions non-covalentes avec UBC9 et PIAS1 pour la formation d'un complexe ternaire E3:SUMO1:E2. Compte tenu des analogies structurales entre les enzymes du processus d'Ubiquitination et celles de la SUMOylation, de nombreux parallèles ont pu être fait et donc potentiellement applicables à l'un ou l'autre des systèmes. Nous nous sommes donc initialement basés sur les connaissances structurales disponibles concernant le processus d'Ubiquitination pour élucider les déterminants moléculaires régissant les interactions entre UBC9 et PIAS1.

Ainsi, comme démontré dans cette thèse, ces deux enzymes de la SUMOylation doivent reconnaître leur propre Ublp, SUMO, pour interagir entre elles de manière spécifique. Considérant les analogies mécanistiques entre les systèmes d'Ubiquitination et de SUMOylation, il est tentant de suggérer que des principes similaires contrôlent les interactions spécifiques de certaines des enzymes E2 et E3 de la machinerie

d'Ubiquitination. Il est à noter que plusieurs de ces enzymes interagissent de façon non-covalente avec l'Ubiquitine. Cela implique soit leur surface *backside* comme c'est le cas de plusieurs enzymes de conjugaison E2 (UBE2D2 et UBE2V2), soit un domaine d'interaction avec l'Ubiquitine (UBD, UBA) comme c'est le cas pour certaines enzymes de conjugaison E2 (UBC1, UBE2K) et différentes enzymes de ligation E3 (CBL, IAPs) [64,66,160,162,163,505]. Ainsi, des études similaires à celles présentées dans l'article 2 pourraient être entreprises pour identifier les déterminants moléculaires à la base de la formation de paires E3:E2 physiologiquement actives.

Donc, outre le rôle des interactions de SUMO dans la formation du complexe ternaire PIAS1:SUMO1:UBC9 répresseur, notre deuxième étude ouvre des pistes de recherche pour la détermination des interactions spécifiques entre les enzymes de conjugaison E2 et les enzymes de ligation E3 de l'Ubiquitine mais aussi d'autres Ublps. À première vue le processus de SUMOylation semble plus simple, puisqu'il ne compte qu'une enzyme de conjugaison (UBC9) et seulement quatre enzymes de ligation de type RING (PIAS1-4) [177,183], mais les mêmes principes d'interaction pourraient s'appliquer pour les autres Ublps. L'identification des paires E3:E2 physiologiquement actives fait actuellement l'objet de recherches intensives dans le monde de l'Ubiquitine [43]. Tel qu'abordé dans l'introduction, près de trente enzymes de conjugaison E2 et probablement plus de cinq cent enzymes de ligation E3 de type RING opèrent dans le processus d'Ubiquitination [80]. Considérant le nombre significatif d'enzymes E3 impliquées dans des pathologies [136], une compréhension adéquate des déterminants moléculaires qui régissent la spécificité des interactions des enzymes E2 et E3 de l'Ubiquitine apparaît donc essentielle.

Une bonne caractérisation des mécanismes moléculaires qui dictent les interactions spécifiques entre les enzymes de ligation E3 et les enzymes de conjugaison E2 permettrait de développer de molécules inhibitrices ou activatrices ciblant spécifiquement les interfaces d'interaction de couples E3:E2 connus pour être impliqués dans divers pathologies, tel BRCA1 impliqué dans le développement du cancer du sein, ou bien Parkin associée au Parkinson [136].

## **4 Les protéines PIAS, des ligases E3 pour SUMO possiblement activables par le stress**

Les résultats de notre deuxième étude (article 2) indiquent que le niveau de phosphorylation des résidus sérines adjacents au SIM de PIAS1 module la formation du complexe ternaire entre PIAS1, SUMO1 et UBC9. Sachant que la phosphorylation de ces sérines est sous le contrôle de la kinase CK2 qui est activable dans des cas de stress cellulaires par la voie p38 MAPK, notamment [271], il est possible d'envisager que la formation et l'activité enzymatique du complexe ternaire PIAS1:SUMO:UBC9 soient positivement régulées par la phosphorylation de PIAS1. Il est à noter que différents types de stress induisent une conjugaison de SUMO2 et de SUMO3 à des protéines [199]. Il est donc possible que cette SUMOylation de protéines par SUMO2 et SUMO3 reflète l'activité de PIAS1 dans des conditions de stress cellulaires. Considérant le haut degré de conservation de ces résidus sérine chez les autres protéines PIAS, il est probable que ce mécanisme d'induction soit valable pour toutes les protéines PIAS lors de stress cellulaires.

## **5 Les relations entre la stabilité de PML et la phosphorylation de son SIM**

Tel qu'abordé dans l'introduction et dans deux des articles présentés dans cette thèse (article 3 et article en annexe), PML interagit de manière non-covalente avec les protéines SUMO via son SIM. D'autre part, il a été rapporté que le SIM de PML est impliqué dans la formation adéquate des corps nucléaires de PML [408]. De manière analogue, les corps nucléaires de PML requiert UBC9 [227]. Ceci indique que les interactions de PML avec SUMO et sa machinerie sont un des moteurs de l'homéostasie de ces organelles.

Les résultats de cette thèse soulignent que si l'interaction PML:SUMO est dictée par la phosphorylation de résidus sérines juxtaposés au SIM de PML, la phosphorylation de ces mêmes résidus ne semble pas impliquée dans le recrutement de UBC9 (donnée non

publiée) comme c'est le cas pour PIAS1 dans le contexte de la formation ternaire PIAS1:SUMO1:UBC9. Ainsi, bien que la phosphorylation des SIM de PML et de PIAS1 augmente leur interaction respective avec SUMO, les impacts fonctionnels de cette phosphorylation sont différents chez PML et PIAS1. Ceci, indique que des propriétés intrinsèques à PIAS1 et à PML dictent la spécificité fonctionnelle des séquences SIM.

Bien que la séquence SIM de PML soit requise pour la dégradation de PML induite par trioxyde d'arsenic, la phosphorylation des résidus sérine adjacents n'est pas essentielle. Par contre, la phosphorylation de ces mêmes résidus semble être impliquée dans la dégradation de PML induites par CK2 [437,441]. Sachant que la phosphorylation des résidus sérine adjacents à la séquence SIM semble être impliquée dans la dégradation de PML lors de stress cellulaire via la voie de CK2, mais pas dans des conditions de traitement au trioxyde d'arsenic, il apparaît important de mieux comprendre les différentes voies de dégradation impliquées dans chacun de ces processus.

Un traitement au trioxyde d'arsenic permet d'accroître fortement la poly-SUMOylation de PML ainsi que le recrutement de RNF4, une ligase E3 pour l'Ubiquitine reconnaissant spécifiquement les chaînes de poly-SUMO et permettant leur Ubiquitination pour une dégradation par le protéasome. Plusieurs autres ligases E3 pour l'Ubiquitine sont impliquées dans l'Ubiquitination de PML dans différentes conditions [131,439]. Il est possible de proposer que la phosphorylation du SIM de PML pourrait permettre de stimuler le recrutement d'une E3 ligase pour l'Ubiquitine dans sa forme SUMOylée.

## **6 SUMO et l'Ubiquitine : des processus de conjugaison analogues dictent des fonctions distinctes**

Dans cette thèse, il a été illustré que la mécanistique des processus de conjugaison de SUMO et de l'Ubiquitine sont très similaires. Tout comme l'Ubiquitine, SUMO se retrouve conjugué de manière covalente sur des résidus lysine de protéines cibles suite à une série d'étapes séquentielles (maturation, activation, conjugaison et ligation). La machinerie d'Ubiquitination semble cependant plus complexe que celle contrôlant la



SUMOylation. En effet, alors que la machinerie de SUMOylation n'emploie qu'une seule enzyme d'activation E1 (SAE1:SAE2), qu'une seule enzyme de conjugaison E2 (UBC9) et que quelques enzymes de ligation E3 de type RING (PIAS1-4), deux enzymes d'activation E1, près de trente enzyme de conjugaison E2 et plus de 500 enzymes de ligation E3 de type RING officient pour l'Ubiquitination des protéines [5,41,80]. Le nombre élevé des enzymes impliquées dans la machinerie d'Ubiquitination reflète fort probablement un haut degré de spécialisation pour les mécanismes associés à l'Ubiquitination des protéines. En effet, tel que présenté dans l'introduction, les différentes topologies de chaînes de poly-Ubiquitine peuvent entraîner différentes fonctions [146]. Cette multifonctionnalité est en partie assurée par la diversité de domaines capables d'interagir de manière non-covalente avec les nombreux types de chaîne de poly-Ubiquitine [147]. Ceci n'est pas le cas pour SUMO.

À ce jour, la majorité des motifs d'interaction non-covalente avec les protéines SUMO correspondent à une séquence tétra-peptidique de nature hydrophobe ( $\psi\psi x\psi$ ,  $\psi x\psi\psi$ , où  $\psi$  représente un acide aminé hydrophobe et  $x$  correspond souvent soit à un résidu hydrophobe, soit à un résidu négativement chargé ou bien à un résidu phosphorylable) sans structure secondaire définie [302]. Les principaux acides aminés constituant ce motif sont les résidus isoleucine et valine; des résidus leucine sont retrouvés, mais de manière plus anecdotique. La présence de cette séquence de résidus dans une protéine semble lui conférer la capacité de lier de manière non-covalente SUMO. Ainsi, tel qu'abordé dans la troisième étude un bon nombre de protéines, et notamment celles retrouvées dans les corps nucléaires de PML, incluant PML lui-même, présente une extension, sous la forme de résidus acides et/ou phosphorylables, qui suit ou bien précède ce motif hydrophobe. Lors de sa liaison à SUMO, le motif SIM hydrophobe forme un brin  $\beta$  qui prolonge le feuillet  $\beta$  de SUMO en établissant des liaisons hydrogènes classiquement retrouvées dans le cadre de brins  $\beta$  adjacents qui constituent un feuillet  $\beta$  et les résidus formant la séquence SIM s'insèrent dans un sillon hydrophobe localisé entre le second brin  $\beta$  et l'hélice  $\alpha$  de SUMO [306]. Selon les données cristallographiques du complexe SUMO1:PML-SIM, le motif SIM de PML forme un brin  $\beta$  et adopte une configuration parallèle vis-à-vis du second brin  $\beta$  de SUMO1. L'orientation du motif SIM hydrophobe semble dépendre de la nature des

résidus qui l'encadre. Notamment, la position relative (amino- versus carboxy-terminale) de l'extension phospho/acidique par rapport au tétra-peptide hydrophobe pourrait être un des déterminants dictant l'orientation parallèle ou antiparallèle du motif SIM. La présence de résidus basiques occupant des positions spécifiques dans SUMO pourrait aussi dicter ce phénomène. Ainsi, l'orientation parallèle du SIM de PML, tel qu'observée dans la structure cristallographique du complexe SUMO1:PML-SIM, s'explique par la position de la séquence phospho/acidique qui suit son motif hydrophobe. Dans le cas de RanBP2, une des enzymes E3 du processus de SUMOylation, la présence de résidus phospho/acidiques précédant son motif SIM lui confère une orientation anti-parallèle vis-à-vis du second brin  $\beta$  de SUMO [59].

Contrairement aux séquences SIM qui forment des brins  $\beta$ , beaucoup de domaines caractérisés à ce jour pour interagir de manière non-covalente avec l'Ubiquitine (UBD), adoptent la configuration d'hélice  $\alpha$  (UIM, MUI, DUIM, UBA, CUE, VHS, GAT) [147]. Cependant, toutes les hélices  $\alpha$  ne fonctionnent pas comme des UBDs. Un espacement adéquat de résidus aliphatiques dans les UBDs leur permet d'établir des interactions de nature hydrophobe avec la surface convexe qui entoure le résidu isoleucine 44 de l'Ubiquitine [506]. Les interactions entre l'Ubiquitine et ce type de motifs présentent, dans la plupart des cas, une affinité relativement faible lorsque comparée aux affinités mesurées entre différentes séquences SIM et SUMO [307,308] et (données non publiées). En outre, l'affinité entre SUMO et les motifs SIM peut être modulée par différentes modifications post-traductionnelles. Ainsi, alors que la phosphorylation de l'extension riche en résidus sérine jouxtant la séquence SIM de plusieurs protéines augmente l'affinité de liaison du SIM à SUMO, l'acétylation de résidus lysine de SUMO semblerait inhiber cette interaction [271,313]. À ce jour, de tels mécanismes de régulation de l'affinité entre l'Ubiquitine et les UBDs n'ont pas été rapportés. Considérant le nombre élevé de domaines différents qui lient l'Ubiquitine, il est probable que de nouveaux domaines interagissant avec SUMO restent encore à découvrir.

## IV. CONCLUSION

Les résultats des études présentées dans cette thèse explorent comment SUMO, une petite protéine de la famille de l'Ubiquitine, participe à la régulation des fonctions de protéines d'échafaudage modèles, telles TIF1 $\beta$ , le corépresseur universel des protéines KRAB-Multidoigt de zinc, PIAS1, une ligase E3 pour la SUMOylation ainsi que le suppresseur de tumeurs et l'organisateur de corps nucléaires PML. Qu'il soit couplé de façon covalente (SUMOylation) ou non covalente à ses protéines cibles, il apparaît que SUMO puisse agir en fournissant des nouvelles interfaces d'interaction à titre de protéine adaptatrice, de plateforme de recrutement ou de stabilisateur d'interactions.

Nous avons démontré qu'une SUMOylation adéquate de TIF1 $\beta$  sur des résidus lysine de son domaine inhibiteur est essentielle à ses fonctions de répresseur et corépresseur transcriptionnel. De plus, alors que peu de mécanismes sont connus pour réguler la SUMOylation de substrats spécifiques, nous avons établi que la SUMOylation de TIF1 $\beta$  est dictée par son interaction avec le domaine KRAB des protéines KRAB-Multidoigt de zinc.

Nos données ont suggéré que les enzymes de la machinerie de SUMOylation, telles PIAS1 et UBC9 participent aussi à la répression de la transcription dépendante de TIF1 $\beta$ , nous conduisant à concentrer nos recherches sur la caractérisation des déterminants impliqués dans l'interaction de PIAS1 avec UBC9. En nous inspirant des processus régissant les interactions des enzymes de la machinerie d'Ubiquitination que nous avons pu démontré que SUMO est une protéine adaptatrice dont les interactions non-covalentes sont essentielles à l'activité répressive de UBC9 et à la genèse d'un complexe ternaire PIAS1:SUMO1:UBC9. De plus, nous révélons que le niveau de phosphorylation de résidus sérine jouxtant la séquence SIM de PIAS1 qui est ciblés par la kinase CK2, module son interaction avec SUMO et conséquemment la formation du complexe ternaire.

Enfin, sachant que PIAS1 mais aussi PML et qu'un nombre significatif de protéines retrouvées dans les corps nucléaires de PML possèdent des sites potentiellement ciblés par CK2 et juxtaposés à leur séquence SIM, des études structurales ont été entreprises et ont permis d'identifier les résidus de SUMO1 spécifiquement impliqués dans la reconnaissance

des phospho-sérines de la séquence SIM de PML. Des cristaux du complexe entre SUMO1 et la séquence SIM de PML ont pu être générés, ce qui a permis d'obtenir par radiocristallographie la première structure tridimensionnelle d'un complexe entre SUMO1 et une séquence SIM phosphorylée. Nos données indiquent que la phosphorylation du SIM de PML dicte sa capacité d'interagir avec SUMO. À la lumière de ces résultats, il apparaît évident que SUMO influence de deux façons les interactions protéines:protéines, tout d'abord en agissant à titre de modification post-traductionnelle covalente mais aussi à titre de partenaire non-covalent. De plus, ces interactions covalentes et non-covalentes avec SUMO sont toutes deux régulables.

## Bibliographie

1. Jensen K, Shiels C, Freemont PS (2001) PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20: 7223-7233.
2. Garavelli JS (2004) The RESID Database of Protein Modifications as a resource and annotation tool. *Proteomics* 4: 1527-1533.
3. Hershko A (2005) The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell-division cycle (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 44: 5932-5943.
4. van der Veen AG, Ploegh HL (2012) Ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Biochem* 81: 323-357.
5. Schulman BA, Harper JW (2009) Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 319-331.
6. Xirodimas DP (2008) Novel substrates and functions for the ubiquitin-like molecule NEDD8. *Biochem Soc Trans* 36: 802-806.
7. Skaug B, Chen ZJ (2010) Emerging role of ISG15 in antiviral immunity. *Cell* 143: 187-190.
8. Groettrup M, Pelzer C, Schmidtke G, Hofmann K (2008) Activating the ubiquitin family: UBA6 challenges the field. *Trends Biochem Sci* 33: 230-237.
9. Nakamura M, Yamaguchi S (2006) The ubiquitin-like protein MNSFbeta regulates ERK-MAPK cascade. *J Biol Chem* 281: 16861-16869.
10. Geng J, Klionsky DJ (2008) The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep* 9: 859-864.
11. Vijay-Kumar S, Bugg CE, Cook WJ (1987) Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 194: 531-544.
12. Vijay-Kumar S, Bugg CE, Wilkinson KD, Vierstra RD, Hatfield PM, et al. (1987) Comparison of the three-dimensional structures of human, yeast, and oat ubiquitin. *J Biol Chem* 262: 6396-6399.
13. Chang YG, Yan XZ, Xie YY, Gao XC, Song AX, et al. (2008) Different roles for two ubiquitin-like domains of ISG15 in protein modification. *J Biol Chem* 283: 13370-13377.

14. Loeb KR, Haas AL (1992) The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. *J Biol Chem* 267: 7806-7813.
15. Hochstrasser M (2009) Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 458: 422-429.
16. Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67: 425-479.
17. Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD (2009) Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* 78: 363-397.
18. Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A (1980) ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 1365-1368.
19. 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.
20. Ciechanover A, Elias S, Heller H, Ferber S, Hershko A (1980) Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *J Biol Chem* 255: 7525-7528.
21. Ciechanover A, Heller H, Katz-Etzion R, Hershko A (1981) Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 761-765.
22. Ciechanover A, Elias S, Heller H, Hershko A (1982) "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* 257: 2537-2542.
23. Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A (1983) Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* 258: 8206-8214.
24. Haas AL, Bright PM (1988) The resolution and characterization of putative ubiquitin carrier protein isozymes from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* 263: 13258-13267.
25. Zimmerman ES, Schulman BA, Zheng N (2010) Structural assembly of cullin-RING ubiquitin ligase complexes. *Curr Opin Struct Biol* 20: 714-721.
26. Gavin JM, Chen JJ, Liao H, Rollins N, Yang X, et al. (2012) Mechanistic studies on activation of ubiquitin and di-ubiquitin-like protein, FAT10, by ubiquitin-like modifier activating enzyme 6, Uba6. *J Biol Chem* 287: 15512-15522.

27. Lake MW, Wuebbens MM, Rajagopalan KV, Schindelin H (2001) Mechanism of ubiquitin activation revealed by the structure of a bacterial MoeB-MoaD complex. *Nature* 414: 325-329.
28. Wang C, Xi J, Begley TP, Nicholson LK (2001) Solution structure of ThiS and implications for the evolutionary roots of ubiquitin. *Nat Struct Biol* 8: 47-51.
29. Xi J, Ge Y, Kinsland C, McLafferty FW, Begley TP (2001) Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin in *Escherichia coli*: identification of an acyl disulfide-linked protein--protein conjugate that is functionally analogous to the ubiquitin/E1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8513-8518.
30. Iyer LM, Burroughs AM, Aravind L (2006) The prokaryotic antecedents of the ubiquitin-signaling system and the early evolution of ubiquitin-like beta-grasp domains. *Genome Biol* 7: R60.
31. Lois LM, Lima CD (2005) Structures of the SUMO E1 provide mechanistic insights into SUMO activation and E2 recruitment to E1. *EMBO J* 24: 439-451.
32. Walden H, Podgorski MS, Schulman BA (2003) Insights into the ubiquitin transfer cascade from the structure of the activating enzyme for NEDD8. *Nature* 422: 330-334.
33. Lee I, Schindelin H (2008) Structural insights into E1-catalyzed ubiquitin activation and transfer to conjugating enzymes. *Cell* 134: 268-278.
34. Olsen SK, Capili AD, Lu X, Tan DS, Lima CD (2010) Active site remodelling accompanies thioester bond formation in the SUMO E1. *Nature* 463: 906-912.
35. Huang DT, Paydar A, Zhuang M, Waddell MB, Holton JM, et al. (2005) Structural basis for recruitment of Ubc12 by an E2 binding domain in NEDD8's E1. *Mol Cell* 17: 341-350.
36. Capili AD, Lima CD (2007) Taking it step by step: mechanistic insights from structural studies of ubiquitin/ubiquitin-like protein modification pathways. *Curr Opin Struct Biol* 17: 726-735.
37. Finley D, Ciechanover A, Varshavsky A (1984) Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* 37: 43-55.
38. Stephen AG, Trausch-Azar JS, Ciechanover A, Schwartz AL (1996) The ubiquitin-activating enzyme E1 is phosphorylated and localized to the nucleus in a cell cycle-dependent manner. *J Biol Chem* 271: 15608-15614.
39. Yuan W, Krug RM (2001) Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *EMBO J* 20: 362-371.

40. Yang Y, Kitagaki J, Dai RM, Tsai YC, Lorick KL, et al. (2007) Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics. *Cancer Res* 67: 9472-9481.
41. van Wijk SJ, Timmers HT (2010) The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *FASEB J* 24: 981-993.
42. Christensen DE, Klevit RE (2009) Dynamic interactions of proteins in complex networks: identifying the complete set of interacting E2s for functional investigation of E3-dependent protein ubiquitination. *FEBS J* 276: 5381-5389.
43. Wenzel DM, Stoll KE, Klevit RE (2011) E2s: structurally economical and functionally replete. *Biochem J* 433: 31-42.
44. Eletr ZM, Huang DT, Duda DM, Schulman BA, Kuhlman B (2005) E2 conjugating enzymes must disengage from their E1 enzymes before E3-dependent ubiquitin and ubiquitin-like transfer. *Nat Struct Mol Biol* 12: 933-934.
45. Burroughs AM, Jaffee M, Iyer LM, Aravind L (2008) Anatomy of the E2 ligase fold: implications for enzymology and evolution of ubiquitin/Ub-like protein conjugation. *J Struct Biol* 162: 205-218.
46. Winn PJ, Religa TL, Battey JN, Banerjee A, Wade RC (2004) Determinants of functionality in the ubiquitin conjugating enzyme family. *Structure* 12: 1563-1574.
47. Cook BW, Shaw GS (2012) Architecture of the catalytic HPN motif is conserved in all E2 conjugating enzymes. *Biochem J* 445: 167-174.
48. Tolbert BS, Tadj SG, Webb H, Snyder J, Nielsen JE, et al. (2005) The active site cysteine of ubiquitin-conjugating enzymes has a significantly elevated pKa: functional implications. *Biochemistry* 44: 16385-16391.
49. Michelle C, Vourc'h P, Mignon L, Andres CR (2009) What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor? *J Mol Evol* 68: 616-628.
50. Zheng N, Wang P, Jeffrey PD, Pavletich NP (2000) Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* 102: 533-539.
51. Dominguez C, Bonvin AM, Winkler GS, van Schaik FM, Timmers HT, et al. (2004) Structural model of the UbcH5B/CNOT4 complex revealed by combining NMR, mutagenesis, and docking approaches. *Structure* 12: 633-644.
52. Xu Z, Kohli E, Devlin KI, Bold M, Nix JC, et al. (2008) Interactions between the quality control ubiquitin ligase CHIP and ubiquitin conjugating enzymes. *BMC Struct Biol* 8: 26.



