N°d'ordre: 4015

30376
2007
69

Université des Sciences et Technologies de Lille
Institut de Biologie de Lille, UMR8161
Ecole Doctorale Biologie-Santé

THESE DE DOCTORAT

Biologie-Santé

UNIVERSITÉ DES SC. ET TECHN. BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE LILLE

Présentée par
Cindy DEGERNY

Sumoylation et régulation de l'activité du facteur de transcription ERM

Soutenue en public le 12 octobre 2007

Jury :		
Président :	Pr Philippe DELANNOY	Université de Lille 1
Rapporteur :	Dr Robert HIPSKIND	Université de Montpellier 2
	Dr Jacob SEELER	Université de Paris
Examinateur :	Dr Jacques GHYSDAEL	Université de Paris 11
Directeur de thèse :	Dr Jean-Luc BAERT	Université de Lille 1
Directeur de laboratoire :	Pr Yvan de LAUNOIT	Université de Lille 1

Remerciements

Je désire remercier l'ensemble des membres de mon jury qui ont accepté de juger mon travail. Merci aux Dr **Jacob Seeler** et **Robert Hipskind** d'avoir accepté d'être mes rapporteurs, au Dr **Jacques Ghysdael** d'être mon examinateur et au Pr **Philippe Delannoy** de présider ce jury.

Je tiens à remercier **Yvan de Launoit** de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir aidée chaque fois que j'en ai eu besoin.

Jean-Luc. Comment dire en quelques mots tout ce que je te dois et combien je te remercie ? Merci de m'avoir donné une chance après ma licence et d'avoir accepté de me supporter quatre ans de plus. Grâce à toi, je sais ce qu'est l'encadrement parfait à tous les niveaux, ce qui est pour moi, une chance estimable. Je te remercie de m'avoir tant appris. Merci aussi pour ton soutien, tes conseils avisés, ta gentillesse, ta confiance et les innombrables cafés...Je n'oublie pas non plus le grand nombre de crayons que tu as usés sur mes différents écrits et les heures que tu m'as consacrées. J'espère avoir été à la hauteur de tes exigences et de ne pas t'avoir déçu. Laurent t'appelle souvent « le père » et je n'ai jamais su pourquoi. En tout cas, pour moi, tu es un vrai « Papa Sciences ». Encore une fois, Mille fois merci...

Laurent. Mention spéciale à mon collègue (très) matinal et à sa bonne humeur. Le « pitbull », la « pompom » ou le « monstre » a toujours apprécié tes blagues, ta gentillesse et l'aide que tu lui as apportée tout au long de ma thèse. Merci pour les cours d'embryologie !!!

Didier. Je te remercie pour ta gentillesse et tes conseils toujours justes. Je pense que tes railleries vont me manquer un peu quand même...

Elisabeth. Merci pour toutes les cellules que je t'ai honteusement volées et qui m'ont souvent dépannée. Ta gentillesse, ta bonne humeur et la ritournelle sur ma blouse invisible ont ponctué ces quatres années de bons moments.

Isabelle. Ma compagne du matin. Merci de m'avoir tenu compagnie si souvent à l'aurore et de ton aide en radioactivité !!

Nathalie et Nicolas. Merci pour nos bons moments, nos délires, nos coups de gueule communs et votre aide. Je dois avouer que, grâce à vous, je n'oublie pas ma « blondeur intérieure ». Bonne chance à vous dans vos projets !!

Franck. Cher voisin de bureau. Ça y est, tu vas être enfin tranquille...je ne vais plus t'embêter...ni être méchante Je te souhaite toute la réussite possible et bonne chance pour ta thèse...nous nous reverrons dans trois ans !!!

Bénédicte. Ma sœur de thèse. Nous avons pris le même bateau en DEUG et nous avons accosté ensemble en fin de thèse. Dans un mois, c'est ton tour...Comme nos routes

se séparent ici, je voulais juste te remercier de ta gentillesse, ton écoute, ton soutien... Je te souhaite bonne chance pour la suite.

Fred. Indissociable de la personne précédente et qui m'a beaucoup fait rire. Je n'oublierai pas ton flegme, ta tête du matin, tes délires et surtout ta gentillesse. Au passage, bon courage avec les « poulpes ». Rétablis-toi vite…

Catherine. Tu es mon double et la grande sœur que je n'ai jamais eue. Ton énergie, ta douceur, tes conseils et nos grandes discussions vont me manquer. J'espère que tes espoirs secrets seront vite comblés et que tu continueras à te créer ta propre chance. Tu vas avoir un contact supplémentaire sur msn mais pense à dormir un peu quand même. N'oublie pas de progresser en rock…pour cela, il va falloir être plus sérieuse en cours. De mon côté, je vais essayer de me perfectionner aussi.

