

**N° ordre : 41625**

Université de Lille Nord de France  
Université des Sciences et Technologies de Lille I  
Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille

## **Thèse de doctorat**

**Présentée par**

**Adelma ESCOBAR-RAMIREZ**

**En vue de l'obtention du titre de**

**Docteur de l'Université de Lille I**

**Discipline : Aspects cellulaires et moléculaires de la biologie**

**Spécialité : Biochimie et biologie moléculaire**

# **La delta-lactoferrine : un facteur de transcription régulé par SUMOylation**

**Soutenue le 19 décembre 2014 devant la commission d'examen :**

<b>Président :</b>	Pr Fabrice ALLAIN
<b>Rapporteurs :</b>	Dr Véronique PILLER Pr Edgar ZENTENO
<b>Examineurs :</b>	Dr Anne BLAIS Dr Dominique LEPRINCE
<b>Membre invité:</b>	Pr Yannis KARAMANOS
<b>Directrice de thèse :</b>	Pr Annick PIERCE

*A mi adorada Madre  
y Familia*



Mes premiers remerciements vont tout d'abord au Pr. Annick Pierce qui a dirigé ces travaux. Merci de m'avoir confié ce sujet et de m'avoir accompagné pendant ces trois années.

Je tiens à remercier le Pr. Tony Lefebvre pour m'avoir accueilli dans son groupe.

Je souhaite remercier le Dr. Véronique Piller et le Pr. Edgar Zenteno pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury et d'avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux. Mes remerciements vont également aux Drs. Anne Blais, Dr Dominique Leprince et au Pr. Yannis Karamanos pour avoir accepté d'être examinateurs. Je remercie chaleureusement le Pr. Fabrice Allain pour avoir accepté d'être le président de mon jury de doctorat.

Je remercie tout particulièrement le Dr Isabelle Huvent. Je te suis très reconnaissante de m'avoir formée à la biologie moléculaire.

Je tiens à remercier tout particulièrement Maïté et Anne-Sophie pour la relecture. La SUMOylation ne doit plus avoir de secrets pour vous.

Je souhaite remercier chaleureusement Esthelle, Christophe, Soccoro avec qui j'ai partagé le laboratoire 113 à mon arrivée.

Je tiens également à remercier Marlène, Anne-Sophie, Vanessa, Ikram, Steffi, Jeanne pour votre aide et vos conseils et pour la bonne ambiance du labo 113.

Je remercie également le groupe « héparanes sulfates » Pierre, Anne-Sophie, Maxime, Hela, Agnès, Mathieu et Fabrice pour leur sympathie et leur soutien tout au long de ces années.

El eterno agradecimiento para mi madre Natalia por todo lo que me dio en esta vida y por animarme a continuar siempre adelante a pesar de las dificultades por su cariño, y por todo el amor que siempre me prodigo.

A mi padre por sus buenos consejos

A mis Hermanas Guille, Ginda, Adelina, Lety y Hermanos Elibardo, Israel y Efrain, Alfredo gracias por su apoyo moral por preocuparse por mi y por estar siempre conmigo en la buenas y en la malas.

A mis sobrinos y sobrinas por sus mensajes de aliento y por su cariño por esperarme siempre con alegría.

Mi reconocimiento especial a Carmen gracias por haber creído en mi aun sin conocerme y por estar siempre pendiente de mi.

A Yobana, Socorro y Mary gracias por su amistad, por los buenos momentos que pasamos y por su ayuda cuando mas lo necesite

A mis amigos Claudia, Mathew, Amandin, Liliana, Omar por los buenos momentos compartidos y su agradable compañía.

A mi amado Sylvain muchas gracias por haber llenado mi vida de alegría, de amor y ternura.

A Jean y Rolanda, Elena, Celia, Luca, Guillaume gracias por sus constantes mensajes de apoyo y por el placer de haberlos conocido.

A mi Dios por acompañarme siempre en todos los buenos y malos momentos de mi vida.

# *Table des matières*

Préface.....	8
Généralités.....	13
La delta-lactoferrine.....	14
<b>I. Biosynthèse de la delta-lactoferrine.....</b>	<b>15</b>
1.1 Le gène de la lactoferrine .....	15
1.2 Régulation de l'expression de la delta-lactoferrine.....	16
1.2.1 Régulation transcriptionnelle.....	17
1.2.2 Régulation post-transcriptionnelle.....	18
1.2.3 Régulation traductionnelle.....	19
1.3 Localisation tissulaire.....	19
<b>II. Structure de la delta-lactoferrine.....</b>	<b>20</b>
2.1 Structure tridimensionnelle.....	21
2.2 Caractéristiques de surface des lactoferrines.....	22
2.3 Les domaines fonctionnels.....	23
2.3.1 Le domaine de fixation à l'ADN.....	23
2.3.2 Les séquences de domiciliation nucléaire.....	24
2.3.3 La séquence PEST.....	26
<b>III. Rôles de la delta-lactoferrine.....</b>	<b>27</b>
3.1 Activité de facteur de transcription.....	27
3.1.1 Le $\Delta$ l $f$ RE.....	27
3.1.2 Les gènes cibles de la delta-lactoferrine.....	29
a) <i>Skp1</i> et la régulation du cycle cellulaire.....	29
b) <i>DcpS</i> et la dégradation des ARNm.....	31
c) <i>SelH</i> , <i>UBE2E2</i> et <i>GTF2F2</i> .....	33
d) <i>InterFeron-Induced protein with Tetratricopeptide repeats (IFITs)</i> .....	35
3.2 Maturation des pré-ARNm.....	36
<b>IV. Régulation de l'activité et de la stabilité de la delta-lactoferrine par O-GlcNAcylation.....</b>	<b>36</b>
4.1 La O-N-acétylglucosaminylation.....	37
4.2 La balance O-GlcNAc/phosphorylation.....	37
4.3 La delta-lactoferrine est modifiée par O-GlcNAc.....	39
4.4 La balance O-GlcNAc/phosphorylation contrôle la dégradation protéasomale de la delta-lactoferrine .....	40
4.5 La balance O-GlcNAc/phosphorylation contrôle l'activité transcriptionnelle de la delta-lactoferrine .....	40
Modifications post-traductionnelles.....	42
<b>I. La SUMOylation.....</b>	<b>44</b>
1.1 Les protéines SUMO.....	45
1.1.1 <i>SUMO-1</i> .....	46

1.1.2 SUMO-2/3.....	48
1.1.3 SUMO-4.....	49
1.2 La poly-SUMOylation.....	49
1.3 Les sites consensus de SUMOylation.....	50
1.3.1 Le consensus classique.....	50
1.3.2 Les consensus alternatifs.....	51
1.4 Sites de SUMOylation non consensus.....	52
1.5 Le motif SIM d'interaction avec SUMO.....	53
II. Le cycle de la SUMOylation.....	54
2.1 Les enzymes impliquées dans la SUMOylation des protéines.....	54
2.1.1 L'enzyme d'activation E1 : SAE1:SAE2.....	54
2.1.2 L'enzyme de conjugaison E2 : UBE2I ou Ubc9.....	56
2.1.3 Les enzymes de ligation E3.....	57
a) Les E3 ligases à domaine RING.....	57
b) Les E3 ligases sans domaine RING.....	59
2.2 Les enzymes impliquées dans la dé-SUMOylation des protéines.....	60
III. Le rôle de la SUMOylation.....	61
3.1 Conséquences moléculaires de la SUMOylation.....	62
3.2 Les processus biologiques nucléaires régulés par la SUMOylation...	63
3.2.1 Régulation de la l'expression génique .....	63
3.2.2 Régulation de la transcription par les facteurs de transcription.....	64
a) Répression transcriptionnelle.....	64
b) Activation transcriptionnelle.....	65
3.2.3 Maintien de l'intégrité du génome.....	66
a) Organisation de la chromatine.....	66
b) Réparation de l'ADN.....	67
3.3 Ciblage sub-cellulaire des protéines SUMOylées.....	67
3.3.1 Le transport nucléo-cytoplasmique.....	67
3.3.2 Le transport nucléole-nucléoplasme.....	68
3.3.3 Le transport corps nucléaires-nucléoplasme.....	68
3.4 Les processus biologiques cytoplasmiques régulés par la SUMOylation.....	70
3.4.1 Les protéines cytoplasmiques SUMOylées.....	70
3.4.2 Régulation du cycle cellulaire.....	72
3.4.3 Réponse au stress.....	73
IV. Compétition entre SUMOylation/ubiquitinylation/acétylation.....	75
4.1 SUMOylation/ubiquitinylation .....	75
4.1.1 Effets antagonistes .....	75



4.1.2 Effets coopératifs.....	76
4.1.3 Effets indépendants .....	77
4.2 SUMOylation/ubiquitinylation/Phosphorylation.....	78
4.2.1 Phosphorylation/ubiquitinylation.....	78
4.2.2 Phosphorylation/ SUMOylation.....	79
4.2.3 Phosphorylation / SUMOylation/ubiquitinylation....	79
4.3 SUMOylation/acétylation.....	81
4.3.1 Acétylation.....	81
4.3.2 Acétylation/ ubiquitinylation.....	83
4.3.3 Acétylation/SUMOylation.....	83
4.3.4 Acétylation/SUMOylation/phosphorylation.....	86
4.4 Conclusion.....	86
Travaux personnels.....	88
Article 1.....	89
Article 2.....	123
Discussion et Conclusion.....	152
Annexes.....	160
Bibliographie.....	166

# *Préface*

Ces travaux ont été réalisés sous la direction du Professeur Annick PIERCE au sein de l'équipe «*O*-GlcNAcylation, signalisation cellulaire et cycle cellulaire» du Pr. Tony Lefebvre dans l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR CNRS 8576 dirigée par le Dr. Jean-Claude Michalski et depuis mars 2013 par le Pr. Christophe D'Hulst).

Cette étude a été financée par CONACYT et la Ligue du Nord contre le Cancer.

La delta-lactoferrine a été décrite pour la première fois en 1997 par Siebert et Huang. Son expression semble ubiquitaire. Elle a une localisation nucléocytoplasmique, peut se fixer à l'ADN *via* un élément de réponse à la delta-lactoferrine et induire la transcription des gènes *Skp1*, *Bax*, *DcpS*, *SelH*, *GTF2F2* et *UBE2E1* (Mariller *et al.*, 2007; Mariller *et al.*, 2009; Hardivillé *et al.*, 2014a; Hoedt *et al.*, 2014). Réprimée dans le cas de cancers (Siebert et Huang, 1997), la delta-lactoferrine est un suppresseur de tumeur potentiel dont l'expression est corrélée à un facteur de bon pronostic dans les cas de cancer du sein (Benaïssa *et al.*, 2005). Lorsqu'elle est ré-exprimée dans les cellules HEK293, cela conduit à un arrêt du cycle cellulaire en G1/S puis à l'apoptose (Breton *et al.*, 2004; Hardivillé *et al.*, 2014a). L'induction de son expression dans les cellules MDA-MB-231 conduit à l'activation de nombreuses protéines impliquées dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et dans le contrôle de l'expression des protéines (Hoedt *et al.*, 2014).

Ainsi la delta-lactoferrine, de par son activité transcriptionnelle et anti-proliférative, est au cœur de nombreux processus responsables du maintien de l'homéostasie cellulaire dont la progression du cycle et la survie cellulaire. Son activité doit donc être hautement contrôlée ainsi que le choix de ses cibles. Les modifications post-traductionnelles présentes sur les facteurs de transcription peuvent réguler leur activité, stabilité, trafic, fixation à l'ADN et le recrutement de partenaires qui contribueront à la sélectivité des gènes transactivés. Elles sont dynamiques et permettent un changement rapide et réversible du comportement des facteurs de transcription ainsi modifiés. Récemment, nous avons démontré au laboratoire que la delta-lactoferrine possède un site de *O*-GlcNAcylation et qu'elle est ubiquitinylée en K379 et K391 (Hardivillé *et al.*, 2010). La mise en place de ces modifications post-traductionnelles permet une régulation fine de son activité transcriptionnelle et de sa stabilité. Nous avons pu démontrer que le site S10 est au cœur de ces régulations. En effet, la glycosylation de ce site confère à la protéine une protection face à la dégradation protéasomale alors que sa phosphorylation antagoniste conduit à la transactivation de ses gènes cibles (Hardivillé *et al.*, 2010). Ainsi, la *O*-GlcNAcylation régule négativement l'activité transcriptionnelle de la delta-lactoferrine. Le mutant nul pour la *O*-GlcNAylation, donc non soumis à cette régulation, est constitutivement actif et possède une activité pro-apoptotique supérieure à celle de la protéine native (Hardivillé *et al.*, 2014a).

A mon arrivée en Doctorat, en septembre 2011, une étude *in silico* avait été entreprise afin d'évaluer la présence possible de d'autres modifications post-traductionnelles sur la delta-lactoferrine. Ainsi, un site consensus de SUMOylation avait été trouvé faisant du résidu de lysine K361 une cible potentielle des SUMO-ligases. Cette étude n'avait pas révélé de sites

de méthylation ou d'acétylation. Les sites de phosphorylation étaient, quant à eux, extrêmement nombreux. Le Pr. Annick PIERCE m'a chargée d'étudier (1) le profil de SUMOylation de la delta-lactoferrine, (2) l'impact de la SUMOylation sur le contrôle de l'activité transcriptionnelle de la delta-lactoferrine, et (3) comment s'établit le dialogue entre la SUMOylation et les autres modifications post-traductionnelles de la delta-lactoferrine afin de définir le *code delta-lactoferrine (code  $\Delta Lf$ )* optimal responsable du contrôle des activités anti-tumorales de la delta-lactoferrine.

Après avoir passé en revue les connaissances actuelles concernant la delta-lactoferrine et la SUMOylation, je détaillerai les résultats obtenus au cours de mon doctorat. Le chapitre « travaux personnels » sera composé de deux parties : une partie traitant de la régulation de l'activité transcriptionnelle et de la stabilité de la delta-lactoferrine par la SUMOylation ainsi que du rôle respectif des balances SUMOylation/acétylation et SUMOylation/ubiquitination dans ces processus, et une partie traitant de l'impact de la balance *O*-GlcNAc/phosphate sur l'expression de *Bax*, cible transcriptionnelle de la delta-lactoferrine.

Dans la première partie, nous verrons que la delta-lactoferrine est en fait multi-SUMOylée, qu'elle est de plus principalement acétylée sur l'un de ces sites, et que son activité transactivatrice est réprimée par SUMOylation alors qu'elle est activée par acétylation. Nous montrerons également qu'une compétition ubiquitine/SUMO régule sa stabilité.

Dans la seconde partie, nous verrons que la  $\Delta Lf$  induit la mort cellulaire par apoptose *via* la voie intrinsèque. En effet, nos résultats montrent que la delta-lactoferrine induit une augmentation des taux des transcrits *Bax* et de la protéine *Bax*, ce qui conduit au clivage des caspases 9 et 7. Nous avons ensuite montré que la transactivation du gène *Bax* par la delta-lactoferrine est régulée en partie par *O*-GlcNAcylation.

L'ensemble des travaux que j'ai mené au cours de ma thèse a fait l'objet des publications et communications suivantes :

- **Publications soumises à comité de lecture**

1. Hardivillé, S., **Escobar-Ramirez A.**, Pina-Canséco S., Ellass E., Pierce, A. (2014) Delta-lactoferrin induces cell death *via* the mitochondria death signaling pathway by upregulating *Bax* expression. *Biometals* 27: 875-889.

2. **Escobar-Ramirez A.**, Vercoutter-Edouart A.-S., Mortuaire M., Huvent I., Hardivillé S., Lefebvre T., Pierce A. (2014) Modification by SUMOylation controls both the transcriptional activity and the stability of delta-lactoferrin. soumis à *Plosone*.

- **Communications orales**

**Escobar-Ramirez Adelma**, Huvent Isabelle, Hoedt Esthelle, Dehennaut Vanessa and Pierce Annick. “A crosstalk between O-GlcNAcylation, phosphorylation, ubiquitination, acetylation and SUMOylation controls the transcriptional activity of delta-lactoferrin”, 2<sup>nd</sup> Latinoamerican Congress of Glicobiologia, Mexico City, Mexique, 31 july-2 august 2013.

- **Communications par affiche**

**Escobar Ramirez Adelma**, Huvent Isabelle, Hoedt Esthelle, Mariller Christophe and Pierce Annick, “A crosstalk between O-GlcNAcylation, phosphorylation, ubiquitination and SUMOylation controls the transcriptional activity of delta-lactoferrin”, 12<sup>ème</sup> Journée André VERBERT, Lille, France, 11 September 2012.

Florian Paula E., Huvent Isabelle, Hoedt Esthelle, **Escobar-Ramirez Adelma**, Marcant Adeline, Anca Roseanu, Annick Pierce. “Lactoferrin is a transcription factor transactivating the IL-6 inflammatory gene”, 42<sup>nd</sup> Annual Conference of the Romanian Society of Immunology, Bucharest, Romania, 27-29 September 2012.

**Escobar-Ramirez Adelma**, Huvent Isabelle, Hoedt Esthelle, Dehennaut Vanessa and Pierce Annick. “A crosstalk between O-GlcNAcylation, phosphorylation, ubiquitination, acetylation and SUMOylation controls both the transcriptional activity and the stability of delta-lactoferrin”, XIth International Conference on Lactoferrin, Rome, Italy, 6-10 October 2013.

**Escobar-Ramirez Adelma**, Huvent Isabelle, Hoedt Esthelle, Dehennaut Vanessa and Pierce Annick. “A crosstalk between O-GlcNAcylation, phosphorylation, ubiquitination, acetylation and SUMOylation controls both the transcriptional activity and the stability of delta-lactoferrin”, III Symposium of Grant Holder CONACYT in Europe, Strasbourg, France, 6-8 November 2013.

# *Généralités*

# La delta-lactoferrine

Les lactoferrines appartiennent à la famille des transferrines. Elles existent sous différentes isoformes dues à l'existence d'un polymorphisme génétique et d'un ensemble de modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles. Les deux isoformes principales correspondent à la lactoferrine de sécrétion et à la delta-lactoferrine, forme intracellulaire de la lactoferrine. Si la lactoferrine est connue depuis plus de 50 ans, la delta-lactoferrine a été mise en évidence pour la première fois en 1997 par Siebert et Huang. Elles sont issues d'un même gène présent uniquement chez les mammifères qui dérive de la duplication du gène de la transferrine (Shirsat *et al.*, 1992; Baldwin, 1993). L'utilisation de promoteurs alternatifs conduit à la production de deux transcrits qui diffèrent uniquement par leurs premiers exons (Siebert et Huang, 1997; Liu *et al.*, 2003). Les protéines issues de ces transcrits auront des localisations cellulaires et des fonctions différentes. La lactoferrine de sécrétion est synthétisée en continu par les épithéliums glandulaires. Elle est présente en grande quantité dans le lait, les larmes, la bile, la salive et toutes les sécrétions (Masson *et al.*, 1968; Masson *et al.*, 1969; Masson et Heremans, 1971). Elle est également synthétisée au cours de la différenciation des polynucléaires neutrophiles et par les cellules microgliales (Masson *et al.*, 1969; Fillebeen *et al.*, 2001). Longtemps considérée comme un simple chélateur de fer, la lactoferrine de sécrétion est depuis ces dix dernières années connue pour ses activités antimicrobienne, immunomodulatrice et antitumorale (pour revues voir : Legrand *et al.*, 2008; Pierce *et al.*, 2009; Vogel, 2012). Quant à la delta-lactoferrine, elle est présente dans de nombreux types cellulaires (Siebert et Huang, 1997; Goldberg *et al.*, 2005). Sa localisation cytoplasmique exclut qu'elle puisse fixer des ions ferriques et jouer comme son homologue de sécrétion un rôle de défense de l'organisme vis-à-vis des pathogènes. La delta-lactoferrine possède des propriétés anti-tumorales (Breton *et al.*, 2004). Elle se place au carrefour de la régulation de processus cellulaires cruciaux que sont le cycle et la mort cellulaire (Mariller *et al.*, 2007; Mariller *et al.*, 2009; Hardivillé *et al.*, 2014a). Il a été suggéré que ces deux formes de lactoferrine pourraient appartenir à la famille des suppresseurs de tumeur. Récemment la delta-lactoferrine a été impliquée dans la maturation des pré-ARNm (Kim *et al.*, 2013).

Les travaux sur la lactoferrine sont nombreux, notamment ceux concernant les données structurales, et permettent de mieux cerner les relations structure-fonction de la delta-lactoferrine. Seules les données en relation avec la delta-lactoferrine seront exposées dans ces généralités.

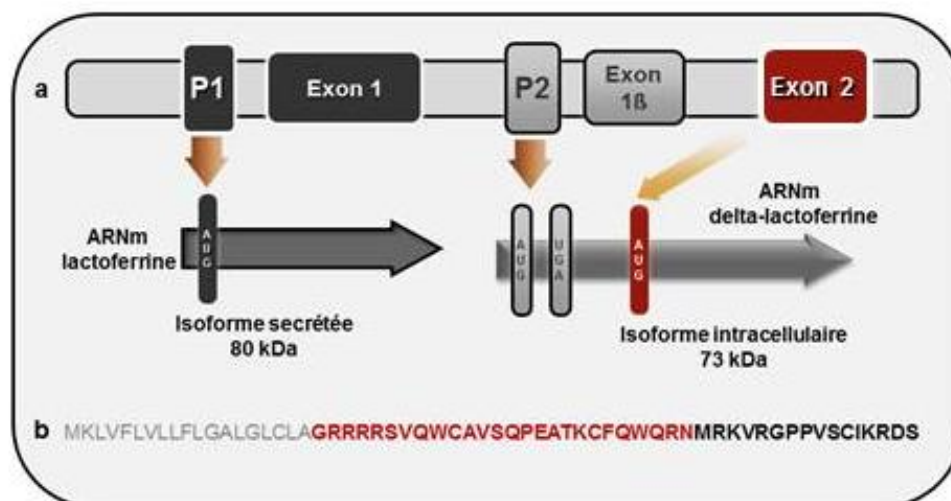


# I. Biosynthèse de la delta-lactoferrine

## 1.1 Le gène de la lactoferrine

Le gène de la lactoferrine humaine est localisé sur le chromosome 3 (en q21.31) (McCombs *et al.*, 1988). D'une longueur totale de 29 kpb il est organisé en 17 exons de 48 à 210 pb entrecoupés de 16 introns de 300 pb à 3,3 kpb (Siebert et Huang, 1997; Kim *et al.*, 1998). La mise en évidence d'une forte identité entre les régions codantes formées par 14 des 15 exons constituant 7 paires homologues qui codent les domaines N- et C-terminaux de la protéine, explique l'homologie qui existe entre les deux domaines. De plus, l'organisation introns/exons du gène est similaire à celle des gènes codant les autres protéines de la famille des transferrines. L'ensemble de ces données conforte l'hypothèse d'une duplication d'un gène ancestral commun (Shirsat *et al.*, 1992; Baldwin, 1993).

C'est lors d'une tentative pour identifier le second gène de prédisposition au cancer du sein (BRCA2) que Siebert et Huang (1997) ont mis en évidence l'existence du second transcrit du gène de la *lactoferrine*. En effet deux promoteurs ont été décrits à ce jour. La transcription issue de l'utilisation du promoteur P1 conduit à la synthèse du messager de la lactoferrine de sécrétion et celle issue de l'utilisation du promoteur alternatif P2, situé à l'intérieur du premier intron, à la synthèse de l'ARNm delta-lactoferrine (Figure 1a).



**Figure 1 : Représentation schématique du gène de la lactoferrine humaine et de son épissage alternatif à partir des promoteurs P1 et P2.** a) La transcription du gène à partir du promoteur P1 permet la synthèse de l'isoforme sécrétée alors que celle à partir du promoteur alternatif P2 conduit à la synthèse de l'isoforme cytoplasmique appelée delta-lactoferrine (Siebert et Huang, 1997; Liu *et al.*, 2003). b) Séquence N-terminale de la lactoferrine humaine. Les acides aminés en gris forment la séquence du signal peptidique. Les acides aminés en rouge correspondent aux acides aminés N-terminaux de la lactoferrine absents et ceux en noir à la séquence N-terminale de la delta-lactoferrine.

Ces transcrits possèdent en commun les exons 2 à 17 et ne diffèrent qu'au niveau de leur premier exon (Siebert et Huang, 1997; Liu *et al.*, 2003). L'activation de la transcription au niveau du promoteur P2 conduit au remplacement de l'exon 1 par l'exon 1 $\beta$ , plus long de 100 bases. Le séquençage de l'exon 1 $\beta$  révèle l'existence d'un codon stop à proximité du codon d'initiation. Ainsi, la traduction débute à partir d'un second site d'initiation de la traduction en phase avec le cadre de lecture ouvert de la lactoferrine situé dans le deuxième exon et conduit à la synthèse d'une protéine identique à la lactoferrine à l'exception de l'extrémité N-terminale amputée des 45 premiers résidus d'acides aminés incluant le peptide signal (Figure 1b) (Siebert et Huang, 1997). La delta-lactoferrine, à l'inverse de la lactoferrine qui est sécrétée, aura une destinée cytoplasmique.

La delta-lactoferrine n'a pas encore été décrite chez d'autres espèces. Cependant, l'étude *in silico* des séquences introniques et promotrices du gène de la *lactoferrine* bovine suggère l'existence d'un promoteur contenu dans l'intron 1 ainsi qu'un exon 1 $\beta$ . Si ces séquences sont fonctionnelles, elles pourraient être à l'origine de la synthèse d'une delta-lactoferrine bovine (Hardivillé, communication personnelle). En outre, les résultats préliminaires obtenus au laboratoire par Stephan Hardivillé laissent penser qu'il existerait une forme d'ARNm de la *lactoferrine* amputée de l'exon 1 chez la souris. Les résultats de 5'RACE ont révélé l'existence d'un second transcrit de taille inférieure à celui de la lactoferrine de sécrétion murine. Ce transcrit plus court de 157 nucléotides ne possède pas l'exon 1 et par voie de conséquence la région codant le peptide signal. Ce transcrit semble dépourvu d'exon 1 $\beta$ . Par ailleurs, l'amplification des régions spécifiques des jonctions exon1-exon2 et exon2-exon3 des transcrits *lactoferrine* isolés de différents tissus murins suggère que les exons 2 et 3 sont plus représentés dans la rate et les ovaires que l'exon 1, ce qui est en faveur de l'existence de transcrits ne possédant pas l'exon 1. Ces travaux préliminaires suggèrent fortement l'existence d'un transcrit de la *lactoferrine* murine. Sa traduction devrait conduire à la synthèse d'une protéine de lactoferrine murine cytoplasmique tronquée des 24 premiers résidus d'acides aminés (Stephan Hardivillé, thèse d'Université, 2010).

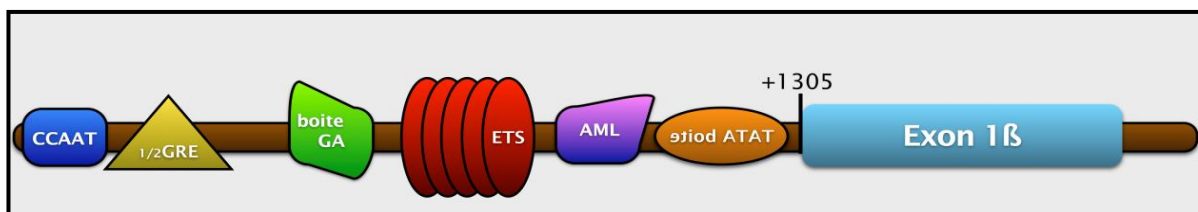
## 1.2 Régulation de l'expression de la delta-lactoferrine

L'expression de la delta-lactoferrine dans les cellules HEK293 conduit à des effets anti-prolifératifs et à l'arrêt du cycle cellulaire (Breton *et al.*, 2004). C'est pourquoi des variations de sa concentration et/ou des modifications de son activité pourraient avoir des conséquences dramatiques pour l'homéostasie cellulaire. Ainsi, son expression est hautement régulée tant du point de vue transcriptionnel que traductionnel, alors qu'elle est fortement

diminuée voire éteinte dans certains cancers.

### 1.2.1 Régulation transcriptionnelle

Des éléments régulateurs constitutifs ou inductibles sont présents dans la région promotrice du promoteur P2. Ils varient de ceux présents en amont du promoteur P1 suggérant que ces deux promoteurs sont différemment transactivés. Notamment le promoteur de la delta-lactoferrine n'a pas d'éléments de réponse aux œstrogènes ou à la prolactine (Pentecost et Teng, 1987; Teng, 2002). Les séquences régulatrices putatives du promoteur P2 ont été identifiées par Siebert et Huang (1997) ainsi que par le groupe de Cristina Teng (Liu *et al.*, 2003). La figure 2 montre la présence d'une boîte TATA inversée localisée à -29 nucléotides du site d'initiation de la transcription, une boîte GA retrouvée dans le gène c-Myc, une boîte NF-E2 (*Nuclear Factor erythroid 2*) et une boîte CCAAT. Des sites de fixation tels que les XRE (*Xenobiotic Response Element*), les 1/2 HRE (*Hormone Response Element half site*) et les GRE (*Glucocorticoïde Response Element*), ainsi que des sites de liaison pour des protéines régulatrices telles que l'IRF (*Interferon Regulatory Factor*) et l'AML-1a (*Acute Myeloid Leukemia-1*) sont également présents. Une séquence consensus riche en motifs GC reconnue par le facteur de transcription Sp1 (*Specificity protein 1*) est incluse. Néanmoins, la fonctionnalité de ces différents éléments reste à démontrer. Des modules NF- $\kappa$ B/cRel/STAT3 (*Nuclear Factor-kappa B family*) sont également présents cependant l'expression de la delta-lactoferrine n'est pas augmentée en réponse au lipopolysaccharide (LPS) (Hoedt *et al.*, 2010). L'équipe de Christina Teng a montré que le facteur de transcription Ets (*E26 transformation-specific*) était nécessaire à l'activation du promoteur P2 dans les cellules lymphoïdes établissant la fonctionnalité des motifs GGAA de fixation à Ets (Liu *et al.*, 2003).



**Figure 2 : Représentation schématique de quelques éléments de réponse putatifs du promoteur P2** (Siebert et Huang, 1997; Liu *et al.*, 2003) (d'après Thèse d'Université Esthelle Hoedt, 2012).

La méthylation de l'ADN conditionne l'expression des gènes dans chaque cellule. Il existe en effet une expression différentielle des deux transcrits due à un niveau de méthylation différent des deux promoteurs. Le promoteur P2 est hyperméthylé sur des sites CpG dans de nombreux tissus, ce qui explique sa faible expression (Teng *et al.*, 2004). Par contre dans la

majorité des tissus étudiés, il y a une sous-méthylation du promoteur P1 qui rend compte du haut niveau d'expression de l'isoforme sécrétée dans certains fluides corporels.

L'hyperméthylation focale de divers promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur et l'hypométhylation globale du génome sont associées au processus de carcinogenèse. Ainsi, des niveaux différents de méthylation du gène *lactoferrine* sont retrouvés entre les tissus sains et les tissus cancéreux lymphoïde et mammaire (Panella *et al.*, 1991; Teng *et al.*, 2004; Shaheduzzaman *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011). Une hyperméthylation est retrouvée dans les deux régions promotrices du gène *lactoferrine* avec une augmentation globale sur les îlots CpG tout particulièrement dans les échantillons tumoraux lymphocytaires et de glande mammaire (Liu *et al.*, 2003; Teng *et al.*, 2004). A cette perturbation de la trame de méthylation des promoteurs *lactoferrine*, s'ajoute des altérations de l'ADN. Des mutations et des réarrangements chromosomiques sont également impliqués dans le « silencing » du gène *lactoferrine*. Ces mutations s'accumulent et se combinent au fil du temps et modifient l'expression et l'activité de multiples gènes, dont certains ont une action renforcée, comme les oncogènes, et d'autres au contraire sont « réduits au silence » tels que les gènes suppresseurs de tumeurs comme le gène *lactoferrine*. Le gène *delta-lactoferrine* est localisé en 3q21, région du génome fréquemment réarrangée dans les cas de cancer, notamment dans les cas de leucémie ( Testoni *et al.*, 1999; Lahortiga *et al.*, 2004; McGrattan *et al.*, 2010). Par ailleurs, des aberrations chromosomiques de la région 3q21 à q27 ont été décrites dans la lignée cellulaire MCF-10A1h cl13 qui correspond à une lignée de carcinome mammaire invasif (Worsham *et al.*, 2006). En outre, le polymorphisme de cette région est associé à la susceptibilité familiale au cancer colorectal (Kemp *et al.*, 2006). Ces altérations génétiques et épigénétiques qui inactivent le gène *lactoferrine* fournissent aux cellules cancéreuses un réel avantage prolifératif.

### ***1.2.2 Régulation post-transcriptionnelle***

Les micro-ARN sont des régulateurs post-transcriptionnels connus pour réprimer la traduction et entraîner la dégradation des transcrits (Ambros, 2004 ; Baltimore *et al.*, 2008; Garofalo *et al.*, 2010; Melino et Knight, 2010). Récemment, le micro ARN miR-214 a été décrit comme un régulateur épigénétique négatif de la région 3'UTR (*UnTranslated Region*) du gène *lactoferrine* dans de nombreux types cellulaires dont les cellules MCF7 (Liao *et al.*, 2010). Le micro-ARN miR214 contient une région qui s'apparie parfaitement avec la région 3'UTR commune aux transcrits *lactoferrine* et *delta-lactoferrine*. Le groupe du Dr Bo Lonnerdal (Université de Californie, Davis, USA) a pu observer une diminution dès 48 h de

l'expression de la lactoferrine lorsque miR214 est transfecté (Liao *et al.*, 2010). Nous avons établi une collaboration avec cette équipe pour étudier l'impact du miR-214 sur le transcrit *delta-lactoferrine* et déterminer si lui aussi est soumis à une régulation négative. En outre, un nombre croissant d'études indique que des altérations du niveau d'expression de certains miRs seraient impliquées dans le développement de cancers, il serait donc intéressant, en parallèle, de doser le taux de ce miR-214 dans les cellules tumorales par rapport aux cellules contrôles.

### **1.2.3 Régulation traductionnelle**

Le transcrit *delta-lactoferrine* possède deux phases ouvertes de lecture (ORF), un court uORF (*5' upstream open reading frame*) et un pORF (*primary open reading frame*). Les transcrits qui possèdent ces uORF correspondent souvent à des gènes qui contrôlent la croissance cellulaire incluant des récepteurs, des oncogènes ou des facteurs de croissance (Morris et Geballe, 2000; Calvo *et al.*, 2009). La présence d'un uORF dans l'exon 1 $\beta$  du transcrit *delta-lactoferrine* devrait conduire à une diminution de l'efficacité de la traduction (Kozak, 2002) et correspondrait à un niveau supplémentaire de régulation de l'expression de cette protéine expliquant pourquoi la delta-lactoferrine est si faiblement exprimée.

### **1.3 Localisation tissulaire**

La localisation tissulaire de la delta-lactoferrine n'a, jusqu'à présent, été abordée qu'au travers de celle de ses transcrits. En effet il n'existe pas d'anticorps spécifique anti-delta-lactoferrine puisque ce qui caractérise cette dernière c'est l'absence des 26 résidus d'acides aminés N-terminaux de la lactoferrine. La mise en évidence des deux isoformes n'est possible que grâce aux techniques PCR (*Polymerase Chain Reaction*) qui ciblent et amplifient spécifiquement les exons 1 et 1 $\beta$ .

Les travaux de Siebert et Huang (1997) ont montré par RT-PCR que les transcrits de la *delta-lactoferrine* sont retrouvés dans tous les tissus sains et notamment dans la glande mammaire, les ovaires, l'utérus, le placenta, les testicules, la prostate, le foie adulte et fœtal, l'intestin grêle, le pancréas, le thymus, les reins, la rate, le cerveau adulte et fœtal, les poumons et les muscles squelettiques. Goldberg *et al.* (2005) montrent que des cellules transformées isolées soit de poumon soit de tissus mammaires (adénocarcinome ou carcinome) et les cellules non-transformées prélevées sur du tissu sain adjacent expriment de manière équivalente les transcrits *lactoferrine* et *delta-lactoferrine*. Récemment, au laboratoire Hoedt *et al.* (2010) ont mis au point un dosage des transcrits respectifs de la *lactoferrine* et la *delta-lactoferrine* utilisant la chimie Taqman (qPCR Taqman). Cette étude a permis de montrer que

les transcrits *delta-lactoferrine* sont exprimés de manière ubiquitaire dans les cellules normales et qu'ils sont sous-exprimés dans de nombreuses cellules cancéreuses. Ils sont présents à très forte concentration dans les cellulaires immunitaires telles que les leucocytes et les lymphocytes isolés de sang frais (Hoedt *et al.*, 2010). L'ensemble de ces travaux montrent une expression simultanée des deux transcrits dans la plupart des tissus et cellules étudiés.

Ainsi, les études sur la distribution cellulaire et tissulaire montrent que la delta-lactoferrine est exprimé dans de nombreux tissus et que cette expression est régulée différemment selon le type cellulaire et le phénotype normal ou malin de ces tissus. Une étude réalisée dans notre laboratoire par Benaïssa *et al.* (2005) en collaboration avec l'équipe de J.-P. Peyrat (Centre Oscar Lambret, Lille) concernait l'analyse de l'expression des ARNm des deux isoformes de lactoferrine dans 99 biopsies de glande mammaire cancéreuses et a montré qu'il existe une corrélation positive entre les profils d'expression de ces deux ARNm et la survie des patientes. Cette étude rétrospective a permis d'établir un seuil au-delà duquel aucune récurrence n'a été diagnostiquée et ce, après un suivi de 4000 jours. Il existe donc une corrélation positive entre la présence des transcrits *lactoferrine* et la survie des patientes. Cette survie est d'autant plus longue que le transcrit de la delta-lactoferrine est en concentration plus importante, faisant ainsi de la delta-lactoferrine un facteur de bon pronostic (Benaïssa *et al.*, 2005). La delta-lactoferrine possédant une activité anti-proliférative pourrait être un agent anti-tumoral de choix. Une expérimentation chez l'animal, en collaboration avec l'équipe du Prof. H. Tsuda (Département of Toxicology, Nagoya City University, Japon) tente actuellement de mesurer les effets d'une construction adénovirale (Long *et al.*, 2009) qui devrait permettre une expression ciblée dans les cellules cancéreuses.

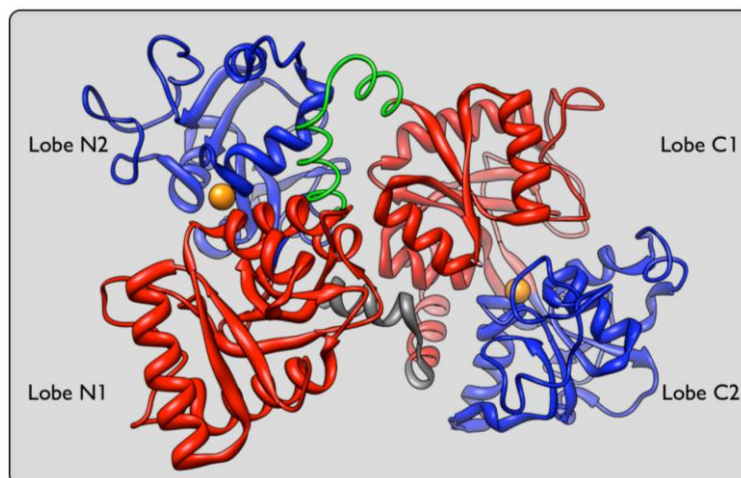
## **II. Structure de la lactoferrine**

C'est en 1997 que la delta-lactoferrine humaine a été clonée et séquencée (Siebert et Huang, 1997). Elle est composée de 666 résidus d'acides aminés pour une masse de 73 kDa. Les membres de la famille des lactoferrines sont des protéines extrêmement basiques avec un pHi supérieur à 9. La délétion des 26 premiers résidus d'acides aminés de l'extrémité N-terminale de la lactoferrine humaine qui concentre de nombreux résidus d'acides aminés basiques, ne diminue que d'une unité le pHi de la delta-lactoferrine. La structure 3-D de la delta-lactoferrine reste à établir mais comme sa séquence est identique à celle de la lactoferrine de sécrétion la plupart des caractéristiques de la delta-lactoferrine peuvent être déduites des connaissances acquises de la cristallisation des lactoferrines humaines et bovines

(Anderson *et al.*, 1987; Baker et Baker, 2009).

## 2.1 Structure tridimensionnelle

L'étude cristallographique de la lactoferrine humaine et son analyse par diffraction aux rayons X (Anderson *et al.*, 1987; Anderson *et al.*, 1989) a permis d'établir sa structure tridimensionnelle (Figure 3) qui a ensuite été confirmée par l'étude de celles d'autres espèces (Moore *et al.*, 1997; Karthikeyan *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2001). Cette molécule est organisée en deux lobes globulaires N- (résidus 1 à 333) (résidus 319 à 307 pour la delta-lactoferrine) et C-terminaux (résidus 345 à 692) (résidus 319 à 666 pour la delta-lactoferrine). Ces deux lobes résultent d'une duplication interne et le lobe N-terminal partage environ 40 % d'identité de séquence avec le lobe C-terminal. Ces deux lobes sont reliés entre eux par une courte hélice  $\alpha$  formée par les acides aminés 334 à 344 (308 à 318 pour la delta-lactoferrine). Chaque lobe est structuré en deux sous-domaines d'environ 160 résidus d'acides aminés à l'interface desquels se trouve le site de fixation du fer dans le cas de la lactoferrine. Les deux domaines possèdent la même organisation structurale basée sur l'alternance de feuillets  $\beta$  et d'hélices  $\alpha$  (Figure 3) (Anderson *et al.*, 1987; Anderson *et al.*, 1989).



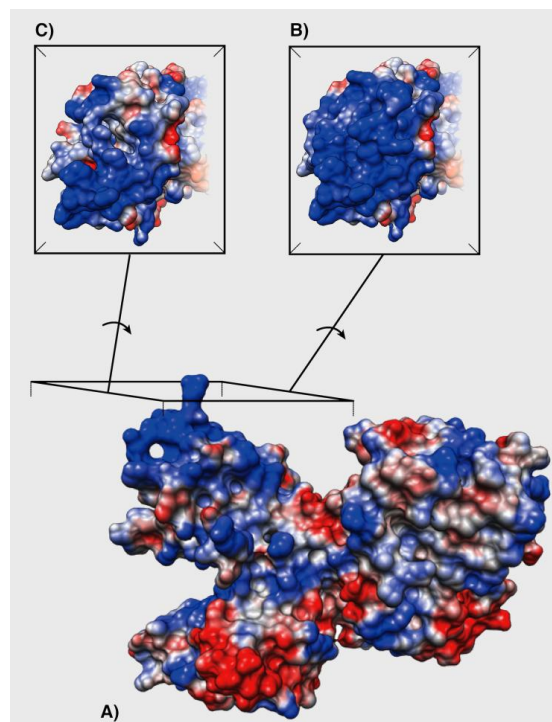
**Figure 3 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de la lactoferrine humaine saturée en fer** (d'après Anderson *et al.*, 1989). Les lobes N1 et C1 et les lobes N2 et C2 sont respectivement représentés en rouge et en bleu. La région inter-lobe apparaît en vert. Les deux points en orange représentent les atomes de fer chélatés par la lactoferrine humaine. La représentation moléculaire a été réalisée en utilisant le logiciel *Chimera* <http://cgl.ucsf.edu/chimera/> et est extraite de la thèse d'Université d'Esthelle Hoedt (USTL, 2012).

Le lobe N-terminal est constitué des domaines N1 (résidus 1 à 90 et de 252 à 320 pour la lactoferrine, résidus 1 à 64 et de 226 à 294 pour la delta-lactoferrine) et N2 (résidus de 91 à 251 pour la lactoferrine, de 65 à 225 pour la delta-lactoferrine), le lobe C-terminal est constitué du domaine C1 (résidus 345 à 433 et 596 à 663 pour la lactoferrine, résidus 319 à

407 et 570 à 637 pour la delta-lactoferrine) et du domaine C2 (résidus 434 à 595 pour la lactoferrine, résidus 408 à 569 pour la delta-lactoferrine).

## 2.2 Caractéristiques de surface des lactoferrines

Les lactoferrines possèdent une forte concentration de charges positives mais leur répartition est très inégale. Ces charges se répartissent essentiellement dans le lobe N-terminal, tout plus particulièrement au niveau de la séquence  $^1\text{GRRRRS}^6$  de la lactoferrine humaine située à l'extrémité C-terminale de la première hélice (résidus 12 à 30 pour la lactoferrine), et du groupe de résidus d'acides aminés basiques associé à la neuvième hélice (résidus 26 à 279 pour la lactoferrine) (Figure 4A-B).



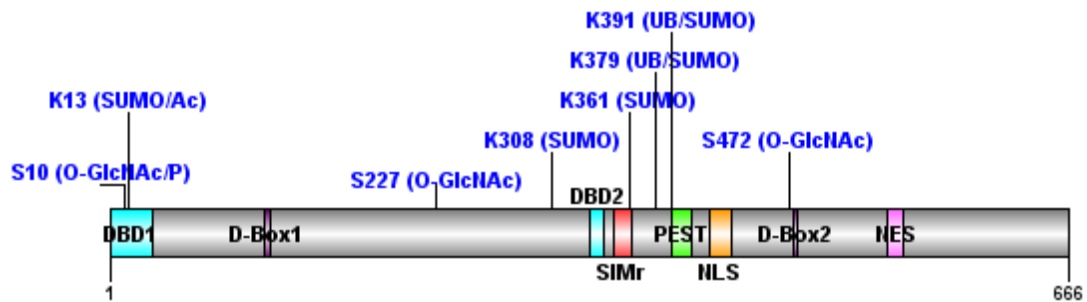
**Figure 4 : Répartition des charges à la surface de la lactoferrine humaine (A, B) et de la delta-lactoferrine (C).** (d'après Mariller *et al.*, 2012). Le potentiel électrostatique de surface a été calculé en utilisant l'équation de Poisson-Boltzmann (Rocchia *et al.*, 2002). Les charges positives sont représentées en bleu et les charges négatives en rouge. A) L'image montre la surface de la molécule exposée au solvant avec la distribution des charges. B et C) les molécules sont orientées de manière à mettre en évidence la différence de charges entre les lobes N-terminaux de la lactoferrine humaine (B) et de la delta-lactoferrine (C). Le modèle moléculaire, basé sur la structure tridimensionnelle définie par Anderson *et al.* (1987), a été réalisé en utilisant le logiciel *Chimera* (<http://cgl.ucsf.edu/chimera/>)

Dans la delta-lactoferrine, l'absence de l'extrémité  $^1\text{GRRRRS}^6$  et la délétion partielle de la partie exposée vers l'extérieur de la première hélice formée des résidus 13 à 30 conduit à une diminution des charges positives de son lobe NI (Figure 4C). Commune aux deux isoformes, la région inter-lobe associée à la courte hélice  $\alpha$  reliant les deux lobes est également composée de nombreux résidus basiques (Anderson *et al.*, 1989; Baker et Baker, 2005).



## 2.3 Les domaines fonctionnels

Les domaines structuraux fonctionnels et putatifs ainsi que les acides aminés cibles des nombreuses modifications post-traductionnelles que subit la delta-lactoferrine, ont été rassemblés dans la figure 5.



**Figure 5 : Localisation des domaines structuraux de la delta-lactoferrine humaine et des acides aminés cibles des modifications post-traductionnelles de la delta-lactoferrine.** DBD, domaines putatifs de fixation à l'ADN ; PEST, séquence de dégradation protéasomale ; NLS, séquence de domiciliation nucléaire, SIMr, motif putatif d'interaction à SUMO; NES, séquence putative de sortie du noyau ; D-box, boîte de dégradation putative ; SUMO, SUMOylation ; UB, ubiquitine ; Ac, acétylation, P, phosphorylation, O-GlcNAc, O-GlcNAcylation.

### 2.3.1 Le domaine de fixation à l'ADN

Les facteurs de transcription doivent posséder un ou plusieurs DBD (*DNA Binding Domain*) capables d'interagir avec une ou plusieurs séquences nucléotidiques consensuelles qui leur sont propres. Il existe plus de 30 types de DBD permettant de classer les facteurs de transcription (Garvie et Wolberger, 2001). L'analyse de la structure de la delta-lactoferrine ne permet pas d'identifier un DBD classique. Cependant, la forte concentration de charges positives de l'extrémité N-terminale (résidus 1-7) et de l'extrémité C-terminale de la première hélice (résidus 27 à 30) de la lactoferrine pourrait constituer un site de liaison pour l'ADN (van Berkel *et al.*, 1997). La région N-terminale de la delta-lactoferrine, bien que tronquée conserve l'extrémité C-terminale de la première hélice (résidus 27 à 30 de la lactoferrine, 2 à 5 pour la delta-lactoferrine) qui pourrait constituer un DBD. Cependant, la délétion des 14 premiers résidus d'acides aminés de la delta-lactoferrine n'altère ni la fixation à l'ADN de la protéine mutée ni son activité transcriptionnelle (Hardivillé *et al.*, 2010) suggérant l'existence d'un autre DBD.

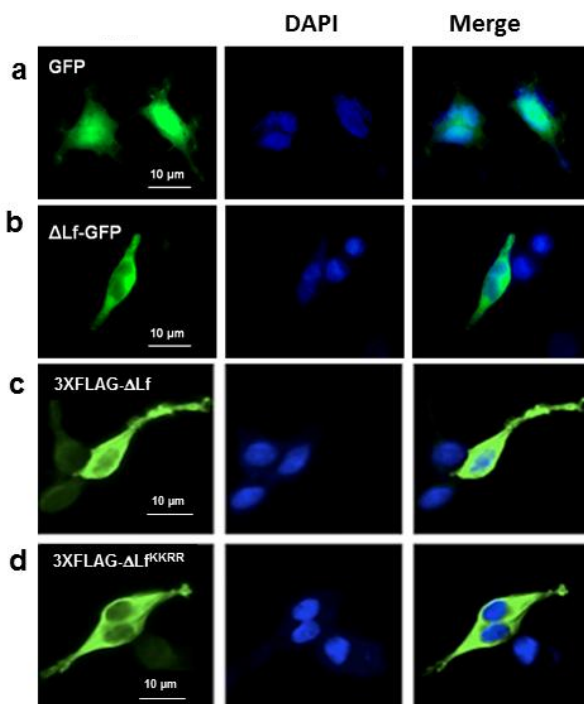
La région inter-lobe, également constituée de résidus basiques, apparaît comme une deuxième région potentielle de fixation à l'ADN. Cette région séparant les deux lobes confère aux lactoferrines l'espacement suffisant pour encercler la molécule d'ADN comme le suggèrent des résultats d'expériences de « docking » (Dr. C. Mariller et Pr. G. Vergoten, communication personnelle).

Une fois liés à l'ADN, les facteurs de transcription interagissent avec un ensemble de

protéines impliquées dans le contrôle de l'expression des gènes. Pour ce faire, leur structure renferme un autre domaine spécialisé, dit de transactivation. Jusqu'à présent, les recherches pour positionner le domaine d'activation de la transactivation de la delta-lactoferrine sont restées vaines. Enfin, l'interaction entre un facteur de transcription et l'ADN est souvent favorisée si plusieurs molécules du facteur de transcription s'associent (Pan *et al.* 2010). Un autre domaine, dit d'oligomérisation, est utilisé à cet effet. Il n'y a pas d'organisation de ce type décrit pour la delta-lactoferrine.

### 2.3.2 Les séquences de domiciliation nucléaire

Nos travaux ainsi que ceux de l'équipe de Cristina Teng ont permis de suivre le trafic intracellulaire d'une delta-lactoferrine soit couplée à une GFP soit « taggée » (3XFLAG-delta-lactoferrine) dans différentes lignées cellulaires. Ces travaux ont montré que, malgré une localisation majoritairement cytoplasmique, cette dernière est retrouvée dans le noyau (Liu *et al.*, 2003; Breton *et al.*, 2004; Goldberg *et al.*, 2005 Mariller *et al.*, 2007) (Figure 6).



**Figure 6 : La delta-lactoferrine est nucléocytoplasmique.** a) Contrôle GFP. b-c) La delta-lactoferrine-GFP ( $\Delta$ Lf-GFP) et la 3XFLAG-delta-lactoferrine (3XFLAG- $\Delta$ Lf, révélation par les anticorps anti-3XFLAG) sont présentes majoritairement dans le cytoplasme mais également dans le noyau. d) L'invalidation de la séquence NLS conduit à une rétention cytoplasmique de la delta-lactoferrine (3XFLAG- $\Delta$ Lf<sup>KKRR</sup>). Les noyaux sont colorés au DAPI (Mariller *et al.*, 2007; Hardivillé *et al.*, 2010). GFP, Green Fluorescent Protein.

La delta-lactoferrine étant un facteur de transcription, elle devrait posséder une séquence de domiciliation nucléaire (NLS). L'analyse *in silico* de sa séquence primaire en utilisant le serveur PSORT II (<http://psort.hgc.jp/form2.html>) a révélé la présence d'un NLS potentiel en position 417 à 432. Cette séquence **RRSDTSLTWNSVKGKK** ressemble aux séquences NLS bipartites proches des séquences NLS fonctionnelles retrouvées pour Rb

(*Retinoblastoma susceptibility protein*) (Efthymiadis *et al.*, 1997), IL-5 (*InterLeukin*) (Jans *et al.*, 1997) et la nucléoplasmine (Robbins *et al.*, 1991). Ce NLS est conservé parmi les lactoferrines de différentes espèces (Mariller *et al.*, 2007). Il est nécessaire à l'adressage nucléaire de la delta-lactoferrine puisque le remplacement des quatre résidus basiques conduit à sa rétention cytoplasmique (Figure 6) (Mariller *et al.*, 2007). Néanmoins ce mutant possède une activité transcriptionnelle résiduelle suggérant qu'une faible proportion de cette protéine est toujours présente dans le noyau. L'étude *in silico* avait également pointé la séquence <sup>554</sup>KRKP<sup>557</sup> comme pouvant être un NLS de très faible score. Cependant, cette dernière n'est pas conservée phylogénétiquement (Mariller *et al.*, 2007). Si cette séquence est fonctionnelle, elle ne le sera que pour la delta-lactoferrine humaine.

L'exploration de la séquence de la delta-lactoferrine *via* le serveur NetNES 1.1 (La Cour *et al.*, 2004) met en avant une séquence NES-like d'export nucléaire conservée parmi les lactoferrines de différentes espèces. En effet, certaines protéines telles que les facteurs de transcription peuvent faire la navette entre cytoplasme et noyau. La séquence <sup>541</sup>LKLADFALLCL<sup>551</sup> riche en résidus de leucine se situe à l'extrémité C-terminale de la protéine à proximité du second motif NLS (Tableau I). Il nous faudra, par la suite, démontrer la fonctionnalité de ces deux motifs.

**Tableau I :** Séquence d'export nucléaire présente dans les lactoferrines de différentes espèces comparée à la séquence putative NES <sup>541</sup>LKLADFALLCL<sup>551</sup> de la delta-lactoferrine. Les numéros d'accèsion de la banque de données UniProtKB sont reportés pour chaque espèce.

Lactoferrine	Signal d'export nucléaire	Numéro d'accèsion
	L-x <sub>2-3</sub> -L-x <sub>2-3</sub> -L-x-L	(Fu <i>et al.</i> , 2011)
humaine	<sup>567</sup> L-K-L-A-D-F-A-L-L-C-L <sup>577</sup>	Q5EK51
souris	L-K-L-K-D-F-E-L-L-C-L	P08071
mouton	L-N-R-E-D-F-R-L-L-C-L	Q5MJE8
cheval	L-K-Q-E-D-F-E-L-L-C-L	O77811
porc	L-R-S-D-D-F-E-L-L-C-L	P14632
chèvre	L-N-R-E-D-F-R-L-L-C-L	Q29477
chameau	L-K-L-G-D-F-E-L-L-C-L	Q9TUM0
vache	L-N-R-E-D-F-R-L-L-C-L	P24627

### 2.3.3 La séquence PEST

Aucune protéine intracellulaire n'échappe à la dégradation. Il existe, cependant, une grande disparité quant à la sensibilité des unes et des autres vis-à-vis des systèmes protéolytiques. Les protéines à activité régulatrice ont en général une demi-vie courte et sont marquées avant d'être dégradées par le protéasome au niveau de séquences peptidiques particulières. Parmi ces séquences se trouvent la séquence PEST riche en proline, glutamate, aspartate, sérine et thréonine bordée par des régions basiques contenant, la plupart du temps, les lysines cibles des ubiquitine ligases (Rogers *et al.*, 1986). Les boîtes de dégradation ou D-box de consensus RXXLXXXXN et les boîtes KEN ou Ken-box de consensus KENXXXN sont les deux autres signatures peptidiques importantes des protéines ciblées par la dégradation protéasomale (Glotzer *et al.*, 1991; Pflieger et Kirschner, 2000; Primorac et Musacchio, 2013).

Au laboratoire, il a été démontré que la delta-lactoferrine possédait un domaine de dégradation rapide (PEST) fonctionnel de séquence <sup>391</sup>KSQQSSDPDNCVD<sup>404</sup> localisé en position C-terminal (Hardivillé *et al.*, 2010). Cette séquence PEST, conservée phylogénétiquement parmi les lactoferrines, est reconnue par le système ubiquitine/protéasome. La mutation de cette séquence augmente la durée de demi-vie de la delta-lactoferrine ce qui confirme sa fonctionnalité. Hardivillé *et al.* (2010) ont pu montrer que la delta-lactoferrine était polyubiquitinylée, que les résidus de lysine positionnés en 379 et 391 sont les cibles des ubiquitine ligases et que la lysine 379 est la cible majeure de cette modification. En effet, la mutation de ces deux résidus abolit très fortement l'ubiquitinylation de la protéine. Néanmoins, ce mutant conserve un taux résiduel de polyubiquitinylation ce qui suggère que la delta-lactoferrine pourrait contenir d'autres domaines de dégradation de la protéine. En effet, deux D-Box putatives de séquence <sup>108</sup>RPFL<sup>111</sup> et <sup>475</sup>RSNL<sup>478</sup> sont retrouvées et conservées phylogénétiquement parmi les lactoferrines. Il nous reste cependant à confirmer leur fonctionnalité.

Les résidus de sérine ou de thréonine des séquences PEST sont fréquemment la cible d'une phosphorylation permettant leur activation (Rogers *et al.*, 1986; Rechsteiner et Rogers, 1996). La mutation ponctuelle de chacune des trois sérines de la séquence PEST de la delta-lactoferrine (sérines 392, 395 et 396) stabilise indifféremment la protéine, ce qui suggère que ces trois résidus pourraient être des cibles équivalentes de kinases (Hardivillé *et al.*, 2010). Les questions qui se posent désormais sont : quelles sont les kinases impliquées et quelles sont les voies de signalisation responsables de l'activation de ces kinases.

Ces différents dégrons sont reconnus par les complexes ubiquitine ligases de type SCF

(*Skp1-Cullin1-F-box-protein*) pour la séquence PEST ou APC/C (*Anaphase-promoting complex/cyclosome*) pour les D-Box. SCF et APC/C sont tous deux impliqués dans la protéolyse des acteurs moléculaires régulant la progression du cycle cellulaire (Harper *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2005). Le complexe SCF dirige la polyubiquitinylation des protéines à séquence PEST en phase G1 et S tandis que le complexe APC/C dirige celle des protéines à D-Box en phase G2 et M (Linder *et al.*, 1989; Hames *et al.*, 2001). L'activité de la delta-lactoferrine, conduisant à l'arrêt du cycle en phase S (Breton *et al.*, 2004), pourrait être régulée par l'activation de sa séquence PEST conduisant à la dégradation de la protéine. Si la delta-lactoferrine est toujours présente pendant les phases G2 et M, les D-Box pourraient contrôler sa dégradation. Les résultats obtenus devraient permettre de mieux comprendre le mécanisme de dégradation de la delta-lactoferrine.

### III. Rôles de la delta-lactoferrine

#### 3.1 Activité de facteur de transcription

##### 3.1.1 Le $\Delta$ LfRE

En 1989, Hutchens *et al.* ont mis en évidence *in vitro* l'existence d'une interaction entre la lactoferrine de sécrétion et de l'ADN double brin (Hutchens *et al.*, 1989). He et Furmanski (1995) ont incubé la lactoferrine dans des conditions stringentes en présence de séquences oligonucléotidiques aléatoires d'ADN, ont purifié les complexes lactoferrine/ADN résultants et amplifié par PCR l'ADN du complexe. Les produits de PCR ont été isolés et séquencés. Trois d'entre eux étaient capables, *in vitro*, d'interagir spécifiquement avec la lactoferrine (Tableau II) (He et Furmanski, 1995). La séquence S1 est celle qui est trouvée le plus souvent. En effet, une séquence S1-like a été retrouvée fonctionnelle dans les promoteurs des gènes de l'*IL-1 $\beta$*  humain (Son *et al.*, 2002) et de l'*endothéline-1* (ET-1) (Ha *et al.*, 2011). Cette activité de facteur de transcription n'a cependant jamais été démontrée *in vivo* pour la lactoferrine de sécrétion.

**Tableau II** : Séquences d'ADN reconnues spécifiquement par la lactoferrine humaine (He et Furmanski, 1995).

Nom	Séquence	Fonctionnalité
S1	GGCACTT(G/A)C	++
S2	TAGA(A/G)GATCAAA	-
S3	ACTACAGTCTACA	+

Les travaux entrepris dans notre équipe ont montré que la delta-lactoferrine était un facteur de transcription et que l'élément de réponse spécifique à la delta-lactoferrine ( $\Delta$ LfRE) avait une séquence proche de la séquence S1 (GGCACTTA/GC) décrite par He et Furmanski (1995). Ce  $\Delta$ LfRE est retrouvé dans les promoteurs des gènes cibles de la delta-lactoferrine comme ceux des gènes *Skp1* (*S-phase kinase-associated protein 1*), *DcpS* (*Scavenger mRNA-Decapping enzyme*), *Bax* (*Bcl-2-associated X protein*), *SelH* (*Selenoprotein H*), *UBE2E1* (*Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E1*) et *GTF2F2* (*General Transcription Factor 2F2*) (Mariller *et al.*, 2007; Mariller *et al.*, 2009; Hoedt *et al.*, 2014; Hardivillé *et al.*, 2014a). La mutation des nucléotides GCACT quelque soit le promoteur considéré, conduit à une inhibition totale de l'activité transactivatrice de la delta-lactoferrine confirmant la fonctionnalité du  $\Delta$ LfRE. L'ensemble des données concernant cet élément de réponse a permis de définir une séquence consensus optimale (Tableau III).

**Tableau III** : Efficacité des éléments de réponse à la delta-lactoferrine.

	Séquence										Efficacité (en %)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
$\Delta$ LfRE	G/A	G	C	A	C	T	(G)	T	A/G	C/G	
$\Delta$ LfRE <sup>Skp1</sup>	G	G	C	A	C	T	G	T	A	C	100
$\Delta$ LfRE <sup>DcpS</sup>	A	G	C	A	C	T	-	T	G	G	90
$\Delta$ LfRE <sup>Bax</sup>	G	G	C	A	C	T	-	T	A	T	60
$\Delta$ LfRE <sup>Fas</sup>	G	G	C	A	C	T	-	A	A	C	5
$\Delta$ LfRE <sup>SelH</sup>	G	G	C	A	C	T	G	T	G	G	ND
$\Delta$ LfRE <sup>UBE2E1</sup>	A	G	C	A	C	T	T	T	G	G	ND
$\Delta$ LfRE <sup>GTF2F2</sup>	A	G	C	A	C	T	-	T	G	G	ND
Elément de réponse défini par He et Furmanski (1995)											
S1	G	G	C	A	C	T	-	T	A/G	C	++
GmT	G	T	C	A	C	T	-	T	G	C	++
CmA	G	G	A	A	A	T	-	T	G	C	+
GmC	C	G	C	A	C	T	-	T	G	C	+
CmG	G	G	C	A	G	T	-	T	G	C	+/-
CTdmGG	G	G	C	A	G	G	-	T	G	C	+/-

Les expériences de gène rapporteur et de mutagenèse dirigée réalisées par He et Furmanski (1995) montrent la présence d'un « noyau » de six nucléotides (GGCACT) dont la mutation ponctuelle diminue fortement ou abolit l'activité transcriptionnelle. Bien que les mutations des cytosines de ce consensus en alanine (séquence CmA) permettent de conserver l'activité CAT, la mutation ponctuelle de la cinquième cytosine en guanine (séquence CmG) diminue fortement l'efficacité de l'élément de réponse. La conversion de la guanine en position 1 par une cytosine (séquence GmC) conduit également à la perte d'efficacité. La transactivation du  $\Delta$ LfRE retrouvé dans le promoteur du gène *Skp1* conduit à la détection de l'activité luciférase

la plus importante, suggérant qu'il est le plus proche de l'élément de réponse optimal de la delta-lactoferrine. Cette séquence présente une insertion par rapport à la séquence S1. Il semble donc que l'ajout d'une guanine en position 7 n'interfère pas sur l'interaction de la delta-lactoferrine avec son élément de réponse. Comparée à l'expression optimale obtenue avec le  $\Delta$ LfRE contenu dans le gène *Skp1*, celui présent dans le gène *Fas* n'induit quasiment pas de transactivation (Hardivillé *et al.*, 2014a). Hormis la présence d'une adénine à la place d'une thymine en huitième position, le  $\Delta$ LfRE de *Fas* est identique à la séquence S1 ce qui démontrent l'importance de cette thymine. Les  $\Delta$ LfRE des promoteurs des gènes *Bax* et *DcpS* permettent respectivement de mesurer une activité luciférase de 60 % et 90 % par rapport à celui de *Skp1* en présence de delta-lactoferrine (Mariller *et al.*, 2007; Mariller *et al.*, 2009; Mariller *et al.*, 2012; Hardivillé *et al.*, 2014a). Le  $\Delta$ LfRE de *DcpS* possède une adénine et une guanine respectivement en position 1 et 10. Comme pour le mutant GmC, cette séquence est fonctionnelle mais moins efficace suggérant que cette première base module la reconnaissance du  $\Delta$ LfRE par la delta-lactoferrine. Les  $\Delta$ LfRE de *Bax* et *DcpS* possèdent respectivement une thymine et une guanine en dernière position à la place d'une cytosine. Leurs efficacités respectives suggèrent que la présence d'une guanine en position terminale interfère peu alors que la présence d'une thymine est plus préjudiciable. Les  $\Delta$ LfRE récemment mis en évidence n'ont pas encore pu être évalués. Néanmoins, le  $\Delta$ LfRE de *SelH* proche de celui de *Skp1* et du consensus S1 semble très efficace. Les  $\Delta$ LfRE de *GTF2F2* et *UBE2E1* sont identiques à celui de *DcpS* avec pour *UBE2E1* un thymine supplémentaire en position 7 (Hoedt *et al.*, 2014). Ces différentes données nous ont permis de mieux comprendre l'importance de certains nucléotides et de définir la séquence 5'-G/AGCACT(G)TA/GC/G-3' comme le  $\Delta$ LfRE consensus.