53. Mace PD, Linke K, Feltham R, Schumacher FR, Smith CA, et al. (2008) Structures of the cIAP2 RING domain reveal conformational changes associated with ubiquitin-conjugating enzyme (E2) recruitment. *J Biol Chem* 283: 31633-31640.
54. Yin Q, Lin SC, Lamothe B, Lu M, Lo YC, et al. (2009) E2 interaction and dimerization in the crystal structure of TRAF6. *Nat Struct Mol Biol* 16: 658-666.
55. Bentley ML, Corn JE, Dong KC, Phung Q, Cheung TK, et al. (2011) Recognition of UbcH5c and the nucleosome by the Bmi1/Ring1b ubiquitin ligase complex. *EMBO J* 30: 3285-3297.
56. Chen B, Mariano J, Tsai YC, Chan AH, Cohen M, et al. (2006) The activity of a human endoplasmic reticulum-associated degradation E3, gp78, requires its Cue domain, RING finger, and an E2-binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 341-346.
57. Hibbert RG, Huang A, Boelens R, Sixma TK (2011) E3 ligase Rad18 promotes monoubiquitination rather than ubiquitin chain formation by E2 enzyme Rad6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 5590-5595.
58. Das R, Mariano J, Tsai YC, Kalathur RC, Kostova Z, et al. (2009) Allosteric activation of E2-RING finger-mediated ubiquitylation by a structurally defined specific E2-binding region of gp78. *Mol Cell* 34: 674-685.
59. Reverter D, Lima CD (2005) Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex. *Nature* 435: 687-692.
60. Page RC, Pruneda JN, Amick J, Klevit RE, Misra S (2012) Structural insights into the conformation and oligomerization of E2~ubiquitin conjugates. *Biochemistry* 51: 4175-4187.
61. Serniwka SA, Shaw GS (2009) The structure of the UbcH8-ubiquitin complex shows a unique ubiquitin interaction site. *Biochemistry* 48: 12169-12179.
62. Sakata E, Satoh T, Yamamoto S, Yamaguchi Y, Yagi-Utsumi M, et al. (2010) Crystal structure of UbcH5b~ubiquitin intermediate: insight into the formation of the self-assembled E2~Ub conjugates. *Structure* 18: 138-147.
63. Pruneda JN, Stoll KE, Bolton LJ, Brzovic PS, Klevit RE (2011) Ubiquitin in motion: structural studies of the ubiquitin-conjugating enzyme approximately ubiquitin conjugate. *Biochemistry* 50: 1624-1633.
64. Brzovic PS, Lissounov A, Christensen DE, Hoyt DW, Klevit RE (2006) A UbcH5/ubiquitin noncovalent complex is required for processive BRCA1-directed ubiquitination. *Mol Cell* 21: 873-880.

65. Knipscheer P, van Dijk WJ, Olsen JV, Mann M, Sixma TK (2007) Noncovalent interaction between Ubc9 and SUMO promotes SUMO chain formation. *EMBO J* 26: 2797-2807.
66. Lewis MJ, Saltibus LF, Hau DD, Xiao W, Spyropoulos L (2006) Structural basis for non-covalent interaction between ubiquitin and the ubiquitin conjugating enzyme variant human MMS2. *J Biomol NMR* 34: 89-100.
67. Eddins MJ, Carlile CM, Gomez KM, Pickart CM, Wolberger C (2006) Mms2-Ubc13 covalently bound to ubiquitin reveals the structural basis of linkage-specific polyubiquitin chain formation. *Nat Struct Mol Biol* 13: 915-920.
68. Papaleo E, Casiraghi N, Arrigoni A, Vanoni M, Coccetti P, et al. (2012) Loop 7 of E2 enzymes: an ancestral conserved functional motif involved in the E2-mediated steps of the ubiquitination cascade. *PLoS One* 7: e40786.
69. Coccetti P, Tripodi F, Tedeschi G, Nonnis S, Marin O, et al. (2008) The CK2 phosphorylation of catalytic domain of Cdc34 modulates its activity at the G1 to S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Cycle* 7: 1391-1401.
70. Papaleo E, Ranzani V, Tripodi F, Vitriolo A, Cirulli C, et al. (2011) An acidic loop and cognate phosphorylation sites define a molecular switch that modulates ubiquitin charging activity in Cdc34-like enzymes. *PLoS Comput Biol* 7: e1002056.
71. Huang DT, Ayrault O, Hunt HW, Taherbhoy AM, Duda DM, et al. (2009) E2-RING expansion of the NEDD8 cascade confers specificity to cullin modification. *Mol Cell* 33: 483-495.
72. Spratt DE, Shaw GS (2011) Association of the disordered C-terminus of CDC34 with a catalytically bound ubiquitin. *J Mol Biol* 407: 425-438.
73. Wilson RC, Edmondson SP, Flatt JW, Helms K, Twigg PD (2011) The E2-25K ubiquitin-associated (UBA) domain aids in polyubiquitin chain synthesis and linkage specificity. *Biochem Biophys Res Commun* 405: 662-666.
74. Scott DC, Monda JK, Bennett EJ, Harper JW, Schulman BA (2011) N-terminal acetylation acts as an avidity enhancer within an interconnected multiprotein complex. *Science* 334: 674-678.
75. Ravid T, Hochstrasser M (2007) Autoregulation of an E2 enzyme by ubiquitin-chain assembly on its catalytic residue. *Nat Cell Biol* 9: 422-427.
76. Semplici F, Meggio F, Pinna LA, Oliviero S (2002) CK2-dependent phosphorylation of the E2 ubiquitin conjugating enzyme UBC3B induces its interaction with beta-TrCP and enhances beta-catenin degradation. *Oncogene* 21: 3978-3987.

77. Zou W, Papov V, Malakhova O, Kim KI, Dao C, et al. (2005) ISG15 modification of ubiquitin E2 Ubc13 disrupts its ability to form thioester bond with ubiquitin. *Biochem Biophys Res Commun* 336: 61-68.
78. Pichler A, Knipscheer P, Oberhofer E, van Dijk WJ, Korner R, et al. (2005) SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nat Struct Mol Biol* 12: 264-269.
79. Knipscheer P, Flotho A, Klug H, Olsen JV, van Dijk WJ, et al. (2008) Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination. *Mol Cell* 31: 371-382.
80. Deshaies RJ, Joazeiro CA (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78: 399-434.
81. Buday L, Tompa P (2010) Functional classification of scaffold proteins and related molecules. *FEBS J* 277: 4348-4355.
82. Notenboom V, Hibbert RG, van Rossum-Fikkert SE, Olsen JV, Mann M, et al. (2007) Functional characterization of Rad18 domains for Rad6, ubiquitin, DNA binding and PCNA modification. *Nucleic Acids Res* 35: 5819-5830.
83. Zheng N, Schulman BA, Song L, Miller JJ, Jeffrey PD, et al. (2002) Structure of the Cull1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* 416: 703-709.
84. Rotin D, Kumar S (2009) Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 398-409.
85. Pickart CM, Eddins MJ (2004) Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695: 55-72.
86. Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM (1995) Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 373: 81-83.
87. Huang L, Kinnucan E, Wang G, Beaudenon S, Howley PM, et al. (1999) Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science* 286: 1321-1326.
88. Ogunjimi AA, Wiesner S, Briant DJ, Varelas X, Sicheri F, et al. (2010) The ubiquitin binding region of the Smurf HECT domain facilitates polyubiquitylation and binding of ubiquitylated substrates. *J Biol Chem* 285: 6308-6315.
89. Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, et al. (1999) RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11364-11369.

90. Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M, Ishida N, Nakayama KI (2001) U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem* 276: 33111-33120.
91. Jackson PK (2001) A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev* 15: 3053-3058.
92. Wenzel DM, Lissounov A, Brzovic PS, Klevit RE (2011) UBC7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids. *Nature* 474: 105-108.
93. Dove KK, Klevit RE (2012) RING-between-RINGs-keeping the safety on loaded guns. *EMBO J*.
94. Yin Q, Lamothe B, Darnay BG, Wu H (2009) Structural basis for the lack of E2 interaction in the RING domain of TRAF2. *Biochemistry* 48: 10558-10567.
95. Petroski MD, Deshaies RJ (2005) Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 9-20.
96. Thien CB, Langdon WY (2005) c-Cbl and Cbl-b ubiquitin ligases: substrate diversity and the negative regulation of signalling responses. *Biochem J* 391: 153-166.
97. Wang X, Jiang X (2012) Mdm2 and MdmX partner to regulate p53. *FEBS Lett* 586: 1390-1396.
98. Megas C, Hatzivassiliou EG, Yin Q, Marinopoulou E, Hadweh P, et al. (2011) Mutational analysis of TRAF6 reveals a conserved functional role of the RING dimerization interface and a potentially necessary but insufficient role of RING-dependent TRAF6 polyubiquitination towards NF-kappaB activation. *Cell Signal* 23: 772-777.
99. Napolitano LM, Meroni G (2012) TRIM family: Pleiotropy and diversification through homomultimer and heteromultimer formation. *IUBMB Life* 64: 64-71.
100. Freemont PS, Hanson IM, Trowsdale J (1991) A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell* 64: 483-484.
101. Barlow PN, Luisi B, Milner A, Elliott M, Everett R (1994) Structure of the C3HC4 domain by 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. A new structural class of zinc-finger. *J Mol Biol* 237: 201-211.
102. Bellon SF, Rodgers KK, Schatz DG, Coleman JE, Steitz TA (1997) Crystal structure of the RAG1 dimerization domain reveals multiple zinc-binding motifs including a novel zinc binuclear cluster. *Nat Struct Biol* 4: 586-591.
103. Brzovic PS, Rajagopal P, Hoyt DW, King MC, Klevit RE (2001) Structure of a BRCA1-BARD1 heterodimeric RING-RING complex. *Nat Struct Biol* 8: 833-837.

104. Yunus AA, Lima CD (2009) Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 ligase Siz1 and determinants required for SUMO modification of PCNA. *Mol Cell* 35: 669-682.
105. Ohi MD, Vander Kooi CW, Rosenberg JA, Chazin WJ, Gould KL (2003) Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. *Nat Struct Biol* 10: 250-255.
106. Xie Y, Varshavsky A (1999) The E2-E3 interaction in the N-end rule pathway: the RING-H2 finger of E3 is required for the synthesis of multiubiquitin chain. *EMBO J* 18: 6832-6844.
107. Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, et al. (1999) Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* 4: 1029-1040.
108. Yokouchi M, Kondo T, Houghton A, Bartkiewicz M, Horne WC, et al. (1999) Ligand-induced ubiquitination of the epidermal growth factor receptor involves the interaction of the c-Cbl RING finger and UbCH7. *J Biol Chem* 274: 31707-31712.
109. Joazeiro CA, Wing SS, Huang H, Levenson JD, Hunter T, et al. (1999) The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* 286: 309-312.
110. Seol JH, Feldman RM, Zachariae W, Shevchenko A, Correll CC, et al. (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.
111. Tan P, Fuchs SY, Chen A, Wu K, Gomez C, et al. (1999) Recruitment of a ROC1-CUL1 ubiquitin ligase by Skp1 and HOS to catalyze the ubiquitination of I kappa B alpha. *Mol Cell* 3: 527-533.
112. Ohta T, Michel JJ, Schottelius AJ, Xiong Y (1999) ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* 3: 535-541.
113. Kamura T, Koepp DM, Conrad MN, Skowyra D, Moreland RJ, et al. (1999) Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* 284: 657-661.
114. Brzovic PS, Keefe JR, Nishikawa H, Miyamoto K, Fox D, 3rd, et al. (2003) Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5646-5651.
115. Plechanovova A, Jaffray EG, Tatham MH, Naismith JH, Hay RT (2012) Structure of a RING E3 ligase and ubiquitin-loaded E2 primed for catalysis. *Nature* 489: 115-120.

116. Pruneda JN, Littlefield PJ, Soss SE, Nordquist KA, Chazin WJ, et al. (2012) Structure of an E3:E2 approximately Ub Complex Reveals an Allosteric Mechanism Shared among RING/U-box Ligases. *Mol Cell*.
117. Dou H, Buetow L, Sibbet GJ, Cameron K, Huang DT (2012) BIRC7-E2 ubiquitin conjugate structure reveals the mechanism of ubiquitin transfer by a RING dimer. *Nat Struct Mol Biol* 19: 876-883.
118. Lima CD, Schulman BA (2012) Structural biology: A protein engagement RING. *Nature* 489: 43-44.
119. Calabrese MF, Scott DC, Duda DM, Grace CR, Kurinov I, et al. (2011) A RING E3-substrate complex poised for ubiquitin-like protein transfer: structural insights into cullin-RING ligases. *Nat Struct Mol Biol* 18: 947-949.
120. Skowyra D, Craig KL, Tyers M, Elledge SJ, Harper JW (1997) F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91: 209-219.
121. Verma R, Annan RS, Huddleston MJ, Carr SA, Reynard G, et al. (1997) Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase. *Science* 278: 455-460.
122. Yu X, Fu S, Lai M, Baer R, Chen J (2006) BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP. *Genes Dev* 20: 1721-1726.
123. Buchwald G, van der Stoop P, Weichenrieder O, Perrakis A, van Lohuizen M, et al. (2006) Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b. *EMBO J* 25: 2465-2474.
124. Huang A, Hibbert RG, de Jong RN, Das D, Sixma TK, et al. (2011) Symmetry and asymmetry of the RING-RING dimer of Rad18. *J Mol Biol* 410: 424-435.
125. Linares LK, Hengstermann A, Ciechanover A, Muller S, Scheffner M (2003) HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12009-12014.
126. Masuda Y, Suzuki M, Kawai H, Suzuki F, Kamiya K (2012) Asymmetric nature of two subunits of RAD18, a RING-type ubiquitin ligase E3, in the human RAD6A-RAD18 ternary complex. *Nucleic Acids Res* 40: 1065-1076.
127. Chaugule VK, Burchell L, Barber KR, Sidhu A, Leslie SJ, et al. (2011) Autoregulation of Parkin activity through its ubiquitin-like domain. *EMBO J* 30: 2853-2867.

128. Safadi SS, Barber KR, Shaw GS (2011) Impact of autosomal recessive juvenile Parkinson's disease mutations on the structure and interactions of the parkin ubiquitin-like domain. *Biochemistry* 50: 2603-2610.
129. Beasley SA, Hristova VA, Shaw GS (2007) Structure of the Parkin in-between-ring domain provides insights for E3-ligase dysfunction in autosomal recessive Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3095-3100.
130. Kozlov G, Peschard P, Zimmerman B, Lin T, Moldoveanu T, et al. (2007) Structural basis for UBA-mediated dimerization of c-Cbl ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 282: 27547-27555.
131. Tatham MH, Geoffroy MC, Shen L, Plechanovova A, Hattersley N, et al. (2008) RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat Cell Biol* 10: 538-546.
132. Manke IA, Lowery DM, Nguyen A, Yaffe MB (2003) BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science* 302: 636-639.
133. Sakata E, Yamaguchi Y, Miyauchi Y, Iwai K, Chiba T, et al. (2007) Direct interactions between NEDD8 and ubiquitin E2 conjugating enzymes upregulate cullin-based E3 ligase activity. *Nat Struct Mol Biol* 14: 167-168.
134. Rudner AD, Murray AW (2000) Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J Cell Biol* 149: 1377-1390.
135. Wang X, Taplick J, Geva N, Oren M (2004) Inhibition of p53 degradation by Mdm2 acetylation. *FEBS Lett* 561: 195-201.
136. Lipkowitz S, Weissman AM (2011) RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis. *Nat Rev Cancer* 11: 629-643.
137. Wang Q, Moyret-Lalle C, Couzon F, Surbiguet-Clippe C, Saurin JC, et al. (2003) Alterations of anaphase-promoting complex genes in human colon cancer cells. *Oncogene* 22: 1486-1490.
138. Hashizume R, Fukuda M, Maeda I, Nishikawa H, Oyake D, et al. (2001) The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem* 276: 14537-14540.
139. de The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A (1990) The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* 347: 558-561.

140. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B (1992) Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358: 80-83.
141. Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, et al. (1989) A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243: 1576-1583.
142. Gregori L, Poosch MS, Cousins G, Chau V (1990) A uniform isopeptide-linked multiubiquitin chain is sufficient to target substrate for degradation in ubiquitin-mediated proteolysis. *J Biol Chem* 265: 8354-8357.
143. Finley D, Sadis S, Monia BP, Boucher P, Ecker DJ, et al. (1994) Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. *Mol Cell Biol* 14: 5501-5509.
144. Eytan E, Ganoth D, Armon T, Hershko A (1989) ATP-dependent incorporation of 20S protease into the 26S complex that degrades proteins conjugated to ubiquitin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7751-7755.
145. Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 19: 94-102.
146. Komander D, Rape M (2012) The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* 81: 203-229.
147. Husnjak K, Dikic I (2012) Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu Rev Biochem* 81: 291-322.
148. Hicke L (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 195-201.
149. Mukhopadhyay D, Riezman H (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315: 201-205.
150. Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, et al. (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* 21: 921-926.
151. Morris JR, Solomon E (2004) BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Hum Mol Genet* 13: 807-817.
152. Xu P, Duong DM, Seyfried NT, Cheng D, Xie Y, et al. (2009) Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* 137: 133-145.
153. Jin L, Williamson A, Banerjee S, Philipp I, Rape M (2008) Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell* 133: 653-665.



154. Mastrandrea LD, You J, Niles EG, Pickart CM (1999) E2/E3-mediated assembly of lysine 29-linked polyubiquitin chains. *J Biol Chem* 274: 27299-27306.
155. Sun L, Chen ZJ (2004) The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol* 16: 119-126.
156. Matsumoto ML, Wickliffe KE, Dong KC, Yu C, Bosanac I, et al. (2010) K11-linked polyubiquitination in cell cycle control revealed by a K11 linkage-specific antibody. *Mol Cell* 39: 477-484.
157. Johnson ES, Ma PC, Ota IM, Varshavsky A (1995) A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem* 270: 17442-17456.
158. Saeki Y, Kudo T, Sone T, Kikuchi Y, Yokosawa H, et al. (2009) Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *EMBO J* 28: 359-371.
159. Flick K, Raasi S, Zhang H, Yen JL, Kaiser P (2006) A ubiquitin-interacting motif protects polyubiquitinated Met4 from degradation by the 26S proteasome. *Nat Cell Biol* 8: 509-515.
160. Merkle N, Shaw GS (2004) Solution structure of the flexible class II ubiquitin-conjugating enzyme Ubc1 provides insights for polyubiquitin chain assembly. *J Biol Chem* 279: 47139-47147.
161. Gyrð-Hansen M, Darding M, Miasari M, Santoro MM, Zender L, et al. (2008) IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF- $\kappa$ B as well as cell survival and oncogenesis. *Nat Cell Biol* 10: 1309-1317.
162. Blankenship JW, Varfolomeev E, Goncharov T, Fedorova AV, Kirkpatrick DS, et al. (2009) Ubiquitin binding modulates IAP antagonist-stimulated proteasomal degradation of c-IAP1 and c-IAP2(1). *Biochem J* 417: 149-160.
163. Davies GC, Ettenberg SA, Coats AO, Mussante M, Ravichandran S, et al. (2004) Cbl-b interacts with ubiquitinated proteins; differential functions of the UBA domains of c-Cbl and Cbl-b. *Oncogene* 23: 7104-7115.
164. Smit JJ, Monteferrario D, Noordermeer SM, van Dijk WJ, van der Reijden BA, et al. (2012) The E3 ligase HOIP specifies linear ubiquitin chain assembly through its RING-IBR-RING domain and the unique LDD extension. *EMBO J* 31: 3833-3844.
165. Yagi H, Ishimoto K, Hiromoto T, Fujita H, Mizushima T, et al. (2012) A non-canonical UBA-UBL interaction forms the linear-ubiquitin-chain assembly complex. *EMBO Rep* 13: 462-468.

166. Zhang N, Wang Q, Ehlinger A, Randles L, Lary JW, et al. (2009) Structure of the s5a:k48-linked diubiquitin complex and its interactions with rpn13. *Mol Cell* 35: 280-290.
167. Schreiner P, Chen X, Husnjak K, Randles L, Zhang N, et al. (2008) Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction. *Nature* 453: 548-552.
168. Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88: 97-107.
169. 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.
170. Shen Z, Pardington-Purtymun PE, Comeaux JC, Moyzis RK, Chen DJ (1996) UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics* 36: 271-279.
171. Okura T, Gong L, Kamitani T, Wada T, Okura I, et al. (1996) Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J Immunol* 157: 4277-4281.
172. Matunis MJ, Coutavas E, Blobel G (1996) A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 135: 1457-1470.
173. Johnson ES, Blobel G (1997) Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J Biol Chem* 272: 26799-26802.
174. Desterro JM, Rodriguez MS, Kemp GD, Hay RT (1999) Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *J Biol Chem* 274: 10618-10624.
175. Gong L, Li B, Millas S, Yeh ET (1999) Molecular cloning and characterization of human AOS1 and UBA2, components of the sentrin-activating enzyme complex. *FEBS Lett* 448: 185-189.
176. Okuma T, Honda R, Ichikawa G, Tsumagari N, Yasuda H (1999) In vitro SUMO-1 modification requires two enzymatic steps, E1 and E2. *Biochem Biophys Res Commun* 254: 693-698.
177. Desterro JM, Thomson J, Hay RT (1997) Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS Lett* 417: 297-300.

178. Lee GW, Melchior F, Matunis MJ, Mahajan R, Tian Q, et al. (1998) Modification of Ran GTPase-activating protein by the small ubiquitin-related modifier SUMO-1 requires Ubc9, an E2-type ubiquitin-conjugating enzyme homologue. *J Biol Chem* 273: 6503-6507.
179. Saitoh H, Pu R, Cavenagh M, Dasso M (1997) RanBP2 associates with Ubc9p and a modified form of RanGAP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3736-3741.
180. Li SJ, Hochstrasser M (1999) A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* 398: 246-251.
181. Gong L, Millas S, Maul GG, Yeh ET (2000) Differential regulation of sumoylated proteins by a novel sumoylation-specific protease. *J Biol Chem* 275: 3355-3359.
182. Sachdev S, Bruhn L, Sieber H, Pichler A, Melchior F, et al. (2001) PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* 15: 3088-3103.
183. Kotaja N, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ (2002) PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol Cell Biol* 22: 5222-5234.
184. Pichler A, Gast A, Seeler JS, Dejean A, Melchior F (2002) The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108: 109-120.
185. Schmidt D, Muller S (2002) Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2872-2877.
186. Takahashi Y, Kahyo T, Toh EA, Yasuda H, Kikuchi Y (2001) Yeast Ull1/Siz1 is a novel SUMO1/Smt3 ligase for septin components and functions as an adaptor between conjugating enzyme and substrates. *J Biol Chem* 276: 48973-48977.
187. Johnson ES, Gupta AA (2001) An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* 106: 735-744.
188. Sternsdorf T, Jensen K, Reich B, Will H (1999) The nuclear dot protein sp100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers. *J Biol Chem* 274: 12555-12566.
189. Gill G (2004) SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* 18: 2046-2059.
190. Chosed R, Mukherjee S, Lois LM, Orth K (2006) Evolution of a signalling system that incorporates both redundancy and diversity: Arabidopsis SUMOylation. *Biochem J* 398: 521-529.

191. Chen A, Mannen H, Li SS (1998) Characterization of mouse ubiquitin-like SMT3A and SMT3B cDNAs and gene/pseudogenes. *Biochem Mol Biol Int* 46: 1161-1174.
192. Lapenta V, Chiurazzi P, van der Spek P, Pizzuti A, Hanaoka F, et al. (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.
193. Johnson ES, Schwienhorst I, Dohmen RJ, Blobel G (1997) The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *EMBO J* 16: 5509-5519.
194. Tanaka K, Nishide J, Okazaki K, Kato H, Niwa O, et al. (1999) Characterization of a fission yeast SUMO-1 homologue, pmt3p, required for multiple nuclear events, including the control of telomere length and chromosome segregation. *Mol Cell Biol* 19: 8660-8672.
195. Novatchkova M, Budhiraja R, Coupland G, Eisenhaber F, Bachmair A (2004) SUMO conjugation in plants. *Planta* 220: 1-8.
196. Bayer P, Arndt A, Metzger S, Mahajan R, Melchior F, et al. (1998) Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280: 275-286.
197. Ding H, Xu Y, Chen Q, Dai H, Tang Y, et al. (2005) Solution structure of human SUMO-3 C47S and its binding surface for Ubc9. *Biochemistry* 44: 2790-2799.
198. Yuan H, Zhou J, Deng M, Liu X, Le Bras M, et al. (2010) Small ubiquitin-related modifier paralogs are indispensable but functionally redundant during early development of zebrafish. *Cell Res* 20: 185-196.
199. Saitoh H, Hinchev J (2000) Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* 275: 6252-6258.
200. Schimmel J, Larsen KM, Matic I, van Hagen M, Cox J, et al. (2008) The ubiquitin-proteasome system is a key component of the SUMO-2/3 cycle. *Mol Cell Proteomics* 7: 2107-2122.
201. Zhang XD, Goeres J, Zhang H, Yen TJ, Porter AC, et al. (2008) SUMO-2/3 modification and binding regulate the association of CENP-E with kinetochores and progression through mitosis. *Mol Cell* 29: 729-741.
202. Gong L, Yeh ET (2006) Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *J Biol Chem* 281: 15869-15877.