Virginie. Voilà six mois que tu es partie et j'avoue que le bureau est bien vide sans toi. Nos discussions (scientifiques et de filles) jusqu'à des heures tardives, nos dégustations de sucreries et gâteaux me manquent. Merci en tout cas pour ta gentillesse et ta bonne humeur quasi constante. Grâce à toi, les heures d'enseignement en TP ont été géniales. Je te souhaite toute la réussite possible dans ton post-doc parisien et pour la suite…J'allais oublier de te remercier de m'avoir initié à la salsa…je n'ai pas vraiment progressé mais qu'importe, ces soirées sont d'excellents souvenirs.

Alessandro. Fournisseur officiel de bonbons et de blagues. Merci pour ta bonne humeur. Bonne chance à toi pour la suite.

Je remercie aussi toutes les autres personnes travaillant au **3e étage de l'IBL** et **l'équipe de cristallographie** d'avoir toujours répondu à mes questions, de m'avoir aidée parfois et d'avoir été si gentils.

Papa et Maman. Mon plus gros soutien et mes premiers fans. Vous avez toujours été là et vous m'avez tant offert. J'espère vous avoir rendu fiers. Aujourd'hui, la première étape de mon rêve s'achève et la suite se jouera de l'autre côté de l'Atlantique. Je sais que vous me manquerez énormément mais je voulais juste vous dire merci et que je vous aime.

Romu. Ma moitié, mon meilleur ami, mon frère, mon équilibre. Nous avons eu des hauts et des bas. Mais depuis 7 ans, je suis heureuse grâce à toi. Tu m'as toujours soutenue et épaulée. Merci car je ne suis pas sûre que j'aurai tenu le coup sans toi.

Papy et Mamie. J'espère que, là où vous êtes, vous êtes fiers de votre unique petite-fille.

Juste pour finir, je remercie encore ma famille et mes amis pour leur soutien et leur aide qui ont été déterminants durant toutes ces années.

Résumé

Résumé

ERM est un facteur de transcription de la famille ETS appartenant au groupe PEA3. Ce groupe se compose de trois protéines impliquées dans la tumorigènese mammaire, principalement dans le processus métastatique. Ces protéines sont des activateurs transcriptionnels dont le niveau d'activation dépend de différentes modifications post-traductionnelles.

La sumoylation est une modification post-traductionnelle qui joue un rôle clé dans la régulation de l'activité de certains facteurs de transcription. Elle consiste en la conjugaison d'une protéine SUMO sur la lysine d'une séquence consensus Ψ**K**XE (Ψ résidu hydrophobe) par l'enzyme de conjugaison Ubc9 et une SUMO-ligase. Nous avons montré qu'ERM, qui interagit avec Ubc9 et possède cinq sites consensus de sumoylation, est effectivement conjuguée à SUMO et que cette modification est très nettement impliquée dans l'inhibition de son activité transcriptionnelle. Cette inhibition est liée à la sumoylation de trois sites présents dans un domaine préalablement défini comme réprimant l'activité du domaine transactivateur N-terminal d'ERM. Toutefois, la sumoylation des deux sites extérieurs à ce domaine répresseur est aussi impliquée dans la régulation négative de l'activité d'ERM. Chaque site de sumoylation semble ainsi pouvoir correspondre à un module inhibiteur. Finalement, nous avons établi que la sumoylation d'ERM est dépendante de la SUMO-ligase PIAS1 sans toutefois exclure le rôle d'autres protéines de la famille PIAS dans ce processus.

Ces travaux ouvrent maintenant la voie de l'étude des mécanismes d'inhibition mis en jeu par SUMO et des interconnexions entre les diverses modifications post-traductionnelles d'ERM.

Mots-clés : ERM, facteur de transcription, SUMO, modification post-traductionnelle

Thèse préparée à

UMR8161-Institut de Biologie de Lille
Equipe 6 « Transcription-Développement-Cancer »
1 rue du Pr Calmette
59021 Lille cedex
France

Résumé

ERM is an ETS transcription factor belonging to the PEA3 group. This group contains three proteins (ERM, ER81 and PEA3) which are involved in mammary tumorigenesis and mainly in metastasis process. These proteins are transcriptional activators and their activity depends on several post-translational modifications such as phosphorylation and acetylation.

Sumoylation is a post-translational modification which is an important regulator of some transcription factors. It consists of the covalent attachment of SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) to a lysine residue belonging to a consensus site Ψ**K**XE (Ψ hydrophobic amino acid) and involves the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 and a SUMO-ligase. We showed here that ERM, which interacts with Ubc9 and possesses five SUMO consensus sites, is a SUMO modified protein and that SUMO is clearly involved in inhibition of its transcriptional activity. This inhibition is linked to sumoylation of three SUMO sites localized in a domain previously described to negatively regulate the activity of the N-terminal transactivation domain of ERM. Nevertheless, modification of the two others SUMO sites present outside this domain is also involved in inhibition of ERM activity suggesting that each SUMO site can be considered as an inhibitory motif. Finally, we gave evidence that ERM sumoylation depends on the SUMO-ligase PIAS1 but we can not exclude that other members of the PIAS family are also implicated in the ERM sumoylation process.