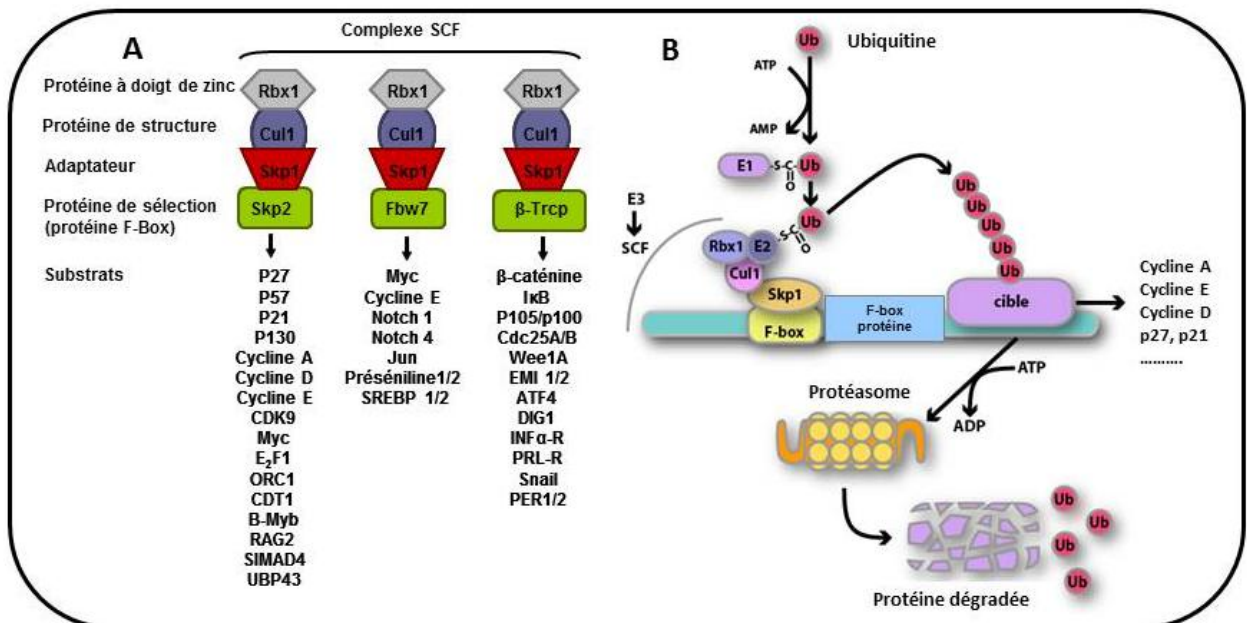
### **3.1.2 Les gènes cibles de la delta-lactoferrine**

#### *a) Skp1 et la régulation du cycle cellulaire*

La progression du cycle cellulaire est sous le contrôle de complexes protéiques spécifiques de type Cycline/Cdk. L'activité de ces complexes varie au cours du cycle grâce à deux mécanismes : le premier met en jeu un système de synthèse et de dégradation de la cycline et le second influe sur l'activité kinase du Cdk par le biais de régulation de la phosphorylation (voir pour revues : Blagosklonny et Pardee, 2002; van Leuken *et al.*, 2008; Segurado et Tercero, 2009). L'une des caractéristiques principales des cellules cancéreuses est la perte des régulations des points de contrôle (Dash et El-Deiry, 2004). Lors de sa découverte,

la delta-lactoferrine a été décrite comme étant sous-exprimée dans les lignées cellulaires cancéreuses. Son expression conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire en phase S, Breton *et al.*, (2004) se sont intéressés à son action durant les phases G1 et S afin de mieux comprendre son implication dans la régulation du cycle.

Cette étude a permis de démontrer pour la première fois que la delta-lactoferrine est effectivement un facteur de transcription et de définir sa ou ses cibles transcriptionnelles à la transition G1/S. Pour se faire, la technique de « macroarrays » a été utilisée, et l'expression de 23 ARNm de protéines clés de cette transition a été analysée. L'hybridation des ARNm de cellules HEK 293 exprimant ou non la delta-lactoferrine a permis de mettre en évidence une surexpression des ARNm de p19, p21, p27, p55, PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), Rb, Skp1 et Skp2. Parmi eux, l'expression de Skp1 était augmentée d'un facteur deux à trois tant du point de transcriptionnel que traductionnel. De plus, l'analyse du promoteur du gène *Skp1* a mis en évidence une séquence homologue à la séquence S1 (He et Furmanski, 1995) qui s'est avérée être un élément de réponse fonctionnel à la delta-lactoferrine (Mariller *et al.*, 2007). Skp1 est un des composants du système de dégradation des acteurs moléculaires de la transition G1/S appelé SCF (*Skp, Cullin, F-box containing complex*) (pour revue voir : Cardozo et Pagano, 2004) (Figure 7).



**Figure 7 : Le complexe SCF.** A) Le complexe SCF ubiquitine ligase est composé de la sous-unité Cul1 qui agit en tant que squelette moléculaire, interagissant simultanément à l'extrémité N-terminale avec Skp1 (*S-phase-kinase-associated protein-1*) et à l'extrémité C-terminale avec RBX1 (protéine à « doigt de zinc », appelée aussi Roc1 ou Roc2) et d'une enzyme E2 spécifique telle que Ubc3, Ubc4 ou Ubc5. En retour, Skp1 interagit avec l'une des nombreuses protéines à domaine F-box ou FBP. Chaque FBP semble fixer sélectivement un nombre défini de substrats *via* un domaine d'interaction protéine-protéine. B) Polyubiquitination des cibles du SCF suivie de leur dégradation protéasomale.



Le complexe SCF ubiquitine-ligase permet la dégradation des inhibiteurs p27 et p21, des cyclines D1, D2, E, A (Yan et Mumby, 1999; Yew, 2001) (Figure 7) et de la protéine Cdc6 (*Cell division cycle 6*) essentielle pour la formation du complexe de pré-réplication. En outre, Skp1 est également présent lors de la transition G2/M puisqu'il a été montré que sa mutation chez la levure ou son « KO » (*Knock-Out*) chez la souris conduit à une mauvaise formation du fuseau mitotique suivie d'une aneuploïdie (Piva *et al.*, 2002; Lehmann et Toda, 2004). Chez la levure, Skp1 contribue à l'assemblage et la fonction normale du complexe CBF3 (*Centromere Binding Factor 3*, kinétochore interne) via une Ctf13p (Rodrigo-Brenni *et al.*, 2004). Ctf13p est une F-box protéine qui constitue le cœur structural de CBF3. Chez l'homme, il semble que Skp1 soit impliquée dans des fonctions similaires puisqu'elle est co-localisée au niveau des centrosomes durant la mitose. L'interaction de Skp1 avec CENP-E (*Centromere-associated Protein E*) est requise pour le déroulement correct de la cytokinèse (Liu *et al.*, 2006a). Ainsi, une variation des taux de Skp1 pourrait avoir des conséquences néfastes sur le déroulement du cycle cellulaire et sur la ségrégation des chromosomes lors de la mitose.

#### *b) DcpS et la dégradation des ARNm*

Afin de mettre en évidence de nouvelles cibles de la delta-lactoferrine, une étude comparative des protéomes des cellules exprimant ou non la delta-lactoferrine a été réalisée au laboratoire (Mariller *et al.*, 2009). Parmi les protéines identifiées, trois interviennent dans la régulation de l'apoptose. En effet, la surexpression de la protéine PCBP2 (*Poly(rC)-binding protein 2*) conduit à une diminution de la viabilité cellulaire et à une augmentation de l'activité des caspases 3 et 9 entraînant ainsi l'apoptose des cellules qui la produisent (Roychoudhury *et al.*, 2007). N'ayant pas l'élément de réponse à la delta-lactoferrine au niveau de son promoteur, cette protéine n'a donc pas une expression directement liée à l'activité de la delta-lactoferrine. Quoi qu'il en soit, elle pourrait participer avec la delta-lactoferrine à l'induction de la mort cellulaire par apoptose. A l'inverse, la protéine TCPB (*T complex subunit β*) qui est également dépourvue de séquence ΔLfRE a été identifiée comme étant un interactant de la cycline E et comme étant surexprimée lors de la transition G1/S. Son inhibition conduit à une diminution de la viabilité cellulaire, à un arrêt du cycle en G1/S et à la mort cellulaire par apoptose (Coghlin *et al.*, 2006). Cette protéine a donc un rôle important dans la prolifération et la survie cellulaire. Sa surexpression pourrait contrebalancer l'effet pro-apoptotique de la delta-lactoferrine et permettre le passage en phase S préalablement bloqué par l'activité de cette dernière. De même, les expériences menées par Lu

et Legerski montrent que la surexpression de la protéine PRP19 (*Pre-mRNA processing factor 19*) participe également à la survie cellulaire. En effet, elle réduit l'apoptose après exposition des cellules aux agents mutagènes grâce à son activité de réparation de l'ADN (Lu et Legerski, 2007). Ces travaux n'ont pas permis de déceler une quelconque surexpression des transcrits de PRP19 en présence de delta-lactoferrine bien que cette protéine soit pourvue d'un  $\Delta$ LfRE-like.

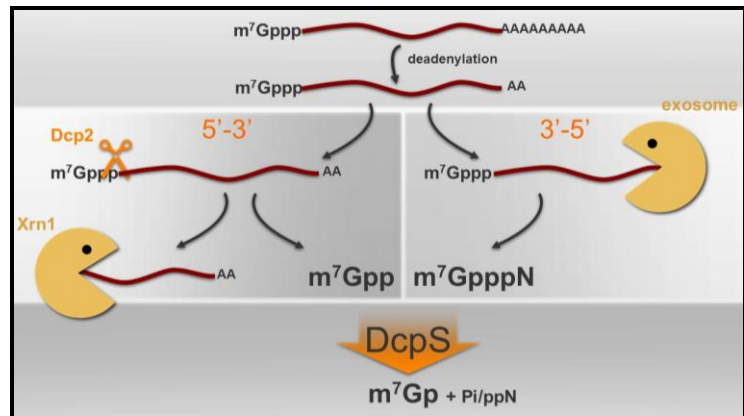
Mariller *et al.* (2009) ont également pu identifier la PDI (*Protein Disulfide Isomerase*) qui intervient dans la mise en conformation des protéines, la *proteasome subunit  $\beta$*  impliquée dans la dégradation protéolytique et la protéine *vesicle fusing protein NSF* ou *AAA ATPase NSF* qui intervient dans la formation des vésicules intracellulaires. Les promoteurs des gènes correspondants ne contiennent pas de  $\Delta$ LfRE, donc la surexpression de ces protéines ne dépend pas directement de l'activité de la delta-lactoferrine.

Enfin, trois protéines impliquées dans la maturation et la stabilité des transcrits ont été identifiées. La PRP19, citée précédemment pour son rôle dans le maintien de l'intégrité de l'ADN, est également dotée d'un domaine U-box à activité E3 ubiquitine ligase qui est indispensable à l'association des protéines impliquées dans la maturation des transcrits par épissage (Chan et Cheng, 2005). La protéine hnRNP-L (*heterogenous RiboNuclear Protein L*), quant à elle, empêche la maturation des pré-ARNm en se fixant sur des séquences *cis* inhibitrices de l'épissage des exons (Rothrock *et al.*, 2005). Ces expériences n'ont pas montré de surexpression des transcrits en présence de delta-lactoferrine. Il faut noter que cette protéine possède néanmoins un élément similaire et une séquence identique au  $\Delta$ LfRE. L'absence de transactivation du gène *hnRNP-L* pourrait s'expliquer par l'absence des cofacteurs nécessaires à cette activation. DcpS hydrolyse la coiffe en 5' des ARNm (Liu et Kiledjian, 2006b). Cette protéine voit ses transcrits surexprimés en présence de delta-lactoferrine et possède une séquence similaire au  $\Delta$ LfRE dont la fonctionnalité a été vérifiée *in vitro* et *in situ* grâce à des expériences de gène rapporteur et d'immunoprécipitation de la chromatine respectivement, confirmant que DcpS est une nouvelle cible de la delta-lactoferrine (Mariller *et al.*, 2009).

DcpS est une pyrophosphatase intervenant à la fin de la voie de dégradation des ARNm (Figure 8). La dégradation des ARNm occupe une place primordiale dans le contrôle de l'expression génique, le « contrôle qualité » des ARNm et la défense contre les infections virales. Chez les eucaryotes, la dégradation des ARNm se fait par deux voies principales débutant toutes deux par l'hydrolyse de la coiffe 7 méthylguanosine ou 5'-cap (Liu et Kiledjian, 2006b). Ce nucléotide particulier, ajouté de manière post-transcriptionnelle sur les

ARNm, permet leur protection face aux ribonucléases et favorise leur traduction *via* le recrutement du ribosome. La dégradation récurrente des ARNm dans le sens 3'-5' par l'exosome libère la coiffe sous la forme du dinucléotide m<sup>7</sup>GpppN. La dégradation dans le sens 5'-3' fait intervenir une première enzyme, Dcp2, qui hydrolyse la coiffe sous la forme m<sup>7</sup>GDP et libère l'extrémité 5'-phosphate des ARNm. Il s'en suit alors une dégradation des ARNm de 5' en 3' effectuée par la ribonucléase Xrn1 (Coller et Parker, 2004; Liu et Kiledjian, 2006b). Les nucléotides m<sup>7</sup>GpppN et m<sup>7</sup>GDP sont alors pris en charge par DcpS et libérés sous la forme de m<sup>7</sup>GMP qui sera recyclé (van Dijk *et al.*, 2003). (Figure 8).

**Figure 8 : La dégradation des transcrits et le rôle de DcpS.** Après la déadénylation, les ARNm sont dégradés par l'exosome de 3' en 5' libérant ainsi du m<sup>7</sup>GpppN. L'autre voie de dégradation fait intervenir Dcp2 pour l'hydrolyse de la coiffe libérant du m<sup>7</sup>GDP. La dégradation des ARNm de 5' en 3' peut alors être effectuée par Xrn1. Les deux produits de la dégradation issus de la coiffe des ARNm sont alors convertis par DcpS en m<sup>7</sup>GMP qui peut alors être recyclé ou éliminé de la cellule. (adapté de van Dijk *et al.*, 2003).



DcpS pourrait être impliquée indirectement dans la régulation de l'épissage ainsi que dans celle de la traduction des ARNm. En effet, ces deux mécanismes nécessitent respectivement l'interaction du complexe CBC (*Cap-binding complex*) (Lewis et Izaurralde, 1997) et d'eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*) (Gingras *et al.*, 1999) avec la coiffe des ARNm. Les coiffes libérées lors de la dégradation des ARNm, non converties en m<sup>7</sup>GMP par DcpS, entrent en compétition avec l'extrémité coiffée des ARNm pour lier les complexes CBC et eIF4E, interférant ainsi avec les mécanismes d'épissage et de traduction (Bail et Kiledjian, 2008). La surexpression de DcpS permettrait alors de diminuer les quantités de m<sup>7</sup>GpppN et m<sup>7</sup>GDP et, ainsi, d'augmenter l'efficacité de l'épissage et la traduction des ARNm.

### c) *SelH*, *UBE2E1* et *GTF2F2*

Lors d'une étude protéomique à grande échelle réalisée par notre groupe, Hoedt *et al.* (2014) ont comparé l'effet de la ré-introduction des deux isoformes de lactoferrine dans une lignée cellulaire de cancer du sein hautement invasive, les cellules MDA-MB-231. En effet, les deux isoformes que sont la lactoferrine de sécrétion et la delta-lactoferrine sont capables de contrôler la progression du cycle cellulaire et l'apoptose, deux mécanismes dont la

dérégulation est directement impliquée dans le processus de cancérisation. La lactoferrine de sécrétion a été introduite dans le milieu de culture alors que l'expression de la delta-lactoferrine a été induite par la doxycycline.

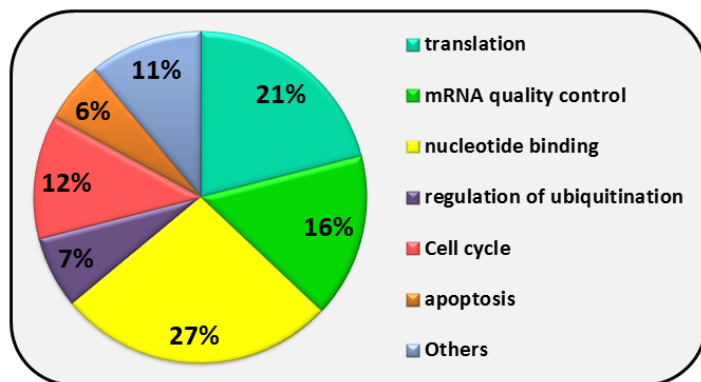
Afin d'être à même d'appréhender les modifications globales du protéome induites par la lactoferrine de sécrétion et la delta-lactoferrine, tout en intégrant un aspect quantitatif rigoureux, une analyse protéomique quantitative de type SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell culture*) a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr. Bernard Monsarrat (IPBS, Institut de Protéomique et de Biologie Structurale, Toulouse). Cette approche a été choisie car le marquage des protéines est, dans ce cas, un marquage métabolique effectué le plus en amont possible de l'expérience, évitant ainsi les biais de manipulations donc de quantification liés au traitement des échantillons en parallèle (Ong *et al.*, 2002; Blagoev *et al.*, 2003; Ong *et al.*, 2003;). La difficulté majeure a été d'effectuer une analyse SILAC en triplex afin d'intégrer au sein de la même manipulation l'impact des deux isoformes (Hoedt *et al.*, 2014).

L'analyse a permis d'identifier plus de 5300 protéines différentes dont 187 protéines surexprimées en présence de delta-lactoferrine et 217 sous-régulées. Seules les données obtenues avec la delta-lactoferrine seront discutées. Les analyses de type DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) et PANTHER (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*) (Dennis *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2009; Mi *et al.*, 2013) ont permis de classer ces protéines en familles et sous-familles selon leurs fonctions ou selon les processus biologiques dans lesquels elles interviennent.

Ainsi, les protéines sur-exprimées (Figure 9) sont pour 20 % d'entre elles impliquées dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, notamment la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose. Il est intéressant de noter qu'environ 70 % des protéines identifiées sont impliquées dans le contrôle de l'expression des protéines: contrôle de la qualité de l'ARNm, de la transcription, de la traduction. Les protéines sous-régulées sont pour 60 % d'entre elles impliquées dans des mécanismes de liaison à l'ADN et à l'ARNm. Elles se classent parmi des acteurs de la régulation du métabolisme des acides nucléiques, du contrôle qualité des ARNm et du turnover des protéines (Hoedt *et al.*, 2014).

Cette étude a mis en avant de nouvelles cibles transcriptionnelles de la delta-lactoferrine. Parmi elles, on trouve la sélénoprotéine H (SelH), une thiorédoxine nucléolaire (Novoselov *et al.*, 2007), l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine-E2E1 (UBE2E1) (van Wijk et Timmers, 2010), le facteur général de transcription TFIIF2 (GTF2F2 ou RAP30), et une ADN-hélicase ATP-dépendante qui appartient au complexe TFIIF associé à GTF2F1 (RAP74)

(Tan *et al.*, 1994). Ce complexe lie l'ARN polymérase II et la recrute au complexe d'initiation de la transcription (Tan *et al.*, 1994). La delta-lactoferrine se fixe *in situ* spécifiquement aux  $\Delta$ LfRE des promoteurs de ces trois gènes et transactive leur transcription. L'étude *in silico* des promoteurs des gènes correspondant aux protéines les plus sur-exprimées ouvre de nouvelles pistes pour la mise en évidence de nouveaux gènes cibles de la delta-lactoferrine (Hoedt *et al.*, 2014). (Figure 9).



**Figure 9 : Répartition d'après la base de données DAVID des 187 protéines sur-exprimées en présence de la delta-lactoferrine.** Elles se répartissent principalement en deux groupes : les protéines qui régulent la progression du cycle et la survie cellulaire et les protéines qui régulent le niveau d'expression des protéines tant au niveau transcriptionnelle que traductionnelle. (Hoedt *et al.*, 2014).

#### d) IFITs

De manière intéressante mais inattendue, on trouve trois membres de la famille des protéines induites par l'interféron IFIT2, IFIT3 et IFIT1 (*InterFeron-Induced protein with Tetratricopeptide repeats*) parmi les protéines les plus fortement surexprimées par la delta-lactoferrine dans les cellules MDA-MB-231. Leurs promoteurs possèdent des séquences  $\Delta$ LfRE dont la fonctionnalité devra être confirmée. Les membres de la famille des IFITs sont connus pour répondre à des infections. Ils ont récemment été décrits comme pouvant être des inhibiteurs de la migration et la prolifération cellulaire (Lai *et al.*, 2008; Fensterl et Sen, 2011). Une expression élevée d'IFIT1 dans le cas du cancer du sein est associée à une meilleure survie (Danish *et al.*, 2013). L'inactivation d'IFIT2 dans le carcinome cellulaire squameux conduit à la progression tumorale, en particulier elle favorise la formation des métastases (Lai *et al.*, 2013). En outre, l'expression de IFIT2 favorise l'apoptose cellulaire (Reich, 2013). Les fonctions antitumorales d'IFIT1 et IFIT2 sont notamment dues à leurs interactions avec une variété de molécules du cytosquelette et à leurs interactions avec eIF3 ce qui mène à une inhibition de la traduction (Terenzi *et al.*, 2006). Une activité anti-proliférative a également été attribuée à IFIT3 dont l'expression conduit à une régulation positive de p27 et p21 et à l'accumulation de cellules en phase G1 (Xiao *et al.*, 2006). Il est intéressant de noter que l'activité et la stabilité d'IFIT1 sont modulées par liaison à la protéine « ubiquitin-like modifier » ISG15 (*Interferon-induced ubiquitin-like protein*) (Zhao *et al.*, 2005a), elle-même

surexprimée dans des cellules exprimant la delta-lactoferrine. Il existe désormais des preuves solides que dans certains cancers une altération de l'immunosurveillance joue un rôle essentiel dans l'initiation et la croissance tumorale. Par conséquent, en surexprimant les protéines IFITs, la delta-lactoferrine pourrait contribuer directement ou indirectement à favoriser une réponse immunitaire contre la tumorigenèse. Des travaux seront nécessaires pour corrélérer les niveaux d'expression de la delta-lactoferrine et des IFITs avec l'immunoprotection contre les cellules cancéreuses mammaires.

### **3.2 Maturation des pré-ARNm**

Kim *et al.* (2013) ont réalisé une étude transcriptomique comparative des transcrits sur- ou sous-exprimés en réponse aux deux isoformes de lactoferrine de cellules HEK293. Ils ont également étudié les voies de signalisation cellulaire activées ou non lors de cette étude comparative. Ils ont généré une quantité impressionnante de données et montré que les gènes essentiels dont l'expression était modifiée ainsi que les réseaux de signalisation qui étaient affectés avaient un lien fort avec le contrôle de la survie cellulaire et/ou de l'apoptose.

Par ailleurs, ils ont montré que la delta-lactoferrine pouvait agir directement sur la maturation des transcrits en favorisant le passage des pré-ARNm HBB (*hemoglobin, beta*), TRA2B (*Splicing Factor, Arginine/Serine-Rich 10* ou *Transformer 2 Homolog*) and ATP5C1 (*ATP Synthase, H<sup>+</sup> Transporting, Mitochondrial F1 Complex, Gamma*) en ARNm matures (Kim *et al.*, 2013).

## **IV. Régulation de l'activité et de la stabilité de la delta-lactoferrine par O-GlcNAcylation**

La *O-N*-acétylglucosaminylation (*O-GlcNAc*) est une modification post-traductionnelle ubiquitaire mise en évidence pour la première fois en 1984 (Torres et Hart, 1984). On sait maintenant que la régulation du niveau de *O-GlcNAcylation* est importante pour le déroulement normal du cycle cellulaire et plus particulièrement de la mitose (O'Donnell *et al.*, 2004; Slawson *et al.*, 2005; Dehennaut *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2006c; Drougat *et al.*, 2012). Une dérégulation de ce processus est observée dans certains cancers dont le cancer du sein (Caldwell *et al.*, 2010; Champattanachai *et al.*, 2013), de la prostate (Lynch *et al.*, 2012), du côlon et du poumon (Mi *et al.*, 2011) et de l'œsophage (Qiao *et al.*, 2012). Ces études ont montré une contribution active de la *O-GlcNAc* transférase (OGT) dans la prolifération, la migration ou l'invasion des cellules cancéreuses (Caldwell *et al.*, 2010; Lynch *et al.*, 2012; Champattanachai *et al.*, 2013).

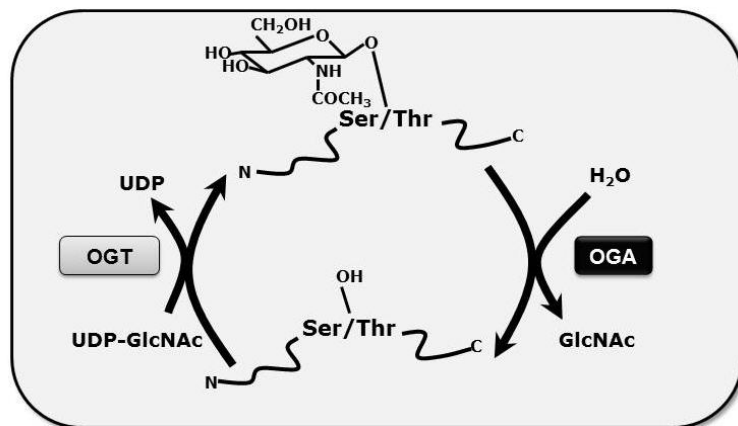
C'est pourquoi nous avons étudié l'impact de la *O*-GlcNAc sur la delta-lactoferrine, un facteur de transcription impliqué dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire. Les travaux réalisés au laboratoire ont permis de mettre en évidence que la *O*-GlcNAc contrôle l'activité transcriptionnelle et la stabilité de la delta-lactoferrine (Hardivillé *et al.*, 2010).

#### 4.1 La *O*-N-acétylglucosaminylation

La *O*-GlcNAcylation est retrouvée majoritairement dans le cytosol et le noyau mais aussi dans les mitochondries (Hart *et al.*, 1989; Hu *et al.*, 2009). Elle concerne de nombreuses classes fonctionnelles de protéines telles que les facteurs de transcription, les oncoprotéines et les protéines du cytosquelette (Zachara et Hart, 2006 ; Özcan *et al.*, 2010)

C'est une glycosylation atypique qui lie un monosaccharide unique, la N-acétyl-D-glucosamine, au niveau d'un acide aminé hydroxylé (sérine ou thréonine) d'une protéine par l'intermédiaire d'une liaison  $\beta$  (Figure 10). La *O*-GlcNAc est une modification dynamique contrôlée par deux enzymes nucléocytosoliques : la *O*-acétylglucosaminyltransférase (OGT) qui catalyse le transfert d'un seul résidu de N-acétyl- $\beta$ -D-glucosamine à partir de l'UDP-GlcNAc sur le groupement hydroxylé d'un résidu de sérine ou de thréonine et la *O*-acétylglucosaminidase (*O*-GlcNAcase, OGA) qui hydrolyse spécifiquement la liaison GlcNAc-Ser/Thr (Braiman *et al.*, 1974; Haltiwanger *et al.*, 1990).

**Figure 10 : Modification par *O*-GlcNAc des résidus de sérine et de thréonine.** Les flèches indiquent la nature hautement dynamique de cette modification par l'OGT ou l'OGA.



#### 4.2 La balance *O*-GlcNAc/phosphorylation

Toutes les protéines portant un résidu de *O*-GlcNAc décrites à ce jour sont des phosphoprotéines. *O*-GlcNAcylation et phosphorylation sont deux modifications post-traductionnelles qui peuvent être mutuellement exclusives si elles ciblent le même acide aminé ; mais la phosphorylation peut aussi avoir lieu sur un site adjacent situé dans l'environnement proche du site de *O*-GlcNAc (Figure 11). Ainsi, un grand nombre des

fonctions décrites pour la *O*-GlcNAcylation sont associées à l'antagonisme *O*-GlcNAc/phosphorylation (Butkinaree *et al.*, 2010). Cette réciprocité ou « Ying-O-Yang » a pu être démontrée entre autres pour l'ARN polymérase II (Comer et Hart, 2001; Ranuncolo *et al.*, 2012), le récepteur  $\beta$  murin aux œstrogènes (Cheng et Hart, 2001), la NO synthase endothéliale (eNOS) (Musicki *et al.*, 2005), le suppresseur de tumeur p53 (Yang *et al.*, 2006c) et le facteur de transcription c-Myc (Chou *et al.*, 1995 ; Kamemura *et al.*, 2002) et de nombreux autres acteurs de la régulation de la transcription (revue Hardivillé *et al.*, 2014b).

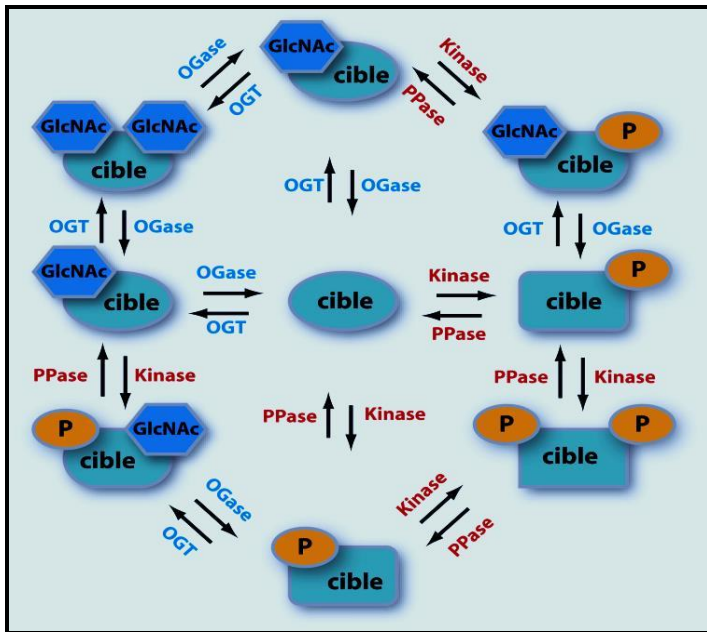


Figure 11 : Schéma soulignant la complexité de la balance *O*-GlcNAc/phosphorylation en présentant les différentes possibilités pour une protéine portant uniquement deux sites impliqués dans la modification par *O*-GlcNAc et phosphorylation. OGA (OGase) ; P : phosphate, PPase : phosphatase.

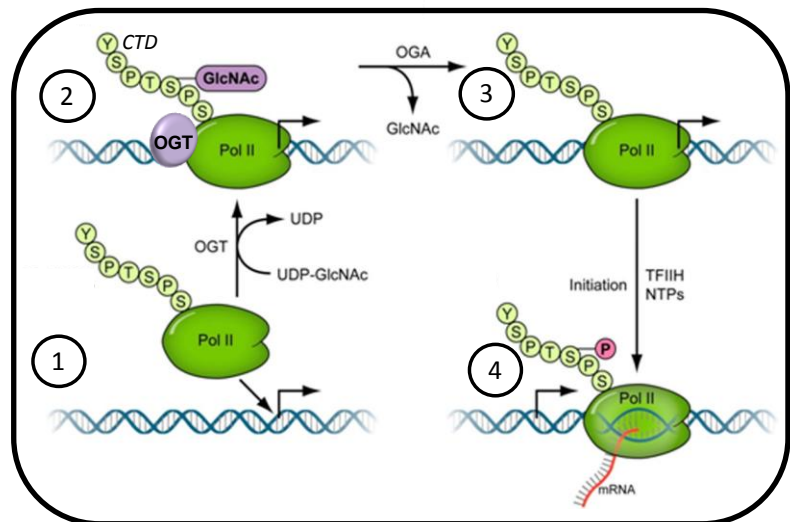
Par exemple dans le cas de l'ARN polymérase II, les premiers travaux de GW Hart ont montré que la *O*-GlcNAcylation du CTD (*Carboxy Terminal Domain*) contrôle négativement l'élongation de l'ARN, indiquant que ces deux modifications post-traductionnelles seraient mutuellement exclusives (Comer et Hart, 2001). Plus récemment, les travaux de Ranuncolo *et al.* ont mis en évidence une dépendance plus complexe entre les deux modifications post-traductionnelles (Figure 12). Ils ont montré *in vitro* qu'une hyper- ou une hypo-glycosylation de l'ARN polymérase II ne bloque la transcription que si cela se passe avant la formation du complexe de pré-initiation. Ils ont aussi démontré que l'OGT interagit avec plusieurs protéines du complexe de pré-initiation (dont ARN polymérase II, TBP (*TATA Box binding Protein*), TFIIA (*Transcription Factor IIA*), TFIIF (*Transcription Factor IIF*)), et que son expression est nécessaire à la transcription et au recrutement de l'ARN polymérase II sur les promoteurs (Ranuncolo *et al.*, 2012).

Cette relation antagoniste entre *O*-GlcNAc et phosphorylation apporte un haut degré de complexité des modifications d'une protéine dont chacune des isoformes pourrait avoir des



propriétés physiques et biologiques différentes.

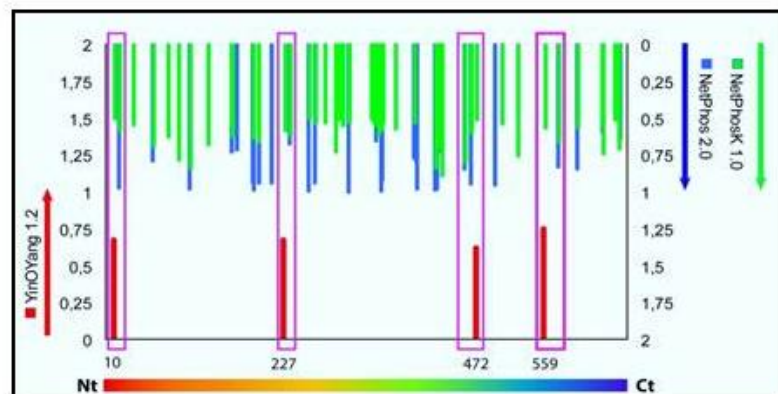
**Figure 12 : Modèle proposé pour l'action séquentielle de l'OGT, l'OGA et des kinases sur le CTD (Carboxy-terminal domain) de l'ARN polymérase II.** (1) Dans un premier temps, l'OGT s'associe au complexe de pré-initiation formé sur les promoteurs des gènes activés et glycosyle l'ARN pol II (2). Puis, la déglycosylation de l'ARN pol II par l'OGA est indispensable (3) pour permettre la phosphorylation de la polymérase par le facteur de transcription TFIIH et l'élongation subséquente de la molécule d'ARN (4) (d'après *Ranuncolo et al., 2012*).



### 4.3 La delta-lactoferrine est modifiée par O-GlcNAc

L'analyse *in silico* de la séquence primaire de la delta-lactoferrine a permis de mettre en évidence quatre sites potentiels de O-GlcNAc susceptibles d'être aussi phosphorylés ou proches de résidus pouvant l'être (Figure 13). Il s'agit des résidus de sérine S10, S227, S472 et thréonine T559.

**Figure 13 : Sites potentiels de O-GlcNAc et de phosphorylation de la delta-lactoferrine** obtenus avec les serveurs Yin-O-Yang 1.2 pour la O-GlcNAc et NetPhosK 1.0 et NetPhos 2.0 pour la phosphorylation.



L'étude du profil de O-GlcNAc a confirmé que trois des sites étaient effectivement modifiés et que seule la T559 ne l'était pas. La recherche *in silico* des résidus modifiés par un groupement phosphate (Figure 13) montre que la delta-lactoferrine est susceptible d'être phosphorylée sur de très nombreux sites. L'utilisation d'inhibiteurs ou activateurs spécifiques soit de l'OGA ou de l'OGT ou la surexpression de l'OGT a permis de montrer que S10, S227 et S472 étaient également la cible de kinases et qu'une balance O-GlcNAc/phosphate pouvait exister au niveau de chacun de ces sites (*Hardivillé et al., 2010*).

#### **4.4 La balance *O*-GlcNAc/phosphorylation contrôle la dégradation protéasomale de la delta-lactoferrine**

La balance *O*-GlcNAc/phosphorylation est décrite pour réguler la stabilité des protéines et particulièrement celle des facteurs de transcription (Özcan *et al.*, 2010). La *O*-GlcNAcylation exerce un effet protecteur alors que la phosphorylation déclenche la dégradation protéasomale. Ainsi, le facteur de transcription Sp1 sous forme hypoGlcNAcylé voit sa durée de demi-vie réduite alors que sa *O*-GlcNAcylation a l'effet opposé (Han et Kudlow, 1997; Lee *et al.*, 2008). Cet effet protecteur de la *O*-GlcNAc des protéines a également été suggéré pour mER- $\beta$  (*murine Estrogen Receptor  $\beta$* ). Située au cœur d'une séquence PEST, la phosphorylation de ce résidu induit la dégradation du récepteur alors que sa *O*-GlcNAc augmente sa durée de demi-vie (Cheng et Hart, 2001). Par ailleurs, il a également été démontré que la *O*-GlcNAc de la sérine 149 de p53 induit une diminution de son ubiquitinylation par inhibition de la phosphorylation de la thréonine 155 (Yang *et al.*, 2006c).

Nous avons déjà évoqué la dégradation protéasomale de la delta-lactoferrine dans le paragraphe concernant la séquence PEST et discuté de l'impact de la phosphorylation sur l'activation de cette dernière. Ici, nous allons nous intéresser au potentiel protecteur de la *O*-GlcNAc. Hardivillé *et al.* (2010) ont montré que la *O*-GlcNAc inhibe la polyubiquitinylation de la delta-lactoferrine et la protège de la dégradation protéasomale. Les isoformes mutantes pour les sites de *O*-GlcNAc n'ont pas toutes la même stabilité mais la *O*-GlcNAc de la S10 est au cœur de ce processus. En effet, cette isoforme conserve une durée de demi-vie comparable à celle de l'isoforme sauvage. La *O*-GlcNAc masque l'hydroxyle des résidus de sérine ou de thréonine de la séquence PEST à la phosphorylation, ce qui conduit à la stabilisation des protéines. Cependant, concernant la delta-lactoferrine le résidu S10 est distant de la séquence PEST suggérant que la stabilisation de la protéine par la *O*-GlcNAc de la S10 nécessite un mécanisme relais. Il a été démontré par l'équipe de Tony Lefèbvre que les Hsp (*Heat shock protein*) possèdent une activité lectinique leur permettant d'interagir avec les protéines *O*-GlcNAcylées (Guinez *et al.*, 2006). Le complexe protéine-*O*-GlcNAc/Hsp serait alors protégé de la dégradation protéasomale (Guinez *et al.*, 2007). Un complexe de ce type n'a pas pu être mis en évidence avec la delta-lactoferrine.

#### **4.5 La balance *O*-GlcNAc/phosphorylation contrôle l'activité transcriptionnelle de la delta-lactoferrine**

La balance *O*-GlcNAc/phosphorylation peut contrôler l'activité des acteurs de la

machinerie de transcription comme l'ARN polymérase II (Ranuncolo *et al.*, 2012) mais également l'activité transcriptionnelle de nombreux facteurs de transcription. En effet, cette balance joue un rôle clef dans la régulation de leur interaction avec différents partenaires protéiques, leur trafic, leur stabilité, leur liaison à l'ADN et/ou leur activité. Ainsi la *O*-GlcNAc augmente l'activité transcriptionnelle de certains d'entre eux, notamment FoxO1 (*Forkhead box O1*) (Kuo *et al.*, 2008), p53 (Shaw *et al.*, 1996; Fiordaliso *et al.*, 2001) ou NF- $\kappa$ B (James *et al.*, 2002), mais l'inhibe pour d'autres tels que c-Myc (Kamemura *et al.*, 2003) ou mER- $\beta$  (Cheng *et al.*, 2001).

Concernant la delta-lactoferrine, Hardivillé *et al.* (2010) ont montré par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine, que l'isoforme *O*-GlcNAcylée n'interagit pas avec l'ADN alors que le complexe transcriptionnel contient une isoforme phosphorylée et ubiquitinylée de la delta-lactoferrine. Ils ont montré que le résidu S10 est au coeur de cette régulation. La phosphorylation de cette sérine conduit à une forte activité transcriptionnelle alors que la modification par *O*-GlcNAc du même site conduit à une forte diminution de la transactivation. L'utilisation d'un mutant mimant une phosphorylation constitutive sur la S10 (S10D) confirme le rôle de la phosphorylation puisque l'activité transcriptionnelle du mutant S10D est supérieure d'un facteur 4,5 à celle de l'isoforme sauvage. Ces résultats montrent que la réciprocity *O*-GlcNAc/phosphorylation de la S10 contrôle l'activité transcriptionnelle de la delta-lactoferrine.

Les deux autres sites de *O*-GlcNAc que sont les S227 et S472 ne semblent pas avoir le même impact et n'ont que peu d'effet sur l'activité transcriptionnelle de la delta-lactoferrine. Il se pourrait, comme décrit pour la phosphorylation, que ces sites soient des sites dits de « priming ». Le résidu de sérine 472, situé à proximité de la séquence NLS, pourrait selon son type de modifications influencer le trafic nucléocytoplasmique de la delta-lactoferrine. Cependant, l'utilisation d'activateurs et/ou inhibiteurs de la balance *O*-GlcNAc/phosphorylation montre que le trafic intracellulaire de la delta-lactoferrine n'est pas sous l'influence de cette balance (Hardivillé *et al.*, 2010).

# Modifications post-traductionnelles

Le protéome est deux à trois fois plus complexe (supérieur à 1 000 000 protéines) que les régions codantes de l'ADN peuvent le prédire. Il existe trois mécanismes majeurs permettant d'augmenter la capacité codante du génome (environ 26 500 gènes chez l'humain) à la diversité du protéome.

Le premier d'entre eux est l'épissage alternatif (Maniatis et Tasic, 2002; Black, 2003). En effet, il est communément admis que près de 70% des gènes humains voient leur ARN pré-messager régulé par épissage alternatif.

Le second mécanisme à la base de la diversité fonctionnelle des protéines repose sur l'existence de protéases qui clivent les chaînes polypeptiques de protéines cibles les rendant fonctionnelles ou à partir de ces dernières génèrent de nouveaux fragments protéiques pouvant présenter des fonctions nouvelles.

Le troisième mécanisme permettant d'accroître la diversité du protéome est la modification covalente des protéines sur un ou plusieurs sites. Ces modifications sont regroupées sous le terme de modifications post-traductionnelles (MPTs). Ainsi, le très grand nombre de modifications différentes qui touchent une protéine peut influencer de façon quasi illimitée les fonctions de cette dernière, les intégrer à une cascade de signalisation, les adresser vers un compartiment cellulaire, les ancrer à la membrane ou les « marquer » afin qu'elles soient reconnues par d'autres molécules ou par les systèmes de dégradation cellulaire. 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.

Bien que présentes chez les procaryotes, ces MPTs sont plus largement rencontrées chez les eucaryotes. Environ 5% du génome des eucaryotes supérieurs sont alloués à la synthèse des enzymes réalisant ces MPTs (pour revue voir : Walsh *et al.*, 2005).

Parmi les MPTs répertoriées à ce jour, une trentaine d'entre elles sont plus communément répandues (Seo et Lee, 2004). A côté de la phosphorylation qui reste à ce jour la plus étudiée des MPTs et dont les rôles sont quasiment établis, sont retrouvées la méthylation, l'acétylation, l'ubiquitinylation, la SUMOylation, la O-GlcNAcylation, l'ADP-ribosylation, la nitration et l'ajout d'ancrage lipidique (myristoylation, prénylation, ..), la formation des ponts disulfure et la glycosylation (Anbalagan *et al.*, 2012) (Tableau IV).

**Tableau IV. Principales modifications post-traductionnelles rencontrées par acide aminé** (Walsh *et al.*, 2005). Il n'y a pas de modification connue à ce jour pour les acides aminés Leu, Ile, Val et Phe.

Type de modification post-traductionnelle	Résidu modifié	Fonction
<b>Sumoylation</b>	Lys	Addition d'un peptide d'environ 100 acides aminés par une liaison $\epsilon$ -amino isopeptidique hautement labile sur une lysine provoquant un incrément de masse de 11 kDa. Possibilité de multi- ou polySUMOylation. Existence de 4 peptides SUMO différents.
<b>Acétylation</b>	Lys	Addition d'un groupement acétyl. L'acétylation des lysines neutralise les charges positives des protéines qu'elle modifie.
<b>Ubiquitinylation</b>	Lys	Addition d'un peptide d'environ 76 acides aminés par une liaison $\epsilon$ -amine isopeptidique ou par une liaison peptidique sur l'acide aminé N-terminal. Possibilité de multi- ou polyubiquitination.
<b>Méthylation</b>	Lys, His, Arg	Addition de groupement $\text{CH}_3$ à des acides aminés basiques. Augmente l'indice d'hydrophobicité de la protéine modifiée.
<b>Neddylaton</b>	Lys	Addition d'un peptide ubiquitin-like NEDD8.
<b>Hydroxylation</b>	Lys et Pro	Addition d'un groupement OH par une prolyl hydroxylase. Cette modification est importante pour la maturation des fibres de collagène (Pekkala <i>et al.</i> , 2004).
<b>Sulfatation</b>	Tyr	Transfert d'un groupement sulfate activé sur une protéine acceptrice par une sulfotransférase.
<b>Nitration</b>	Tyr	Addition de groupement $\text{NO}_2$ sur les résidus de Tyr. Augmente la dégradation des protéines modifiées par le protéasome.
<b>Phosphorylation</b>	Ser, Thr, Tyr	Addition d'un groupement phosphate par une liaison ester sur des acides aminés polaires résulte en une augmentation de charges négatives dans l'environnement de la modification.
<b>O-GlcNAcylation</b>	Ser, Thr	Addition d'un résidu de N-acétylglucosamine par une liaison osidique en $\beta$ sur des acides aminés polaires. Peut entrer en compétition avec la phosphorylation. La O-GlcNAcylation n'altère pas la charge de la protéine.
<b>Carboxylation</b>	Glu	Modification du glutamate en $\gamma$ -carboxyglutamate par une $\gamma$ -glutamylcarboxylase, principalement dans les protéines impliquées dans la cascade de coagulation du sang (Bandyopadhyay, 2008).
<b>Citrullinisation</b>	Arg	Conversion d'arginine en citrulline dans une séquence consensus par l'enzyme peptidylarginine deiminase (PAD).
<b>Prénylation</b>	Cys	Modification post-traductionnelle lipidique par l'ajout d'un groupement 15-carbone farnésyl pyrophosphate ou 20-carbone géranylgeranyl pyrophosphate lesquels sont attachés à l'extrémité C-terminale des protéines cibles. Est catalysée par la farnésyl transférase ou la géranylgeranyl transférase, respectivement.
<b>S-acylation</b>	Cys	Aussi nommée palmitoylation. C'est l'addition d'acides gras sur des résidus de cystéine par une famille d'acyltransférases. La réaction inverse est catalysée par les acylthioestérases.
<b>Myristoylation</b>	Gly	Lipidation de protéines dans laquelle un groupement myristoyl dérivé d'acide myristique (acide gras saturé de 14 carbones) est lié à une glycine N-terminale par une liaison amide stable laquelle est catalysée par la myristoyl-CoA:protéine N-myristoyltransférase (NMT).
<b>ADP-ribosylation</b>	Arg, Glu, Asp	Addition d'un ou plusieurs motifs d'ADP-ribose provenant du $\text{NAD}^+$ par l'ADP rRibosyltransférase <i>via</i> une liaison ester.
<b>C- mannosylation</b>	Trp	La liaison de $\alpha$ -mannopyranose au premier tryptophane dans la séquence consensus WXXW, par une liaison C-C.

Certaines de ces modifications peuvent se retrouver en même temps sur une protéine ou apparaître transitoirement. Parfois la présence d'une de ces modifications sert de signal pour l'addition d'une autre modification. Par exemple, la phosphorylation précède souvent l'ubiquitination ou la SUMOylation. Il arrive également que certains sites soient la cible de

compétitions qui peuvent être agonistes ou antagonistes. Ainsi, O-GlcNAcylation/phosphorylation et ubiquitination et SUMOylation sont des modifications parfois antagonistes, de même que SUMOylation et acétylation. Ce point sera abordé dans le chapitre IV.

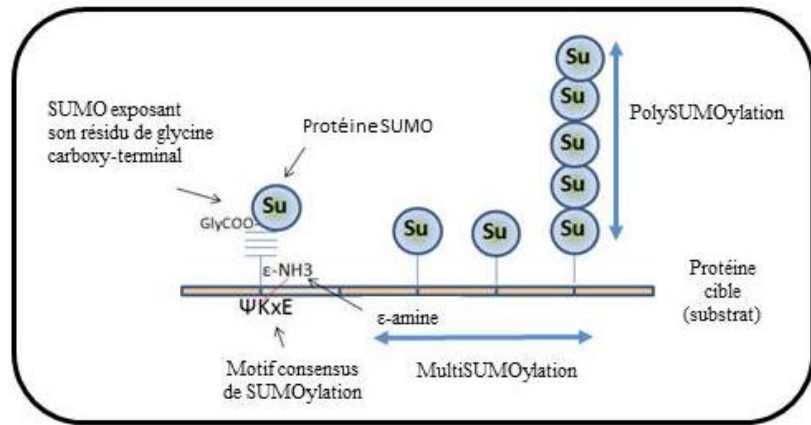
Concernant les facteurs de transcription, les MPTs sont au cœur de la régulation de leur activité, leur stabilité, leur localisation, le recrutement de partenaires et/ou leur fixation à l'ADN (Filtz *et al.*, 2014). Les MPTs les plus rencontrées sont la phosphorylation, la O-GlcNAc, l'ubiquitination, la SUMOylation, l'acétylation et la méthylation. Nous savons déjà que la delta-lactoferrine est la cible de la balance O-GlcNAc/phosphate et de l'ubiquitination. Nos études *in silico* montrent qu'elle ne semble pas posséder de site de méthylation ; par contre elle possède un site consensus de SUMOylation et pourrait être acétylée. Dans ce chapitre, une description de la SUMOylation sera faite et une attention particulière sera portée aux compétitions entre MPTs notamment SUMOylation/ubiquitination et SUMOylation/acétylation. L'impact de la phosphorylation sera également discuté.

## **I. La SUMOylation**

La protéine SUMO a été découverte dans les années 1990, 20 ans après la découverte de l'ubiquitine dû à la nature instable de la liaison entre les protéines cibles et SUMO. C'est grâce à RanGap, une protéine sumoylée stable, que la découverte a eu lieu (Johnson *et al.*, 1997; Meulmeester et Melchior, 2008). La SUMOylation consiste en l'ajout d'une petite protéine SUMO de 11 kDa (20 kDa sur SDS-page) par formation d'un lien isopeptidique entre sa glycine C-terminale et le groupe  $\epsilon$ -amine d'une lysine de la protéine cible. La maturation des protéines SUMO qui consiste à exposer le motif di-glycine C-terminal, est nécessaire au processus et implique des endoprotéases spécifiques, nommées sentrines (SENPs) (Ayaydin et Dasso, 2004; Galisson *et al.*, 2011).

La SUMOylation est un processus enzymatique en deux ou trois étapes qui nécessite, comme pour l'ubiquitination, un complexe enzymatique composé d'enzymes d'activation, d'une enzyme de conjugaison Ubc9 et de SUMO ligases. Cependant, contrairement à l'ubiquitination, la SUMOylation ne nécessite pas vraiment la présence d'une SUMO ligase. En effet, Ubc9 est capable à elle seule de reconnaître et de SUMOyler sa cible. Les SUMO ligases améliorent simplement le taux de SUMOylation.

**Figure 14 :** La SUMOylation consiste en l'ajout d'une unité SUMO sur une protéine cible u niveau d'un résidu de lysine situé dans un consensus de type ΨKXE. La protéine cible peut être mono-, multi- ou polySUMOylée.

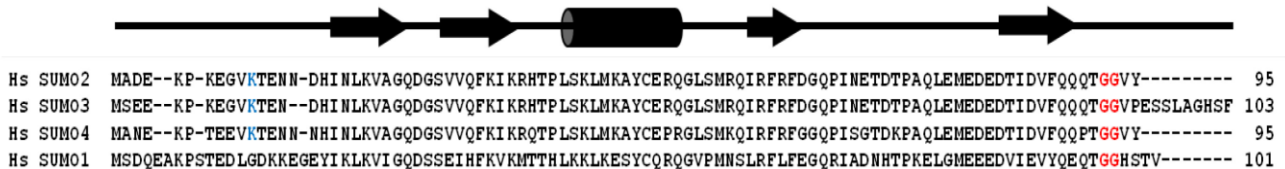


Les protéines pourront être les substrats d'une mono-, d'une multi- ou d'une poly-SUMOylation (Srikumar *et al.*, 2013) (Figure 14). La SUMOylation est réversible grâce à l'action d'enzymes spécifiques qui possèdent une activité de SUMO isopeptidases, les SENPs (*Sentrin Specific Proteases*).

### 1.1 Les protéines SUMO

La découverte tardive des protéines SUMO-1, en 1996, est due en partie au fait que la SUMOylation est un processus hautement dynamique et que seulement une petite partie du protéome est SUMOylé *in vivo* (Johnson, 2004). C'est la première protéine ubiquitine-like (Ubl) découverte. Elle a reçu de nombreux noms SUMO-1 (Mahajan *et al.*, 1997), Sentrin-1 (Okura *et al.*, 1996), PIC-1 (Boddy *et al.*, 1996), GMP-1 (Matuni *et al.*, 1996), UBL1 (Shen *et al.*, 1996), SMT3 (Mannen *et al.*, 1996; Lapenta *et al.*, 1997) mais est désormais connue sous le nom unique de SUMO-1 (*Small Ubiquitin-related Modifier*). Sa découverte a été rapidement suivie par la caractérisation de trois autres polypeptides de même nature chez l'humain (SUMO-2, -3 et -4) (Saitoh et Hinchey, 2000; Wang *et al.*, 2007).

Les protéines SUMO sont présentes chez l'homme sous quatre différentes isoformes (Figure 15).



**Figure 15 :** Alignement des séquences primaires de SUMO1, SUMO2, SUMO3 et SUMO4. Le motif di-glycine exposé après l'étape de maturation est coloré en rouge. SUMO-2, SUMO-3 et SUMO-4 possèdent dans leur extension amino-terminale un site consensus de SUMOylation (résidu lysine K11, coloré en bleu). Cette particularité explique pourquoi SUMO-1 ne forme pas de chaînes polymériques comme l'ubiquitine ou SUMO-2/3 (Tatham *et al.*, 2001). Les éléments de structures secondaires sont représentés au dessus de l'alignement par une flèche (brin β) et un cylindre (hélice α).

Les SUMOs sont présentes chez tous les eucaryotes (Ishov *et al.*, 1999; Johnson, 2004). Le génome de *S. cerevisiae* ne code que pour la SUMO *Smt3* (*Suppressor of Mif Two3*), essentielle pour sa viabilité. De même, celui de *S. Pombe* ne code que pour *Pmt3*, alors que de nombreuses protéines SUMOs sont encodées par le génome de *A.thaliana* (Meluh et Koshland 1995; Melchior, 2000; Novatchkova *et al.*, 2004; Chosed *et al.*, 2006). La SUMOylation est trouvée chez de nombreux invertébrés (Coulson, 1996; Choudhury et Li, 1997; Jones *et al.*, 2002; Nowak et Hammerschmidt 2006), le protiste *Toxoplasma gondii* (Braun *et al.*, 2009). Les protéines SUMO sont redondantes. L'invalidation du gène *SUMO-1* n'est létale ni chez la souris ni chez le poisson zébre adulte (Zhang *et al.*, 2008a; Evdokimov *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2010). Cependant les protéines SUMO-1, -2 et -3 sont toutes les trois indispensables au développement embryonnaire correct du poisson zébre (Yuan *et al.*, 2010).

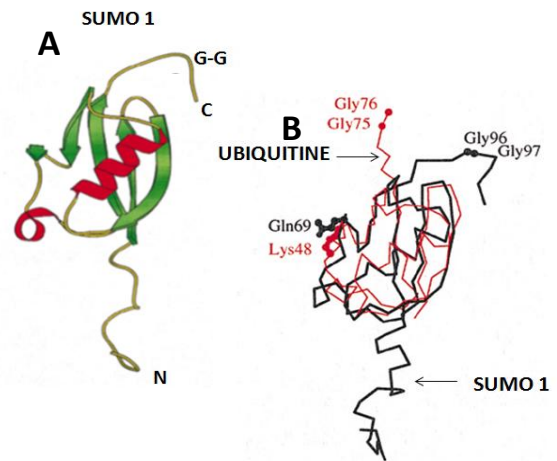
D'abord considérée comme exclusivement nucléaire, la SUMOylation possède des substrats cytoplasmiques et membranaires. Les peptides SUMO-1 et -2/3 cibleraient des protéines différentes. Ainsi, chez l'homme, SUMO-1 modifierait préférentiellement RanGAP1, PML, Sp100, p53 (Vertegaal *et al.*, 2004b) alors que SUMO-2/3 est retrouvé sur Sp3, le heat shock factor 1, la thymidine glycosylase, l'histone desacétylase 4, p300, et la topoisomerase II (Saitoh et Hinchev, 2000; Vertegaal *et al.*, 2006). Cependant certains substrats peuvent être modifiés par les deux (Wilkinson et Henley, 2010). Il est clair, au vu des données de la littérature que des travaux supplémentaires sont nécessaires pour comprendre comment la machinerie de SUMOylation fait la distinction entre les peptides SUMO-1 et SUMO-2 ou -3 pour que la modification soit spécifique d'une protéine cible donnée.

### **1.1.1 SUMO-1**

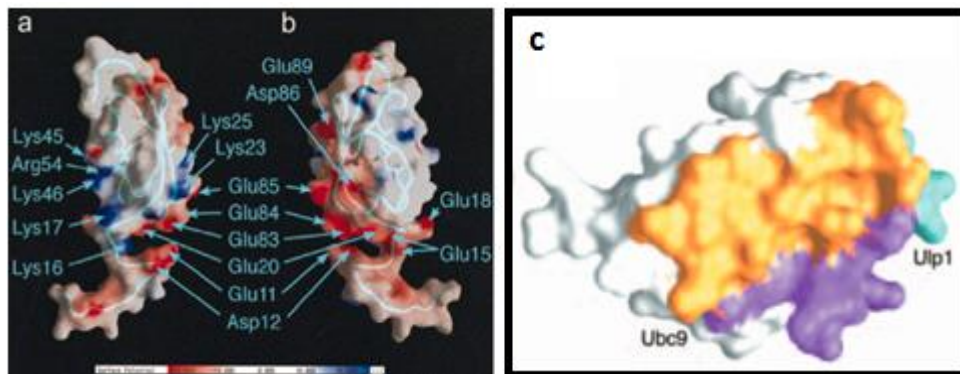
SUMO-1 est identique à 46 % à SUMO-2 et à 47 % à SUMO-3 (Figure 15). SUMO-1 n'a que peu d'homologie avec l'ubiquitine (18 %) (Bayer *et al.*, 1998). Elle se différencie de l'ubiquitine par une extension amino-terminale de quinze à vingt résidus hautement flexible (Bayer *et al.*, 1998) (Figure 16). L'étude de la répartition des charges de surface montre que SUMO-1 a une répartition inégale de ses charges avec une large surface concentrant des charges négatives ainsi qu'une poche d'acides aminés chargés négativement non présente dans l'ubiquitine au niveau de l'extrémité N-terminale. Des charges de surface positives, cette fois, sont retrouvées sur la face concave de la molécule (Figure 17 a-b). Cette dichotomie dans la répartition des charges pourrait expliquer les interactions de SUMO-1 avec ces différents partenaires comme l'enzyme de conjugaison Ubc9 et la SUMO protéase Ulp1 (Bayer *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2004) (Figure 17 c).



**Figure 16 : La structure tridimensionnelle de SUMO-1 est similaire à celle de l'ubiquitine.** A) Représentation en rubans de la structure 3D de SUMO-1 en utilisant le logiciel MOLSCRIPT. Les protéines SUMO appartenant aux membres de la famille des Ubiquitine-like (Ubls) se caractérisent par un repliement dit en « en  $\beta$ -grasp » qui se définit par une structure secondaire organisée selon une succession de feuillets beta-beta-alpha-beta-beta. B) Superposition des structures de SUMO-1 (noir) et de l'ubiquitine (rouge). La superposition des squelettes de Ca montre le cœur des deux protéines. Les membres de cette famille se caractérisent par la même structure en  $\beta$ -grasp mise en évidence dans l'ubiquitine. (d'après Bayer *et al.*, 1998).



SUMO-1 est essentiellement localisée dans le noyau (Woo et Abe, 2010). Elle se trouve principalement sous forme conjuguée et sa conjugaison ne semble pas être liée à des conditions physiologiques spécifiques (Saitoh et Hinchey, 2000). SUMO-1 régule de nombreux acteurs du transport noyau-cytoplasme, de la transcription, de la réparation de l'ADN, de la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose (Meluh et Koshland, 1995; Shen *et al.*, 1996; Okura *et al.*, 1996).



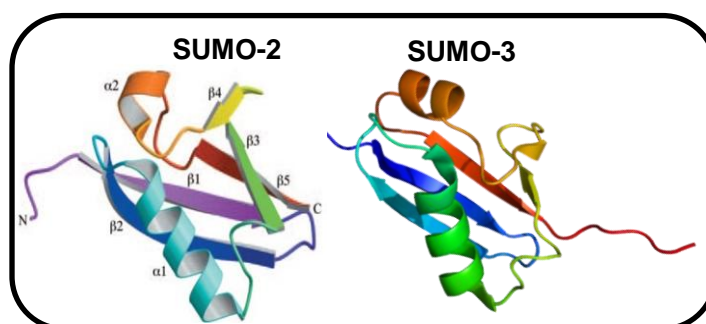
**Figure 17 : Répartition des charges à la surface de SUMO-1 et modélisation des régions d'interaction.** a-b) Répartition des charges électrostatiques sur les deux faces opposées de la molécule. Les orientations sont indiquées en filigrane et correspondent au squelette Ca. Les charges positives sont représentées en bleu et les charges négatives en rouge en utilisant le programme program GRASP (Nicholls *et al.*, 1991). La première vue de SUMO-1 (a) montre les épitopes chargés positivement (Arg54, Lys46, Lys25, Lys23, Lys17 and Lys16). La seconde vue (b) révèle une large zone composée d'acides aminés chargés négativement (Glu89, Asp86, Glu85 and Glu84) ainsi que la poche d'acides aminés acides (Glu83, Glu18, Glu15, Asp12, Glu11 and Glu20). (d'après Bayer *et al.*, 1998). c) Modélisation des zones d'interaction de SUMO-1 avec l'enzyme de conjugaison Ubc9 et la SUMO protéase Ulp1 colorées en orange, magenta et bleu cyan (Huang *et al.*, 2004).

### 1.1.2 SUMO-2/3

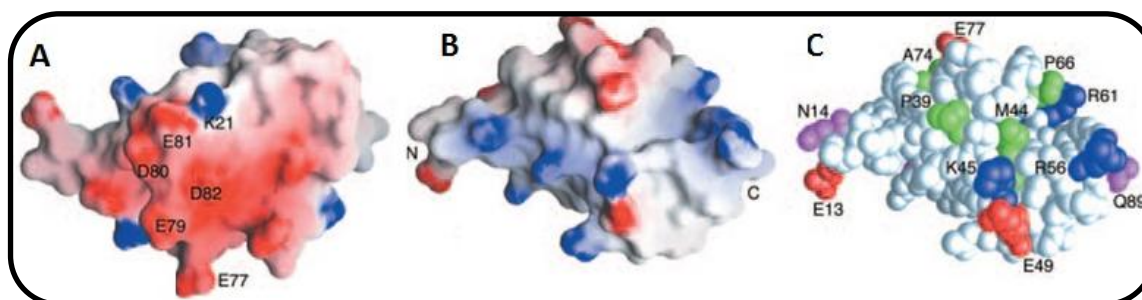
Les protéines SUMO-2 et -3 sont identiques à 87 % et ont été désignées comme suit, SUMO-2/3, faute d'anticorps spécifiques pour les différencier (Figures 15 et 18). Les SUMO-2/3 possèdent un motif ΨKXE au niveau de leur extension N-terminale, reconnu par l'enzyme de conjugaison Ubc9 qui utilise la lysine comme un site d'attachement de SUMO permettant, de cette manière, la formation de chaînes poly-SUMO-2/3 (Tatham *et al.*, 2001). L'étude des régions d'interaction à l'enzyme de conjugaison Ubc9 montre qu'elles sont hautement conservées chez toutes les isoformes SUMO.

**Figure 18 : Structures tridimensionnelles de SUMO-2 et SUMO-3.**

A) Représentation en ruban de la structure 3D de SUMO-2 tronquée en N-terminal (structure correspondant aux aa 9-93) obtenue par diffraction aux rayons X. B) Représentation en ruban de la structure 3D de SUMO-3. Le repliement dit en « en β-grasp » est retrouvé comme dans l'ubiquitine et SUMO-1 (voir figure 16). (Huang *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2005).



La répartition des charges est semblable pour les isoformes 2/3. La seule différence provient du résidu 77 qui est chargé négativement dans SUMO-2 (Glu) et positivement dans SUMO-3 (Arg) (Figure 19A). La région la plus caractéristique de SUMO-2 est la zone qui correspond à la partie concave de la molécule qui est positive dans SUMO-1 (Figure 17) et neutre dans SUMO-2 (Figure 19B, C). Ceci est dû au remplacement de la Lys 48 de SUMO-1 par une Met en 44 dans SUMO-2.



**Figure 19 : Répartition des charges à la surface de SUMO-2.** A-B) Répartition des charges électrostatiques sur les deux faces opposées de la molécule. Les charges neutres sont représentées en blanc, les charges positives en bleu et les charges négatives en rouge. SUMO-2 présente une région avec une très forte concentration de charges négatives (A). C) La molécule est présentée dans la même orientation qu'en (B) mais montre en plus les acides aminés qui diffèrent par leur charge entre SUMO-1 et SUMO-2. (les aa chargés positivement sont en bleu, les aa chargés négativement sont en rouge, les aa neutres polaires en magenta et les aa non polaires en vert). (Huang *et al.*, 2004).