203. Zhang FP, Mikkonen L, Toppari J, Palvimo JJ, Thesleff I, et al. (2008) Sumo-1 function is dispensable in normal mouse development. *Mol Cell Biol* 28: 5381-5390.
204. Evdokimov E, Sharma P, Lockett SJ, Lualdi M, Kuehn MR (2008) Loss of SUMO1 in mice affects RanGAP1 localization and formation of PML nuclear bodies, but is not lethal as it can be compensated by SUMO2 or SUMO3. *J Cell Sci* 121: 4106-4113.
205. Ayaydin F, Dasso M (2004) Distinct in vivo dynamics of vertebrate SUMO paralogues. *Mol Biol Cell* 15: 5208-5218.
206. Guo D, Li M, Zhang Y, Yang P, Eckenrode S, et al. (2004) A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet* 36: 837-841.
207. Smyth DJ, Howson JM, Lowe CE, Walker NM, Lam AC, et al. (2005) Assessing the validity of the association between the SUMO4 M55V variant and risk of type 1 diabetes. *Nat Genet* 37: 110-111; author reply 112-113.
208. Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA, Desterro JM, Botting CH, et al. (2001) Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* 276: 35368-35374.
209. Cheng CH, Lo YH, Liang SS, Ti SC, Lin FM, et al. (2006) SUMO modifications control assembly of synaptonemal complex and polycomplex in meiosis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 20: 2067-2081.
210. Skilton A, Ho JC, Mercer B, Outwin E, Watts FZ (2009) SUMO chain formation is required for response to replication arrest in *S. pombe*. *PLoS One* 4: e6750.
211. Matic I, Macek B, Hilger M, Walther TC, Mann M (2008) Phosphorylation of SUMO-1 occurs in vivo and is conserved through evolution. *J Proteome Res* 7: 4050-4057.
212. Cooper HJ, Tatham MH, Jaffray E, Heath JK, Lam TT, et al. (2005) Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for the analysis of small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification: identification of lysines in RanBP2 and SUMO targeted for modification during the E3 autoSUMOylation reaction. *Anal Chem* 77: 6310-6319.
213. Wagner SA, Beli P, Weinert BT, Nielsen ML, Cox J, et al. (2011) A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. *Mol Cell Proteomics* 10: M111 013284.
214. Muller S, Hoege C, Pyrowolakis G, Jentsch S (2001) SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 202-210.

215. Pichler A, Knipscheer P, Saitoh H, Sixma TK, Melchior F (2004) The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type. *Nat Struct Mol Biol* 11: 984-991.
216. Kagey MH, Melhuish TA, Wotton D (2003) The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* 113: 127-137.
217. Weger S, Hammer E, Heilbronn R (2005) Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo. *FEBS Lett* 579: 5007-5012.
218. Lu X, Olsen SK, Capili AD, Cisar JS, Lima CD, et al. (2010) Designed semisynthetic protein inhibitors of Ub/Ubl E1 activating enzymes. *J Am Chem Soc* 132: 1748-1749.
219. Bossis G, Melchior F (2006) Regulation of SUMOylation by reversible oxidation of SUMO conjugating enzymes. *Mol Cell* 21: 349-357.
220. Wang J, Cai S, Chen Y (2010) Mechanism of E1-E2 interaction for the inhibition of Ubl adenylation. *J Biol Chem* 285: 33457-33462.
221. Azuma Y, Tan SH, Cavenagh MM, Ainsztein AM, Saitoh H, et al. (2001) Expression and regulation of the mammalian SUMO-1 E1 enzyme. *FASEB J* 15: 1825-1827.
222. Truong K, Lee TD, Chen Y (2012) Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of E1 Cys domain inhibits E1 Cys domain enzymatic activity. *J Biol Chem* 287: 15154-15163.
223. Wimmer P, Schreiner S, Dobner T (2012) Human pathogens and the host cell SUMOylation system. *J Virol* 86: 642-654.
224. Boggio R, Colombo R, Hay RT, Draetta GF, Chiocca S (2004) A mechanism for inhibiting the SUMO pathway. *Mol Cell* 16: 549-561.
225. Seufert W, Futcher B, Jentsch S (1995) Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* 373: 78-81.
226. Betting J, Seufert W (1996) A yeast Ubc9 mutant protein with temperature-sensitive in vivo function is subject to conditional proteolysis by a ubiquitin- and proteasome-dependent pathway. *J Biol Chem* 271: 25790-25796.
227. Nacerddine K, Lehembre F, Bhaumik M, Artus J, Cohen-Tannoudji M, et al. (2005) The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell* 9: 769-779.
228. Hayashi T, Seki M, Maeda D, Wang W, Kawabe Y, et al. (2002) Ubc9 is essential for viability of higher eukaryotic cells. *Exp Cell Res* 280: 212-221.

229. Tong H, Hateboer G, Perrakis A, Bernards R, Sixma TK (1997) Crystal structure of murine/human Ubc9 provides insight into the variability of the ubiquitin-conjugating system. *J Biol Chem* 272: 21381-21387.
230. Giraud MF, Desterro JM, Naismith JH (1998) Structure of ubiquitin-conjugating enzyme 9 displays significant differences with other ubiquitin-conjugating enzymes which may reflect its specificity for sumo rather than ubiquitin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54: 891-898.
231. Sampson DA, Wang M, Matunis MJ (2001) The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 276: 21664-21669.
232. Tatham MH, Chen Y, Hay RT (2003) Role of two residues proximal to the active site of Ubc9 in substrate recognition by the Ubc9.SUMO-1 thiolester complex. *Biochemistry* 42: 3168-3179.
233. Wang J, Taherbhoy AM, Hunt HW, Seyedin SN, Miller DW, et al. (2010) Crystal structure of UBA2(ufd)-Ubc9: insights into E1-E2 interactions in Sumo pathways. *PLoS One* 5: e15805.
234. Wilken N, Senecal JL, Scheer U, Dabauvalle MC (1995) Localization of the Ran-GTP binding protein RanBP2 at the cytoplasmic side of the nuclear pore complex. *Eur J Cell Biol* 68: 211-219.
235. Tatham MH, Kim S, Jaffray E, Song J, Chen Y, et al. (2005) Unique binding interactions among Ubc9, SUMO and RanBP2 reveal a mechanism for SUMO paralog selection. *Nat Struct Mol Biol* 12: 67-74.
236. Kahyo T, Nishida T, Yasuda H (2001) Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell* 8: 713-718.
237. Takahashi Y, Toh-e A, Kikuchi Y (2001) A novel factor required for the SUMO1/Smt3 conjugation of yeast septins. *Gene* 275: 223-231.
238. Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, et al. (1998) Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10626-10631.
239. Janne OA, Moilanen AM, Poukka H, Rouleau N, Karvonen U, et al. (2000) Androgen-receptor-interacting nuclear proteins. *Biochem Soc Trans* 28: 401-405.
240. Liu Q, Jin C, Liao X, Shen Z, Chen DJ, et al. (1999) The binding interface between an E2 (UBC9) and a ubiquitin homologue (UBL1). *J Biol Chem* 274: 16979-16987.

241. Bencsath KP, Podgorski MS, Pagala VR, Slaughter CA, Schulman BA (2002) Identification of a multifunctional binding site on Ubc9p required for Smt3p conjugation. *J Biol Chem* 277: 47938-47945.
242. Ding H, Yang Y, Zhang J, Wu J, Liu H, et al. (2005) Structural basis for SUMO-E2 interaction revealed by a complex model using docking approach in combination with NMR data. *Proteins* 61: 1050-1058.
243. Duda DM, van Waardenburg RC, Borg LA, McGarity S, Nourse A, et al. (2007) Structure of a SUMO-binding-motif mimic bound to Smt3p-Ubc9p: conservation of a non-covalent ubiquitin-like protein-E2 complex as a platform for selective interactions within a SUMO pathway. *J Mol Biol* 369: 619-630.
244. Tatham MH, Kim S, Yu B, Jaffray E, Song J, et al. (2003) Role of an N-terminal site of Ubc9 in SUMO-1, -2, and -3 binding and conjugation. *Biochemistry* 42: 9959-9969.
245. Capili AD, Lima CD (2007) Structure and analysis of a complex between SUMO and Ubc9 illustrates features of a conserved E2-Ubl interaction. *J Mol Biol* 369: 608-618.
246. Sekiyama N, Arita K, Ikeda Y, Hashiguchi K, Ariyoshi M, et al. (2010) Structural basis for regulation of poly-SUMO chain by a SUMO-like domain of Nip45. *Proteins* 78: 1491-1502.
247. Prudden J, Perry JJ, Nie M, Vashisht AA, Arvai AS, et al. (2011) DNA repair and global sumoylation are regulated by distinct Ubc9 noncovalent complexes. *Mol Cell Biol* 31: 2299-2310.
248. Beasley SA, Safadi SS, Barber KR, Shaw GS (2012) Solution structure of the E3 ligase HOIL-1 Ubl domain. *Protein Sci* 21: 1085-1092.
249. Faesen AC, Luna-Vargas MP, Sixma TK (2012) The role of UBL domains in ubiquitin-specific proteases. *Biochem Soc Trans* 40: 539-545.
250. Tomasi ML, Tomasi I, Ramani K, Pascale RM, Xu J, et al. (2012) S-adenosyl methionine regulates ubiquitin-conjugating enzyme 9 protein expression and sumoylation in murine liver and human cancers. *Hepatology* 56: 982-993.
251. Su YF, Yang T, Huang H, Liu LF, Hwang J (2012) Phosphorylation of Ubc9 by Cdk1 enhances SUMOylation activity. *PLoS One* 7: e34250.
252. Reindle A, Belichenko I, Bylebyl GR, Chen XL, Gandhi N, et al. (2006) Multiple domains in Siz SUMO ligases contribute to substrate selectivity. *J Cell Sci* 119: 4749-4757.



253. Merrill JC, Melhuish TA, Kagey MH, Yang SH, Sharrocks AD, et al. (2010) A role for non-covalent SUMO interaction motifs in Pc2/CBX4 E3 activity. *PLoS One* 5: e8794.
254. Yang SH, Sharrocks AD (2010) The SUMO E3 ligase activity of Pc2 is coordinated through a SUMO interaction motif. *Mol Cell Biol* 30: 2193-2205.
255. Gorlich D, Kutay U (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 607-660.
256. Werner A, Flotho A, Melchior F (2012) The RanBP2/RanGAP1\*SUMO1/Ubc9 complex is a multisubunit SUMO E3 ligase. *Mol Cell* 46: 287-298.
257. Wotton D, Merrill JC (2007) Pc2 and SUMOylation. *Biochem Soc Trans* 35: 1401-1404.
258. Rytinki MM, Kaikkonen S, Pehkonen P, Jaaskelainen T, Palvimo JJ (2009) PIAS proteins: pleiotropic interactors associated with SUMO. *Cell Mol Life Sci* 66: 3029-3041.
259. Shuai K, Liu B (2005) Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5: 593-605.
260. Liu B, Mink S, Wong KA, Stein N, Getman C, et al. (2004) PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity. *Nat Immunol* 5: 891-898.
261. Santti H, Mikkonen L, Anand A, Hirvonen-Santti S, Toppari J, et al. (2005) Disruption of the murine PIASx gene results in reduced testis weight. *J Mol Endocrinol* 34: 645-654.
262. Roth W, Sustmann C, Kieslinger M, Gilmozzi A, Irmer D, et al. (2004) PIASy-deficient mice display modest defects in IFN and Wnt signaling. *J Immunol* 173: 6189-6199.
263. Wong KA, Kim R, Christofk H, Gao J, Lawson G, et al. (2004) Protein inhibitor of activated STAT Y (PIASy) and a splice variant lacking exon 6 enhance sumoylation but are not essential for embryogenesis and adult life. *Mol Cell Biol* 24: 5577-5586.
264. Tahk S, Liu B, Chernishof V, Wong KA, Wu H, et al. (2007) Control of specificity and magnitude of NF-kappa B and STAT1-mediated gene activation through PIASy and PIAS1 cooperation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 11643-11648.
265. Aravind L, Koonin EV (2000) SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem Sci* 25: 112-114.

266. Okubo S, Hara F, Tsuchida Y, Shimotakahara S, Suzuki S, et al. (2004) NMR structure of the N-terminal domain of SUMO ligase PIAS1 and its interaction with tumor suppressor p53 and A/T-rich DNA oligomers. *J Biol Chem* 279: 31455-31461.
267. Munarriz E, Barcaroli D, Stephanou A, Townsend PA, Maisse C, et al. (2004) PIAS-1 is a checkpoint regulator which affects exit from G1 and G2 by sumoylation of p73. *Mol Cell Biol* 24: 10593-10610.
268. Onishi A, Peng GH, Hsu C, Alexis U, Chen S, et al. (2009) Pias3-dependent SUMOylation directs rod photoreceptor development. *Neuron* 61: 234-246.
269. Morris JR, Boutell C, Keppler M, Densham R, Weekes D, et al. (2009) The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature* 462: 886-890.
270. Galanty Y, Belotserkovskaya R, Coates J, Polo S, Miller KM, et al. (2009) Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. *Nature* 462: 935-939.
271. Stehmeier P, Muller S (2009) Phospho-regulated SUMO interaction modules connect the SUMO system to CK2 signaling. *Mol Cell* 33: 400-409.
272. Pungaliya P, Kulkarni D, Park HJ, Marshall H, Zheng H, et al. (2007) TOPORS functions as a SUMO-1 E3 ligase for chromatin-modifying proteins. *J Proteome Res* 6: 3918-3923.
273. Weger S, Hammer E, Engstler M (2003) The DNA topoisomerase I binding protein topors as a novel cellular target for SUMO-1 modification: characterization of domains necessary for subcellular localization and sumolation. *Exp Cell Res* 290: 13-27.
274. Mukhopadhyay D, Dasso M (2007) Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends Biochem Sci* 32: 286-295.
275. Reverter D, Lima CD (2004) A basis for SUMO protease specificity provided by analysis of human Senp2 and a Senp2-SUMO complex. *Structure* 12: 1519-1531.
276. Xu Z, Au SW (2005) Mapping residues of SUMO precursors essential in differential maturation by SUMO-specific protease, SENP1. *Biochem J* 386: 325-330.
277. Shen L, Tatham MH, Dong C, Zagorska A, Naismith JH, et al. (2006) SUMO protease SENP1 induces isomerization of the scissile peptide bond. *Nat Struct Mol Biol* 13: 1069-1077.

278. Reverter D, Lima CD (2006) Structural basis for SENP2 protease interactions with SUMO precursors and conjugated substrates. *Nat Struct Mol Biol* 13: 1060-1068.
279. Mukhopadhyay D, Ayaydin F, Kolli N, Tan SH, Anan T, et al. (2006) SUSP1 antagonizes formation of highly SUMO2/3-conjugated species. *J Cell Biol* 174: 939-949.
280. Chen YZ, Chen Z, Gong YA, Ying G (2012) SUMOhydro: a novel method for the prediction of sumoylation sites based on hydrophobic properties. *PLoS One* 7: e39195.
281. Xu J, He Y, Qiang B, Yuan J, Peng X, et al. (2008) A novel method for high accuracy sumoylation site prediction from protein sequences. *BMC Bioinformatics* 9: 8.
282. Liu B, Li S, Wang Y, Lu L, Li Y, et al. (2007) Predicting the protein SUMO modification sites based on Properties Sequential Forward Selection (PSFS). *Biochem Biophys Res Commun* 358: 136-139.
283. Da Silva-Ferrada E, Lopitz-Otsoa F, Lang V, Rodriguez MS, Matthiesen R (2012) Strategies to Identify Recognition Signals and Targets of SUMOylation. *Biochem Res Int* 2012: 875148.
284. Bernier-Villamor V, Sampson DA, Matunis MJ, Lima CD (2002) Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* 108: 345-356.
285. Matic I, Schimmel J, Hendriks IA, van Santen MA, van de Rijke F, et al. (2010) Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif. *Mol Cell* 39: 641-652.
286. Yang SH, Galanis A, Witty J, Sharrocks AD (2006) An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *EMBO J* 25: 5083-5093.
287. Yang XJ, Gregoire S (2006) A recurrent phospho-sumoyl switch in transcriptional repression and beyond. *Mol Cell* 23: 779-786.
288. Hietakangas V, Ahlskog JK, Jakobsson AM, Hellesuo M, Sahlberg NM, et al. (2003) Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol* 23: 2953-2968.
289. Mohideen F, Capili AD, Bilimoria PM, Yamada T, Bonni A, et al. (2009) A molecular basis for phosphorylation-dependent SUMO conjugation by the E2 UBC9. *Nat Struct Mol Biol* 16: 945-952.

290. Picard N, Caron V, Bilodeau S, Sanchez M, Mascle X, et al. (2012) Identification of estrogen receptor beta as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3beta. *Mol Cell Biol* 32: 2709-2721.
291. Desterro JM, Rodriguez MS, Hay RT (1998) SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell* 2: 233-239.
292. Stankovic-Valentin N, Deltour S, Seeler J, Pinte S, Vergoten G, et al. (2007) An acetylation/deacetylation-SUMOylation switch through a phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor HIC1 regulates transcriptional repression activity. *Mol Cell Biol* 27: 2661-2675.
293. Hoegge C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419: 135-141.
294. Matic I, van Hagen M, Schimmel J, Macek B, Ogg SC, et al. (2008) In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy. *Mol Cell Proteomics* 7: 132-144.
295. Blomster HA, Imanishi SY, Siimes J, Kastu J, Morrice NA, et al. (2010) In vivo identification of sumoylation sites by a signature tag and cysteine-targeted affinity purification. *J Biol Chem* 285: 19324-19329.
296. Bruderer R, Tatham MH, Plechanovova A, Matic I, Garg AK, et al. (2011) Purification and identification of endogenous polySUMO conjugates. *EMBO Rep* 12: 142-148.
297. Perry JJ, Tainer JA, Boddy MN (2008) A simultaneous role for SUMO and ubiquitin. *Trends Biochem Sci* 33: 201-208.
298. Xie Y, Rubenstein EM, Matt T, Hochstrasser M (2010) SUMO-independent in vivo activity of a SUMO-targeted ubiquitin ligase toward a short-lived transcription factor. *Genes Dev* 24: 893-903.
299. Prudden J, Pebernard S, Raffa G, Slavin DA, Perry JJ, et al. (2007) SUMO-targeted ubiquitin ligases in genome stability. *EMBO J* 26: 4089-4101.
300. Yin Y, Seifert A, Chua JS, Maure JF, Golebiowski F, et al. (2012) SUMO-targeted ubiquitin E3 ligase RNF4 is required for the response of human cells to DNA damage. *Genes Dev* 26: 1196-1208.

301. Minty A, Dumont X, Kaghad M, Caput D (2000) Covalent modification of p73 $\alpha$  by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J Biol Chem* 275: 36316-36323.
302. Song J, Durrin LK, Wilkinson TA, Krontiris TG, Chen Y (2004) Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14373-14378.
303. Hannich JT, Lewis A, Kroetz MB, Li SJ, Heide H, et al. (2005) Defining the SUMO-modified proteome by multiple approaches in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280: 4102-4110.
304. Song J, Zhang Z, Hu W, Chen Y (2005) Small ubiquitin-like modifier (SUMO) recognition of a SUMO binding motif: a reversal of the bound orientation. *J Biol Chem* 280: 40122-40129.
305. Gareau JR, Lima CD (2010) The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 861-871.
306. Sekiyama N, Ikegami T, Yamane T, Ikeguchi M, Uchimura Y, et al. (2008) Structure of the small ubiquitin-like modifier (SUMO)-interacting motif of MBD1-containing chromatin-associated factor 1 bound to SUMO-3. *J Biol Chem* 283: 35966-35975.
307. Fisher RD, Wang B, Alam SL, Higginson DS, Robinson H, et al. (2003) Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif. *J Biol Chem* 278: 28976-28984.
308. Kang RS, Daniels CM, Francis SA, Shih SC, Salerno WJ, et al. (2003) Solution structure of a CUE-ubiquitin complex reveals a conserved mode of ubiquitin binding. *Cell* 113: 621-630.
309. Vertegaal AC, Andersen JS, Ogg SC, Hay RT, Mann M, et al. (2006) Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 5: 2298-2310.
310. Sun H, Levenson JD, Hunter T (2007) Conserved function of RNF4 family proteins in eukaryotes: targeting a ubiquitin ligase to SUMOylated proteins. *EMBO J* 26: 4102-4112.
311. Hecker CM, Rabiller M, Haglund K, Bayer P, Dikic I (2006) Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem* 281: 16117-16127.
312. Vogt B, Hofmann K (2012) Bioinformatical detection of recognition factors for ubiquitin and SUMO. *Methods Mol Biol* 832: 249-261.
313. Ullmann R, Chien CD, Avantaggiati ML, Muller S (2012) An acetylation switch regulates SUMO-dependent protein interaction networks. *Mol Cell* 46: 759-770.

314. Danielsen JR, Povlsen LK, Villumsen BH, Streicher W, Nilsson J, et al. (2012) DNA damage-inducible SUMOylation of HERC2 promotes RNF8 binding via a novel SUMO-binding Zinc finger. *J Cell Biol* 197: 179-187.
315. Huang J, Yan J, Zhang J, Zhu S, Wang Y, et al. (2012) SUMO1 modification of PTEN regulates tumorigenesis by controlling its association with the plasma membrane. *Nat Commun* 3: 911.
316. Long J, Wang G, He D, Liu F (2004) Repression of Smad4 transcriptional activity by SUMO modification. *Biochem J* 379: 23-29.
317. Kang JS, Saunier EF, Akhurst RJ, Derynck R (2008) The type I TGF-beta receptor is covalently modified and regulated by sumoylation. *Nat Cell Biol* 10: 654-664.
318. Lin DY, Huang YS, Jeng JC, Kuo HY, Chang CC, et al. (2006) Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Mol Cell* 24: 341-354.
319. Armstrong AA, Mohideen F, Lima CD (2012) Recognition of SUMO-modified PCNA requires tandem receptor motifs in Srs2. *Nature* 483: 59-63.
320. Anckar J, Hietakangas V, Denessiouk K, Thiele DJ, Johnson MS, et al. (2006) Inhibition of DNA binding by differential sumoylation of heat shock factors. *Mol Cell Biol* 26: 955-964.
321. Baba D, Maita N, Jee JG, Uchimura Y, Saitoh H, et al. (2005) Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. *Nature* 435: 979-982.
322. Steinacher R, Schar P (2005) Functionality of human thymine DNA glycosylase requires SUMO-regulated changes in protein conformation. *Curr Biol* 15: 616-623.
323. Tan JA, Sun Y, Song J, Chen Y, Krontiris TG, et al. (2008) SUMO conjugation to the matrix attachment region-binding protein, special AT-rich sequence-binding protein-1 (SATB1), targets SATB1 to promyelocytic nuclear bodies where it undergoes caspase cleavage. *J Biol Chem* 283: 18124-18134.
324. Tan JA, Song J, Chen Y, Durrin LK (2010) Phosphorylation-dependent interaction of SATB1 and PIAS1 directs SUMO-regulated caspase cleavage of SATB1. *Mol Cell Biol* 30: 2823-2836.
325. Yang SH, Jaffray E, Hay RT, Sharrocks AD (2003) Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol Cell* 12: 63-74.
326. Sapetschnig A, Rischitor G, Braun H, Doll A, Schergaut M, et al. (2002) Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO J* 21: 5206-5215.