Our work is an open field for future studies on mechanisms involved in SUMO-dependent inhibition of ERM activity and on cross-talk between the several post-translational modifications affecting ERM.

Keywords : ERM, transcription factor, SUMO, post-translational modification

Title : Sumoylation and regulation of ERM transcriptional activity

Sommaire

RESUME **5**

SOMMAIRE **9**

TABLE DES ILLUSTRATIONS **11**

ABREVIATIONS **13**

INTRODUCTION **17**

I. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DU GROUPE PEA3 19
A. La famille ETS *19*
1) Découverte 19
2) Le domaine ETS 19
3) Fonctions biologiques 21
4) Implication dans les cancers 23
B. Le groupe PEA3 ..... *25*
1) Les trois membres du groupe PEA3 25
2) Les domaines fonctionnels 27
3) L'expression 27
4) Les gènes cibles 31
5) Les fonctions biologiques normales 32
6) Implication dans les cancers 33
7) Modulation de l'activité des membres du groupe PEA3 36
II. LA SUMOYLATION 43
A. SUMO et sa voie de conjugaison *43*
1) Gènes et protéines SUMO 43
2) Cascade enzymatique 45
3) Caractéristiques de la sumoylation 48
B. Les fonctions de SUMO *53*
1) La transcription 53
2) L'intégrité du génome 59
3) Cycle cellulaire 60
4) Autres fonctions cellulaires 61
C. SUMO et tumorigenèse *62*
D. Régulation de la sumoylation *62*
1) La phosphorylation 63
2) Compétition avec d'autres voies de modification des lysines 64
E. Facteurs ETS et sumoylation *67*
1) Les répresseurs de la famille ETS 67
2) Les activateurs de la famille ETS 68
F. Conclusion *70*

RESULTATS **71**

I. SUMOYLATION ET REPRESSION DE L'ACTIVITE D'ERM 73
II. SUMOYLATION ET DOMAINE INHIBITEUR INTERNE D'ERM 77
III. SUMOYLATION ET SUMO-LIGASE POUR ERM 83
A. Certaines PIAS interagissent avec ERM *83*
B. Les PIAS qui modulent le niveau de sumoylation et l'activité d'ERM *85*
1) Sumoylation d'ERM 85

2) Activité d'ERM 85
C. PIAS1 : une potentielle SUMO-ligase pour ERM *87*
1) Interaction entre PIAS1 et ERM *in vivo* 87
2) L'activité SUMO-ligase de PIAS1 est nécessaire à l'inhibition de l'activité d'ERM 87
3) Les effets de PIAS1 sur l'activité d'ERM sont liés à la présence des sites de sumoylation 88
4) La sous-expression de PIAS1 augmente l'activité d'ERM 89
D. Quid de PIASγ? *91*
IV. CONCLUSION 93

DISCUSSION 95

I. LA SUMOYLATION REPRIME L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DES MEMBRES DU GROUPE PEA3 97
II. LES SUMO-LIGASES 100
III. MECANISMES MIS EN JEU PAR SUMO 103
IV. RELATIONS ENTRE LA SUMOYLATION ET D'AUTRES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES 106
A. La phosphorylation *106*
B. L'ubiquitination *108*
C. L'acétylation *109*
V. IMPACT *IN VIVO* DE LA SUMOYLATION DE ERM 110
VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 111