La localisation subcellulaire de ces deux isoformes diffère, SUMO-2 est trouvée associée aux corps nucléaires alors que SUMO-3 est cytosolique (Woo et Abe, 2010). Contrairement aux protéines SUMO-1, les protéines SUMO-2/3 semblent majoritairement libres et sont donc considérées comme des réservoirs pour la SUMOylation. Elles sont mobilisées lors de différents stress cellulaires (Saitoh et Hinchsey, 2000).

### **1.1.3 SUMO-4**

SUMO-4 a été mis en évidence plus récemment. Il y a 86% d'identité entre SUMO-2 et SUMO-4 et 76 % entre SUMO-3 et SUMO-4 (Figure 15). Cette isoforme ne serait pas capable de participer à la formation de conjugués *in vivo* (Owerbach *et al.*, 2005) dû à son impossibilité à être maturée et à dévoiler ses deux glycines C-terminales.

A la différence des autres isoformes, son expression est limitée à certains tissus (Bohren *et al.*, 2004 ; Guo *et al.*, 2004). SUMO-4 est principalement exprimée dans le rein, les ganglions lymphatiques, la rate et les îlots pancréatiques. Elle semble modifier des facteurs de transcription impliqués dans la réponse immunitaire comme NFκB, STAT1 et AP1 (Wang et She, 2008). Une étude récente montre que SUMO-4 inhibe indirectement l'activité transcriptionnelle de NFκB. En SUMOylant IκB, elle favorise la séquestration de NFκB dans le cytoplasme par IκB. De plus, NFκB en se liant au promoteur de SUMO-4 inhibe sa transcription, suggérant un rétrocontrôle négatif (Wang *et al.*, 2009).

SUMO-4 pourrait être activée lors de stimulations stressantes des cellules et jouer un rôle clef dans la régulation du stress intracellulaire. Les travaux réalisés par le groupe de Wei et al. (2008) montrent que SUMO-4 SUMOyle plusieurs facteurs de transcription cruciaux impliqués dans la régulation du stress intracellulaire tels que AP-1, AP-2a, STAT-1, STAT-3 et le récepteur des glucocorticoïdes (Guo *et al.*, 2005). Les substrats protéiques de SUMO-4 appartiennent au groupe des protéines anti-stress, qui inclut des enzymes antioxydantes comme par exemple Cu/ZnSOD, la catalase et les peroxyredoxines, les chaperons moléculaires comme HSP70 et Grp58 (protéine disulfure isomérase trouvée dans le lumen du Réticulum Endoplasmique) (Guo *et al.*, 2005).

## **1.2 La poly-SUMOylation**

Un site de SUMOylation consensus est présent au sein de l'extension amino-terminale de SUMO-2 et de SUMO-3 (résidu lysine K11) (Figure 15). Ainsi, SUMO-2/3 peuvent être auto-modifiées et générer une chaîne de poly-SUMO-2/3 *in vivo* (Tatham *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2001; Matic *et al.*, 2008). Bien que SUMO-2 et SUMO-3 partagent 96 %

d'identité, SUMO-2 semble être un meilleur substrat de polymérisation (Tatham *et al.*, 2001). *In vivo*, les chaînes de poly-SUMO-2/3 sont souvent terminées par des unités de SUMO-1, suggérant que SUMO-1 puisse avoir un rôle de « terminateur » d'élongation (Tatham *et al.*, 2001; Matic *et al.*, 2008).

Des études récentes effectuées dans des conditions favorisant la SUMOylation montrent que les résidus de lysine K5, K7 et K42 des protéines SUMO-2/3 et les résidus de lysine K7, K16, K17, K25, K37, K39 et K46 de SUMO-1 seraient SUMOylables (Cooper *et al.*, 2005; Blomster *et al.*, 2010 ; Jeram *et al.*, 2010 ;Matic *et al.*, 2010).

Par ailleurs, des chaînes mixtes de poly-ubiquitine/SUMO ont également été décrites (Schimmel *et al.*, 2008; Aillet *et al.*, 2012). Ainsi IκBα, la protéine inhibitrice de NFκB, peut être modifiée par des chaînes de SUMO-2/3-ubiquitine. La modification de IκBα par cette chaîne mixte suite à une stimulation par le TNFα permettrait une dégradation protéasomale plus efficace de IκBα comparée à celle de la protéine modifiée soit par SUMO-2/3 soit par l'ubiquitine seule (Aillet *et al.*, 2012).

### 1.3 Les sites consensus de SUMOylation

#### 1.3.1 Le consensus classique

Tout comme pour l'ubiquitination, la SUMOylation cible un résidu de lysine (K) qui, dans la majorité des cas, se trouve au sein d'un motif ou site consensus spécifique qui correspond au consensus canonique ΨKxE/D où Ψ est un acide aminé hydrophobe, x correspond à n'importe quel résidu et E/D est un résidu acide, généralement un acide glutamique (Tableau V) (Sternsdorf *et al.*, 1999; Ling *et al.*, 2004).

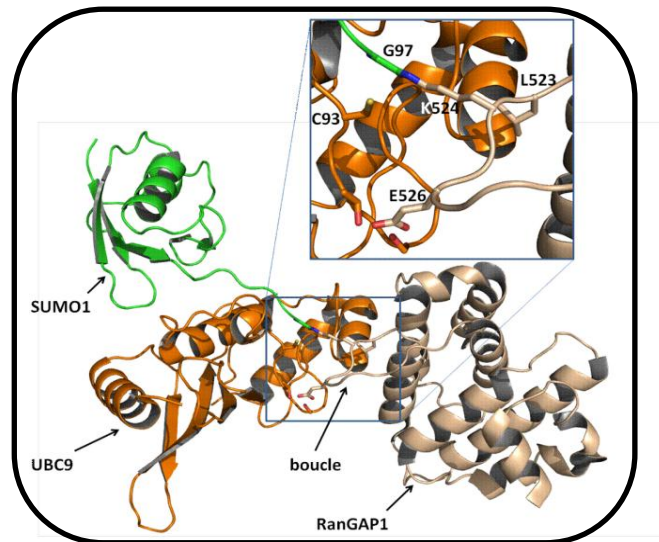
**Tableau V : Les différents motifs de SUMOylation.**

Motif consensus	Sigle	Séquence*
Consensus Motif	CM	ΨKxE/D
Inverted Consensus Motif	ICM	E/DxKΨ
Negatively charged amino-acid-Dependent SUMO Motif	NDSM	ΨKxE <sub>xx</sub> EEEE
Hydrophobic Cluster SUMO Motif	HCSM	ΨΨΨKxE
Phosphorylation-Dependent SUMO Motif	PDSM	ΨKxE/D <sub>xx</sub> SP
phosphorylated SuMOylation Motif	pSuM	ΨKxS

\* Les résidus du motif consensus sont colorés en fonction de leur nature. Résidu hydrophobe (Ψ, bleu), lysine (K), acide (E/D, rouge) et sérine phosphorylable (S, magenta). x représente n'importe quel résidu. (adapté de Da Silva-Ferrada *et al.*, 2012).

Il est désormais communément établi que des critères structuraux doivent être intégrés à la prédiction. Ainsi, 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) par le groupe de Bernier-Villamor (Figure 20), les principales caractéristiques structurales d'un site consensus de SUMOylation ont pu être déterminées et vérifiées par la suite chez d'autres protéines (Bernier-Villamor *et al.*, 2002). (Figure 20).

**Figure 20 : Modèle cristallographique du complexe Ubc9:RanGAP1-SUMO-1.** Lien isopeptidique entre le résidu lysine (K524) de RanGAP1 (beige) et le résidu glycine (G97) de SUMO1 (vert) en complexe avec Ubc9 (marron). La cystéine catalytique (C93) d'Ubc9 ainsi que les résidus leucine (L523) et acide glutamique (E526) du site consensus de SUMOylation (LKSE) de RanGAP1 sont représentés. PDB:1Z5S. (Bernier-Villamor *et al.*, 2002)



Afin d'être modifié par SUMOylation, le site consensus doit généralement faire partie d'une région non-structurée ou d'une boucle (Gareau et Lima, 2010). Les résidus lysine et acide du consensus sont susceptibles d'être spécifiquement reconnus par Ubc9. L'analyse des données obtenues lors de l'étude des interactions entre certains résidus d'Ubc9 et les sites consensus de différentes protéines suggèrent que ce sont les résidus entourant le site actif d'Ubc9 qui dictent, en partie, la reconnaissance de la séquence consensus de SUMOylation (Sampson *et al.*, 2001; Bernier-Villamor *et al.*, 2002).

### 1.3.2 Les consensus alternatifs

Récemment, des sites consensus alternatifs ont été déterminés (Tableau V). Le site ICM (*Inverted Consensus Motif*) correspond au consensus classique, mais en position inversée suggérant que l'orientation du consensus n'est pas nécessaire à sa reconnaissance par l'enzyme de conjugaison. Le site HCSM (Hydrophobic Cluster SUMO Motif) contient après le résidu lysine une séquence riche en acides aminés hydrophobes (Rodriguez *et al.*, 2001; Matic *et al.*, 2010; Spratt et Shaw, 2011). Les sites NDSM (*Negatively charged amino-acid-Dependent SUMO Motif*) (Yang *et al.*, 2006b) et PDSM (*Phosphorylation-Dependent SUMO*

*Motif*) (Hietakangas *et al.*, 2006) correspondent à deux extensions différentes, adjacentes au site de SUMOylation consensus (Tableau V). Les résidus acides présents dans le consensus NDSM favorisent positivement la SUMOylation des résidus lysine alors que dans le cas du consensus PDSM, la SUMOylation est dépendante de la phosphorylation des résidus de sérine ou thréonine adjacents au consensus (Hietakangas *et al.*, 2003; Yang et Gregoire, 2006). Ces deux motifs consensus fonctionnent finalement de la même manière puisque l'apport de charges négatives juxtaposées au site de SUMOylation par des résidus de glutamate ou d'aspartate dans le cas de NDSM ou par la phosphorylation de sérine ou thréonine dans le cas du PDSM favorise le contact avec une surface basique de l'enzyme de conjugaison Ubc9 (K65, K74 et K76), facilitant ainsi la SUMOylation (Sampson *et al.*, 2001; Mohideen *et al.*, 2009). Plus récemment, un nouveau site consensus de SUMOylation a été découvert. Il s'agit du consensus pSuM (*phosphorylated SuMOylation Motif*) quasi identique au site consensus classique de SUMOylation mais comportant un résidu sérine phosphorylable à l'emplacement du résidu acide (Picard *et al.*, 2012). L'apport de charges négatives par la phosphorylation du résidu sérine crée un site consensus compétant pour la modification du résidu lysine par SUMO. Ces évènements de phosphorylation impliquent donc une régulation du processus de SUMOylation par la balance phosphorylation/déphosphorylation.

#### 1.4 Les sites de SUMOylation non consensus

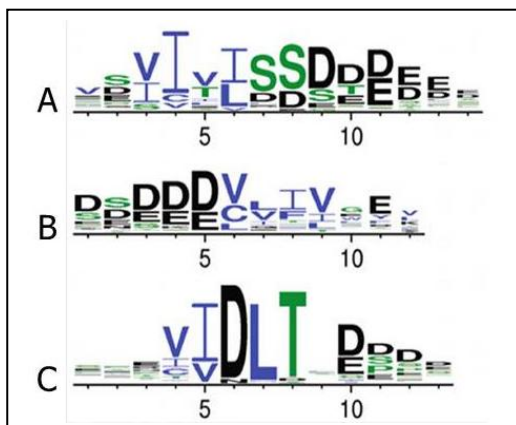
Afin de faciliter la découverte de nouvelles cibles de la SUMOylation, des algorithmes de prédiction de sites consensus SUMOplot (<http://www.abgent.com/tools/sumoplot>) et SUMOsp (<http://sumosp.biocuckoo.org/>) ont été conçus mais le contexte seul du consensus n'est pas suffisant pour valider un site de modification. En effet, certaines protéines qui possèdent ce consensus ne sont pourtant pas modifiées sur ce site. De plus, un certain nombre de protéines SUMOylées ne présentent pas de site consensus.

La SUMOylation sur des sites non consensus n'est pas facile à expliquer. Elle pourrait être attribuée à des facteurs différents comme la structure secondaire de la protéine substrat, l'encombrement stérique dû à des modifications post-traductionnelles compétitives ou la nature des SUMO ligases E3. Ainsi, des sites non consensus sont retrouvés au sein de structures secondaires structurées. Ubc9 est SUMOylée sur un résidu de lysine non consensus (K14) qui fait partie de son hélice  $\alpha$  H1 (Knipscheer *et al.*, 2005). La protéine UBE2K est modifiée par SUMO sur un résidu de lysine non consensus au sein d'une hélice  $\alpha$ , mais pas sur son site consensus, situé dans cette même hélice  $\alpha$  (Pichler *et al.*, 2005). PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) est SUMOylée sur un résidu de lysine non consensus

localisé au sein d'un  $\beta$ -turn et pouvant aussi être ubiquitinée (Hoegge *et al.*, 2002; Yunus et Lima, 2009).

### 1.5 Le motif SIM d'interaction avec SUMO

Les protéines SUMOs se lient à leurs cibles de deux manières différentes. La première, décrite ci-dessus, correspond à une liaison covalente tandis que la seconde correspond à une interaction non covalente entre une protéine SUMO et sa cible *via* un motif hydrophobe appelé SIM (*SUMO Interacting Motif*) présent sur celle-ci (Minty *et al.*, 2000; Kerscher, 2007; Gareau et Lima, 2010). Le motif SIM a été identifié chez de nombreuses protéines SUMOylées et l'alignement de ces différents motifs a permis d'établir un consensus. Il 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) (Song *et al.*, 2004; Reverter et Lima 2005; Song *et al.*, 2005 ; Hannich *et al.*, 2005). Ce consensus a évolué notamment grâce à l'étude des acides aminés adjacents aux SIMs (Figure 21). En effet dans un grand nombre de protéines SUMOylées, le noyau hydrophobe du SIM est précédé ou suivi de résidus acides (aspartate et/ou glutamate) ou de résidus de sérine ou de thréonine phosphorylables (Deshaies et Joazeiro, 2009). Désormais, la prédiction de motifs SIM peut être réalisée en utilisant le serveur GPS-SBM 1.0-prediction of SUMO-binding motifs (<http://sbm.biocuckoo.org/>) (Qian *et al.*, 2009).



**Figure 21 : 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 (exemple : SIM de PML) B) SIM avec séquence hydrophobe précédée de résidus phosphorylables et acides (exemple ; SIM de RanBP2). C) SIM avec séquence hydrophobe interrompue par un acide aspartique suivie d'une thréonine et de résidus phosphorylables et acides (exemple : les protéines PIAS) (adapté de Vogt et Hofmann, 2012).

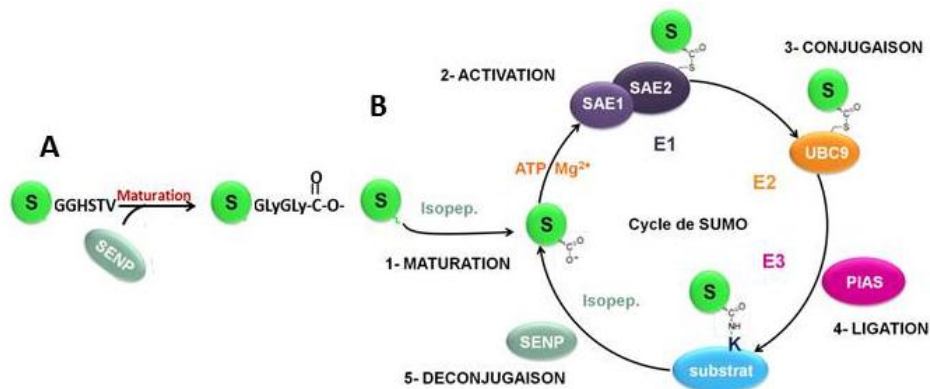
Des SIMs ont été retrouvées également dans des enzymes clef de la voie SUMO telles que l'enzyme d'activation E1 et les enzymes de ligation E3 (Song *et al.*, 2004; Lois et Lima, 2005). D'autre part, des protéines STUbL, impliquées dans la dégradation des chaînes poly-SUMOylées, présentent des motifs SIM répétés en séries jusqu'à quatre unités de répétitions leur facilitant ainsi la reconnaissance spécifique des chaînes de poly-SUMOs (Sun *et al.*, 2007). Certains motifs SIM pourraient être spécifiques soit de SUMO-1 soit de SUMO-2/3

expliquant partiellement pourquoi certaines protéines seraient préférentiellement modifiées par SUMO-1 *versus* SUMO-2/3 (Vertegaal *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008b).

Des modifications post-traductionnelles ciblant SUMO et les séquences SIMs ont été décrites. Elles se révèlent importantes pour la régulation des interactions non-covalentes entre SUMO et ses substrats. Récemment, il a été montré que l'acétylation des protéines SUMOs altérait leur interaction avec certains motifs SIM (Ullmann *et al.*, 2012).

## II. Le cycle de la SUMOylation

Le cycle de conjugaison des protéines SUMOs ressemble à celui de l'ubiquitine (Figure 22) (Muller *et al.*, 2001) et fait intervenir un complexe enzymatique composé d'enzymes d'activation, de conjugaison et de ligation. C'est un processus réversible qui fait appel des protéases spécifiques.



**Figure 22 : Le cycle de conjugaison des protéines SUMOs.** A) Une étape préliminaire de maturation des protéines SUMO, effectuée par les iso-peptidases de la famille SENP (SUMO Sentrin Specific Proteases) est requise pour leur entrée dans le processus de SUMOylation. B) Les protéines SUMO sont prises en charge par une série d'activités enzymatiques distinctes qui leur sont spécifiques. Trois étapes sont essentielles au processus de SUMOylation : l'activation par l'enzyme E1, SAE1:SAE2, la conjugaison par l'enzyme E2, Ubc9 et le transfert au substrat par des enzymes de ligation E3 telles les PIAS (Jackson, 2001, Kagey *et al.*, 2003; Pichler *et al.*, 2004; Weger *et al.*, 2005). Finalement la déconjugaison est réalisée par les SENPs.

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

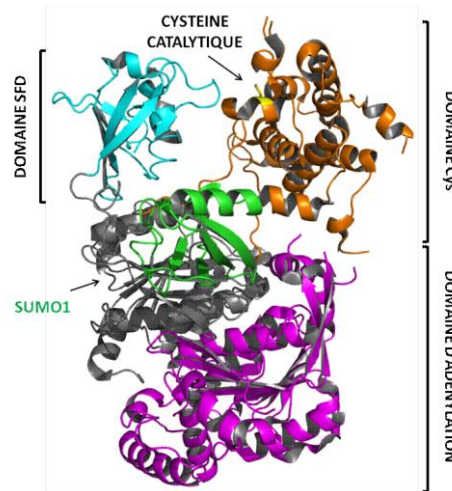
#### 2.1.1 L'enzyme d'activation E1 : SAE1:SAE2

La SUMOylation fait appel à une seule enzyme E1, présente sous forme hétérodimérique SAE1:SAE2, qui prend en charge une protéine SUMO (Figure 23). En outre, l'enzyme E1 (SAE1:SAE2) peut activer les trois protéines SUMOs (SUMO-1, -2 et -3). En



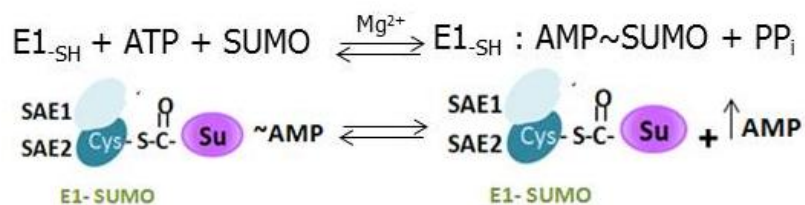
effet, les résidus des protéines SUMOs nécessaires à la reconnaissance par l'enzyme d'activation SAE1:SAE2 sont conservés dans les trois SUMOs (Desterro *et al.*, 1999; Tatham *et al.*, 2001).

**Figure 23 : Modèle cristallographique du complexe entre SUMO1 et l'enzyme d'activation E1 SAE1:SAE2.** SUMO-1 (vert) est complexé au domaine d'adénylation formé de SAE1 (magenta):SAE2 (gris foncé). La cystéine catalytique (C173) du domaine Cys (marron) de SAE2 est colorée en jaune. Le domaine SFD (cyan) de SAE2 sert au recrutement de l'enzyme de conjugaison E2 Ubc9. SFD : *SUMO-Fold Domain* (PDB: 3KYC).



La mécanistique du processus d'activation de SUMO semble en tout point identique à celle de l'ubiquitine (Figure 24). En effet, après sa maturation protéolytique, SUMO est adénylé en présence de d'ATP et de  $Mg^{2+}$ . Par la suite, une liaison thioester est formée entre SAE2 et SUMO-AMP (SAE2~SUMO) suite à l'attaque nucléophile de la cystéine catalytique (SAE2-C173) sur la partie carboxy-terminale de la protéine SUMO adénylée. Cette étape est appelée transthioylation. Le processus d'activation s'accompagne de changements de conformation de la sous-unité SAE2 permettant le recrutement de l'enzyme de conjugaison Ubc9 (Lu *et al.*, 2010).

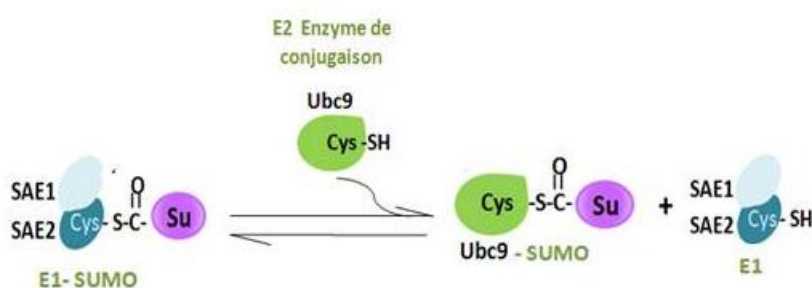
L'enzyme de conjugaison E2 (UBE2I ou Ubc9) est conservée chez tous les organismes eucaryotes. Il n'existe qu'une seule enzyme E2 ce qui explique pourquoi elle est essentielle. Son invalidation entraîne une létalité à un stade précoce du développement chez la levure *S. cerevisiae* et chez la souris (Betting et Seufert, 1996; Hayashi *et al.*, 2002; Nacerddine *et al.*, 2005).



**Figure 24 : La réaction d'activation.** L'enzyme E1 lie l'ATP et SUMO et catalyse la formation de SUMO-adénylate dans lequel le groupement carboxy terminal de SUMO est lié de manière covalente à l'AMP. SUMO-adénylate est lié à E1 de manière non covalente. Ensuite, SUMO est transférée au site actif Cys de E1 et forme un conjugué thioester avec E1. A la fin de la réaction il y a la libération d'AMP et de pyrophosphate inorganique. La réaction d'activation est réversible (Shin *et al.*, 2010; Alontaga *et al.*, 2012).

### 2.1.2 L'enzyme de conjugaison E2 : Ubc9

Ubc9 est recrutée par l'enzyme d'activation E1 (Desterro *et al.*, 1997 ; Johnson et Blobel, 1997) *via* son interaction avec le domaine SFD (*SUMO-Fold Domain*) de SAE2 (Lois et Lima, 2005) (Figure 23). 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 d'Ubc9 (C93) (Figure 25) (Olsen *et al.*, 2010). Ubc9 semble suffisante pour la reconnaissance du substrat et la modification des résidus cibles de lysine (Giraud *et al.*, 1998; Bernier-Villamor *et al.*, 2002). Néanmoins en tant que protéine intermédiaire dans le processus de SUMOylation, elle interagit aussi avec les différentes enzymes de ligation E3 situées en aval de la voie de SUMOylation. Cette interaction reste encore mal connue car peu de SUMO ligases E3 ont été caractérisées à ce jour.



**Figure 25 : La réaction de conjugaison.** La transthiolation conduit au transfert de SUMO du site actif de E1 au site catalytique de E2. Ubc9 forme un conjugué thioester avec SUMO.

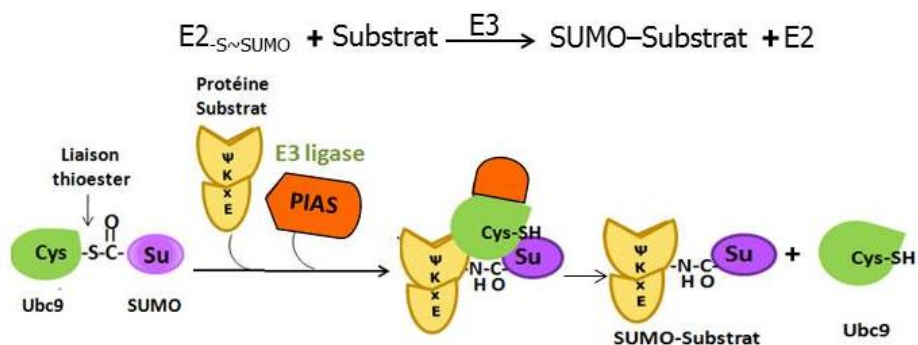
Ubc9 interagit avec les protéines SUMOs mais aussi avec des protéines contenant des SLDs (SUMO-Like Domains) comme NIP45 (*NFAT-Interacting Protein 45*), une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN qui contient deux SLDs. L'interaction d'Ubc9 avec le domaine SLD2 de Rad60 (*Radiation protein 60*), homologue de NIP45 chez la levure *S. pombe*, est essentielle à la fonction de Rad60 dans la réparation de l'ADN (Prudden *et al.*, 2011). A ce jour, les bases moléculaires permettant à Ubc9 de discriminer entre ces deux partenaires (SUMO et un domaine SLD) ne sont pas connues.

La régulation de la voie SUMO passe par une SUMOylation de la sous-unité SAE2 de l'enzyme d'activation mais aussi d'Ubc9. L'auto-SUMOylation de SAE2 n'altère pas le processus d'activation mais l'étape de transthiolation est inhibée (Truong *et al.*, 2012). L'auto-SUMOylation de Ubc9 cible la lysine K14 qui se situe au sein de l'hélice  $\alpha 1$  correspondant à la région d'interaction avec SAE1:SAE2. Cette SUMOylation n'altère pas l'interaction SAE1:SAE2:Ubc9 mais régule la capacité d'Ubc9 à modifier ses protéines cibles. Ainsi, l'auto-SUMOylation de ces enzymes conduit à une auto-inhibition de la

SUMOylation alors que la phosphorylation d'Ubc9 par la kinase CDK1 régule positivement le processus de transthiolation (Tomasi *et al.*, 2012), ainsi que l'activité de catalytique d'Ubc9 (Su *et al.*, 2012).

### 2.1.3 Les enzymes de ligation E3

Les enzymes de ligation E3 interviennent juste avant la modification du substrat par les protéines SUMOs. Elles recrutent le complexe Ubc9-SUMO, ainsi que le substrat, et facilitent le processus de modification de ce dernier (Figure 26) (Reverter et Lima, 2005; Tatham *et al.*, 2005 ; Reindle *et al.*, 2006; Merrill *et al.*, 2010; Yang et Sharrocks, 2010).



**Figure 26 : La réaction de ligation.** Transfert de SUMO du site actif d'Ubc9 à la protéine cible possédant le consensus ΨKxE grâce à l'intervention de la SUMO ligase PIAS.

A ce jour, très peu de SUMO ligases E3 ont été caractérisées chez l'humain. La plupart de ces ligases ne présentent que peu de spécificité pour leurs substrats. Elles présentent des localisations subcellulaires différentes. RanBP2 est associée, côté face cytoplasmique, au complexe du pore nucléaire, PIAS est dans le nucléoplasme et les corps nucléaires, Topors dans le nucléoplasme tandis que les Pc2 se trouvent dans des structures subnucléaires appelées complexes Polycomb. La localisation des E3 ligases contribue à la régulation spatiale spécifique de la SUMOylation de leurs substrats, et donc à la spécificité fonctionnelle *in vivo* de ces derniers.

Bien que structurellement différentes, toutes les SUMO ligases présentent plusieurs dénominateurs communs: elles recrutent Ubc9, elles favorisent la modification de substrats par SUMO, elles interagissent toutes avec SUMO de manière covalente et/ou non covalente, et possèdent au moins un SIM. 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.

#### a) Les E3 ligases à domaine RING

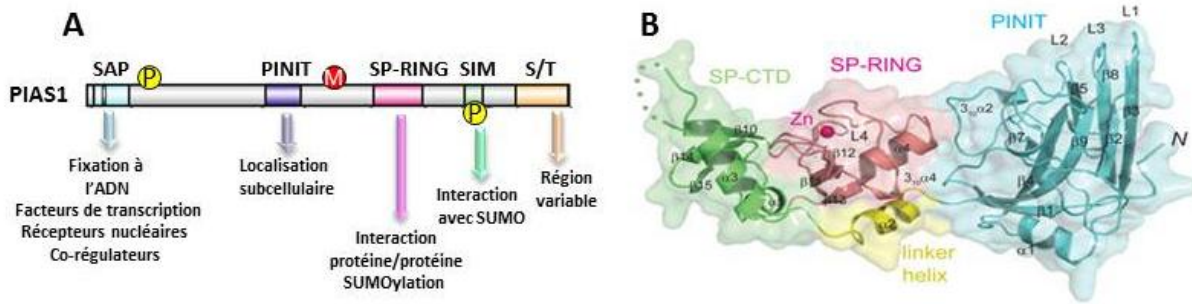
Les protéines PIAS (*Protein Inhibitor of Activated STAT*) constituent une famille de

protéines conservées chez tous les eucaryotes (Rytinki *et al.*, 2009). Les sept protéines qui constituent la famille des PIAS de mammifères sont encodées par quatre gènes : *PIAS1*, *PIAS2* (*PIASx*), *PIAS3*, et *PIAS4* (*PIASy*). À part *PIAS1*, les autres gènes vont encoder deux isoformes protéiques. Des homologues des protéines PIAS sont trouvés chez d'autres eucaryotes, comme Zimp/dPIAS chez la Drosophile, zfPIAS4a chez le poisson zébre et SIZ1 et SIZ2 chez la levure.

Elles ont été caractérisées initialement comme des co-régulateurs de facteurs de transcription de la famille des STATs (*Signal Transducer and Activated of Transcription*) et sont impliquées dans la régulation du processus immunitaire (Shuai et Liu, 2005). Elles interagissent avec de nombreux autres facteurs de transcription et peuvent, selon le facteur impliqué, avoir un rôle de co-activateur ou de co-répresseur.

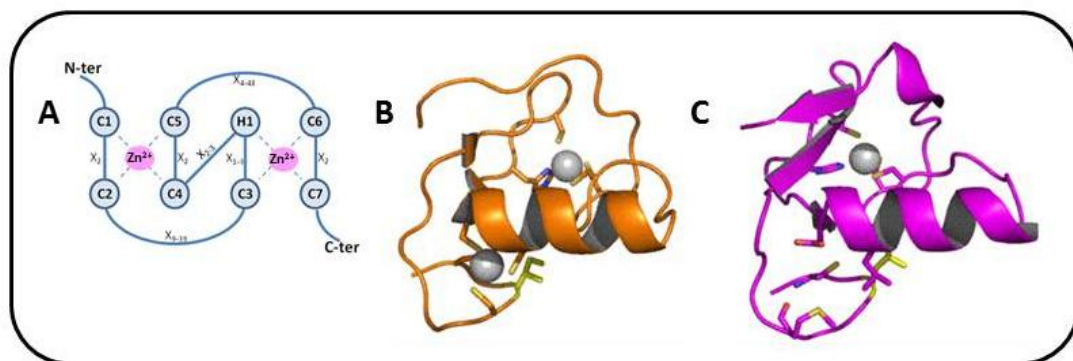
Les protéines PIAS sont des enzymes de ligation qui permettent l'augmentation de la SUMOylation des protéines. Cette famille d'enzymes agirait comme des protéines adaptatrices qui augmentent l'interaction entre l'enzyme de conjugaison Ubc9 et la protéine substrat (Sharrocks, 2006).

Tous les membres de la famille Siz/PIAS présentent une organisation similaire (Figure 27). Plusieurs domaines fonctionnels importants sont retrouvés chez toutes les E3 ligases Siz/PIAS : un domaine SAP (*Scaffold Attachment factor-A/B/acinus/PIAS*) suivi d'un domaine PINIT (*Proline Isoleucine asparagiNe Isoleucine Threonine*) et d'un domaine SP-RING (*Siz/Protein Inhibitor of Activated STAT-RING*). 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 (Aravind et Koonin, 2000). 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 nécessaire à l'interaction avec Ubc9 (Kotaja *et al.*, 2002; Okubo *et al.*, 2004; Reindle *et al.*, 2006; Yunus et Lima, 2009). Les protéines PIAS possèdent également un motif SIM bordé des résidus phosphorylables par la kinase CK2 (Figure 27). Cette phosphorylation renforce leur interaction avec les protéines SUMOs (Stehmeier et Muller, 2009). Tout comme les autres enzymes de la voie SUMO, la protéine PIAS est elle-même SUMOylée, mais l'impact de cette SUMOylation n'est pas connue (Kotaja *et al.*, 2002).



**Figure 27 : La SUMO ligase Siz/PIAS.** A) Représentation schématique de la protéine PIAS1. 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. Les fonctions, dans lesquels ces derniers sont impliqués sont indiquées en dessous. Les positions des modifications post-traductionnelles de PIAS1 sont représentées (P, phosphorylation ; M, méthylation). (d'après Rytinki *et al.*, 2009). B) Structure tridimensionnelle de Siz/PIAS. Les différents domaines qui composent l'enzyme sont colorés en vert pour le SP-CTD, en rose pour le domaine doigt de  $Zn^{2+}$  de SP-RING et en bleu pour PINIT. L'atome de  $Zn^{2+}$  est représenté par une sphère rose. Les résidus d'acides aminés présents dans une région non structurée du domaine SP-CTD sont en pointillés verts (Yunus et Lima, 2009).

La ligase Topors (*Topoisomerase I-binding arginine/serine-rich protein*) est à ce jour la seule ligase E3 possédant à la fois les activités de ligase E3 pour l'ubiquitine et pour SUMO. C'est une protéine nucléaire qui a pour cible de nombreuses protéines associées à la chromatine (Weger *et al.*, 2005 ; Pungaliya *et al.*, 2007).



**Figure 28 : Organisation structurale des domaines RING et SP-RING de ligases E3.** A) Organisation de la séquence primaire du domaine RING-HC. C1 correspond au premier résidu cystéine liant le zinc ( $Zn^{2+}$ ). 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 (adapté de Deshaies et Joazeiro, 2009). B-C) Modèles cristallographiques de la structure des domaines RING de CBL (B) et SP-RING de PIAS2 (C). Les résidus cystéine et histidine liant le zinc présents dans les domaines RING et SP-RING sont représentés. Un résidu hydrophobe conservé est représenté et coloré en jaune. Le zinc est représenté en gris. (PDBs respectifs: 1FBV, 4FO9 et 2OXQ).

### b) Les E3 ligases sans domaine RING

La SUMO ligase RanBP2 (*Ran Binding Protein 2*) est une protéine uniquement présente chez les vertébrés (Gorlich et Kutay, 1999) ; elle fonctionne en complexe avec RanGAP1 (*Ran GTPase-Activating Protein 1*). RanBP2-RanGAP1 font partie d'un complexe multi-protéique localisé sur la surface cytoplasmique des pores nucléaires et impliqués dans la

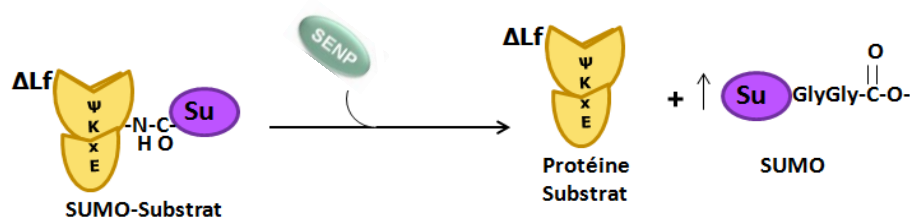
SUMOylation des protéines à destinée nucléaire, expliquant pourquoi la plupart des protéines connues pour être SUMOylées possèdent un NLS et sont retrouvées dans le noyau des cellules (Wilken *et al.*, 1995 ; Saitoh *et al.*, 1997). RanBP2 possède une région IR1-M-IR2 (*Internal Repeat1-Middle domain-Internal Repeat2*) présentant une activité de SUMO ligase (Pichler *et al.*, 2002). Chaque motif IR interagit à la fois avec Ubc9 et SUMO-1. L'activité ligase de RanBP2 requiert l'intervention de deux molécules d'Ubc9. Une molécule d'Ubc9 aurait un rôle catalytique tandis que l'autre molécule aurait un rôle structural indispensable à la fonction du complexe RanBP2-RanGAP1 (Reverter et Lima, 2005; Werner *et al.*, 2012).

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 en altérant la structure de la chromatine (Wotton et Merill, 2007). Comme RanBP2, Pc2 présente deux régions d'interaction avec Ubc9 et SUMO qui sont importantes pour sa fonction de ligase (Kagey *et al.*, 2003; Merrill *et al.*, 2010; Yang et Sharrocks, 2010). Si cette SUMO ligase ne semble pas être nécessaire pour la modification du corépresseur CtBP1 (*C-terminal-binding protein 1*) *in vitro*, son expression augmente fortement la SUMOylation de ce dernier *in vivo* (Zhao, 2007). La SUMOylation de CtBP1 est malgré tout dépendante de Pc2 et ces deux protéines sont retrouvées co-localisées dans des structures subnucléaires appelées PcG (*Polycomb group body*) avec Ubc9 (Zhao, 2007).

## 2.2 Les enzymes impliquées dans la dé-SUMOylation des protéines

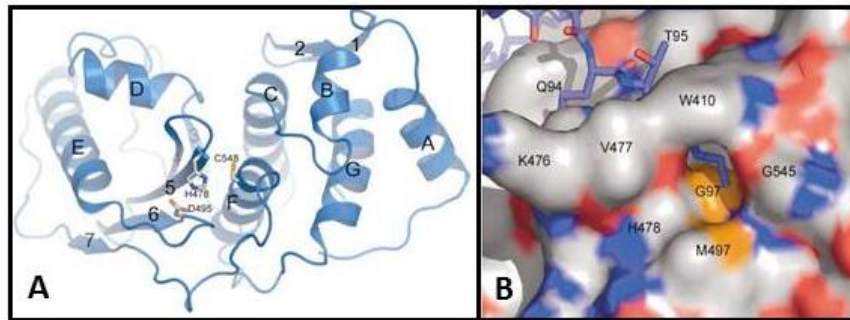
La SUMOylation est un processus réversible (Figure 29). Ce sont les protéines de la famille des SENPs (*SENP* *specific Proteases*) qui participent à la déconjugaison des protéines SUMO de leur substrat (Mukhopadhyay et Dasso, 2007) (Figures 29 et 30).

Alors que certains des membres de la famille SENP (SENP-1 et -2) déconjuguent aussi bien SUMO-1 que SUMO-2/3 de leur substrats, d'autres (SENP-3 et -5) déconjuguent préférentiellement les protéines modifiées par SUMO-2/3 (Reverter et Lima, 2004; Xu et Au, 2005; Gong et Yeh, 2006).



**Figure 29 : La réaction de dé-SUMOylation.** Les SENPs protéases clivent les liaisons isopeptidiques libérant les protéines SUMO de leurs substrats. Elles assurent le maintien d'un pool de protéines SUMO matures et actives qui seront ré-utilisées par la machinerie de ligation (Johnson, 2004; Kerscher *et al.*, 2006; Gareau et Lima, 2010; Alontaga *et al.*, 2012).

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 et donc d'activation des protéines SUMOs (voir ci-dessus) et d'autre part, certaines SENPs pourraient servir dans l'édition des chaînes de poly-SUMO2/3 (Mukhopadhyay *et al.*, 2006).



**Figure 30 : Structure de SENP-2.** A) Représentation en ruban de la structure secondaire du domaine catalytique du SENP-2. Les brins sont numérotés et les hélices- $\alpha$  désignées par des lettres. Le site de clivage englobe les résidus de la triade catalytique His 478, Asp 495, Cys 548 (Li et Hochstrassern, 1999). B) Représentation de la surface d'interaction entre SENP-2 et SUMO-1. SUMO-1 est représentée comme une fine ligne bleue. Le site actif est orienté pour visualiser le site de coupure de SUMO-1 (Reverter et Lima, 2004).

Différents groupes ont caractérisé, chez les levures comme chez l'humain, une classe de protéines impliquée dans la dégradation spécifique des protéines poly-SUMOylées (Perry *et al.*, 2008). Ces protéines appartiennent à la famille des ubiquitine-ligases E3 à domaine RING et ont été nommées STUbLs (*SUMO Targeted Ubiquitin Ligases*) (Tatham *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2010).

### III. Le rôle de la SUMOylation

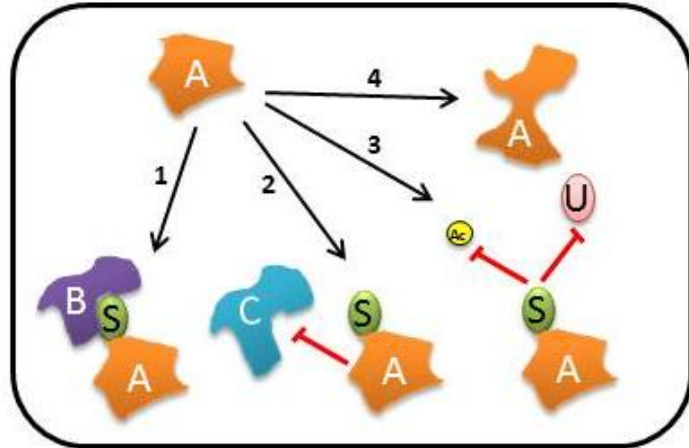
Depuis la découverte en 1996 de RanGAP, la première protéine modifiée par une protéine SUMO, le nombre de protéines SUMOylées n'a cessé d'augmenter. Les protéines cibles de la voie de la SUMOylation sont majoritairement des protéines nucléaires qui jouent des rôles importants dans la régulation de la transcription, le maintien de l'intégrité du génome, le trafic nucléaire. Cependant, la SUMOylation cible aussi des protéines cytoplasmiques et régule des mécanismes cellulaires comme la progression du cycle cellulaire et la réponse au stress cellulaire. Toutes ces fonctions semblent reposer sur les protéines cibles qui une fois modifiées, vont présenter de nouvelles surfaces d'interaction à leur environnement. Les protéines SUMOylées pourront ainsi recruter de nouveaux partenaires qui orienteront leur localisation et/ou leur fonction. Ainsi, ce sont des mécanismes moléculaires

simples induits par la SUMOylation des protéines qui auront des conséquences fonctionnelles parfois très complexes.

### 3.1 Conséquences moléculaires de la SUMOylation

La SUMOylation d'une protéine va soit faciliter soit prévenir ses interactions protéine-protéine, induire son changement de conformation et/ou influencer sa demi-vie (Figure 31).

**Figure 31 : Conséquences moléculaires des interactions de SUMO avec ses substrats.** La modification de la protéine A par SUMO (S) peut : 1) induire l'interaction avec B, 2) inhiber l'interaction avec C, 3) entrer en compétition avec d'autres MPTs comme l'ubiquitine (U) ou bien le groupement acétyl (Ac), 4) induire un changement de conformation.



SUMO peut favoriser et stabiliser des interactions protéiques. Ainsi, la SUMOylation de RanGAP induit son interaction avec RanBP2, essentielle à l'activité de la SUMO ligase (Reverter et Lima, 2005; Werner *et al.*, 2012), celle de la protéine PML (*Promyelocytic Leukemia Protein*) permet le recrutement de nombreuses protéines au sein des corps nucléaires (Tatham *et al.*, 2008) et celle de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) le recrutement de l'hélicase Srs2 (Armstrong *et al.*, 2012). A l'inverse, la SUMOylation peut empêcher sa cible d'interagir avec une autre molécule. Par exemple, la SUMOylation de l'enzyme de conjugaison pour l'ubiquitine UBE2K, empêche son interaction avec l'enzyme d'activation UBA1 et inhibe ainsi le transfert de l'ubiquitine sur UBE2K (Pichler *et al.*, 2005), tandis que celle de HSF2 (*Heat Shock Factor2*) inhibe son interaction avec l'ADN (Anckar *et al.*, 2006). L'inhibition de la fixation à l'ADN de la protéine TDG (*Thymine DNA Glycosylase*) serait due un changement de conformation de l'enzyme suite à sa SUMOylation (Baba *et al.*, 2005; Steinacher et Schar, 2005). La SUMOylation peut aussi agir en empêchant l'accès d'une lysine « régulatrice » à d'autres MPTs telles que l'ubiquitination ou l'acétylation. Ce dernier point sera discuté en détail ultérieurement dans le chapitre abordant le dialogue entre différentes MPTs.



### 3.2 Les processus biologiques nucléaires régulés par la SUMOylation

Le nombre des publications concernant le rôle de la SUMOylation est sans cesse en expansion, il serait illusoire d'espérer pouvoir les répertorier tous. Ce chapitre ne peut que traiter quelques exemples parmi les plus étudiés afin de démontrer l'importance de cette modification post-traductionnelle dans la régulation de tous les processus nucléaires. En effet, la majorité des cibles de SUMO sont des facteurs de transcription, des co-régulateurs, des protéines impliquées dans la régulation de la chromatine et l'intégrité du génome, mais aussi dans le ciblage sub-cellulaire (pour revues Bekker-Jensen et Mailand, 2011; Nagai *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2012; Raman *et al.*, 2013; Ulrich, 2014; Pinder *et al.*, 2013; Cubeñas-Potts et Matunis, 2013).

#### 3.2.1 Régulation de l'expression génique

L'expression génique est régulée par la balance méthylation/déméthylation. On sait maintenant que la SUMOylation peut contrôler finement l'état de méthylation de l'ADN, et donc de l'expression génique. Ainsi, les ADN méthyltransférases DNMT1 et DNMT3a, b (*DNA MTase*) sont SUMOylées *in vivo* ce qui conduit au « silencing » des gènes (Kang *et al.*, 2001; Ling *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007). La déméthylation de l'ADN est également contrôlée par SUMOylation, mais de manière indirecte. En effet le mécanisme est complexe car il implique l'action d'une ubiquitine ligase RNF4 qui ubiquitine spécifiquement les protéines SUMOylées (Perry *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2010). La déméthylation peut conduire à la désamination des résidus de méthylcytosine et à la création d'un mésappariement T:G qui va déclencher la machinerie de réparation impliquant la thymidine glycosylase (TDG, *Thymidine DNA Glycosylase*) qui est un interactant de RNF4 (Wu et Zhang, 2010 ; Hu *et al.*, 2010 ). La SUMOylation et l'ubiquitination concomittante de TDG augmente le turnover de cette dernière et serait un des signaux nécessaires à la déméthylation et la réparation de l'ADN (Hardeland *et al.*, 2002 ; Baba *et al.*, 2005; Smet-Nocca *et al.*, 2011).

La SUMOylation peut également affecter l'assemblage des protéines qui se fixent aux régions CpG méthylées (MBD, *Methyl-CpG Binding Domain*) (Bogdanovic et Veenstra, 2009), notamment les protéines MBD1 et HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) qui sont toutes deux SUMOylées, et MCAF1 (*MBD1-containing chromatin-associated factor 1*) qui reconnaît ces protéines SUMOylées (Uchimura *et al.*, 2006). L'invalidation de SUMO-1 ou de SUMO-2/3 rompt les interactions entre ces protéines et déréprime le « silencing » de gènes. Par ailleurs, la SUMOylation de MBD1 inhibe son interaction avec l'histone méthyltransférase SETDB1, modulant ainsi la transcription (Lyst *et al.*, 2006).

L'expression des gènes est aussi régulée par l'acétylation des histones, contrôlée par la balance histone acétyl transférases (HATs)/histone désacétylases (HDACs). Or, les histones qui sont le siège de très nombreuses MPTs (« code des histones ») sont également modifiées par la SUMOylation. Celle-ci pourrait servir à recruter des protéines partenaires des complexes de co-répression de la transcription. De plus, les HDACs sont elles-mêmes SUMOylées. Il a été montré que la SUMOylation des HDAC1 et HDAC4 est nécessaire à une répression transcriptionnelle efficace de certains promoteurs (David *et al.*, 2002; Kirsh *et al.*, 2002 ; Cheng *et al.*, 2004).

### ***3.2.2 Régulation de la transcription par les facteurs de transcription***

Dans la plupart des cas, l'activité des régulateurs transcriptionnels est inhibée par SUMOylation, soit parce que cela entraîne le recrutement de facteurs qui répriment la transcription, soit parce que la SUMOylation altère l'interaction de ce régulateur à l'ADN. Néanmoins dans certains cas, la SUMOylation peut activer la transcription.

#### *a) Répression transcriptionnelle*

La SUMOylation est le plus souvent associée à la répression de la transcription. L'inactivation des lysines cibles de la SUMOylation de nombreux facteurs de transcription conduit à une augmentation de leur activité transcriptionnelle comme dans le cas de Elk1, Sp3 (*Specificity Factor 3*), c-Jun et de nombreux récepteurs nucléaires tels que AR (*Androgen Receptor*), GR (*Glucocorticoid Receptor*) et PR (*Progesterone Receptor*) (Yang *et al.*, 2003a ; Sapetschnig *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2000; Poukka *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 2002; Abdel-Hafiz *et al.*, 2002 ; Valin et Gill, 2007; van der Steen et al.,2013; Abdel-Hafiz et Horwitz,2014).

La SUMOylation des facteurs de transcription conduit au recrutement de protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine et présentes dans leur environnement immédiat, telles que les désacétylases HDACs et/ou les méthyltransférases des histones, comme décrit pour Elk1 (Yang et Sharrocks, 2004) ou CoREST1 (*Corepressor of RE1 Silencing Transcription factor*) (Colombo *et al.*, 2002) (Figure 32B). Dans le cas du facteur de transcription Sp3, le recrutement au niveau des promoteurs de l'hélicase CHD3 (*CHromo Domain helicase 3*), qui fait partie du complexe de remodelage de la chromatine NuRD (*Nucleosome Remodeling and Deacetylase*), et des protéines HP1, nécessite que Sp3 soit SUMOylé (Stielow *et al.*, 2008).

La répression transcriptionnelle par SUMOylation peut aussi être due à une impossibilité pour un facteur de transcription de se fixer à l'ADN. C'est le cas de STAT1 qui possède un consensus de SUMOylation modifiable dans son DBD. La mutation de la lysine de ce consensus ou l'ajout de la protéase SENP1 conduit à une augmentation de son activité (Gronholm *et al.*, 2012). Dans le cas des HSFs (*Heat Shock Factors*), facteurs de transcription impliqués dans la réponse aux stress environnementaux, la SUMOylation conduit à des effets inverses selon le facteur impliqué. En effet, si la SUMOylation de HSF2 altère son interaction avec l'ADN (Anckar *et al.*, 2006; Tateishi *et al.*, 2009), la SUMOylation de HSF1 augmente sa capacité à lier l'ADN et à induire l'expression de ses gènes cibles (Hong *et al.*, 2001).

Le nucléole n'échappe pas à la SUMOylation et les peptides SUMO-1, -2/3 ainsi que les SENP-3 et -5, Ubc9 et des SUMO ligases y sont retrouvés (Ayaydin et Dasso, 2004; Takahashi *et al.*, 2008 ; Gong et Yeh, 2006). La SUMOylation joue un rôle important chez les vertébrés et la levure en contrôlant négativement la transcription des ARNr et l'assemblage des particules ribosomales ainsi que la stabilité des loci d'ADNr nucléolaires (Panse *et al.*, 2006; Torres-Rosell *et al.*, 2007 ;Yun *et al.*, 2008; Altmannova *et al.*, 2010; Finkbeiner *et al.*, 2011 ; Castle *et al.*, 2012).

#### *b) Activation transcriptionnelle*

Les exemples sont beaucoup plus rares mais la SUMOylation peut néanmoins activer la transcription, soit directement en augmentant l'activité d'un facteur de transcription, soit indirectement en inhibant l'action d'un répresseur transcriptionnel. Par exemple, la SUMOylation de p53 par SUMO-1 sur le résidu K386 augmente son activité transcriptionnelle (Gostissa *et al.*, 1999), alors que la SUMOylation de l'ADN méthyltransférase Dnmt3a altère son interaction avec les HDAC, ce qui, par conséquent, favorise la transcription (Ling *et al.*, 2004).

L'analyse de la SUMOylation des acteurs de la voie de signalisation Wnt (*Wingless type*) qui participe au contrôle du développement de nombreux organismes, a mis en évidence que le facteur Tcf-4 (*T cell Factor 4*) est SUMOylé par la SUMO ligase PIASy (Yamamoto *et al.*, 2003). PIASy n'empêche pas l'interaction de Tcf-4 avec la bêta-caténine ou l'ADN, mais sa présence au sein du complexe conduit à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de Tcf-4 dépendante de la bêta-caténine. Les auteurs ont donc conclu que la SUMOylation de Tcf-4 favorise la transcription des gènes dépendante du complexe bêta-caténine/Tcf-4 dans la voie Wnt.

Le facteur de transcription Ikaros, crucial pour la différenciation et l'homéostasie des

lymphocytes, est un répresseur transcriptionnel qui possède deux sites majeurs de SUMOylation. La répression de la transcription dépendante de Ikaros est augmentée lorsque ses deux sites de SUMOylation sont mutés. En effet, la SUMOylation de Ikaros altère son interaction avec plusieurs co-répresseurs (Gomez-del Arco *et al.*, 2005).

### 3.2.3 *Maintien de l'intégrité du génome*

#### *a) Organisation de la chromatine*

La SUMOylation joue un rôle très important dans la modification de protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. Des expériences d'immunofluorescence et d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré que toutes les protéines de la machinerie de SUMOylation sont retrouvées associées à l'hétérochromatine, aux corps Polycomb (PcG) (Kagey *et al.*, 2003, 2005; Kang *et al.*, 2010), au nucléole, aux télomères (Ferreira *et al.*, 2011; Hang *et al.*, 2011) et aux centromères (Dasso, 2008). Ces observations sont corroborées par des études récentes du SUMO-protéome qui ont permis d'identifier de nombreux sites de SUMOylation sur des protéines organisatrices de la chromatine, comme sur les protéines MEAF6 (*Chromatin modification-related protein*) ou ACIN1 (*Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus*) (Impens *et al.*, 2014 ; Tammsalu *et al.*, 2014). D'un point de vue fonctionnel, la SUMOylation de la protéine MBD1 par SUMO-2/3 ou SUMO-1 facilite son interaction avec la protéine MCAF1 et favorise l'assemblage des complexes protéiques nécessaires à la formation de l'hétérochromatine (Uchimura *et al.*, 2006).

L'élongation des télomères est également régulée négativement par SUMOylation. Dans la levure, la télomérase de mutants pour la SUMOylation n'est plus capable de se fixer correctement aux télomères, conduisant à une altération de leur élongation (Xhemalce *et al.*, 2007). Le défaut de SUMOylation n'affecte pas directement la télomérase mais cible Cdc13, une protéine qui se fixe à un seul brin des télomères. Cdc13 non SUMOylée conduit à des télomères de grande taille. A l'inverse, lorsqu'elle est SUMOylée, Cdc13 interagit avec Stn1, un inhibiteur de la télomérase, ce qui conduit à des télomères beaucoup plus courts (Hang *et al.*, 2011). De plus, les « shelterines » qui s'assemblent en complexe aux extrémités des chromosomes afin de les protéger de l'érosion, sont SUMOylées (Potts et Yu, 2007 ; Pebernard *et al.*, 2008 ; Lu *et al.*, 2010 ; Ferreira *et al.*, 2011; Hang *et al.*, 2011).

L'étude de la répartition des protéines SUMOs sur l'ensemble du génome révèle une large distribution de ces dernières tout particulièrement au niveau des promoteurs actifs. La SUMOylation est plus spécifiquement concentrée au niveau des promoteurs d'histones, des gènes codant les ARN polymérase I et III et des protéines impliquées dans la biogénèse des

ribosomes (Neyret-Kahn *et al.*, 2013). La transcription de ces différents gènes est augmentée lorsque la SUMOylation est inhibée, confirmant la nature répressive de cette modification. Ces données suggèrent que les protéines SUMOs sont des acteurs à part entière de la régulation transcriptionnelle et de la dynamique de la chromatine.

#### *b) Réparation de l'ADN*

Récemment, la machinerie de SUMOylation a été associée au mécanisme de réparation de l'ADN dans les cellules humaines. En effet, les ligases de la famille PIAS sont recrutées à l'ADN suite à des cassures double brin induites par les rayons UV ou par des agents chimiques. Il s'avère que le recrutement des protéines PIAS dans la zone de dommage à l'ADN est essentiel à l'initiation du processus de réparation (Galanty *et al.*, 2009 ; Morris *et al.*, 2009; Danielsen *et al.*, 2012; Bologna et Ferrari, 2013; Jackson et Durocher, 2013). De manière analogue chez *S. cerevisiae*, la SUMOylation de certaines des protéines impliquées dans le mécanisme de réparation de l'ADN est nécessaire à la mise en place du processus (Psakhye et Jentsch, 2012).

### **3.3 Ciblage sub-cellulaire des protéines par la SUMOylation**

La SUMOylation conditionne des changements de distribution cellulaire des protéines et affecte tout particulièrement le trafic noyau-cytoplasme et le trafic sub-nucléaire : nucléole-nucléoplasme et corps nucléaires-nucléoplasme. Cependant, bien que majoritairement retrouvée sur les protéines nucléaires, la SUMOylation n'est pas limitée à ce seul compartiment mais est également trouvée sur des protéines cytoplasmiques (Geiss-Friedlander et Melchior, 2007; Impens *et al.*, 2014; Tammsalu *et al.*, 2014).

#### **3.3.1 Le transport nucléo-cytoplasmique**

La découverte de la SUMOylation de RanGAP1 qui fait partie d'un complexe protéique cytosolique accroché aux pores nucléaires a conduit à étudier l'impact de la SUMOylation sur le 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 (Mahajan *et al.*, 1997 ; Matunis *et al.*, 1998). Le complexe RanGAP1-RanBP2 pourrait exercer son activité SUMO ligase à l'entrée du pore nucléaire et SUMOyler les protéines au moment de leur transfert du cytoplasme vers le noyau. Souvent, la présence d'une séquence NLS (*Nuclear Localization Signal*) fonctionnelle est un pré-requis à la SUMOylation, comme c'est le cas pour la protéine Sp100 (Sternsdorf *et al.*, 1999).

Kap114 est un transporteur de la famille des importines  $\beta$  qui prend en charge des substrats tels que TBP1 (*TATA Binding Protein*), les histones H2A et H2B et un facteur d'assemblage du nucléosome Nap1. Sa SUMOylation est nécessaire à sa fonction d'importine. En effet, la mutation de la lysine cible de Kap114 conduit à l'accumulation dans le noyau de la protéine et de ses cargos (Rothenbusch *et al.*, 2012).

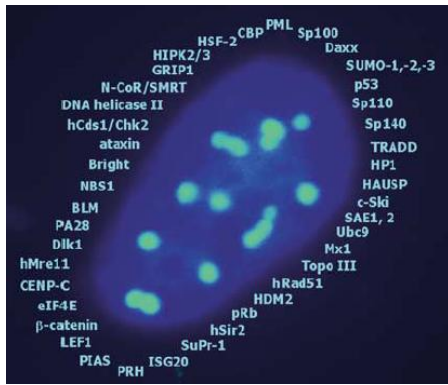
Le co-régulateur de récepteurs nucléaires SRC1 (*Steroid Receptor Coactivator 1*) est majoritairement présent dans le noyau. Sa délocalisation vers le cytoplasme est accompagnée de sa dé-SUMOylation (Chauchereau *et al.*, 2003). De même, CtBP1 (*C-terminal Binding Protein 1*), un co-répresseur de plusieurs gènes impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire, est localisé uniquement au noyau, alors que son mutant de SUMOylation se distribue entre le noyau et le cytoplasme (Lin *et al.*, 2003). L'ensemble de ces données indique que la SUMOylation est associée au trafic nucléo-cytoplasmique.

### **3.3.2 Le transport nucléole-nucléoplasme**

Certaines protéines font la navette entre différents compartiments nucléaires et ce transport est régulé par leur SUMOylation. Ainsi, la topoisomérase-1, une enzyme responsable du déroulement de la double hélice d'ADN fait la navette entre le nucléoplasme et le nucléole. La SUMOylation de la topoisomérase-I est associée à sa localisation dans le nucléoplasme puisque son mutant de SUMOylation est retrouvé piégé dans le nucléole. La modification par SUMO de la topoisomérase-1 altérerait son interaction avec la nucléoline (Rallabhandi *et al.*, 2002).

### **3.3.3 Le transport corps nucléaires-nucléoplasme**

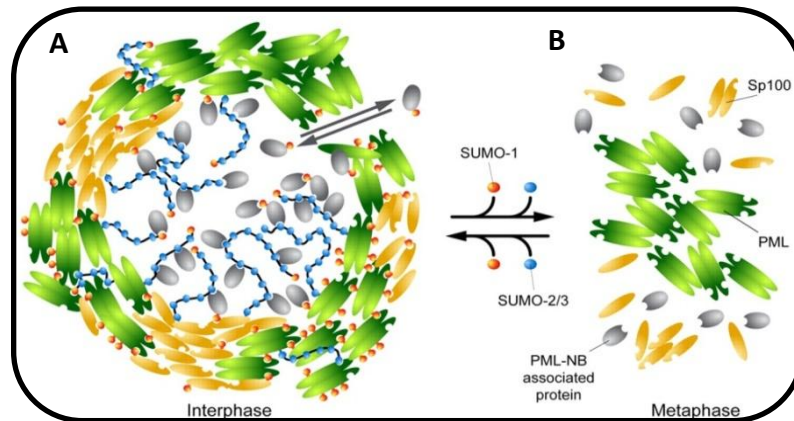
Le noyau des cellules eucaryotes présente de nombreux territoires ou domaines, parmi lesquels on retrouve les corps nucléaires de PML appelés PML-NBs (*ProMyelocytic Leukemia-Nuclear Bodies*) (Cremer et Cremer, 2001; Dellaire et Bazett-Jones, 2004; Handwerger et Gall, 2006) (Figure 32). Les noyaux des cellules de mammifères contiennent de 10 à 30 PML-NBs (Dellaire et Bazett-Jones, 2004). Ces corps nucléaires sont des structures concentriques de 0,2 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre impliquées dans un grand nombre de processus biologiques tels que la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN, le contrôle de la croissance cellulaire, l'apoptose, la sénescence, la dégradation protéique et la réponse antivirale (Maul, 1998; Zhong *et al.*, 2000a; Salomoni et Pandolfi, 2002; Bernardi et Pandolfi, 2003; Dellaire et Bazett-Jones, 2004; Zimber *et al.*, 2004; Ching *et al.*, 2005; Rabellino et Scaglioni, 2013; Sahin *et al.*, 2014a).



**Figure 32 : Représentation d'un PML-NB avec les protéines associées identifiées** (tirée de Hofmann et Will, 2003).

Les PML-NBs sont des réservoirs de stockage permettant la mise à disposition rapide de protéines en réponse à différents stimuli cellulaires. Plus de 80 protéines différentes ont été caractérisées dans ces structures nucléaires, dont divers acteurs de la machinerie d'ubiquitination et de SUMOylation (Sachdev *et al.*, 2001; Chosed *et al.*, 2006; Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2008; Lang *et al.*, 2010) (Figure 32). La protéine suppresseur de tumeur PML et Sp100 semblent être les deux seules protéines résidentes des PML-NBs (Hofmann et Will, 2003), PML étant essentielle à leur organisation structurale (Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2012).

Les PML-NBs regroupent un ensemble de protéines dont le recrutement est régulé par SUMOylation. La disponibilité de ces protéines ainsi que le dynamisme des PML-NBs sont contrôlés par un mécanisme de SUMO/dé-SUMOylation (Figure 33).



**Figure 33 : Modèle de structure des PML-NBs.** A) A l'interphase, les protéines PMLs s'associent entre elles *via* leurs domaines RBCC (*RING, B boxes, Coiled-Coil*) et peuvent être modifiées de façon covalente par SUMOs. Les PML-NBs sont définies par une « coquille » sphérique stabilisée par des interactions non-covalentes SUMO-SIM entre les protéines PML et Sp100. Les protéines associées aux PML-NBs peuvent gagner l'intérieur des corps nucléaires à PML mais leur diffusion est réduite. Les chaînes poly-SUMO-2/3 sont tournées vers l'intérieur des PML-NBs et fournissent des points d'ancrage aux protéines possédant des domaines SIMs. B) Les PML-NBs subissent des phénomènes de fission et de fusion suivant la progression du cycle cellulaire. Lors de la mitose, les protéines PML restent agrégées mais deviennent dé-SUMOylées conduisant ainsi à la libération de leurs partenaires protéiques et au désassemblage des PML-NBs. (d'après Lang *et al.*, 2010).

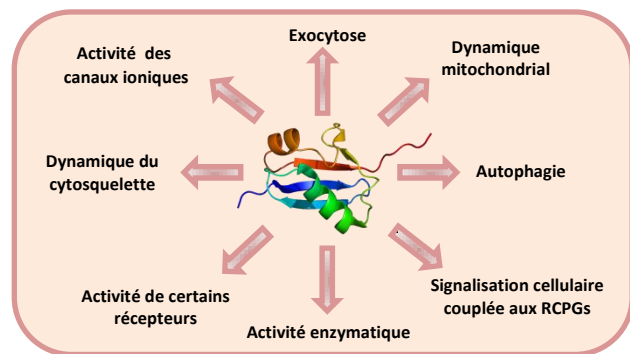
L'hélicase BLM (*BLoom syndrom protein*) a besoin d'être SUMOylée pour être recrutée (Eladad *et al.*, 2005) alors que la kinase HIPK2 (*Homeodomain Interacting Protein Kinase 2*) et la protéine SIZN1 (*Smad-Interacting Zinc finger protein 1*) qui possèdent chacune une séquence SIM sont recrutées par PML SUMOylée (Cho *et al.*, 2009 ;Sung *et al.*, 2011). PML est modifiée par les trois paralogues de SUMO (Zhong *et al.*, 2000b ;Muller *et al.*, 2001) mais la modification par SUMO-3 sur la Lys 160 est essentielle à la formation des PML-NBs et ne peut être compensée ni par SUMO-1 ni par SUMO-2.