327. Muller S, Berger M, Lehembre F, Seeler JS, Haupt Y, et al. (2000) c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 275: 13321-13329.
328. Poukka H, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ (2000) Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 14145-14150.
329. Tian S, Poukka H, Palvimo JJ, Janne OA (2002) Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor. *Biochem J* 367: 907-911.
330. Abdel-Hafiz H, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB (2002) The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression. *J Biol Chem* 277: 33950-33956.
331. Shio Y, Eisenman RN (2003) Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13225-13230.
332. Yang SH, Sharrocks AD (2004) SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Mol Cell* 13: 611-617.
333. Colombo R, Boggio R, Seiser C, Draetta GF, Chiocca S (2002) The adenovirus protein Gam1 interferes with sumoylation of histone deacetylase 1. *EMBO Rep* 3: 1062-1068.
334. Ouyang J, Shi Y, Valin A, Xuan Y, Gill G (2009) Direct binding of CoREST1 to SUMO-2/3 contributes to gene-specific repression by the LSD1/CoREST1/HDAC complex. *Mol Cell* 34: 145-154.
335. Stielow B, Sapetschnig A, Wink C, Kruger I, Suske G (2008) SUMO-modified Sp3 represses transcription by provoking local heterochromatic gene silencing. *EMBO Rep* 9: 899-906.
336. Gronholm J, Vanhatupa S, Ungureanu D, Valiaho J, Laitinen T, et al. (2012) Structure-function analysis indicates that sumoylation modulates DNA-binding activity of STAT1. *BMC Biochem* 13: 20.
337. Tateishi Y, Ariyoshi M, Igarashi R, Hara H, Mizuguchi K, et al. (2009) Molecular basis for SUMOylation-dependent regulation of DNA binding activity of heat shock factor 2. *J Biol Chem* 284: 2435-2447.
338. Gomez-del Arco P, Koipally J, Georgopoulos K (2005) Ikaros SUMOylation: switching out of repression. *Mol Cell Biol* 25: 2688-2697.
339. Ling Y, Sankpal UT, Robertson AK, McNally JG, Karpova T, et al. (2004) Modification of de novo DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) by SUMO-1

modulates its interaction with histone deacetylases (HDACs) and its capacity to repress transcription. *Nucleic Acids Res* 32: 598-610.

340. Hong Y, Rogers R, Matunis MJ, Mayhew CN, Goodson ML, et al. (2001) Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 276: 40263-40267.
341. Psakhye I, Jentsch S (2012) Protein Group Modification and Synergy in the SUMO Pathway as Exemplified in DNA Repair. *Cell* 151: 807-820.
342. Matunis MJ, Wu J, Blobel G (1998) SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 140: 499-509.
343. Chauchereau A, Amazit L, Quesne M, Guiochon-Mantel A, Milgrom E (2003) Sumoylation of the progesterone receptor and of the steroid receptor coactivator SRC-1. *J Biol Chem* 278: 12335-12343.
344. Lin X, Sun B, Liang M, Liang YY, Gast A, et al. (2003) Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Mol Cell* 11: 1389-1396.
345. Rallabhandi P, Hashimoto K, Mo YY, Beck WT, Moitra PK, et al. (2002) Sumoylation of topoisomerase I is involved in its partitioning between nucleoli and nucleoplasm and its clearing from nucleoli in response to camptothecin. *J Biol Chem* 277: 40020-40026.
346. Muller S, Matunis MJ, Dejean A (1998) Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J* 17: 61-70.
347. Sung KS, Lee YA, Kim ET, Lee SR, Ahn JH, et al. (2011) Role of the SUMO-interacting motif in HIPK2 targeting to the PML nuclear bodies and regulation of p53. *Exp Cell Res* 317: 1060-1070.
348. Cho G, Lim Y, Golden JA (2009) SUMO interaction motifs in Sizn1 are required for promyelocytic leukemia protein nuclear body localization and for transcriptional activation. *J Biol Chem* 284: 19592-19600.
349. Eladad S, Ye TZ, Hu P, Leversha M, Beresten S, et al. (2005) Intra-nuclear trafficking of the BLM helicase to DNA damage-induced foci is regulated by SUMO modification. *Hum Mol Genet* 14: 1351-1365.
350. Good MC, Zalatan JG, Lim WA (2011) Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science* 332: 680-686.



351. Shaw AS, Filbert EL (2009) Scaffold proteins and immune-cell signalling. *Nat Rev Immunol* 9: 47-56.
352. Liu B, Shuai K (2008) Targeting the PIAS1 SUMO ligase pathway to control inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 29: 505-509.
353. Hoefler J, Schafer G, Klocker H, Erb HH, Mills IG, et al. (2012) PIAS1 is increased in human prostate cancer and enhances proliferation through inhibition of p21. *Am J Pathol* 180: 2097-2107.
354. Coppola D, Parikh V, Boulware D, Blanck G (2009) Substantially reduced expression of PIAS1 is associated with colon cancer development. *J Cancer Res Clin Oncol* 135: 1287-1291.
355. Driscoll JJ, Pelluru D, Lefkimiatis K, Fulciniti M, Prabhala RH, et al. (2010) The sumoylation pathway is dysregulated in multiple myeloma and is associated with adverse patient outcome. *Blood* 115: 2827-2834.
356. Tolkunova E, Malashicheva A, Parfenov VN, Sustmann C, Grosschedl R, et al. (2007) PIAS proteins as repressors of Oct4 function. *J Mol Biol* 374: 1200-1212.
357. Zhou S, Si J, Liu T, DeWille JW (2008) PIASy represses CCAAT/enhancer-binding protein delta (C/EBPdelta) transcriptional activity by sequestering C/EBPdelta to the nuclear periphery. *J Biol Chem* 283: 20137-20148.
358. van den Akker E, Ano S, Shih HM, Wang LC, Pironin M, et al. (2005) FLI-1 functionally interacts with PIASxalpha, a member of the PIAS E3 SUMO ligase family. *J Biol Chem* 280: 38035-38046.
359. Duval D, Duval G, Kedinger C, Poch O, Boeuf H (2003) The 'PINIT' motif, of a newly identified conserved domain of the PIAS protein family, is essential for nuclear retention of PIAS3L. *FEBS Lett* 554: 111-118.
360. Mautsa N, Prinsloo E, Bishop OT, Blatch GL (2011) The PINIT domain of PIAS3: structure-function analysis of its interaction with STAT3. *J Mol Recognit* 24: 795-803.
361. Hochstrasser M (2001) SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* 107: 5-8.
362. Tan J, Hall SH, Hamil KG, Grossman G, Petrusz P, et al. (2000) Protein inhibitor of activated STAT-1 (signal transducer and activator of transcription-1) is a nuclear receptor coregulator expressed in human testis. *Mol Endocrinol* 14: 14-26.
363. Kotaja N, Aittomaki S, Silvennoinen O, Palvimo JJ, Janne OA (2000) ARIP3 (androgen receptor-interacting protein 3) and other PIAS (protein inhibitor of

activated STAT) proteins differ in their ability to modulate steroid receptor-dependent transcriptional activation. *Mol Endocrinol* 14: 1986-2000.

364. Lee H, Quinn JC, Prasanth KV, Swiss VA, Economides KD, et al. (2006) PIAS1 confers DNA-binding specificity on the Msx1 homeoprotein. *Genes Dev* 20: 784-794.
365. Lee SJ, Lee JR, Hahn HS, Kim YH, Ahn JH, et al. (2007) PIAS1 interacts with the KRAB zinc finger protein, ZNF133, via zinc finger motifs and regulates its transcriptional activity. *Exp Mol Med* 39: 450-457.
366. Suda N, Shibata H, Kurihara I, Ikeda Y, Kobayashi S, et al. (2011) Coactivation of SF-1-mediated transcription of steroidogenic enzymes by Ubc9 and PIAS1. *Endocrinology* 152: 2266-2277.
367. Alm-Kristiansen AH, Lorenzo PI, Molvaersmyr AK, Matre V, Ledsaak M, et al. (2011) PIAS1 interacts with FLASH and enhances its co-activation of c-Myb. *Mol Cancer* 10: 21.
368. Ilmarinen T, Kangas H, Kytomaa T, Eskelin P, Saharinen J, et al. (2008) Functional interaction of AIRE with PIAS1 in transcriptional regulation. *Mol Immunol* 45: 1847-1862.
369. Nishida T, Yasuda H (2002) PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J Biol Chem* 277: 41311-41317.
370. Ungureanu D, Vanhatupa S, Kotaja N, Yang J, Aittomaki S, et al. (2003) PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1. *Blood* 102: 3311-3313.
371. Tiefenbach J, Novac N, Ducasse M, Eck M, Melchior F, et al. (2006) SUMOylation of the corepressor N-CoR modulates its capacity to repress transcription. *Mol Biol Cell* 17: 1643-1651.
372. Rabellino A, Carter B, Konstantinidou G, Wu SY, Rimessi A, et al. (2012) The SUMO E3-ligase PIAS1 regulates the tumor suppressor PML and its oncogenic counterpart PML-RARA. *Cancer Res* 72: 2275-2284.
373. Liu B, Yang Y, Chernishof V, Loo RR, Jang H, et al. (2007) Proinflammatory stimuli induce IKKalpha-mediated phosphorylation of PIAS1 to restrict inflammation and immunity. *Cell* 129: 903-914.
374. Depaux A, Regnier-Ricard F, Germani A, Varin-Blank N (2007) A crosstalk between hSiah2 and Pias E3-ligases modulates Pias-dependent activation. *Oncogene* 26: 6665-6676.

375. Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, et al. (2001) The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J* 20: 2140-2151.
376. Marin I (2012) Origin and Diversification of TRIM Ubiquitin Ligases. *PLoS One* 7: e50030.
377. Tao H, Simmons BN, Singireddy S, Jakkidi M, Short KM, et al. (2008) Structure of the MID1 tandem B-boxes reveals an interaction reminiscent of intermolecular ring heterodimers. *Biochemistry* 47: 2450-2457.
378. Massiah MA, Simmons BN, Short KM, Cox TC (2006) Solution structure of the RBCC/TRIM B-box1 domain of human MID1: B-box with a RING. *J Mol Biol* 358: 532-545.
379. Bell JL, Malyukova A, Holien JK, Koach J, Parker MW, et al. (2012) TRIM16 acts as an E3 ubiquitin ligase and can heterodimerize with other TRIM family members. *PLoS One* 7: e37470.
380. Peng H, Feldman I, Rauscher FJ, 3rd (2002) Hetero-oligomerization among the TIF family of RBCC/TRIM domain-containing nuclear cofactors: a potential mechanism for regulating the switch between coactivation and corepression. *J Mol Biol* 320: 629-644.
381. Kawai T, Akira S (2011) Regulation of innate immune signalling pathways by the tripartite motif (TRIM) family proteins. *EMBO Mol Med* 3: 513-527.
382. Meroni G, Diez-Roux G (2005) TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays* 27: 1147-1157.
383. Napolitano LM, Jaffray EG, Hay RT, Meroni G (2011) Functional interactions between ubiquitin E2 enzymes and TRIM proteins. *Biochem J* 434: 309-319.
384. Chu Y, Yang X (2011) SUMO E3 ligase activity of TRIM proteins. *Oncogene* 30: 1108-1116.
385. Zhong S, Salomoni P, Pandolfi PP (2000) The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol* 2: E85-90.
386. Dellaire G, Bazett-Jones DP (2007) Beyond repair foci: subnuclear domains and the cellular response to DNA damage. *Cell Cycle* 6: 1864-1872.
387. Salomoni P, Dvorkina M, Michod D (2012) Role of the promyelocytic leukaemia protein in cell death regulation. *Cell Death Dis* 3: e247.

388. Melnick A, Licht JD (1999) Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93: 3167-3215.
389. Rowley JD, Golomb HM, Dougherty C (1977) 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet* 1: 549-550.
390. de The H, Le Bras M, Lallemand-Breitenbach V (2012) The cell biology of disease: Acute promyelocytic leukemia, arsenic, and PML bodies. *J Cell Biol* 198: 11-21.
391. Scaglioni PP, Yung TM, Choi S, Baldini C, Konstantinidou G, et al. (2008) CK2 mediates phosphorylation and ubiquitin-mediated degradation of the PML tumor suppressor. *Mol Cell Biochem* 316: 149-154.
392. Gurrieri C, Capodieci P, Bernardi R, Scaglioni PP, Nafa K, et al. (2004) Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. *J Natl Cancer Inst* 96: 269-279.
393. Zhang P, Chin W, Chow LT, Chan AS, Yim AP, et al. (2000) Lack of expression for the suppressor PML in human small cell lung carcinoma. *Int J Cancer* 85: 599-605.
394. Koken MH, Linares-Cruz G, Quignon F, Viron A, Chelbi-Alix MK, et al. (1995) The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene* 10: 1315-1324.
395. Wang ZG, Ruggero D, Ronchetti S, Zhong S, Gaboli M, et al. (1998) PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet* 20: 266-272.
396. Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Chen Z, de The H (2012) Curing APL through PML/RARA degradation by As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Trends Mol Med* 18: 36-42.
397. de The H, Lavau C, Marchio A, Chomienne C, Degos L, et al. (1991) The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66: 675-684.
398. Kakizuka A, Miller WH, Jr., Umesono K, Warrell RP, Jr., Frankel SR, et al. (1991) Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 66: 663-674.
399. Pandolfi PP, Grignani F, Alcalay M, Mencarelli A, Biondi A, et al. (1991) Structure and origin of the acute promyelocytic leukemia myl/RAR alpha cDNA and characterization of its retinoid-binding and transactivation properties. *Oncogene* 6: 1285-1292.
400. Licht JD (2009) Acute promyelocytic leukemia--weapons of mass differentiation. *N Engl J Med* 360: 928-930.

401. Shen ZX, Shi ZZ, Fang J, Gu BW, Li JM, et al. (2004) All-trans retinoic acid/As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> combination yields a high quality remission and survival in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5328-5335.
402. Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, et al. (1988) Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72: 567-572.
403. Chen SJ, Wang ZY, Chen Z (1995) Acute promyelocytic leukemia: from clinic to molecular biology. *Stem Cells* 13: 22-31.
404. Huan SY, Yang CH, Chen YC (2000) Arsenic trioxide therapy for relapsed acute promyelocytic leukemia: an useful salvage therapy. *Leuk Lymphoma* 38: 283-293.
405. Boddy MN, Duprez E, Borden KL, Freemont PS (1997) Surface residue mutations of the PML RING finger domain alter the formation of nuclear matrix-associated PML bodies. *J Cell Sci* 110 ( Pt 18): 2197-2205.
406. Duprez E, Saurin AJ, Desterro JM, Lallemand-Breitenbach V, Howe K, et al. (1999) SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J Cell Sci* 112 ( Pt 3): 381-393.
407. Borden KL, Lally JM, Martin SR, O'Reilly NJ, Solomon E, et al. (1996) In vivo and in vitro characterization of the B1 and B2 zinc-binding domains from the acute promyelocytic leukemia protooncogene protein PML. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1601-1606.
408. Shen TH, Lin HK, Scaglioni PP, Yung TM, Pandolfi PP (2006) The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol Cell* 24: 331-339.
409. Condemine W, Takahashi Y, Zhu J, Puvion-Dutilleul F, Guegan S, et al. (2006) Characterization of endogenous human promyelocytic leukemia isoforms. *Cancer Res* 66: 6192-6198.
410. Brand P, Lenser T, Hemmerich P (2010) Assembly dynamics of PML nuclear bodies in living cells. *PMC Biophys* 3: 3.
411. Weidtkamp-Peters S, Lenser T, Negorev D, Gerstner N, Hofmann TG, et al. (2008) Dynamics of component exchange at PML nuclear bodies. *J Cell Sci* 121: 2731-2743.
412. Maroui MA, Kheddache-Atmane S, El Asmi F, Dianoux L, Aubry M, et al. (2012) Requirement of PML SUMO Interacting Motif for RNF4- or Arsenic Trioxide-Induced Degradation of Nuclear PML Isoforms. *PLoS One* 7: e44949.
413. Lang M, Jegou T, Chung I, Richter K, Munch S, et al. (2010) Three-dimensional organization of promyelocytic leukemia nuclear bodies. *J Cell Sci* 123: 392-400.

414. Chen YC, Kappel C, Beaudouin J, Eils R, Spector DL (2008) Live cell dynamics of promyelocytic leukemia nuclear bodies upon entry into and exit from mitosis. *Mol Biol Cell* 19: 3147-3162.
415. Daniel MT, Koken M, Romagne O, Barbey S, Bazarbachi A, et al. (1993) PML protein expression in hematopoietic and acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 82: 1858-1867.
416. Ishov AM, Sotnikov AG, Negorev D, Vladimirova OV, Neff N, et al. (1999) PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* 147: 221-234.
417. Chang KS, Fan YH, Andreeff M, Liu J, Mu ZM (1995) The PML gene encodes a phosphoprotein associated with the nuclear matrix. *Blood* 85: 3646-3653.
418. Everett RD, Lomonte P, Sternsdorf T, van Driel R, Orr A (1999) Cell cycle regulation of PML modification and ND10 composition. *J Cell Sci* 112 ( Pt 24): 4581-4588.
419. Eskiw CH, Dellaire G, Mymryk JS, Bazett-Jones DP (2003) Size, position and dynamic behavior of PML nuclear bodies following cell stress as a paradigm for supramolecular trafficking and assembly. *J Cell Sci* 116: 4455-4466.
420. Dellaire G, Ching RW, Dehghani H, Ren Y, Bazett-Jones DP (2006) The number of PML nuclear bodies increases in early S phase by a fission mechanism. *J Cell Sci* 119: 1026-1033.
421. Nefkens I, Negorev DG, Ishov AM, Michaelson JS, Yeh ET, et al. (2003) Heat shock and Cd<sup>2+</sup> exposure regulate PML and Daxx release from ND10 by independent mechanisms that modify the induction of heat-shock proteins 70 and 25 differently. *J Cell Sci* 116: 513-524.
422. Eskiw CH, Dellaire G, Bazett-Jones DP (2004) Chromatin contributes to structural integrity of promyelocytic leukemia bodies through a SUMO-1-independent mechanism. *J Biol Chem* 279: 9577-9585.
423. Van Damme E, Laukens K, Dang TH, Van Ostade X (2010) A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics. *Int J Biol Sci* 6: 51-67.
424. Van Damme E, Van Ostade X (2011) Crosstalk between viruses and PML nuclear bodies: a network-based approach. *Front Biosci* 16: 2910-2920.
425. Geoffroy MC, Chelbi-Alix MK (2011) Role of promyelocytic leukemia protein in host antiviral defense. *J Interferon Cytokine Res* 31: 145-158.

426. Lallemand-Breitenbach V, de The H (2010) PML nuclear bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000661.
427. Bernardi R, Pandolfi PP (2007) Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 1006-1016.
428. Goodson ML, Hong Y, Rogers R, Matunis MJ, Park-Sarge OK, et al. (2001) Sumo-1 modification regulates the DNA binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor. *J Biol Chem* 276: 18513-18518.
429. Dahle O, Bakke O, Gabrielsen OS (2004) c-Myb associates with PML in nuclear bodies in hematopoietic cells. *Exp Cell Res* 297: 118-126.
430. Fernandez-Lloris R, Osses N, Jaffray E, Shen LN, Vaughan OA, et al. (2006) Repression of SOX6 transcriptional activity by SUMO modification. *FEBS Lett* 580: 1215-1221.
431. Janssen K, Hofmann TG, Jans DA, Hay RT, Schulze-Osthoff K, et al. (2007) Apoptin is modified by SUMO conjugation and targeted to promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Oncogene* 26: 1557-1566.
432. Karvonen U, Jaaskelainen T, Rytinki M, Kaikkonen S, Palvimo JJ (2008) ZNF451 is a novel PML body- and SUMO-associated transcriptional coregulator. *J Mol Biol* 382: 585-600.
433. Hayakawa F, Privalsky ML (2004) Phosphorylation of PML by mitogen-activated protein kinases plays a key role in arsenic trioxide-mediated apoptosis. *Cancer Cell* 5: 389-401.
434. Quignon F, Chen Z, de The H (1997) Retinoic acid and arsenic: towards oncogene-targeted treatments of acute promyelocytic leukaemia. *Biochim Biophys Acta* 1333: M53-61.
435. Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Puvion F, Koken M, Honore N, et al. (2001) Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J Exp Med* 193: 1361-1371.
436. Everett RD, Earnshaw WC, Pluta AF, Sternsdorf T, Ainsztein AM, et al. (1999) A dynamic connection between centromeres and ND10 proteins. *J Cell Sci* 112 ( Pt 20): 3443-3454.
437. Scaglioni PP, Yung TM, Cai LF, Erdjument-Bromage H, Kaufman AJ, et al. (2006) A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell* 126: 269-283.

438. Bailey D, O'Hare P (2005) Comparison of the SUMO1 and ubiquitin conjugation pathways during the inhibition of proteasome activity with evidence of SUMO1 recycling. *Biochem J* 392: 271-281.
439. Chen RH, Lee YR, Yuan WC (2012) The role of PML ubiquitination in human malignancies. *J Biomed Sci* 19: 81.
440. Lallemand-Breitenbach V, Jeanne M, Benhenda S, Nasr R, Lei M, et al. (2008) Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol* 10: 547-555.
441. Percherancier Y, Germain-Desprez D, Galisson F, Mascle XH, Dianoux L, et al. (2009) Role of SUMO in RNF4-mediated promyelocytic leukemia protein (PML) degradation: sumoylation of PML and phospho-switch control of its SUMO binding domain dissected in living cells. *J Biol Chem* 284: 16595-16608.
442. Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 320-344.
443. Sayed M, Kim SO, Salh BS, Issinger OG, Pelech SL (2000) Stress-induced activation of protein kinase CK2 by direct interaction with p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 275: 16569-16573.
444. Koken MH, Puvion-Dutilleul F, Guillemain MC, Viron A, Linares-Cruz G, et al. (1994) The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. *EMBO J* 13: 1073-1083.
445. Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, et al. (1996) In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. *Blood* 88: 1052-1061.
446. Raelson JV, Nervi C, Rosenauer A, Benedetti L, Monczak Y, et al. (1996) The PML/RAR alpha oncoprotein is a direct molecular target of retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 88: 2826-2832.
447. Shao W, Fanelli M, Ferrara FF, Riccioni R, Rosenauer A, et al. (1998) Arsenic trioxide as an inducer of apoptosis and loss of PML/RAR alpha protein in acute promyelocytic leukemia cells. *J Natl Cancer Inst* 90: 124-133.
448. Zhu J, Koken MH, Quignon F, Chelbi-Alix MK, Degos L, et al. (1997) Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3978-3983.



449. Wang ZG, Rivi R, Delva L, Konig A, Scheinberg DA, et al. (1998) Arsenic trioxide and melarsoprol induce programmed cell death in myeloid leukemia cell lines and function in a PML and PML-RARalpha independent manner. *Blood* 92: 1497-1504.
450. Jeanne M, Lallemand-Breitenbach V, Ferhi O, Koken M, Le Bras M, et al. (2010) PML/RARA oxidation and arsenic binding initiate the antileukemia response of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Cancer Cell* 18: 88-98.
451. Zhang XW, Yan XJ, Zhou ZR, Yang FF, Wu ZY, et al. (2010) Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RARalpha oncoprotein by directly binding PML. *Science* 328: 240-243.
452. Kamitani T, Kito K, Nguyen HP, Wada H, Fukuda-Kamitani T, et al. (1998) Identification of three major sentrinization sites in PML. *J Biol Chem* 273: 26675-26682.
453. Kamitani T, Nguyen HP, Kito K, Fukuda-Kamitani T, Yeh ET (1998) Covalent modification of PML by the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *J Biol Chem* 273: 3117-3120.
454. Cammas F, Mark M, Dolle P, Dierich A, Chambon P, et al. (2000) Mice lacking the transcriptional corepressor TIF1beta are defective in early postimplantation development. *Development* 127: 2955-2963.
455. Le Douarin B, Nielsen AL, Garnier JM, Ichinose H, Jeanmougin F, et al. (1996) A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J* 15: 6701-6715.
456. Friedman JR, Fredericks WJ, Jensen DE, Speicher DW, Huang XP, et al. (1996) KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes Dev* 10: 2067-2078.
457. Kim SS, Chen YM, O'Leary E, Witzgall R, Vidal M, et al. (1996) A novel member of the RING finger family, KRIP-1, associates with the KRAB-A transcriptional repressor domain of zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 15299-15304.
458. Moosmann P, Georgiev O, Le Douarin B, Bourquin JP, Schaffner W (1996) Transcriptional repression by RING finger protein TIF1 beta that interacts with the KRAB repressor domain of KOX1. *Nucleic Acids Res* 24: 4859-4867.
459. Looman C, Abrink M, Mark C, Hellman L (2002) KRAB zinc finger proteins: an analysis of the molecular mechanisms governing their increase in numbers and complexity during evolution. *Mol Biol Evol* 19: 2118-2130.