BIBLIOGRAPHIE 113

ANNEXES 137

Table des illustrations

Figure 1 : Représentation des membres de la famille ETS. 20
Figure 2 : Représentation du domaine de liaison à l'ADN du facteur ETS-1 fixé à l'ADN. 21
Tableau 1 : Phénotype obtenu suite à l'inactivation des membres de la famille ETS. 22
Tableau 2 : Implication des facteurs ETS dans différents types de tumeurs. 24
Figure 3 : Représentation des domaines conservés entre les membres du groupe PEA3. 24
Figure 4 : Domaines fonctionnels de la protéine ERM. 26
Tableau 3 : Profil d'expression des membres du groupe PEA3 au niveau neuronal et génital. 28
Figure 5 : Intervention du GDNF et de l'HGF dans la différenciation des motoneurones. 29
Tableau 4 : Gènes cibles connus des membres du groupe PEA3. 30
Tableau 5 : Corrélations et données fonctionnelles impliquant les facteurs du groupe PEA3 dans les cancers. 34
Figure 6 : Taux de survie de patientes atteintes d'un cancer du sein en fonction du niveau d'expression d'ERM. 35
Figure 7 : Schéma des différentes voies de phosphorylation des membres du groupe PEA3. 38
Figure 8 : Représentation d'un membre prototype du groupe PEA3 avec ses domaines fonctionnels et ses modifications post-traductionnelles. 40
Figure 9 : Comparaison des structures tridimentionnelles de SUMO et de l'ubiquitine. 42
Figure 10 : Voie de conjugaison de SUMO et localisation subcellulaire de ses différents acteurs. 45
Figure 11 : Présentation des domaines fonctionnels des protéines PIAS. 47
Figure 12 : Quelques substrats de la sumoylation regroupés par fonction. 50
Figure 13 : Fonctions cellulaires dans lesquelles la sumoylation a été impliquée. 52
Figure 14 : Régulation de la sumoylation par d'autres modifications post-traductionnelles. ..66
Figure 15 : Modèle d'action de PIASxα en fonction des voies MAPkinases activées sur l'activité du facteur de transcription Elk-1. 69
Figure 16 : Localisation du domaine d'ERM utilisé comme appât dans le système double hybride et position des sites consensus de sumoylation. 72
Figure 17 : ERM interagit *in vitro* avec Ubc9. 72
Figure 18 : La mutation des sites de sumoylation n'affecte pas l'ubiquitination d'ERM. 74
Figure 19 : Localisation du NRD et des sites de sumoylation dans les membres du groupe PEA3. 77
Figure 20 : Les deux sites de sumoylation situés en dehors du NRD participent à l'inhibition de l'activité d'ERM. 79

Table des illustrations

Figure 21 : Expression des différents membres de la famille PIAS. 82
Figure 22 : Interaction *in vitro* entre les différentes PIAS et ERM. 82
Figure 23 : Niveau de sumoylation d'ERM en présence des différentes PIAS. 84
Figure 24 : Impact de l'expression des protéines PIAS sur l'activité transcriptionnelle d'ERM. 84
Figure 25 : PIAS1 $C_{351}S$ interagit *in vivo* avec ERM 86
Figure 26 : Impact de l'expression de PIAS1 et PIAS1 $C_{351}S$ sur l'activité transcriptionnelle et la sumoylation d'ERM. 86
Figure 27 : Effet de l'expression de PIAS 1 sur l'activité d'ERM et du mutant non sumoylable. 88
Figure 28 : La diminution d'expression de PIAS1 corrèle avec l'augmentation d'activité transcriptionnelle d'ERM dans les cellules HeLa. 89
Figure 29 : Sumoylation d'ERM en présence de PIASγ. 90
Figure 30 : PIASγ réprime l'activité transcriptionnelle d'ERM. 90
Figure 31 : Effet de l'expression de PIASγ sur l'activité de p53 sur le promoteur Mdm2. 92
Figure 32 : Efficacité d'un shRNA dirigé contre PIASγ 92

Abréviations

ABL : v-abl Abelson murine leukemia oncogene
ACTR : Activator of Thyroid and Retinoic acid Receptor
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AIB1 : Amplified In Breast cancer-1 protein
AMP : Adénosine MonoPhosphate
APE : Apurinic/Apyrimidinic endonucléase
AR : Androgen receptor
ARNm : Acide ribonucléique messager
ARIP4 : Androgen Receptor-Interacting Protein 4
ATM : ataxia telangiectasia mutant
CBP : CREB binding protein
C/EBP : CCAAT/enhancer-binding protein
ChIP : Chromatin immunoprecipitation
cox : Cyclooxygenase
CRD1 : Cell Cycle Regulatory Domain1
CRE : cAMP responsive element
CtBP : C terminal binding protein
DBD : DNA binding domain
DIF : Domaine d'inhibition de la fixation à l'ADN
DRP1 : Dynamin related protein
E2F : E2 factor
EBS : ETS Binding Site
EGF : Epithelial growth factor
ELF : E74 like factor
ER81 : Ets-related 81
ERM : Ets related molecule
ERF : Ets2 repressor factor
ERG : Early response gene
ESE : Epithelium specific ets
ETS : E-twenty six
ETV : Ets variant
EWS : Ewing's sarcoma protein
MEF : mouse embryonic fibroblast
FGF : Fibroblast growth factor
FLI-1 : Friend leukaemia integration I
F-MuLV : Friend murine leukemia virus
GABP : GA-binding protein
galT1 : β1,4-galactosyltransferase I
GDNF : Glial derived neurotrophic factor
GR : Glucocorticoid receptor
GRIP1 : Glucocorticoid receptor-interacting protein
HDAC : Histone désacétylase
HGF : Hepatocyte growth factor
HIF-1 : Hypoxia-inducible factor 1
HSF : Heat shock factor
icam-1 :Intracellular adhesion molecule 1
IKK : IκB kinase
IL : Interleukine
inos : inducible nitric oxide synthase
JNK : Janus kinase
LEF : Lymphoïd enhancing factor