### 3.4 Les processus biologiques cytoplasmiques régulés par la SUMOylation

#### 3.4.1 Protéines cytoplasmiques SUMOylées

Il y a de plus en plus de protéines décrites pour être modifiées par SUMOylation dans le cytoplasme (Figures 34 et 35). La SUMOylation régule positivement ou négativement certaines de leurs fonctions.

**Figure 34 : Implication de la SUMOylation dans différents processus cellulaires** (d'après Wasik et Filipek, 2014). Les fonctions nucléaires ne sont pas représentées sur le schéma.



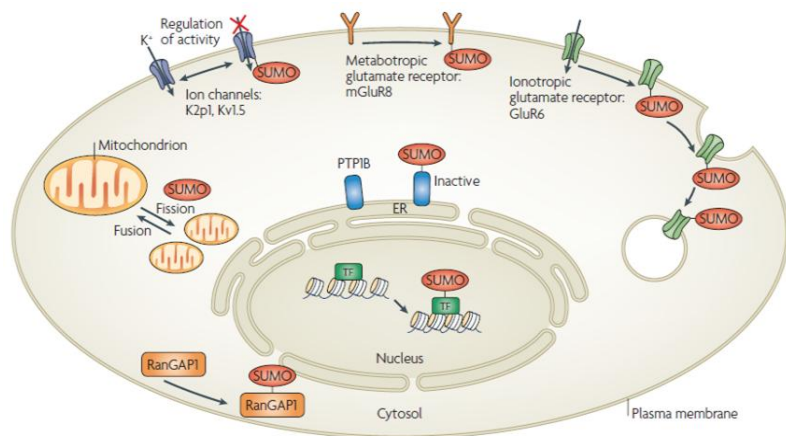
De nombreux canaux ioniques et notamment des canaux potassiques sont connus pour être SUMOylés. Le canal K2P qui contrôle l'excitabilité neuronale interagit à la membrane avec Ubc9. Sa SUMOylation sur la Lys 274 inhibe son activité (Rajan *et al.*, 2005; Plant *et al.*, 2005; Plant *et al.*, 2012). Le canal potassique voltage dépendant Kv est également SUMOylé sur certaines de ces sous-unités. Sa désSUMOylation par SENP2 conduit à une hyperpolarisation de la membrane (Benson *et al.*, 2007). Beaucoup de récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G trimériques (RCPGs) comme les récepteurs canaux au glutamate sont également modifiés (Geiss-Friedlander et Melchior, 2007). La SUMOylation du récepteur au TGFβ conduit au recrutement des protéines Smad2 et Smad3 et à l'activation de la transcription dépendante de TGFβ (Engel *et al.*, 1998; Derynck et Zhang, 2003).

Des enzymes et notamment des kinases et des phosphatases ont leur activité enzymatique modulée par SUMOylation. Ainsi, la phosphatase réticulaire PTP1B (*Protein*



*Tyrosin Phosphatase-1B*) qui se fixe aux récepteurs tyrosine kinase (RTK), dont le récepteur à l'insuline, voit son action sur le récepteur à l'insuline et la transduction du signal qui s'en suit inhibées par sa SUMOylation (Dadke *et al.*, 2007). Par ailleurs, la protéine kinase FAK (*Focal Adhesion Kinase*) qui conditionne l'adhésion cellulaire est activée par autophosphorylation et induit le recrutement de la Src kinase suite à sa SUMOylation (Kadaré *et al.*, 2003). Récemment, plusieurs protéines du cytosquelette, dont l'actine, des cytokératines et la tubuline, ont été identifiées comme étant SUMOylées (Impens *et al.*, 2014). De manière intéressante, des molécules régulant la dynamique du cytosquelette sont également touchées, comme la petite protéine G Rac1 dont la SUMOylation stimule la migration cellulaire et la formation des lamellipodes (Castillo-Lluva *et al.*, 2010).

**Figure 35. Localisation des protéines SUMOylées dans la cellule** (Geiss-Friedlander et Melchior, 2007).



L'ubiquitine ligase MAPL est un acteur de la dynamique mitochondriale et de la mitophagie, et qui, selon les conditions cellulaires, peut fonctionner comme une SUMO ligase. L'équilibre entre la fusion et la fission mitochondriale dépend de la dégradation protéasomale des facteurs MFN1 et DRP1. La SUMOylation de DRP1, dépendante de la protéine pro-apoptotique Bax, la stabilise et conduit à la fragmentation mitochondriale (Braschi *et al.*, 2009). MAPL est aussi retrouvée dans des vésicules à destinée peroxisomale et pourrait aussi participer à la biogénèse de ces organites (Neuspiel *et al.*, 2008; Braschi *et al.*, 2010).

Récemment les études réalisées sur le transfert extra-cellulaire par les exosomes de matériel cellulaire comme les ARNm et les mini ARNs montrent que la protéine hnRNPA2B1 (*Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein*) qui prend en charge les miARNs et les livre aux exosomes ne peut plus effectuer correctement sa fonction lorsqu'elle est déSUMOylée (Villarroya-Beltri *et al.*, 2013).

### 3.4.2 Régulation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un ensemble de mécanismes moléculaires séquentiels et orchestrés qui débutent dans le cytoplasme et se transmettent jusqu'au noyau, pour aboutir *in fine* à la ségrégation des chromosomes dupliqués et à la formation de deux cellules-filles génétiquement identiques. Les événements initiateurs de ce processus biologique étant cytoplasmiques, la régulation du cycle cellulaire par la SUMOylation sera traitée dans ce paragraphe.

La progression du cycle cellulaire est largement contrôlée par des MPTs, dont la SUMOylation ( Hay, 2005; Gareau *et* Lima, 2010; Flotho *et* Melchior 2013; Schimmel *et al.*, 2014). Une dérégulation de la voie SUMO peut entraîner des dommages sévères à la cellule et perturber la phase G2/M du cycle cellulaire (Seufert *et al.*,1995; Li *et* Hochstrasser, 1999; Nacerddine *et al.*, 2005; Schwartz *et al.*, 2007). De nombreuses protéines SUMOylées et impliquées dans la régulation de la progression du cycle cellulaire ont été caractérisées. Il s'agit de la protéine PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) (Armstrong *et al.*, 2012), de l'ADN topoisomerase-II $\alpha$  (Dawlaty *et al.*, 2008), de la CENP-E (*CEN*tromere-associated *Protein*) (Zhang *et al.*, 2008b), de la CENP-1 (Mukhopadhyay *et al.*, 2010) et de la protéine Borealin qui est un composant du complexe CPC (*Chromosomal Passenger Complex*), régulateur clé de la mitose (Klein *et al.*, 2009). Malgré ces découvertes, le rôle de la SUMOylation sur ces protéines cibles est encore largement méconnu, et il y a peu de données reliant directement la SUMOylation à la progression du cycle cellulaire.

Pourtant, l'étude récente du SUMO-protéome de cellules arrêtées à différentes phases du cycle cellulaire a permis de mettre en évidence un rôle pour la SUMOylation de la protéine FoxM1 (*Forkhead box transcription factor M1*), régulateur clé de la progression du cycle cellulaire et de la ségrégation des chromosomes. Ainsi, Schimmel *et al.* (2014) ont montré qu'un défaut de SUMOylation de FoxM1 pendant la phase G2/M conduit à une inhibition de son activité transcriptionnelle et, par voie de conséquence, à une augmentation de la polyplôïdie des cellules dans lesquelles la SUMOylation de FoxM1 est déficiente. Par ailleurs, il semble que la modification de protéines par SUMO-2/3 régule la progression de la mitose mais peu de cibles, dont l'inhibiteur de la petite protéine G Rho RhoGDI $\alpha$ , ont été identifiées pour l'instant ( Murali *et* Rajalingam 2013 ; Schimmel *et al.*, 2014).

Récemment la kinase AKT, impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la migration et la survie cellulaire, le métabolisme et la tumorigénèse et modifiée par de très nombreuses MPTs, a été retrouvée sous une forme SUMOylée. La SUMOylation de AKT conduit à son activation et à une augmentation de la

prolifération cellulaire faisant de la voie SUMO un nouvel acteur de la régulation de l'activité d'AKT (Li *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2014 ; de la Cruz-Herrera *et al.*, 2014).

Une étude très récente a mis en évidence la SUMOylation d'une kinase spécifique de la phase G1 du cycle cellulaire, CDK6, dans des cellules de glioblastomes (Bellail *et al.*, 2014) . Les auteurs ont montré dans des lignées cellulaires humaines de glioblastome que la SUMOylation de CDK6 par SUMO-1 stabilise la kinase dès la mitose et est requise pour la transition G1/S. De plus, ils ont montré qu'Ubc9 est activée par phosphorylation par la kinase mitotique CDK1, ce qui permet alors l'interaction d'Ubc9 avec CDK6 et la SUMOylation de cette dernière.

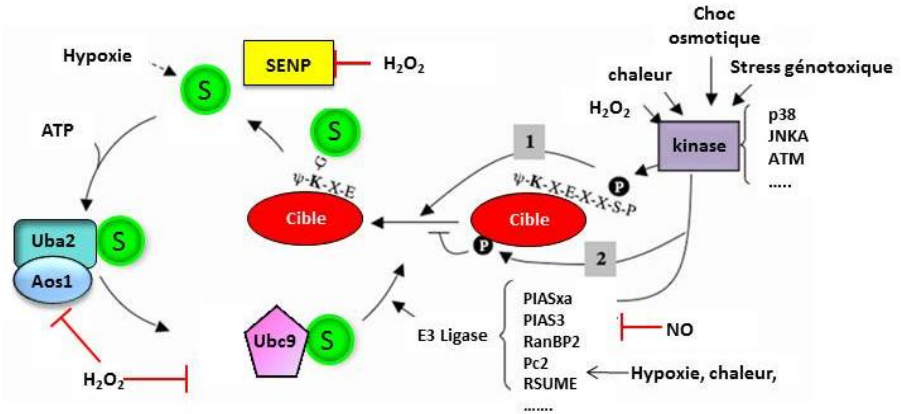
Néanmoins il ne faut pas oublier que le contrôle de la prolifération cellulaire passe surtout par la SUMOylation des facteurs de transcription régulant l'expression des gènes responsables de cette prolifération. De façon inattendue, la SUMOylation est perdue au niveau de la plupart des gènes dans les cellules en état de sénescence (Neyret-Kahn *et al.*, 2013). Seuls les facteurs de transcription d'un petit nombre de gènes essentiels à la division cellulaire demeurent SUMOylés. Parce qu'elle se distingue par un arrêt irréversible de la division cellulaire, la sénescence cellulaire agit comme une barrière contre la prolifération des cellules tumorales. Ainsi, la perte de la SUMOylation pourrait être une caractéristique de la sénescence et pourrait jouer un rôle dans l'établissement et le maintien de cet état protecteur contre la formation de tumeurs (Neyret-Kahn *et al.*, 2013).

### **3.4.3 Réponse au stress**

Le niveau global de la SUMOylation est modulé en réponse à différents types de stress environnementaux comme les stress osmotique, oxydatif et thermique. Cela se traduit en général par une augmentation du nombre de protéines modifiées surtout par SUMO-2/3 vraisemblablement due à la plus grande disponibilité de ces peptides. Les effets de ces différents stress sur des cibles individuelles montrent que les réponses sont complexes et qu'elles dépendent de l'intensité et de la durée du stress. Les mécanismes moléculaires impliqués sont résumés dans la figure 36 (Tempé *et al.*, 2008).

Le choc osmotique a beaucoup moins d'impact que les autres stress sur le niveau de SUMOylation (Saitoh et Hinchev, 2000). Lorsqu'il est induit par le sorbitol, il conduit à une SUMOylation par SUMO-2/3 de STAT1 de manière dépendante de l'activation de la p38MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Vanhatupa *et al.*, 2008). De même, un choc osmotique induit par une concentration saline élevée conduit à la SUMOylation de c-Myc par SUMO-2/3 (Sramko *et al.*, 2006).

**Figure 36 : Régulation de la SUMOylation en réponse à différents stress environnementaux.** La régulation affecte l'activité des enzymes de la voie SUMO (activation, conjugaison, ligation et protéase SENP). Le stress active différentes kinases qui augmentent (1) ou inhibent (2) la SUMOylation. (Schéma adapté de Tempé *et al.*, 2008).



Le choc thermique conduit à des effets plus sévères. La SUMOylation de HSF1 (*Heat Shock Factor-1*) est fortement augmentée et conduit, comme décrit précédemment, à une augmentation de sa fixation à l'ADN et de son activité (Hong *et al.*, 2001). De même, l'activateur transcriptionnel c-Myb est SUMOylé en réponse à un choc thermique. Au contraire, la SUMOylation de la topoisomerase 1 (Mo *et al.*, 2002) et de la protéine PML (Nefkens *et al.*, 2003) est fortement réduite suite au choc thermique, et la SUMOylation de c-Fos disparaît suite à ce stress de manière concomitante à la phosphorylation d'une thréonine proche de la lysine SUMOylable (Bossis *et al.*, 2005). Ces différents travaux ont conduit à identifier une nouvelle SUMO ligase, RSUME (*RWD-containing SUMOylation Enhancer*), dont la transcription est activée en réponse au stress thermique (Carbia-Nagashima *et al.*, 2007).

Le stress oxydant induit conduit globalement à une inhibition de la SUMOylation. Si l'inducteur est le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cette inhibition est due à une perte d'activité des enzymes d'activation et de conjugaison (Saitoh et Hinchey, 2000) alors que l'utilisation d'oxyde nitrique (NO) entraîne une S-nitrosation de PIAS3 facilitant ainsi son interaction avec l'ubiquitine ligase Trim32 et sa dégradation protéolytique (Qu *et al.*, 2007). Le stress hypoxique est corrélé à une augmentation de la transcription de SUMO-1 (Comerford *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2004) et à la SUMOylation de HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor*) (Ulrich, 2007).

Le stress génotoxique fait suite à la génération de cassures double brin de l'ADN induites par des agents chimiques, des radiations ionisantes ou une exposition aux rayons UV. Ce stress conduit chez la levure *S. pombe* à la SUMOylation de Rad52 impliquée dans les voies de recombinaison (Sacher *et al.*, 2006). De manière analogue, dans des cellules de

mammifères exposées aux UV, une augmentation de la SUMOylation est retrouvée sur le régulateur transcriptionnel DJ1 (aussi connue sous le nom de PARK7 pour *PARKinson disease autosomal recessive, early onset 7*) (Shinbo *et al.*, 2006), sur la protéine XPC (*Xeroderma Pigmentosum, complementation group C*), un composant de la voie de réparation par excision de nucléotides ou NER (*Nucleotide Excision Repair*) (Wang *et al.*, 2005) et sur la HAT Tip60 (Cheng *et al.*, 2008). Les agents anti-cancéreux comme la doxorubicine affectent aussi la SUMOylation de certains facteurs comme le co-répresseur KAP-1 (*Kinesin-Associated Protein-1*) ( Li *et al.*, 2007; Ivanov *et al.*, 2007), p53 (Lin *et al.*, 2004) et NEMO (*NF-kappa-B Essential MODulator*) (Huang *et al.*, 2003).

## **IV. Compétition entre SUMOylation/ubiquitinylation/acétylation**

Les relations SUMOylation/ubiquitinylation/acétylation ne sont plus à démontrer et la dynamique ubiquitinylation/SUMOylation/acétylation est de plus en plus documentée dans la littérature sur des protéines non-histones. Cette dynamique est complexe car très souvent, elle associe à ce trio ciblant des résidus de lysine une régulation par phosphorylation. Il est à noter que bien d'autres exemples de relations entre MPTs existent mais nous nous focaliserons, pour cette partie, aux MPTs qui nous intéressent.

### **4.1 SUMOylation/ubiquitinylation**

#### ***4.1.1. Effets antagonistes***

De nombreux exemples illustrent l'existence au sein d'une même protéine d'une lysine cible qui se retrouve ubiquitinylée ou SUMOylée avec généralement des conséquences opposées. La SUMOylation des facteurs de transcription est très souvent associée à la répression transcriptionnelle alors que leur ubiquitinylation, est quant à elle, associée à leur activation (Gill, 2004). De la même manière, la SUMOylation semble stabiliser les protéines alors que l'ubiquitinylation les dirige vers la dégradation protéasomale.

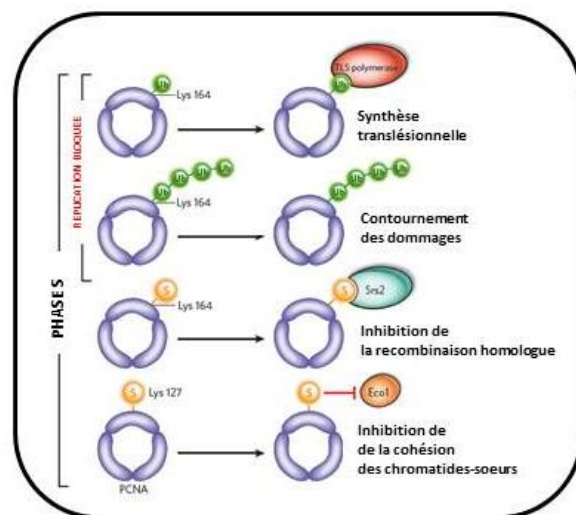
I $\kappa$ B $\alpha$  est la première protéine pour laquelle une compétition entre SUMO-1 et l'ubiquitine a été proposée, sur la lysine K21 (Desterro *et al.*, 1998 ; Hayden et Ghosh, 2004). Récemment, il a été démontré que la stabilité du récepteur ER $\beta$  est régulée par une compétition entre SUMO-1 et l'ubiquitine pour la même lysine. Ainsi, la SUMOylation de ER $\beta$  sur K4 inhibe sa dégradation par le protéasome alors que la polyubiquitinylation sur ce même résidu la déclenche (Picard *et al.*, 2012). Beaucoup d'autres exemples de modification

d'une seule et même lysine par la SUMOylation et ubiquitinylation sont décrites comme celui de Smad4 sur les lysines K113 et K159 (Lee *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003a; Lin *et al.*, 2003b), de la huntingtine sur K6, K9 et K15 (Steffan *et al.*, 2004) et de la protéine adaptatrice NEMO (*NF- $\kappa$ B Essential Modulator* ou IKK $\gamma$ ) sur les résidus K277 et K309 (Perkins, 2006). Plus récemment, Bellail *et al.* ont montré que la SUMOylation de CDK6 sur la lysine K216 inhibe son ubiquitinylation sur le résidu K147, ce qui bloque sa dégradation et la stabilise, permettant ainsi la progression des cellules cancéreuses dans le cycle cellulaire (Bellail *et al.*, 2014).

#### 4.1.2 Effets coopératifs

La modification d'une même lysine par SUMO et l'ubiquitine n'induit pas nécessairement des effets opposés. PCNA est un exemple de cette dynamique où la compétition SUMO/ubiquitine sur une même lysine contrôle de manière très fine le choix du type de réparation de l'ADN durant la réplication. Si des lésions à l'ADN persiste à la phase S et bloque la progression des fourches de réplication, la cellule met en place un mécanisme de réparation dit post-répliatif pour éliminer ou passer outre ces altérations. Une régulation complexe se met en place et met en jeu la protéine PCNA qui se fixe autour de l'ADN pour servir de co-facteur à l'ADN polymérase et aux facteurs de réparation (Moldovan *et al.*, 2007). PCNA est monoubiquitylée, polyubiquitylée ou SUMOylée (Figure 37).

**Figure 37 : Les modifications post-traductionnelles de PCNA régulent la réparation de l'ADN.** En présence de dommages à l'ADN, PCNA est ubiquitylée en K164. PCNA-Ub favorise le recrutement de polymérase translésionnelles (TLS) et permet de continuer la réplication en attendant la réparation. PCNA-polyUb conduit au contournement des dommages. La SUMOylation de K164 permet le recrutement de Srs2 et conduit à l'inhibition de la recombinaison homologue. La SUMOylation de K127 régule un autre mécanisme : l'inhibition de l'établissement de la cohésion des chromatides sœurs (d'après Hoege *et al.*, 2002).



PCNA est monoubiquitylée sur sa lysine K164 par l'E2 Rad6 et l'E3 Rad18, elle est polyubiquitylée née par l'E2 Ubc13-Mms2 et l'E3 Rad5, et SUMOylée par Ubc9 sur cette même lysine (Hoege *et al.*, 2002). Ces trois modifications jouent des rôles différents au

niveau de divers mécanismes de réparation de l'ADN. L'ubiquitylation de PCNA induite par les dommages à l'ADN est essentielle à la réparation de l'ADN. La SUMOylation de PCNA permet le recrutement de l'hélicase Srs2 sur le site de réplication et empêche ainsi une activité réparatrice de l'ADN en absence de dommages à l'ADN et la recombinaison homologue (Prakash *et al.*, 1993; Hoege *et al.*, 2002; Stelter et Ulrich, 2003; Haracska *et al.*, 2004; Papouli *et al.*, 2005; Watts, 2006; Branzei et Foiani, 2008; Gareau et Lima, 2010; Ulrich et Takahashi, 2013).

SUMOylation et ubiquitylation peuvent coopérer. Ainsi, la SUMOylation peut être un préliminaire à l'ubiquitylation. La poly-SUMOylation de PML par SUMO-2/3 semble être un signal inducteur pour sa dégradation. En effet, ce motif est reconnu comme cible par les STUbLs, une nouvelle famille de ligases E3 pour l'ubiquitine, qui induisent alors spécifiquement la polyubiquitylation des chaînes de poly-SUMO-2/3 (Tatham *et al.*, 2008).

La compétition entre SUMO et ubiquitine peut réguler aussi l'activité des enzymes impliquées dans ces deux MPTs. Par exemple, l'activité d'ubiquitine-protéine ligase de RFN4 est dépendante de SUMO : RFN4 va ubiquityler les protéines SUMOylées qu'elle reconnaît grâce à son domaine SIM. MDM2 est une E3 ubiquitine-ligase qui peut être SUMOylée et polyubiquitylée : lorsqu'elle est SUMOylée, elle interagit avec p53 qu'elle ubiquitine et p53 est alors dégradée. Lorsqu'elle est désSUMOylée par SUSP4, elle s'auto-ubiquitine alors elle-même et est dégradée, stabilisant ainsi p53 (Lee *et al.*, 2006).

#### **4.1.3 Effets indépendants**

Le facteur de transcription Ets1 qui régule la transcription de nombreux gènes impliqués dans la progression et l'invasion tumorale est la cible de nombreuses MPTs. En particulier, il est SUMOylé sur les résidus de lysine 15 et 227. Il est également polyubiquitylé sur K48, ce qui mène à sa dégradation par le protéasome. Les travaux de Ji *et al.* (2007) montrent que la dégradation protéasomale de Ets1 n'est pas influencée par sa SUMOylation, suggérant une indépendance entre SUMOylation et ubiquitylation.

Le suppresseur de tumeur PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog deleted for chromosome 10*) est une phosphatase qui, parmi ses nombreuses cibles, compte les phosphatidylinositols triphosphate de la membrane plasmique qu'elle déphosphoryle s'opposant ainsi aux effets des kinases PI3K et AKT. PTEN est sujet à l'ubiquitylation : sa monoubiquitylation déclenche son ciblage nucléaire. PTEN peut aussi être SUMOylée soit par SUMO-1, soit par SUMO-2, et les sites de SUMOylation sont identiques aux sites

majeurs d'ubiquitinylation (González-Santamaría *et al.*, 2012). La modification par SUMO-1 réduit la capacité de PTEN à être ubiquitinylée confirmant qu'une compétition existe entre ces deux MPTs. Par ailleurs, l'inhibition du protéasome conduit à une accumulation des isoformes de PTEN-SUMO-2, suggérant des impacts différents des deux types de SUMOylation sur PTEN (González-Santamaría *et al.*, 2012). Tout comme l'isoforme monoubiquitinylée de PTEN, l'isoforme modifiée par SUMO-1 est majoritairement nucléaire. De plus, González-Santamaría *et al.* (2012) ont montré d'une part, que l'infection par le virus VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*) induit la SUMOylation de PTEN par SUMO-1 ou SUMO-2 et sa translocation à la membrane, et d'autre part, que la SUMOylation de PTEN contribue à la réponse cellulaire anti-virale. Ces travaux ainsi que ceux de Huang *et al.* (2012) montrent que PTEN-SUMO-1 peut être recrutée à la membrane et expliquent comment cette phosphatase peut ainsi contrôler la phosphorylation des phosphoinositides membranaires (González-Santamaría *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012).

## **4.2 SUMOylation/ubiquitinylation/phosphorylation**

La coopération ou la compétition entre phosphorylation et SUMOylation et/ou ubiquitinylation apporte un degré supplémentaire de complexité à l'étude des protéines modifiées et à la compréhension des mécanismes cellulaires qu'elles régulent. En effet, il est clair désormais qu'il n'y a quasiment pas d'ubiquitinylation ou de SUMOylation sans qu'au préalable une phosphorylation ne soit impliquée. Comme les voies SUMO/dé-SUMOylation et ubiquitine/dé-ubiquitinylation ciblent les mêmes lysines, une régulation supplémentaire par le système phospho/dé-phosphorylation doit se mettre en place afin d'orienter le choix de la modification à apporter à une lysine donnée. Si des données concernant les kinases existent dans certaines de ces études, quasiment rien n'est connu pour les phosphatases.

### **4.2.1 Phosphorylation/Ubiquitinylation**

Dans la majeure partie des cas, la phosphorylation est un prérequis pour l'ubiquitinylation. En effet, les protéines cytoplasmiques et nucléaires sont ubiquitinylées suite à la phosphorylation de leur dégron (séquence PEST, D-Box, ..). Par exemple, la cycline E doit être modifiée sur deux sites différents par deux kinases différentes (T380 par GSK3 et S384 par CDK2) pour finalement être ubiquitinylée et dégradée (Strohmaier *et al.*, 2001, Welcker *et al.*, 2003). L'inhibiteur de CDK Sic1 possède, quant à lui, neuf sites de phosphorylation. Il faut au minimum que six de ces sites soient phosphorylés par la kinase CDC28 pour que Sic1 lie Cdc4 et soit dégradé (Orlicky *et al.*, 2003). De même, la delta-



lactoferrine doit être phosphorylée sur la S10 avant d'être phosphorylée sur sa séquence PEST et être ubiquitinylée (Hardivillé *et al.*, 2010). A l'inverse, la phosphorylation peut contrôler négativement l'ubiquitinylation. L'exemple le plus cité est celui de la protéine p53 dont la phosphorylation par les kinases Chk1 et Jnk empêche son interaction avec l'E3 ubiquitine ligase Mdm2 et par conséquent sa dégradation (Brooks et Gu, 2003).

#### **4.2.2 Phosphorylation/SUMOylation**

La SUMOylation dépendante de la phosphorylation a déjà été en partie traitée puisqu'il existe un motif de SUMOylation phospho-dépendant, PDSM,  $\psi$ KxExxSP (Hietakangas *et al.*, 2003). Ce motif a été mis en évidence dans plusieurs facteurs de transcription tels que HSF1, GATA-1, MEF2A, MEF2D, HSF4b, PPAR $\gamma$ 2 (Hietakangas *et al.*, 2003; Yamashita *et al.*, 2004; Hietakangas *et al.*, 2006; Grégoire *et al.*, 2006) et des kinases comme HIPK2, HIPK3, MAPKK2 et MAK (Hofmann *et al.*, 2005; Gresko *et al.*, 2005). De même SIM, le motif de liaison à SUMO peut être régulé par phosphorylation comme décrit pour la SUMO E3 ligase PIAS $\alpha$  (Hecker *et al.*, 2006).

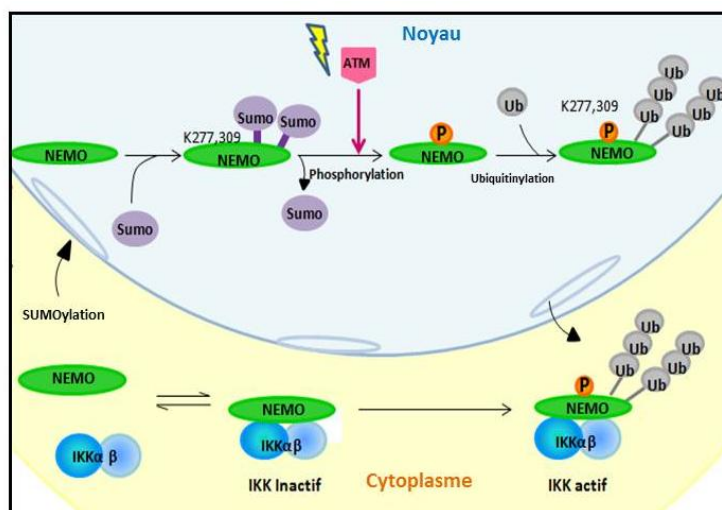
La phosphorylation peut néanmoins réguler la SUMOylation à distance et de façon négative. Un cas particulier est celui de la protéine MEF2D pour qui la phosphorylation de la S444 localisée dans la séquence PDSM régule positivement la SUMOylation de K439, alors que la phosphorylation de la S179 éloignée de cette séquence conduit à une régulation négative de cette SUMOylation (Grégoire et Yang, 2005). D'autres régulations négatives de la SUMOylation par phosphorylation, indépendamment du PSDM, ont été décrites pour c-Fos (Bossis *et al.*, 2005), c-Jun (Muller *et al.*, 2000), p53 (Muller *et al.*, 2000) et Elk-1 (Yang *et al.*, 2003a ; 2003b).

#### **4.2.3 Phosphorylation/SUMOylation/Ubiquitinylation**

Le premier exemple et le plus étudié est celui de la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  qui est polyubiquitinylée ou monoSUMOylée sur K21 (Desterro *et al.*, 1998). Cet exemple est intéressant car il a permis de démontrer la complexité et l'interdépendance des trois MPTs qui nous intéressent (Perkins, 2006). En effet, la polyubiquitination d'I $\kappa$ B $\alpha$  requiert la phosphorylation préalable des résidus S32 et S36 qui, d'une part déclenche la reconnaissance d'I $\kappa$ B $\alpha$  par l'ubiquitine ligase SCF/ $\beta$ TrCP (Chen *et al.*, 1996; Hayden et Ghosh 2004; Perkins, 2006), et d'autre part inhibe la SUMOylation en K21 (Desterro *et al.*, 1998 ; Perkins, 2006). Cette phosphorylation en S32 et S36 est réalisée par la kinase IKK $\beta$  qui est elle-même ubiquitinylée (Chen *et al.*, 1996).

I $\kappa$ B $\alpha$  fait partie de la voie de signalisation de NF $\kappa$ B qui est régulée par de très nombreux stimuli (cytokines, TNF, IL-1, endotoxine bactérienne, dommage à l'ADN, ...) *via* l'induction de complexes formés de diverses sous-unités : les IKKs (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , NEMO) qui régulent les I $\kappa$ Bs (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , Bcl-3), qui à leur tour régulent NF $\kappa$ B. Chacune de ces protéines est modifiée par des MPTs. Parmi ces sous-unités on trouve NEMO qui est séquentiellement modifié par ces trois MPTs et pour laquelle SUMOylation et ubiquitinylation coopèrent (Figure 38). En réponse à un stress génotoxique, l'activation du complexe IKK est dépendante de la SUMOylation du facteur NEMO qui possède deux lysines cibles dans son domaine doigt de Zinc, K227 et K309 et de son entrée dans le noyau. La SUMOylation de NEMO rend compte de sa séquestration nucléaire. A l'inverse, l'ubiquitinylation de NEMO va déclencher sa sortie du noyau. L'ubiquitinylation de NEMO est dépendante de sa phosphorylation par la kinase ATM. Une fois polyubiquitinylé, NEMO retourne au cytoplasme et s'assemble en complexe actif avec les sous-unités IKK $\alpha$ / $\beta$  afin de dégrader I $\kappa$ B et activer ainsi NF $\kappa$ B (Huang *et al.*, 2003; Ulrich, 2005).

**Figure 38. Coopération SUMOylation/ubiquitinylation.** NEMO est associée dans le cytoplasme aux sous-unités catalytiques IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  pour former le complexe IKK inactif. La SUMOylation de NEMO provoque sa rétention dans le noyau. Ici la signalisation d'ATM, dépendante des dommages à l'ADN (représentés par une flèche brisée jaune), induit la déSUMOylation puis la phosphorylation de NEMO par ATM, et enfin l'ubiquitinylation de NEMO. La forme polyubiquitinylée peut alors sortir du noyau et s'associer avec IKK $\alpha$ / $\beta$  pour former le complexe IKK actif (d'après Hay, 2004 et Ulrich, 2005).



Le dernier exemple est celui de la protéine PML dont la dégradation est déclenchée par la SUMOylation. Nous nous sommes déjà intéressés à la SUMOylation de la protéine PML qui est localisée au niveau de structures subnucléaires. Les corps nucléaires à PML sont désorganisés de manière réversible par l'acide rétinoïque dans les cellules de patients atteints de leucémies aiguës promyélocyaires (LAP). Chez ces patients, la translocation t(15,17) génère une protéine hybride entre la protéine PML et le récepteur  $\alpha$  de l'acide rétinoïque (PML/RAR $\alpha$ ) qui, à elle seule, suffit à rendre les cellules leucémiques. L'arsenic sous la forme de trioxyde d'arsenic (As $_2$ O $_3$ ) est un traitement remarquablement efficace de cette

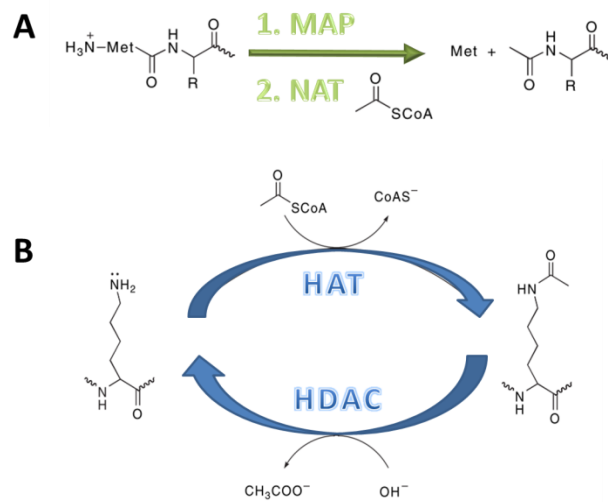
forme rare de leucémie. L'incroyable efficacité du traitement est due au fait que ce dérivé de l'arsenic induit de manière spécifique la dégradation de l'oncoprotéine PML/RAR $\alpha$  et permet ainsi l'élimination des cellules souches leucémiques. Ce ciblage protéolytique est dû à la SUMOylation déclenchée par l'arsenic de la protéine PML. Seule la lysine K160 de PML est sensible à l'exposition par As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et devient SUMOylée par SUMO-2 puis polySUMOylée. La SUMOylation conduit au recrutement de RNF4, une STUbls (*SUMO Targeted ubiquitin ligase*) qui ubiquitinye PML-SUMO et PML/RAR $\alpha$ -SUMO provoquant ainsi leur catabolisme (Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2008; Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2012; de Thé *et al.*, 2012; Maroui *et al.*, 2012). C'est la phosphorylation par la kinase CK2 du motif SIM de PML qui module l'affinité des PML avec RNF4 (Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2012; de Thé *et al.*, 2012, Sahin *et al.*, 2014).

### 4.3 SUMOylation/Acétylation

#### 4.3.1 Acétylation

L'acétylation des lysines internes est un processus bien connu pour les protéines histones, mais il est largement rencontré chez les protéines non histones telles que les chaperones, les protéines ribosomales, les ADN/ARN hélicases et les enzymes de réparation de l'ADN (revue de Sterner et Berger, 2000) (Figure 39). L'acétylation des protéines est distincte de l'acétylation en N-terminale des protéines qui elle, est un processus co-translationnel et irréversible, touchant environ 50% des protéines de la levure et plus de 80% des protéines des eucaryotes supérieurs. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il a été montré que l'acétylation N-terminale agit comme un signal de dégradation (Hwang *et al.*, 2010). L'acétylation/désacétylation protéines est un processus régulé par un ensemble d'enzymes que sont les acétyltransférases et les désacétylases. Bien que ne ciblant pas uniquement des histones, ces enzymes sont, malgré tout, toujours rassemblées sous les noms de HATs (*Histone Acetyl Transferase*) et de HDACs (*Histone DeAcetylase*). Pour les protéines non histones, on trouve parfois les termes FATs (*Factor AcetylTransferase*) et FDACs (*Factor DeAcetylase*). Les conséquences de l'acétylation des protéines non histones sont variables. L'acétylation affecte la localisation cellulaire, augmente la stabilité des ARNm et des protéines, active la transcription, renforce la liaison des protéines acétylées à l'ADN, module l'activité enzymatique et influence les interactions protéine-protéine (Glozak *et al.*, 2005).

**Figure 39 : La balance HAT/HDAC.** **A.** L'acétylation en N-terminal est un processus irréversible grâce à l'action de la *Methionine AminoPeptidase* (MAP) et des *N-Acetyl-Transférases* (NAT). **B.** L'acétylation des lysines internes est réversible grâce aux *Histone Acétyl-Transférases* (HAT) et *Histone-Déacétylases* (HDAC) et module la fonction de la protéine.



Parmi les protéines acétylées, p53 est sûrement celle qui est la plus étudiée. L'acétylation de p53 est induite en réponse aux dommages à l'ADN (Barley *et al.*, 2001) et conduit au recrutement de nombreux co-régulateurs transcriptionnels et à sa redistribution intracellulaire (Liang et Clarke, 2001). La phosphorylation est aussi un facteur déclenchant. Les kinases qui phosphorylent l'extrémité N-terminale de p53 sont ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) et/ou ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein*) qui ciblent la sérine S15, et Chk2 et/ou Chk1 (*Checkpoint homolog*) qui ciblent la sérine S20. Elles permettent alors la stabilisation de p53 en la dissociant de l'ubiquitine ligase Mdm2 et le recrutement des acétyltransférases CBP/p300 et PCAF (*P300/CBP-Associated Factor*) (Appella *et al.*, 2001). La fixation de CBP/p300 et PCAF à l'extrémité N-terminale de p53 permet l'acétylation de son extrémité C-terminale. L'ensemble de ces modifications, phosphorylation, acétylation et association avec des co-facteurs, stimule l'activité transcriptionnelle de p53 avec, pour conséquence, l'induction de l'expression de toute une série de gènes impliqués, en particulier, dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose.

Dans le cas de MyoD (*Myogenic Differentiation*), un activateur clef de la différenciation musculaire, son acétylation par PCAF augmente sa fixation à l'ADN (Mc Kinsey *et al.*, 2002). La désacétylation de MyoD par des HDACs de classe I conduit à l'inhibition de la myogénèse (Mal *et al.*, 2001). Quant à PCNA, son acétylation renforce son implication dans la réplication de l'ADN alors que la forme non acétylée de PCNA jouerait un rôle dans la terminaison de la réplication (Naryzhny et Lee, 2004).

Puisque les lysines sont également la cible de l'ubiquitinylation et de la SUMOylation, il est évident qu'une compétition entre ces différentes MPTs va prendre place sur les mêmes résidus. Notons que la phosphorylation de résidus Ser/Thr va également jouer un rôle régulateur et peut influencer ainsi la compétition des autres MPTs.

### 4.3.2 Acétylation/ubiquitinylation

Un certain nombre de rapports suggèrent que la balance HAT/HDAC peut réguler la dégradation des protéines. En effet, l'acétylation pourrait réduire la dégradation de certaines protéines par « verrouillage » d'un résidu de lysine, bloquant ainsi leur ubiquitinylation et la dégradation protéasomale de la protéine-cible (Caron *et al.*, 2005; Sadoul *et al.*, 2008). Ainsi, le facteur de transcription E2F1 est plus fortement exprimé en présence de PCAF que de PCAF tronquée de son domaine HAT, suggérant qu'*in vivo* la forme acétylée d'E2F1 a une demi-vie plus longue que la forme non-acétylée. Ces résultats ont été appuyés par des analyses montrant que la demi-vie initiale d'E2F1 doublait en présence de PCAF. Cependant, la demi-vie du mutant E2F1, dont les lysines acétylées ont été mutées en arginine, ne change pas comparée à celle de la forme sauvage d'E2F1 en présence de PCAF. L'ensemble de ces données suggèrent que l'acétylation d'E2F1 par PCAF influence sa stabilité (Martinez-Balbas *et al.*, 2000). Toutefois, il est difficile de savoir si l'effet observé est direct ou s'il résulte d'une compétition acétylation/ubiquitinylation (Caron *et al.*, 2005; Sadoul *et al.*, 2008).

### 4.3.3 Acétylation/SUMOylation

La SUMOylation et l'acétylation peuvent entrer en compétition pour le même résidu de lysine comme cela a été rapporté pour de nombreux facteurs de transcription (Sapetschnig *et al.*, 2002), des coactivateurs (Bouras *et al.*, 2005) et des répresseurs de la transcription (Stankovic-Valentin *et al.*, 2007).

Sp3 est un facteur de transcription pour lequel la SUMOylation et l'acétylation ciblent un même résidu de lysine, situé entre le second domaine d'activation riche en résidus de glutamine et le domaine de liaison à l'ADN. Sp3 peut soit activer soit réprimer la transcription (Valin *et al.*, 2007). La conjugaison de SUMO à cette lysine participe à l'activité répressive de Sp3 en favorisant le recrutement de co-répresseurs (Sapetschnig *et al.*, 2002; Valin *et al.*, 2007). A l'inverse, l'acétylation de Sp3 sur ce même résidu participe à l'inhibition de l'activité répressive de Sp3 (Braun *et al.*, 2001). Ainsi ces modifications sont mutuellement exclusives, la SUMOylation prévenant l'acétylation et *vice-versa*, et elles ont un effet antagoniste sur l'activité du facteur de transcription (Sapetschnig *et al.*, 2002).

P300 peut acétyler des facteurs de transcription mais aussi des histones (Chan *et al.*, 2001). P300 est associée à la protéine CBP (*CREB Binding Protein*) et ce complexe est souvent considéré comme une seule entité appelée p300/CBP (Goodman *et al.*, 2000). P300/CBP facilite l'activité transcriptionnelle de plusieurs facteurs de transcription en

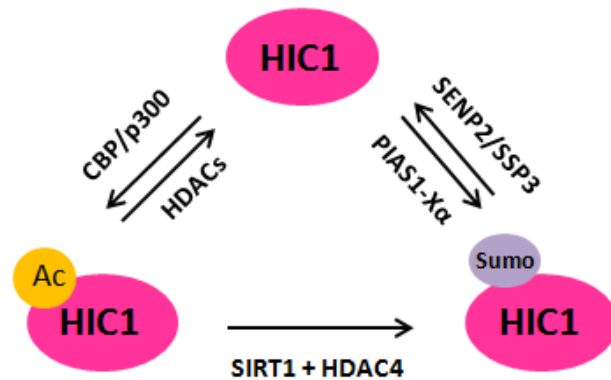
participant à un réseau qui permet non seulement de fixer ces facteurs de transcription à leur promoteur cible, mais aussi d'apporter sur place une activité intrinsèque HAT favorisant le remodelage de la chromatine en acétylant directement les histones. P300 possède un domaine CRD1 (*Cell Cycle Regulatory Domain 1*) impliqué dans la régulation transcriptionnelle dans lequel se trouvent deux lysines conservées, K1020 et K1024, qui sont les cibles de la balance acétylation/SUMOylation. La désacétylation de p300 par la désacétylase SIRT1 est dépendante de la SUMOylation et conduit à l'inhibition de la transactivation par p300 SUMOylée. On a ici un autre exemple du dialogue entre acétylation/SUMOylation permis par l'activation de la désacétylase SIRT1 (Bouras *et al.*, 2005).

La compétition SUMOylation/acétylation cible également des répresseurs de la transcription comme HIC-1 (Figure 40). Le gène suppresseur de tumeur *HIC-1* (*Hypermethylated in Cancer 1*) est localisé dans la région 17p13.3 du chromosome qui est souvent hyperméthylé ou délété dans les cancers (Wales *et al.*, 1995). La protéine HIC-1, largement exprimée dans les tissus sains, est composée de trois domaines principaux fonctionnels. Le domaine central présente deux courts motifs conservés phylogénétiquement : le motif GLDLSKK qui permet le recrutement du co-répresseur CtBP (*C-terminal Binding Protein*) et le motif M/VK<sub>314</sub>XEP ou «SUMO-acetyl switch», cible du dialogue SUMOylation/acétylation (Stankovic-Valentin *et al.*, 2007; Dehennaut *et al.*, 2013). HIC-1 est modifié par SUMO-1 grâce aux E3 ligases PIAS1 et Xα, et il est déSUMOylé par SENP-2/SSP3. La SUMOylation n'affecte pas la localisation subcellulaire de HIC-1, par contre elle régule positivement son activité de répression de la transcription. Récemment, Dehennaut *et al.* (2013) ont montré que HIC-1 était SUMOylée suite aux cassures double-brin de l'ADN et intervenait par le biais du recrutement de certains partenaires comme MTA1 (MeTAstasis-associated protein), membre du complexe NuRD (*Nucleosome Remodeling Deacetylase*), dans le mécanisme de réparation de l'ADN. Ces auteurs ont également montré que suite aux cassures double-brin le complexe SIRT1-SUMO1/HDAC4/Ubc9 se formait et activait la désacétylation de HIC-1 au profit de sa SUMOylation.

HIC-1 est acétylé par p300/CBP sur plusieurs résidus de lysine dont la K314. SIRT1 SUMOylée et HDAC4 contrôlent elles aussi positivement l'activité répressive de HIC-1 en jouant sur la balance désacétylation/SUMOylation du résidu K314. La sirtuine SIRT1 est une HDAC de type III dépendante du cofacteur NAD<sup>+</sup> ciblant à la fois les histones H3 et H4 mais aussi des protéines non histones comme p53 (Rood *et al.*, 2013). HDAC4 est une désacétylase particulière car elle facilite la SUMOylation de K314. En effet, en plus de son domaine C-terminal HDAC, HDAC4 possède un domaine N-terminal à activité E3 SUMO ligase-like ou

«SUMO facilitase » qui interagit avec Ubc9.

**Figure 40 : Compétition SUMOylation/acétylation et les acteurs de cette régulation dans le cas du répresseur transcriptionnel HIC-1** (adapté de la thèse du Dr. Capucine van Rechem-Fleuriel, 2008).

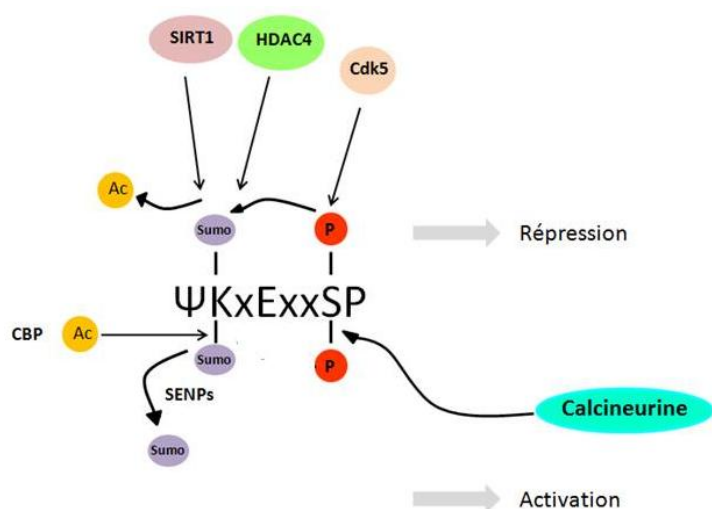


Dans le cas du suppresseur de tumeur p53, la SUMOylation et l'acétylation ciblent des lysines différentes qui sont principalement concentrées dans le domaine C-terminal (CTD) (Gu *et al.*, 2012). Le CTD de p53 de nature flexible contient de nombreuses lysines (K370, K372, K373, K381, K382, K386) qui permettent un contact non spécifique de p53 à l'ADN (McKinney *et al.*, 2004). Les six derniers résidus de lysine en C-terminal sont sujets à de nombreuses MPTs qui constituent un véritable "code-barres" régulateur de l'activité de p53. Parmi elles, on trouve l'ubiquitinylation dépendante de Mdm2 ciblant ces 6 résidus (Rodriguez *et al.*, 2000), la SUMOylation de la lysine K386 (Wu *et al.*, 2009), la néddylation (une autre modification ubiquitine-like) des résidus K370, K372 et K373 (Xirodimas *et al.*, 2004), l'acétylation dépendante de p300/CBP des résidus K373 et K382 (Gu et Roeder, 1997), et la méthylation des résidu K370, K372 et K382 médiée respectivement par les méthyltransférases Smyd2 (Huang *et al.*, 2006), Set7/9 (Chuikov *et al.*, 2004) et Set8 (Shi *et al.*, 2007). Alors que l'acétylation des lysines K373/K382 et la méthylation de K372 sont liées à l'activation de p53, les autres MPTs participent à la répression de l'activité transcriptionnelle de p53. Les travaux de Wu *et al.* (2009) montrent que la SUMOylation de p53 empêche la forme libre, mais non la forme liée à l'ADN, de s'associer spécifiquement à son élément de réponse. L'acétylation de p53 restaure l'activité de fixation à l'ADN de p53 SUMOylée, indiquant que l'acétylation antagonise l'effet inhibiteur de la SUMOylation et confirme son rôle stimulateur de la transcription.

#### 4.3.3 Acétylation/SUMOylation/phosphorylation

Une compétition acétylation/SUMOylation/phosphorylation a été reportée pour les facteurs de transcription MEF2 (*Myocyte Enhancer Factor 2*) majoritairement exprimés dans

le muscle strié et dans le cerveau lors de la maturation dendritique des neurones et lors de la formation des synapses (Lyons *et al.*, 1995; Potthoff *et al.*, 2007). L'expression des MEF2 est régulée tant au niveau transcriptionnel que traductionnel, et leur activité est hautement contrôlée par différentes MPTs. Ces MPTs sont mises en place sous l'influence d'une régulation phosphorylation/déphosphorylation impliquant les kinases MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) et/ou Cdk5 (*Cyclin Dependent Kinase 5*) et la phosphatase PP2B, appelée également "calcineurine calcium-dépendante" (Zhu *et al.*, 2004). Elles ciblent le motif consensus PDSM pour lequel la phosphorylation du résidu de sérine S408 contrôle le dialogue SUMOylation/acétylation sur le résidu de lysine K403 (Shalizi *et al.*, 2006) (Figure 41). Alors que la SUMOylation dépendante de la phosphorylation réprime l'activité transcriptionnelle des MEF2, la déphosphorylation de S408 et la désSUMOylation-acétylation de K403 activent ces facteurs de transcription.



**Figure 41 : Dialogue SUMOylation/acétylation/phosphorylation, exemple des facteurs de transcription MEF2.** Le motif consensus de SUMOylation est hautement conservé chez les protéines MEF2 de différentes espèces, notamment le dipeptide SP. Ce dipeptide est phosphorylé par Cdk5. La phosphorylation facilite la SUMOylation de ce motif et par voie de conséquence réprime la transcription (Yang *et al.*, 2006). La déphosphorylation calcium-dépendante fait intervenir la phosphatase calcineurine. L'activité de MEF2 est finement régulée par l'activité de la SUMO E3 ligase-like de HDAC4 qui facilite la SUMOylation, et par la balance acétylation/désacétylation régulée par l'acétyltransférase CBP et la désacétylase SIRT1 (Zhao *et al.*, 2005c). (Adapté de la thèse du Dr. Capucine van Rechem-Fleuriel, 2008).

#### 4.4 Conclusion

Comme nous venons de le voir à travers ces différents exemples, la combinaison de diverses MPTs génère une incroyable complexité mais permet une régulation fine des processus cellulaires. La phosphorylation, l'ubiquitinylation, l'acétylation et la SUMOylation sont indubitablement liées. Etudier une seule MPT ne rend pas compte de la dynamique des événements. Pour mieux comprendre la régulation de l'activité d'une protéine donnée, il faut donc ajouter une dimension séquentielle en essayant de décrypter le dialogue qui s'établit entre ces MPTs. Nous avons, grâce aux travaux précédents du laboratoire et bien entendu à ceux obtenus au cours de ma thèse, tenté d'élaborer le «code delta-lactoferrine» qui régit l'activité transcriptionnelle et la stabilité de ce facteur de transcription. La delta-lactoferrine



est non seulement modifiée par *O*-GlcNAcylation/phosphorylation/ubiquitination mais aussi, comme je l'ai démontré au cours de ma thèse, par SUMOylation et acétylation.

*Travaux  
personnels*

# *Article 1*

# La régulation de l'activité transcriptionnelle et de la stabilité de la delta-lactoferrine par SUMOylation

A mon arrivée au laboratoire, la présence de plusieurs sites de SUMOylation sur la delta-lactoferrine était supposée. Une étude *in silico* avait montré qu'un consensus de SUMOylation était présent en K361 mais la SUMOylation subsistait après mutagenèse dirigée de ce résidu, suggérant que plusieurs sites devaient exister. Une partie de mes travaux de thèse a donc consisté à confirmer l'existence de ces sites modifiés par SUMOylation, à les cartographier et étudier l'effet de cette modification sur l'activité transcriptionnelle et la stabilité de la delta-lactoferrine, ainsi que mettre en évidence l'impact des compétitions SUMOylation/ubiquitination et SUMOylation/acétylation sur la delta-lactoferrine.

Les résultats de cette étude ont été rassemblés et font l'objet de la publication suivante soumise à Plosone :

**Escobar-Ramirez A.**, Vercoutter-Edouart A.-S., Mortuaire M., Huvent I., Hardivillé S., Lefebvre T., Pierce A. (2014) Modification by SUMOylation controls both the transcriptional activity and the stability of delta-lactoferrin.

Au cours de ma thèse, nous avons pu montrer que la delta-lactoferrine était modifiée par SUMO-1. La SUMOylation régule de nombreux processus biologiques dont l'expression des gènes, la stabilité des protéines, le trafic nucléocytoplasmique et la réparation de l'ADN. Elle modifie de nombreux facteurs de transcription et elle est souvent synonyme de répression transcriptionnelle. Nous avons, dans un premier temps, réalisé une étude *in silico* et mis en évidence 5 sites de SUMOylation sur la delta-lactoferrine, les lysines K13, K308, K361, K379 et K391. Nous avons ensuite produit un ensemble de mutants pour lesquels un seul site était préservé et un mutant M5S invalidé pour les cinq sites de SUMOylation. Nous avons pu montrer que ces cinq lysines étaient la cible de la machinerie de SUMOylation et que K13, K308 et K379 étaient les sites accepteurs majeurs. Nous avons ensuite étudié l'activité transcriptionnelle des différents mutants et montré que la SUMOylation réprime l'activité transcriptionnelle de la delta-lactoferrine. L'utilisation de la protéase SENP2, de siRNA dirigés contre l'enzyme de conjugaison Ubc9 (siUbc9) et du vecteur d'expression SUMO-1

pour moduler le profil de SUMOylation de la lysine K308 a permis de confirmer que ce site est un élément clef de cette régulation.

Dans un second temps nous avons étudié le dialogue entre différentes modifications post-traductionnelles. En effet, au laboratoire il avait été montré que les lysines K379 et K391, localisées au voisinage de la séquence PEST, étaient les cibles de la voie ubiquitine. Nous avons pu démontrer qu'une compétition SUMO/ubiquitine existait et que sous la forme SUMOylée le mutant K379 avait une durée de demi-vie plus longue, confirmant que la SUMOylation protégeait la delta-lactoferrine de la dégradation protéasomale. Au cours de mes travaux de thèse, nous avons également pu montrer que la delta-lactoferrine était acétylée principalement sur la lysine K13. En modulant le niveau de SUMOylation ou d'acétylation du mutant K13 (siUbc9, inhibition des HDACs, overexpression de SUMO-1) nous avons pu montrer que la compétition SUMO/acétylation était impliquée dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de la delta-lactoferrine. En effet, l'acétylation régule positivement l'activité transactivatrice de la delta-lactoferrine alors que la SUMOylation l'inhibe.

En résumé, nous avons pu montrer que la delta-lactoferrine était multi-SUMOylée et que la SUMOylation était un nouveau mécanisme de régulation à la fois de son activité transcriptionnelle et de sa stabilité.

**Modification by SUMOylation Controls both the Transcriptional Activity and the Stability of Delta-Lactoferrin**

**Adelma Escobar-Ramirez, Anne-Sophie Vercoutter-Edouart, Marlène Mortuaire, Isabelle Huvent, Stephan Hardivillé<sup>§</sup>, Tony Lefebvre and Annick Pierce\***

Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille, IFR 147, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

**\*Correspondance to:** Pr. Annick Pierce, UGSF, UMR 8576 CNRS, USTL, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

Fax: +33 3 20 43 65 55; Tel: +33 3 20 33 72 38; E-mail: [annick.pierce@univ-lille1.fr](mailto:annick.pierce@univ-lille1.fr)

**§Present address:** Departement of Biological Chemistry, Johns Hopkins University, School of Medicine, Baltimore MD, USA

**Keywords:** Delta-lactoferrin, transcription factor, antitumoral agent, post-translational modifications, SUMOylation, acetylation, ubiquitination, *O*-GlcNAcylation.

**Abbreviations:**  $\Delta$ Lf, delta-lactoferrin;  $\Delta$ LfRE, delta-lactoferrin response element; SUMO, small ubiquitin-like modifier; SENP, sentrin/small ubiquitin-like modifier-specific protease, Ubc9, ubiquitin-conjugating 9, PTM, post-transcriptional modification.

**Short title:** SUMOylation represses  $\Delta$ Lf transcriptional activity

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

Delta-lactoferrin is a transcription factor, the expression of which is downregulated or silenced in case of breast cancer. It possesses antitumoral activities and when it is re-introduced in mammary epithelial cancer cell lines, provokes antiproliferative effects. It is posttranslationally modified and our earlier investigations showed that the *O*-GlcNAcylation/phosphorylation interplay plays a major role in the regulation of both its stability and transcriptional activity. Here, we report the covalent modification of delta-lactoferrin with small ubiquitin-like modifier SUMO-1. Mutational and reporter gene analyses identified five different lysine residues at K13, K308, K361, K379 and K391 as SUMO acceptor sites. The SUMOylation deficient M5S mutant displayed enhanced transactivation capacity on an delta-lactoferrin responsive promoter suggesting that SUMO-1 negatively regulated the transactivation function of delta-lactoferrin. K13, K308 and K379 are the main SUMO sites and among them, K308 which is located in a SUMOylation consensus motif of the NDSM-like type is a key SUMO site involved in repression of delta-lactoferrin transcriptional activity. K13 and K379 are both targeted by other posttranslational modifications. We demonstrated that K13 is the main acetylation site and that favoring acetylation at K13 reduced SUMOylation and increased delta-lactoferrin transcriptional activity. K379 which is either ubiquitinated or SUMOylated, is a pivotal site for the control of delta-lactoferrin stability. We showed that SUMOylation competes with ubiquitination and protects delta-lactoferrin from proteosomal degradation by positively regulating its stability. Collectively, our results indicate that multi-SUMOylation occurs on delta-lactoferrin to repress its transcriptional activity. Reciprocal occupancy of K13 by either SUMO-1 or an acetyl group may contribute to the establishment of finely regulated mechanisms to control delta-lactoferrin transcriptional activity. Moreover, competition between SUMOylation and ubiquitination at K379 coordinately regulates the stability of delta-lactoferrin toward proteolysis. Therefore SUMOylation of delta-lactoferrin is a novel mechanism controlling both its activity and stability.

## Introduction

Lactoferrins exist as different variants due to gene polymorphisms, post-transcriptional and post-translational modifications [1]. The two main isoforms are secreted lactoferrin and its nucleocytoplasmic counterpart, delta-lactoferrin ( $\Delta$ Lf) [2,3,4]. Their expression is downregulated or silenced in cancer cells [3,5]. In breast cancers, significantly lower levels of Lf and/or  $\Delta$ Lf correlated with more advanced disease and an unfavourable prognosis [5,6]. This downregulation is mainly due to genetic and epigenetic modifications which have been found on the *Lf* gene in some forms of cancer [7,8].  $\Delta$ Lf mRNAs derive from the transcription of the *Lf* gene at the alternative P2 promoter leading, after translation, to a 73 kDa intracellular protein [4]. Although its subcellular distribution is mainly cytoplasmic, confocal microscopy analyses have clearly shown that  $\Delta$ Lf targets the nucleus [4]. Thus, we showed that  $\Delta$ Lf possesses a functional bipartite NLS motif in the C-terminal lobe [9].  $\Delta$ Lf is capable of binding DNA but the location of its DNA binding domain is not known. Two regions of Lf in which a strong concentration of positive charges was found could be good candidates [10].  $\Delta$ Lf exhibits antitumoral activities and we previously showed that overexpression of  $\Delta$ Lf leads to cell cycle arrest at the G1/S transition and apoptosis [11,12].  $\Delta$ Lf mainly exerts its anti-proliferative and pro-apoptotic activities *via* its role as a transcription factor. Indeed,  $\Delta$ Lf transactivates different target genes such as *Skp1*, *DcpS*, *Bax*, *SelH*, *GTF2F2* and *UBE2E1* [9,12-14]. A genome-wide pathway analysis and our quantitative proteomic analysis showed that the re-introduction of Lf isoforms in cancerous cells modified essential genes and/or signaling networks responsible mainly for cell survival, apoptosis and RNA processing [14,15].

Since  $\Delta$ Lf has a variety of target genes and is involved in the control of cell homeostasis, modifications in its activity or concentration may have profound consequences. Its transcriptional activity is controlled by posttranslational modifications (PTM) among which *O*-GlcNAcylation, is a key link between nutrient sensing and signaling, which notably regulates gene activation due to *O*-GlcNAc cycling on gene-specific transcription factors and components of the basal transcriptional machinery [reviewed in 16]. The targeting of S10 by *O*-GlcNAcylation negatively regulates  $\Delta$ Lf transcriptional activity whereas phosphorylation increases it [17]. Deglycosylation leads to DNA binding and basal transactivation level which was markedly enhanced when phosphorylation was present at S10.  $\Delta$ Lf possesses a functional PEST sequence which drives the protein to its proteasomal degradation after polyubiquitination of the K379 and/or K391 lysine residues.  $\Delta$ Lf stability is also under the



control of *O*-GlcNAcylation. Indeed, *O*-GlcNAcylation at S10 protects  $\Delta$ Lf from polyubiquitination increasing its half-life whereas phosphorylation favours its proteosomal degradation [17].

Recently, we discovered that  $\Delta$ Lf was also modified by SUMOylation. The small ubiquitin-related modifier (SUMO) is involved in many aspects of cell function and affects pathways as diverse as DNA repair, cell cycle, transcriptional regulation, RNA processing, and cell signaling [18,19]. At a molecular level, SUMOylation of target proteins alters their protein-protein interactions, localization, stability or/and activity [20]. Many transcription factors are targeted by SUMOylation and in most cases SUMOylation triggers transcriptional repression by recruiting transcriptional co-repressors, such as histone deacetylases [21-23]. Four different SUMO isoforms (SUMO-1-4) have been identified in higher eukaryotes, although only SUMO-1-3 seem to be covalently attached to proteins. SUMO-2 and SUMO-3 share 96 % identity, and both have approximately 46 % identity with SUMO-1. The attachment of SUMO is a multi-step process analogous to that of ubiquitin. Thus, the SUMO pathway is mediated by SUMO-activating enzymes (E1), a unique SUMO-conjugating enzyme (E2) called Ubc9 and SUMO-ligases (E3). SUMOylation is a highly dynamic process which can be reversed by the activity of SUMO-specific isopeptidases (SENPs) [24].

SUMOs are conjugated to lysine residues in a  $\Psi$ KXE/D sequence where  $\Psi$  is a large hydrophobic amino acid residue and X represents any amino acid [25]. This motif is sufficient by itself to mediate a direct interaction with Ubc9 [25,26]. Extended SUMO consensus motifs such as the negatively charged amino acid-dependent SUMO motif (NDSM) that possesses an acidic patch downstream of the  $\Psi$ KXE/D motif, the phosphorylation-dependent SUMO motif (PDSM) that includes a phosphorylation site downstream of the consensus core motif and the hydrophobic cluster SUMOylation motif (HCSM) that contains several hydrophobic residues located N-terminal to the core motif has been described to promote substrate SUMOylation *via* additional interaction with Ubc9 [27-29]. Moreover, several proteins are also modified at other sites and until now it is not known how these non-consensus sites are recognized. However, substrates with SUMO-interacting motif (SIM) could be SUMOylated within a non-consensus SUMO motif [30] and, as shown for the Death domain-associated protein 6 Daxx, phosphorylation of SIMs enhances SUMO-1 binding and conjugation [31]. SUMO-1 can be attached either to a single or to multiple lysine residues within a target protein leading either to mono- or multi-SUMOylation, respectively whereas chain formation is attributed to SUMO-2/3 [32]. However, [27] identified the human Topoisomerase I as a poly-SUMO-1 target. On the other hand, SUMO-1 may be attached to lysine residues within SUMO-2/3

chains thereby preventing its elongation and acting therefore as a SUMO chain terminator [32,33]. Recently, mixed SUMO/ubiquitin chains have been reported [34].

Crosstalk between the SUMOylation, ubiquitination, and acetylation pathways is crucial for the regulation of protein activity and/or stability since these modifications may have different, sometimes opposing consequences [35]. Thus, SUMOylation can stabilize proteins by competing with ubiquitin [36,37]. However, heterogeneous SUMO2/3-ubiquitin chains were found on I $\kappa$ B $\alpha$  and PLM (promyelocytic leukemia) protein, contributing to their optimal proteosomal degradation [38]. Switches between SUMOylation and acetylation have also been reported for several proteins. SUMOylation of the myocyte-specific enhancer factor 2A (MEF2A) inhibits its transcriptional activity whereas acetylation increases it [39]. A similar SUMO to acetyl switch has also been described for the hypermethylated in cancer 1 protein (HIC1) [40].

Here we demonstrate that the stability and transcriptional activity of  $\Delta$ Lf are regulated by SUMOylation, which provides a novel regulatory mechanism for controlling  $\Delta$ Lf function. We identified the major SUMO and acetylation acceptor sites and we evaluated the impact of the SUMOylation/ubiquitin and the SUMOylation/acetylation interplays.