460. Witzgall R, O'Leary E, Leaf A, Onaldi D, Bonventre JV (1994) The Kruppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4514-4518.
461. Vissing H, Meyer WK, Aagaard L, Tommerup N, Thiesen HJ (1995) Repression of transcriptional activity by heterologous KRAB domains present in zinc finger proteins. *FEBS Lett* 369: 153-157.
462. Margolin JF, Friedman JR, Meyer WK, Vissing H, Thiesen HJ, et al. (1994) Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4509-4513.
463. Agata Y, Matsuda E, Shimizu A (1999) Two novel Kruppel-associated box-containing zinc-finger proteins, KRAZ1 and KRAZ2, repress transcription through functional interaction with the corepressor KAP-1 (TIF1beta/KRIP-1). *J Biol Chem* 274: 16412-16422.
464. Gebelein B, Urrutia R (2001) Sequence-specific transcriptional repression by KS1, a multiple-zinc-finger-Kruppel-associated box protein. *Mol Cell Biol* 21: 928-939.
465. Liu L, Zhao E, Li C, Huang L, Xiao L, et al. (2012) TRIM28, a new molecular marker predicting metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Cancer Epidemiol.*
466. Wang C, Ivanov A, Chen L, Fredericks WJ, Seto E, et al. (2005) MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation. *EMBO J* 24: 3279-3290.
467. Venturini L, You J, Stadler M, Galien R, Lallemand V, et al. (1999) TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene* 18: 1209-1217.
468. Khetchoumian K, Teletin M, Mark M, Lerouge T, Cervino M, et al. (2004) TIF1delta, a novel HP1-interacting member of the transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) family expressed by elongating spermatids. *J Biol Chem* 279: 48329-48341.
469. Peng H, Begg GE, Harper SL, Friedman JR, Speicher DW, et al. (2000) Biochemical analysis of the Kruppel-associated box (KRAB) transcriptional repression domain. *J Biol Chem* 275: 18000-18010.
470. Peng H, Begg GE, Schultz DC, Friedman JR, Jensen DE, et al. (2000) Reconstitution of the KRAB-KAP-1 repressor complex: a model system for defining the molecular anatomy of RING-B box-coiled-coil domain-mediated protein-protein interactions. *J Mol Biol* 295: 1139-1162.

471. Germain-Desprez D, Bazinet M, Bouvier M, Aubry M (2003) Oligomerization of transcriptional intermediary factor 1 regulators and interaction with ZNF74 nuclear matrix protein revealed by bioluminescence resonance energy transfer in living cells. *J Biol Chem* 278: 22367-22373.
472. Nielsen AL, Ortiz JA, You J, Oulad-Abdelghani M, Khechumian R, et al. (1999) Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *EMBO J* 18: 6385-6395.
473. Ryan RF, Schultz DC, Ayyanathan K, Singh PB, Friedman JR, et al. (1999) KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* 19: 4366-4378.
474. Cammas F, Oulad-Abdelghani M, Vonesch JL, Huss-Garcia Y, Chambon P, et al. (2002) Cell differentiation induces TIF1beta association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction. *J Cell Sci* 115: 3439-3448.
475. Cammas F, Herzog M, Lerouge T, Chambon P, Losson R (2004) Association of the transcriptional corepressor TIF1beta with heterochromatin protein 1 (HP1): an essential role for progression through differentiation. *Genes Dev* 18: 2147-2160.
476. Zeng L, Yap KL, Ivanov AV, Wang X, Mujtaba S, et al. (2008) Structural insights into human KAP1 PHD finger-bromodomain and its role in gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 15: 626-633.
477. Capili AD, Schultz DC, Rauscher IF, Borden KL (2001) Solution structure of the PHD domain from the KAP-1 corepressor: structural determinants for PHD, RING and LIM zinc-binding domains. *EMBO J* 20: 165-177.
478. Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ, 3rd (2002) SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev* 16: 919-932.
479. Schultz DC, Friedman JR, Rauscher FJ, 3rd (2001) Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD. *Genes Dev* 15: 428-443.
480. Iyengar S, Ivanov AV, Jin VX, Rauscher FJ, 3rd, Farnham PJ (2011) Functional analysis of KAP1 genomic recruitment. *Mol Cell Biol* 31: 1833-1847.

481. Tadepally HD, Burger G, Aubry M (2008) Evolution of C2H2-zinc finger genes and subfamilies in mammals: species-specific duplication and loss of clusters, genes and effector domains. *BMC Evol Biol* 8: 176.
482. Urrutia R (2003) KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biol* 4: 231.
483. Ayyanathan K, Lechner MS, Bell P, Maul GG, Schultz DC, et al. (2003) Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation. *Genes Dev* 17: 1855-1869.
484. Lechner MS, Begg GE, Speicher DW, Rauscher FJ, 3rd (2000) Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interaction is essential. *Mol Cell Biol* 20: 6449-6465.
485. Sripathy SP, Stevens J, Schultz DC (2006) The KAP1 corepressor functions to coordinate the assembly of de novo HP1-demarcated microenvironments of heterochromatin required for KRAB zinc finger protein-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 26: 8623-8638.
486. Groner AC, Meylan S, Ciuffi A, Zangger N, Ambrosini G, et al. (2010) KRAB-zinc finger proteins and KAP1 can mediate long-range transcriptional repression through heterochromatin spreading. *PLoS Genet* 6: e1000869.
487. Hsu SI, Yang CM, Sim KG, Hentschel DM, O'Leary E, et al. (2001) TRIP-Br: a novel family of PHD zinc finger- and bromodomain-interacting proteins that regulate the transcriptional activity of E2F-1/DP-1. *EMBO J* 20: 2273-2285.
488. Rambaud J, Desroches J, Balsalobre A, Drouin J (2009) TIF1beta/KAP-1 is a coactivator of the orphan nuclear receptor NGFI-B/Nur77. *J Biol Chem* 284: 14147-14156.
489. Chang CJ, Chen YL, Lee SC (1998) Coactivator TIF1beta interacts with transcription factor C/EBPbeta and glucocorticoid receptor to induce alpha1-acid glycoprotein gene expression. *Mol Cell Biol* 18: 5880-5887.
490. Seeler JS, Marchio A, Losson R, Desterro JM, Hay RT, et al. (2001) Common properties of nuclear body protein SP100 and TIF1alpha chromatin factor: role of SUMO modification. *Mol Cell Biol* 21: 3314-3324.
491. Xu Y, Piston DW, Johnson CH (1999) A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 151-156.

492. Falconer RJ, Penkova A, Jelesarov I, Collins BM (2010) Survey of the year 2008: applications of isothermal titration calorimetry. *J Mol Recognit* 23: 395-413.
493. Cardullo RA (2007) Theoretical principles and practical considerations for fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods Cell Biol* 81: 479-494.
494. Christensen DE, Brzovic PS, Klevit RE (2007) E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages. *Nat Struct Mol Biol* 14: 941-948.
495. Markson G, Kiel C, Hyde R, Brown S, Charalabous P, et al. (2009) Analysis of the human E2 ubiquitin conjugating enzyme protein interaction network. *Genome Res* 19: 1905-1911.
496. van Wijk SJ, de Vries SJ, Kemmeren P, Huang A, Boelens R, et al. (2009) A comprehensive framework of E2-RING E3 interactions of the human ubiquitin-proteasome system. *Mol Syst Biol* 5: 295.
497. Perdomo J, Verger A, Turner J, Crossley M (2005) Role for SUMO modification in facilitating transcriptional repression by BKLf. *Mol Cell Biol* 25: 1549-1559.
498. Iniguez-Lluhi JA, Pearce D (2000) A common motif within the negative regulatory regions of multiple factors inhibits their transcriptional synergy. *Mol Cell Biol* 20: 6040-6050.
499. Holmstrom S, Van Antwerp ME, Iniguez-Lluhi JA (2003) Direct and distinguishable inhibitory roles for SUMO isoforms in the control of transcriptional synergy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15758-15763.
500. Rytinki M, Kaikkonen S, Sutinen P, Paakinaho V, Rahkama V, et al. (2012) Dynamic SUMOylation is linked to the activity cycles of androgen receptor in the cell nucleus. *Mol Cell Biol* 32: 4195-4205.
501. Chang CC, Naik MT, Huang YS, Jeng JC, Liao PH, et al. (2011) Structural and functional roles of Daxx SIM phosphorylation in SUMO paralog-selective binding and apoptosis modulation. *Mol Cell* 42: 62-74.
502. Ogawa H, Komatsu T, Hiraoka Y, Morohashi K (2009) Transcriptional Suppression by Transient Recruitment of ARIP4 to Sumoylated nuclear receptor Ad4BP/SF-1. *Mol Biol Cell* 20: 4235-4245.
503. Ivanov AV, Peng H, Yurchenko V, Yap KL, Negorev DG, et al. (2007) PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. *Mol Cell* 28: 823-837.

504. Maison C, Bailly D, Roche D, Montes de Oca R, Probst AV, et al. (2011) SUMOylation promotes de novo targeting of HP1alpha to pericentric heterochromatin. *Nat Genet* 43: 220-227.
505. Ko S, Kang GB, Song SM, Lee JG, Shin DY, et al. (2010) Structural basis of E2-25K/UBB+1 interaction leading to proteasome inhibition and neurotoxicity. *J Biol Chem* 285: 36070-36080.
506. Hofmann K, Falquet L (2001) A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci* 26: 347-350.

## **Annexe**

**ARTICLE ANNEXE**

Cette étude a été publiée dans *The Journal of Biological Chemistry*.

Yann Percherancier\*, Delphine Germain-Desprez\*, Frédéric Galisson, Xavier H. Mascle, Laurent Dianoux, Patricia Estephan, Mounira K Chelbi-Alix# and Muriel Aubry#. Role of SUMO in RNF4-mediated PML degradation: PML sumoylation and phospho-switch control of its SUMO Binding Domain dissected in living cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009; Vol :16595-16608. © The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

En tant que co-auteur dans cette étude, ma contribution se résume à l'initiation du projet avec Yann Percherancier, la génération de constructions et d'expériences pilotes préliminaires.



**Role of SUMO in RNF4-mediated PML degradation: PML sumoylation and phospho-switch control of its SUMO Binding Domain dissected in living cells§**

*Yann Percherancier\*<sup>1</sup>, Delphine Germain-Desprez\*<sup>2</sup>, Frédéric Galisson<sup>1</sup>, Xavier H. Mascle<sup>2</sup>, Laurent Dianoux<sup>1</sup>, Patricia Estephan<sup>2</sup>, Mounira K Chelbi-Alix#<sup>1</sup> and Muriel Aubry#<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>CNRS FRE2937, Institut André Lwoff, Villejuif, France

<sup>2</sup>Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, Canada

**#Correspondences:**

Muriel Aubry, Département de biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, H3C 3J7, Canada, Fax: (514) 343-2210,

Mounira K Chelbi-Alix, CNRS FRE2937, Institut André Lwoff, 7, rue Guy Môquet, 94801, Villejuif Cedex, France, Fax: (33) 1 49583348,

\*These authors contributed equally to this work; # co-senior authors.

Running title: Mechanisms of SUMO-dependent PML degradation

Keywords: BRET, SUMO, PML, Arsenic trioxide, RNF4

## SUMMARY

Promyelocytic Leukemia protein (PML) is a tumor suppressor acting as the organizer of sub-nuclear structures called PML-nuclear bodies (NBs). Both covalent modification of PML by the Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) and non covalent binding of SUMO to PML SUMO Binding Domain (SBD) are necessary for PML-NB formation and maturation. PML sumoylation and proteasome-dependent degradation induced by the E3 ubiquitin ligase, RNF4, are enhanced by the Acute Promyelocytic Leukemia therapeutic agent, arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Here, we established a novel bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assay to dissect and monitor PML/SUMO interactions dynamically in living cells upon addition of therapeutic agents. Using this sensitive and quantitative SUMO BRET assay that distinguishes PML sumoylation from SBD-mediated PML/SUMO non-covalent interactions, we probed the respective roles of covalent and non-covalent PML/SUMO interactions in PML degradation and interaction with RNF4. We found that, although dispensable for As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-enhanced PML sumoylation and RNF4 interaction, PML SBD core sequence was required for As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- and RNF4-induced PML degradation. As confirmed with a phosphomimetic mutant, phosphorylation of a stretch of serine residues, contained within PML SBD was needed for PML interaction with SUMO-modified protein partners and thus for NB maturation. However, mutation of these serine residues did not impair As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- and RNF4-induced PML degradation, contrasting with the known role of these phosphoserine residues for casein kinase 2-promoted PML degradation. Altogether, these data suggest a model whereby sumoylation- and SBD-dependent PML oligomerization within NBs is sufficient for RNF4-mediated PML degradation and does not require the phosphorylation-dependent association of PML with other sumoylated partners.

## INTRODUCTION

ProMyelocytic Leukaemia protein (PML) is a tumor suppressor (Salomoni and Pandolfi 2002) which gene is translocated in cases of acute promyelocytic leukemia (APL) (de The, Chomienne et al. 1990). PML functions as the organizer of PML NBs which are dynamic structures harboring numerous transiently and permanently localized proteins (Negorev and Maul 2001). The importance of PML NB structural integrity was first revealed in APL since, in this malignancy, the abnormal fusion protein PML/RAR $\alpha$  leads to NB disruption. Patient treatment with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induces the reversion of the APL phenotype as well as PML/RAR $\alpha$  degradation and PML NB reformation (Zhu, Koken et al. 1997).

PML is a target for the post-translational modification by SUMO, an ubiquitin-like protein which is covalently coupled to PML lysine residues 65, 160 and 490 via a process called sumoylation (Kamitani, Kito et al. 1998; Hay 2005). Among the four human SUMO paralogs identified, SUMO1, -2 and -3 were found to be conjugated to target proteins. It involves an enzymatic cascade for the transfer of the mature SUMO and the formation of an isopeptide bond between the C-terminal glycine of SUMO and a lysine from the target protein. The sumoylation is a reversible process due to the existence of several deconjugating enzymes.

PML NB formation requires both the covalent linkage (sumoylation) (reviewed in (Seeler and Dejean 2001)) and the non-covalent interactions of SUMO with PML through a SUMO Binding Domain (SBD also named SIM for SUMO interacting Motif) (Shen, Lin et al. 2006). Interestingly, PML SBD contains specific serines, acting as substrates for the Casein Kinase-2 (CK2), which are implicated in PML ubiquitination and degradation (Scaglioni, Yung et al. 2006) and which phosphorylation status could regulate the function of the SBD.

Because the sumoylation of proteins is dynamic and reversible, this post-translational modification is difficult to follow *in vivo* and its detection mainly relies on the

identification of sumoylated protein species by Western blot following cell lysis. Recently, we used Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) to detect covalent-linkage of ubiquitin (ubiquitination) in living mammalian cells and in real time (Perroy, Pontier et al. 2004). In brief, BRET monitors the interaction between a protein fused to a luciferase and a protein fused to fluorescent YFP or GFP, upon addition of a luciferase substrate; it is a proximity-based assay which requires that the donor of energy (luciferase fusion) and the acceptor (YFP or GFP fusions) are within 50 to 100 Å for an efficient energy transfer (Xu, Piston et al. 1999; Angers, Salahpour et al. 2000; Germain-Desprez, Bazinet et al. 2003). However, a demonstration that BRET may provide a method of choice to follow the dynamics of protein sumoylation in living cells is lacking.

Here, we developed a sensitive and quantitative SUMO BRET assay for the detection of PML interactions with SUMO in living cells. We proved that BRET can be used to detect both SUMO covalent and non-covalent interactions with PML (Model, Fig 1H). For this purpose, we used PMLIII isoform which sumoylation is induced by As2O3 and triggers a proteasome-dependent PML degradation (Lallemand-Breitenbach, Zhu et al. 2001); the degradation process involves the ubiquitination of polySUMO covalently coupled to PML by the poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase RNF4 (Sun, Levenson et al. 2007; Lallemand-Breitenbach, Jeanne et al. 2008; Tatham, Geoffroy et al. 2008).. Altogether, our BRET results indicate that, As2O3 and/or RNF4-induced PML degradation are dependent on the integrity of both PML sumoylation target sites and the PML SBD core sequence but not on the CK2 serine phosphorylation sites within the SBD. However the phosphorylation of these serines is required for most PML SBD-dependent non-covalent interactions. This phospho-regulation of PML SBD ('SBD phospho-switch') establishes another link between the phosphorylation and SUMO, different from the phospho-sumoyl switch (Yang and Gregoire 2006).

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Constructs and Expression vectors*

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

*BRET constructs*- YFP-SUMO1, YFP-SUMO1G, YFP-SUMO2 and YFP-SUMO3 (all cloned in pEYFP (C1), BD Biosciences Clontech) are kind gift of Dr Dasso M. (N.I.H., Bethesda, U.S.A.) (Ayaydin and Dasso 2004). GFP-SUMO1, and GFP-UBI were previously described respectively in (Masclé, Germain-Desprez et al. 2007) and (Perroy, Pontier et al. 2004). The myc-tagged SUMO1 construct used was subcloned as an XhoI fragment in the XhoI site of a myc-tagged version of pcDNA3.1 vector. UBC9 (Accession Number: U45328) was cloned in the SacI/KpnI site of pGFP10 C3 (Perkin Elmer Life Sciences). The NLS used for Luc-NLS construct was already described (Germain-Desprez, Bazinet et al. 2003) and Luc-NLS was generated by inserting the NLS sequence within the ApaI/BamHI site of pHRLuc-C3 (Perkin Elmer Life Sciences).

To generate the other BRET constructs with Renilla Luciferase (Luc) and Yellow Fluorescent protein (YFP), Luc or YFP were cloned together with the cDNA of interest by a three-piece-ligation in the BamHI/XhoI or BamHI/XbaI site of pcDNA3.1(+) (Invitrogen). Luc was amplified by PCR from pcDNA3-CXCR4-Luc vector (Percherancier, Berchiche et al. 2005) and cloned either at the C-terminal of the cDNA of interest as an EcoRI-XhoI fragment (primers used: “Luc\_EcoRI\_ATG\_C-term sens” and “Luc\_Stop\_XhoI\_C-term antisens” primers) or at the N-terminal as a BamHI-EcoRI fragment (primers used: “Luc\_BamHI\_ATG\_N-term sens” and “Luc\_no-Stop\_EcoRI\_N-term antisens”). YFP was amplified by PCR from pcDNA3-CXCR4-YFP (Percherancier, Berchiche et al. 2005), digested with EcoRI and XhoI, and cloned at the C-terminal of the cDNA of interest (primers used: “YFP\_EcoRI\_ATG\_C-term sens” and “YFP\_Stop\_XhoI\_C-term antisens”). The cDNA of interest was amplified by PCR for cloning in phase either at the N-terminal of the fusion clone as a BamHI-EcoRI fragment or at the C-terminal as an EcoRI-XhoI or EcoRI-XbaI fragment. In each case, the sequence

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

*PML mutants*- PMLIII point mutations were generated using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) starting with PMLIII (PMLWT) cDNA (accession number: S50913) cloned in pBluescript SK+ and the appropriate oligonucleotides (see list of primers: only sense oligonucleotides are described). PML3KR was obtained by mutating sequentially K65, K160 and K490 to R residues to generate PMLK65R, PMLK65R,K160R and PMLK65R,K160R,K490R (PML3KR). Then, PML3KR, PML3KR-SBD and PML3KR-S560A,S561A,S562A,S565A mutants were obtained using PML3KR as a matrix by mutating either the four hydrophobic residues from the SBD (VVVI) (Shen, Lin et al. 2006) or the four serines serving as target for CK2 kinase which are within the sequence encompassing amino acid 560 to 565 (Scaglioni, Yung et al. 2006). PML $\Delta$ CC was constructed by replacing a 411 bp fragment coding for PMLIII coiled-coiled domain (nucleotides 669 to 1069 of PMLIII coding sequence) by a short unrelated 18 bp sequence which includes a NotI site. The PML $\Delta$ CC sequence was generated by PCR amplification of 5'- and 3'-overlapping fragments which both include the NotI site from the 18 bp sequence; the 5'-PCR fragment includes the initiator ATG of PMLIII and an upstream BamHI cloning site and the 3'-PCR fragment includes PMLIII Stop codon and a downstream XhoI cloning site. The 5'- and 3'-PCR fragments (BamHI-NotI and NotI-XhoI fragments, respectively) were ligated together in a three-piece-ligation reaction in the BamHI/XhoI site of pcDNA3.1(+) (primers used: "PML\_BamHI\_ATG sens" and "PML\_ $\Delta$ CC1\_NotI antisens" for the 5'-fragment and "PML\_ $\Delta$ CC2\_NotI sens" and "PML\_Stop\_XhoI antisens" for the 3'-fragment).

*PML expression constructs*- PMLWT and mutants were amplified by PCR from pBluescript SK+ for subcloning in appropriate vectors. To generate untagged expression constructs, PML PCR fragments digested with BamHI and XhoI were cloned into the BamHI/XhoI site of either pcDNA3.1 (+) for transient expression or HIV-1-based lentiviral pTRIP vector for stable expression (a gift from Dr. P. Charneau, Groupe de Virologie moléculaire et de Vectorologie, Institut Pasteur, Paris) (primers used: "PML\_BamHI\_ATG

sens” and “PML\_ Stop\_XhoI antisense”). To generate Luc and YFP BRET constructs, PML PCR fragments digested with BamHI and EcoRI were cloned N-terminal to Luc or YFP in the BamHI/XhoI site of pcDNA3.1 (+) as part of a tree-piece-ligation (primers used: “PML\_BamHI\_ATG sens” and “PML\_No Stop EcoRI\_Nterm” antisens).

*RNF4 constructs-* pFLAG-RNF4 is a kind gift from F.J. Kaiser and B. Horsthemke (Kaiser, Moroy et al. 2003). To generate Luc-RNF4 BRET construct, RNF4 was PCR amplified from pFLAG-RNF4 and cloned in phase, as an EcoRI-XbaI fragment, C-terminal to Luc in the BamHI/XbaI site of pcDNA3.1 owing to a tree-piece-ligation (primers used: “RNF4\_EcoRI\_ATG\_C-term sens” and a “RNF4- Stop\_XbaI antisens”).