Abréviations

LPP : Lipoma-preferred partner
LSD1 = AOF2 : Amine oxidase, flavin-containing, 2
LXR : Liver X receptor
MAPK : Mitogen activated protein kinase
MBD1 : Methyl binding domain
MCAF1 : MBD1-containing chromatin-associated factor1
MEF2 : Myocyte enhancer factor 2
MK2 = MAPKAP : MAPK-activated protein kinase
MMP : Matrix metalloproteinase
MN : Motoneurone
MRF : Muscle regulatory factor
MSK1 : Mitogen- and stress-activated protein kinase 1
mt1-mmp : Membrane-type 1-MMP
muc : Mucine
NCoR : Nuclear receptor corepressor 1
NDSM : Negatively charged amino acid-Dependent Sumoylation Motif
NEMO : NF□B essential modulator
NFAT : Nuclear factor of activated T cells
NFκB : Nuclear factor κB
NF-IL6β : Nuclear factor-interleukin-6 β
NLS : Nuclear localization signal
NRD : Negative regulatory domain
NXP-2 : Nuclear matrix protein
P/CAF : p300/ CBP associated factor
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCNA : Proliferating cell nuclear antigen
PDEF : Prostate epithelium-derived Ets transcription factor
PDGFR : Platelet-derived growth factor receptor
PDSM : Phosphorylation Dependent Sumoylation Motif
PEA3 : Polyomavirus enhancer activator
PELP1 : Proline glutamic acid and leucine rich protein 1
PIAS : Protein Inhibitor of Activated STAT
PI3K : Phosphatidyl inositol 3-kinase
PKA : Protein kinase A
PLAG : Pleomorphic adenoma gene
PMA : Phorbol myristate acétate
PML : Promyelocytic leukaemia protein
PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor
P-TEFb : Posistive transcription elongation factor b
RanGAP1 : Ran-GTPase-activating protein1
Rb : Retinoblastome protein
RNAi : ARN interférence
RSK1 : Ribosomal protein s6 kinase
RT-PCR : Retrotranscription polymerase chain reaction
SAM : Sterile Alpha Motif
SAP : Siz Acinus PIAS
SBM : SUMO binding Motif
SC motif : Synergy control motif
SENP : Sentrin protease
SIP1 : Smad-interacting protein1
SMRT : Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
SRC-1 : Steroid receptor coactivator-1
STAT : Signal transducer and activator of transcription
STUbL : SUMO-targeted ubiquitin ligase
SUMO : Small ubiquitin-related modifier

Abréviations

TAD : Transactivation domain
TDG : Thymine DNA glycolylase
TEL : translocation Ets Leukemia
TERT : Telomerase reverse transcriptase
TFIID : Transcription factor of RNA pol II
TGFβ : Transforming growth factor β
TRAF : TNF receptor-associated factor
UFDS : Ubc9 fusion-directed SUMOylation
uPA : Urokinase plasminogen activator
USF1 : Upstream Stimulatory Factor 1

Introduction

I. Les facteurs de transcription du groupe PEA3

A. La famille ETS

1) Découverte

En 1962, Ivanov et al ont montré que le rétrovirus aviaire E26 (Erythroïd Twenty Six) entraîne des leucémies *in vivo* chez le poulet [134]. Son injection à des animaux sains engendre l'apparition rapide de leucémies initialement décrites comme myéloïdes et érythroïdes [212, 251] puis reconnues comme des leucémies des cellules souches [94]. L'ARN viral est traduit en une protéine de fusion $p135^{Gag\text{-}Myb\text{-}Ets}$ constituée de deux oncogènes *v-myb* et *v-ets* et d'une protéine virale Gag [181, 231]. L'oncogène *v-ets* induit *in vitro* la transformation de fibroblastes, myéloblastes et érythroblastes [316]. L'étude de ce rétrovirus a permis la caractérisation de *v-ets* et l'émergence d'une grande famille de protéines.

Très rapidement, les homologues cellulaires de l'oncogène viral *v-ets* ont été isolés chez le poulet (*ck-ets1*) [80] puis chez l'homme (*h-ets1*) [317]. Grâce au clonage de nouveaux proto-oncogènes s'est réellement constituée la famille des protéines ETS. Actuellement chez les Métazoaires, cette famille comprend 28 paralogues d'*ets-1* (fig. 1). Chez les Mammifères, les gènes de la famille ETS sont localisés sur l'ensemble du génome [174]. Ces gènes *ets* codent des facteurs de transcription qui possèdent un domaine très conservé de fixation à l'ADN.