## Experimental Section

### Cell culture, transfection, and reagents

HEK-293 cells (ATC CRL-1573) were grown in monolayers and transfected (1  $\mu$ g of DNA for  $1 \times 10^6$  cells) using DreamFect<sup>TM</sup> (OZ Biosciences, Marseille, France) as described [17]. The amounts of  $\Delta$ Lf expression vectors were adjusted to maintain  $\Delta$ Lf amounts similar to those found in normal NBEC cells [5,6]. Transfections were done in triplicate ( $n \geq 5$ ). Cell viability was assessed by counting using Trypan blue 0.4% (v/v). To measure the  $\Delta$ Lf turnover rate indirectly, we performed incubations with cycloheximide, a potent inhibitor of *de novo* protein synthesis [41,42]. Cells were transfected with either  $\Delta$ Lf (WT), the SUMO mutant constructs or null vector (NV) then incubated with fresh medium supplemented by 10  $\mu$ g/mL cycloheximide (CHX) for 0-150 min 24 h post transfection as described [17]. Inhibition of proteosomal degradation was performed by incubating cells with a 10  $\mu$ M concentration of the proteasomal inhibitor MG132 for 2 h prior to lysis as described [17]. Inhibition of histone deacetylases was performed by incubating cells with Trichostatin A

(TSA) at 15 ng/mL TSA (TSA treated cells) or not overnight. Cell culture reagents were from Lonza. Other reagents were from Sigma.

### Plasmid preparation

pGL3-S1<sup>Skp1</sup>-Luc [9] and p3xFLAG-CMV10- $\Delta$ Lf (WT) [17] were constructed as described. p3xFLAG-CMV10 (Sigma, St Louis, MO, USA) was used as a null vector (NV). The hemagglutinin A-Ubiquitin (HA-Ub) expression vector was a gift from Dr. C. Couturier (UMR-CNRS 8161, IBL, Lille, France). The psG5-His-SUMO-1 (His-SUMO-1) and pcDNA3-SEN2-SV5 (SEN2) expression vectors were a kind gift from Dr. D. Leprince (UMR-CNRS 8161, IBL, Lille, France). All plasmids were purified using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen Germantown, MD) according to the manufacturer's specifications.

### Reporter gene assays

Reporter gene assays were performed using the pGL3-S1<sup>Skp1</sup>-Luc reporter vector containing a single  $\Delta$ LfRE and the WT, different  $\Delta$ Lf SUMO mutant constructs or a null vector. HEK-293 cells were synchronized overnight in medium containing 1 % FCS before being transfected (250 ng of DNA for  $2 \times 10^5$  cells: 50 ng of reporter vector and 200 ng of  $\Delta$ Lf, SUMO mutants or null vector) using DreamFect<sup>TM</sup> (OZ Biosciences, Marseille, France) as described in [17]. Reporter gene assays were also performed in the presence of psG5-His-SUMO-1 (200 ng of DNA) or either in the presence of pcDNA3-SEN2-SV5 expression vectors (200 ng of DNA) or TSA (15 ng/mL, overnight) with their respective controls. Reporter gene assays on Ubc9 knockdown cells were performed in two steps. Cells were siUbc9/siCtrl (5 nM) transfected in serum-free medium which was supplemented 4 h post transfection with 1% FCS. Twenty hours later cells were transfected with WT or mutant constructs and the reporter gene. Cell lysates were assayed using a luciferase assay kit (Promega) in a Tristar multimode microplate reader LB 941 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Basal luciferase expression was assayed using a null vector and was determined for each condition. Relative luciferase activities were normalized to basal luciferase expression and  $\Delta$ Lf content as in [12] and expressed as a percentage; 100 % corresponds to the relative luciferase activity of WT. Each experiment represents at least three sets of independent triplicates.

## Site-directed mutagenesis

Mutants were generated using the QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Garden Grove, CA) according to the manufacturer's instructions with p3xFLAG-CMV10- $\Delta$ Lf as template and primer pairs listed in Table S1. The constructs in which several sites were mutated were done sequentially. Following sequence verification, positive clones were used directly in transfection.

**Table S1: Name of mutant constructs, location of amino acid modifications and oligonucleotides used for mutagenesis.**

Name of mutants	Mutated amino acid(s)	Site-directed mutagenesis oligonucleotides
$\Delta$ Lf <sup>K13R</sup>	K13R	F: 5'-CTCCTGTCAGCTGCATACGGAGAGACTCCCCATC-3' R: 5'-GATGGGGGAGTCTCTCCGTATGCAGCTGACAGGAG-3'
$\Delta$ Lf <sup>K308R</sup>	K308R	F: 5'-CATCCAGAACTTGAGGAGAAGTGAGGAGGAAGTGG-3' R: 5'-CCACTTCCTCCTCACTTCTCCTCAAGTTCTGGATG-3'
$\Delta$ Lf <sup>K361R</sup>	K361R	F: 5'-ACTGCATCGCCCTGGTGCTGAGAGGAGAAGCTGAT-3' R: 5'-ATCAGCTTCTCCTCTCAGCACCAGGGCGATGCAGT-3'
$\Delta$ Lf <sup>K379R</sup>	K379R	F: 5'-TGTGTACACTGCATGCAGATGTGGTTTGGTGCCTG-3' R: 5'-CAGGCACCAAACCACATCTGCATGCAGTGTACACA-3'
$\Delta$ Lf <sup>K391R</sup>	K391R	F: 5'-CCTGGCAGAGAACTACAGATCCCAACAAAGCAGTG-3' R: 5'-CACTGCTTTGTTGGGATCTGTAGTTCTCTGCCAGG-3'
K13	K308R, K361R, K379R, K391R	
K308	K13R, K361R, K379R, K391R	
K361	K13R, K308R, K379R, K391R	
K379	K13R, K308R, K361R, K391R	
K391	K13R, K308R, K361R, K379R	
M5S	K13R, K308R, K361R, K379R, K391R	

## Ubc9 invalidation

HEK-293 cells ( $2 \times 10^6$  cells in 100-mm dish) were transfected with RNAiMax (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions, using 5 nM of siRNAs targeting Ubc9 (Hs\_UBE2I\_8 FlexiTube siRNA, Qiagen) or a scrambled control sequence (siCtrl) (Qiagen). Cells were harvested 48 h post-transfection and lysed. Cell extracts were assayed for Ubc9 content and SUMOylation levels.

## Western blotting and immunodetection

Proteins were extracted from frozen cell pellets in RIPA buffer as described [9]. In order to inhibit de-SUMOylation of proteins, N-Ethylmaleimide (NEM) was added at 20 mM to lysis, Western blot and immunoprecipitation (IP) buffers. For direct immunoblotting, samples

mixed with 4x Laemmli buffer were boiled for 5 min. Otherwise 10 µg of protein from each sample or immunocomplexes were submitted to 6 % SDS-PAGE for IP, 7.5 % SDS-PAGE for input and 12.5 % SDS-PAGE for Ubc9 WB prior to immunoblotting. For immunoprecipitation experiments, 1 or 1.5 mg of total protein were preabsorbed with 20 µL protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare). M2 (1/500), anti-acetyllysine (1/1000) or anti-SUMO-1 (1/100) antibodies were mixed with 40 µL Protein G Sepharose beads for 1 h prior to an overnight incubation with the preabsorbed lysate supernatant at 4°C. The beads were then washed five times with lysis buffer. Proteins bound to the beads were eluted with 4X Laemmli buffer and analyzed by immunoblotting as above. Blots were first blocked in 5 % non-fat milk for 1 h at room temperature prior being probed with primary antibodies (M2, 1/2000; HA.11, 1/1000; anti-Ubc9, 1/1000; anti-His, 1/1000 ; anti-SUMO-1, 1/1000; anti-SUMO-2/3, 1/500; anti-acetyllysine, 1/1000; anti-GAPDH, 1/3000) overnight at 4 °C and then probed with secondary anti-IgG antibodies conjugated to horseradish peroxidase (1/10000) for 1 h at room temperature before detection by chemiluminescence (ECL Advance or ECL Select, GE Healthcare Life Sciences). Each result in which immunoblots are presented corresponds to one representative experiment among at least three.

Antibodies against the 3xFLAG epitope (mouse monoclonal anti-FLAG M2 antibody, Sigma), HA epitope (mouse monoclonal HA.11 antibody 16B12, Covance Research Products), 6XHis epitope (mouse monoclonal anti-6XHis P5A11 antibody for WB, Biolegend; mouse monoclonal anti-His AD1.10 antibody for IP, Santa Cruz Biotechnology), SUMO-1 (rabbit monoclonal anti-SUMO-1, Millipore), SUMO-2/3 (rabbit polyclonal anti-SUMO-2/3, Millipore), Ubc9 (rabbit monoclonal antibody anti-Ubc9, Cell Signaling), acetyllysine (rabbit polyclonal anti-acetyllysine, ABCAM), GAPDH (rabbit polyclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antibody, Santa Cruz Biotechnologies) were used for immunoprecipitation and/or immunoblotting. Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase were purchased from GE Healthcare Life Sciences. All the antibodies were used according to the manufacturer's instructions.

## Densitometric and statistical analyses

The densitometric analysis was performed using the Quantity One v4.1 software (Bio-Rad, Hercules, CA) or *ImageJ* and statistical analyses were performed with PRISM 5 software (Graphpad, USA). M2 densitometric values were normalized to GAPDH and expressed as  $D^{M2}/D^{GAPDH}$ . Means were statistically analysed using the t-test or ANOVA and

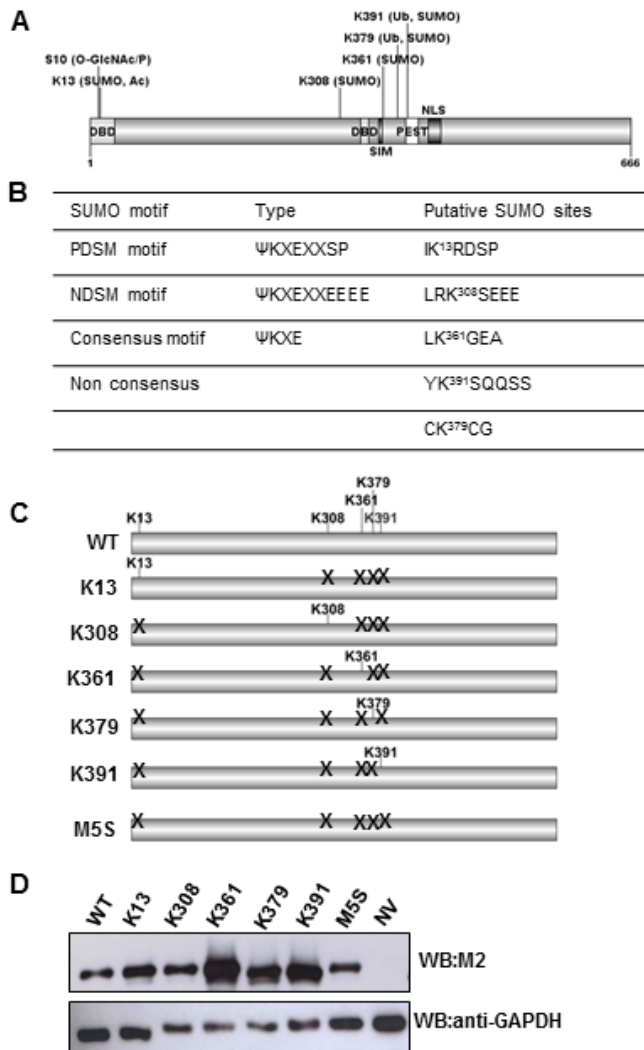
differences assessed at  $p < 0.05$  (\*) or  $p < 0.01$  (\*\*). SUMO-1 and acetyllysine densitometric values were normalized to M2 and expressed as  $D^{\text{SUMO}}/D^{\text{M2}} (R^{\text{SUMO}})$  and  $D^{\text{Ac}}/D^{\text{M2}} (R^{\text{Ac}})$ . The acetylation/SUMOylation ratio corresponds to  $R^{\text{Ac}}/R^{\text{SUMO}}$  with the the WT ratio in the siCtrl condition arbitrarily set as 100 %.

## Results

### $\Delta$ Lf possesses putative SUMO and acetylation sites and a putative SIMr motif

*In silico* analysis of the  $\Delta$ Lf sequence with SUMOsp (<http://sumosp.biocuckoo.org/>) and SUMOplot<sup>TM</sup> (<http://www.abgent.com/tools/sumoplot/>) softwares revealed four lysine residues to be putative SUMO acceptors: K13 and K361 that are in the canonical  $\Psi$ KXE/D motifs and K308 and K391 in non-canonical SUMO sequences (Fig. 1 A-B). The K13 consensus motif is of the PDSM-like type and the K308 motif of the NDSM-like type. Since competition between SUMO and ubiquitin ligases often occurs at ubiquitin sites, K379 which is the main ubiquitinated target on  $\Delta$ Lf [17] was also investigated. K13 is within the first putative DBD and next to S10, the main *O*-GlcNAcylation/Phosphorylation site we previously demonstrated to control  $\Delta$ Lf transcriptional activity and stability [17]. Interestingly, K13 is also a putative acetylation site predicted using PAIL (prediction of acetylation on internal lysine [43]) (<http://bdmpail.biocuckoo.org/prediction.php>). The four other putative sites are concentrated in the central part of the protein, before the second DBD for K308, between this DBD and the PEST sequence for K361 and K379, and within the PEST sequence for K391 (Fig. 1A-B).

In the case of a SUMO consensus motif, the target lysine is directly recognized by the conjugating enzyme Ubc9 whereas in the case of a non-consensus sequence, the recruitment of SUMO-loaded Ubc9 is realized *via* interactions with a SIM motif, which increases the modification of proximal lysine residues [30,44,45]. Thus, the prediction of SIM motifs using the GPS-SBM 1.0 User Interface software [46] reveals the presence of one SIM motif within the central region of  $\Delta$ Lf, near to the K361 site (Fig 1A). This motif is in a reversed orientation (SIMr) (Table 1) with four hydrophobic positions preceded by an acidic cluster



**Figure 1:  $\Delta$ Lf possesses putative SUMO sites.** A) Schematic overview of  $\Delta$ Lf showing the NLS and PEST sequences, the two putative DBD and the putative SIM domain. The amino acid residues targeted by post-translational modifications are shown, S10 as the main *O*-GlcNAc/P site, K379 and K391 as the two ubiquitinated lysines, K13 as a putative acetylation site. B) Consensus motif for each SUMO acceptor sites. C) Schematic representation of  $\Delta$ Lf SUMO mutant constructs. D) Expression of pCMV-3xFLAG- $\Delta$ Lf<sup>WT</sup> (WT) and its SUMOylation mutants. WT and the above constructs were transfected for 24 h prior to lysis. Whole cell extract was immunoblotted with either anti-FLAG M2 or anti-GAPDH antibodies. NV: null vector (pCMV-3xFLAG).

and by a serine residue. Phosphorylation of SIM-associated serine residues is known to favor efficient recognition of SUMO [37,47]. Comparison of this motif with homologs from a number of vertebrate species reveals that it is conserved in Lf/ $\Delta$ Lf (Table 1). The functional significance of this motif and its role in  $\Delta$ Lf SUMOylation remain to be investigated.

The low abundance of  $\Delta$ Lf and the feeble percentage of SUMOylated conjugates rendered the detection of SUMOylated  $\Delta$ Lf and the subsequent mapping of its SUMO sites

**Table 1. SUMO Interacting Motifs in human  $\Delta$ Lf and Lf from different species compared to the SIMr consensus (D/E)<sub>3</sub>V/C L/V I/V V - E [37].**

$\Delta$ Lf/Lf	SUMO Interacting Motif <sup>a</sup>	Accession number
Human $\Delta$ Lf <sup>b</sup>	<sup>350</sup> <u>S</u> <i><b>T T E D C I A L V L K G E</b></i> <sup>363</sup>	Q5EKS1
Bovine Lf <sup>c</sup>	<sup>375</sup> <u>S</u> <i><b>T T D D C I V L V L K G E</b></i> <sup>388</sup>	P24627
Goat Lf	<sup>375</sup> <u>S</u> <i><b>T T D D C I A L V L K G E</b></i> <sup>388</sup>	Q29477
Mouse Lf	<sup>373</sup> <u>P</u> <i><b>T T E D C I V A I M K G D</b></i> <sup>386</sup>	P08071
Pig Lf	<sup>371</sup> <u>S</u> <i><b>T T E D C I V Q V L K G E</b></i> <sup>384</sup>	P14632
Horse Lf	<sup>375</sup> <u>S</u> <i><b>T T E E C I A L V L K G E</b></i> <sup>388</sup>	O77811
Sheep Lf	<sup>375</sup> <u>S</u> <i><b>T T D E C I A L V L K G E</b></i> <sup>388</sup>	AY792499
Camel Lf	<sup>375</sup> <u>S</u> <i><b>T T E D C I A L V L K G E</b></i> <sup>388</sup>	AJ131674

<sup>a</sup>The single-letter amino acid code is used; bold letters indicate the hydrophobic positions of the putative SUMO interacting motif, the acidic cluster is in italics, the SIM-associated serine residues are underlined. <sup>b</sup>The numbering of the amino acid residues corresponds to human  $\Delta$ Lf. <sup>c</sup>The numbering of the amino acid residues corresponds to Lfs.

extremely difficult. Therefore we used a 3xFLAG-tagged  $\Delta$ Lf in order to detect it and we constructed SUMOylation mutants to confirm the presence of the SUMO sites and characterize their roles. Mutation of each individual lysine residue did not abolish SUMOylation of the entire molecule (data not shown). Thus, we produced a series of mutant constructs in which only one putative SUMO site was preserved. We first invalidated the four predicted sites: K13, K308, K361, and K391 but SUMOylation was still visible on the M4S mutant (data not shown). Therefore, since ubiquitination sites can also be targeted by SUMO ligases, we next replaced K379 by an arginine residue in each construct. We obtained a series of SUMO mutants (Table S1, Fig 1C) named K13, K308, K361, K379 and K391, respectively and the M5S mutant in which all putative SUMOylation sites were abolished (Fig 1C).  $\Delta$ Lf and its SUMOylation mutants were then expressed in HEK-293 cells which do not produce  $\Delta$ Lf endogeneously. We detected 3xFLAG-tagged  $\Delta$ Lf isoforms as a single band of the expected 75 kDa predicted molecular weight. The level of their expression was compared and Figure 1D shows that they were expressed at least at the same level as WT. K391, K379 and notably K361 were expressed at a higher level than the other mutants.

### Mapping the main SUMO sites

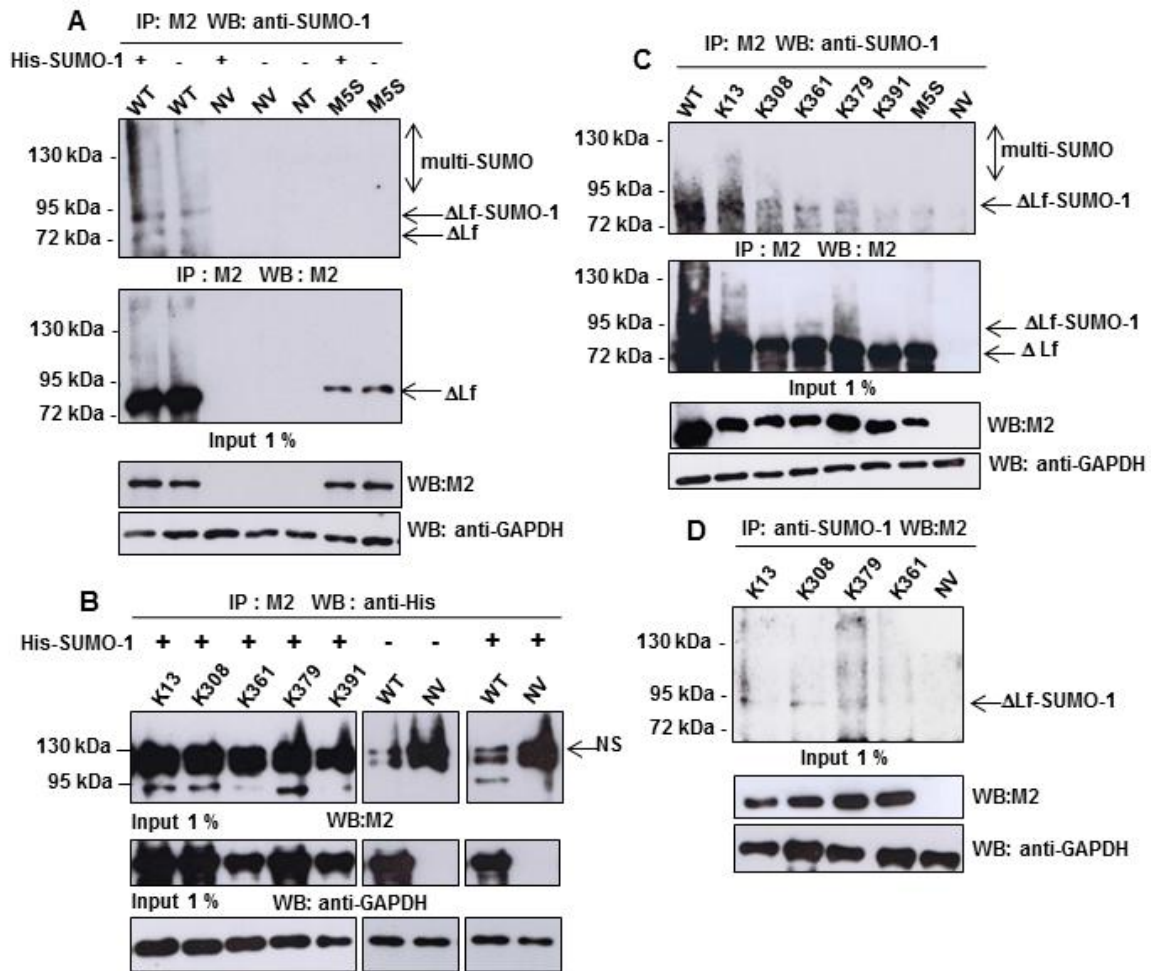
SUMOylation was first investigated on WT and M5S which were co-transfected with or without the SUMO-1 expression vector. An immunoprecipitation was then performed using the anti-FLAG antibody in order to specifically immunoprecipitate  $\Delta$ Lf or its SUMO variants.



SUMOylation was then investigated using anti-SUMO-1 antibodies. Figure 2A shows that  $\Delta$ Lf was effectively SUMOylated and that SUMOylation was increased when SUMO-1 was overexpressed. Higher molecular weight bands which may correspond to poly- or multi-SUMOylated forms and a faint band of around 90 kDa corresponding to  $\Delta$ Lf-SUMO-1 form were observed. The feeble amount of SUMO-conjugates (Fig 2A upper panel) compared to unmodified  $\Delta$ Lf (Fig 2A middle panel) is in accordance with the literature. Thus, for most SUMOylated proteins, the levels of the SUMO forms are low relative to the unmodified form due to an efficient SUMOylation/deSUMOylation balance in cells [35]. A small band corresponding to the non-SUMOylated parental form of  $\Delta$ Lf is also visible confirming partial de-SUMOylation (Fig 2A upper panel). M5S is not SUMOylated even when SUMO-1 was overexpressed confirming that no other SUMO sites are present on the protein (Fig 2A, upper panel). Moreover, overexposure of this film failed to show additional bands that could suggest SUMOylation of the M5S construct (data not shown).

In order to identify SUMO acceptor sites, SUMO mutants were co-transfected with the His-SUMO-1 expression vector. A band of around 90 kDa corresponding to  $\Delta$ Lf-SUMO-1 forms is visible in each lane confirming that the five predicted sites are effectively SUMOylated (Fig. 2B). SUMOs are 11 kDa proteins, but they appear larger on SDS-PAGE and add around 20 kDa to the apparent molecular weight of most substrates [19]. K13, K308 and K379 are the three main sites. Surprisingly, the K361 mutant which possesses a predictive SUMO sequence that perfectly fits the optimal  $\Psi$ KXE consensus sequence is poorly modified, as was K391. Overexpression or not of SUMO-1 did not modify the SUMO profile of the latter site confirming that it is not preferentially targeted by the SUMO machinery (Fig 2B-2C). K391 is also ubiquitinated but it was not the main ubiquitin target site [17]. Interestingly, K379 which is the main ubiquitination site is also a good acceptor of SUMO, even though this lysine residue does not belong to a SUMO consensus sequence. Control of specificity of His antibodies has been added since these antibodies revealed bands above 110 kDa even when His-SUMO-1 was not overexpressed (Fig. 2B, right panels).

We next tried to evaluate whether SUMOylation modifies  $\Delta$ Lf *in vivo*. The presence of SUMO proteases (SENPs) within the cells and also in cell extracts poses a significant problem for the detection of SUMOylated proteins. Therefore, we used N-Ethylmaleimide (NEM), which blocks cysteine proteases, as an SENPs inhibitor. Since NEM is not cell permeable we used it during cell lysis and immunoprecipitation steps.  $\Delta$ Lf-expressing cell lysates were immunoprecipitated with M2 and SUMO forms immunodetected with anti-



**Figure 2: Mapping of the SUMO sites of  $\Delta$ Lf.** A)  $\Delta$ Lf is SUMOylated and M5S is not. WT and the M5S mutant construct were co-transfected with or without the pSG5-His-SUMO-1 (His-SUMO-1) plasmid in HEK-293 cells for 24 h prior to lysis. Lysates were immunoprecipitated with M2 and immunoblotted with anti-SUMO-1 antibodies and M2. Lysates from HEK-293 cells transfected with a null vector (NV) and from non-transfected (NT) cells were used as negative controls. The data presented correspond to one representative experiment of at least three conducted ( $n \geq 3$ ). (B) K13, K308 and K379 are the main SUMO-1 sites. Cells were co-transfected by WT or the mutant constructs and pSG5-His-SUMO-1 plasmid and then lysed 24 h later. Lysates were immunoprecipitated with M2 and immunoblotted with anti-His. Input was immunoblotted with either M2 or anti-GAPDH antibodies and used as loading control. The data presented correspond to one representative experiment of at least three conducted ( $n \geq 3$ ). C-D) WT and its mutants are SUMOylated *in vivo*. WT and the SUMO mutant constructs were transfected for 24 h prior to lysis. Whole cell extracts were immunoprecipitated with M2 and immunoblotted with either anti-SUMO-1 antibodies or M2 (C). Reverse immunoprecipitation was also performed (D). 1 % of the cell extract (input) was immunoblotted with either M2 or anti-GAPDH antibodies used as loading control. Inhibition of proteosomal degradation was performed by incubating cells with MG132 for 2 h prior to lysis and inhibition of de-SUMOylation was performed by adding NEM to lysis, IP and WB buffers as in Material and Methods. The data presented correspond to one representative experiment of at least three conducted ( $n \geq 3$ ).

SUMO-1 antibodies (Fig. 2C). Slow migrating bands of strong intensity were detected for WT (upper panel) which might be due to the fact that WT is multi-SUMOylated. SUMO forms were also observed for K13, K308, K361 and K379 mutants whereas the K391 mutant seems

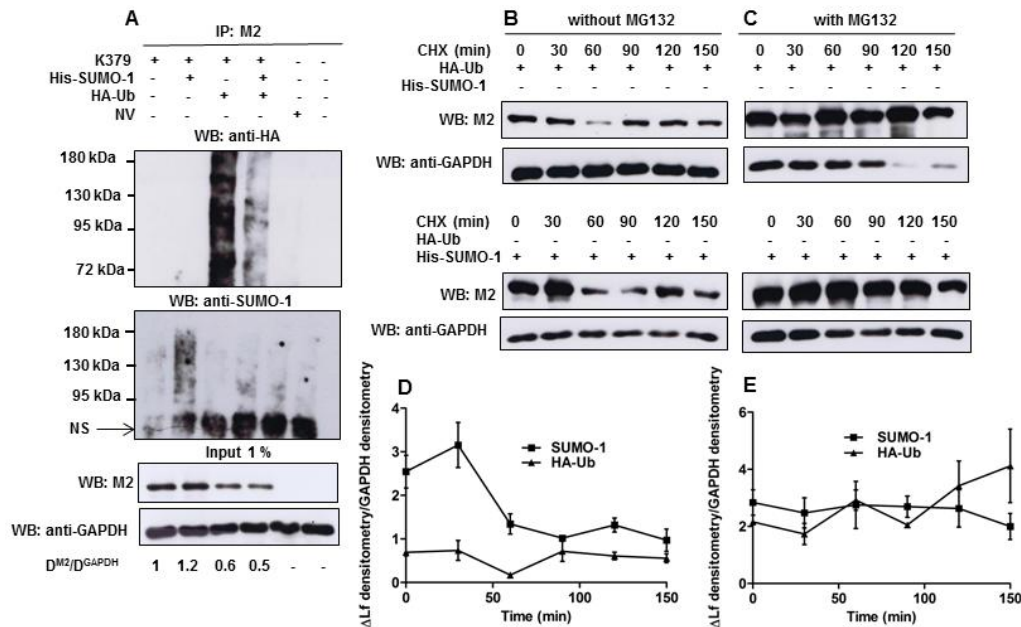
poorly or even not modified (Fig 2C, upper panel). Mutants that are unable to ubiquitinate such as K13, K308 and K361 seem better in promoting SUMOylation of  $\Delta$ Lf (Fig 2C, lanes 2-4). Immunodetection by M2 showed the presence of a ladder of bands for WT, K13 and K379 confirming possible multi- and/or poly-modification (Fig 2C, middle panel). A slow migrating band around 90 kDa was visible for K308 and K361 confirming the existence of a mono-SUMO-conjugated form of  $\Delta$ Lf. On the other hand, the strong ladder pattern (Fig. 2C, middle panel) observed for WT and K379 may also partially be due to ubiquitination as already described [17] suggesting that a competition between SUMO and ubiquitin modifications may occur. Since K13 is unable to ubiquitinate, ladder bars might correspond to polySUMOylation. Therefore, M2 immunoprecipitation followed by SUMO2/3 immunodetection of WT and SUMO mutant cell extracts was performed but we were unable to observe SUMO2/3 modifications on WT or its SUMO mutants (data not shown). The figure 2D corresponds to the reverse immunoprecipitation of K13, K308, K361 and K379 cell lysates with anti-SUMO-1 antibodies followed by M2 immunodetection. A faint band  $\Delta$ Lf-SUMO-1 is visible. A strong poly-SUMO pattern is observed for K379. Since mixed SUMO/ubiquitin chain could be formed we will further investigate whether  $\Delta$ Lf might be modified at K379 by such a complex.

Collectively these results indicated that  $\Delta$ Lf is SUMOylated at multiple lysine residues and that the band shift of  $\Delta$ Lf was indeed due to the covalent attachment of SUMO-1 with K13, K308 and K379 as hot spots of SUMOylation.

### The SUMOylation/ubiquitination interplay at K379 controls $\Delta$ Lf stability

Since, as for many transcription factors,  $\Delta$ Lf is rapidly degraded, we previously demonstrated that its turnover was dependent on both the Ub-proteasome pathway and the O-GlcNAc/Phosphate interplay [17]. We also targeted K379 as the major site for  $\Delta$ Lf poly-ubiquitination. Since K379 is also targeted by SUMO ligases we next investigated whether a crosstalk exists between the ubiquitin and SUMO pathways. Figure 3A shows that a ladder of polyubiquitinated K379 forms is visible in the presence of recombinant HA-Ubiquitin (upper panel, lane 3). The intensity of the polyubiquitination signal decreases when SUMO-1 peptides are overexpressed (Fig 3A upper panel, lane 4). After stripping, the immunoblot was revealed using anti-SUMO-1 antibodies (middle panel). This time we can observe a decrease in the SUMO signal in the presence of recombinant ubiquitin (Fig 3A, middle panel, lanes 2 and 4). Loadings of K379 (input) confirmed that in the presence of recombinant ubiquitin the

expression level of K379 is lower than in the untreated condition or when SUMO-1 is overexpressed. These data support the view that K379 is indeed the target of an Ubiquitin/SUMO switch.



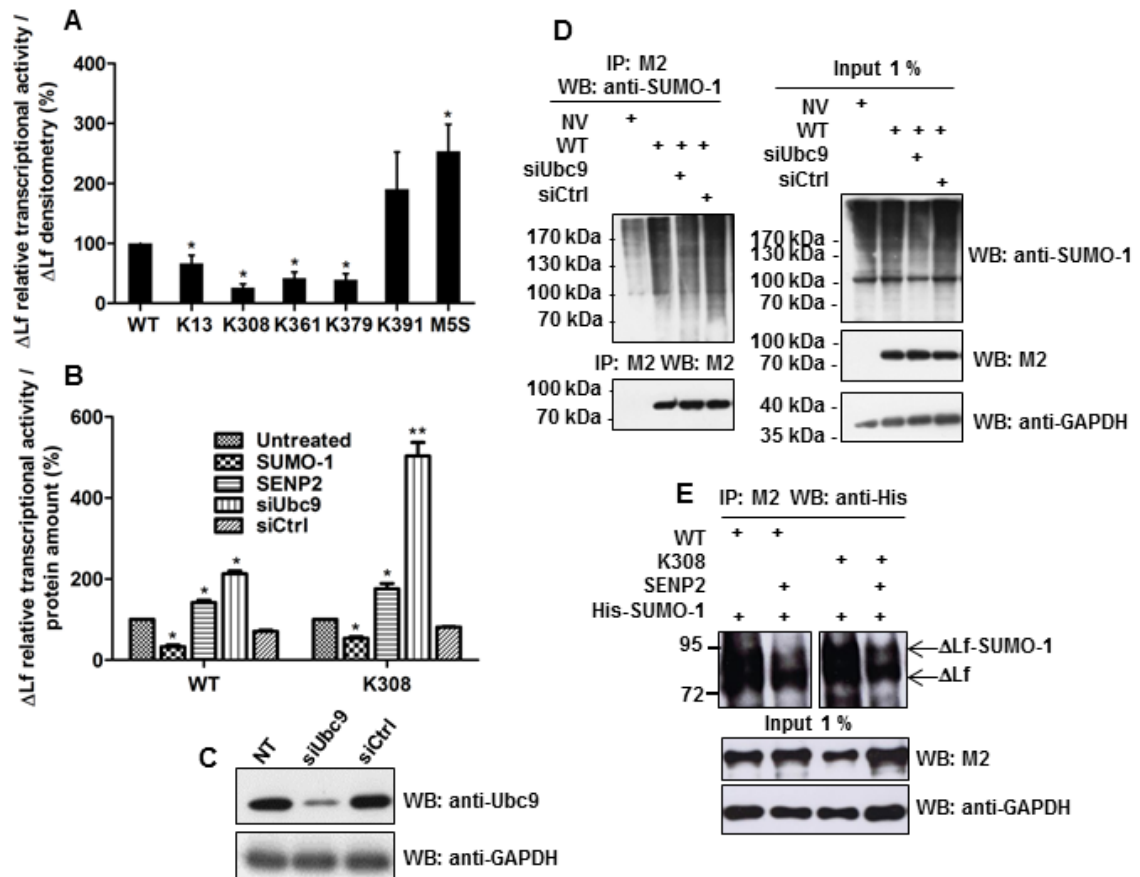
**Figure 3: Competition between SUMOylation and ubiquitination at K379 controls  $\Delta$ Lf turnover.** A) HEK-293 cells were co-transfected with K379 or NV constructs, His-SUMO-1 or/and HA-Ub-expression vectors for 24 h and then incubated with 10  $\mu$ M of the proteasomal inhibitor MG132 for 2 h prior to lysis. NEM was added to lysis, IP and WB buffers. Total cell extracts were immunoprecipitated with M2 or used as input. Samples were immunoblotted with anti-HA (upper panel) or with anti-SUMO-1 (lower panel) antibodies. Input was immunoblotted with either M2 or anti-GAPDH antibodies and used as loading control. NS: no specific. The data presented correspond to one representative experiment of at least three conducted ( $n \geq 3$ ). Lane 6 corresponds to non-transfected cells. B-C) Cells were transfected with K379, either with the His-SUMO-1 or the HA-Ub expression vector and then incubated with fresh medium supplemented by 10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> CHX for the indicated time 24 h after transfection. K379 transfected cells were incubated without (B) or with (C) 10  $\mu$ M MG132 for 2 h prior to lysis. Total protein extracts were immunoblotted with either M2 or anti-GAPDH antibodies. The data presented (B-C) correspond to one representative experiment of at least two conducted. D-E) The M2 densitometric analyses are normalized for the matching GAPDH immunoblots and expressed as ratio  $D^{K379}/D^{GAPDH}$  as described in Materials and Methods. Data are shown as the means  $\pm$  SD ( $n = 2$ ).

We next investigated whether this interplay acts on K379 stability. To measure the K379 turnover rate indirectly, we performed incubations (0-150 min) with cycloheximide (CHX), a potent inhibitor of *de novo* protein synthesis. The K379 (panels 1 and 3) and GAPDH (panels 2 and 4) contents of HEK-293 cells were analysed following addition of CHX (Figs 3B-C). GAPDH was used as an internal control. Differences in the steady state levels of K379 mutant were readily apparent after 60 min, which may correspond to the delay necessary for observing the first effects of treatment. HA-Ubiquitin (HA-Ub) or His-SUMO-1 (SUMO-1)

expression vectors were co-transfected in HEK-293 cells with the K379 construct (Figs. 3B-C). Densitometric data are expressed as  $D^{K379}/D^{GAPDH}$  ratio as described in Materials and Methods (Figs. 3D-E). HA-Ub overexpression led to an overall 3-fold decrease in K379 stability compared to His-SUMO-1 treated cells (Fig. 3D) confirming that increasing ubiquitination drives  $\Delta Lf$  to degradation as we showed previously [17]. When K379-expressing cells overexpressed the SUMO-1 peptide, the stability of the mutant was comparable to that of untreated K379 mutant (data not shown). The same experiment was conducted with MG132 and densitometric results showed that K379 is highly stable when the degradation of ubiquitin-conjugated proteins is reduced, whatever the applied treatments (Figs. 3C, 3E). Taken together these results confirmed, as already described for other substrates, that SUMOylation may antagonise ubiquitination at K379 and hence positively affect the proteolytic stability of  $\Delta Lf$ .

### SUMOylation of $\Delta Lf$ represses its transcriptional activity

To study the physiological consequences of  $\Delta Lf$  SUMOylation, we next assayed the transcriptional activity of the mutants compared to wild type (Fig. 4A). SUMOylation usually triggers recruitment of corepressors such HDACs which condense chromatin and prevent transcription. We used a luciferase reporter construct driven by a basal promoter and one  $\Delta Lf$  response element present in a fragment of the *Skp1* promoter [9]. In this experiment, the cells were not co-transfected with His-SUMO-1, so the status of  $\Delta Lf$  SUMOylation completely relied on endogenous SUMO activity. The 2.5-fold increased transcriptional activity of the SUMOylation-null mutant confirmed that SUMOylation negatively regulates  $\Delta Lf$  transcriptional activity. Since M5S could not be SUMOylated, over-expression of this mutant without co-expression of SUMO-1 justified the conclusion drawn here stating the SUMOylation of  $\Delta Lf$  is part of a regulatory event that governs its activity. The small amount of  $\Delta Lf$ -SUMO forms present in cells could not account for the 2.5 fold increment observed in the transcriptional activity induced by the M5S mutant compared to WT. This has been already described for numerous transcription factors and suggests that SUMOylation is required to initiate transcriptional repression but not to maintain it [19,48]. We then compared the activity of mutants in which only one SUMOylation site was preserved to that of M5S in order to evaluate the impact of adding only one regulatory site at a time. The K391 mutant which is poorly modified showed a transcriptional activity nearly comparable to that of M5S (Fig. 4A) suggesting that the presence of SUMO on this site does not crucially regulate  $\Delta Lf$



**Figure 4: SUMOylation of  $\Delta$ Lf represses its transcriptional activity.** A) Cells were co-transfected with pGL3-S1<sup>Skp1</sup>-Luc reporter vector and WT, SUMO mutant constructs or null vector in order to assay the relative transcriptional activity of WT and its SUMO mutants. Relative luciferase activities are expressed as described in Materials and Methods ( $n \geq 5$ ;  $p < 0.05$  (\*)). B) Alteration of SUMOylation at K308 modulates  $\Delta$ Lf transcriptional activity. Cells were co-transfected with pGL3-S1<sup>Skp1</sup>-Luc reporter vector, either WT or the K308 construct together with pSG5-His-SUMO-1 or pcDNA-SENP2-SV5. Relative luciferase activities were also assayed in Ubc9 invalidated cells. HEK-293 cells were reverse transfected for 24 h using siRNAs targeting Ubc9 (siUbc9) or a scrambled control sequence (siCtrl) before being transfected as described above to evaluate the relative transcriptional activities of  $\Delta$ Lf and the K308 mutant. Relative luciferase activities are expressed as described in Materials and Methods ( $n \geq 5$ ;  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*)). C) Invalidation of Ubc9 was performed using siUbc9/siCtrl as described in Materials and Methods and followed after 48 h of incubation by immunoblotting of the cell extracts with either anti-Ubc9 or anti-GAPDH antibodies. D) Invalidation of Ubc9 leads to a decrease in SUMOylation. Lysates were immunoprecipitated with M2 and immunoblotted with anti-SUMO-1 or M2. Input was immunoblotted with M2, anti-SUMO-1 or anti-GAPDH antibodies and used as controls. E) Deconjugation of SUMO-1 from WT and K308 by SENP2. HEK-293 cells were co-transfected with WT or the K308 construct together with pSG5-His-SUMO-1 and pcDNA-SENP2-SV5 and then lysed 24 h later. Lysates were immunoprecipitated with M2 and immunoblotted with anti-His. Input was immunoblotted with either M2 or anti-GAPDH antibodies. C-E) Cells were incubated with MG132 for 2 h prior to lysis (D, E) and NEM added to lysis, IP and WB buffers (D). The data presented correspond to one representative experiment of at least six conducted ( $n \geq 6$ ) (C) and to one representative experiment of at least two conducted ( $n \geq 2$ ) (D, E).

transcriptional activity. In contrast, the transcriptional activities of K308, K361 and K379 mutants were strongly inhibited by 10-fold for K308 and by nearly 6 fold for the other sites

compared to M5S and by 4 fold for K308 and by around 2-2.5 fold for the two other sites compared to WT suggesting that these three sites are primordial for regulation. K361 which is poorly SUMOylated is nevertheless highly involved in the repression process. The transcriptional activity of the K13 mutant also decreases but to a lesser extent, by 3.5-fold compared to M5S and by 1.5-fold compared to WT. This may be due to the SUMO/acetylation switch discussed below (Fig. 5). The transcriptional activity of the SUMO mutants K13, K361, K379 and notably K308 is lower than that of WT. This may be due to the fact that  $\Delta$ Lf is multi-SUMOylated and that the distribution of SUMO conjugates at each site leads to a “dilution” of the effect in the WT compared to the mutants with only one SUMO acceptor site which may be more heavily SUMOylated.

Since SUMO modifications on the K308 site led to the highest inhibitory impact on  $\Delta$ Lf transcriptional activity, we next focused our attention on K308 and investigated the impact of altering its SUMO pattern. Therefore we increased SUMOylation by using the His-SUMO-1 expression vector and decreased it by performing either de-SUMOylation using recombinant SENP2 protease or invalidation using specific short interfering RNA against Ubc9 (siUbc9). As shown in Fig 4B, overexpression of the His-SUMO-1 peptide strongly decreased the transcriptional activity of  $\Delta$ Lf and its K308 mutant whereas overexpression of SENP2 protease significantly increases it. Moreover, siRNA-mediated depletion of endogenous Ubc9 abolished the repressive potential of SUMOylation and led to a drastic activation of the reporter gene activity (Fig 4B). Figure 4C shows that siUbc9 efficiently invalidated Ubc9 expression leading to a decrease in the level of SUMOylation of both  $\Delta$ Lf (Fig 4D, IP, lane 3) and other protein substrates (Fig 4D, input, lane 3). Immunoprecipitation of  $\Delta$ Lf or K308-expressing cell lysates with M2 followed by immunodetection of SUMO forms using anti-His antibodies (Fig. 4E) showed that effective de-SUMOylation was produced in the presence of recombinant SENP2 and is visible in the second and fourth lanes compared to the untreated condition. Taken together, these results indicate that de-SUMOylation of  $\Delta$ Lf enhances its transcriptional activity. This combination of overexpression and knockdown experiments demonstrate that SUMOylation plays an important role in  $\Delta$ Lf-mediated transcriptional activation. Collectively, these results showed that effectively SUMOylation negatively controls  $\Delta$ Lf transcriptional activity and may convert  $\Delta$ Lf into a transcriptional repressor.

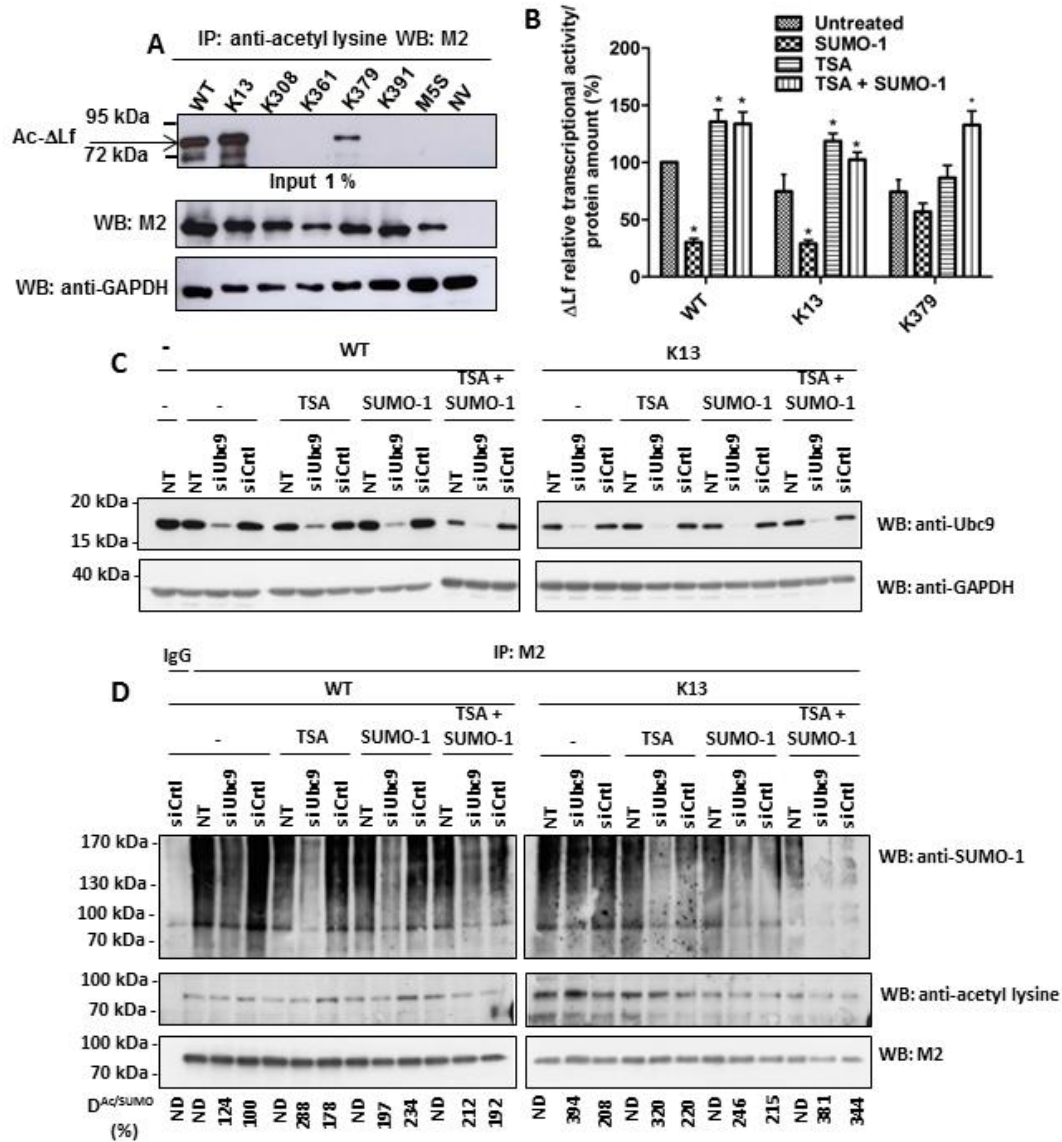
## 1) Acetylation attenuates SUMO-mediated transcriptional repression

Acetylation regulates numerous cellular processes, including the regulation of

transcription [49,50]. Acetylation of internal lysine residues is a reversible PTM which strongly alters the electrostatic properties of its targets, modulating their functions, such as protein-protein interactions, DNA binding, activity, stability and subcellular localization [22]. Since competition between SUMOylation and acetylation occurs on many substrates and a putative acetylation site was found on  $\Delta$ Lf at K13, we next investigated whether the SUMO sites might also be acceptors for acetyltransferases. We performed mapping of  $\Delta$ Lf acetylation sites by western blotting of the different expressed mutant  $\Delta$ Lfs using an anti-acetyllysine antibody. Among the five SUMOylated lysine residues, K13 and K379 were the only acetylation acceptor sites with K13 being the major acetylated residue (Fig 5A, lanes 2 and 5, respectively). Mutation of these two lysine residues in the other SUMO mutants (Figure 5A, lanes 3, 4 and 6) and in M5S (Figure 5A, lane 7) resulted in a complete loss of the acetylation signal suggesting that only two acetylation sites are present on  $\Delta$ Lf. These data also confirmed the existence of a possible interplay between acetylation and SUMOylation for K13 and suggested an acetylation/SUMOylation/ubiquitination crosstalk for K379.

We next assayed the impact of the SUMO/acetylation interplay on  $\Delta$ Lf-mediated transactivation (Fig 5B). We increased either SUMOylation by overexpressing SUMO-1 peptide or raised the acetylation level by using the HDAC inhibitor Trichostatin A (TSA). TSA-induced acetylation was able to promote  $\Delta$ Lf- and K13-mediated activation by nearly 1.5 fold compared to the untreated condition and 4-fold compared to the condition when SUMO forms were overexpressed (SUMO-1). These data suggested that dynamic interactions between these two posttranslational modifications may occur. The fact that the enhanced WT and K13 transcriptional activities due to TSA-induced acetylation were not modified when SUMO-1 peptides were overexpressed (TSA+SUMO-1) may be due to the fact that acetylation is a less labile PTM than SUMOylation. Indeed, SENPs have to be inhibited in order to observe SUMO forms whereas we do not need to inhibit HDACs in order to visualize acetylated forms. Modulation of the SUMO or acetylation pattern on the K379 mutant had less impact on  $\Delta$ Lf transcriptional activity may be due to the fact that ubiquitination also targets this site. In order to confirm these results we further investigated whether an increase of the levels of acetylation may result in a reduction in the levels of  $\Delta$ Lf SUMOylation and conversely (Figs. 5 C-D). Therefore, we invalidated Ubc9 or inhibited deacetylases with TSA in order to increase acetylation levels, or raised the levels of SUMOylation by overexpressing His-SUMO-1 peptides (SUMO-1), and assessed the impact on  $\Delta$ Lf acetylation.





**Figure 5: SUMOylation/acetylation switch at K13 controls  $\Delta$ Lf transcriptional activity.** (A) K13 is the main acetylation site. Cells were co-transfected by WT, the mutant constructs or the null vector and then lysed 24 h later. Lysates were immunoprecipitated with anti-acetyllysine antibodies and immunoblotted with M2. Input was immunoblotted with either M2 or anti-GAPDH antibodies and used as loading control (n=3). (B) Relative transcriptional activity of K13 and K379 mutants compared to WT. Cells were co-transfected with pGL3-S1<sup>Skp1</sup>-Luc reporter vector and WT, K13 or K379. His-SUMO-1 expression vector and/or the deacetylase inhibitor Trichostatin A (TSA, 15 ng/mL) were used to modulate the acetylation/SUMOylation ratio. Relative luciferase activities are expressed as described in Materials and Methods (n $\geq$ 3; p < 0.05 (\*)). (C-D) Modulation of SUMOylation level was performed either by knocking down Ubc9 using siUbc9 or by overexpressing His-SUMO-1 peptides (SUMO-1). Cells were reverse transfected or not with RNAiMax using 5 nM of siUbc9/siCtrl for 24 h before being transfected for 24 h with WT or K13 plasmid with or without His-SUMO-1 plasmid. Before cell lysis, the acetylation level was altered or not by an overnight treatment with TSA (15 ng/mL). Cells were then incubated with 10  $\mu$ M of the proteasomal inhibitor MG132 for 2 h prior to lysis. NEM was added to lysis, IP and WB buffers. (C) Input was immunoblotted with anti-Ubc9 (upper panel) or anti-GAPDH (lower panel) antibodies. (D) Samples were immunoprecipitated with M2 and immunoblotted with anti-SUMO-1 (upper panel), then with anti-acetyl lysine (middle panel) or finally with M2 (lower panel) antibodies. The acetylation/SUMOylation ratio ( $R^{Ac/SUMO}$ ) was assayed as described in Material and Methods. The data presented correspond to one representative experiment of two conducted.

Results shown in figure 5C confirmed that siUbc9 were functional. More than 80 % of the Ubc9 protein disappeared 48 h post-transfection as compared to untreated (NT) or siCtrl treated cells. Moreover, invalidation was not sensitive to treatment with TSA or to the overexpression of His-SUMO-1. Immunoprecipitation of  $\Delta$ Lf-expressing cell lysates with M2 was followed by immunodetection of SUMO-1, acetylated forms or  $\Delta$ Lf (Fig. 5D). SUMO profiles of WT and its K13 mutant, when Ubc9 was invalidated, confirmed a decrease in SUMOylation compared to controls (Fig. 5D, lane 3 left panel and 2 right panel, respectively) which was more pronounced after TSA treatment (lanes 6 and 12 left panel and lanes 5 and 11 right panel). Overexpression of SUMO-1 peptides together with siUbc9 treatment did not lead to increased SUMOylation of WT and K13 as expected (Fig. 5D, lane 9 left panel and 8 right panel, respectively) compared to their respective controls (Fig. 5D, lanes 8 and 10 left panel and 7 and 9 right panel, respectively). Thus,  $\Delta$ Lf SUMOylation levels were downregulated following Ubc9 invalidation and when inhibition of HDACs was achieved with TSA. We also analyzed the modification of the acetylation profile of WT and K13 in the above conditions but we did not observe visible variations. Therefore we assayed the acetylation/SUMOylation ratio. This ratio varied slightly when WT was expressed in siUbc9 cells but increased by nearly 2-fold when these cells were grown overnight in the presence of TSA and 3-fold in siUbc9-TSA-treated HEK-293 cells. These data are in accordance with the literature and confirmed increased acetylation when HDACs are inhibited by TSA. Overexpression of SUMO-1 peptides in siCtrl versus siUbc9 cells leads to a comparable acetylation/SUMO ratio. When cells overexpressing SUMO-1 were treated with TSA, acetylation was favoured. The same experiment was conducted with the K13 mutant. The acetylation/SUMOylation ratio was 2-fold higher than WT and rose 4-fold in Ubc9-null cells suggesting that the K13 mutant with only one acetylation/SUMOylation site may preferentially exist as an acetylated form. TSA treatments led to an increased acetylation/SUMOylation ratio as expected. Taken together these results suggest that acetylation antagonises SUMOylation and may downregulate SUMO effects at K13 (Figs 5B and 5D). The crosstalk between these sites could constitute part of the « $\Delta$ Lf code » responsible for the control of the transactivation of  $\Delta$ Lf target genes.

## Discussion

Transient PTMs like acetylation, phosphorylation, *O*-GlcNAcylation, ubiquitination and

SUMOylation are fast and efficient ways for the cell to respond to different stimuli. Transcription factors are often regulated by combinations of these different PTMs which might act as a molecular barcode [51]. In this report, we demonstrated that  $\Delta$ Lf, known to be modified by *O*-GlcNAcylation, phosphorylation at S10 and ubiquitination at K379 and K391 [17], can also be modified by SUMOylation and acetylation. We provide experimental evidence that SUMOylation represses  $\Delta$ Lf transcriptional activity whereas acetylation increases it and, by competing with ubiquitination, influences its stability.

Considering the fact that of a given protein only a small fraction is commonly found in the SUMOylated state and that this modification is transient, it was difficult to visualize or isolate endogeneous SUMO forms. Nevertheless we were able to observe SUMO-1 isoforms of  $\Delta$ Lf *in situ*. The  $\Delta$ Lf SUMOylation pattern, manifested as multiple bands, is consistent with the presence of multiple SUMOylation sites on the protein. We identified five SUMOylation sites among which K13 and K361 sites conform to the consensus sequence of  $\Psi$ KXE/D. Furthermore, SUMOylation was also mapped at K308, K379 and K391, which are non-canonical sites. Among these, K13, K308 and K379 are the three SUMO hot spots.

SUMOylation of transcription factors generally antagonizes their activation potential or mediates repression, although in a few cases SUMOylation has been associated with reciprocal effects resulting in activation. Whereas SUMOylation decreases the transactivation potential of c-Jun and the androgen receptor [52,53], it increases heat shock factor-2 (HSF2) transactivation capacity [54]. SUMOylation can both positively and negatively modulate p53 transcriptional activity depending on the target promoter [55]. Here we demonstrated that SUMOylation of  $\Delta$ Lf represses its transcriptional activity using a fragment of the *Skp1* promoter containing one  $\Delta$ LfRE.  $\Delta$ Lf binds to and transactivates *DcpS*, *Skp1*, *Bax*, *SelH*, *GTF2F2* and *UBE2E1* genes [9,12-14] through similar consensus response elements. Nevertheless it may be interesting to investigate whether  $\Delta$ Lf differentially transactivates its target genes depending on its SUMOylation status.

Since  $\Delta$ Lf possesses five SUMO target sites it is difficult to know whether each of the individual sites has a specific role. Moreover three of them are targeted by other PTMs rendering this study even more complex. In order to establish whether any single SUMOylation site was important for the transactivation capacity we compared the activities of mutants disabled specifically at each individual consensus SUMOylation site. The transactivation capacity of each single-site lysine mutant was similar or slightly increased compared to WT (data not known). Since multiple sites contribute to the control of  $\Delta$ Lf

transactivation capacity, the loss of only one SUMO site has only small effects on the activity of  $\Delta$ Lf suggesting either that individual sites act in a redundant manner or that SUMOylation at multiple sites is necessary. Therefore we next studied the transcriptional activity of each mutant in which only one SUMO site was preserved. The K308 mutant strongly inhibited  $\Delta$ Lf transcriptional activity. Moreover when SUMOylation was impaired either after Ubc9 invalidation or in the presence of increased expression of the SENP2 protease, the transcriptional activity of K308 was increased 5-fold compared to that of the K308 mutant expressed in untreated cells. This activity strongly decreased by nearly 2-fold when SUMO-1 peptides were overexpressed. These results demonstrated that SUMOylation at K308 strongly controls  $\Delta$ Lf activity. The SUMO modification at K308 has a marked impact on  $\Delta$ Lf transcriptional activity may be due to the fact that the region downstream from its SUMO motif is rich in acidic residues as in NDSM. NDSM interacts twice with Ubc9, first between the consensus motif and the active site of the enzyme and also between the acidic tail of the consensus and the basic patch of Ubc9 [27]. Thus, the NDSM acidic patch plays an important role in determining the efficiency of substrate SUMOylation which consequently results in enhanced transcriptional repressive properties.

K361 is located in the central part of the protein notably at the neighborhood of a putative SIM motif. Our *in silico* studies led us to discover a reverse putative consensus SIMr motif in the vicinity of the K361 SUMO site which is conserved among mammalian species (Table 1). SIMs, which mediate non-covalent interactions between SUMO and SIM-containing proteins [56], can mediate SUMO modification of numerous proteins, resulting in changes in their activity. Moreover a serine residue that is proximal to this SIMr might be the target of kinases as described for non-histone proteins such as PML, EXO9 and PIAS proteins [47]. The presence of a SIMr and/or a phospho-SIMr might be essential to enhance interactions with a SUMO protein and mediate SUMO conjugation. Therefore, the functionality of such a motif has to be established for  $\Delta$ Lf.

SUMOylation usually competes with ubiquitination, phosphorylation and acetylation. Ubiquitination/SUMOylation and SUMOylation/acetylation are mutually exclusive whereas SUMOylation/phosphorylation can be agonistic or antagonistic depending on the substrates. The dialogue between SUMO and the other modifications is emerging as a common mechanism that allows control of the transcriptional activity of transcription factors [21]. Two of the SUMO sites are targeted by acetyltransferases. Acetylation is also a dynamic process which mainly contributes to activation of transcription factors [57,58]. Thus, K13 and K379

are acetylated with K13 as the major acetylation site. Modulation of the SUMO/acetylation status has a strong impact on K13 transcriptional activity. In this way, SUMO/acetylation modification of  $\Delta$ Lf could act as a form of switch for the selective interaction with corepressor or coactivator partners, thus modulating  $\Delta$ Lf activity from a transcriptional repressor/corepressor to a coactivator. This is consistent with literature data. Thus, it was shown that SUMOylation inhibits MEF2, HIC1 and KLF8 transcriptional activities whereas acetylation blocks these inhibitory effects [39,40,59,60]. This acetylation/SUMOylation switch is regulated by phosphorylation for MEF2 [39] and it will be interesting to investigate whether  $\Delta$ Lf acetylation/SUMOylation interplay is also controlled by phosphorylation events. The K13 site has a SUMOylation motif close to PDSM motifs [28]. Phosphorylation of the SP motif within this consensus sequence plays an important role in promoting SUMOylation of several substrates including MEF2A [28,39]. Therefore we will have to investigate whether S16 might be of potential functional importance in the regulation of SUMOylation at K13. Moreover since at the N-terminus, the K13 SUMO/acetylation site is adjacent to the S10 *O*-GlcNAcylation/phosphorylation site we will further investigate whether the *O*-GlcNAc/Phosphate interplay interferes with the SUMOylation/acetylation switch or acts in parallel. The crosstalk between these sites may constitute the  $\Delta$ Lf code responsible for the control of the transactivation of  $\Delta$ Lf target genes. We know from our results [17] and from the literature that acetylation and phosphorylation both lead to transcriptional activation whereas *O*-GlcNAcylation and SUMOylation repress it. So we hypothesize that this region might be part of the  $\Delta$ Lf transactivation domain which has never been identified. On the other hand, Ubc9 itself is acetylated and its acetylation leads to its decreased binding to NDSM substrates, causing a reduction in their SUMOylation status. Therefore Ubc9 acetylation/deacetylation may serve as a dynamic switch for NDSM substrates such as the K308 site in order to control their SUMOylation [61].

K379 and K391 could be both SUMOylated and ubiquitinated. SUMOylation competes with ubiquitination and positively regulates  $\Delta$ Lf stability. Indeed, SUMO frequently influences protein stability by blocking ubiquitin attachment sites [19,36]. K379, which is the main target of both the SUMO and ubiquitin machineries, does not possess a SUMO consensus sequence but is located in the vicinity of the PEST region. It has been shown that Ubc9 could directly interact with the PEST region of SUMO-1 target proteins such as HIPK2 [62] but this is not always the case. It will be interesting to evidence the Ubc9-interacting region of  $\Delta$ Lf and investigate whether it overlaps the PEST region. The

ubiquitination/SUMOylation interplay exerts a critical role in the maintenance of cellular homeostasis by controlling the turnover of numerous of proteins and notably transcription factors. The switch between these two PTMs needs to be tightly regulated in a spatiotemporal manner and other PTMs, such as phosphorylation, contribute to regulate the ubiquitin/SUMO pathways. PEST sequences are rich in S/TP motifs and are often recognized and phosphorylated by proline-directed S/T protein kinases [63]. Phosphorylation can prevent or favor SUMO-1 conjugation as previously shown for I $\kappa$ B $\alpha$  [36], c-Jun [52] and p53 [52]. We already showed that the  $\Delta$ Lf PEST motif contains three serine residues (S392, S395 and S396) which are phosphorylated prior to ubiquitination of the targets K379 and K391 in their vicinity. Mutation of these two lysine residues or of the three serine residues (S392, S395 and S396) within the PEST motif strongly increased the half-life of  $\Delta$ Lf [17]. Moreover we showed that they were equivalent phosphorylation targets due to their proximity. Therefore, at the PEST motif a crosstalk between phosphorylation and ubiquitination exists with phosphorylation and ubiquitination working in synergy [17] while SUMOylation and ubiquitination are antagonistic PTMs. Therefore this crosstalk could constitute the  $\Delta$ Lf code responsible for the control of  $\Delta$ Lf stability.

This regulation is driven by the *O*-GlcNAc/phosphate interplay at S10. *O*-GlcNAc coordinately regulates  $\Delta$ Lf stability and transcriptional activity. The pool of  $\Delta$ Lf may exist under a stable but not functional *O*-GlcNAc isoform. Since the level of *O*-GlcNAc changes during the cell cycle or is altered, such as in tumorigenesis, deglycosylated  $\Delta$ Lf will become the target of kinases leading to its activation and polyubiquitination [1,17].  $\Delta$ Lf is at the crossroads between cell survival and cell death. It triggers cell cycle arrest and apoptosis *via* the transactivation of several crucial target genes. Therefore, modifications of their expression may have marked consequences and, depending on cell homeostasis, their transactivation by  $\Delta$ Lf should be transiently suspended. In this context, the SUMOylation/acetylation switch at K13 acts as a second level of control. The activation of the SUMO pathway leads to repression of  $\Delta$ Lf transcriptional activity whereas acetylation, by counteracting SUMOylation at gene promoters, restores it. Increasing evidence shows that *O*-GlcNAcylation not only interferes with phosphorylation but also crosstalks with other PTMs including acetylation [64], methylation [64,65], ubiquitination [66,67] and poly-ubiquitination [68,69]. However crosstalk with SUMOylation has not yet been reported and we are currently investigated the *O*-GlcNAcylation/SUMOylation interrelationship.

In conclusion, we showed that SUMO modification provides subtle, context-dependent,

regulatory input to modulate  $\Delta$ Lf target gene expression. Moreover, we confirmed that  $\Delta$ Lf, like many transcription factors, is regulated by combinations of different PTMs which act as a molecular barcode. Thus, cooperation and/or competition between SUMOylation, ubiquitination, acetylation, phosphorylation and *O*-GlcNAcylation may contribute to the establishment of a fine regulation of  $\Delta$ Lf transcriptional activity depending on the type of target gene and cellular homeostasis. In this paper, we have focused on the role of SUMOylation but it has not escaped our attention that lysine residues can also be methylated and that such modifications can also affect the activity and stability of proteins such as p53 [70]. Further studies of the roles of PTMs in the molecular mechanisms of  $\Delta$ Lf functions are warranted.