### ***Primers***

#### *Luc and YFP primers-*

Luc\_EcoRI\_ATG\_C-term sens:

5'CCGGTGAATTCTGGTGGAGGCGGATCTATGACCAGCAAGGTGTACGACCCCG  
3'; Luc\_ Stop\_XhoI\_C-term antisens:

5'TCTAGACTCGAGCGGCCGCAATTCTTACTGCTCGTTCTTCAGCACTCTCTCCA  
CG3';

Luc\_BamHI\_ATG\_N-term sens:

5'CTGTGCTAGCGGATCCATAATGACCAGCAAGGTGTACGACCCCGAGC3';

Luc\_no Stop\_EcoRI\_N-term antisens:

5'TCCACCAGAATTCACCGGTACCTGCTCGTTCTTCAGCACTCTCTCCACG3';

YFP\_EcoRI\_ATG\_C-term sens:

5'ACCGGTGAATTCTGGTGGAGGCGGATCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT  
G3';

YFP-Stop\_XhoI\_C-term antisens:

5'CTCTAGACTCGAGCGGCCGCTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG3';

x

*PML and RNF4 primers*

PMLK65R (silent BssHII): 5'GCCAGGCGGAAGCGCGCTGCCCCGAAGCTGCTGC3';

PMLK160R (silent AflII): 5'CACCAGTGGTTCTTAAGACACGAGGCCCGGCC3';

PMLK490R(silent PsiI):

5'GCCCCAGGAAGGTTATAAGAATGGAGTCTGAGGAGGGG3'; PMLSBD (silent NotI):5'-GCAGAGGAACGCGCGGCCGCGAGCAGCAGCTCGG-3';

PMLS560A,S561A,S562A,S565A (silent NotI):

5'CGCGTTGTGGTGATCGCGGCCGCGGAAGACGCAGATGCCGAAAACCTCGG3';

PMLS560D,S561D,S562D,S565D (silent ClaI):

5'CGCGTTGTGGTGATCGATGACGACGAAGACGATGATGCCGAAAACCTCG3';

PMLC57A,C60AA (silent BssHII):

5'GAGTTCCAGTTTCTGCGCGCCAGCAAGCCCAGGCGGAAGCC3';

PML\_BamHI\_ATG sens :

5'TGTCTAAGCTTGCTAGCGGATCCACACCATGGAGCCTGCACCCGCCCGATCTC  
CG3'; PML\_ΔCC1\_NotI antisens :

5'TGCTTGGCGGCCGCATATACTGTGGCTGCTGTCAAGGAGCGCGCACG3';

PML\_ΔCC2\_NotI sens :

5'ATATGCGGCCGCCAAGCACAGGAGGAGCCCCAGAGCCTGCAAGC3'; PML\_

Stop\_XhoI antisens :

5'ATCCGCCTCGAGCAGAATCAGCGGGCTGGTGGGGAGGCCAAGC3'; PML\_No

Stop\_EcoRI\_N-term antisens:

5'CACCAGAATTCACCGGTACGCGGGCTGGTGGGGAGGCCAAGC3';

RNF4\_EcoRI\_ATG\_C-term sens:

5'ATACGTACCGGTGAATTCTGGTGGAGGCGGATCTATGAGTACAAGAAAGCGT  
CGTGGTGG3'; RNF4\_Stop\_XbaI antisens

5'ATCCGCCTCGAGGCTAGCGTCTGACTCATATATAAATGGGGTGGTACCGTTTGT  
GG3'



### ***Antibodies***

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

### ***Arsenic and Epoxomycin treatments***

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich # A1010, solution stock 330 mM resuspended in 1 N NaOH) and Epoxomycin (Sigma-Aldrich # E3652, solution stock 100 μM resuspended in DMSO) were used at the concentrations and for the time indicated in the text.

### ***Stable transduction, transient transfection and cell culture***

#### ***Stable transduction***

A stable expression of PML constructs was obtained by a lentiviral-based strategy as described (Zennou, Petit et al. 2000). The efficiency of the HIV-1 based lentiviral pTRIP vector, in which PML constructs are subcloned, relies on the presence of a triple-stranded DNA structure that acts as a cis-determinant of HIV-1 DNA import. The stable integration of the transgenes into the host DNA allows efficient and long term transgene expression without clone selection. Virus stock production and infection were as described in (Zennou, Petit et al. 2000) to transduce and express PML wild type and mutants in the HEK293T cell line. Briefly, virus particles were produced after transient co-transfection of HEK293T cells, with the p8.91 encapsidation plasmid, the pHCMV-G vector encoding the vesicular stomatitis virus envelope and the pTRIP vector encoding PMLWT and its mutants, using a standard calcium phosphate method.

#### ***BRET1 transient transfections***

HEK293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with GLUTAmax (Gibco), 10 % fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin and

streptomycin, 1 mM Sodium Pyruvate (all from Gibco BRL). Cells were seeded at a density of  $5 \times 10^5$  cells per well in 6-well dishes, 24 h before transfection. Transient transfections were performed using PEI (Polyethylenimine, linear, MW: 25,000; cat. No.23966 Polysciences, Inc., Warrington, PA) in Optimem medium (Gibco BRL). PEI powder was dissolved in water to a concentration of 1 mg/ml in water which has been heated to 80 °C. Usually, 0.1 µg of PML-Luc construct was transfected alone or with increasing quantities of YFP-tagged SUMO1. The amount of transfected DNA was completed to a total of 2 µg with pcDNA3.1(+) empty vector. PEI (10 µg in 100 µl of Optimem medium) was added on the DNA and the samples were incubated for 20 min at room temperature. The PEI-DNA suspension was then added to the attached cells in 2 ml of fresh culture media. Following an overnight incubation, the transfection medium was replaced with fresh Dulbecco's modified Eagle's medium for three hours to allow cell recovery. Transfected cells ( $8 \times 10^4$ ) were then detached and replated in 96-wells white plates with clear bottom (Costar) pre-treated with D-polylysine (Sigma) and left in culture for 24 h before being processed for BRET1 assay. When required, the plated cells were treated with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> for the appropriate time within this 24 h.

#### *BRET2 transient transfections-*

HEK293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 1 mM L-glutamine, 10% foetal bovine serum (Wisent) and 100 µg/ml penicillin and streptomycin. Cells were seeded at a density of  $1 \times 10^6$  cells per 100-mm dish, 24 h before transfection. Transient transfections of plasmids were performed using the calcium phosphate precipitation method. Usually, 1 µg of PML-Luc construct was transfected alone or with increasing quantities of GFP-tagged SUMO1. The amount of transfected DNA was completed to a total of 10 µg with pGEM empty vector as already described in (Germain-Desprez, Bazinet et al. 2003). The transfection medium was replaced with the supplemented Dulbecco's modified Eagle's medium after 26 h and cells were left in culture for an additional 22 h before being processed for BRET2 assay. When required, the As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> treatment was done on the cells in suspension (see BRET2 detection assay).

## ***BRET detection assays***

### *BRET1 assay*

BRET1 measurement was done on attached cells as previously described (Percherancier, Berchiche et al. 2005). Before measurement, culture media was replaced by PBS. Coelenterazine H (Nanolight Technology) was then added to a final concentration of 5  $\mu$ M in PBS. Readings were then collected using a multi-detector plate reader MITHRAS LB940 (Berthold) allowing the sequential integration of the signals detected in the 480  $\pm$ 20 nm and 530  $\pm$ 20 nm windows, for Luciferase and YFP light emissions, respectively. The BRET1 signal is determined by calculating the ratio of the light intensity emitted by the YFP fusion over the light intensity emitted by the Luc fusion. The values were corrected by subtracting the background BRET1 signal detected when the Luc fusion construct was expressed alone. For BRET1 titration experiments, BRET1 ratios were expressed as a function of the [acceptor]/[donor] expression ratio (YFP/Luc). Total fluorescence and luminescence were used as a relative measure of total expression of the acceptor and donor proteins, respectively. Total fluorescence was determined with MITHRAS using an excitation filter at 485 nm and an emission filter at 535 nm. Total luminescence was measured in the MITHRAS, 10 min after the addition of coelenterazine H and the reading was taken in the absence of emission filter.

### *BRET2 assay*

The BRET2 assays were conducted on cells in suspension as we previously described in (Germain-Desprez, Bazinet et al. 2003). In brief, transiently transfected cells were resuspended in PBS. Cells were then distributed in 96-well microplates (white Optiplate from Packard) (20  $\mu$ g corresponding to  $\sim$  1-2  $\times$  10<sup>5</sup> cells). When required, cells were treated with 10  $\mu$ M As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> or vehicle for the appropriate time at 37°C. For the BRET2 assay, upon addition of the cell permeant luciferase substrate (coelenterazine Deep Blue, PerkinElmer Life Sciences), the bioluminescence signal resulting from the degradation of the substrate was detected using a 370–450 nm band pass filter (donor emission peak 400 nm). The transferred energy resulted in a fluorescence signal emitted by the GFP acceptor (excitation

peak 400 nm and emission peak 510 nm) that was detected using a 500–530 nm band pass filter. The BRET2 signal was quantified by calculating the acceptor fluorescence /donor bioluminescence ratio as previously reported. Expression level of each construct was determined by direct measurements of total fluorescence and luminescence on aliquots of transfected cell samples. The GFP total fluorescence was measured using a FluoroCount (PerkinElmer Life Sciences) with an excitation filter at 400 nm and an emission filter at 510 nm. The total luminescence was measured using the same cells incubated with coelenterazine H for 10 min (Molecular Probes) (emission peak 485 nm). The BRET2 was plotted as a function of the GFP/Luc fusion protein expression ratio, both fusion proteins expression being assessed with the same cells as described above, to take into account the potential variations in the expression of individual constructs from transfection to transfection. The values were corrected by subtracting the background BRET2 signal detected when the Luc fusion construct was expressed alone.

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

### ***Confocal microscopy***

For confocal microscopy,  $3 \times 10^5$  HEK293T cells were seeded 24 h after their transfection onto glass cover slips pre-treated with poly-D-lysine (Sigma Chemical, Co) placed within 6-well plates. Cells were then washed three times in PBS 24 h later and fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. Following several washes, cells were permeabilized with blocking buffer (PBS containing 0.3% Triton X-100 and 2% BSA (w/v)). Monoclonal anti-PML (1/250) and anti-RNF4 (1/100) antibodies were then added for 2 h in blocking buffer. Cells were washed twice and incubated for 1 h with the appropriate Alexa-Fluor 488- or 594-conjugated secondary antibody (1/500 dilution, Molecular Probe, Inc). Coverslips were mounted using vectashield (Vector laboratory). Confocal images were obtained on a Leica TCS-NT/SP inverted confocal laser-scanning microscope using an Apochromat x 63/1.32 oil-immersion objective. Co-localization was performed by overlay of the images using the Leica Confocal Software LCS (Heidelberg,

Germany). Excitation and emission filters for the different labelled dyes were as follows: YFP (green):  $\lambda_{ex}$ =488 nm,  $\lambda_{em}$ =540/25 nm; Texas red (red):  $\lambda_{ex}$ =568 nm,  $\lambda_{em}$ =610/30 nm.

### **Western blot analysis**

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

## RESULTS

### *PML / SUMO1 interactions are detected by BRET*

In order to better understand the role of SUMO in PML function and its involvement in the dynamic of PML NB formation, we developed a BRET assay for the detection of PML interactions with SUMO in living cells. For this purpose, PMLIII was tagged at its carboxy-terminus with a luciferase (PMLWT-Luc) whereas SUMO1 was tagged at his amino-terminus with YFP or its GFP green variant. We performed a classic BRET titration assay (Germain-Desprez, Bazinet et al. 2003; Percherancier, Berchiche et al. 2005) by co-transfecting HEK293T cells with a constant amount of PMLWT-Luc and increasing amounts of either YFP-SUMO1 (BRET1, Fig. 1A) or GFP-SUMO1 (BRET2, Fig. 1B) (differences in the BRET assay sensitivity, depending on the fluorescent protein acceptor used, were previously described (Hamdan, Audet et al. 2005)). In each case, the occurrence of BRET was quantified by measuring the ratio of light emitted by the acceptor (YFP or GFP) and the luciferase donor upon addition of the membrane permeable luciferase substrate, coelenterazine. The BRET ratio was plotted as a function of the YFP/Luc or GFP/Luc fusion protein expression to take into account the potential variations in the expression of individual constructs.

As shown in Fig. 1A or B, a strong BRET signal occurred between PMLWT-Luc/YFP-SUMO1 or PMLWT-Luc/GFP-SUMO1 BRET pairs and increased as a hyperbolic function which is indicative of a specific interaction (Perroy, Pontier et al. 2004). Similar results were obtained using GFP-SUMO2 as an acceptor protein (data not shown). Negative controls, that exhibited a linear non-specific BRET signal resulting from random collision (“bystander” BRET (Perroy, Pontier et al. 2004)), ascertained this specificity: i) a donor targeting Luc to the nucleus by fusion to a nuclear localization signal (Luc-NLS, Fig. 1B) and ii) a RING finger PML mutant (PMLC57A,C60A-Luc, Fig. 1A) with altered SUMO binding properties (Fig. 3C) (Shen, Lin et al. 2006) that is unable to interact with the only known SUMO E2 ligase UBC9 (Duprez, Saurin et al. 1999).

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

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

Since BRET is a proximity-based assay, the BRET signal observed with the PMLWT/SUMO1 pair may result not only from the covalent (sumoylation) but also from the non-covalent interaction between PML and SUMO (Model, Fig 1H). To evaluate the contribution of the covalent linkage of SUMO to PMLWT-Luc relative to its SUMO non-covalent interactions, we compared the BRET titration curve obtained with PMLWT-Luc with that of PML3KR-Luc, its sumoylation-less mutant (with lysines 65, 160, 490 mutated to arginine), in pairs with YFP- or GFP-SUMO1 (Fig. 1C and D). Since the covalent-linkage of SUMO is abrogated within the PML3KR mutant, the difference in the BRET signal between the PMLWT and PML3KR saturation curves depends on PML sumoylation (Fig. 1C); furthermore, the PML3KR saturation curve mainly revealed the contribution of non-covalent interactions to the BRET signal (Fig. 1C and Model, Fig. 7B). Thus, it appears that non-covalent interactions represent a major part of the BRET signal in BRET1 (Fig. 1C) and BRET2 (Fig. 1D) assays. Strikingly, a linear and low non-specific BRET signal was obtained with PMLWT-Luc and YFP-SUMO1G, a SUMO mutant with a single glycine residue at its C-terminus, that is unable to be covalently conjugated to proteins (Ayaydin and Dasso 2004) (Fig. 1A and C). Similar results were obtained with YFP-SUMO2G (data not shown). Interestingly, this shows that SUMO1 and -2 paralogs do not interact in their free form in vivo with PML, in contrast with data obtained in vitro (Shen, Lin et al. 2006). Thus, the non-covalent PML/SUMO1 interactions detected by BRET involve SUMO1-modified proteins recruited by PML-Luc as illustrated in Fig. 7B model.

To further establish the capacity of the BRET assay to detect variations in the sumoylation status of PML in living cells, we tested PMLWT-Luc or PML3KR-Luc/YFP (or GFP)-SUMO1 pairs in the presence of As2O3. Clearly, a significant increase in the BRET signal was obtained with PMLWT upon As2O3 treatment as seen in titration (Fig. 1C and D), time course (Fig. 1E) and dose response (Fig. 1F) experiments. In contrast, no

or very limited change in the BRET signal was observed with PML3KR as revealed by the saturation curves (Fig. 1C and D) and confirmed by the dose-response curve (Fig. 1F). Consequently, the As2O3-enhanced BRET signal was concluded to be dependent on PML sumoylation. To evaluate the relative contribution of each of the three PML sumoylation target lysines, we compared the As2O3-induced sumoylation single PML K→R mutants. While K490R and K65R single mutants exhibit a partially reduced As2O3-induced sumoylation compared to PMLWT, mutation of K160 alone was sufficient to prevent the As2O3-induced sumoylation of PML to the same extent as the triple 3KR mutant (Fig. 1G). Thus, K160 is a prerequisite for As2O3-induced PML modification by SUMO1. These results are in agreement with previous Western blot data (Lallemand-Breitenbach, Zhu et al. 2001). Additional experiments revealed that As2O3 exhibited a similar potency to induce PML sumoylation with SUMO1 (Log EC50 = -6,430 +/- 0,181 M), SUMO2 (Log EC50 = -6,618 +/- 0,203 M) or SUMO3 (Log EC50 = -6,626 +/- 0,272 M) as shown by comparing the EC50 in dose response curves (Fig. 4A). Thus, we proved here that the sensitivity of both BRET1 and BRET2, which assay conditions differ as described in Experimental Procedures, was sufficient to monitor dynamic changes in PML sumoylation in living cells.

### ***PML SUMO Binding Domain is not required for As2O3-induced PML sumoylation***

The identified PML SBD, which sequence is represented in Fig. 7A, is involved in the non-covalent recruitment of sumoylated proteins, among them PML itself, as demonstrated by co-immunoprecipitation studies (Shen, Lin et al. 2006). To evaluate the contribution of PML SBD in the non-covalent PML/SUMO1 interactions detected by BRET, we compared the BRET1 signal of PMLWT with that of PMLSBD that is mutated in its SBD core sequence (VVVI hydrophobic amino acids; see Fig. 7A) (Shen, Lin et al. 2006). As seen in Fig. 2A, a significant decrease in the BRET signal was obtained with PMLSBD relative to PMLWT indicating that non-covalent PML/SUMO1 interactions are largely dependent on PML SBD core sequence. Upon As2O3 treatment, the increase in the BRET profile was quite similar with both PMLWT and PMLSBD as shown by the



saturation and dose response curves (Fig. 2A-B). This demonstrates that the SBD-dependent PML/SUMO non-covalent interactions are not required for As2O3-induced PML sumoylation.

The limited contribution of sumoylated endogenous proteins to the non-covalent BRET signal is estimated using the PML3KR-Luc fusion (Fig. 1C) which can interact with endogenous sumoylated proteins via its intact SBD. Interestingly, As2O3 induced a slight increase in PML3KR-Luc BRET signal (Fig. 1C, BRET1 assay) likely resulting from the enhanced sumoylation of endogenous PML by YFP-SUMO1. In contrast, the BRET signal observed with PML3KR-Luc was not increased by As2O3 in the BRET2 assay (Fig. 1D), consistent with the fact that the sensitivity of the BRET2 required a much higher level of expression of the donor luciferase fusion than the BRET1 assay (Hamdan, Audet et al. 2005) rendering the contribution of the YFP-SUMO1-modified endogenous PML negligible.

Altogether, our results indicate that in the absence of a sumoylation inducer such as As2O3 (basal conditions), most of the PML-Luc/YFP-SUMO1 BRET signal is accounted by the SBD-dependent non-covalent interaction of endogenous sumoylated proteins with the PML-Luc donor whereas in the presence of the inducer, the large increase in the BRET signal only reflects a change in PML sumoylation. Our data also indicate that the As2O3-induced PML sumoylation does not require the non-covalent interaction of SUMO1-modified proteins with PML SBD.

### ***Serine phosphorylation sites within the SBD are required for PML SBD interactions with SUMO-modified proteins***

Recently, serines acting as targets for CK2 kinase phosphorylation were identified on PMLIV (Scaglioni, Yung et al. 2006). Interestingly, these serines (S560, S561, S562, S565 in PMLIII indicated in green in Fig. 7A) are adjacent to the SBD hydrophobic core sequence within PML SBD (Shen, Lin et al. 2006). We hypothesized that these serines, as phosphorylation targets, could functionally regulate the interaction properties of PML SBD.

To determine whether these serines may affect the binding of SUMO1-modified proteins to PML SBD, a mutant of these serines (PMLS560A, S561A,S562A,S565A-Luc, herein called PMLS560-565A-Luc) was tested by BRET in pair with YFP-SUMO1 (Fig. 3A). Based on the titration curves (Fig. 3A, left panel), the BRET signals calculated for PMLWT, PMLS560-565A and PMLSBD at an identical YFP/Luc ratio are presented as a bar graph (Fig. 3A, right panel). Interestingly, a similar reduction in the BRET signal was observed with PMLSBD and PMLS560-565A when compared to PMLWT. This indicates that the serines within the SBD are important determinants for the SBD-dependent non-covalent interactions of PML with most its SUMO-modified protein partners (if not all). Consistent with the hypothesized involvement of the phosphorylation of these serines in these interactions, a BRET signal comparable to that of PMLWT was restored when PMLS560D,S561D,S562D,S565D, a serine phosphomimetic mutant (called herein PMLS560-565D), was used (Fig. 3B). Altogether, these results indicate that serine phosphorylation sites within the SBD regulate PML SBD-dependent interactions with SUMO1-modified proteins.

It is noteworthy that, as for PMLSBD, the sumoylation of PMLS560-565A mutant remains As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-inducible (Fig. 3A). The amplitude of the As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-induced signals was similar for PMLWT and PMLS560-565A indicating that the integrity of the poly-serine motif is dispensable for As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-induced PML sumoylation. This is consistent with the sumoylation profile obtained by Western blot using extracts from HEK293T cells stably expressing PMLWT or its mutants (Fig. 3C). An increase in the sumoylation of PMLWT, PMLSBD and PMLS560-565A was detected upon the addition of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> by a change in the sumoylation pattern towards higher molecular weight SUMO-modified species (as expected, no SUMO1-modified forms could be detected with PML3KR, PMLC57A,C60A and the sumoylation-deficient double mutants, PML3KR/SBD and PML 3KR/S560-565A).

Interestingly, the serine phosphorylation-deficient mutant, PMLS560-565A is localized like PMLWT in multiple and dense nuclear dots characteristics of PML NBs as shown by confocal microscopy (Fig. 3D). In contrast PMLSBD is distributed in large and diffuse aggregates with disruption of PML NBs as previously described (Shen, Lin et al.

2006). This result most likely suggests that the poly-serine motif (from S560 to S565), in contrast to the VVVI core sequence of the SBD, is not required for the formation of PML NBs. It also suggests that some non-covalent interaction(s) required for the integrity of PML NBs is lost in PMLSBD but maintained in PMLS560-565A.

As suggested (Hecker, Rabiller et al. 2006), negative charges imposed either by a stretch of neighbouring acidic amino acids and/or phosphorylated serine residues within the SBD of some proteins favours the recruitment of SUMO1 but not SUMO2. Thus, we used the SUMO BRET assay to determine if differential SBD-dependent non-covalent recruitment of sumoylated proteins by PML could be evidenced with the three SUMO paralogs. Hyperbolic curves of a similar range of amplitudes were obtained with PMLWT and the three SUMO paralogs as evidenced by BRET titration experiments (Fig. 4B). Furthermore, the BRET signal was drastically and similarly decreased with all SUMO paralogs for PMLS560-565A mutant to level close to those obtained with PMLSBD mutant, as evidenced by BRET titration curves or corresponding bar graphs (Fig. 4B-C). This indicates that comparable binding of the three SUMO paralogs occurred with PML SBD and that this binding depends on PML S560 to S565 serine residues and their phosphorylation.

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

It is now known that PML is polyubiquitinated and degraded in a proteasome-dependent manner, a process that requires the K160 sumoylation site (Lallemand-Breitenbach, Zhu et al. 2001). Consequently, we studied the possible link between PML sumoylation, ubiquitination and the As2O3-enhanced PML degradation.

In an attempt to follow the ubiquitination of PML and its mutants in basal conditions and upon exposure to As2O3, we conducted a ubiquitin BRET2 assay (Perroy, Pontier et al. 2004) using PML-Luc fusions in pairs with GFP-UBI. As seen in Fig. 5C, the BRET titration curves obtained with PMLSBD, PML3KR and PML3KR-SBD were similar

in the presence or absence of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and show that the BRET signal increased as a function of the amount of GFP-UBI transfected. In contrast, with PMLWT and PMLS560-565A, a clear shift of the BRET curves to the right was seen upon As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> treatment (Fig. 5A). This is indicative of a change in the expression of the fusions in the presence of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> since BRET ratios are plotted as a function of the GFP/Luc fusion protein expression. To directly assess how the BRET ratio varies in relation to the expression of PMLWT-Luc and GFP-UBI fusions, the BRET ratio, Luc expression and GFP expression are presented as separate bar graphs for each sample (11 samples) analyzed with the ubiquitin BRET assay in the presence or absence of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Fig. 5B). Clearly, neither the BRET signal nor the GFP-UBI expression are significantly changed upon As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> addition whereas a 3-7 fold decrease in the PMLWT-Luc expression was observed. While similar results were obtained with PMLS560-565A mutant (data not shown), no significant difference in PMLSBD-Luc, PML3KR-Luc and PML3KR-SBD-Luc expression was detected upon As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> treatment (Fig. 5D and data not shown). The significant decrease in PMLWT-Luc and PMLS560-565A-Luc expression, seen as early as 30 min after the addition of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, is not normally seen in cells where GFP-UBI is not overexpressed. This indicates that the overexpression of ubiquitin accelerates the kinetics of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-induced PML degradation.