2) Le domaine ETS

Les facteurs de transcription de la famille ETS possèdent une forte identité de séquence dans le domaine de liaison à l'ADN, le « domaine ETS ». Ce domaine d'environ 85 acides aminés (AA) est structuré en trois hélices α et quatre feuillets β antiparallèles organisés de la manière suivante : $\alpha1$- $\beta1$- $\beta2$- $\alpha2$- $\alpha3$- $\beta3$- $\beta4$. Le domaine ETS présente une structure tridimensionnelle hélice-tour-hélice de type ailé (pour revue [272], fig. 2). Pour remplir leur fonction, les protéines ETS se fixent sous forme monomérique à l'ADN au niveau d'une séquence consensus minimale 5' GGA(A/T) 3' dénommée EBS (ETS Binding Site). Les nucléotides flanquant cette séquence sont quant à eux importants pour la spécificité de reconnaissance des protéines ETS envers les sites du promoteur du gène cible [232]. Le contact entre le domaine ETS et l'ADN est majoritairement assuré par deux résidus arginine de l'hélice 3 avec les deux guanosines de l'EBS au niveau du grand sillon de l'ADN. D'autres jonctions mineures se produisent au niveau des boucles entre $\beta3$, $\beta4$ et $\alpha2$, $\alpha3$ (pour revue [272], fig. 2).

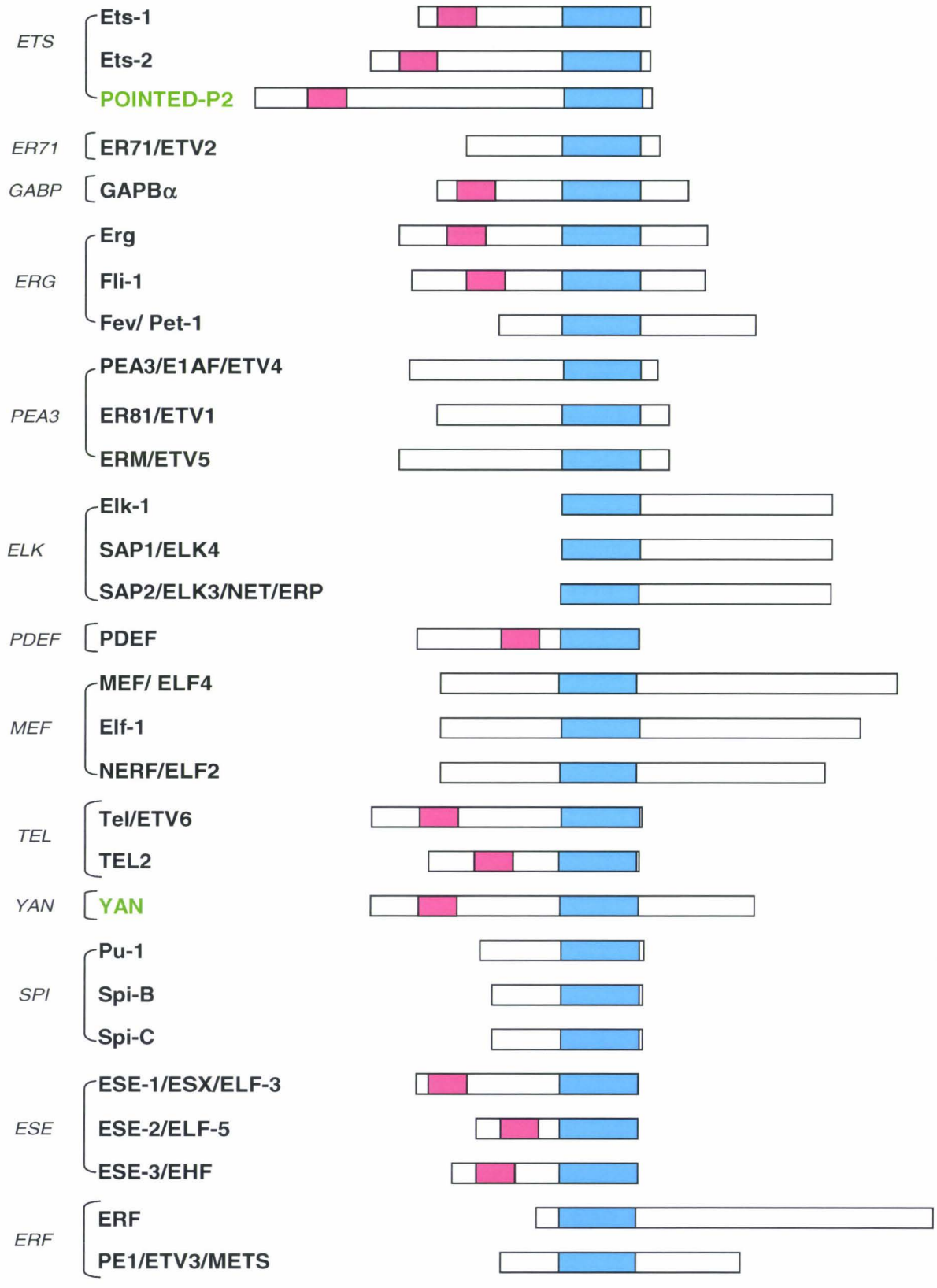


Figure 1 : Représentation des groupes et de certains membres de la famille ETS.
Le domaine ETS est représenté en bleu et le domaine « Pointed » en rose. Les protéines indiquées en noir sont celles présentes chez les Mammifères, en vert celles présentes chez la Drosophile. D'après Laudet et al, 1999 [174].