## Acknowledgments

This investigation was supported in part by the CNRS UMR 8576 (Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle), the Institut Fédératif de Recherche n° 147, the Université des Sciences et Technologies de Lille I, the Comité du Nord de la Ligue Nationale contre le Cancer. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We would like to thank Dr. R. J. Pierce (CIIL, Institut Pasteur de Lille, France) for critical reading of this manuscript.

## REFERENCES

1. Mariller C, Hardivillé S, Hoedt E, Huvent I, Pina-Canseco S, et al. (2012) Delta-lactoferrin, an intracellular lactoferrin isoform that acts as a transcription factor. *Biochem Cell Biol* 90:307-319.
2. Masson PL, Heremans JF, Schonke E (1969) Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J Exp Med* 130: 643–658.
3. Siebert PD, Huang BC (1997) Identification of an alternative form of human lactoferrin mRNA that is expressed differentially in normal tissues and tumor-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2198–2203.
4. Liu D, Wang X, Zhang Z, Teng CT (2003) An intronic alternative promoter of the human lactoferrin gene is activated by Ets. *Biochem Biophys Res Commun* 301: 472–479.
5. Benaïssa M, Peyrat J, Hornez L, Mariller C, Mazurier J, et al. (2005) Expression and prognostic value of lactoferrin mRNA isoforms in human breast cancer. *Int J Cancer* 114: 299-306.

6. Hoedt E, Hardivillé S, Mariller C, Ellass E, Perraudin JP, et al. (2010) Discrimination and evaluation of lactoferrin and delta-lactoferrin gene expression levels in cancer cells and under inflammatory stimuli using TaqMan real-time PCR. *Biometals* 23:441-452.
7. Panella TJ, Liu YH, Huang AT, Teng CT (1991) Polymorphism and altered methylation of the lactoferrin gene in normal leukocytes, leukemic cells, and breast cancer *Cancer Res* 51: 3037–3043.
8. Teng CT, Gladwell W, Raphiou I, Liu E (2004) Methylation and expression of the lactoferrin gene in human tissues and cancer cells. *Biometals* 17: 317–323.
9. Mariller C, Benaïssa M, Hardivillé S, Breton M, Pradelle G, et al. (2007) Human delta-lactoferrin is a transcription factor that enhances Skp1 (S-phase kinase-associated protein) gene expression. *FEBS J* 274: 2038–2053.
10. Baker HM, Baker EN (2012) A structural perspective on lactoferrin function. *Biochem Cell Biol* 90: 320-328.
11. Breton M, Mariller C, Benaïssa M, Caillaux K, Browaeys E, et al. (2004) Expression of delta-lactoferrin induces cell cycle arrest. *Biometals* 17: 325-329.
12. Hardivillé S, Escobar-Ramirez A, Pina-Canceco S, Ellass E, Pierce A (2014) Delta-lactoferrin induces cell death via the mitochondrial death signaling pathway by upregulating Bax expression, *Biometals* 27:875-889.
13. Mariller C, Hardivillé S, Hoedt E, Benaïssa M, Mazurier J, et al. (2009) Proteomic approach to the identification of novel delta-lactoferrin target genes: Characterization of DcpS, an mRNA scavenger decapping enzyme. *Biochimie* 91: 109–122.
14. Hoedt E, Chaoui K, Huvent I, Mariller C, Monsarrat B, et al. (2014) SILAC-based proteomic profiling of the human MDA-MB-231 metastatic breast cancer cell line in response to the two antitumoral lactoferrin isoforms: the secreted lactoferrin and the intracellular delta-lactoferrin. *PLoS One* 12;9:e104563. doi: 10.1371/journal.pone.0104563.
15. Kim B, Kang S, Kim SJ (2013) Genome-wide pathway analysis reveals different signaling pathways between secreted lactoferrin and intracellular delta-lactoferrin. *PLoS One* 8: e55338. doi: 10.1371/journal.pone.0055338.
16. Hardiville S, Hart GW (2014) Nutrient Regulation of Signaling, Transcription, and Cell Physiology by O-GlcNAcylation. *Cell Metabolism* 20: 208-213.
17. Hardivillé S, Hoedt E, Mariller C, Benaïssa M, Pierce A (2010) O-GlcNAcylation/ phosphorylation cycling at Ser10 controls both transcriptional activity and stability of delta-lactoferrin. *J Biol Chem* 285: 19205-19218.



18. Seeler JS, Dejean A (2003) Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:690-699.
19. Johnson ES (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73:355-382.
20. Gareau JR, Lima CD (2010) The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:861-871.
21. Verger A, Perdomo J, Crossley M (2003) Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* 4:137-142.
22. Yang SH, Sharrocks AD (2004) SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Mol Cell* 13:611-617.
23. Gill G (2005) Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* 15: 536-541.
24. Yeh ET (2009) SUMOylation and De-SUMOylation: wrestling with life's processes. *J Biol Chem* 284:8223-8227.
25. Rodriguez MS, Dargemont C, Hay RT (2001) SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* 276:12654-12659.
26. 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.
27. Yang S-H, Galanis A, Witty J, Sharrocks AD (2006) An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *EMBO J* 25: 5083–5093.
28. Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, et al. (2006) PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:45-50.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA, Desterro JMP, 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.
33. Matic I, van Hagen M, Schimmel J, Macek B, Ogg SC, et al. (2008) In vivo identification of human SUMO polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy. *Mol Cell Proteom* 7:132-144.
  34. Tatham MH, Geoffroy M-C, Shen L, Plechanovova A, Hattersley N, et al. (2008) RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nature Cell Biology* 10: 538 – 546.
  35. Watts FZ (2013) Starting and stopping SUMOylation. What regulates the regulator? *Chromosoma* 122:451-463.
  36. Desterro JM, Rodriguez MS, Hay RT (1998) SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell* 2:233-239.
  37. Miteva M, Keusekotten K, Hofmann K, Gerrit JK, Praefcke R, et al. (2010) SUMOylation as a signal for polyubiquitylation and proteasomal degradation. *Conjugation and Deconjugation of Ubiquitin Family Modifiers* (Marcus Groettrup, eds) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media. pp 195-214.
  38. Aillet F, Lopitz-Otsoa F, Egaña I, Hjerpe R, Fraser P, et al. (2012) Heterologous SUMO-2/3-ubiquitin chains optimize I $\kappa$ B $\alpha$  degradation and NF- $\kappa$ B activity. *PLoS One* 7:e51672. doi: 10.1371/journal.pone.0051672.
  39. Shalizi A, Gaudillière B, Yuan Z, Stegmüller J, Shirogane T, et al. (2006) A calcium-regulated MEF2 SUMOylation switch controls postsynaptic differentiation. *Science* 311:1012-1017.
  40. 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.
  41. Fu Y, Fang Z, Liang Y, Zhu X, Prins P, et al. (2007) Overexpression of integrin beta1 inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cell SMMC-7721 through preventing Skp2-dependent degradation of p27 via PI3K pathway. *J Cell Biochem* 102:704-718.
  42. Yonashiro R, Sugiura A, Miyachi M, Fukuda T, Matsushita N, et al. (2009) Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL ubiquitinates mutant SOD1 and attenuates mutant SOD1-induced reactive oxygen species generation. *Mol Biol Cell* 20: 4524–4530.
  43. Xue Y, Li A, Yao X (2006) PAIL: Prediction of Acetylation on Internal Lysines. <http://bdmpail.biocuckoo.org/prediction.php>
  44. 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.
45. Flotho A, Melchior F (2013) SUMOylation: A Regulatory Protein Modification in Health and Disease. *Annu Rev Biochem* 82:357-385.
  46. Qian M, Xinjiao G, Jun C, Zexian L, Changjiang J, Jian R, Yu X (2009) GPS-SBM 1.0: a stand-alone program for prediction of SUMO-binding motifs.
  47. Stehmeier P, Muller S (2009) Phospho-regulated SUMO interaction modules connect the SUMO system to CK2 signaling. *Mol. Cell* 33: 400–409.
  48. Geiss-Friedlander R, Melchior F (2007) Concepts in SUMOylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:947-956.
  49. Faiola F, Liu X, Lo S, Pan S, Zhang K, et al. (2005) Dual regulation of c-Myc by p300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover and coactivation of Myc-induced transcription. *Mol Cell Biol* 25:10220-10234.
  50. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, *et al.* (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303 :2011–2015.
  51. Benayoun BA, Veitia RA (2009). A post-translational modification code for transcription factors: sorting through a sea of signals. *Trends Cell Biol* 19:189-197.
  52. Muller S, Berger M, Lehembre F, Seeler JS, Haupt Y, et al. (2000) c-Jun and p53 are modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 275, 13321-13329.
  53. 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 USA* 97: 14145-14150.
  54. 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.
  55. Gostissa M, Hengstermann A, Fogal V, Sandy P, Schwarz SE, et al. (1999) Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J* 18:6462-6471.
  56. Kerscher O (2007) SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep* 8: 550–555.
  57. Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E (2005) Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363:15-23.
  58. Yang XJ, Seto E (2008) Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational

- modifications. *Mol. Cell* 31, 449-461.
59. Zhao X, Sternsdorf T, Bolger TA, Evans RM, Yao TP (2005) Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4- and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications. *Mol Cell Biol* 25:8456–8464.
  60. Urvalek AM, Lu H, Wang X, Li T, Yu L, et al. (2011) Regulation of the oncoprotein KLF8 by a switch between acetylation and SUMOylation. *Am J Transl Res* 3: 121–132.
  61. Hsieh Y-L, Kuo H-Y, Chang C-C, Naik MT, Liao P-H, et al. (2013) Ubc9 acetylation modulates distinct SUMO target modification and hypoxia response. *EMBO J* 32: 791–804.
  62. Kim YH, Choi CY, Kim Y (1999) Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12350-12355.
  63. Rechsteiner M, Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21: 267-271.
  64. Sakabe K, Wang Z, Hart GW (2010) Beta-N-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) is part of the histone code. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 19915-19920.
  65. Deplus, R, Delatte B, Schwinn, MK, Defrance M, Mendez J, et al. (2013) TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS. *EMBO J* 32: 645-655.
  66. Guinez C, Mir AM, Dehennaut V, Cacan R, Harduin-Lepers A, et al. (2008) Protein ubiquitination is modulated by *O*-GlcNAc glycosylation. *FASEB J* 22:2901-2911.
  67. Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Chikanishi T, et al. (2011) GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature* 480:557-560.
  68. Capotosti F, Guernier S, Lammers F, Waridel P, Cai Y, et al (2011) *O*-GlcNAc transferase catalyzes site-specific proteolysis of HCF-1. *Cell* 14:376-388.
  69. Li MD, Ruan HB, Hughes ME, Lee J.S, Singh JF, et al (2013) *O*-GlcNAc signaling entrains the circadian clock by inhibiting BMAL1/CLOCK ubiquitination. *Cell Metab* 17:303-310.
  70. Chuikov S, Kurash JK, Wilson JR, Xiao B, Justin N, et al. (2004) Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature* 432, 353-360.

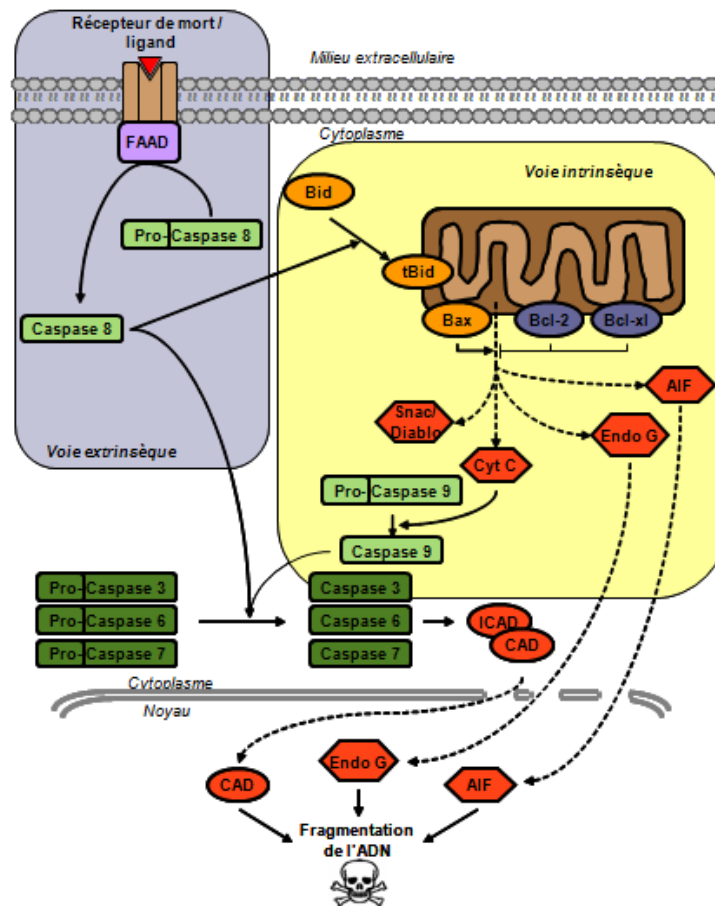
# *Article 2*

# **La transactivation du gène *Bax* par la delta-lactoferrine est régulée par *O*-GlcNAc**

A mon arrivée au laboratoire, nous savions que la surexpression de delta-lactoferrine induisait un arrêt du cycle cellulaire après 24 h et conduisait à une augmentation significative de la mort cellulaire au bout de 48 h. A l'instar d'autres facteurs de transcription régulant le cycle cellulaire tels que p53, la delta-lactoferrine pouvait être un facteur pro-apoptotique.

L'apoptose est un processus cellulaire physiologique nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. L'une des caractéristiques de l'apoptose est la translocation des résidus de phosphatidylsérine du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmique, ce qui déclenche la phagocytose de ces cellules par les macrophages. L'apoptose est définie par d'autres phénotypes tels que la condensation de la chromatine, la fragmentation du noyau et la formation de corps apoptotiques. D'un point de vue biochimique, l'apoptose implique généralement l'activation par clivage protéique de caspases, responsables de la dégradation de substrats spécifiques conduisant à la fragmentation internucléosomique de l'ADN.

La transduction du signal de mort cellulaire implique deux voies distinctes et interconnectées : la voie extrinsèque, nécessitant l'interaction des récepteurs de mort avec leurs ligands, et la voie intrinsèque faisant intervenir la mitochondrie et les membres de la famille Bcl (Figure 42).



**Figure 42 : Voies d'induction de l'apoptose.** L'apoptose est classiquement induite par deux voies. Une voie dépendante de la reconnaissance d'un ligand par un récepteur membranaire et une voie faisant intervenir la libération de molécules mitochondriales initialement présentes dans l'espace intermembranaire. L'induction de l'une ou l'autre de ces voies aboutit à l'activation des caspases effectrices et à la dégradation de l'ADN nucléaire (schéma d'après Stéphan Hardivillé, Thèse d'Université, USTL, 2010).

Le but de cette étude a été de démontrer d'une part que la delta-lactoferrine était capable d'induire la mort cellulaire par apoptose, et d'autre part de déterminer le mécanisme d'induction mis en jeu. De plus, cette étude a confirmé que la *O*-GlcNAcylation qui réprime l'activité transcriptionnelle de la delta-lactoferrine réprime la transactivation du gène *Bax*.

Les résultats de cette étude ont été compilés et présentés sous la forme d'une publication :

Hardivillé, S., Escobar-Ramirez A., Pina-Canséco S., Ellass E., Pierce, A. (2014) Delta-lactoferrin induces cell death *via* the mitochondria death signaling pathway by upregulating *Bax* expression. *Biometals* 27: 875-889.

Dans cette étude, nous avons montré que l'expression de la delta-lactoferrine induit la mort cellulaire par l'apoptose dans les cellules HEK-293 et les cellules MCF7. L'apoptose est dépendante des caspases-9, 7 et 8 et le clivage protéolytique de l'endonucléase PARP est augmenté. Les niveaux d'expression des membres de la famille Bcl ont été détectés et nous avons montré que les ratios Bcl-xl/Bax et Bcl-2/Bax sont diminués. Nous avons ainsi confirmé que les effets pro-apoptotiques de la delta-lactoferrine étaient principalement médiés par l'activation de la voie intrinsèque mitochondriale.

L'induction de l'apoptose par la delta-lactoferrine est concomitante à l'augmentation des niveaux cellulaires de la protéine Bax. L'analyse de la région promotrice du gène *Bax* a permis de mettre en évidence un élément de réponse putatif à la delta-lactoferrine. En utilisant les techniques de gène rapporteur de la luciférase et d'immunoprécipitation de la chromatine nous avons démontré que la delta-lactoferrine interagissait *in vitro* et *in vivo* avec cette séquence. Sa délétion, réalisée par mutagenèse dirigée, abolit totalement l'activité transcriptionnelle de la delta-lactoferrine.

Ces résultats indiquent que *Bax* est un nouveau gène cible de la delta-lactoferrine. Par ailleurs, nous avons montré que la balance *O*-GlcNAc/Phosphate qui contrôle l'activité transcriptionnelle de la delta-lactoferrine, module la transactivation de *Bax*.



# DELTA-LACTOFERRIN INDUCES CELL DEATH VIA THE MITOCHONDRIAL DEATH SIGNALING PATHWAY BY UPREGULATING BAX EXPRESSION

Stéphan Hardivillé<sup>a</sup>, Adelma Escobar-Ramirez, Soccoro Pina-Canceco<sup>b</sup>, Elisabeth Ellass and Annick Pierce\*

Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille, IFR-147, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

\* Correspondance to Pr. Annick Pierce, UGSF, UMR 8576 CNRS, USTL, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

Fax: +33 3 20 43 65 55; Tel: +33 3 20 33 72 38; E-mail: [annick.pierce@univ-lille1.fr](mailto:annick.pierce@univ-lille1.fr)

**Abbreviations :** Lf, lactoferrin ;  $\Delta$ Lf, delta-lactoferrin ;  $\Delta$ LfRE, delta-lactoferrin response element ; OGT : O-GlcNAc transferase ; GlcNH<sub>2</sub> : N-acetylglucosamine, OA : okadaic acid, P, phosphate; CHIP, chromatin immunoprecipitation; WT, wild type, PTM, post-translational modifications, NT, not transfected.

## Footnotes: present address:

<sup>a</sup> Departement of Biological Chemistry, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA

<sup>b</sup> Laboratorio de Biología Celular, Centro de Investigación en Ciencias Médicas y Biológicas, Facultad de Medicina Y Cirugía de la Universidad Autónoma « Benito Juárez » de Oaxaca, Mexico.

**Key words:** Delta-lactoferrin, Lactoferrin, transcription factor, apoptosis, tumor-suppressor, O-GlcNAcylation

## Abstract

Delta-lactoferrin is a transcription factor belonging to the lactoferrin family, the expression of which inhibits cell proliferation and leads to *Skp1* and *DcpS* gene transactivation. In this study, we showed that delta-lactoferrin expression also induces cell death via apoptosis in HEK 293 and MCF7 cells using a cell viability assay and DNA fragmentation. Western blot analyses showed that apoptosis was caspase-9, 7 and 8 dependent. Proteolytic cleavage of the endonuclease PARP was significantly increased. The levels of expression of Bcl family members were detected by immunocytochemistry and showed that the Bcl-x1/Bax and Bcl-2/Bax protein ratios were decreased. We determined that the pro-apoptotic effects of delta-lactoferrin are mainly mediated by the activation of the mitochondria-dependent death-signaling pathway. Apoptosis induction by delta-lactoferrin is concomitant with increased cellular levels of Bax protein. Analysis of the *Bax* promoter region detected a  $\Delta$ LfRE located at -155 bp from the transcription start site. Both luciferase reporter gene and chromatin immunoprecipitation assays confirmed that delta-lactoferrin interacts *in vitro* and *in vivo* specifically with this sequence. Its deletion, realized using directed mutagenesis, totally abolished delta-lactoferrin transcriptional activity, identifying it as a delta-lactoferrin-responsive element. These results indicate that the *Bax* gene is a novel delta-lactoferrin target. Moreover we also showed that the O-GlcNAc/P interplay, which controls  $\Delta$ Lf transcriptional activity, modulates *Bax* transactivation.

## Introduction

Apoptosis is a universal cell suicide pathway characterized by membrane blebbing, nuclear breakdown, and DNA fragmentation. It is an indispensable process controlling development, tissue homeostasis, and regulation of the immune system (Li et al. 2001) the dysregulation of which has been implicated in numerous pathogeneses. Two main induction pathways lead to cell death by apoptosis, the extrinsic or death receptor pathway and the intrinsic or mitochondrial pathway. Death receptors are activated through the binding of their ligands in response to extracellular stimuli (Nagata 1997). Receptor stimulation induces formation of the death-induced signaling complex and leads to the recruitment and the cleavage of initiator caspases, like caspase 8. The mitochondrial pathway is characterized by the permeabilisation of the external mitochondrial membrane initiated by Bcl-2 family members (Bender and Martinou 2013). Among them, anti-apoptotic members like Bcl-2 and Bcl-xl are responsible for preserving membrane integrity whereas apoptosis mediators such as Bax induce its permeabilisation (Chipuk et al. 2010); the balance between these two subgroups is critical and helps determine the susceptibility of cells to a death signal. Pro-apoptotic effectors trigger the release of apoptosis mediators such as cytochrome c, AIF or G endonuclease from the mitochondrial intermembrane space into the cytosol. These factors promote and amplify the apoptotic cascade directly or through the formation of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9-containing apoptosome complex (Ow et al. 2008). Activation of both pathways leads to the cleavage of downstream effector caspases such as caspases 3, 6 and 7 (Cullen and Martin 2009), which in turn are responsible for the release of the CAD nuclease from its inhibitor ICAD and for the cleavage of numerous proteins such as PARP. CAD, AIF and endonuclease G are then targeted to the nucleus to trigger DNA fragmentation (Li et al. 2001). Although the extrinsic and intrinsic pathways appeared to be independent it is now clear that crosstalk may exist. For example, caspase 8, which is activated in extrinsic apoptosis, also cleaves Bid to form tBid, leading to cytochrome c release and a higher apoptotic response (Li et al. 1998).

In this report, we show that delta-lactoferrin ( $\Delta$ Lf) is a transcription factor that exerts pro-apoptotic activities by upregulating the synthesis of Bax.  $\Delta$ Lf belongs to the lactoferrin (Lf) family. Lfs exist as different variants due to post-translational modifications, gene polymorphism and alternative splicing which lead to the production of lactoferrin isoforms that are all involved in host defence. The two main lactoferrin isoforms are the secretory

lactoferrin (Lf) (Masson et al. 1969) and  $\Delta$ Lf, its intracellular counterpart (Siebert and Huang 1997; Liu et al. 2003; Mariller et al. 2007). The 5'-regulatory region of the human Lf gene contains two promoters that are differentially transactivated leading to the synthesis of two transcripts (Siebert and Huang 1997; Liu et al. 2003; Hoedt et al. 2010). The N-terminus and their post-translational modification pattern are the only features that discriminate the isoforms.  $\Delta$ Lf is a truncated Lf without the leader sequence and the first 26 aminoacid residues present in Lf. Therefore, whereas Lf is secreted,  $\Delta$ Lf stays in the cytoplasm from which it enters the nucleus (Liu et al. 2003; Mariller et al. 2007). As a secreted protein, Lf is *N*-glycosylated (Spik et al. 1988) whereas  $\Delta$ Lf is *O*-GlcNAcylated (Hardivillé et al. 2010). The role of the Lf glycan moiety seems to be restricted to a decrease in the immunogenicity of the protein and its protection from proteolysis. On the other hand, *O*-GlcNAcylation, which competes directly with phosphorylation (Hart et al. 1996), positively regulates  $\Delta$ Lf stability and negatively regulates its transcriptional activity (Hardivillé et al. 2010). Among the serine residues involved in this process only Ser10 is critical. Mutation of the *O*-GlcNAc sites in  $\Delta$ Lf leads to a constitutively active M4 mutant with a higher activity than the wild type *O*-GlcNAcylated protein (Mariller et al. 2009; Hardivillé et al. 2010).

Both Lf isoforms display antitumoral properties and behave as tumor suppressors. Like tumor suppressor genes, the Lf gene loses its function in cancer cells and the expression of both Lf and  $\Delta$ Lf is downregulated or silenced in cancer cells or tissues (Penco et al. 1999; Benaïssa et al. 2005). Genetic and epigenetic alterations have been found on the Lf gene (Panella et al. 1991; Teng et al. 2004) that confer a real proliferative advantage on cancer cells. In a study including 99 patients, we showed that a high level of expression of the two transcripts was correlated with a good prognosis (Benaïssa et al. 2005). A recent genome-wide pathway analysis showed that even though the two Lf isoforms act on different signaling pathways, they both lead to alterations in the expression of genes that are responsible for cell survival and apoptosis (Kim et al. 2013). Whilst Lf antitumoral activity mainly involves interactions with cell surface receptors and activation of different signaling pathways,  $\Delta$ Lf is involved in gene transactivation (Damiens et al. 1999; Breton et al. 2004; Xiao et al. 2004; Son et al. 2006). Lf exerts antitumoral and antimetastatic properties *in vitro* and *in vivo* although if it is mainly known as a regulator of the innate immune system of mammals (Bezault et al. 1994; Tsuda et al. 2004). Depending on the cellular models studied, Lf is described to inhibit cdk2 and cdk4 kinase activities, increase p21 cdk inhibitor expression, promote retinoblastoma protein-mediated growth arrest, increase p21 expression and

upregulate the tumor suppressor p53 and its target genes (reviewed in Tsuda et al. 2004; Legrand et al. 2008; Pierce and Legrand 2009). Both Lf isoforms possess nuclear targeting sequences (Mariller et al. 2007) and a strong concentration of positive charges that might create potential DNA interaction sites (Baker and Baker 2005). Moreover, they are both capable of binding DNA sequences, *in vitro* for Lf (He and Furmanski 1995; Son et al. 2002) and *in vivo* for  $\Delta$ Lf (Mariller et al. 2007; Mariller et al. 2009). Thus, while it is clear that  $\Delta$ Lf acts as a transcription factor via a functional  $\Delta$ LfRE it is still unclear whether Lf possesses the same activity *in vivo*.  $\Delta$ Lf overexpression leads to cell cycle arrest in S phase (Breton et al. 2004) and to cell death. Its transcriptional activity targets the *DcpS* and *Skp1* genes (Mariller et al. 2007; Mariller et al. 2009). DcpS is a scavenger decapping enzyme that hydrolyzes the cap structure generated by the 3' to 5' decay pathway, the overexpression of which is crucial for quality control of mRNA biogenesis and translation (Nuss et al. 1975; van Dijk et al. 2003; Bail and Kiledjian 2008). Skp1, or S-phase kinase associated protein, is essential for cell cycle progression at both the G1/S and G2/M transitions (Ang and Wade Harper 2005). It belongs to the SCF complex which couples growth and division by targeting the cell cycle and metabolic regulators for degradation (Benanti 2012). Therefore, modulation of Skp1 and DcpS concentrations may have considerable consequences for cell homeostasis.

Both Lf isoforms promote apoptosis. Lf pro-apoptotic activity has been observed in human cell lines (Valenti et al. 1999 ; Baumrucker et al. 2006b) and after administration to rodents (Fujita et al. 2004a, Fujita et al. 2004b; Chandra Mohan et al. 2006; Spagnuolo et al. 2007; Spagnuolo and Hoffman-Goetz 2008). This process seems to involve the death receptor Fas and activation of caspase-3 and -8 (Fujita et al. 2006; Lee et al. 2006). Recently, recombinant adenovirus expressed human lactoferrin (Ad-rhLF) was also shown to play an important role in the induction of cell cycle arrest and apoptosis. Adenoviral infection leads to a decrease in Bcl-2 and an increase in Bax and/or Fas contents and activation of caspase 3 in MCF-7 and HeLa cells, in mice bearing EMT6 breast carcinoma and in a mouse model of cervical cancer (Li et al. 2011; Wang et al. 2011; Wang et al. 2012). The transcriptomic study of Kim et al. (2012) showed that essential genes responsible for anti-proliferation or anti-apoptosis were dysregulated in both Lf-treated and  $\Delta$ Lf- expressing cells. Recently, it was shown that Lf expression and thereby its pro-apoptotic function were under the control of miR-214 in mammary epithelial cells (Liao et al. 2010).

Like Lf,  $\Delta$ Lf is also at the crossroads between cell survival and cell death. Here we show that  $\Delta$ Lf interacts directly with a  $\Delta$ LfRE in both the *Fas* and *Bax* promoters, and that

these interactions lead to their transcriptional activation with a much higher response for *Bax*. Thus, by causing overexpression of *Bax*,  $\Delta$ Lf triggers apoptosis through the intrinsic mitochondrial-death pathway.

## **Material and Methods**

### ***Cell culture, reagents and transfections***

Human kidney HEK293 (ATC CRL-1573) cells and human breast cancer MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) were grown in DMEM (« Dulbecco's Modified Eagle's Medium »), human breast cancer MCF7 (ATCC HTB-22) and human cervix adenocarcinoma HeLa (ATCC CCL 2<sup>TM</sup>) cell lines in EMEM (« Eagle's Minimum Essential Medium »), at 37°C and under 5% CO<sub>2</sub>. The media were both complemented with 10% FCS and 2mM L-glutamine. Human recombinant insulin (0.01 mg/ml) was added only to MCF7 medium. Cells were transfected as described (Hardivillé et al. 2010) using DreamFect<sup>TM</sup> (OZ Biosciences) at the ratio of 1µg of pcDNA- $\Delta$ Lf or its mutant constructs to 1x10<sup>6</sup> cells. The amount of  $\Delta$ Lf expression vectors was adjusted to keep the  $\Delta$ Lf amount similar to that found in normal NBEC cells (Benaïssa et al. 2005). Transfection efficiency was followed using a p $\Delta$ Lf-N-EGFP vector which was kindly provided by Dr C. Teng (NIH, Research Triangle Park, NC) and the expression level of  $\Delta$ Lf and  $\Delta$ Lf<sup>M4</sup> evaluated as described (Hardivillé et al. 2010). Transfections were done in triplicate (n ≥ 3). The stable HeLa and MDA-MD-231 expressing His-tag- $\Delta$ Lf cell lines under doxycyclin induction (MDA-MB-231- $\Delta$ Lf and HeLa- $\Delta$ Lf) were obtained as previously described (Breton et al. 2004; Hoedt et al. 2010) using the tetracyclin inducible Tet-on system (Clontech). The expression of  $\Delta$ Lf was confirmed in each cell type by western blotting using anti-His antibodies. Cell culture reagents were from Dutscher, Cambrex Corporation and Invitrogen. Other reagents were from Sigma. Antibodies against the 3xFLAG epitope (mouse monoclonal anti-FLAG M2 antibody) were from Sigma and against the 6xHis flag epitope (mouse monoclonal anti-FLAG MA1-21315 antibody) were from Thermo Scientific. Rabbit polyclonal antibodies against caspase 7, caspase 9, PARP, PARP (Asp 214), Bcl-2, Bcl-xl and Bax were from Cell Signaling. Antibodies against caspase 8 (rabbit polyclonal anti-caspase 8) and actin (goat polyclonal antibodies I-19) were from Santa Cruz Biotechnologies.

### ***Cell viability***

Cell viabilities of  $\Delta$ Lf expressing cells (1x10<sup>6</sup>) and cells transfected with an empty vector

( $1 \times 10^6$ ) were assessed by counting the cells 24 h and 48 h after transfection using Trypan blue 0.4% (v/v) (Cambrex). Dead and viable cells were discriminated by ATP-dependent exclusion of the stain. Relative cell viability is expressed as a ratio corresponding to the number of viable (or dead) cells divided by the total number of the corresponding mock cells. Each experiment represents at least five sets of independent triplicates.

### ***DNA fragmentation***

For DNA gels,  $5 \times 10^5$   $\Delta$ Lf-expressing cells were lysed 20 min on ice, 24 h after transfection without vortexing or pipetting in 20  $\mu$ l DNA extraction buffer (2 mM EDTA, 0.8% SDS, 100 mM Tris-HCl pH 8). The lysate was first incubated 30 min at 37°C with 2  $\mu$ l of 50 mg/ml RNase A and then incubated 90 min at 50°C with 10  $\mu$ l of 20 mg/ml proteinase K. DNA pellet was then subjected to electrophoresis on a 1.8 % agarose gel (Invitrogen) containing ethidium bromide at 25 V and visualized under ultraviolet light. Each result in which DNA fragmentation is presented corresponds to one representative experiment of at least three conducted.

### ***DNA purification***

Genomic DNA was purified using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) and total RNA using RNeasy Mini Kit (Qiagen). Plasmid extraction was performed using QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen). The purity and integrity of each extract were checked using the nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Labtech International) and the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

### ***Vector constructs and site-directed mutagenesis***

pcDNA- $\Delta$ Lf, pcDNA- $\Delta$ Lf<sup>M4</sup>, p3xFLAG-CMV10- $\Delta$ Lf<sup>WT</sup>, p3xFLAG-CMV10- $\Delta$ Lf<sup>M4</sup> and p3xFLAG-CMV10- $\Delta$ Lf<sup>S10+</sup>, p3xFLAG-CMV10- $\Delta$ Lf<sup>S227+</sup>, p3xFLAG-CMV10- $\Delta$ Lf<sup>S472+</sup> were constructed as described (Mariller et al. 2007). The pcDNA-OGT expression vector was constructed using OGT cDNA isolated from the pShuttle-OGT vector (a kind gift of Dr. G. Hart, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA) and further cloned into the pcDNA3.1 vector (Hardivillé et al. 2010). Promoter regions containing the  $\Delta$ LfRE of *Bax* (139 bp) and *Fas* (137 bp) were amplified with specific primer pairs as follows : sense 5'-TGGATAAATGAAGGCATTA-3', antisense 5'-TGACCGCACCTGCCTCGCT-3' for *Bax*, and sense 5'-CTATTAGATGCTCAGAGTG-3', antisense

5'-CATCTGTCACTGCACTTAC-3' for *Fas*. Amplification products were further cloned in the basic pGL3-Luc reporter vector as described (Mariller et al. 2007) and sequenced. Mutants were generated using the QuikChange® Sitedirected Mutagenesis Kit (Stratagene) with pGL3- $\Delta$ Lf<sup>Bax</sup>-Luc and pGL3- $\Delta$ Lf<sup>Fas</sup>-Luc as templates and primer pairs: sense 5'-CGCCACTGCTGTATCGGGAGATGC-3', antisense 5'-AGCATCTCCCGATACAGCAGTGGCG-3' (pGL3-del $\Delta$ Lf<sup>Bax</sup>-Luc) and sense 5'-GGTCTTCCTCATGAACAGTCTACTG-3', antisense 5'-CAGTAGACTGTTTCATGAGGAAGACC-3' (pGL3-del $\Delta$ Lf<sup>Fas</sup>-Luc). Following sequencing, the inserts were cloned into fresh pGL3-Luc for reporter gene assays.

### ***Reporter gene assay***

The genomic sequences containing the human *Bax* (NW\_001838497) or the human *Fas* (NT\_030059) promoters were retrieved from the Genbank database. Around 1 kbp sequence upstream the transcription start site was searched for the presence of a putative  $\Delta$ LfRE in both the *Bax* and *Fas* promoter regions. Reporter gene assays were performed using pGL3- $\Delta$ LfRE<sup>Bax</sup>-Luc, pGL3-del $\Delta$ LfRE<sup>Bax</sup>-Luc, pGL3- $\Delta$ LfRE<sup>Fas</sup>-Luc and pGL3-del $\Delta$ LfRE<sup>Fas</sup>-Luc reporter vectors and the pcDNA- $\Delta$ Lf<sup>WT</sup> or the p3xFLAG-CMV10- $\Delta$ Lf<sup>WT</sup> constructs as described (Mariller et al. 2009). Cell lysates were assayed using a luciferase assay kit (Promega) in a Tristar multimode microplate reader LB 941 (Berthold Technologies). Luciferase activities correspond to the luciferase activity normalized to protein content as in (Mariller et al. 2007) or to  $\Delta$ Lf content when glycosylation mutants are assayed since they are differentially expressed (Mariller et al. 2009). In the latter case, 2  $\mu$ l of each cell lysate were immunoblotted and revealed using the M2 antibody directed against the 3xFLAG. The expression of  $\Delta$ Lf or its glycosylation mutants was then evaluated by densitometry as described (Hardivillé et al. 2010). Relative luciferase activities were normalized to basal luciferase expression and expressed as a percentage; 100 % corresponds to the relative luciferase activity of  $\Delta$ Lf. Basal luciferase expression was assayed using a null vector and was determined for each condition (2.5  $\mu$ g pcDNA-OGT/10<sup>6</sup> cells, 10 nM OA and 10 mM GlcNH<sub>2</sub>) as in (Hardivillé et al. 2010). Each experiment represents at least three sets of independent triplicates.

### ***In vivo DNA binding assays and Q-PCR***

The ChIP assay was performed as described (Metivier et al. 2003; Hardivillé et al. 2010). For



the ChIP assay, cells were transfected with p3xFLAG-CMV10- $\Delta$ Lf in order to produce a 3xFLAG-tagged- $\Delta$ Lf (Hardivillé et al. 2010; Mariller et al. 2009). Briefly, ChIP complexes ( $8 \times 10^6$  cells) were immunoprecipitated with M2 (anti 3xFLAG-tag) used at 1:250 or normal mouse IgG or without antibodies. Input corresponds to DNA not submitted to immunoprecipitation. Samples were then decrosslinked overnight at 65 °C and DNA purified using the Qiagen DNA purification Kit (Qiagen). Amplification was carried out in triplicate (n=3) in the presence of 2  $\mu$ l of purified DNA, primer pairs used to amplify the *Bax* promoter fragment and Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. Samples were then submitted to 40 cycles of amplification (denaturation: 30 s at 90 °C, hybridation: 30 s at 55 °C, elongation: 30 s at 72 °C) in a thermocycler Mx4000 (Stratagene). Data presented in Figure 6C are expressed as a percentage of input.

### ***Immunoblotting***

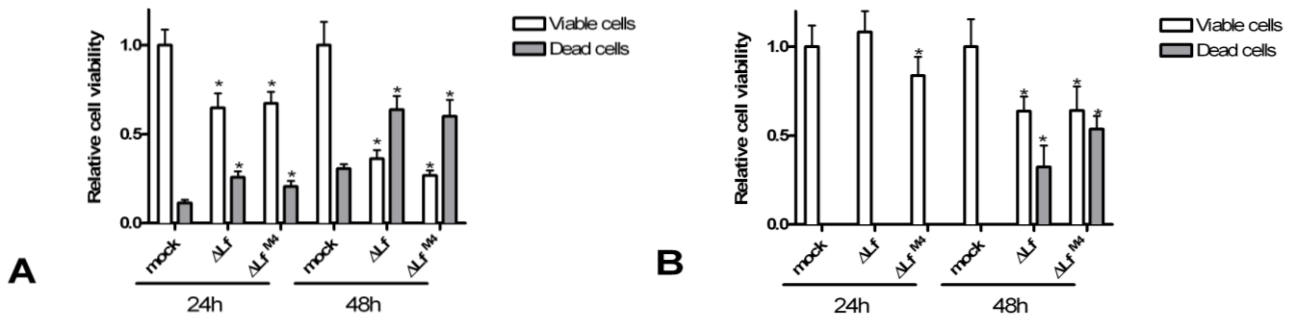
Proteins were extracted from frozen cell pellets in 500  $\mu$ L RIPA buffer as described (Mariller et al. 2007). Protein content was assayed using microBCA (Pierce) according to the manufacturer's instructions. For direct immunoblotting, samples mixed with 4x Laemmli buffer were boiled for 5 min. 20  $\mu$ g of protein from each sample were submitted to 7.5% SDS-PAGE and immunoblotted. Blots were saturated by 3% SAB in TBS-Tween 0.1%, 2h at room temperature. Blots were subsequently probed in the same solution with primary antibodies (anti-actin, 1:10000; anti-caspase 8, 1:1000 and anti-caspase 7, anti-caspase 9, anti-PARP, anti-PARP (Asp 214), anti-Bcl-2, anti-Bcl-xl and anti-Bax 1:500) overnight at 4°C and with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (GE Healthcare Life Sciences) at room temperature for 1 h before being detected by chemiluminescence (ECL advance, GE Healthcare Life Sciences). Acquisition of the hyperfilms (GE Healthcare Life Sciences) was carried out with a GS710-calibrated densitometer (Bio-Rad) and the densitometric analysis was performed using QUANTITY ONE v4.1 (Bio-Rad) acquisition software. Each result in which immunoblots are presented corresponds to one representative experiment of at least three conducted.

## Results and discussion

### $\Delta$ Lf induces programmed cell death

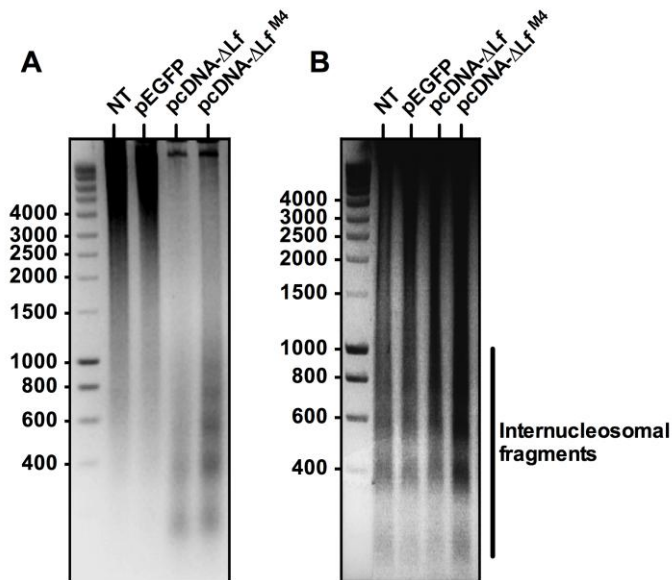
Our previous studies have shown that  $\Delta$ Lf expression induces cell cycle arrest at S phase (Breton et al. 2004) and is correlated with a good prognosis in the case of breast cancer (Benaïssa et al. 2005) suggesting that  $\Delta$ Lf may exert antitumoral activities. However, the role of  $\Delta$ Lf in cell homeostasis is still poorly understood. To better characterize its function, we transiently expressed  $\Delta$ Lf and its constitutively active isoform ( $\Delta$ Lf<sup>M4</sup>) (Hardivillé et al. 2010) in two different cell lines and performed cell viability assays. HEK 293 and MCF7 were chosen since they express respectively no or an extremely low level of  $\Delta$ Lf transcripts (Benaïssa et al. 2005; Hoedt et al. 2010). Figure 1 shows cell viability at 24 h and 48 h after  $\Delta$ Lf expression. The viability of MCF7 cells (Fig 1A) was slightly affected 24 h after  $\Delta$ Lf or  $\Delta$ Lf<sup>M4</sup> expression compared to cells transfected with empty pcDNA vector whereas it decreased strongly 48 h after transfection. Numbers of viable cells compared to baseline values decreased strongly, whereas the percentage of dead cells was increased, corresponding to approximately 20 % of total cells at 24 h and to 50-60 % at 48 h. Therefore, the death of MCF7 cells appears to be  $\Delta$ Lf or  $\Delta$ Lf<sup>M4</sup> dependent. The number of viable HEK 293 cells (Fig 1B) compared to baseline was not affected at 24 h and only moderately at 48 h for  $\Delta$ Lf expressing cells compared to controls. Dead cells were only visible at 48 h with approximately 25 % of dead  $\Delta$ Lf expressing HEK 293 cells and approximately 50 % in  $\Delta$ Lf<sup>M4</sup> expressing HEK 293 cells compared to total cells. The total number of viable cells decreased for both  $\Delta$ Lf isoform expressing cells, suggesting that both  $\Delta$ Lf isoforms have a main impact either on cell cycle progression or cell death. Moreover, both  $\Delta$ Lf isoforms have a higher impact on MCF7 cells than on HEK 293 cells, the effects of the expression of the  $\Delta$ Lf<sup>M4</sup> mutant are slightly more marked than those of the wild type at 48 h in HEK 293 cells. Although the data showed that  $\Delta$ Lf and its  $\Delta$ Lf<sup>M4</sup> mutant reduce cell numbers to the nearly same extent, the  $\Delta$ Lf<sup>M4</sup> mutant is more active since its expression level is more than ten times less than the wild type as previously shown (Hardivillé et al. 2010).

In order to determine whether cell death is due to apoptosis or necrosis we next studied the genomic DNA degradation pattern in  $\Delta$ Lf expressing cells. Since apoptosis is characterized by the activation of endogenous endonucleases such as CAD and endonuclease G (Li et al. 2001) with subsequent cleavage of chromatin DNA into internucleosomal fragments of 180



**Figure 1:  $\Delta$ Lf induces cell death.** Cell viability of MCF7 (A) and HEK 293 (B) cells was assayed 24h and 48h post-transfection using Trypan blue. Prior to counting, cells were transfected with pcDNA- $\Delta$ Lf, pcDNA- $\Delta$ Lf<sup>M4</sup> or empty vector (mock). Empty bars show the ratio of viable cells under each condition and at each time point compared to the baseline. Shaded bars show the ratio of dead cells under each condition and at each time point compared to the baseline. Data shown as means  $\pm$  SD ( $n \geq 5$ ). \*,  $p < 0.05$  compared to the mock-transfected cells.

bp, whereas necrosis results in non-enzymatic degradation of DNA which forms a "smear" on agarose gels (Shiokawa and Tanuma, 2004), we determined the electrophoretic behaviour of the genomic DNA extracted from these cells. Although the detection of DNA fragmentation was not quantitative, each well was loaded with the same amount of DNA and comparison to controls allows a relative estimation of the numbers of cells undergoing apoptosis. The presence of a "ladder" pattern at 180 bp intervals for HEK 293 cells that overexpressed  $\Delta$ Lf or its constitutively activate isoform is in favor of an apoptotic DNA fragmentation (Figure 2A, lanes 3 and 4).



**Figure 2: DNA fragmentation of cells expressing either  $\Delta$ Lf or its constitutively active mutant.** HEK 293 (A) and MCF7 (B) were transfected 48 h before DNA extraction with empty vector or pEGFP as negative control and pcDNA- $\Delta$ Lf or pcDNA- $\Delta$ Lf<sup>M4</sup> expression vectors. Genomic DNA was extracted from the same number of cells for each transfection and submitted to EtBr agarose gel electrophoresis. Molecular sizes are expressed in bp. The data presented corresponds to one representative experiment of at least three conducted ( $n \geq 3$ ).

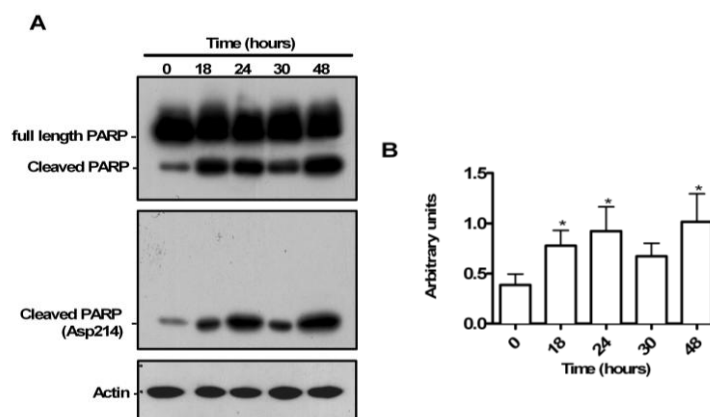
This fragmentation was strongly visible with the  $\Delta\text{Lf}^{\text{M4}}$  mutant. MCF7 cells show a basal level of apoptosis as evidenced by the presence of a "DNA scale" in both control lanes, i.e. NT and pEGFP, representing either untransfected cells or GFP expressing cells, respectively (Figure 2B, lanes 1 and 2). This pattern suggests that a small subpopulation of MCF7 cells was already in apoptosis. This feature has already been reported (Kagawa et al. 2001; Luzhna and Kovalchuk 2010) and is consistent with our cell viability results (Figure 1). The signals observed for the tracks corresponding to MCF7 cells which express  $\Delta\text{Lf}$  or its  $\Delta\text{Lf}^{\text{M4}}$  mutant have a higher intensity than that observed for the control tracks (Figure 2B, lanes 3 and 4). These results allow us to conclude that a larger population of MCF7 cells is entering into apoptosis when  $\Delta\text{Lf}$  isoforms are expressed. Like its secretory counterpart (Baumrucker et al. 2006a),  $\Delta\text{Lf}$  is also able to induce programmed cell death in cancerous mammary gland cell lines. Therefore  $\Delta\text{Lf}$ , with its restricted expression and its antiproliferative and proapoptotic activities is a good candidate as a tumor suppressor. Thus, further work will be done to collect data on the regulation of  $\Delta\text{Lf}$  transcription in order to develop strategies to enhance its expression in cancer cells.

*O*-GlcNAcylation is a dynamic and reversible post-translational modification mainly found in the cytoplasm and nucleus (Hart et al. 1989). Proteins in every functional class are subjected to this modification and about one-quarter of the identified *O*-GlcNAcylated proteome is composed of proteins involved in transcription or translation (Hart et al. 2007).  $\Delta\text{Lf}$  belongs to this group of *O*-GlcNAcylated proteins and *O*-GlcNAcylation negatively controls  $\Delta\text{Lf}$  transcriptional activity. The higher level of DNA cleavage in the presence of the constitutively active  $\Delta\text{Lf}^{\text{M4}}$  mutant confirms that this isoform is a much more efficient proapoptotic agent than the wild type protein and suggests that the mechanism of induction of apoptosis by  $\Delta\text{Lf}$  may involve its transcriptional activity. The proapoptotic activities of  $\Delta\text{Lf}$  and  $\Delta\text{Lf}^{\text{M4}}$  are currently under *in vivo* study using a prototype helper-dependent adenovirus gene delivery system (Long et al. 2009).

### **$\Delta\text{Lf}$ triggers the mitochondrial death pathway**

$\Delta\text{Lf}$  induces apoptosis in both HEK 293 and MCF7 cells. Since normal mammary gland epithelial cells express  $\Delta\text{Lf}$  whereas breast cancer cells such as MCF7 do not, we next studied the impact of « re-introducing » a pro-apoptotic transcription factor like  $\Delta\text{Lf}$  and investigated whether the death receptor or the mitochondrial pathway was involved. DNA fragmentation would occur whatever the pathway induced. Indeed, the release of

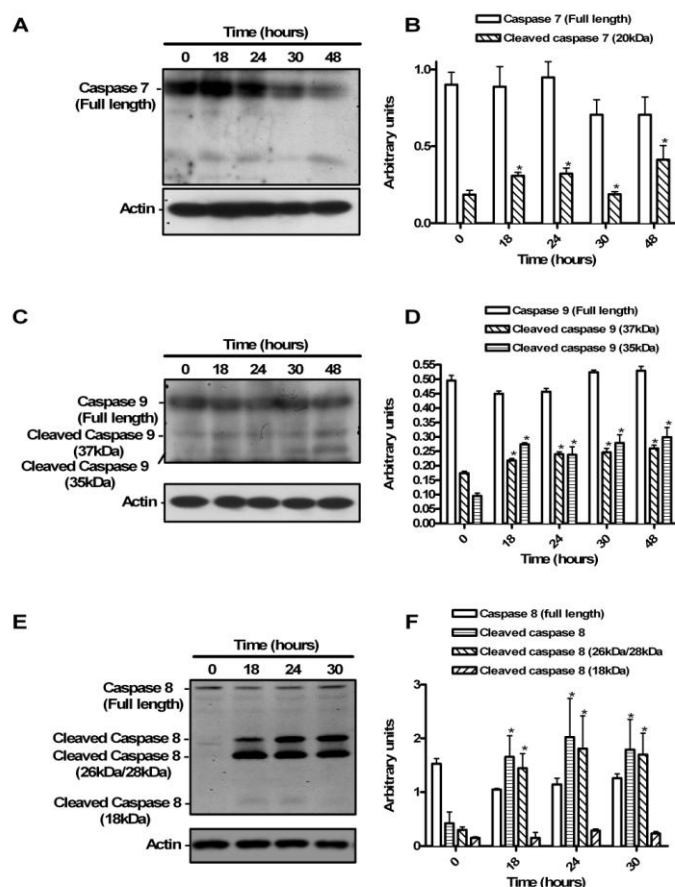
endonuclease G from the intermembrane space of mitochondria is sufficient in itself for the fragmentation of genomic DNA (Li et al. 2001) but the release of the CAD nuclease by effector caspases may also be involved (Shiokawa and Tanuma 2004). In each following experiment we verified that transfection with the null vector does not trigger apoptosis via activation of caspases or PARP cleavage, or alteration of the Bax/Bcl2 ratio (data not shown). Figure 3 shows the time course of the cleavage of PARP, a substrate of these effector caspases, in  $\Delta$ Lf-expressing MCF7 cells. In the absence of  $\Delta$ Lf, full length PARP and a basal level of cleaved PARP are visible using antibodies directed against both isoforms (Figure 3, lane 1, top panel). However, when  $\Delta$ Lf is expressed the amount of cleaved PARP is markedly increased (Figure 3A, lanes 2-5, top panel and Figure 3B). The cleavage of PARP was confirmed using cleaved PARP (Asp214) antibody which specifically detects endogenous levels of the large fragment (85 kDa) of human PARP produced by caspase cleavage. This antibody recognizes neither full length PARP nor other PARP isoforms (Figure 3A, lanes 2-5, medium panel). Actin was used as loading control (Figure 3, bottom panel).



**Figure 3:  $\Delta$ Lf induces PARP cleavage.** (A) MCF7 cells were transfected with pcDNA- $\Delta$ Lf expression vector or empty vector and lysed at the indicated times post transfection. 20  $\mu$ g of total protein extract were submitted to SDS-PAGE and immunoblotted with anti-PARP, anti-cleaved PARP (Asp214) or anti-actin antibodies. (B) The histogram represents the densitometric analysis of the cleaved PARP (Asp214) level (A, middle panel). The results are normalized for the correspondent actin immunoblot and expressed as arbitrary units. Data are shown as the means  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ); \*,  $p < 0.05$ .

In order to determine which pathway was induced following  $\Delta$ Lf expression, we next studied the cleavage of different caspases (Figure 4) except caspase 3 which is not functional in MCF7 cells (Janicke et al. 1998; Fazi et al. 2008). Since the cleavage of PARP can also be triggered by the activation of caspase 7 (Walsh et al. 2008), we further investigated cleavage of this caspase. The immunodetection and the densitometry analysis of the time course of the cleavage of caspase 7 is presented in Figure 4A, top panel and Figure 4B respectively. A

fragment of 20 kDa corresponding to cleaved caspase 7 appeared about 18 h post transfection while the signal corresponding to the 35 kDa full length caspase 7 decreased concomitantly 24 h after transfection. This result demonstrates that the activation of caspase 7 is dependent on  $\Delta$ Lf expression. Actin was used as loading control (Figure 4A, bottom panel). The cleavage of caspase 7 follows that of PARP (Figure 3).

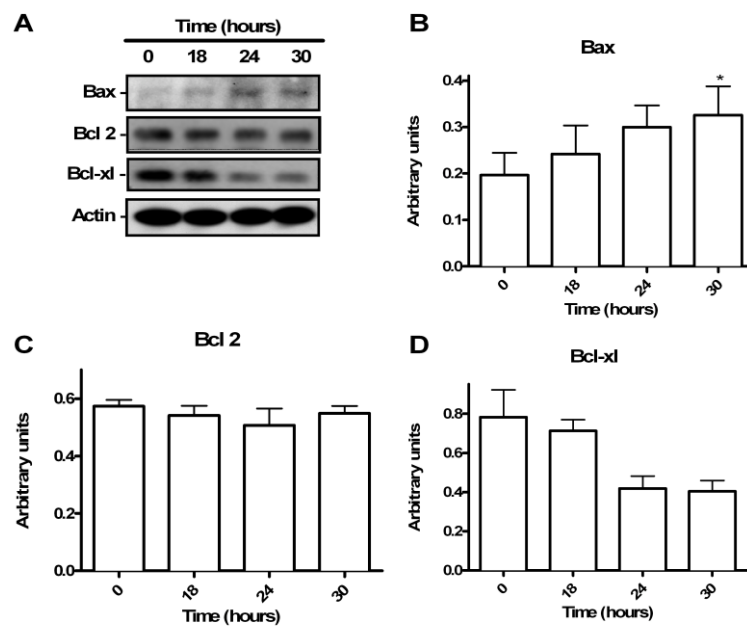


**Figure 4:  $\Delta$ Lf induces cleavage of caspase 7 (A), caspase 9 (C) and caspase 8 (E).** MCF 7 cells were transfected with pcDNA- $\Delta$ Lf expression vector or empty vector and lysed at the indicated times post transfection. 20  $\mu$ g of total protein extract were submitted to SDS-PAGE and immunoblotted with anti-caspase 7, anti-caspase 9, anti-caspase 8 or anti-actin antibodies. The densitometric analysis for the cleavage of caspase 7 (B), caspase 9 (D) and caspase 8 (F) are normalized for the correspondent actin immunoblots and expressed as arbitrary units. Data are shown as the means  $\pm$  SD (n = 3) \*, p < 0.05.

Caspase 7 is itself cleaved by caspases known as initiator caspases such as caspases 8 and 9. Caspases 8 and 9 are involved upstream respectively in the extrinsic and intrinsic pathways. The formation of the death receptor/ligand/FADD complex will therefore trigger the activation by cleavage of caspase 8 whereas the release of cytochrome c from mitochondria and the formation of the apoptosome will trigger the cleavage of caspase 9 (Cullen and Martin 2009). Immunodetection (Figures 4C and 4E) shows the cleavage of both

caspsases following  $\Delta$ Lf expression. The signals at 37 and 35 kDa corresponding to the cleaved forms of caspase 9 are visible from 18 h post transfection and increase until 48 h (Figure 4C, top panel and Figure 4D). Similarly, the appearance of signals at 26/28 kDa and 18 kDa, reflecting the activation of the cleavage of caspase 8 is also visible (Figure 4E, top panel and Figure 4F). Although both caspase-dependent pathways seem induced by  $\Delta$ Lf expression, we further investigated which of these pathways might be the principal one involved and started by studying the intrinsic pathway.

The release of molecules sequestered in the mitochondrial intermembrane space, such as cytochrome c, is under the control of Bcl-2 family members and notably of the Bax/Bcl-2 or the Bax/Bcl-xl ratio (Oltvai et al. 1993). Figure 5 shows the variation of the expression of the pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xl proteins during  $\Delta$ Lf expression in MCF7 cells. The production of  $\Delta$ Lf leads to the overexpression of Bax. The amount of Bax increased from 18 h to 30 h (Figure 5A and B). In parallel, no alteration in the level of expression of Bcl-2 was detected (Figure 5A and C), suggesting that the presence of  $\Delta$ Lf does not influence its expression.



**Figure 5: The expression of Bcl family members is modified under  $\Delta$ Lf expression.** MCF 7 cells were transfected with pcDNA- $\Delta$ Lf expression vector or empty vector and lysed at the indicated times. 20  $\mu$ g of total protein extract were submitted to SDS-PAGE and immunoblotted with anti-Bax, anti-Bcl-2, anti-Bcl-xl and anti-actin antibodies. The densitometric analyses for the expression level of Bax, Bcl-2, and Bcl-xl are normalized for the correspondent actin immunoblots and expressed as arbitrary units. Data are shown as the means  $\pm$  SD (n = 3); \*, p<0.05.

The immunodetection of Bcl-xl shows that the amount of this protein decreases 18 h after transfection (Figure 5A, lane 2 and Figure 5D) and strongly diminishes after 24 h (Figure 5A, lanes 3 and 4; and Figure 5D) compared to the control (Figure 5A, lane 1 and figure 5D). Therefore in both cases the Bax/Bcl-xl and Bax/Bcl-2 ratios are altered. The highest level was reached 24 h after transfection and corresponded to the maximal expression level of  $\Delta$ Lf as previously shown (Mariller et al. 2007; Mariller et al. 2009). Our data demonstrate that  $\Delta$ Lf modifies the balance between Bcl-2 members at the mitochondrial membrane leading to cytochrome c release (Bender and Martinou 2013) and in turn to the cleavage of caspase-9 (Figure 4C and D) confirming the proapoptotic effect of  $\Delta$ Lf and the activation of the intrinsic mitochondria-death pathway.

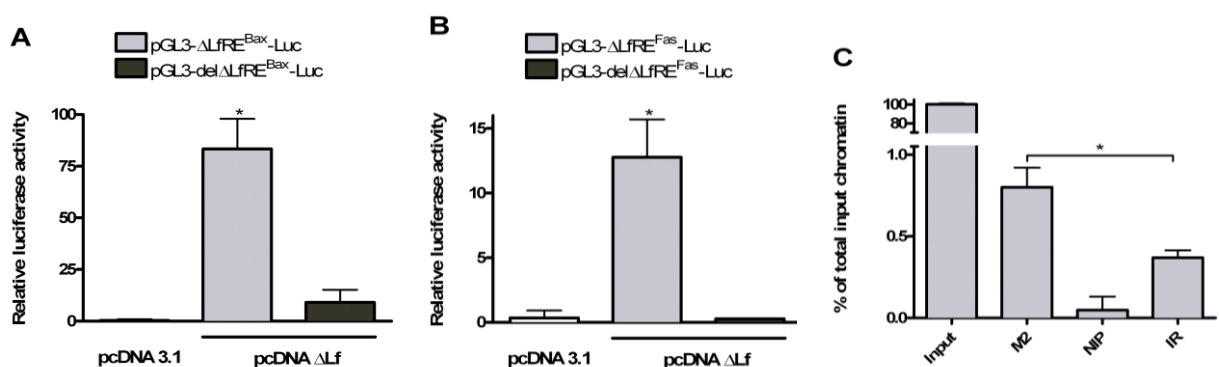
In parallel, we investigated the possibility that  $\Delta$ Lf might also induce the extrinsic pathway as suggested by the cleavage of caspase 8. However, our preliminary results failed to demonstrate that the expression of the Fas receptor is upregulated. Nevertheless, activation of the other death receptors or crosstalk between the extrinsic and the intrinsic pathways might be responsible for caspase 8 cleavage. It has been shown that, in addition to complementing caspase 3 in cells where it is inactive, caspase 7 is able to cleave caspases 2 and 6 which in turn target caspase 8 (Inoue et al. 2009). Therefore, the cleavage of caspase 8 may occur independently of the activation of death receptors suggesting that it may no longer be considered a critical criterion for the activation of the death receptor pathway. Further investigations will be necessary to clarify this point. Transfection with the null vector does not activate caspases or PARP cleavage, alter Bcl-xl/Bax or Bcl2/Bax ratio (data not shown).

### ***Bax* is a new $\Delta$ Lf target gene**

The upregulation of *Bax* transcription observed when  $\Delta$ Lf is expressed suggested that the *Bax* gene may be a direct target of this transcription factor and we therefore searched for a  $\Delta$ Lf response element ( $\Delta$ LfRE) in the *Bax* promoter region. An *in silico* study highlighted the presence of a putative GGCACCTTAT response element at -155 bp from the transcription start site. This sequence is homologous to the S1 sequence described as an Lf binding sequence by He and Furmanski (1995) and found to be functional in the promoter of the *Skp1* and *DcpS* genes (Mariller et al. 2007; Mariller et al. 2009). In this study, we also examined the promoter regions of death receptor genes. Although we were unable to demonstrate an upregulation of the Fas receptor in response to  $\Delta$ Lf expression, *in silico* analyses of the Fas promoter region revealed the presence of a GGCACCTAAC  $\Delta$ LfRE-like sequence at -1013 bp from the transcription start site.



In order to demonstrate the functionality of these two response elements, the sequences surrounding each response element were amplified using PCR. A 139 bp PCR product corresponding to the - 216 bp to - 77 bp of the *Bax* promoter region and a 137 bp PCR product corresponding to the - 1068 bp to - 931 bp of the *Fas* promoter region were cloned into pGL3 promoter luciferase reporter vectors. Luciferase reporter assays were performed in HEK 293 and MCF7 cells and verified in the inducible MDA-MB-231- $\Delta$ Lf and HeLa- $\Delta$ Lf cell lines. As the results were comparable, only the data obtained with the MCF7 cells are presented. The results are summarized in Figure 6A for the *Bax* promoter and Figure 6B for the *Fas* promoter.



**Figure 6:  $\Delta$ Lf transactivates both the *Bax* (A) and *Fas* promoters (B) and binds to the *Bax* promoter *in vivo* (C).** (A-B) MCF7 cells were co-transfected with pGL3- $\Delta$ LfRE<sup>Bax</sup>-Luc, pGL3-del $\Delta$ LfRE<sup>Bax</sup>-Luc, pGL3- $\Delta$ LfRE<sup>Fas</sup>-Luc or pGL3-del $\Delta$ LfRE<sup>Fas</sup>-Luc vector and with null plasmid or pcDNA- $\Delta$ Lf expression vector. Cells were lysed 24 h after transfection. Samples were assayed for protein content and luciferase activity. The relative luciferase activity is expressed as a ratio of the luciferase activity to the protein content. Values represent the mean  $\pm$  SD of triplicates from three independent measurements. (C) HEK 293 cells were transfected with the p3X FLAG-CMV-10- $\Delta$ Lf. 24h after transfection, a ChIP assay was performed. ChIP product was then amplified by real time PCR using specific primer pairs targeting the  $\Delta$ LfRE containing fragment of the *Bax* promoter. Total  $\Delta$ LfRE of the *Bax* promoter corresponds to input. ChIP assays were performed using an anti-FLAG (M2) and anti-rabbit IgG as nonspecific antibody control (IR). As a further control, the assay was performed without binding of an antibody to the protein G plus Sepharose (NIP). The results are expressed as a percentage, where 100 % represent the signal obtained for the Q-PCR product of the input, and are the mean  $\pm$  SD of triplicates from three independent assays; \*,  $p < 0.05$ .