Consistent with the results obtained with the ubiquitin BRET assay in transiently transfected cells, PML3KR and PMLSBD stably expressed in HEK293T cells were shown to be resistant whereas PMLWT and PMLS560-565A were sensitive to degradation by a long incubation (16 h) with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, as revealed by Western blot (Fig. 5E).

Altogether these results indicate that the As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-induced PML degradation is not dependent on the serine phosphorylation sites within the SBD but requires the integrity of both PML sumoylation target sites and PML SBD core sequence, as also needed for PML NB formation (Shen, Lin et al. 2006).

***Both PML interaction with RNF4 and its RNF4-induced degradation are reinforced by As2O3***

RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase involved in the control of PML stability and implicated in As2O3-induced PML degradation (Lallemand-Breitenbach, Jeanne et al. 2008; Tatham, Geoffroy et al. 2008). As2O3, which enhances PML sumoylation, was also suggested to favor PML SUMO-dependent polyubiquitination and proteasome-mediated degradation (Lallemand-Breitenbach, Jeanne et al. 2008; Tatham, Geoffroy et al. 2008).

To further study the mechanisms involved in PML degradation, we assessed the effect of RNF4 on the expression of PMLWT and its mutants exhibiting a differential sensitivity to the As2O3-induced degradation as described above (Fig. 5). First, we overexpressed RNF4 in HEK293T transiently transfected with PMLWT. Clearly, RNF4 alone induced a decrease in PML expression (Fig. 6A, lanes 1 and 4), a process accelerated by As2O3 and observed as early as 1 h after addition of this agent (Fig. 6A, lane 4-6). In contrast, no change in PML level was observed in the absence of overexpressed RNF4 upon a similar As2O3 treatment (Fig. 6A, lanes 1-3). Then, we compared the fate of PMLWT, PMLS560-S565A, PML3KR or PMLSBD expressed in HEK293T cells in the presence or absence of overexpressed RNF4 and proteasome inhibitor Epoxomycin (Fig. 6C). The RNF4-induced decrease in PMLWT level was inhibited by Epoxomycin (Fig. 6C, lanes 1-2 and 4), indicating that RNF4 alone leads to PML degradation via the proteasome pathway. Similar experiments indicated that RNF4 also induced PMLS560-565A degradation but did not alter the level of PML3KR and PMLSBD (Fig. 6C, lanes 1-2 and 4). However, in overexpression experiments where significantly higher RNF4/PML ratios were used, a forced degradation of the much more resistant PMLSBD and to some extent PML3KR was also observed (data not shown). Taken together, our results show that in addition to PML sumoylation target sites, efficient proteasome-dependent RNF4-mediated degradation depends on the integrity of PML SBD core sequence but not of the adjacent phosphorylable serines.

To determine whether the ability of PML mutants to interact with RNF4 can explain their differential sensitivity to RNF4-induced degradation, we tested their interaction by a BRET1 assay using a limiting concentration of a Luc version from PMLWT or its mutants in pair with increasing and saturating concentrations of RNF4-YFP. Clearly, BRET titration curves indicated that PMLWT, PMLS560-565A and unexpectedly PMLSBD, interacted with RNF4 and that their interaction was strongly increased by As2O3, indicating that this drug enhances the affinity of PML and its mutants for RNF4 (Fig. 6B). In contrast, lower BRET signals indicative of weak or no interaction were obtained with PML3KR and these signals were only slightly increased by As2O3 (Fig. 6B), possibly due to the interaction of PML3KR with endogenous PML as previously noted (Fig. 1C). Interestingly, the differential sensitivity of PML and its mutants to RNF4-mediated degradation was also evidenced by the clear shift of PML, PMLS560-565A and PMLSBD BRET curves to the right upon As2O3 treatment. Analysis of each individual sample treated or not with As2O3 confirmed that these curve shifts were due in each case to a decrease in the level of expression of the Luc fusions upon As2O3 exposure; in the conditions used, no change in the expression of PML3KR was seen after As2O3 treatment at any of the RNF4/PML3KR ratio used.

Considering that PMLSBD was resistant to degradation upon As2O3 exposure (Fig. 5 and Fig. 6C), it was unexpected to find that the interaction of PMLWT and PMLSBD with RNF4 were similarly increased by As2O3. Thus, it appears that the capacity to interact with RNF4 is not the only determinant in the differential sensitivity of PML and its mutants to RNF4-induced proteasome-dependent degradation.

## DISCUSSION

### *Covalent and non-covalent PML/SUMO interactions are required for As2O3- and RNF4-induced PML degradation*

Our results indicate that stimulation of the sumoylation or ubiquitination machinery through overexpression of SUMO1 (not shown), ubiquitin or RNF4 ligase as well as through As2O3 treatment enhances PML degradation; the regulation of PML level is thus dependent on the relative abundance of the various components of the ubiquitin machinery but also, as less usual, of the SUMO machinery. We also demonstrate here that, in addition to be necessary for NB formation (Shen, Lin et al. 2006), both the covalent-linkage of SUMO to PML and the integrity of PML SBD which mediates non covalent interactions of PML with SUMO-modified proteins, are required for As2O3- and RNF4-induced PML degradation (See Model in Fig. 7C). The requirement of the integrity of PML SBD for PML degradation provides an explanation for our previous data showing that a C-terminus mutant, lacking the amino acids 555 to 641 of PML and thus PML SBD which starts at residue 556, completely impairs the As2O3-induced PML degradation (Zhu, Koken et al. 1997).

Interestingly, a functional PML SBD is however not required for the As2O3-enhanced PML sumoylation and for the basal or As2O3-enhanced PML/RNF4 interaction. We suggest that the increased PML interaction with RNF4 in the presence of As2O3 is most likely due to the As2O3-enhanced formation of higher molecular weight poly-SUMO chains onto PML (slower migrating species most often observed on blots upon addition of As2O3 – data not shown) and to higher affinity of RNF4 for poly-SUMO chains over monomeric SUMO, as recently reported based on in vitro studies (Tatham, Geoffroy et al. 2008). Since inactivation studies revealed that both SUMO2/3 and SUMO1 are required for As2O3-induced PML degradation (Lallemand-Breitenbach, Jeanne et al. 2008), we suggest that SUMO2/3 inactivation, by preventing the formation of polymeric sumoylation chain onto PML, most likely impairs PML/RNF4 interaction and thus the As2O3-induced PML degradation. While As2O3 is suggested to increase the ratio of SUMO1 over SUMO2/3

incorporated in the sumoylated PML (Lallemand-Breitenbach, Jeanne et al. 2008), it is not yet clear however how SUMO1 participates to the As2O3-induced PML degradation. This may involve SUMO1 non-covalent binding to PML SBD, the coupling of SUMO1 directly to one of the PML target lysines, or its linking at the end of poly-SUMO2/3 chains to terminate chain growth. Compared to poly-SUMO2/3 chains, SUMO1-terminated polySUMO2/3 chains may exhibit a different substrate specificity for the cellular isopeptidases involved in depolymerizing/dismanteling poly-SUMO chains (Mukhopadhyay, Ayaydin et al. 2006; Petrie and Zelent 2008) or for RNF4.

In addition to functioning as a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase (Tatham, Geoffroy et al. 2008), RNF4 also catalyses the ubiquitination of several PML C-terminal lysines in vitro and possibly the ubiquitination of PML lysine 401 in vivo (Lallemand-Breitenbach, Jeanne et al. 2008). This could explain why a PML sumoylation-deficient mutant (PML3KR) can be downregulated at very high level of RNF4 overexpression; however, this degradation is not accelerated by As2O3 (data not shown).

***A phospho-switch controls PML SBD interaction with sumoylated proteins: a possible role in NB formation and maturation***

Interestingly, our results also indicate that, apart from the integrity of the SBD hydrophobic core sequence, specific serines serving as targets for CK2 kinase (Scaglioni, Yung et al. 2006) or their phosphomimetics are required for most PML SBD-dependent non-covalent interactions with sumoylated proteins and thus presumably for progression toward normal NB late stage maturation (see Model in Fig. 7C). This demonstrates that phosphorylation of a SUMO Binding Domain ('SBD phospho-switch') can positively regulate the interaction of a SBD with its SUMO-modified protein partners. This is consistent with very recently published data showing the phospho-regulation of several SBD-containing proteins including PML (Scaglioni, Yung et al. 2006).

Notably, both the localization and sensitivity to As2O3- and RNF4-induced degradation of PMLWT and PMLS560-S565A are comparable but differ from those of



PMLSBD mutant. This suggests that some non-covalent interaction(s) required for the localization of PML into NBs and for PML degradation are preserved in PMLS560-565A and lost in PMLSBD. Interestingly, we consistently observed that, for PMLS560-565A, the increase of the SUMO BRET signal upon As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> treatment was similar to the one of PMLWT and always slightly higher to that of PMLSBD (Fig. 3). It was thus tempting to speculate that the interaction of SUMO-modified PML with PML SBD was preserved in PMLS560-565A. According to PML nucleation model (Shen, Lin et al. 2006), the non-covalent binding of sumoylated PML to PML SBD is determinant for the nucleation events involved in NB formation and maturation. A preservation of this sumoylation- and SBD core sequence-dependent PML oligomerization could account for PMLS560-565A localization to PML NBs. Furthermore, it is possible that the localization of PML within the NBs, a process known to be enhanced by As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Lallemand-Breitenbach, Zhu et al. 2001), facilitates its RNF4-induced degradation; this would explain why PMLS560-565A is more sensitive to RNF4 degradation than PMLSBD despite the fact that both interact similarly with RNF4 (Model, Fig. 7C). Further studies could determine if, as a possible mechanism, the suggested E3 ubiquitin ligase activity (Bernardi and Pandolfi 2007) of PML reinforces RNF4-induced PML degradation in PML NBs, where components of the ubiquitin machinery are concentrated (Lallemand-Breitenbach, Zhu et al. 2001; Lafarga, Berciano et al. 2002).

Clearly, our results demonstrate that the stretch of serines, adjacent to the SBD hydrophobic core sequence and acting as targets for CK2 kinase (Scaglioni, Yung et al. 2006), is not required for the RNF4-induced PML degradation. Since CK2 kinase was previously found to promote ubiquitin-mediated PML degradation upon phosphorylation of these serines (Scaglioni, Yung et al. 2006), CK2-dependent and RNF4-dependent PML degradation may represent two independent pathways regulating negatively PML level in oncogenic and physiological conditions. Since it was recently shown that ATP depletion results in an immobilization of PML at NBs, a condition which may decrease PML phosphorylation (Weidtkamp-Peters, Lenser et al. 2008), it remained to be determined if cycles of phosphorylation/dephosphorylation of the serines adjacent to the SBD core

sequence may be involved in the regulation of PML nucleation at the NBs and/or NB maturation.

This study took advantage of the development of a sensitive and quantitative SUMO BRET assay for the molecular dissection and dynamic monitoring of kinetics of protein sumoylation upon pharmacological agent treatment and non-covalent interactions with SUMO in living cells. This represents a significant advance compared to our initial description of a BRET assay to study membrane protein ubiquitination (Perroy, Pontier et al. 2004). In this initial study, no tools were available to determine if covalent interaction with UBI could be discriminated by BRET from non covalent interaction. It is also noteworthy that the SUMO BRET assay could simultaneously detect PML/SUMO interactions and PML degradation. This represents a great advantage when strength of interactions are compared upon various pharmacological treatments or when comparing mutants with different sensitivities to degradation. Since BRET can be used in high throughput screening (Hamdan, Audet et al. 2005), the novel SUMO BRET assay paves the way toward large scale screening of chemical libraries for therapeutic agents modulating SUMO interactions.

**REFERENCES**

- Angers, S., A. Salahpour, et al. (2000). "Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3684-3689.
- Ayaydin, F. and M. Dasso (2004). "Distinct in vivo dynamics of vertebrate SUMO paralogues." *Mol Biol Cell* 15(12): 5208-5218.
- Bernardi, R. and P. P. Pandolfi (2007). "Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(12): 1006-1016.
- de The, H., C. Chomienne, et al. (1990). "The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus." *Nature* 347(6293): 558-561.
- Duprez, E., A. J. Saurin, et al. (1999). "SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation." *J Cell Sci* 112 ( Pt 3): 381-393.
- Germain-Desprez, D., M. Bazinet, et al. (2003). "Oligomerization of transcriptional intermediary factor 1 regulators and interaction with ZNF74 nuclear matrix protein revealed by bioluminescence resonance energy transfer in living cells." *J Biol Chem* 278(25): 22367-22373.
- Hamdan, F. F., M. Audet, et al. (2005). "High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay." *J Biomol Screen* 10(5): 463-475.
- Hay, R. T. (2005). "SUMO: a history of modification." *Mol Cell* 18(1): 1-12.
- Hecker, C. M., M. Rabiller, et al. (2006). "Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs." *J Biol Chem* 281(23): 16117-16127.

Kaiser, F. J., T. Moroy, et al. (2003). "The RING finger protein RNF4, a co-regulator of transcription, interacts with the TRPS1 transcription factor." *J Biol Chem* 278(40): 38780-38785.

Kamitani, T., K. Kito, et al. (1998). "Identification of three major sentrinization sites in PML." *J Biol Chem* 273(41): 26675-26682.

Lafarga, M., M. T. Berciano, et al. (2002). "Clastosome: a subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome." *Mol Biol Cell* 13(8): 2771-2782.

Lallemand-Breitenbach, V., M. Jeanne, et al. (2008). "Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway." *Nat Cell Biol* 10(5): 547-555.

Lallemand-Breitenbach, V., J. Zhu, et al. (2001). "Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation." *J Exp Med* 193(12): 1361-1371.

Masclé, X. H., D. Germain-Desprez, et al. (2007). "Sumoylation of the transcriptional intermediary factor 1beta (TIF1beta), the Co-repressor of the KRAB Multifinger proteins, is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain." *J Biol Chem* 282(14): 10190-10202.

Mukhopadhyay, D., F. Ayaydin, et al. (2006). "SUSP1 antagonizes formation of highly SUMO2/3-conjugated species." *J Cell Biol* 174(7): 939-949.

Negorev, D. and G. G. Maul (2001). "Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot." *Oncogene* 20(49): 7234-7242.

Percherancier, Y., Y. A. Berchiche, et al. (2005). "Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers." *J Biol Chem* 280(11): 9895-9903.

- Perroy, J., S. Pontier, et al. (2004). "Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET." *Nat Methods* 1(3): 203-208.
- Petrie, K. and A. Zelent (2008). "Marked for death." *Nat Cell Biol* 10(5): 507-509.
- Salomoni, P. and P. P. Pandolfi (2002). "The role of PML in tumor suppression." *Cell* 108(2): 165-170.
- Scaglioni, P. P., T. M. Yung, et al. (2006). "A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor." *Cell* 126(2): 269-283.
- Seeler, J. S. and A. Dejean (2001). "SUMO: of branched proteins and nuclear bodies." *Oncogene* 20(49): 7243-7249.
- Shen, T. H., H. K. Lin, et al. (2006). "The mechanisms of PML-nuclear body formation." *Mol Cell* 24(3): 331-339.
- Sun, H., J. D. Levenson, et al. (2007). "Conserved function of RNF4 family proteins in eukaryotes: targeting a ubiquitin ligase to SUMOylated proteins." *EMBO J* 26(18): 4102-4112.
- Tatham, M. H., M. C. Geoffroy, et al. (2008). "RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation." *Nat Cell Biol* 10(5): 538-546.
- Weidtkamp-Peters, S., T. Lenser, et al. (2008). "Dynamics of component exchange at PML nuclear bodies." *J Cell Sci*.
- Xu, Y., D. W. Piston, et al. (1999). "A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(1): 151-156.
- Yang, X. J. and S. Gregoire (2006). "A recurrent phospho-sumoyl switch in transcriptional repression and beyond." *Mol Cell* 23(6): 779-786.
- Zennou, V., C. Petit, et al. (2000). "HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap." *Cell* 101(2): 173-185.

Zhu, J., M. H. Koken, et al. (1997). "Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8): 3978-3983.

## FOOTNOTES

### Acknowledgements

We thank Drs. Mary Dasso, Patrick Charneau, Frank J. Kaiser, Bernard Horsthemke, Stéphanie Pontier and Michel Bouvier for their gifts of reagents and Jean-Claude Lelong for his generous contribution to this work. D. G.-D. was supported by a studentship from Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and M.A as a Chercheur National of FRSQ

§This work was supported by a grant from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (to M.A.), the Association pour la Recherche sur le Cancer and the Ligue Nationale Contre le Cancer (to M. K C.-A.).

The abbreviations used are: SBD: SUMO Binding Domain; NB: Nuclear Body; PML: ProMyelocytic Leukaemia protein; SUMO: Small Ubiquitin-like Modifier; BRET: Bioluminescence Resonance Energy Transfer; APL: Acute Promyelocytic Leukemia; CK2: Casein kinase 2; YFP: Yellow Fluorescent Protein; GFP: Green Fluorescent Protein; Luc: Luciferase; Ubi: Ubiquitin; RNF4: RING Finger protein 4

**FIGURE LEGENDS****Fig.1. BRET reveals both covalent and non-covalent PML/SUMO1 interactions as well as As2O3-induced PML sumoylation in living cells.**

A, B) Detection of PML/SUMO1 interactions by BRET1 (A) or BRET2 (B) titration assays using HEK293T cells transfected for expression of increasing amounts of YFP-SUMO1 (BRET1) or GFP-SUMO1 (BRET2) and a fixed amount of Luc fusion. Negative controls: BRET pairs including PMLC57,60A-Luc (a non-sumoylatable mutant with C57 and C60 mutated to A) or YFP-SUMO1G (a SUMO1 that cannot be processed) (dotted line) (A) and Luc fused to a NLS (B). C) and D) Detection of covalent and non-covalent PML/SUMO1 interactions by BRET1 (C) or BRET2 (D) titration assays in the presence (dotted lines, empty symbols) or absence (solid lines and symbols) of As2O3 in HEK293T cells transfected for expression of PMLWT-Luc or its sumoylation deficient mutant PML3K-Luc in pair with either YFP-SUMO1 (BRET1) or GFP-SUMO1 (BRET2). Negative control: PMLWT-Luc in pair with YFP-SUMO1G. E) Kinetics of As2O3-induced PMLWT-Luc sumoylation revealed by BRET1 (assay on attached cells) and BRET2 (cells in suspension). F) Dose-response curve to As2O3 treatment for PMLWT-Luc or PML3KR-Luc/YFP-SUMO1 BRET1 pairs. Negative control: PMLC57,60A-Luc/YFP-SUMO1. G) Comparison of As2O3-induced sumoylation of PMLWT, PML3KR and its single lysine mutants at an identical YFP acceptor/Luc donor expression ratio as derived from titration curves. As2O3 treatment (C-G): 5  $\mu$ M, 4 h exposure for BRET1 and Western Blot or 10  $\mu$ M, 70 min exposure for BRET2. H) Model for the covalent (sumoylation) and non-covalent interactions between a tested protein fused to Luc and SUMO fused to a fluorescent protein (YFP) that generate a BRET signal. The black arrows indicate the Bioluminescent Transfer of energy (or BRET) that occurs between the Luc fusion and the GFP fusion upon exposure to the cell permeable luciferase substrate.



**Fig.2. PML SBD is responsible for non-covalent PML/SUMO1 interactions detected by BRET but is not required for As2O3-induced PML sumoylation**

A) Detection of the non-covalent SBD-dependent PML/SUMO1 interactions by BRET1 in the presence (dotted lines, empty symbols) or absence (solid lines and symbols) of As2O3 in HEK293T cells transfected for expression of PMLWT-Luc or its SBD deficient mutant PMLSBD-Luc in pair with YFP-SUMO1. B) Dose-response curves to As2O3 treatment for PMLWT-Luc or PMLSBD-Luc/YFP-SUMO1 BRET1 pairs. Negative control: PML3KR-SBD-Luc in pair with YFP-SUMO1.

**Fig.3. Serine phosphorylation sites within the SBD are required for PML SBD-dependent interactions with SUMO1-modified proteins.**

A) Disruption of the non-covalent SBD-dependent PML/SUMO1 interactions in HEK293T cells transfected for expression of either PMLWT-Luc (black symbols), PMLSBD-Luc (red symbols) or PMLS560-565A-Luc phosphorylation deficient mutant (blue symbols) in pair with YFP-SUMO1 in the presence (dotted lines, empty symbols) or absence of As2O3 (solid lines and symbols) (left panel). Data derived from the BRET1 titration assay (left panel) at an identical YFP acceptor/Luc donor expression ratio are presented in a bar graph (right panel). B) Comparison of the BRET1 signal between PMLWT-Luc and PMLS560-565D -Luc phosphomimetic mutant in pair with YFP-SUMO1 at a fixed YFP/Luc expression ratio. C) Western blot of extracts from HEK293T cells, stably expressing PMLWT or its various mutants, submitted or not to As2O3 treatment (5  $\mu$ g, 4 h). PML and its SUMO-modified species are revealed by anti-PML antibody. D) Localization by confocal microscopy of PMLWT-Luc or its various mutants in transiently transfected in HEK293T cells.

**Fig.4. PML covalent and non-covalent interactions detected by BRET with the different SUMO paralogs.**

A) Dose-response curves to As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> treatment for PMLWT-Luc in pairs with YFP-SUMO1, YFP-SUMO2 or YFP-SUMO3. B-C) Comparison of the BRET signal between PMLWT-Luc and its mutants in pairs with YFP-SUMO1 (black), YFP-SUMO2 (blue) and YFP-SUMO3 (red) as assessed by a BRET1 titration assay for PMLWT and PMLS560-565A (B) and illustrated with a bar graph derived from titration curves at an identical YFP/Luc expression ratio for PMLWT and its mutants (C).

**Fig.5. Both PML SBD and PML sumoylation target sites are critical for the As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-induced PML degradation.**

A-D) Detection of a differential degradation of PMLWT and its mutants induced by As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10 μM, 35 min exposure) in HEK293T cells transfected for expression of PMLWT-Luc or its mutants in pairs with GFP-UBI. PML-Luc fusions are divided in two groups depending on their response to As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> treatment: degradation (A-B) and no degradation (C-D). BRET2 titration curves are in A and C). As confirmed by the bar graphs in B), a shift of the BRET2 curves to the right seen in the presence of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in A) is indicative of a change in the expression of the Luc-fusions (change in the GFP/Luc expression ratio upon As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> treatment). Bar graphs for PMLWT-Luc (B) and PMLSBD-luc (D) in pairs with GFP-UBI as derived from the data in A) and C), respectively. For each sample treated or not with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, the BRET2 and the expression level of the PML-Luc fusion are shown (B and D); the expression level of GFP-UBI which essentially remains unchanged upon addition As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> for all pairs tested is also shown in B) for PMLWT-Luc. E) Western blot on extracts from HEK293T cells stably expressing PMLWT, PML3KR, PMLSBD or PMLS560-565A and submitted or not to a 16 h treatment with 1 μM As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

**Fig.6. RNF4 interacts with PML and is involved in its constitutive and As2O3-induced degradation.**

A-B) Western blots of extracts from HEK293T cells transiently transfected for expression of PMLWT (A and B), PML3KR, PMLSBD and PMLS560-565A (B) alone or with Flag-RNF4, were treated or not either with 5  $\mu$ M As2O3 for 6 h (A-B) and/or with 1  $\mu$ M Epoxomycin for 16 h (B). Anti-PML, anti-Flag and anti-Actin antibodies were used. C) Interaction of RNF4 with PMLWT and its mutants assessed by BRET1 in HEK293T cells transiently transfected for expression of PML-Luc or its various mutants in pairs with RNF4-YFP and submitted or not to an As2O3 treatment (1  $\mu$ M, 16 h).