Sur la base du degré d'identité de séquence au sein du domaine ETS et d'autres domaines fonctionnels partagés par un nombre plus restreint de membres, treize groupes ont été déterminés dans cette famille [174]. Ceux-ci sont présentés dans la figure 1.

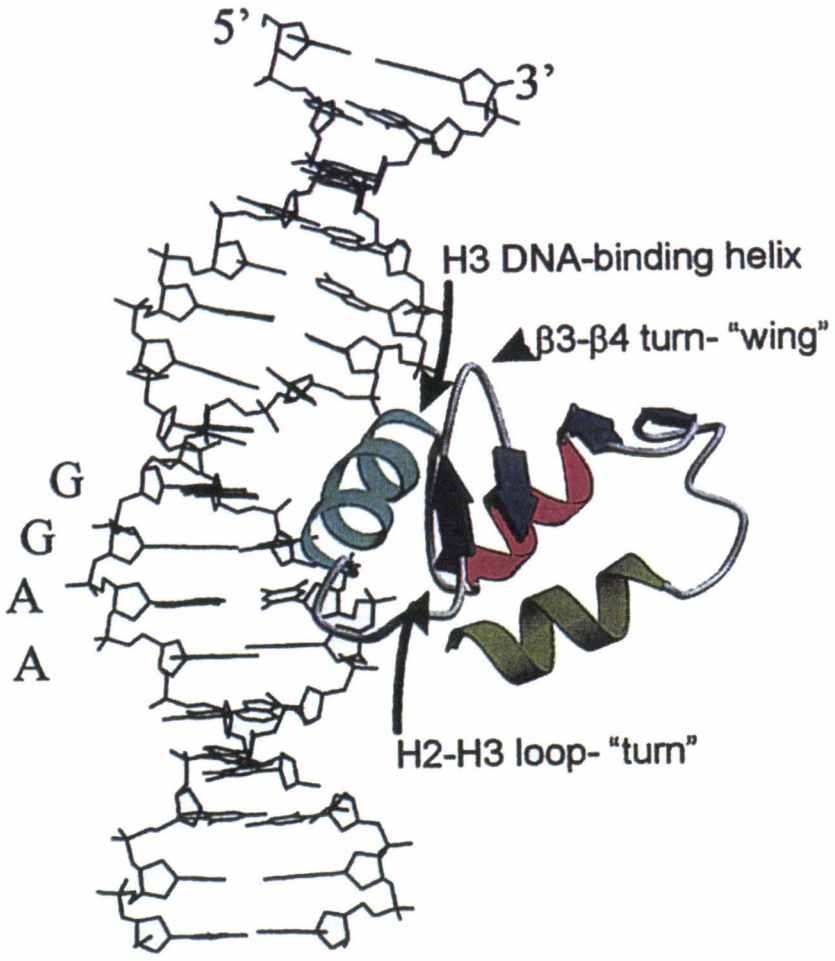


Figure 2 : Représentation du domaine de liaison à l'ADN du facteur ETS-1 fixé à l'ADN. Les 3 hélices et les 4 feuillets définis par l'étude de la structure secondaire sont représentés par des structures colorées. Le motif consensus de fixation à l'ADN est indiqué à gauche de la figure. Les 3 points de contact sont signalés par des flèches. D'après Sharrocks et al, 2001 [272].

3) Fonctions biologiques

La majorité des protéines ETS sont des activateurs transcriptionnels possédant un ou plusieurs domaines transactivateurs (TAD). Certains sont des répresseurs transcriptionnels comme TEL, YAN, NET, ERF, METS et FEV (pour revue [199, 234]). Les facteurs de transcription ETS s'expriment dans de nombreux tissus où ils peuvent réguler un nombre important de gènes cibles (pour revue [234]). Les résultats des approches de recombinaison homologue ou de transgénèse ont montré leur implication dans divers processus cellulaires tels que la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation hématopoïétique et neuronale, l'angiogenèse, la migration ou l'apoptose (pour revues [11, 234]).