Transactivation from the *Bax* promoter by  $\Delta$ Lf led to an 82-fold increase in luciferase expression compared to the basal level whereas under the same conditions, transactivation from the *Fas* promoter led to a 10-fold increase.  $\Delta$ Lf therefore enhances transcription from both  $\Delta$ LfRE sequences but at a much higher level for *Bax*. In order to demonstrate the functionality of both  $\Delta$ LfREs, the GGCCT bases in each sequence were deleted. The results obtained with the deleted  $\Delta$ LfREs within the pGL3 luciferase reporter vectors are shown in Figure 6. Interestingly, deletion of part of each  $\Delta$ LfRE strongly diminished  $\Delta$ Lf transcriptional activity of either  $\Delta$ LfRE<sup>Bax</sup> or  $\Delta$ LfRE<sup>Fas</sup> by about 80% for del $\Delta$ LfRE<sup>Bax</sup> and

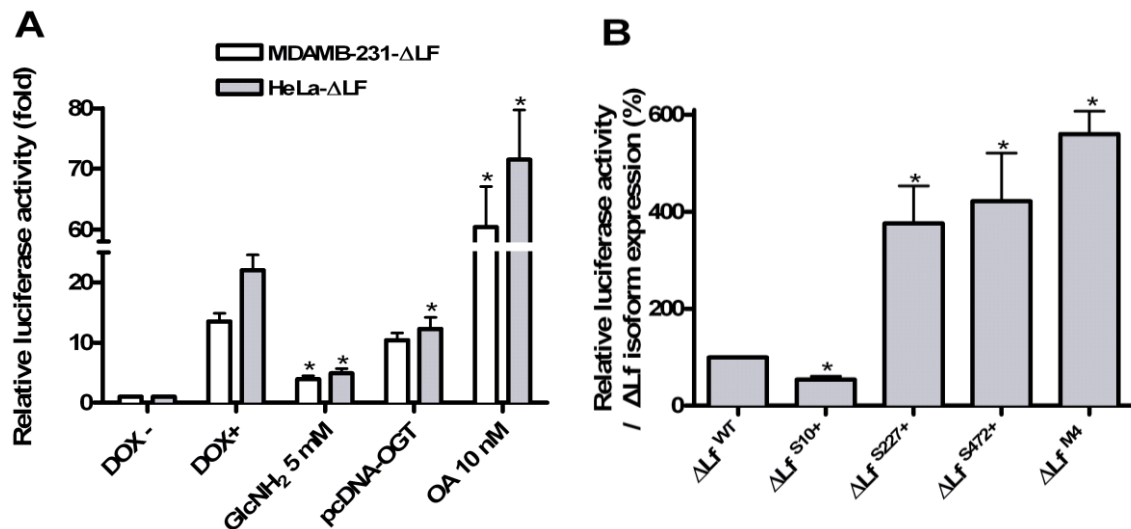
100 % for del $\Delta$ LfRE<sup>Fas</sup> as compared to the wild-type promoters. Nevertheless, even if both cis-acting elements are functional, *Bax*  $\Delta$ LfRE was much more efficient for potentiating transcription in agreement with the observation that  $\Delta$ Lf expression preferentially led to overexpression of *Bax*.

The alignment of  $\Delta$ LfREs present in different  $\Delta$ Lf target genes with the S1 sequence described by He and Furmanski (1995) points out a consensus sequence: GGCACTT(A/G)(C/G) with a highly conserved six nucleotide core from position 2 to 7 (Mariller et al. 2012). Among the  $\Delta$ LfREs,  $\Delta$ LfRE<sup>Skp1</sup>,  $\Delta$ LfRE<sup>DcpS</sup> and  $\Delta$ LfRE<sup>Bax</sup> are the most efficient with the highest score for  $\Delta$ LfRE<sup>Skp1</sup> while  $\Delta$ LfRE<sup>Fas</sup> is the least efficient (data not shown). The biggest difference that may account for the lower efficiency of  $\Delta$ LfRE<sup>Fas</sup> is the presence of an adenylic residue instead of a conserved thymidylic residue at position 7. Nevertheless, these  $\Delta$ LfREs are not present in the same nucleotidic environment and the presence of negative cis-regulatory elements can not be excluded.

We next investigate whether  $\Delta$ Lf interacts *in vivo* with the *Bax*  $\Delta$ LfRE and performed quantitative chromatin immunoprecipitation assays, the results of which are shown in Figure 6C. To this end, a 3xFLAG-Nterminus-tagged  $\Delta$ Lf was used to obtain the most reliable results (Mariller et al. 2007; Mariller et al. 2009). The DNA purified from the sonicated chromatin immunoprecipitated with anti-FLAG (M2) or not was analyzed by qPCR using *Bax*-promoter-specific primer pairs. Figure 6C shows the percentage of immunoprecipitated *Bax* promoter sequence containing a  $\Delta$ LfRE bound to  $\Delta$ Lf compared to the whole pool of *Bax* promoter sequence containing a  $\Delta$ LfRE present in the same cell sample prior to immunoprecipitation. A weak signal was detected in control conditions (NIP and IR) and corresponded to the "background" inherent to the method. The immunoprecipitation of  $\Delta$ Lf with the M2 antibody allows the amplification of the promoter region of the *Bax* promoter the signal of which is significantly different from that observed in control conditions. The upstream sequence of the albumin promoter devoid of  $\Delta$ Lf response elements was also amplified and served as a negative control. As expected, this promoter region was not enriched by the M2 antibodies (data not shown). The signal corresponding to the M2 immunoprecipitated material represents approximately 0.7% of the input, meaning that 0.7% of the response elements of the *Bax* promoter are physically occupied by  $\Delta$ Lf. This value is extremely low but coherent with bibliographic data described for other transcription factors (Nagaoka et al. 2005; Yochum et al. 2007) and indicates that  $\Delta$ Lf interacts *in vivo* with its response element at the *Bax* promoter.

## **Bax transcription is downregulated when O-GlcNAcylation is upregulated**

O-GlcNAcylation represents a molecular switch for gene regulation and we already showed that the OGlcNAc/P interplay controls *Skp1* transactivation (Hardivillé et al. 2010). Therefore, we next investigated whether Bax transactivation was also influenced by these PTMs. Doxycyclin induced MDAMB-231- $\Delta$ Lf and HeLa- $\Delta$ Lf cells were exposed to 5 mM glucosamine (GlcNH<sub>2</sub>) or overexpressed OGT in order to enhance levels of protein O-GlcNAcylation, and to 10 nM okadaic acid (OA), a phosphatase inhibitor, in order to induce protein hyperphosphorylation. As already shown for *Skp1* (Hardivillé et al. 2010), the *Bax* promoter was highly transactivated in the presence of OA whereas this decreased in the presence of GlcNH<sub>2</sub> or when OGT was overexpressed (Fig. 7A). Thus, when phosphorylation was augmented, transactivation was increased 3-4 fold compared to controls whereas when O-GlcNAcylation was increased by the addition of GlcNH<sub>2</sub> in  $\Delta$ Lf-expressing cells, transactivation of the *Bax* promoter was strongly reduced by 4-5 fold.  $\Delta$ Lf transcriptional activity also decreased when cells overexpressed OGT, but at a lower level (Fig 7A).



**Figure 7: *Bax* transactivation by  $\Delta$ Lf<sup>WT</sup> or its glycosylation mutants is downregulated by the O-GlcNAc content.** (A)  $\Delta$ Lf expression is triggered under doxycyclin induction in both MDAMB-231- $\Delta$ Lf and HeLa- $\Delta$ Lf cell lines and incubated with OA, GlcNH<sub>2</sub> or co-transfected with pcDNA-OGT for 24 h prior to lysis. Relative luciferase activities are expressed as described in Materials and Methods. Data are shown as the means  $\pm$  SD (n $\geq$ 6). (B)  $\Delta$ Lf glycosylation mutants differentially transactivate *Bax* promoter. Cells were co-transfected with p3xFLAG-CMV10- $\Delta$ Lf<sup>WT</sup>, p3xFLAG-CMV10- $\Delta$ Lf<sup>M4</sup>, 3xFLAG-CMV10- $\Delta$ Lf<sup>S10+</sup>, 3xFLAG-CMV10- $\Delta$ Lf<sup>S227+</sup> or 3xFLAG-CMV10- $\Delta$ Lf<sup>S472+</sup> and pGL3- $\Delta$ LfRE<sup>Bax</sup>-Luc or null vector. Relative luciferase activities are expressed as described in Materials and Methods. Data are shown as the means  $\pm$  SD (n $\geq$ 6); \*, p<0.05.

Since  $\Delta$ Lf possesses three O-GlcNAc sites we next investigated whether Ser10, as previously described for *Skp1*, was also the only glycosylation site involved in this control. Using our

three glycosylation mutants in which only one glycosylation site was preserved ( $\Delta\text{Lf}^{\text{S10+}}$ ,  $\Delta\text{Lf}^{\text{S227+}}$  and  $\Delta\text{Lf}^{\text{S472+}}$ ) and our  $\Delta\text{Lf}^{\text{M4}}$  null-mutant (Hardivillé et al. 2010) we assayed their transcriptional activity compared to wild type (WT) (Fig. 7B). The strong transcriptional activity of the glycosylation-null mutant confirmed that *O*-GlcNAcylation negatively regulates  $\Delta\text{Lf}$  activity as previously indicated. We compared the activity of mutants to that of  $\Delta\text{Lf}^{\text{M4}}$  in order to evaluate the impact of adding only one regulatory site at a time. The  $\Delta\text{Lf}^{\text{S227+}}$  and  $\Delta\text{Lf}^{\text{S472+}}$  mutants showed transcriptional activities nearly 4-fold greater than WT and close to that of  $\Delta\text{Lf}^{\text{M4}}$  suggesting that the presence of either *O*-GlcNAc or phosphate on these two sites does not crucially regulate  $\Delta\text{Lf}$  transcriptional activity. In contrast, the transcriptional activity of  $\Delta\text{Lf}^{\text{S10+}}$  was strongly inhibited compared to  $\Delta\text{Lf}^{\text{M4}}$  suggesting that this site is primordial for regulation. *O*-GlcNAc/P modifications on the S<sup>10</sup> site led to at least a 10-fold inhibition of  $\Delta\text{Lf}$  transcriptional activity compared to  $\Delta\text{Lf}^{\text{M4}}$  and by 2-fold compared to  $\Delta\text{Lf}^{\text{WT}}$ . We therefore confirmed our previous work showing that this site is the crucial target for the regulation of  $\Delta\text{Lf}$  transcriptional activity. Thus, as a glycosylated isoform,  $\Delta\text{Lf}$  should be unable to control cell cycle progression and apoptosis thus providing a survival advantage to cancer cells.

### Acknowledgments

This investigation was supported in part by the CNRS UMR 8576 (Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle), the Institut Fédératif de Recherche n° 147, the Université des Sciences et Technologies de Lille I, the Comité du Nord de la Ligue Nationale contre le Cancer. We would like to thank Dr. R. J. Pierce (CIIL, Institut Pasteur de Lille, France) for critical reading of this manuscript.

### References

- Ang XL, Wade Harper J (2005) SCF-mediated protein degradation and cell cycle control. *Oncogene* 24: 2860-2870
- Bail S, Kiledjian M (2008) DcpS, a general modulator of cap-binding protein-dependent processes? *RNA Biol* 5: 216-219
- Baker EN, Baker HM (2005) Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cell Mol Life Sci* 62: 2531-2539
- Baumrucker CR, Saurer S, Blum JW, Jungi T, Friis RR (2006a) Lactoferrin (Lf): Retinoid

- interactions in the mammary glands of transgenic mice overexpressing human Lf. *Mol Cell Endocrinol* 251: 56-66
- Baumrucker CR, Schanbacher F, Shang Y, Green MH (2006b) Lactoferrin interaction with retinoid signaling: cell growth and apoptosis in mammary cells. *Domest Anim Endocrinol* 30: 289-303
- Benaïssa M, Peyrat JP, Hornez L, Mariller C, Mazurier J, Pierce A (2005) Expression and prognostic value of lactoferrin mRNA isoforms in human breast cancer. *Int J Cancer* 114: 299-306
- Benanti JA (2012) Coordination of cell growth and division by the ubiquitin-proteasome system. *Semin Cell Dev Biol* 23: 492-498
- Bender T, Martinou JC (2013) Where killers meet--permeabilization of the outer mitochondrial membrane during apoptosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a011106
- Bezault J, Bhimani R, Wiprovnick J, Furmanski P (1994) Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Res* 54: 2310-2312
- Breton M, Mariller C, Benaïssa M, Caillaux K, Browaeys E, Masson M, Vilain JP, Mazurier J, Pierce A (2004) Expression of delta-lactoferrin induces cell cycle arrest. *Biometals* 17: 325-329
- Chandra Mohan KV, Devaraj H, Prathiba D, Hara Y, Nagini S (2006) Antiproliferative and apoptosis inducing effect of lactoferrin and black tea polyphenol combination on hamster buccal pouch carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1760: 1536-1544
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR (2010) The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 37: 299-310
- Cullen SP, Martin SJ (2009) Caspase activation pathways: some recent progress. *Cell Death Differ* 16: 935-938
- Damiens E, El Yazidi I, Mazurier J, Duthille I, Spik G, Boilly-Marer Y (1999) Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells. *J Cell Biochem* 74: 486-498
- Fazi B, Bursch W, Fimia GM, Nardacci R, Piacentini M, Di Sano F, Piredda L (2008) Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells. *Autophagy* 4: 435-441
- Fujita K, Kato T, Shibayama K, Imada H, Yamauchi M, Yoshimoto N, Miyachi E, Nagata Y (2006) Protective effect against 17beta-estradiol on neuronal apoptosis in hippocampus tissue following transient ischemia/recirculation in mongolian gerbils via down-regulation

- of tissue transglutaminase activity. *Neurochem Res* 31: 1059-1068
- Fujita K, Matsuda E, Sekine K, Iigo M, Tsuda H (2004a) Lactoferrin enhances Fas expression and apoptosis in the colon mucosa of azoxymethane-treated rats. *Carcinogenesis* 25: 1961-1966
- Fujita K, Matsuda E, Sekine K, Iigo M, Tsuda H (2004b) Lactoferrin modifies apoptosis-related gene expression in the colon of the azoxymethane-treated rat. *Cancer Lett* 213: 21-29
- Hardivillé S, Hoedt E, Mariller C, Benaïssa M, Pierce A (2010) O-GlcNAcylation/phosphorylation cycling at Ser10 controls both transcriptional activity and stability of delta-lactoferrin. *J Biol Chem* 285: 19205-19218
- Hart GW, Haltiwanger RS, Holt GD, Kelly WG (1989) Nucleoplasmic and cytoplasmic glycoproteins. *Ciba Found Symp* 145: 102-112
- Hart GW, Housley MP, Slawson C (2007) Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 446: 1017-1022
- Hart GW, Kreppel LK, Comer FI, Arnold CS, Snow DM, Ye Z, Cheng X, DellaManna D, Caine DS, Earles BJ, Akimoto Y, Cole RN, Hayes BK (1996) O-GlcNAcylation of key nuclear and cytoskeletal proteins: reciprocity with O-phosphorylation and putative roles in protein multimerization. *Glycobiology* 6: 711-716
- He J, Furmanski P (1995) Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature* 373: 721-724
- Hoedt E, Hardivillé S, Mariller C, Ellass E, Perraudin JP, Pierce A (2010) Discrimination and evaluation of lactoferrin and delta-lactoferrin gene expression levels in cancer cells and under inflammatory stimuli using TaqMan real-time PCR. *Biometals* 23: 441-452
- Inoue S, Browne G, Melino G, Cohen GM (2009) Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. *Cell Death Differ* 16: 1053-1061
- Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG (1998) Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 273: 9357-9360
- Kagawa S, Gu J, Honda T, McDonnell TJ, Swisher SG, Roth JA, Fang B (2001) Deficiency of caspase-3 in MCF7 cells blocks Bax-mediated nuclear fragmentation but not cell death. *Clin Cancer Res* 7: 1474-1480
- Kim B, Kang S, Kim SJ (2013) Genome-wide pathway analysis reveals different signaling pathways between secreted lactoferrin and intracellular delta-lactoferrin. *PLoS One* 8: e55338

- Lee DH, Park T, Kim HW (2006) Induction of apoptosis by disturbing mitochondrial-membrane potential and cleaving PARP in Jurkat T cells through treatment with acetoxyscirpenol mycotoxins. *Biol Pharm Bull* 29: 648-654
- Legrand D, Pierce A, Ellass E, Carpentier M, Mariller C, Mazurier J (2008) Lactoferrin structure and functions. *Adv Exp Med Biol* 606: 163-194
- Lefebvre, T., Pinte, S., Guerardel, C., Deltour, S., Martin-Soudant, N., Slomianny, M.C., Michalski, J.C., et Leprince, D. 2004b. The tumor suppressor HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is O-GlcNAc glycosylated. *Eur J Biochem.* 271:3843-54.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491-501
- Li LY, Luo X, Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412: 95-99
- Li WY, Li QW, Han ZS, Jiang ZL, Yang H, Li J, Zhang XB (2011) Growth suppression effects of recombinant adenovirus expressing human lactoferrin on cervical cancer in vitro and in vivo. *Cancer Biother Radiopharm* 26: 477-483
- Liao Y, Du X, Lönnnerdal B (2010) miR-214 regulates lactoferrin expression and pro-apoptotic function in mammary epithelial cells. *J Nutr* 140: 1552–1556
- Liu D, Wang X, Zhang Z, Teng CT (2003) An intronic alternative promoter of the human lactoferrin gene is activated by Ets. *Biochem Biophys Res Commun* 301: 472-479
- Long N, Hardivillé S, Pierce A, Fukamachi K, Futakuchi M, Alexander DB, Shirai T, Tsuda H (2009) Construction of a multi-functional helper-dependent adenovirus based system for cancer gene therapy. *Asian Pac J Cancer Prev* 10: 939-960
- Luzhna L, Kovalchuk O (2010) Modulation of DNA methylation levels sensitizes doxorubicin-resistant breast adenocarcinoma cells to radiation-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 392: 113-117
- Mariller C, Benaïssa M, Hardivillé S, Breton M, Pradelle G, Mazurier J, Pierce A (2007) Human delta-lactoferrin is a transcription factor that enhances Skp1 (S-phase kinase-associated protein) gene expression. *FEBS J* 274: 2038-2053
- Mariller C, Hardivillé S, Hoedt E, Benaïssa M, Mazurier J, Pierce A (2009) Proteomic approach to the identification of novel delta-lactoferrin target genes: Characterization of DcpS, an mRNA scavenger decapping enzyme. *Biochimie* 91: 109-122
- Mariller C, Hardivillé S, Hoedt E, Huvent I, Pina-Canseco S, Pierce A (2012) Delta-lactoferrin, an intracellular lactoferrin isoform that acts as a transcription factor. *Biochem Cell Biol* 90: 307-319

- Masson PL, Heremans JF, Schonke E (1969) Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J Exp Med* 130: 643-658
- Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F (2003) Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115: 751-763
- Nagaoka H, Ito S, Muramatsu M, Nakata M, Honjo T (2005) DNA cleavage in immunoglobulin somatic hypermutation depends on de novo protein synthesis but not on uracil DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2022-2027
- Nagata S (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365
- Nuss DL, Furuichi Y, Koch G, Shatkin AJ (1975) Detection in HeLa cell extracts of a 7-methyl guanosine specific enzyme activity that cleaves m7GpppNm. *Cell* 6: 21-27
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619
- Ow YP, Green DR, Hao Z, Mak TW (2008) Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 532-542
- Panella TJ, Liu YH, Huang AT, Teng CT (1991) Polymorphism and altered methylation of the lactoferrin gene in normal leukocytes, leukemic cells, and breast cancer. *Cancer Res* 51: 3037-3043
- Penco S, Caligo MA, Cipollini G, Bevilacqua G, Garre C (1999) Lactoferrin expression in human breast cancer. *Cancer Biochem Biophys* 17: 163-178
- Pierce A, Legrand D (2009) Advances in lactoferrin research. *Biochimie* 91: 1-2
- Shiokawa D, Tanuma S (2004) Differential DNases are selectively used in neuronal apoptosis depending on the differentiation state. *Cell Death Differ* 11: 1112-1120
- Siebert PD, Huang BC (1997) Identification of an alternative form of human lactoferrin mRNA that is expressed differentially in normal tissues and tumor-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2198-2203
- Son HJ, Lee SH, Choi SY (2006) Human lactoferrin controls the level of retinoblastoma protein and its activity. *Biochem Cell Biol* 84: 345-350
- Son KN, Park J, Chung CK, Chung DK, Yu DY, Lee KK, Kim J (2002) Human lactoferrin activates transcription of IL-1beta gene in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 236-241
- Spagnuolo PA, Bird RP, Hoffman-Goetz L (2007) Effect of short-term dietary intake of bovine lactoferrin on intestinal lymphocyte apoptosis in healthy mice. *Nutrition* 23: 812-817

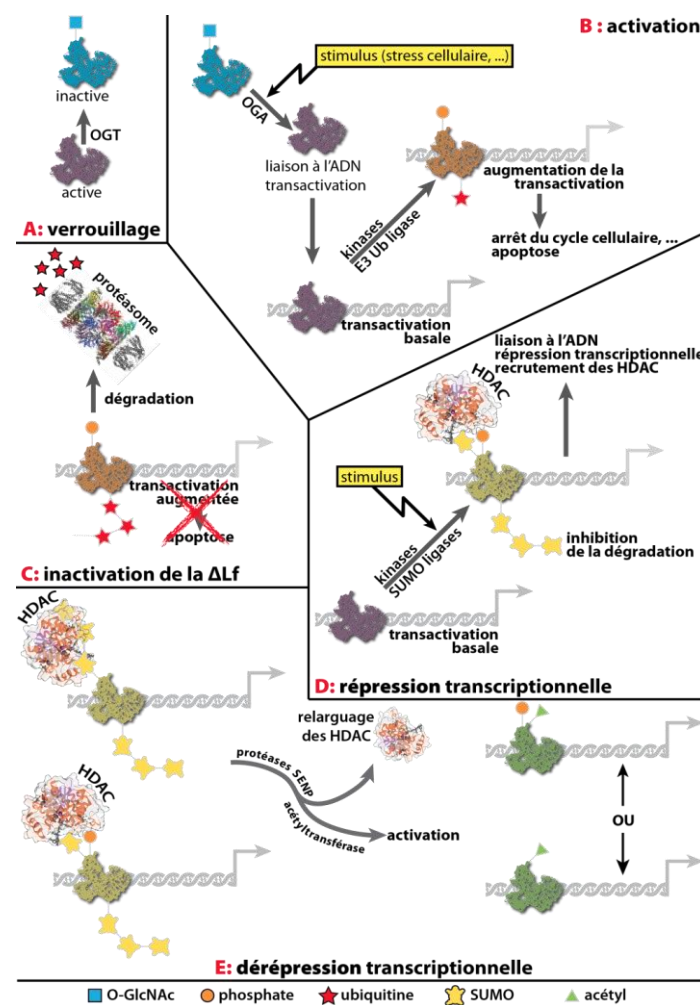


- Spagnuolo PA, Hoffman-Goetz L (2008) Lactoferrin effect on lymphocyte cytokines and apoptosis is independent of exercise. *Med Sci Sports Exerc* 40: 1013-1021
- Spik G, Coddeville B, Montreuil J (1988) Comparative study of the primary structures of sero-, lacto- and ovotransferrin glycans from different species. *Biochimie* 70: 1459-1469
- Teng C, Gladwell W, Raphiou I, Liu E (2004) Methylation and expression of the lactoferrin gene in human tissues and cancer cells. *Biometals* 17: 317-323
- Tsuda H, Ohshima Y, Nomoto H, Fujita K, Matsuda E, Iigo M, Takasuka N, Moore MA (2004) Cancer prevention by natural compounds. *Drug Metab Pharmacokinet* 19: 245-263
- Valenti P, Greco R, Pitari G, Rossi P, Ajello M, Melino G, Antonini G (1999) Apoptosis of Caco-2 intestinal cells invaded by *Listeria monocytogenes*: protective effect of lactoferrin. *Exp Cell Res* 250: 197-202
- van Dijk E, Le Hir H, Seraphin B (2003) DcpS can act in the 5'-3' mRNA decay pathway in addition to the 3'-5' pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12081-12086
- Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, Luthi AU, Gerner C, Martin SJ (2008) Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 12815-12819
- Wang J, Li Q, Li K, Ou Y, Han Z, Gao D, Li J (2011) Effects of adenovirus vectors mediated human lactoferrin cDNA on mice bearing EMT6 breast carcinoma. *Pharmazie* 66: 704-709
- Wang J, Li Q, Ou Y, Li K, Han Z, Wang P, Zhou S (2012) Recombination adenovirus-mediated human lactoferrin cDNA inhibits the growth of human MCF-7 breast cancer cells. *J Pharm Pharmacol* 64: 457-463
- Xiao Y, Monitto CL, Minhas KM, Sidransky D (2004) Lactoferrin down-regulates G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of head and neck cancer cells. *Clin Cancer Res* 10: 8683-8686
- Yochum GS, McWeeney S, Rajaraman V, Cleland R, Peters S, Goodman RH (2007) Serial analysis of chromatin occupancy identifies beta-catenin target genes in colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3324-3329

# *Discussion et Conclusion*

La delta-lactoferrine est un facteur de transcription à activité anti-proliférative et pro-apoptotique. Les études menées par le groupe ont permis de faire avancer les connaissances sur cette protéine et de mieux cerner son rôle. La delta-lactoferrine cible des gènes qui possèdent un élément de réponse à la delta-lactoferrine. Ces gènes sont impliqués dans des processus cellulaires importants comme la transition G1/S, la régulation de l'apoptose, et la dégradation des ARN messagers (Mariller *et al.*, 2007; Mariller *et al.*, 2009; Hoedt *et al.*, 2014, Hardivillé *et al.*, 2014a). La delta-lactoferrine est la cible d'au moins cinq modifications post-traductionnelles : la O-GlcNAcylation, la phosphorylation, l'ubiquitinylation, la SUMOylation et l'acétylation. La figure 43 schématise l'hypothèse selon laquelle la delta-lactoferrine est soumise à au moins deux niveaux de régulation (Mariller *et al.*, 2012) : régulation de sa dégradation et de son activité transcriptionnelle d'une part grâce à la compétition O-GlcNAcylation/Phosphorylation/Ubiquitinylation, et d'autre part, grâce aux compétitions SUMOylation/acétylation pour l'activité transcriptionnelle et SUMOylation/Ubiquitinylation pour le contrôle de son temps de ½ vie .

**Figure 43 : Illustration de la régulation de l'activité transcriptionnelle et de la stabilité de la delta-lactoferrine par les modifications post-traductionnelles.** A : la delta-lactoferrine est présente dans la cellule sous une forme O-GlcNAcylée inactive B : en réponse à un stimulus comme le stress cellulaire, l'OGA déglycosyle la delta-lactoferrine, rendant ainsi le résidu de S<sup>10</sup> accessible aux kinases. La phosphorylation du résidu S<sup>10</sup> potentialise la phosphorylation de la séquence PEST, l'ubiquitinylation, la fixation de la delta-lactoferrine à l'ADN et la transactivation de ses gènes cibles. C : suite à l'activation transcriptionnelle, la poly-ubiquitinylation de la delta-lactoferrine la conduit vers la dégradation protéasomale. D : le second niveau de régulation implique la SUMOylation et serait à l'origine du recrutement de co-répresseurs tels que les HDAC qui condensent la chromatine et empêchent la transcription. E : La DéSUMOylation par les SENP protéases et l'acétylation pourraient conduire à une dé-répression de la transcription. (d'après Mariller *et al.*, 2012).

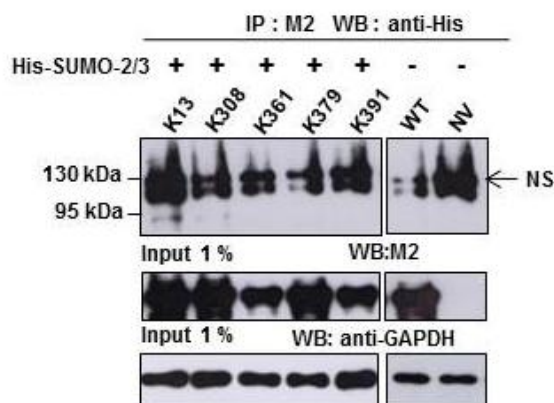


Au cours de mon travail de thèse, j'ai étudié la SUMOylation et l'acétylation, ainsi que le dialogue entre SUMOylation et acétylation, et SUMOylation et ubiquitinylation. J'ai étudié également l'impact de la balance O-GlcNAcylation/Phosphorylation sur l'expression de Bax, une cible de l'activité transcriptionnelle de la delta-lactoferrine.

La première description de protéines SUMO impliquées dans des mécanismes de modifications post-traductionnelles date d'il y a à peine dix ans. La découverte de cette modification a révolutionné la compréhension de certains mécanismes régulant des protéines et en particulier les facteurs de transcription. Plusieurs facteurs de transcription référencés dans la littérature sont la cible de protéines SUMO, et les publications les concernant ne cessent d'augmenter. La delta-lactoferrine est aussi un facteur de transcription et nous avons cherché à savoir si elle pouvait être SUMOylée. Notre recherche *in silico* nous a permis de trouver 4 sites SUMO, deux sites consensus K13 et K361 et 2 sites non consensus K308 et K391 ainsi qu'un motif SIM. Nous avons également identifié le site K13 comme un site putatif d'acétylation.

Les travaux de Hardivillé *et al.* (2010) ont permis de démontrer que la delta-lactoferrine possédait deux sites d'ubiquitinylation, les résidus de lysine K379 et K391 avec le résidu K379 comme cible majeure de cette modification. Le site K391 semble être la cible non seulement de l'ubiquitinylation mais aussi être un site accepteur de SUMOylation. Bien que le site majeur d'ubiquitinylation, la lysine K379, n'ait pas été mis en évidence comme site potentiel de SUMOylation, j'ai montré qu'il était aussi SUMOylé et qu'un dialogue entre la SUMOylation et l'ubiquitinylation existait.

Nous avons montré que la delta-lactoferrine est SUMOylée par la protéine SUMO-1 sur cinq résidus de lysine différents (Article 1). Nos travaux nous ont également permis de mettre en évidence une SUMOylation extrêmement faible par les protéines SUMO2/3 sur les résidus K13 et K308 (Figure 44).



**Figure 44 : Modification de la delta-lactoferrine par SUMO2/3 sur les résidus K13 et K308.** Les cellules ont été co-transfectées par un plasmide de la delta-lactoferrine (sauvage 'WT' ou mutés) et le plasmide pcDNA3.1-His-SUMO-2/3, puis lysées 24 h après. Les lysats ont été immunoprécipités avec l'anticorps M2 et les Western-blot révélés avec un anti-His. Les lysats totaux (*input*) ont été révélés avec le M2 et l'anti-GAPDH et servent de contrôle de charge. Les données correspondent à une expérience représentative d'au moins 3 expériences indépendantes ( $n \geq 3$ ).

Nous n'avons pas étudié l'impact de cette modification sur la delta-lactoferrine au vu de sa faible représentation mais nous essayerons à l'avenir de voir s'il s'agit d'un phénomène de redondance ou s'il y a un rôle particulier de la delta-lactoferrine associé à sa modification par SUMO2/3.

Le site K13 est localisé dans la séquence consensus **IK<sub>13</sub>RDSP** PDSM-like (**ΨKxE<sub>xx</sub>SP**), laquelle est SUMOylée mais aussi acétylée. Ce motif est la cible du dialogue entre SUMOylation, acétylation et phosphorylation comme décrit pour le facteur de transcription MEF2 (Yang *et al.*, 2006 ; Zhao *et al.*, 2005c ; Shalizi *et al.*, 2006a). Nous avons montré l'existence d'un dialogue SUMOylation/acétylation pour la delta-lactoferrine mais nous ne savons pas si la phosphorylation peut aussi être impliquée, comme c'est le cas pour MEF2. Il serait donc intéressant de savoir si la sérine 16 est la cible d'une phosphorylation et si elle participe au dialogue SUMOylation/acétylation. La mutation de ce résidu de sérine par l'alanine ou par un résidu mimant la phosphorylation comme l'aspartate ou le glutamate pourrait permettre de répondre à cette question. Il serait intéressant également de connaître la kinase impliquée dans cette régulation. Nous aimerions poursuivre ce travail en mettant en évidence l'enzyme E3 ligase qui facilite la SUMOylation et savoir s'il s'agit de l'HDAC4 ou d'une autre ligase. Nous aimerions également identifier l'acétyltransférase qui réalise l'acétylation ainsi que la désacétylase qui reverse cette réaction.

De plus, de nombreux régulateurs transcriptionnels dont l'activité est régulée par une permutation acétylation/SUMOylation possèdent un motif **PXDLS** appelé motif de répression (Kuppuswamy *et al.*, 2008) sur lequel se fixent des co-répresseurs, dont la phosphoprotéine CtBP. CtBP recrute d'autres régulateurs comme des HDACs, des méthylases mais également des SUMO ligases favorisant la SUMOylation du répresseur. L'acétylation du résidu de lysine immédiatement situé en aval de ce motif (PXDLSXXK) empêche l'interaction avec le facteur CtBP et la SUMOylation conduisant à la dérégulation. De manière intéressante le résidu de lysine K13 est situé dans un motif *répression-like*. Ce site K13 est aussi très important car il est localisé dans le premier DBD dans l'environnement immédiat de la sérine S10 (Hardivillé *et al.*, 2010). En effet ce site est un site régulateur clef qui permet le contrôle de l'activité transcriptionnelle et de la stabilité de la delta-lactoferrine par la balance O-GlcNAc/P : La O-GlcNAcylation régule négativement l'activité transcriptionnelle de la delta-lactoferrine et positivement sa stabilité, alors que la phosphorylation fait l'inverse. Ainsi le site K13 pourrait contribuer à cette régulation de la transcription par la delta-lactoferrine car la SUMOylation de ce site va conduire à la répression transcriptionnelle alors que l'acétylation va lever cette répression. Il serait donc très intéressant de déterminer s'il existe un dialogue entre ces

différents types de régulation *O*-GlcNAcylation/phosphorylation et SUMOylation/acétylation. De plus, bien qu'il n'y ait pas de données dans la littérature concernant un possible dialogue entre SUMOylation et *O*-GlcNAcylation, il a été montré récemment que l'OGT qui est la *O*-GlcNAc transférase est elle-même modifiée par SUMOylation (Tammsalu *et al.*, 2014).

Le site de SUMOylation K308 fait partie d'une séquence consensus **LRK<sub>308</sub>SEEE** de type NDSM (**ΨKxE<sub>xx</sub>EEEE**). La nature acide des résidus d'acide glutamique qui apportent une forte charge négative dans l'environnement immédiat de la lysine K308, facilite l'interaction avec un domaine fortement positif d'Ubc9 permettant ainsi la stabilisation de la machinerie de SUMOylation. Ainsi la SUMOylation est favorisée et de cette façon la répression transcriptionnelle de la delta-lactoferrine. Nous avons démontré que l'invalidation d'Ubc9, et/ou la déSUMOylation avec SENP2, permet d'augmenter l'activité transcriptionnelle de la delta-lactoferrine. Le remplacement des résidus glutamate par des résidus d'alanine suivi de la mesure de l'activité transcriptionnelle de ce mutant pourrait être une stratégie pour savoir si ce groupe de glutamate serait responsable de la très forte répression de l'activité transcriptionnelle de la delta-lactoferrine au niveau du site K308. Ce site, situé dans une courte hélice  $\alpha$  qui relie les deux lobes de la delta-lactoferrine, est situé stratégiquement dans une zone de la protéine qui pourrait être le DBD2. Ce site est également un site clef de régulation de l'activité transcriptionnelle de la delta-lactoferrine.

Le site K361 est localisé dans une séquence consensus optimale **ΨKxE** qui est directement reconnue par Ubc9 pour être SUMOylée sans que des SUMO E3 ligases soient nécessaires. L'activité transcriptionnelle du mutant K361 est moins inhibée que celle du mutant K308, ce qui pourrait signifier qu'il est moins SUMOylé. Néanmoins, la SUMOylation de K361 participe à l'activité répressive de la transcription. De manière étrange un motif putatif SIMr <sup>350</sup>**STTEDCIALV**L**KGEST**<sup>365</sup> correspondant aux acides aminés 350 à 363 contient la séquence consensus optimale LKGE. Les motifs SIM permettent la reconnaissance des substrats SUMOylés et la SUMOylation par Ubc9 de séquences non-consensus. La fonctionnalité de ce motif SIM de la delta-lactoferrine devra être démontrée. La mutation des résidus hydrophobes colorés en rouge devrait permettre de connaître l'impact de ce motif SIM sur la SUMOylation de sites non-consensus comme par exemple la lysine K379. Si ce motif s'avérait être fonctionnel, la phosphorylation de la sérine S350 pourrait aussi être impliquée dans le processus de SUMOylation comme décrit pour d'autres protéines (Stehmeier *et al.*, 2009; Miteva *et al.*, 2010).

Le site K379 de séquence **CK<sub>379</sub>CG** est un site très important puisqu'il est localisé près de la séquence PEST de la delta-lactoferrine et qu'il est le site majeur de

l'ubiquitinylation (Hardivillé *et al.*, 2010). Nos résultats montrent que ce site est SUMOylé bien qu'il n'appartienne pas à une séquence consensus. Il est également, mais dans une moindre mesure, la cible des acétyltransférases. La polyubiquitinylation de protéines est sous le contrôle d'un motif de dégradation rapide en général activé par phosphorylation. La séquence PEST de la delta-lactoferrine (<sup>391</sup>**KSQQSSDPDPNCVD**<sup>404</sup>) est phosphorylée sur les résidus de sérine 392, 395 et/ou 396 (Hardivillé *et al.*, 2010). La phosphorylation de la sérine S10 et de la séquence PEST déclenche l'ubiquitinylation des lysines K379 et K391 et conduit à la dégradation protéasomale. Nous montrons à l'inverse que la SUMOylation de ces mêmes résidus de lysine stabilise la protéine en empêchant leur accès à l'ubiquitine. Finalement, le résidu K391 qui fait partie intégrante de la séquence PEST, n'est que peu impliqué dans la régulation de la delta-lactoferrine. En effet, le mutant K391 n'est que très peu modifié par SUMO-1 et son activité transcriptionnelle, proche de celle du mutant de SUMOylation M5S, n'est pas réprimée.

Nos résultats montrent que l'extrémité N-terminale de la delta-lactoferrine concentre les sites de régulation de son activité transcriptionnelle, à savoir le résidu K13, cible de la SUMOylation et de l'acétylation, et la sérine S10, cible de la *O*-GlcNAcylation et de la phosphorylation. Ainsi l'activité de la delta-lactoferrine serait contrôlée de manière synergique et/ou exclusive par *O*-GlcNAcylation/phosphorylation (Hardivillé *et al.*, 2010) et SUMOylation/acétylation. La régulation négative de la transcription est réalisée soit par *O*-GlcNAcylation qui stabilise la delta-lactoferrine dans une forme qui ne se fixe pas à l'ADN soit par SUMOylation qui conduit à une forme qui se fixe à l'ADN mais qui permettrait le recrutement de co-répresseurs de la transcription. Ces modifications sont réversibles et la déglycosylation et/ou la dé-SUMOylation permettent l'activation de l'activité de la delta-lactoferrine par phosphorylation et/ou acétylation. La stabilité de la delta-lactoferrine, quant à elle, met en jeu d'autres permutations comme *O*-GlcNAcylation/phosphorylation/ubiquitinylation et SUMOylation/ubiquitinylation. Ce double jeu de modifications pourrait constituer le code épigénétique de la delta-lactoferrine responsable du contrôle de ses activités anti-proliférative et pro-apoptotique par transactivation sélective de certains de ses gènes cibles.

La partie C-terminale de la delta-lactoferrine est également importante car elle contient la séquence de localisation nucléaire « **RRSDTSLTWNSVKGKK** » (Mariller *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'exploration de la séquence de la delta-lactoferrine *via* le serveur NetNES 1.1 (La Cour *et al.*, 2004) a permis d'identifier une séquence d'export nucléaire *NES-like* <sup>541</sup>**LKLADFALLCL**<sup>551</sup>, phylogénétiquement conservée entre les lactoferrines de diverses

espèces. Il nous faudra déterminer par la suite si cette séquence NES est fonctionnelle.

L'interaction de la delta-lactoferrine avec son élément de réponse présent dans la séquence promotrice de certains gènes comme par exemple *Skp1* est importante pour l'induction de la transcription. Nos résultats ont montré que lorsqu'elle est SUMOylée, la delta-lactoferrine est capable de réprimer la transcription du gène *Skp1*. Il serait intéressant de voir si cette répression est sélective, ou si la delta-lactoferrine SUMOylée est capable de réprimer également la transcription de d'autres de ses gènes cibles comme *Dcps*, *Bax*, *SelH*, *UBE2E2* et *GTF2F2*.

Comme nous l'avons déjà mentionné, la delta-lactoferrine s'exprime faiblement ou pas dans le cas du cancer du sein et son expression est corrélée à un effet antiprolifératif (Siebert et Huang, 1997; Breton *et al.*, 2004; Benaïssa *et al.*, 2005). Afin de connaître l'impact de la réintroduction de la delta-lactoferrine et de celle d'une delta-lactoferrine mutante pour ses sites de *O*-GlcNAcylation, des lignes cellulaires que ne produisent pas ou peu de delta-lactoferrine, comme les cellules HEK-293 et la lignée cellulaire de cancer du sein MCF7, ont été transfectées par des vecteurs d'expression de la delta-lactoferrine et de son mutant (article 2). Le résultat de cette étude montre que la delta-lactoferrine induit la mort cellulaire par apoptose. L'induction de l'apoptose par la delta-lactoferrine ou son mutant de glycosylation conduit à la mort cellulaire programmée par activation de la voie intrinsèque et à une altération du ratio *Bax/Bcl-2* et *Bax/Bcl-xl*. La surexpression de *Bax* en réponse à la delta-lactoferrine a permis d'identifier *Bax* comme nouveau gène cible de la delta-lactoferrine et de localiser un élément de réponse à la delta-lactoferrine dans sa région promotrice. Nous savions que la balance *O*-GlcNAc/Phospho contrôle la transactivation du gène *Skp1*, les résultats obtenus (article 2) suggèrent que la balance *O*-GlcNAc/Phospho participe également à la transactivation de *Bax* via la modification du site S10. Nous avons ainsi confirmé nos travaux antérieurs montrant que la S10 est un site régulateur crucial de l'activité de la delta-lactoferrine.

Mes travaux de thèse ainsi que les travaux antérieurs du groupe ont permis de faire avancer la connaissance sur la régulation de l'activité transcriptionnelle de la delta-lactoferrine et de sa stabilité par un jeu de cinq modifications post-traductionnelles. Cependant, la delta-lactoferrine pourrait être la cible de d'autres modifications comme la méthylation ou la néddylation. Ainsi, le décryptage du « code delta-lactoferrine » devrait conduire à établir la carte des modifications post-traductionnelles et les interrelations entre ces MPTs responsables de l'activité anti-tumorale optimale de la delta-lactoferrine. Il pourrait également contribuer à comprendre les mécanismes moléculaires complexes et finement



régulés de l'activité de la delta-lactoferrine, en fonction du type de gènes cibles et de l'homéostasie cellulaire.

# *Annexes*

## Liste des abréviations

<b>3'UTR</b>	3' UnTranslated Region
<b>5'RACE</b>	Rapid Amplification of 5' Complementary DNA Ends
<b>A</b>	Adénine
<b>Ac</b>	Acetyl
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ATP5C1</b>	ATP synthase,H+Transporting Mitochondrial Complex Gamma
<b>AIF</b>	Apoptosis-inducing factor
<b>AML-1</b>	Acute myeloid leukemia 1
<b>Apaf-1</b>	Apoptotic peptidase activating factor 1
<b>APC/C</b>	Anaphase-promoting complex/cyclosome
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm :</b>	ARN messenger
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>Bad</b>	Bcl-2-associated agonist of cell death
<b>Bak</b>	Bcl-2-antagonist/killer
<b>Bax</b>	Bcl-2-associated X protein
<b>Bcl-2</b>	B-cell lymphoma 2
<b>Bid</b>	BH3 interacting domain death agonist
<b>Bik</b>	Bcl-2-interacting killer
<b>Bim</b>	Bcl-2 interacting mediator of cell death
<b>Blk</b>	B lymphoid tyrosine kinase
<b>BRCA2</b>	Breast Cancer 2
<b>C</b>	Cytosine
<b>CAD</b>	Caspase Activated DNase
<b>CBC</b>	Cap-binding complex
<b>CBF3</b>	Centromere-binding factor 3
<b>CCT2</b>	T-complex protein 1, beta subunit
<b>Cdc</b>	Cell division cycle
<b>Cdk</b>	Cyclin dependent kinase
<b>CENP-E</b>	Centromere-associated protein E

<b>CTD</b>	Carboxy-terminal domain
<b>CtF13p</b>	Centromere DNA-Binding protein complex CBF3 Subunit C (CTF13)
<b>Cul</b>	Culline
<b>DAVID</b>	Data base Sor Annotation, Visualizing and Integrates Discovery
<b>DBD</b>	DNA binding domain
<b>D-Box</b>	Destruction box
<b>Dcp2</b>	mRNA-decapping enzyme 2
<b>DcpS</b>	Scavenger decapping enzyme
<b>eIF4E</b>	Eukaryotic translation initiation factor 4E
<b>eNOS</b>	Endothelial nitric oxide synthase
<b>ERE</b>	Estrogen response element
<b>ET-1</b>	Endotheline-1
<b>FBP</b>	F-box protein
<b>FoxO1</b>	Forkhead box O1
<b>G</b>	Guanine
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>GlcNAc</b>	N-acétylglucosamine
<b>GlcNAcylation</b>	<i>O</i> -N-acétylglucosaminylation
<b>GlcNH<sub>2</sub></b>	Glucosamine
<b>GRE</b>	Glucocorticoid response element
<b>GTF2F1</b>	General Transcription Factor 2 F1
<b>GTF2F2</b>	General Transcription Factor 2 F2
<b>HAT</b>	Histone acétyltransférase
<b>HBB</b>	Hemoglobin Beta
<b>HECT</b>	Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus
<b>HIC-1</b>	Hypermethylated In Cancer 1
<b>HNRPL</b>	Heterogeneous Nuclear RibonucleoProtein L
<b>HRE</b>	Hormone Response Element
<b>Hsc</b>	Heat shock cognate protein
<b>Hsp</b>	Heat shock proteins
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IRF</b>	Interferon Regulatory Factor

<b>ISG15</b>	Interferon Stimulated Gene-15
<b>KEN-Box</b>	Consensus KEN
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>mER-<math>\beta</math></b>	Murine estrogen receptor- $\beta$
<b>miRNA</b>	Micro ARN
<b>NES</b>	Nuclear Exit Sequence
<b>NF-E2</b>	Nuclear Factor Erythroid-derived 2
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor-kappa B
<b>NLS</b>	Nuclear localization signal
<b>OGlcNAc</b>	OGlcNAcylation
<b>OGA</b>	N-acétyl $\beta$ -D-glucosaminidase
<b>OGT</b>	Uridine diphospho- <i>N</i> -acétylglucosamine : polypeptide $\beta$ - <i>N</i> -acétylglucosaminyltransférase
<b>ORF</b>	Open Reading Frame
<b>PANTHER</b>	Protein Analysis Through Evolutionary Relations
<b>PARP</b>	Poly (ADP-ribose) polymérase
<b>pb</b>	Paire de base
<b>PCBP2</b>	Poly(rC)-binding protein 2
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PDIA3</b>	Protein disulfide isomerase A
<b>PEST</b>	Proline, Glutamic acid (E),Serine (S) Threonine (T)
<b>PRP19</b>	Pre-mRNA processing factor 19
<b>PSB3</b>	Proteasome subunit beta type 3
<b>qPCR</b>	Quantitative polymerase chain reaction
<b>Rb</b>	Retinoblastoma susceptibility protein
<b>Rbx</b>	Ring box protein
<b>RE</b>	Response element
<b>RING</b>	Really interesting new gene
<b>SCF</b>	Skp1-Cul1-F-box-protein
<b>SIM</b>	Sumo Interacting Motif
<b>siRNA</b>	Short interfering RNA
<b>Skp1</b>	S-phase-kinase-associated protein-1

<b>STAT</b>	Signal Transducers and Activator of Transcription
<b>SeIH</b>	Sélénoprotéine H
<b>SUMO</b>	Small ubiquitin related modifier
<b>Sp1</b>	Specificity Protein 1
<b>SILAC p32</b>	Stable Isotope Labelling by aminoacids in cell Culture
<b>T</b>	Thymine
<b>TBP</b>	TATA- binding- protein
<b>TCPB</b>	T Complex Subunit B
<b>TFIIF</b>	Transcription Factor IIF
<b>TRA2B</b>	Splicing Factor,Arginine/Serine Rich10 Transformer Homolog 2
<b>Ub</b>	Ubiquitine
<b>Uba</b>	Ubiquitin-activating enzymes
<b>Ubc</b>	Ubiquitin-conjugating enzyme
<b>UBE2E1</b>	Ubiquitin Binding Enzyme E1
<b>Ubl</b>	Ubiquitin like modifier
<b>XRE</b>	Xenobiotic response element
<b>Xrn1</b>	5'-3' exoribonuclease 1
<b>YY1</b>	YinYang-1
<b>ΔLfRE</b>	Delta-lactoferrin response element
<b>μM</b>	Micromolaire

## Liste des acides aminés

Nom	Code à une lettre	Code à trois lettres
<b>Alanine</b>	A	Ala
<b>Arginine</b>	R	Arg
<b>Asparagine</b>	N	Asn
<b>Aspartate</b>	D	Asp
<b>Cystéine</b>	C	Cys
<b>Glutamate</b>	E	Glu
<b>Glutamine</b>	Q	Gln
<b>Glycine</b>	G	Gly
<b>Histidine</b>	H	His
<b>Isoleucine</b>	I	Ile
<b>Leucine</b>	L	Leu
<b>Lysine</b>	K	Lys
<b>Méthionine</b>	M	Met
<b>Phénylalanine</b>	F	Phe
<b>Proline</b>	P	Pro
<b>Sérine</b>	S	Ser
<b>Thréonine</b>	T	Thr
<b>Tryptophane</b>	W	Trp
<b>Tyrosine</b>	Y	Tyr
<b>Valine</b>	V	Val

# *Bibliographie*



- A -

- Abdel-Hafiz HA, Horwitz KB (2014) Post-translational modifications of the progesterone receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 140: 80-89.
- 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.
- Aillet F, Lopitz-Otsoa F, Egaña I, Hjerpe R, Fraser P, Hay RT, Rodriguez M.S, Lang V (2012) Heterologous SUMO-2/3-ubiquitin chains optimize I $\kappa$ B $\alpha$  degradation and NF- $\kappa$ B activity. *PLoS One* 7: e51672.
- Alontaga AY, Bobkova E, Chen Y (2012) Biochemical analysis of protein SUMOylation. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 10, Unit10.29.
- Altmannova V, Eckert-Boulet N, Arneric M, Kolesar P, Chaloupkova R, Damborsky J, Sung P, Zhao X, Lisby M, Krejci L (2010) Rad52 SUMOylation affects the efficiency of the DNA repair. *Nucleic Acids Res* 38: 708-721.
- Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* 431: 350-355.
- Anbalagan M, Huderson B, Murphy L, Rowan BG (2012) Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nucl Recept Signal* 10:e001 doi:0.1621/nrs.10001.
- Anckar J, Hietakangas V, Denessiouk K, Thiele DJ, Johnson MS, Sistonen L (2006) Inhibition of DNA binding by differential sumoylation of heat shock factors. *Mol Cell Biol* 26: 955-964.
- Anderson BF, Baker HM, Dodson EJ, Norris GE, Rumball SV, Waters JM, Baker EN (1987) Structure of human lactoferrin at 3.2-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:1769-1773.
- Anderson BF, Baker HM, Norris GE, Rice DW, Baker EN (1989) Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol* 209: 711-734.
- Appella E (2001) Modulation of p53 function in cellular regulation. *Eur J Biochem FEBS* 268: 2763.
- Armstrong AA, Mohideen F, Lima CD (2012) Recognition of SUMO-modified PCNA requires tandem receptor motifs in Srs2. *Nature* 483: 59-63.
- Ayaydin F, Dasso M (2004) Distinct in vivo dynamics of vertebrate SUMO paralogues. *Mol Biol Cell* 15: 5208-5218.

- B -

- Baba D, Maita N, Jee JG, Uchimura Y, Saitoh H, Sugasawa K, Hanaoka F, Tochio H, Hiroaki H, Shirakawa M (2005) Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. *Nature* 435: 979-982.
- Bail S, Kiledjian M (2008) DcpS, a general modulator of cap-binding protein-dependent processes? *RNA Biol* 5: 216-219.
- Baker EN, Baker HM (2005) Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cell Mol Life Sci* 62: 2531-2539.
- Baker EN, Baker HM (2009) A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. *Biochimie* 91: 3-10.
- Baldwin GS (1993) Comparison of transferrin sequences from different species. *Comp Biochem Physiol B* 106: 203-218.
- Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD (2008) MicroRNAs: new

- regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol* 9; 839-845.
- Bandyopadhyay PK (2008) Vitamin K-dependent gamma-glutamylcarboxylation: an ancient posttranslational modification. *Vitam Horm* 78:157–184.
- Barlev NA, Liu L, Chehab NH, Mansfield K, Harris KG, Halazonetis TD, Berger SL (2001) Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* 8:1243–1254.
- Bayer P, Arndt A, Metzger S, Mahajan R, Melchior F, Jaenicke R, Becker J (1998) Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280: 275-286.
- Bekker-Jensen S, Mailand N (2011) The ubiquitin- and SUMO-dependent signaling response to DNA double-strand breaks. *FEBS Letters* 585: 2914-2919.
- Bellail AC, Olson JJ, Hao C (2014) SUMO1 modification stabilizes CDK6 protein and drives the cell cycle and glioblastoma progression. *Nat Commun* 5:4234.
- Benaïssa M, Peyrat JP, Hornez L, Mariller C, Mazurier J, Pierce A (2005) Expression and prognostic value of lactoferrin mRNA isoforms in human breast cancer. *Int J Cancer* 114: 299-306.
- Benson MD, Li QJ, Kieckhafer K, Dudek D, Whorton MR, Sunahara RK, Iñiguez Lluhí JA, Martens JR (2007) SUMO modification regulates inactivation of the voltage-gated potassium channel Kv1.5. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1805-1810.
- Bernardi R, Pandolfi PP (2003) Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene* 22: 9048-9057.
- 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.
- 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.
- Black DL (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72: 291-336.
- Blagoev B, Kratchmarova I, Ong SE, Nielsen M, Foster LJ, Mann J (2003) A proteomics strategy to elucidate functional protein-protein interactions applied to EGF signaling. *Nat Biotechnol* 21: 315-318.
- Blagosklonny MV, Pardee AB (2002) The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle* 1:103-110.
- Blomster HA, Imanishi SY, Siimes J, Kastu J, Morrice NA, Eriksson JE, Sistonen L (2010) In vivo identification of sumoylation sites by a signature tag and cysteine-targeted affinity purification. *J Biol Chem* 285: 19324-19329.
- 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.
- Bogdanovic O, Veenstra GJ (2009) DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* 118: 549-565.
- Bohren KM, Nadkarni V, Song JH, Gabbay KH, Owerbach D (2004) A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem* 279: 27233-27238.
- Bologna S, Ferrari S (2013) It takes two to tango: Ubiquitin and SUMO in the DNA damage response. *Front Genet* 4:106. doi: 10.3389/fgene.2013.00106.

- Bossis G, Malnou CE, Farras R, Andermarcher E, Hipskind R, Rodriguez M, Schmidt D, Muller S, Jariel-Encontre I, Piechaczyk M (2005) Down-regulation of c-Fos/c-Jun AP-1 dimer activity by sumoylation. *Mol Cell Biol* 25, 6964-6979.
- Bouras T, Fu M, Sauve AA, Wang F, Quong AA, Perkins ND, Hay RT, Gu W, Pestell RG (2005) SIRT1 deacetylation and repression of p300 involves lysine residues 1020/1024 within the cell cycle regulatory domain 1. *J Biol Chem* 280: 10264-10276.
- Braidman I, Carroll M, Dance N, Robinson D, Poenaru L, Weber A, Dreyfus JC, Overdijk B, Hooghwinkel GJ (1974) Characterisation of human N-acetyl-beta-hexosaminidase C. *FEBS Lett* 41: 181-184.
- Branzei D, Foiani M (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 297-308.
- Braschi E, Goyon V, Zunino R, Mohanty A, Xu L, McBride HM (2010) Vps35 mediates vesicle transport between the mitochondria and peroxisomes. *Curr Biol* 20: 1310-1315.
- Braschi E, Zunino R, McBride HM (2009) MAPL is a new mitochondrial SUMO E3 ligase that regulates mitochondrial fission. *EMBO Rep* 10: 748-754.
- Braun H, Koop R, Ertmer A, Nacht S, Suske G (2001) Transcription factor Sp3 is regulated by acetylation. *Nucleic Acids Res* 29: 4994-5000.
- Braun L, Cannella D, Pinheiro AM, Kieffer S, Belrhali H, Garin J, Hakimi MA (2009) The small ubiquitin-like modifier (SUMO)-conjugating system of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 39: 81-90.
- Breton M, Mariller C, Benaissa M, Caillaux K, Browaeyts E, Masson M, Vilain JP, Mazurier J, Pierce A (2004) Expression of delta-lactoferrin induces cell cycle arrest. *Biometals* 17:325-329.
- Brooks CL, Gu W (2003) Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 15: 164-171.
- Butkinaree C, Park K, Hart GW (2010) O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta* 1800: 96-106.

- C -

- Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, Lynch TP, Sethi G, Walker S, Vosseller K, Reginato MJ (2010) Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene* 29: 2831-2842.
- Calvo SE, Pagliarini DJ, Mootha VK (2009) Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 7507-7512.
- Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, Paez-Pereda M, Silberstein S, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E (2007) RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1 $\alpha$  during hypoxia. *Cell* 131: 309-323.
- Cardozo T, Pagano M (2004) The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:739-751.
- Caron C, Boyault C, Khochbin S (2005) Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 27: 408-415.
- Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136: 642-655.

- Castillo-Lluva S, Tatham MH, Jones RC, Jaffray EG, Edmondson RD, Hay RT, Malliri A (2010) SUMOylation of the GTPase Rac1 is required for optimal cell migration. *Nat Cell Biol* 12: 1078-1085.
- Castle CD, Cassimere EK, Denicourt C (2012) LAS1L interacts with the mammalian Rix1 complex to regulate ribosome biogenesis. *Mol Biol Cell* 23: 716-728.
- Castro A, Bernis C, Vigneron S, Labbe JC, Lorca T (2005) The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene* 24: 314-325.
- Champattanachai V, Netsirisawan P, Chaiyawat P, Phueaouan T, Charoenwattanasatien R, Chokchaichamnankit D, Punyarit P, Srisomsap C, Svasti J (2013) Proteomic analysis and abrogated expression of O-GlcNAcylated proteins associated with primary breast cancer. *Proteomics* 13: 2088-2099.
- Chan CH, Jo U, Kohrman A, Rezaeian AH, Chou PC, Logothetis C, Lin HK (2014) Posttranslational regulation of Akt in human cancer. *Cell Biosci* 4:59. doi: 10.1186/2045-3701-4-59.
- Chan S, Cheng S (2005) The Prp19-associated complex is required for specifying interactions of U5 and U6 with pre-mRNA during spliceosome activation. *J Biol Chem* 280: 31190-31199.
- 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.
- Chen ZJ, Parent L, Maniatis T (1996) Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell* 84: 853-862.
- Cheng J, Wang D, Wang Z, Yeh ET (2004) SENP1 enhances androgen receptor-dependent transcription through desumoylation of histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol* 24: 6021-6028.
- Cheng X, Hart GW (2001) Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *J Biol Chem* 276: 10570-10575.
- Cheng Z, Ke Y, Ding X, Wang F, Wang H, Wang W, Ahmed K, Liu Z, Xu Y, Aikhionbare F, Yan H, Liu J, Xue Y, Yu J, Powell M, Liang S, Wu Q, Reddy SE, Hu R, Huang H, Jin C, Yao X (2008) Functional characterization of TIP60 sumoylation in UV-irradiated DNA damage response. *Oncogene* 27: 931-941.
- Ching RW, Dellaire G, Eskiw CH, Bazett-Jones DP (2005) PML bodies: a meeting place for genomic loci? *J Cell Sci* 118: 847-854.
- 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.
- 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.
- Choudhury B K, Li SS (1997) Identification and characterization of the SMT3 cDNA and gene from nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun*. 234:788-791.
- Chou TY, Hart GW, Dang CV (1995) c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J Biol Chem* 270:18961-18965.
- Chuikov S, Kurash JK, Wilson JR, Xiao B, Justin N, Ivanov GS, McKinney K, Tempst P, Prives C, Gamblin SJ, Barlev NA, Reinberg D (2004) Regulation of p53 activity through lysine methylation *Nature* 432: 353-360.

- Coghlin C, Carpenter B, Dundas SR, Lawrie LC, Telfer C, Murray GI (2006) Characterization and over-expression of chaperonin t-complex proteins in colorectal cancer. *J Pathol* 210: 351-357.
- Coller J, Parker R (2004) Eukaryotic mRNA decapping. *Annu Rev Biochem* 73: 861-890.
- 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.
- Comer FI, Hart GW (2001) Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry* 40: 7845-7852.
- Comerford KM, Leonard MO, Karhausen J, Carey R, Colgan SP, Taylor CT (2003) Small ubiquitin-related modifier-1 modification mediates resolution of CREB-dependent responses to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 986-991.
- Cooper HJ, Tatham MH, Jaffray E, Heath JK, Lam TT, Marshall AG, Hay RT (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.
- Coulson A (1996) The *Caenorhabditis elegans* genome project. *C. elegans Genome Consortium. Biochem Soc Trans.* 24: 289-291.
- Cremer T, Cremer C (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* 2: 292-301.
- Cubeñas-Potts C, Matunis MJ (2013) SUMO: A Multifaceted Modifier of Chromatin Structure and Function. *Developmental Cell* 24: 1-12.

- D -

- Dadke S, Cotteret S, Yip SC, Jaffer ZM, Haj F, Ivanov A, Rauscher F, Shuai K, Ng T, Neel BG, Chernoff J (2007) Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by sumoylation. *Nat Cell Biol* 9: 80-85.
- Danish HH, Goyal S, Taunk NK, Wu H, Moran MS, Haffty BG (2013) Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT1) as a prognostic marker for local control in T1-2 N0 breast cancer treated with breast-conserving surgery and radiation therapy. *Breast J* 19: 231-239.
- Dash BC, El-Deiry WS (2004) Cell cycle checkpoint control mechanisms that can be disrupted in cancer. *Methods Mol Biol* 280: 99-161.
- 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*: 875148. doi:10.1155/2012/875148.
- Dasso M (2008) Emerging roles of the SUMO pathway in mitosis. *Cell Div* 3: 5-15.
- David G, Neptune MA, DePinho RA (2002) SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities. *J Biol Chem* 277: 23658-23663.
- Dawlaty MM, Malureanu L, Jeganathan KB, Kao E, Sustmann C, Tahk S, Shuai K, Grosschedl R, van Deursen, JM (2008) Resolution of sister centromeres requires RanBP2-mediated SUMOylation of topoisomerase IIalpha. *Cell* 133 :103-115.
- Dehennaut V, Lefebvre T, Sellier C, Leroy Y, Gross B, Walker S, Cacan R, Michalski JC, Vilain JP, Bodart JF (2007) O-linked N-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G2/M transition in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 282: 12527-12536.
- Dehennaut V, Loison I, Dubuissez M, Nassour J, Abbadie C, LePrince D (2013) DNA double-strand breaks lead to activation of hypermethylated in cancer 1 (HIC1) by SUMOylation to regulate DNA repair. *J Biol Chem* 288: 10254-10264.
- De la Cruz-Herrera CF, Campagna M, Lang V, Del Carmen González-Santamaría J, Marcos-

- Villar L, Rodríguez MS, Vidal A, Collado M, Rivas C (2014) SUMOylation regulates AKT1 activity. *Oncogene* doi:10.1038/onc.2014.48.
- Dellaire G, Bazett-Jones DP (2004) PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* 26: 963-977.
- Dennis G, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 4: P3.
- Derynck R, Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGFbeta family signalling. *Nature* 425: 577-584.
- Deshaies RJ, Joazeiro CA (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78: 399-434.
- 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.
- Desterro JM, Rodriguez MS, Hay RT (1998) SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell* 2: 233-239.
- Desterro JM, Thomson J, Hay RT (1997) Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS Lett* 417: 297-300.
- de Thé H, Le Bras M, Lallemand-Breitenbach V (2012) Acute promyelocytic leukemia, arsenic, and PML bodies. *J Cell Biol* 198: 11-21.
- Ding H, Xu Y, Chen Q, Dai H, Tang Y, Wu J, Shi Y (2005) Solution structure of human SUMO-3 C47S and its binding surface for Ubc9. *Biochemistry* 44: 2790-2799.
- Drougat L, Olivier S, Mortuaire M, Foulquier F, Lacoste AS, Michalski JC, Lefebvre T, Vercoutter-Edouart AS (2012) Characterization of O-GlcNAc Cycling and Proteomic Identification of Differentially O-GlcNAcylated Proteins during G1/S transition. *Biochem Biophys Acta* 1820: 1839-1848.

- E -

- Efthymiadis A, Shao H, Hubner S, Jans DA (1997) Kinetic characterization of the human retinoblastoma protein bipartite nuclear localization sequence (NLS) in vivo and in vitro. A comparison with the SV40 large T-antigen NLS. *J Biol Chem* 272: 22134-22139.
- Eladad S, Ye TZ, Hu P, Leversha M, Beresten S, Matunis MJ, Ellis NA (2005) Intra-nuclear trafficking of the BLM helicase to DNA damage-induced foci is regulated by SUMO modification. *Hum Mol Genet* 14: 1351-1365.
- Engel ME, Datta PK, Moses HL (1998) Signal transduction by transforming growth factor-beta: a cooperative paradigm with extensive negative regulation *J Cell Biochem Suppl* 30-31: 111-122.
- 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.

- F -

- Fensterl V, Sen GC (2011) The ISG56/IFIT1 Gene Family. *J Interferon Cytokine Res* 31: 71-78.
- Ferreira HC, Luke B, Schober H, Kalck V, Lingner J, Gasser SM (2011) The PIAS homologue Siz2 regulates perinuclear telomere position and telomerase activity in budding yeast. *Nat Cell Biol* 13: 867-874.
- Fillebeen C, Ruchoux MM, Mitchell V, Vincent S, Benaissa M, Pierce A (2001) Lactoferrin

- is synthesized by activated microglia in the human substantia nigra and its synthesis by the human microglial CHME cell line is upregulated by tumor necrosis factor alpha or 1-methyl-4-phenylpyridinium treatment. *Brain Res Mol Brain Res* 96: 103-113.
- Filtz TM, Vogel WK, Leid M (2014) Regulation of transcription factor activity by interconnected post-translational modifications. *Trends Pharmacol Sci* 35: 76-85.
- Finkbeiner E, Haindl M, Muller S (2011) The SUMO system controls nucleolar partitioning of a novel mammalian ribosome biogenesis complex. *EMBO J* 30: 1067-1078.
- Fiordaliso F, Leri A, Cesselli D, Limana F, Safai B, Nadal-Ginard B, Anversa P, Kajstura J (2001) *Diabetes* 50: 2363-2375.
- Flotho A, Melchior F (2013) Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu Rev Biochem* 82:357-385.
- Fu SC, Imai K, Horton P (2011) Prediction of leucine-rich nuclear export signal containing proteins with NESsential. *Nucleic Acids Res* 39: e111. doi: 10.1093/nar/gkr493.