**Fig.7. Models for PML covalent and non-covalent interactions with SUMO dissected by BRET and their implication in As2O3 and/or RNF4-induced PML degradation.**

A) Schematic representation of PMLIII (used in this study) and PMLIV isoforms. The three sumoylation target lysines (K), the conserved RBCC/TRIM motif (RING finger, B box 1, B box 2, coiled-coil region), the NLS and the SBD (Shen, Lin et al. 2006) are illustrated. The whole sequence defining the SBD with its core hydrophobic amino acids (VVVI, in red) (Shen, Lin et al. 2006) and a region including adjacent phosphorylated serines (green) (Scaglioni, Yung et al. 2006) are represented. B) Covalent (sumoylation) and SBD-dependent non-covalent interactions are illustrated as two BRET components discriminated using PMLWT-Luc donor and its PML3KR and PMLSBD mutants in pair with YFP-SUMO acceptor. The black arrow indicates the BRET occurring between the Luc donor and YFP acceptor. The loss of transfer of energy resulting from the mutation of the sumoylation target lysine or of the SBD is highlighted by red dashed arrows. C) Model for the involvement of PML and its sumoylation, SBD and phospho SBD mutants in NB formation and As2O3- and/or RNF4-induced PML degradation. The molecular events leading to PML NB maturation are illustrated in a sequential order as an oversimplification to point to the steps prevented by the mutants used in this study and their resistance or sensitivity to As2O3- and/or RNF4-induced PML degradation.

## FIGURES

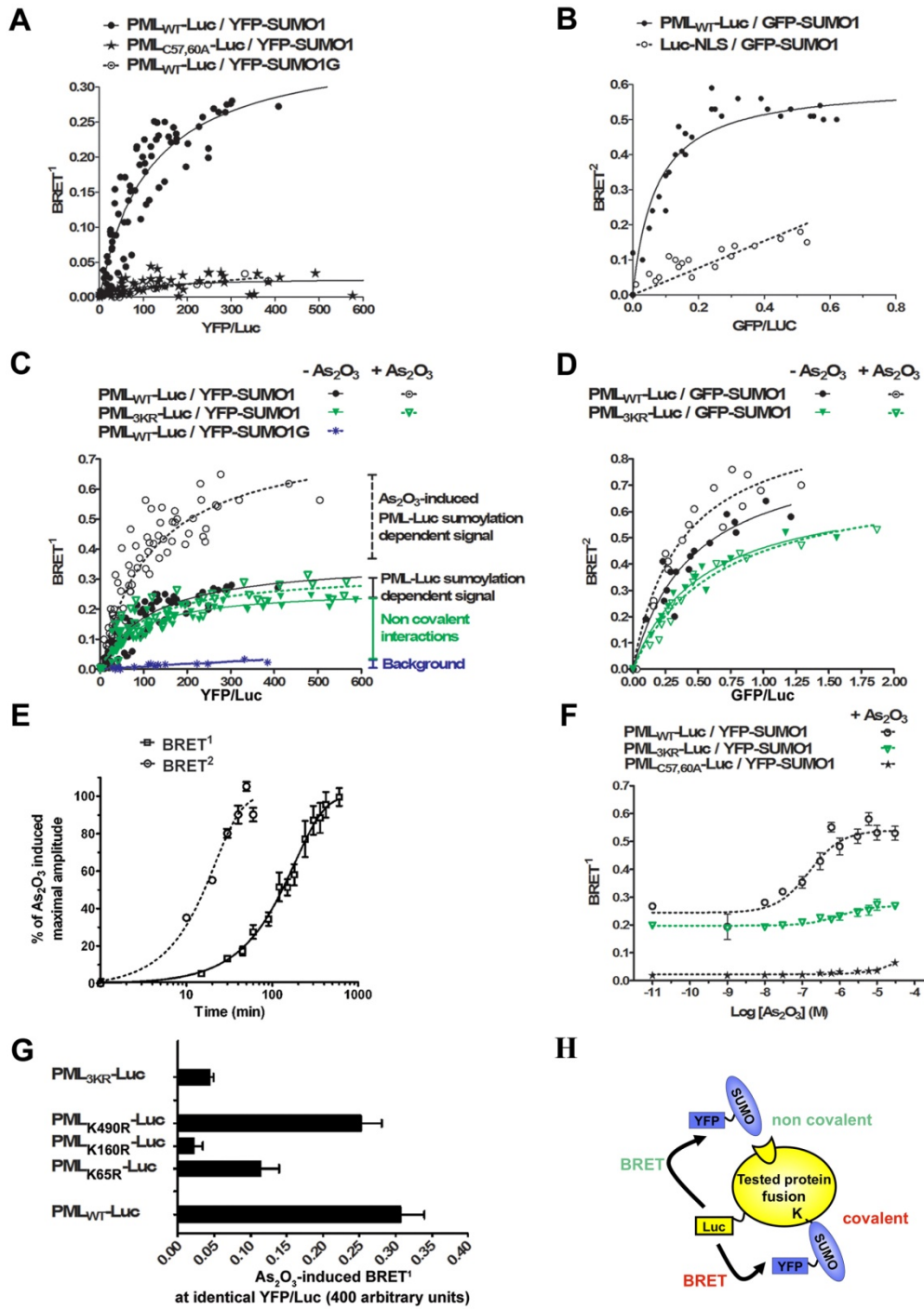


Figure 1

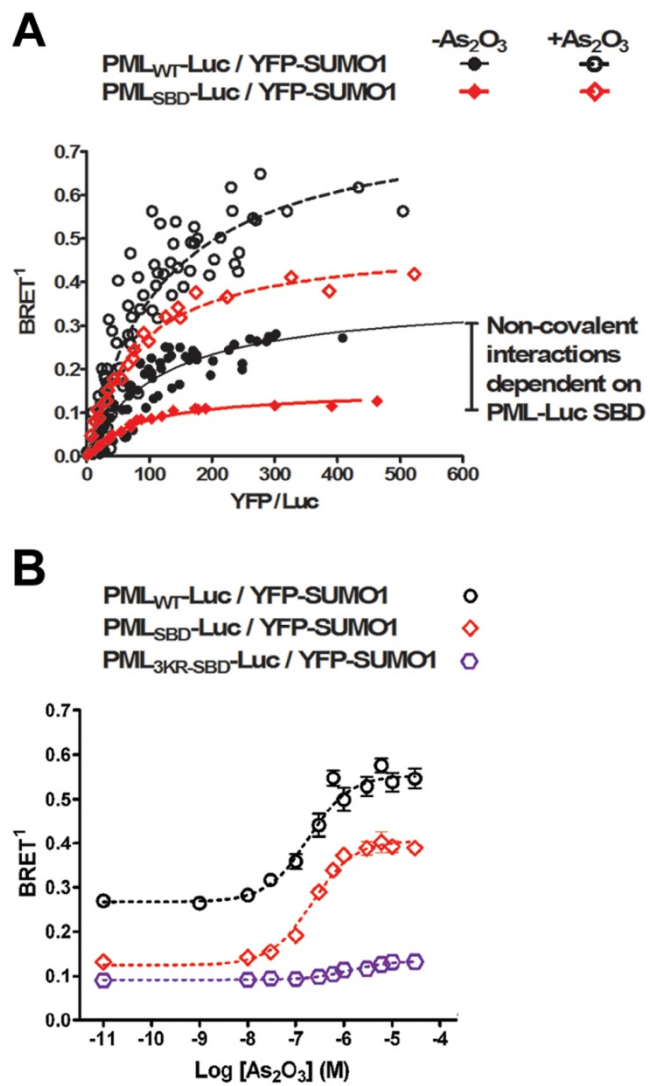


Figure 2

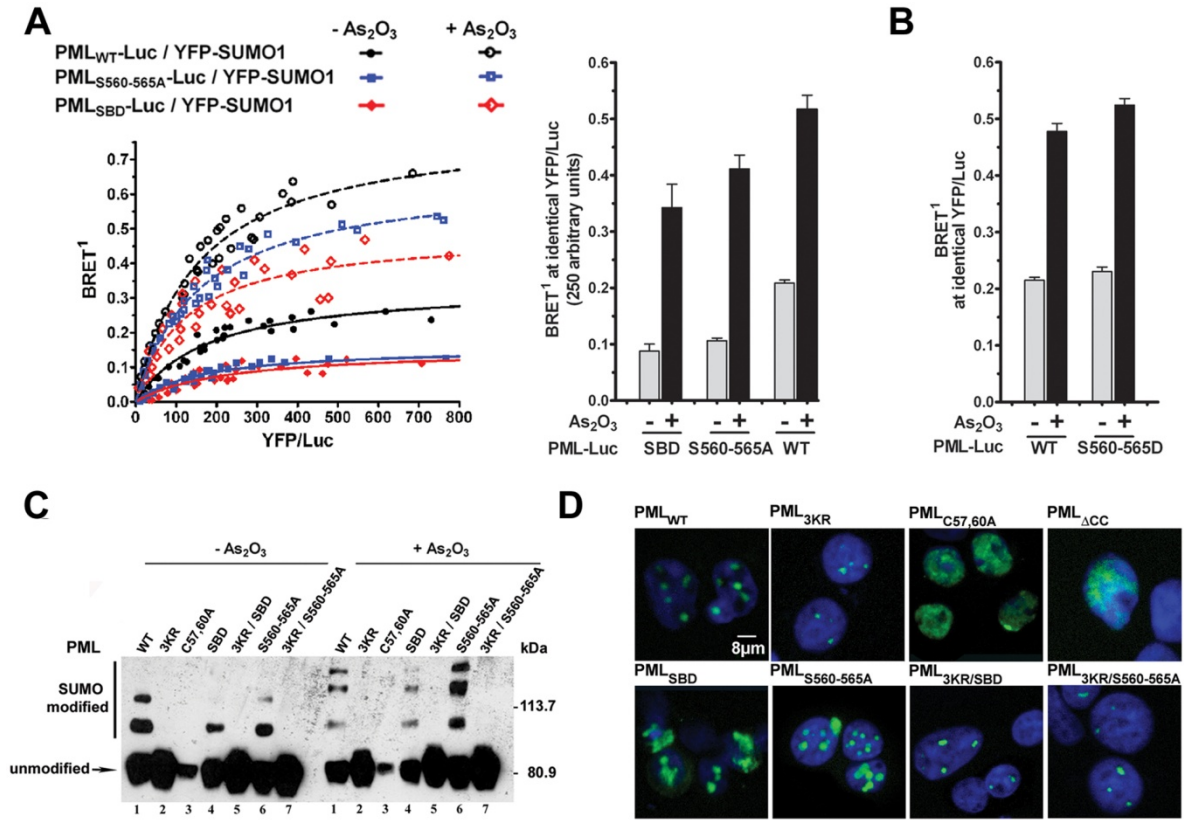


Figure 3

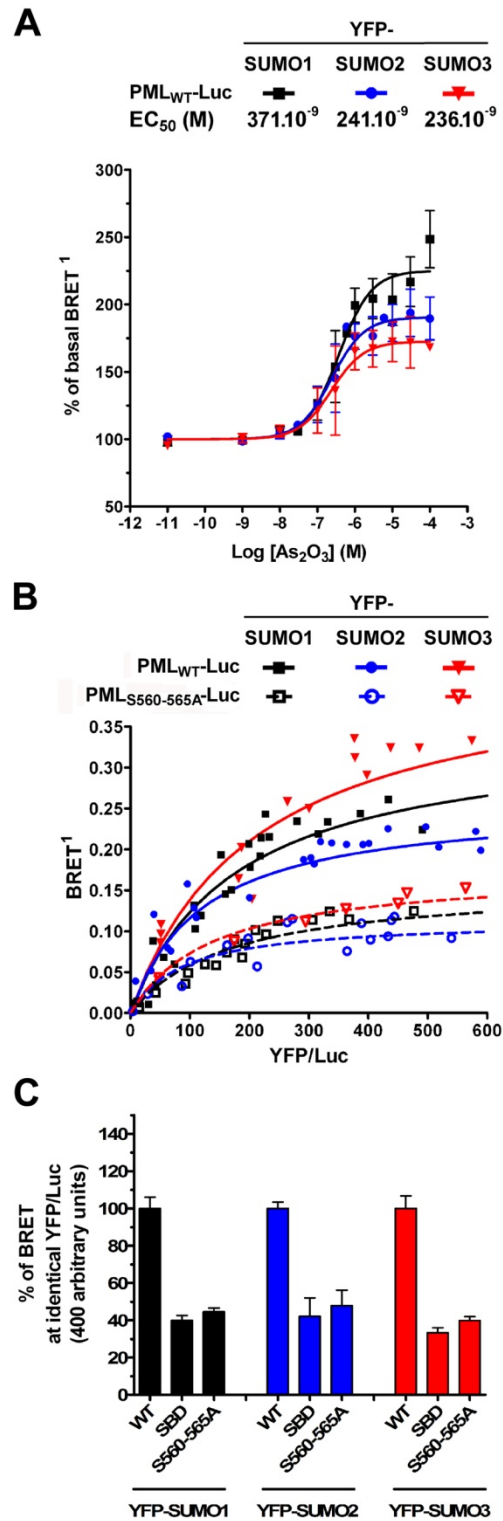


Figure 4

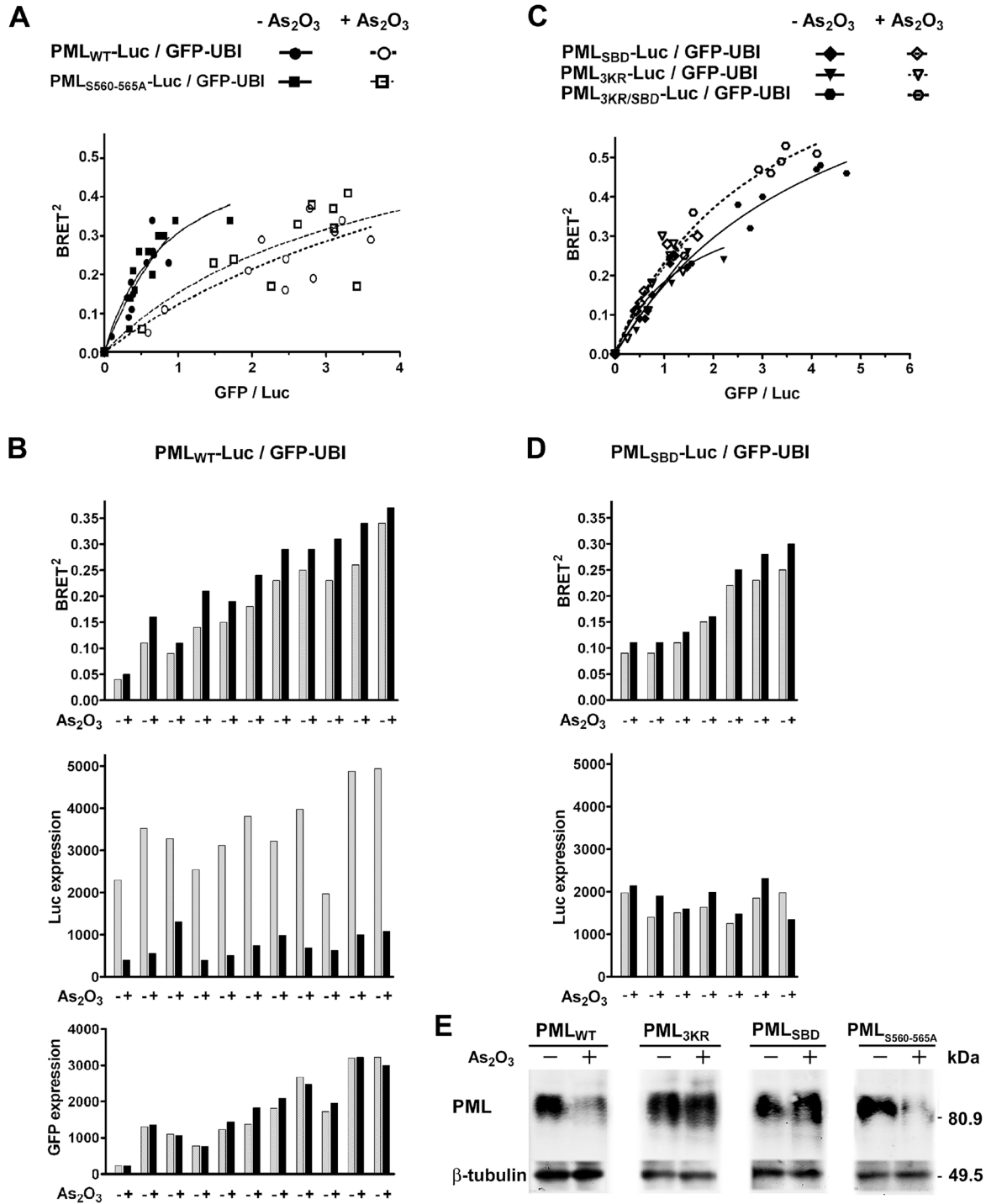


Figure 5



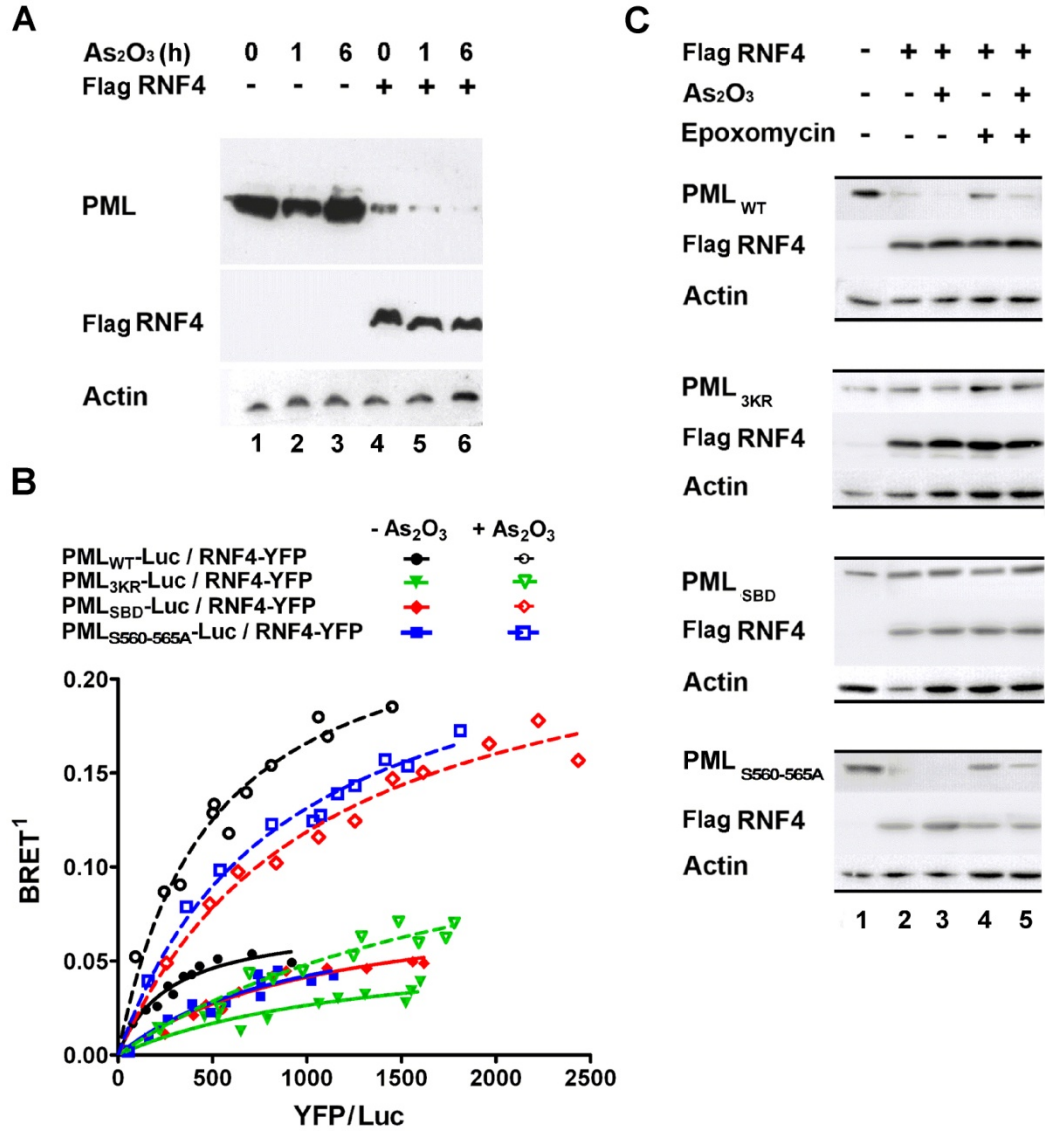


Figure 6

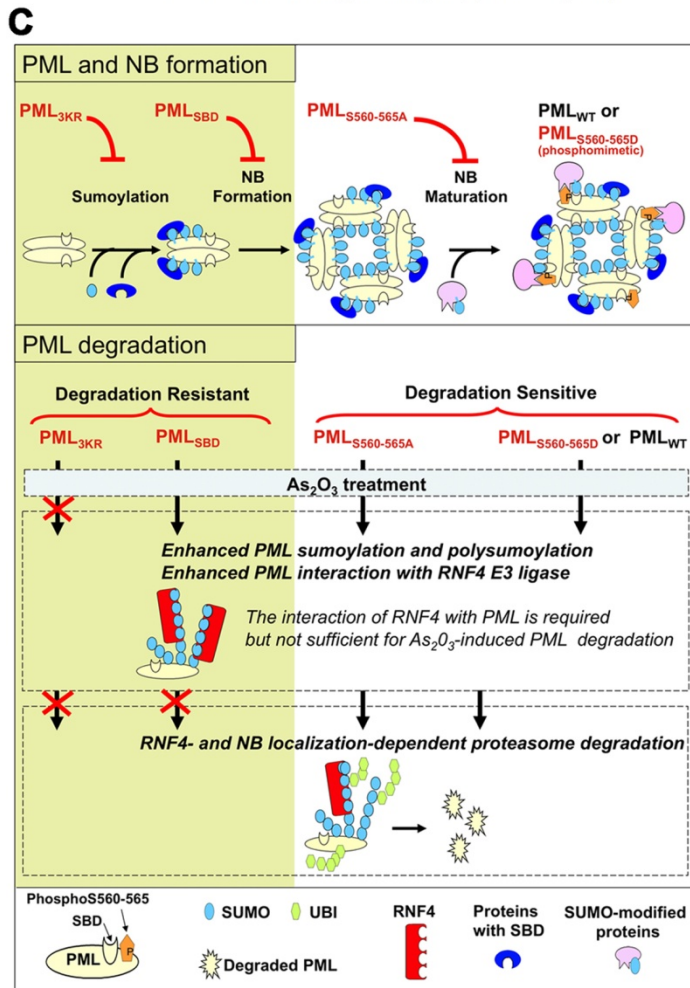
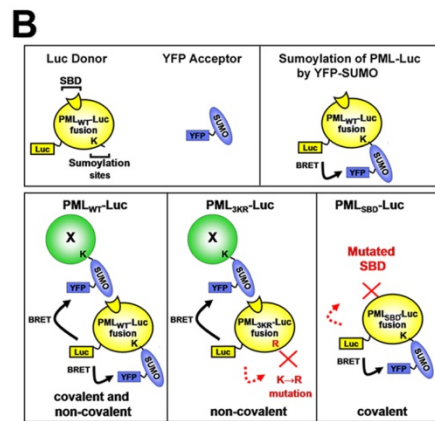
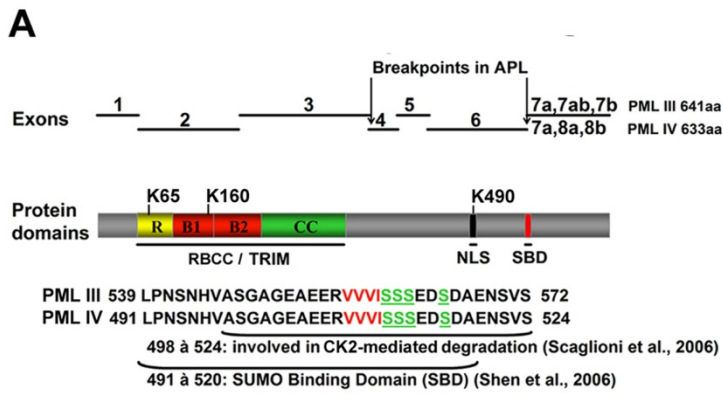


Figure 7