- G -

- Galanty Y, Belotserkovskaya R, Coates J, Polo S, Miller KM, Jackson SP (2009) Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. *Nature* 462: 935-939.
- Galisson F, Mahrouche L, Courcelles M, Bonneil E, Meloche S, Chelbi-Alix MK, Thibault P (2011) A novel proteomics approach to identify SUMOylated proteins and their modification sites in human cells. *Mol Cell Proteomics* MCP 10: M110.004796.
- Gareau JR, Lima CD (2010) The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 861-871.
- Garofalo M, Condorelli GL, Croce CM, Condorelli G (2010) MicroRNAs as regulators of death receptors signaling. *Cell Death Differ* 17: 200-208.
- Garvie CW, Wolberger C (2001) Recognition of specific DNA sequences. *Mol Cell* 8: 937-946.
- Geiss-Friedlander R, Melchior F (2007) Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 947-956.
- Gill G (2004) SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* 18: 2046-2059.
- Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68: 913-963.
- 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.
- Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349: 132-138.
- Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E (2005) Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363: 15-23.
- Gomez-del Arco P, Koipally J, Georgopoulos K (2005) Ikaros SUMOylation: switching out of repression. *Mol Cell Biol* 25: 2688-2697.
- 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.
- González-Santamaría J, Campagna M, Ortega-Molina A, Marcos-Villar L, de la Cruz-Herrera CF, González D, Gallego P, Lopitz-Otsoa F, Esteban M, Rodríguez MS, Serrano M, Rivas C (2012) Regulation of the tumor suppressor PTEN by SUMO. *Cell Death Dis* 3: e393.

- Goodman RH, Smolik S (2000) CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* 14: 1553–1577.
- Gostissa M, Hengstermann A, Fogal V, Sandy P, Schwarz SE, Scheffner M, Del Sal G (1999) Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J* 18: 6462-6471.
- Grégoire S, Tremblay AM, Xiao L, Yang Q, Ma K, Nie J, Mao Z, Wu Z, Giguère V, Yang X J (2006) Control of MEF2 transcriptional activity by coordinated phosphorylation and sumoylation. *J Biol Chem* 281: 4423-4433.
- Gregoire S, Yang XJ (2005) Association with class IIa histone deacetylases upregulates the sumoylation of MEF2 transcription factors. *Mol Cell Biol* 25: 2273-2287.
- Goldberg GS, Kunimoto T, Alexander DB, Suenaga K, Ishidate F, Miyamoto K, Ushijima T, Teng CT, Yocota J, Ohta T, Tesuda H (2005) Full length and delta lactoferrin display differential cell localization dynamics, but do not act as tumor markers or significantly affect the expression of other genes. *Med Chem* 1: 57-64.
- Gresko E, Moller A, Roscic A, Schmitz ML (2005) Covalent modification of human homeodomain interacting protein kinase 2 by SUMO-1 at lysine 25 affects its stability. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 1293-1299.
- Gronholm J, Vanhatupa S, Ungureanu D, Valiaho J, Laitinen T, Valjakka J, Silvennoinen O (2012) Structure-function analysis indicates that sumoylation modulates DNA-binding activity of STAT1. *BMC Biochem* 13: 20-31.
- Gu B, Zhu WG (2012) Surf the post-translational modification network of p53 regulation. *Int J Biol Sci* 8: 672-684.
- Gu W, Roeder RG (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90: 595–606.
- Guinez C, Losfeld ME, Cacan R, Michalski JC, Lefebvre T (2006) Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose availability and utilization. *Glycobiology* 16: 22-28.
- Guinez C, Mir AM, Leroy Y, Cacan R, Michalski JC, Lefebvre T (2007) Hsp70-GlcNAc-binding activity is released by stress, proteasome inhibition, and protein misfolding. *Biochem Biophys Res Commun* 361: 414-420.
- Guo D, Han J, Adam B L, Colburn NH, Wang M H, Dong Z, Eizirik DL, She JX, Wang CY (2005) Proteomic analysis of SUMO4 substrates in HEK293 cells under serum starvation-induced stress. *Biochem Biophys Res Commun* 337: 1308-1318.
- Guo D, Li M, Zhang Y, Yang P, Eckenrode S, Hopkins D, Zheng W, Purohit S, Podolsky RH, Muir A, Wang J, Dong Z, Brusko T, Atkinson M, Pozzilli P, Zeidler A, Raffel LJ, Jacob CO, Park Y, Serrano-Rios M, Larrad MT, Zhang Z, Garchon HJ, Bach JF, Rotter JI, She JX, Wang CY. (2004) A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet* 36: 837-841.

- H -

- Ha N H, Nair VS, Reddy SDN, Mudvari P, Ohshiro K, Ghanta KS, Pakala SB, Li DQ, Costa L, Lipton A, Badwe RA, Fuqua S, Wallon M, Prendergast GC, Kumar R (2011) Lactoferrin-Endothelin-1 Axis Contributes to the development and Invasiveness of Triple Negative Breast Cancer Phenotypes. *Cancer Res*
- Haltiwanger RS, Holt GD, Hart GW (1990) Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine: peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* 265: 2563-2568.
- Hames RS, Wattam SL, Yamano H, Bacchieri R, Fry AM (2001) APC/C-mediated destruction of the centrosomal kinase Nek2A occurs in early mitosis and depends upon



- a cyclin A-type D-box. *EMBO J* 20: 7117-7127.
- Han I, Kudlow JE (1997) Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol* 17: 2550-2558.
- Hang LE, Liu X, Cheung I, Yang Y, Zhao X (2011) SUMOylation regulates telomere length homeostasis by targeting Cdc13. *Nat Struct Mol Biol* 18: 920-926.
- Hannich JT, Lewis A, Kroetz MB, Li SJ, Heide H, Emili A, Hochstrasser M (2005) Defining the SUMO-modified proteome by multiple approaches in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280: 4102-4110.
- Haracska L, Torres-Ramos CA, Johnson RE, Prakash S, Prakash L (2004) Opposing effects of ubiquitin conjugation and SUMO modification of PCNA on replicational bypass of DNA lesions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 24: 4267-4274.
- Hardeland U, Steinacher R, Jiricny J, Schär P (2002) Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *EMBO J* 21: 1456-1464.
- Hardivillé S, Escobar-Ramirez A, Pina-Canceco S, Ellass E, Pierce A (2014) Delta-lactoferrin induces cell death via the mitochondrial death signaling pathway by upregulating Bax expression. *Biomaterials* 27: 875-889.
- Hardiville S, Hart GW (2014) Nutrient Regulation of Signaling, Transcription, and Cell Physiology by O-GlcNAcylation. *Cell Metabolism* 20: 208-213.
- Hardivillé S, Hoedt E, Mariller C, Benaïssa M, Pierce A (2010) O-GlcNAcylation/phosphorylation cycling at Ser10 controls both transcriptional activity and stability of delta-lactoferrin. *J Biol Chem* 285: 19205-19218.
- Harper JW, Burton JL, Solomon MJ (2002) The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev* 16: 2179-2206.
- Hart GW, Haltiwanger RS, Holt GD, Kelly WG (1989) Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. *Annu Rev Biochem* 58: 841-874.
- Hay RT (2004) Modifying NEMO. *Nat Cell Biol* 6: 89-91.
- Hay RT (2005) SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18: 1-12.
- Hayashi T, Seki M, Maeda D, Wang W, Kawabe Y, Seki T, Saitoh H, Fukagawa T, Yagi H, Enomoto T (2002) Ubc9 is essential for viability of higher eukaryotic cells. *Exp Cell Res* 280: 212-221.
- Hayden MS, Ghosh S (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18: 2195-2224.
- He J, Furmanski P (1995) Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature* 373: 721-724.
- Hecker CM, Rabiller M, Haglund K, Bayer P, Dikic I (2006) Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem* 281: 16117-16127.
- Hietakangas V, Ahlskog JK, Jakobsson AM, Hellesuo M, Sahlberg NM, Holmberg CI, Mikhailov A, Palvimo JJ, Pirkkala L, Sistonen L (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.
- Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A, Sistonen L (2006) PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 45-50.
- Hoedt E, Chaoui K, Huvent I, Mariller C, Monsarrat B, Burlet-Schiltz O, Pierce A (2014) SILAC-based proteomic profiling of the human MDA-MB-231 metastatic breast cancer cell line in response to the two antitumoral lactoferrin isoforms: the secreted lactoferrin and the intracellular delta-lactoferrin. *PLoS One* 12; 9:e104563. doi: 10.1371/journal.pone.0104563.
- Hoedt E, Hardiville S, Mariller C, Ellass E, Perraudin JP, Pierce A (2010) Discrimination and evaluation of lactoferrin and delta-lactoferrin gene expression levels in cancer cells

- and under inflammatory stimuli using TaqMan real time PCR. *Biometals* 23: 441-452.
- Hoegel 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.
- Hofmann TG, Jaffray E, Stollberg N, Hay RT, Will H (2005) Regulation of homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) effector function through dynamic small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification. *J Biol Chem* 280: 29224-29232.
- Hofmann T G, Will H (2003) Body language: the function of PML nuclear bodies in apoptosis regulation *Cell Death and Differentiation* 10: 1290-1299.
- Hong Y, Rogers R, Matunis MJ, Mayhew CN, Goodson ML, Park-Sarge OK, Sarge KD (2001) Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 276: 40263-40267.
- Hu XV, Rodrigues TM, Tao H, Baker RK, Miraglia L, Orth AP, Lyons GE, Schultz PG, Wu X (2010) Identification of RING finger protein 4 (RNF4) as a modulator of DNA demethylation through a functional genomics screen. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 15087-15092.
- Hu Y, Suarez J, Fricovsky E, Wang H, Scott BT, Trauger SA, Han W, Hu Y, Oyeleye MO, Dillmann WH (2009) Increased enzymatic O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose. *J Biol Chem* 284: 547-555.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4: 44-57.
- Huang J, Yan J, Zhang J, Zhu S, Wang Y, Shi T, Zhu C, Chen C, Liu X, Cheng J, Mustelin T, Feng GS, Chen G, Yu J (2012) SUMO1 modification of PTEN regulates umorigenesis by controlling its association with the plasma membrane. *Nat Commun* 3: 911 doi:10.1038/ncomms1919.
- Huang, J, Perez-Burgos L, Placek BJ, Sengupta R, Richter M, Dorsey JA, Kubicek S, Opravil S, Jenuwein T, Berger SL (2006) Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature* 444: 629–632.
- Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Wu ZH, Miyamoto S (2003) Sequential modification of NEMO/IKK $\gamma$  by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF- $\kappa$ B activation by genotoxic stress. *Cell* 115: 565-576.
- Huang WC, Ko TP, Li SSL, Wang AH J (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 FEBS* 271: 4114-4122.
- Hutchens TW, Magnuson JS, Yip TT (1989) Interaction of human lactoferrin with DNA: one-step purification by affinity chromatography on single-stranded DNA-agarose. *Pediatr Res* 26, 618-622.
- Hwang CS, Shemorry A, Varshavsky A (2010) N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals. *Science* 327: 973-977.

- I -

- Impens F, Radoshevich L, Cossart P, Ribet D (2014) Mapping of SUMO sites and analysis of SUMOylation changes induced by external stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 12432-12437.
- Ishov AM, Sotnikov AG, Negorev D, Vladimirova OV, Neff N, Kamitani T, Yeh ET, Strauss JF 3rd, Maul GG (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.

Ivanov AV, Peng H, Yurchenko V, Yap KL, Negorev DG, Schultz DC, Psulkowski E, Fredericks WJ, White DE, Maul GG, Sadofsky MJ, Zhou MM, Rauscher FJ (2007) PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. *Mol Cell* 28, 823-837.

- J -

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..

Jackson SP, Durocher D (2013) Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO. *Mol Cell* 49: 795-807.

James L R, Tang D, Ingram A, Ly H, Thai K, Cai L, Scholey JW (2002) Flux through the hexosamine pathway is a determinant of nuclear factor kappaB-dependent promoter activation *Diabetes* 51: 1146-1156.

Jans DA, Briggs LJ, Gustin SE, Jans P, Ford S, Young IG (1997) A functional bipartite nuclear localisation signal in the cytokine interleukin-5. *FEBS Lett* 406: 315-320.

Jeram SM, Srikumar T, Zhang XD, Anne Eisenhauer H, Rogers R, Pedrioli PGA, Matunis M, Raught, B (2010) An improved SUMmOn-based methodology for the identification of ubiquitin and ubiquitin-like protein conjugation sites identifies novel ubiquitin-like protein chain linkages. *Proteomics* 10: 254-265.

Ji Z, Degerny C, Vintonenko N, Deheuninck J, Foveau B, Leroy C, Coll J, Tulasne D, Baert JL, and Fafeur V (2007) Regulation of the Ets-1 transcription factor by sumoylation and ubiquitylation. *Oncogene* 26: 395-406.

Johnson E S (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73: 355-382.

Johnson ES, Gupta AA (2001) An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* 106: 735-744.

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

Johnson PR, Hochstrasser M (1997) SUMO-1: Ubiquitin gains weight. *Trends Cell Biol* 7: 408-413.

Jones D, Crowe E, Stevens TA, Candido EPM (2002) Functional and phylogenetic analysis of the ubiquitylation system in *Caenorhabditis elegans*: ubiquitin-conjugating enzymes, ubiquitin-activating enzymes, and ubiquitin-like proteins. *Genome Biol* 3: RESEARCH0002.

- K -

Kadaré G, Toutant M, Formstecher E, Corvol JC, Carnaud M, Bouterin MC, Girault JA (2003) PIAS1-mediated sumoylation of focal adhesion kinase activates its autophosphorylation. *J Biol Chem* 278: 47434-47440.

Kagey MH, Melhuish TA, Powers SE, Wotton D (2005) Multiple activities contribute to Pc2 E3 function. *EMBO J* 24: 108-119.

Kagey MH, Melhuish TA, Wotton D (2003) The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* 113: 127-137.

Kamemura K, Hart GW (2003) Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: a new paradigm for metabolic control of signal transduction and transcription. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 73: 107-136.

Kamemura K, Hayes BK, Comer FI, Hart GW (2002) Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: alternative glycosylation/phosphorylation of THR-58, a known mutational hot spot of c-Myc in

- lymphomas, is regulated by mitogens. *J Biol Chem* 277: 19229-19235.
- Kang ES, Park CW, Chung JH (2001) Dnmt3b, de novo DNA methyltransferase, interacts with SUMO-1 and Ubc9 through its N-terminal region and is subject to modification by SUMO-1. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 862-868.
- Kang X, Qi Y, Zuo Y, Wang Q, Zou Y, Schwartz RJ, Cheng J, Yeh ET (2010) SUMO-specific protease 2 is essential for suppression of poly-comb group protein-mediated gene silencing during embryonic development. *Mol Cell* 38: 191-201.
- Karthikeyan S, Yadav S, Paramasivam M, Srinivasan A, Singh TP (2000) Structure of buffalo lactoferrin at 3.3 Å resolution at 277 K. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56: 684-689.
- Kemp Z, Carvajal-Carmona L, Spain S, Barclay E, Gorman M, Martin L, Jaeger E, Brooks N, Bishop DT, Thomas H, Tomlinson I, Papaemmanuil E, Webb E, Sellick GS, Wood W, Evans G, Lucassen A, Maher ER, Houlston RS (2006) Evidence for a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 3q21-q24 from a high-density SNP genome-wide linkage scan. *Hum Mol Genet* 15: 2903-2910.
- Kerscher O (2007) SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep* 8: 550-555.
- Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M (2006) Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 159-180.
- Khan JA, Kumar P, Paramasivam M, Yadav RS, Sahani MS, Sharma S, Srinivasan A, Singh TP (2001) Camel lactoferrin, a transferrin-cum-lactoferrin: crystal structure of camel apolactoferrin at 2.6 Å resolution and structural basis of its dual role. *J Mol Biol* 309: 751-761.
- Kim B, Kang S, Kim SJ (2013) Genome-wide pathway analysis reveals different signaling pathways between secreted lactoferrin and intracellular delta-lactoferrin. *PLoS One* 8: e55338. doi: 10.1371/journal.pone.0055338.
- Kim SJ, Yu DY, Pak KW, Jeong S, Kim SW, Lee KK (1998) Structure of the human lactoferrin gene and its chromosomal localization. *Mol Cells* 8:663-668.
- Klein UR, Haindl M, Nigg EA, Muller S (2009) RanBP2 and SENP3 function in a mitotic SUMO2/3 conjugation-deconjugation cycle on Borealin. *Mol Biol Cell* 20 :410-418.
- Knipscheer P, Flotho A, Klug H, Olsen JV, van Dijk WJ, Fish A, Johnson ES, Mann M, Sixma TK, Pichler A (2008) Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination. *Mol. Cell* 31:371-382.
- 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.
- Kozak M (2002) Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* 299: 1-34.
- Kuo M, Zilberfarb V, Gangneux N, Christeff N, Issad T (2008) O-GlcNAc modification of FoxO1 increases its transcriptional activity: a role in the glucotoxicity phenomenon? *Biochimie* 90: 679-685.
- Kuppuswamy M, Vijayalingam S, Zhao LJ, Zhou Y, Subramanian T, Ryerse J, Chinnadurai G (2008) Role of the PLDLS-binding cleft region of CtBP1 in recruitment of core and auxiliary components of the corepressor complex. *Mol Cell Biol* 28: 269-281.

- L -

- La Cour T, Kiemer L, Mølgaard A, Gupta R, Skriver K, Brunak S (2004) Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals *Protein Eng Des Sel* 17: 527-536.
- Lahortiga I, Vazquez I, Agirre X, Larrayoz MJ, Vizmanos JL, Gozzetti A, Calasanz MJ, Otero MD (2004) Molecular heterogeneity in AML/MDS patients with 3q21q26

- rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer* 40: 179-189.
- Lai KC, Chang KW, Liu CJ, Kao SY, Lee TC (2008) IFIT2 protein inhibits migration activity and increases survival in oral squamous cell carcinoma. *Mol Cancer Res* 6: 1-9.
- Lai KC, Liu CJ, Chang KW, Lee TC (2013) Depleting IFIT2 mediates atypical PKC signaling to enhance the migration and metastatic activity of oral squamous cell carcinoma cells. *Oncogene* 32: 3686-3697.
- Lallemand-Breitenbach V, Jeanne M, Benhenda S, Nasr R, Lei M, Peres L, Zhou J, Zhu J, Raught B, de Thé H (2008) Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol* 10: 547-555.
- Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Chen Z, de Thé H (2012) Curing APL through PML/RARA degradation by As2O3. *Trends Mol Med* 18: 36-42.
- Lang M, Jegou T, Chung I, Richter K, Münch S, Udvarhelyi A, Cremer C, Hemmerich P, Engelhardt J, Hell SW, Rippe K (2010) Three-dimensional organization of promyelocytic leukemia nuclear bodies *J Cell Sci* 123 : 392-400.
- Lapenta V, Chiurazzi P, van der Spek P, Pizzuti A, Hanaoka F, Brahe C (1997) SMT3A, a human homologue of the *S. cerevisiae* SMT3 gene, maps to chromosome 21qter and defines a novel gene family. *Genomics* 40: 362-366.
- Lee MH, Lee SW, Lee EJ, Choi SJ, Chung SS, Lee JI, Cho JM, Seol JH, Baek SH, Kim KI, Chiba T, Tanaka K, Bang OS, Chung CH (2006) SUMO-specific protease SUSP4 positively regulates p53 by promoting Mdm2 self-ubiquitination. *Nat Cell Biol* 8: 1424-1431.
- Lee HI, Cho HJ, Han JA, Jang SY, Wang KM, Kang HT, Hwan ES (2008) Transient downregulation of protein O-N-acetylglucosamylation by treatment of high-dose nicotinamide in human cells. *Exp Mol Med* 40: 246-253.
- Lee PS, Chang C, Liu D, Derynck R (2003) Sumoylation of Smad4, the common Smad mediator of transforming growth factor-beta family signaling. *J Biol Chem* 278: 27853-27863.
- Legrand D, Pierce A, Ellass E, Carpentier M, Mariller C, Mazurier J (2008) Lactoferrin structure and functions. *Adv Exp Med Biol* 606: 163-194.
- Lehmann A, Toda T (2004) Fission yeast Skp1 is required for spindle morphology and nuclear membrane segregation at anaphase. *FEBS Lett* 566: 77-82.
- Liang SH, Clarke MF (2001) Regulation of p53 localization. *Eur J Biochem. FEBS* 268: 2779-2783.
- Li R, Wei J, Jiang C, Liu D, Deng L, Zhang K, Wang P (2013). Akt SUMOylation regulates cell proliferation and tumorigenesis. *Cancer Res.* 73: 5742-5753.
- Li SJ, Hochstrasser M (1999) A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* 398: 246-251.
- Li X, Lee YK, Jeng JC, Yen Y, Schultz DC, Shih HM, Ann DK (2007) Role for KAP1 serine 824 phosphorylation and sumoylation/desumoylation switch in regulating KAP1-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem* 282, 36177-36189.
- Liao Y, Du X, Lönnedal B (2010) miR-214 regulates lactoferrin expression and proapoptotic function in mammary epithelial cells. *J Nutr* 140: 1552-1556.
- Lin JY, Ohshima T, Shimotohno K (2004) Association of Ubc9, an E2 ligase for SUMO conjugation, with p53 is regulated by phosphorylation of p53. *FEBS Lett* 573, 15-18.
- Lin X, Liang M, Liang YY, Brunicardi FC, Feng XH (2003a) SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem* 278: 31043-31048.
- Lin X, Liang M, Liang YY, Brunicardi FC, Melchior F, Feng XH (2003b) Activation of transforming growth factor-beta signaling by SUMO-1 modification of tumor suppressor Smad4/DPC4. *J Biol Chem* 278: 18714-18719.

- Lin X, Sun B, Liang M, Liang Y Y, Gast A, Hildebrand J, Brunicardi FC, Melchior F, Feng X H (2003c) Opposed regulation of corepressor CtBP by sumoylation and PDZ binding. *Mol Cell* 11: 1389-1396.
- Linder P, Lasko PF, Ashburner M, Leroy P, Nielsen PJ, Nishi K, Schnier J, Slonimski PP (1989) Birth of the D-E-A-D box. *Nature* 337: 121-122.
- Ling Y, Sankpal UT, Robertson AK, McNally JG, Karpova T, Robertson KD (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.
- Liu D, Wang X, Zhang Z, Teng CT (2003) An intronic alternative promoter of the human lactoferrin gene is activated by Ets. *Biochem Biophys Res Commun* 301:472-429.
- Liu D, Zhang N, Du J, Cai X, Zhu M, Jin C, Dou Z, Feng C, Yang Y, Liu L, Takeyasu K, Xie W, Yao X (2006a) Interaction of Skp1 with CENP-E at the midbody is essential for cytokinesis. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 394-402.
- Liu H, Kiledjian M (2006b) Decapping the message: a beginning or an end. *Biochem Soc Trans* 34: 35-38.
- 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.
- Long N, Hardiville S, Pierce A, Fukamachi K, Futakuchi M, Alexander DB, Shirai T, Tsuda H (2009) Construction of a Multi-Functional Helper-Dependent Adenovirus Based System for Cancer Gene Therapy. *Asian Pac J Cancer Prev* 10: 939-960.
- Lu CY, Tsai CH, Brill SJ, Teng SC (2010) Sumoylation of the BLM ortholog, Sgs1, promotes telomere-telomere recombination in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 38: 488-498.
- Lu X, Legerski RJ (2007) The Prp19/Pso4 core complex undergoes ubiquitylation and structural alterations in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 968-974.
- Lynch TP, Ferrer CM, Jackson SR, Shahriari KS, Vosseller K, Reginato MJ (2012) Critical role of O-Linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine transferase in prostate cancer invasion, angiogenesis, and metastasis. *J Biol Chem* 287: 11070-11081.
- Lyst MJ, Nan X, Stancheva I (2006) Regulation of MBD1-mediated transcriptional repression by SUMO and PIAS proteins. *EMBO J* 25: 5317-5328.

- M -

- 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.
- Mal A, Sturniolo M, Schiltz RL, Ghosh MK, Harter ML (2001) A role for histone deacetylase HDAC1 in modulating the transcriptional activity of MyoD: inhibition of the myogenic program. *EMBO J*. 20:1739-1753
- Maniatis T, Tasic B (2002) Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* 418: 236-243.
- Mannen H, Tseng HM, Cho CL, Li SS (1996) Cloning and expression of human homolog HSMT3 to yeast SMT3 suppressor of MIF2 mutations in a centromere protein gene. *Biochem Biophys Res Commun* 222: 178-180.
- Mariller C, Benaïssa M, Hardivillé S, Breton M, Pradelle G, Mazurier J, Pierce A (2007) Human delta-lactoferrin is a transcription factor that enhances Skp1 (S-phase kinase-associated protein) gene expression. *FEBS J* 274: 2038-2053.
- Mariller C, Hardivillé S, Hoedt E, Benaïssa M, Mazurier J, Pierce A (2009) Proteomic approach to the identification of novel delta-lactoferrin target genes: Characterization

- of DcpS, an mRNA scavenger decapping enzyme. *Biochimie* 91: 109-122.
- Mariller C, Hardivillé S, Hoedt E, Huvent I, Pina-Canseco S, Pierce A (2012) Delta-lactoferrin, an intracellular lactoferrin isoform that acts as a transcription factor. *Biochem Cell Biol* 90: 307-319.
- Martínez-Balbás MA, Bauer UM, Nielsen SJ, Brehm A, Kouzarides T (2000) Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J* 19: 662–671.
- Maroui MA, Kheddache-Atmane S, El Asmi F, Dianoux L, Aubry M, Chelbi-Alix MK (2012) Requirement of PML SUMO interacting motif for RNF4- or arsenic trioxide-induced of nuclear PML isoforms. *PLoS One* 7:e44949. doi: 10.1371/journal.pone.0044949.
- Masson PL, Heremans JF (1971) Lactoferrin in milk from different species. *Comp Biochem Physiol B* 39: 119-129.
- Masson PL, Heremans JF, Ferin J (1968) Presence of an Iron-binding protein (lactoferrin) in the genital tract of the human female. I. Its immunohistochemical localization in the endometrium. *Fertil Steril* 19: 679-689.
- Masson PL, Heremans JF, Schonke E (1969) Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J Exp Med* 130: 643-658.
- Matic I, Schimmel J, Hendriks IA, van Santen MA, van de Rijke F, van Dam H, Gnad F, Mann M, Vertegaal AC (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.
- Matic I, van Hagen M, Schimmel J, Macek B, Ogg SC, Tatham MH, Hay RT, Lamond AI, Mann M, Vertegaal AC (2008) In vivo identification of human SUMO polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy. *Mol Cell Proteom* 7:132-144.
- 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.
- 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.
- Maul GG (1998) Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *Bioessays* 20: 660-667.
- Meulmeester E, Melchior F (2008) Cell biology: SUMO. *Nature* 452: 709–711.
- McCombs JL, Teng CT, Pentecost BT, Magnuson VL, Moore CM, McGill JR (1988) Chromosomal localization of human lactotransferrin gene (LTF) by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 47: 16-17.
- McGrattan P, Logan A, Humphreys M, Bowers M (2010) Jumping translocation in acute monocytic leukemia (M5b) with alternative breakpoint sites in the long arm of donor chromosome 3. *Med Oncol* 27: 667-672.
- McKinney K, Mattia M, Gottifredi V, Prives C (2004) p53 linear diffusion along DNA requires its C terminus. *Mol Cell* 16: 413–424.
- McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN (2002) Signaling chromatin to make muscle. *Curr Opin Cell Biol* 14: 763–772.
- Melino G, Knight RA (2010) MicroRNAs meet cell death. *Cell Death Differ* 17: 189-190.
- Meluh PB, Koshland D (1995) Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. *Mol Biol Cell* 6: 793–807.
- Merrill JC, Melhuish TA, Kagey MH, Yang SH, Sharrocks AD, Wotton D (2010) A role for

- non-covalent SUMO interaction motifs in Pc2/CBX4 E3 activity. *PLoS One* 5: e8794.
- Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD (2013) PANTHER Classification System: large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nature Protoc* 8: 1551-1566.
- Mi W, Gu Y, Han C, Liu H, Fan Q, Zhang X, Cong Q, Yu W (2011) O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim Biophys Acta* 1812: 514-519.
- Minty A, Dumont X, Kaghad M, Caput D (2000) Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J Biol Chem* 275: 36316-36323.
- Mo YY, Yu Y, Shen Z, Beck WT (2002) Nucleolar delocalization of human topoisomerase I in response to topotecan correlates with sumoylation of the protein. *J Biol Chem* 277, 2958-2964.
- Mohideen F, Capili AD, Bilimoria PM, Yamada T, Bonni A, Lima CD (2009) A molecular basis for phosphorylation-dependent SUMO conjugation by the E2 UBC9. *Nat Struct Mol Biol* 16: 945-952.
- Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129: 665-679.
- Moore SA, Anderson BF, Groom CR, Haridas M, Baker EN (1997) Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol* 274:222-236.
- Morris DR, Geballe AP (2000) Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol Cell Biol* 20: 8635-8642.
- Morris JR, Boutell C, Keppler M, Densham R, Weekes D, Alamshah A, Butler L, Galanty Y, Pangon L, Kiuchi T, Ng T, Solomon E (2009) The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature* 462: 886-890.
- Mukhopadhyay D, Dasso M (2010) The fate of metaphase kinetochores is weighed in the balance of SUMOylation during S phase. *Cell Cycle Georget Tex* 9 :3194–3201.
- Mukhopadhyay D, Dasso M (2007) Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends Biochem Sci* 32: 286-295.
- Mukhopadhyay D, Ayaydin F, Kolli N, Tan SH, Anan T, Kametaka A, Azuma Y, Wilkinson KD, Dasso M (2006) SUSP1 antagonizes formation of highly SUMO2/3-conjugated species. *J Cell Biol* 174: 939-949.
- Müller S, Berger M, Lehembre F, Seeler JS, Haupt Y, Dejean A (2000) c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 275: 13321-13329.
- Müller S, Hoegge C, Pyrowolakis G, Jentsch S (2001) SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 202-210.
- Murali A, Rajalingam K (2013) Small Rho GTPases in the control of cell shape and mobility. *Cell Mol Life Sci* 71: 1703-1721.
- Musicki B, Kramer MF, Becker RE, Burnett AL (2005) Inactivation of phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (Ser-1177) by O-GlcNAc in diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11870-11875.

- N -

- Nacerddine K, Lehembre F, Bhaumik M, Artus J, Cohen-Tannoudji M, Babinet C, Pandolfi PP, Dejean A (2005) The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell* 9: 769-779.
- Nagai S, Davoodi N, Gasser SM (2011) Nuclear organization in genome stability: SUMO connections. *Cell Res* 21: 474-485.



- Naryzhny SN, Lee H (2004) The post-translational modifications of proliferating cell nuclear antigen: acetylation, not phosphorylation, plays an important role in the regulation of its function. *J Biol Chem* 279:20194–20199.
- Nefkens I, Negorev DG, Ishov AM, Michaelson JS, Yeh ET, Tanguay RM, Muller WE, Maul GG (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.
- Neuspiel M, Schauss AC, Braschi E, Zunino R, Rippstein P, Rachubinski RA, Andrade-Navarro MA, McBride HM (2008) Cargo-selected transport from the mitochondria to peroxisomes is mediated by vesicular carriers. *Curr Biol* 18: 102-108.
- Neyret-Kahn H, Benhamed M, Ye T, Le Gras S, Cossec JC, Lapaquette P, Bischof O, Ouspenskaia, M Dasso M, Seeler J, Davidson I, Dejean A (2013). Sumoylation at chromatin governs coordinated repression of a transcriptional program essential for cell growth and proliferation. *Genome Res* 23: 1563-1579.
- Novatchkova M, Budhiraja R, Coupland G, Eisenhaber F, Bachmair A (2004) SUMO conjugation in plants. *Planta* 220: 1-8.
- Novoselov SV, Kryukov GV, Xu X, Carlson BA, Hatfield DL, Gladyshev VN (2007) Selenoprotein H is a nucleolar thioredoxin-like protein with a unique expression pattern. *J Biol Chem* 282: 11960-11968.
- Nowak M, Hammerschmidt M (2006) Ubc9 regulates mitosis and cell survival during zebrafish development. *Mol Biol Cell* 17: 5324–5336.

- O -

- O'Donnell N, Zachara NE, Hart GW, Marth JD (2004) Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Mol Cell Biol* 24: 1680-1690.
- Okubo S, Hara F, Tsuchida Y, Shimotakahara S, Suzuki S, Hatanaka H, Yokoyama S, Tanaka H, Yasuda H, Shindo H, (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.
- Okura T, Gong L, Kamitani T, Wada T, Okura I, Wei CF, Chang HM, Yeh ET (1996b) Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J Immunol Baltim Md* 1950 157: 4277–4281.
- 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.
- Ong S, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Steen H, Pandey A, Mann M (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1: 376-386.
- Ong S, Foster LJ, Mann M (2003) Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods* 29: 124-130.
- Orlicky S, Tang X, Willems A, Tyers M, Sicheri F (2003) Structural basis for phosphodependent substrate selection and orientation by the SCFCdc4 ubiquitin ligase. *Cell* 112: 243-256.
- Owerbach D, McKay EM, Yeh ET, Gabbay KH, Bohren KM (2005) A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun* 337: 517-520.
- Ozcan S, Andrali SS, Cantrell JE (2010) Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification. *Biochim Biophys Acta* 1799: 353-364.

- Pan Y, Tsai C-J, Ma B, Nussinov R (2010) Mechanisms of transcription factor selectivity. *Trends Genet* 26: 75-83.
- Panella TJ, Liu YH, Huang AT, Teng CT (1991) Polymorphism and altered methylation of the lactoferrin gene in normal leukocytes, leukemic cells, and breast cancer. *Cancer Res* 51: 3037-3043.
- Panse VG, Kressler D, Pauli A, Petfalski E, Gnädig M, Tollervey D, Hurt E (2006) Formation and nuclear export of pre-ribosomes are functionally linked to the small-ubiquitin-related modifier pathway. *Traffic* 7: 1311-1321.
- Papouli E, Chen S, Davies AA, Huttner D, Krejci L, Sung P, Ulrich HD (2005) Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Mol Cell* 19: 123-133.
- Pebernard S, Schaffer L, Campbell D, Head SR, Boddy MN (2008) Localization of Smc5/6 to centromeres and telomeres requires heterochromatin and SUMO, respectively. *EMBO J* 27: 3011-3023.
- Pekkala M, Hieta R, Bergmann U, Kivirikko KI, Wierenga RK, Myllyharju J (2004) The peptide-substrate-binding domain of collagen prolyl 4-hydroxylases is a tetratricopeptide repeat domain with functional aromatic residues. *J. Biol. Chem.* 279, 52255–52261.
- Perkins ND (2006) Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* 25: 6717-6730.
- Perry JJ, Tainer JA, Boddy MN (2008) A SIM-ultaneous role for SUMO and ubiquitin. *Trends Biochem Sci* 33: 201-208.
- Pfleger CM, Kirschner MW (2000) The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev* 14: 655-665.
- Picard N, Caron V, Bilodeau S, Sanchez M, Mascle X, Aubry M, Tremblay A (2012) Identification of estrogen receptor beta as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3beta. *Mol Cell Biol* 32: 2709-2721.
- Pichler A, Gast A, Seeler JS, Dejean A, Melchior F (2002) The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108: 109-120.
- Pichler A, Knipscheer P, Oberhofer E, van Dijk WJ, Korner R, Olsen JV, Jentsch S, Melchior F, Sixma TK (2005) SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nat Struct Mol Biol* 12: 264-269.
- 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.
- Pierce A, Legrand D, Mazurier J (2009) Lactoferrin: a multifunctional protein. *Med Sci (Paris)* 25: 361-369.
- Pinder JB, Attwood KM, Dellaire G (2013) Reading, writing, and repair: the role of ubiquitin and the ubiquitin-like proteins in DNA damage signaling and repair. *Front Genet* 4: 45-59.
- Piva R, Liu J, Chiarle R, Podda A, Pagano M, Inghirami G (2002) In vivo interference with Skp1 function leads to genetic instability and neoplastic transformation. *Mol Cell Biol* 22: 8375-8387.
- Plant LD, Rajan S, Goldstein SA (2005) K2P channels and their protein partners. *Curr Opin Neurobiol* 15: 326-333.
- Plant LD, Zuniga L, Araki D, Marks JD, Goldstein SA (2012) SUMOylation silences heterodimeric TASK potassium channels containing K2P1 subunits in cerebellar granule neurons. *Sci Signal* 5: ra84.

- Potts PR, Yu H (2007) The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins. *Nat Struct Mol Biol* 14: 581–590.
- Potthoff MJ, Olson EN (2007) MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Dev Camb Engl* 134: 4131–4140.
- 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 USA* 97: 14145-14150.
- Prakash S, Sung P, and Prakash L (1993) DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 27: 33-70.
- Primorac I, Musacchio A (2013) A Panta rhei: the APC/C at steady state. *J Cell Biol* 201:177-189.
- Prudden J, Perry JJP, Nie M, Vashisht AA, Arvai AS, Hitomi C, Guenther G, Wohlschlegel JA, Tainer JA, Boddy MN (2011) DNA repair and global sumoylation are regulated by distinct Ubc9 noncovalent complexes. *Mol Cell Biol* 31 :2299–2310.
- Psakhye I, Jentsch S (2012) Protein Group Modification and Synergy in the SUMO Pathway as Exemplified in DNA Repair. *Cell* 151: 807-820.
- Pungalaya P, Kulkarni D, Park HJ, Marshall H, Zheng H, Lackland H, Saleem A, Rubin EH (2007) TOPORS functions as a SUMO-1 E3 ligase for chromatin-modifying proteins. *J Proteome Res* 6: 3918-3923.

- Q -

- Qian M, Xinjiao G, Jun C, Zexian L, Changjiang J, Jian R, Yu X (2009) GPS-SBM 1.0: a stand-alone program for prediction of SUMO-binding motifs.
- Qiao Z, Dang C, Zhou B, Li S, Zhang W, Jiang J, Zhang J, Kong R, Ma Y (2012) O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT) is overexpressed and promotes O-linked protein glycosylation in esophageal squamous cell carcinoma. *J Biomed Res* 26: 268-273.
- Qu J, Liu GH, Wu K, Han P, Wang P, Li J, Zhang X, Chen C (2007) Nitric oxide destabilizes Pias3 and regulates sumoylation. *PLoS ONE* 2, e1085.

- R -

- Rabellino A, Scaglioni PP (2013) PML Degradation: Multiple Ways to Eliminate PML. *Front Oncol* 3:60. doi: 10.3389/fonc.2013.00060.
- Rajan S, Plant LD, Rabin ML, Butler MH, Goldstein SAN (2005) Sumoylation silences the plasma membrane leak K<sup>+</sup> channel K2P1. *Cell* 121: 37-47.
- Rallabhandi P, Hashimoto K, Mo YY, Beck WT, Moitra PK, D'Arpa P (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.
- Raman N, Nayak A, Muller S (2013) The SUMO system: a master organizer of nuclear protein assemblies. *Chromosoma* 122: 475-485.
- Ranuncolo SM, Ghosh S, Hanover JA, Hart GW, Lewis BA (2012) Evidence of the Involvement of O-GlcNAc-modified Human RNA Polymerase II CTD in Transcription in Vitro and in Vivo. *J Biol Chem* 287: 23549-23561.
- Rechsteiner M, Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21: 267-271.
- Reich NC (2013) A death-promoting role for ISG54/IFIT2. *J Interferon Cytokine Res* 33:199-205.

- Reindle A, Belichenko I, Bylebyl GR, Chen XL, Gandhi N, Johnson ES (2006) Multiple domains in Siz SUMO ligases contribute to substrate selectivity. *J Cell Sci* 119: 4749-4757.
- 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.
- Reverter D, Lima CD (2005) Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex. *Nature* 435: 687-692.
- Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64: 615-623.
- Rocchia W, Sridharan S, Nicholls A, Alexov E, Chiabrera A, Honig B (2002) Rapid grid-based construction of the molecular surface and the use of induced surface charge to calculate reaction field energies: applications to the molecular systems and geometric objects. *J Comput Chem* 23: 128-137.
- Rodriguez MS, Dargemont C, Hay RT (2001) SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* 276: 12654-12659.
- Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Lane DP, Hay RT (2000) Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* 20: 8458-8467.
- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234: 364-368.
- Rood BR, LePrince D (2013) Deciphering HIC1 control pathways to reveal new avenues in cancer therapeutics. *Expert Opin Ther Targets* 17: 811-827.
- Rothenbusch U, Sawatzki M, Chang Y, Caesar S, Schlenstedt G (2012) Sumoylation regulates Kap114-mediated nuclear transport. *EMBO J* 31: 2461-2472.
- Rothrock CR, House AE, Lynch KW (2005) HnRNP L represses exon splicing via a regulated exonic splicing silencer. *EMBO J* 24: 2792-2802.
- Roychoudhury P, Paul RR, Chowdhury R, Chaudhuri K (2007) HnRNP E2 is downregulated in human oral cancer cells and the overexpression of hnRNP E2 induces apoptosis. *Mol Carcinog* 46: 198-207.
- 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.

- S -

- Sachdev S, Bruhn L, Sieber H, Pichler A, Melchior F, Grosschedl R (2001) PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* 15: 3088-3103.
- Sacher M, Pfander B, Hoegge C, Jentsch S (2006) Control of Rad52 recombination activity by double-strand break-induced SUMO modification. *Nat Cell Biol* 8, 1284-1290.
- Sadoul K, Boyault C, Pabion M, Khochbin S (2008) Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases. *Biochimie* 90: 306-312.
- Sahin U, Lallemand-Breitenbach V, de Thé H (2014a) PML nuclear bodies: regulation function and therapeutic perspectives. *J Pathol* 234: 289-291.
- Sahin U, Lapaquette P, Andrieux A, Faure G, Dejean A (2014) Sumoylation of human argonaute 2 at lysine-402 regulates its stability. *PLoS One* 9: e102957.
- 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.
- Saitoh H, Pu R, Cavenagh M, Dasso M (1997) RanBP2 associates with Ubc9p and a modified form of RanGAP1. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3736-3741.

- Salomoni P, Pandolfi PP (2002) The role of PML in tumor suppression. *Cell* 108: 165-170.
- 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.
- Sapetschnig A, Rischitor G, Braun H, Doll A, Schergaut M, Melchior F, Suske G (2002) Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO J* 21: 5206-5215.
- Schimmel J, Eifler K, Sigurðsson JO, Cuijpers SAG, Hendriks IA, Verlaan-de Vries M, Kelstrup CD, Francavilla C, Medema RH, Olsen JV, Vertegaal ACO (2014) Uncovering SUMOylation dynamics during cell-cycle progression reveals FoxM1 as a key mitotic SUMO target protein. *Mol Cell* 53:1053-1066.
- Schimmel J, Larsen KM, Matic I, van Hagen M, Cox J, Mann M, Andersen JS, Vertegaal ACO (2008) The ubiquitin-proteasome system is a key component of the SUMO-2/3 cycle. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 7: 2107–2122.
- Schwartz DC, Felberbaum R, Hochstrasser M (2007) The Ulp2 SUMO protease is required for cell division following termination of the DNA damage checkpoint. *Mol Cell Biol* 27: 6948-6961.
- Segurado M, Tercero JA (2009) The S-phase checkpoint: targeting the replication fork. *Biol Cell* 101: 617-627.
- Seo J, Lee KJ (2004) Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J Biochem Mol Biol* 37: 35-44.
- 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.
- Shalizi A, Gaudillière B, Yuan Z, Stegmüller J, Shirogane T, Ge Q, Tan Y, Schulman B, Harper JW, Bonni A (2006) A calcium-regulated MEF2 sumoylation switch controls postsynaptic differentiation. *Science* 311:1012-1017.
- Sharrocks AD (2006) PIAS proteins and transcriptional regulation--more than just SUMO E3 ligases? *Genes Dev.* 20: 754–758.
- Shao R, Zhang FP, Tian F, Anders Friberg P, Wang X, Sjolund H, Billig H (2004) Increase of SUMO-1 expression in response to hypoxia: direct interaction with HIF-1 $\alpha$  in adult mouse brain and heart in vivo. *FEBS Lett* 569: 293-300.
- Shi X, Kachirskai I, Yamaguchi H, West LE, Wen H, Wang EW, Dutta S, Appella E, Gozani O (2007) Modulation of p53 function by SET8-mediated methylation at lysine 382. *Mol Cell* 27: 636–646.
- Shaw P, Freeman J, Bovey R, Iggo R (1996) Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene* 12:921-930.
- Siebert PD, Huang BC (1997) Identification of an alternative form of human lactoferrin mRNA that is expressed differentially in normal tissues and tumor-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2198-2203.
- Shaheduzzaman S, Vishwanath A, Furusato B, Cullen J, Chen Y, Bañez L, Nau M, Ravindranath L, Kim K, Mohammed A, Chen Y, Ehrich M, Srikantan V, Sesterhenn IA, McLeod D, Vahey M, Petrovics G, Dobi A, Srivastava S (2007) Silencing of Lactotransferrin expression by methylation in prostate cancer progression. *Cancer Biol Ther* 6: 1088-1095.
- 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.
- Shin YC, Liu BY, Tsai JY, Wu JT, Chang LK, Chang SC (2010) Biochemical characterization of the small ubiquitin-like modifiers of *Chlamydomonas reinhardtii*.

- Planta* 232: 649-662.
- Shinbo Y, Niki T, Taira T, Ooe H, Takahashi-Niki K, Maita C, Seino C, Iguchi-Ariga SM, Ariga H (2006) Proper SUMO-1 conjugation is essential to DJ-1 to exert its full activities. *Cell Death Differ* 13: 96-108.
- Shirsat NV, Bittenbender S, Kreider BL, Rovera G (1992) Structure of the murine lactotransferrin gene is similar to the structure of other transferrin-encoding genes and shares a putative regulatory region with the murine myeloperoxidase gene. *Gene* 110: 229-233.
- Shuai K, Liu B (2005) Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5: 593-605.
- Slawson C, Zachara NE, Vosseller K, Cheung WD, Lane MD, Hart GW (2005) Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J Biol Chem* 280:32944-32956.
- Smet-Nocca C, Wieruszkeski JM, Léger H, Eilebrecht S, Benecke A (2011) SUMO-1 regulates the conformational dynamics of thymine-DNA Glycosylase regulatory domain and competes with its DNA binding activity. *BMC Biochem* 1: 12-14.
- Son KN, Park J, Chung CK, Chung DK, Yu DY, Lee KK, Kim J (2002) Human lactoferrin activates transcription of IL-1beta gene in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 236-241.
- 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 USA* 101: 14373-14378.
- 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.
- Spratt DE, Shaw GS (2011) Association of the disordered C-terminus of CDC34 with a catalytically bound ubiquitin. *J Mol Biol* 407 :425–438.
- Sramko M, Markus J, Kabat J, Wolff L, Bies J (2006) Stress-induced inactivation of the c-Myb transcription factor through conjugation of SUMO-2/3 proteins. *J Biol Chem* 281, 40065-40075.
- Srikumar T, Lewicki MC, Costanzo M, Tkach JM, van Bakel H, Tsui K, Johnson ES, Brown GW, Andrews BJ, Boone C, Giaever G, Nislow C, Raught B (2013) Global analysis of SUMO chain function reveals multiple roles in chromatin regulation. *J Cell Biol* 201:145-163.
- Stankovic-Valentin N, Deltour S, Seeler J, Pinte S, Vergoten G, Guérardel C, Dejean A, Leprince D (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.
- Steffan JS, Agrawal N, Pallos J, Rockabrand E, Trotman LC, Slepko N, Illes K, Lukacsovich T, Zhu YZ, Cattaneo E, Pandolfi PP, Thompson LM, Marsh JL (2004) SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* 304: 100-104.
- Stehmeier P, Muller S (2009) Phospho-regulated SUMO interaction modules connect the SUMO system to CK2 signaling. *Mol Cell* 33: 400-409.
- Steinacher R, Schar P (2005) Functionality of human thymine DNA glycosylase requires SUMO-regulated changes in protein conformation. *Curr Biol* 15: 616-623.
- Stelter P, Ulrich HD (2003) Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* 425: 188-191.
- Sterner DE, Berger SL (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 64:435–459.

- 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.
- 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.
- Strohmaier H, Spruck CH, Kaiser P, Won KA, Sangfelt O, Reed SI (2001) Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature* 413: 316-322.
- Su YF, Yang T, Huang H, Liu LF, Hwang J (2012) Phosphorylation of Ubc9 by Cdk1 enhances SUMOylation activity. *PLoS One* 7: e34250.
- Sun H, Leverson JD, Hunter T (2007) Conserved function of RNF4 family proteins in eukaryotes: targeting a ubiquitin ligase to SUMOylated proteins. *EMBO J* 26: 4102-4112.
- Sung KS, Lee YA, Kim ET, Lee SR, Ahn JH, Choi CY (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.

- T -

- Takahashi Y, Dulev S, Liu X, Hiller NJ, Zhao X, Strunnikov A (2008) Cooperation of sumoylated chromosomal proteins in rDNA maintenance. *PLoS Genet* 4: e1000215.
- Tammsalu T1, Matic I, Jaffray EG, Ibrahim AF, Tatham MH, Hay RT (2014) Proteome-wide identification of SUMO2 modification sites. *Sci Signal* 7: rs2. doi: 10.1126/scisignal.2005146.
- Tan S, Aso T, Conaway RC, Conaway JW (1994) Roles for both the RAP30 and RAP74 subunits of transcription factor IIF in transcription initiation and elongation by RNA polymerase II. *J Biol Chem* 269: 25684-25691.
- Tateishi Y, Ariyoshi M, Igarashi R, Hara H, Mizuguchi K, Seto A, Nakai A, Kokubo T, Tochio H, Shirakawa M (2009) Molecular basis for SUMOylation-dependent regulation of DNA binding activity of heat shock factor 2. *J Biol Chem* 284: 2435-2447.
- Tatham MH, Geoffroy MC, Shen L, Plechanovova A, Hattersley N, Jaffray EG, Palvimo JJ, Hay RT (2008) RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat Cell Biol* 10: 538-546.
- Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA, Desterro JM, Botting CH, Naismith JH, Hay RT (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.
- Tatham MH, Kim S, Jaffray E, Song J, Chen Y, Hay RT. (2005) Unique binding interactions among Ubc9, SUMO and RanBP2 reveal a mechanism for SUMO paralog selection. *Nat Struct Mol Biol* 12: 67-74.
- Tempé D, Piechaczyk M, Bossis G (2008) SUMO under stress. *Biochem Soc Trans* 36: 874-878.
- Teng C, Gladwell W, Raphiou I, Liu E (2004) Methylation and expression of the lactoferrin gene in human tissues and cancer cells. *Biometals* 17: 317-323.
- Terenzi F, Hui DJ, Merrick WC, Sen GC (2006) Distinct induction patterns and functions of two closely related interferon-inducible human genes, ISG54 and ISG56. *J Biol Chem* 281: 34064-34071.
- Testoni N, Borsaru G, Martinelli G, Carboni C, Ruggeri D, Ottaviani E, Pelliconi S, Ricci P, Pastano R, Visani G, Zaccaria A, Tura S (1999) 3q21 and 3q26 cytogenetic

- abnormalities in acute myeloblastic leukemia: biological and clinical features. *Haematologica* 84: 690-694.
- 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.
- Tomasi ML, Tomasi I, Ramani K, Pascale RM, Xu J, Giordano P, Mato JM, Lu SC (2012) S-adenosyl methionine regulates ubiquitin-conjugating enzyme 9 protein expression and sumoylation in murine liver and human cancers. *Hepatology* 56: 982-993.
- Torres CR, Hart GW (1984) Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem* 259: 3308-3317..
- 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.

- U -

- Uchimura Y, Ichimura T, Uwada J, Tachibana T, Sugahara S, Nakao M, Saitoh H (2006) Involvement of SUMO modification in MBD1- and MCAF1-mediated heterochromatin formation. *J Biol Chem* 281: 23180-23190.
- Ullmann R, Chien CD, Avantaggiati ML, Muller S (2012) An acetylation switch regulates SUMO-dependent protein interaction networks. *Mol Cell* 46: 759-770.
- Ulrich HD (2005). Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest. *Trends Cell Biol* 15: 525-532.
- Ulrich HD (2007) SUMO teams up with ubiquitin to manage hypoxia. *Cell* 131, 446-447.
- Ulrich HD (2013) New insights into replication clamp unloading. *J Mol Biol* 425:4727-4732.
- Ulrich HD (2014) Two-way communications between ubiquitin-like modifiers and DNA. *Nature Struct Mol Biol* 21: 317-324.
- Ulrich HD, Takahashi T (2013) Readers of PCNA modifications. *Chromosoma* 122: 259-274.

V -

- Valin A, Gill G (2007) Regulation of the dual-function transcription factor Sp3 by SUMO. *Biochem Soc Trans* 35: 1393-1396.
- van Berkel PH, Geerts ME, van Veen HA, Mericskay M, de Boer HA, Nuijens JH (1997) N-terminal stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA. *Biochem J* 328: 145-51.
- van der Steen T, Tindall DJ, Huang H (2013) Posttranslational modification of the androgen receptor in prostate cancer. *Int J Mol Sci* 14: 14833-14859.
- van Dijk E, Le Hir H, Seraphin B (2003) DcpS can act in the 5'-3' mRNA decay pathway in addition to the 3'-5' pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12081-12086.
- Vanhatupa S, Ungureanu D, Paakkunainen M, Silvennoinen O (2008) MAPK-induced Ser<sup>727</sup> phosphorylation promotes SUMOylation of STAT1. *Biochem J* 409, 179-185.
- van Leuken R, Clijsters L, Wolthuis R (2008) To cell cycle, swing the APC/C. *Biochim Biophys Acta* 1786: 49-59.
- 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.
- Vertegaal AC, Andersen JS, Ogg SC, Hay RT, Mann M, Lamond AI (2006) Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 5: 2298-2310.



- Vertegaal AC, Ogg SC, Jaffray E, Rodriguez MS, Hay RT, Andersen JS, Mann M, Lamond AI (2004b) A proteomic study of SUMO-2 target proteins. *J Biol Chem* 279: 33791-33798.
- Vogel HJ (2012) Lactoferrin, a bird's eye view. *Biochem Cell Biol* 90: 233-244.
- Vogt B, Hofmann K (2012) Bioinformatical detection of recognition factors for ubiquitin and SUMO. *Methods Mol Biol* 832: 249-261.

- W -

- Wales MM, Biel MA, el Deiry W, Nelkin BD, Issa JP, Cavenee WK, Kuerbitz SJ, Baylin SB (1995) p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med* 1: 570-577.
- Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ (2005) Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl* 44: 7342-7372.
- Wan J, Subramonian D, Zhang XD (2012) SUMOylation in control of accurate chromosome segregation during mitosis. *Curr Protein Pept Sci* 13: 467-481.
- Wang CY, Podolsky R, She JX (2007) Genetic and functional evidence supporting SUMO4 as a type 1 diabetes susceptibility gene. *Ann N Y Acad Sci* 1079: 257-267.
- Wang CY, She JX (2008) SUMO4 and its role in type 1 diabetes pathogenesis. *Diabetes Metab Res Rev* 24: 93-102.
- Wang CY, Yang P, Li M, Gong F (2009) Characterization of a negative feedback network between SUMO4 expression and NFkappaB transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 381: 477-481.
- Wang QE, Zhu Q, Wani G, El-Mahdy MA, Li J, Wani AA (2005) DNA repair factor XPC is modified by SUMO-1 and ubiquitin following UV irradiation. *Nucleic Acids Res* 33: 4023-4034.
- Wasik U, Filipek A (2014) Non-nuclear function of sumoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1843: 2878-2885.
- Watts FZ (2006) Sumoylation of PCNA: Wrestling with recombination at stalled replication forks. *DNA Repair* 5: 399-403.
- 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.
- Wei W, Yang P, Pang J, Zhang S, Wang Y., Wang M H, Dong Z, She JX, Wang CY (2008) A stress-dependent SUMO4 sumoylation of its substrate proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 375: 454-459.
- Welcker M, Singer J, Loeb KR, Grim J, Bloecher A, Gurien-West M, Clurman BE, Roberts JM (2003) Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation. *Mol Cell* 12: 381-392.
- Werner A, Flotho A, Melchior F (2012) The RanBP2/RanGAP1\*SUMO1/Ubc9 complex is a multisubunit SUMO E3 ligase. *Mol Cell* 46: 287-298.
- Wilken N, Senécal 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.
- Wilkinson KA, Henley JM (2010) Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J* 428: 133-145.
- Woo CH, Abe JI (2010) SUMO--a post-translational modification with therapeutic potential? *Curr Opin Pharmacol* 10: 146-155.
- Worsham MJ, Pals G, Schouten JP, Miller F, Tiwari N, van Spaendonk R, Wolman SR (2006) High-resolution mapping of molecular events associated with immortalization, transformation, and progression to breast cancer in the MCF10 model. *Breast Cancer*

*Res Treat* 96: 177-186.

- Wotton D, Merrill JC (2007) Pc2 and SUMOylation. *Biochem Soc Trans* 35: 1401-1404.
- Wu SC, Zhang Y (2010) Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 607-620.
- Wu SY, Chiang CM (2009) Crosstalk between sumoylation and acetylation regulates p53-dependent chromatin transcription and DNA binding. *EMBO J* 28: 1246-1259.

- X -

- Xhemalce B, Riising EM, Baumann P, Dejean A, Arcangioli B, Seeler JS (2007) Role of SUMO in the dynamics of telomere maintenance in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 893-898
- Xiao S, Li D, Zhu HQ, Song MG, Pan XR, Jia PM, Peng LL, Dou AX, Chen GQ, Chen SJ, Chen Z, Tong JH (2006) RIG-G as a key mediator of the antiproliferative activity of interferon-related pathways through enhancing p21 and p27 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:16448-16453.
- 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.
- Xu Z, Au SWN (2005). Mapping residues of SUMO precursors essential in differential maturation by SUMO-specific protease, SENP1. *Biochem J* 386: 325-330.

- Y -

- Yamamoto H, Ihara M, Matsuura Y, Kikuchi A (2003) Sumoylation is involved in beta-catenin-dependent activation of Tcf-4. *EMBO J* 22: 2047-2059.
- Yamashita D, Yamaguchi T, Shimizu M, Nakata N, Hirose F, Osumi T (2004) The transactivating function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is negatively regulated by SUMO conjugation in the amino-terminal domain. *Genes Cells* 9: 1017-1029.
- Yan Y, Mumby MC (1999) Distinct roles for PP1 and PP2A in phosphorylation of the retinoblastoma protein. PP2a regulates the activities of G(1) cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem* 274: 31917-1924.
- Yang SH, Galanis A, Witty J, Sharrocks AD (2006b) An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *EMBO J* 25: 5083-5093.
- Yang SH, Jaffray E, Hay RT, Sharrocks AD (2003a) Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol Cell* 12: 63-74.
- Yang SH, Jaffray E, Senthinathan B, Hay RT, Sharrocks AD (2003b) SUMO and transcriptional repression: dynamic interactions between the MAP kinase and SUMO pathways. *Cell Cycle* 2: 528-530.
- 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.
- Yang WH, Kim JE, Nam HW, Ju JW, Kim HS, Kim YS, Cho JW (2006c) Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat Cell Biol* 8: 1074-1083.
- Yang XJ, Gregoire S (2006) A recurrent phospho-sumoyl switch in transcriptional repression and beyond. *Mol Cell* 23: 779-786.
- Yew PR (2001) Ubiquitin-mediated proteolysis of vertebrate G1- and S-phase regulators. *J Cell Physiol* 187: 1-10.

- Yuan H, Zhou J, Deng M, Liu X, Le Bras M, de The H, Chen SJ, Chen Z, Liu TX, Zhu J (2010) Small ubiquitin-related modifier paralogs are indispensable but functionally redundant during early development of zebrafish. *Cell Res* 20: 185-196.
- Yun C, Wang Y, Mukhopadhyay D, Backlund P, Kolli N, Yergey A, Wilkinson KD, Dasso M (2008) Nucleolar protein B23/nucleophosmin regulates the vertebrate SUMO pathway through SENP3 and SENP5 proteases. *J Cell Biol* 183: 589-595.
- 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.

- Z -

- Zachara NE, Hart GW (2006). Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochim Biophys Acta* 1761: 599–617.
- Zhang FP, Mikkonen L, Toppari J, Palvimo JJ, Thesleff I, Jänne OA (2008a) Sumo-1 function is dispensable in normal mouse development. *Mol Cell Biol* 28: 5381-5390.
- Zhang XD, Goeres J, Zhang H, Yen TJ, Porter AC, Matunis MJ (2008b) SUMO-2/3 modification and binding regulate the association of CENP-E with kinetochores and progression through mitosis. *Mol Cell* 29: 729-741.
- Zhang H, Feng X, Liu W, Jiang X, Shan W, Huang C, Yi H, Zhu B, Zhou W, Wang L, Liu C, Zhang L, Jia W, Huang W, Li G, Shi J, Wanggou S, Yao K, Ren C (2011) Underlying mechanisms for LTF inactivation and its functional analysis in nasopharyngeal carcinoma cell lines. *J Cell Biochem* 112: 1832-1843.
- Zhao C, Denison C, Huijbrechtse JM, Gygi S, Krug RM (2005a) Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10200-10205.
- Zhao J (2007) Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell Mol Life Sci CMLS* 64: 3017-3033.
- Zhao X, Blobel G (2005b) A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 4777-4782.
- Zhao X, Sternsdorf T, Bolger TA, Evans RM, Yao TP (2005c) Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4- and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications. *Mol Cell Biol* 25: 8456–8464.
- Zhong S, Müller S, Ronchetti S, Freemont PS, Dejean A, Pandolfi PP (2000b) Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 95: 2748-2752.
- Zhong S, Salomoni P, Pandolfi PP (2000) The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol* 2: E85-90.
- Zhu H, Zhou ZM, Huo R, Huang XY, Lu L, Lin M, Wang LR, Zhou YD, Li JM, Sha JH (2004) Identification and characteristics of a novel E1 like gene nUBE1L in human testis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 36: 227-234.
- Zimber A, Nguyen QD, Gerspach C (2004) Nuclear bodies and compartments: functional roles and cellular signalling in health and disease. *Cell Signal* 16: 1085-1104.



La deltalactoferrine ( $\Delta$ Lf) est un facteur de transcription qui possède des propriétés anti-tumorales. Son activité et sa stabilité sont hautement contrôlées par des modifications post-traductionnelles comme la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation. Au cours de ma thèse, nous avons pu montrer que la  $\Delta$ Lf était modifiée par SUMO-1 et mettre en évidence 5 sites de SUMOylation. Nous avons produit un ensemble de mutants pour lesquels un seul site était préservé et un mutant M5S invalidé pour les cinq sites de SUMOylation. Nous avons pu montrer que cinq lysines étaient la cible de la machinerie de SUMOylation et que K13, K308 et K379 étaient les sites accepteurs majeurs. Nous avons ensuite étudié l'activité transcriptionnelle des différents mutants et montré que la SUMOylation réprime l'activité transcriptionnelle de la  $\Delta$ Lf. Dans un second temps nous avons étudié le dialogue entre différentes modifications post-traductionnelles. Nous avons pu démontrer qu'une compétition SUMO/ubiquitine existait et que sous la forme SUMOylée le mutant K379 avait une durée de  $\frac{1}{2}$  vie plus longue confirmant que la SUMOylation protégeait la  $\Delta$ Lf de la dégradation protéasomale. Nous avons également pu montrer que la  $\Delta$ Lf était acétylée principalement sur la lysine K13. En modulant le niveau de SUMOylation ou d'acétylation du mutant K13 nous avons pu montrer que la compétition SUMO/acétylation était impliquée dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de la  $\Delta$ Lf. En effet, l'acétylation régule positivement l'activité transactivatrice de la  $\Delta$ Lf alors que la SUMOylation l'inhibe. En résumé, nous avons pu montrer que la  $\Delta$ Lf était multi-SUMOylée et que la SUMOylation était un nouveau mécanisme de régulation à la fois de l'activité transcriptionnelle et de la stabilité de la  $\Delta$ Lf. En parallèle, nous avons montré que la  $\Delta$ Lf transactivait le gène *Bax* déclenchant l'apoptose et que la balance *O*-GlcNAc/Phosphate modulait la transactivation de *Bax*.

Deltalactoferrin ( $\Delta$ Lf) is a transcription factor which possesses antitumoral activities. Posttranslational modifications such as *O*-GlcNAcylation and phosphorylation, efficiently modulate its transcription factor activity and stability. During my PhD thesis we first showed that  $\Delta$ Lf is modified by SUMO-1 and mapped the five SUMO sites. We produced a series of mutants for which only one site was preserved and a null-mutant in which all five SUMO sites were invalidated. We showed that all lysine residues were SUMO acceptors and that K13, K308 and K379 were the main SUMO sites. We next studied the impact of SUMOylation on  $\Delta$ Lf activity and showed that SUMOylation negatively regulated the transactivation function of  $\Delta$ Lf. During the second part of my PhD, we investigated the crosstalk between different posttranslational modifications. We showed that K379 which is either ubiquitinated or SUMOylated, is a pivotal site for the control of  $\Delta$ Lf stability. We also showed that SUMOylation competes with ubiquitination and protects  $\Delta$ Lf from proteosomal degradation by positively regulating its stability. We demonstrated that K13 is the main acetylation site and that favoring acetylation at K13 reduced SUMOylation and increased  $\Delta$ Lf transcriptional activity. Collectively, our results indicate that multi-SUMOylation occurs on  $\Delta$ Lf to repress its transcriptional activity. Reciprocal occupancy of K13 by either SUMO-1 or an acetyl group may contribute to the establishment of finely regulated mechanisms to control  $\Delta$ Lf transcriptional activity. Moreover, competition between SUMOylation and ubiquitination at K379 coordinately regulates the stability of  $\Delta$ Lf toward proteolysis. Therefore SUMOylation of  $\Delta$ Lf is a novel mechanism controlling both its activity and stability. In parallel, we demonstrated that  $\Delta$ Lf transactivates the *Bax* promoter leading to the triggering of apoptosis and that the *O*-GlcNAc/Phosphate interplay controls *Bax* transactivation.