Groupe	Gène	Phénotype	Anomalies observées	Références
PEA3	*pea3*	Viable, les mâles sont stériles	Dysfonctionnement de l'éjaculation	[172]
	erm	Viable, les mâles deviennent stériles	Perturbation de la spermatogenèse	[35]
	er81	Létalité post-natale, à 3-5 semaines	Perte des connexions synaptiques entre les proprioréceptors et les motoneurones	[2]
ETS	*ets 1*	Viable et fertile, 50% de mortalité néonatale	Réduction du nombre de cellules T et B et accroissement de l'apoptose de ces cellules, problème d'activation du récepteur des lymphocytes T	[20] ; [219]
	ets-2	Létalité embryonnaire (< E8,5)	Malformation de l'ectoplacenta, perte de migration du trophoblaste, pas de formation d'amnios et du chorion	[327]
ERG	*fli-1*	Létalité embryonnaire (< E12,5)	Hémorragies au niveau céphalique, réduction du nombre de cellules progénitrices érythroïdiennes, perturbation de l'hématopoïèse fœtale	[106] ; [281]
	pet-1 (fev)	Viable et fertile	Blocage de la différenciation du système central à neurotransmission sérotonergique, comportement agressif	[113]
ELK	*elk-1*	Viable	ND	[30]
	net	Létalité post-natale (1-6 semaines)	Défaillance respiratoire, chylothorax congénital, dilatation des vaisseaux lymphatiques	[3]
	elk-4	Viable	Défaut dans la sélection positive des thymocytes	[45]
ELF	*elf-1*	Viable	ND	[168]
	elf-4	Viable	Réduction du nombre de cellules NK-T et NK	[167]
GABP	*gabp*	Létalité embryonnaire (< E7,5)	Pas d'obtention de blastocystes	[255]
SP1	*pu1*	Létalité embryonnaire (E17,5-18,5) ou post-natale (24-48h) selon la souche de souris	Blocage de la maturation érythrocytaire, défaut de la lignée lymphoïde et de la lignée myéloïde	[135] ; [201]; [267] ; [266]
	spiB	Viable	Défaut dans la signalisation des récepteurs des lymphocytes B	[285]
TEL	*tel*	Létalité embryonnaire (E 10,5-11,5)	Echec de la formation et du maintien des vaisseaux vitellins. Apoptose des cellules mésenchymateuses et des cellules neurales	[313]
ESE	*elf-5*	Létalité embryonnaire (<E7,5)	Chez les souris hétérozygotes, un arrêt du développement de l'épithélium alvéolaire de la glande mammaire pendant la grossesse et la lactation a été observé	[343]

Tableau 1 : Phénotype obtenu suite à l'inactivation des membres de la famille ETS.
ND : non déterminé.

Actuellement, le rôle de 17 gènes de la famille ETS a été étudié suite à l'invalidation par recombinaison homologue. L'inactivation de certains gènes *ets* entraîne une létalité précoce ce qui montre le rôle essentiel de protéines ETS dans le développement embryonnaire. Le tableau 1 présente l'ensemble des phénotypes obtenus et des anomalies de développement observées.

4) Implication dans les cancers

Les membres de la famille ETS sont impliqués dans de nombreux cancers (tableau 2). Chez l'Homme, les gènes *ets* ont souvent des profils d'expression modifiés dans des leucémies et des tumeurs solides. Ils y sont fréquemment surexprimés, phénomène souvent associé à un mauvais pronostic de survie (pour revue [270]). Dans quelques cas particuliers, la surexpression d'un gène *ets* est causée par une intégration provirale. Ainsi, le gène *fli-1* est activé par intégration du provirus F-MuLV (Friend murine leukemia virus) près de son locus dans les érythroleucémies induites par ce virus et par d'autres provirus dans les leucémies non–erythroides (pour revue [300]). Dans les tumeurs, de nombreuses études ont également montré une co-surexpression de facteurs de transcription ETS et de certaines métalloprotéases, enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire favorisant le processus métastatique (pour revues [234, 270]). Les protéines ETS pourraient donc contribuer à l'oncogenèse en favorisant les processus métastatiques et angiogéniques. Il faut noter que des gènes codant des protéases ou des facteurs angiogéniques sont retrouvés parmi leurs cibles potentielles (pour revue [270]).

L'implication des gènes *ets* dans les cancers est également liée à des phénomènes de réarrangement chromosomique. En effet, quelques membres de la famille ETS sont fusionnés à divers partenaires suite à une translocation chromosomique et les protéines de fusion ainsi générées participent au processus de cancérisation (tableau 2). Les translocations impliquant les gènes *erg* et *er81* sont retrouvées dans certains cancers de la prostate et les tumeurs d'Ewing. Dans la prostate, ces gènes sont activés suite à un réarrangement avec le gène *tmprss2*. Ils deviennent alors dépendants des androgènes et sont ainsi un des marqueurs des cancers de la prostate [297]. Les tumeurs d'Ewing (tumeurs osseuses non différenciées de l'enfant) sont caractérisées par une translocation chromosomique entraînant la fusion du gène *ews* et d'un gène *ets* (dans 95% des cas, il s'agit de *erg* ou *fli-1* ; dans 5% des cas, il s'agit de *er81*, *fev* ou *pea3*) (pour revue [143]). Ces translocations génèrent des protéines de fusion possédant le domaine transactivateur de la protéine EWS (protéine liant l'ARN) et le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription ETS. Il en résulte alors une activation forte des gènes cibles des

Groupe	Membres	Cancer	Anomalies
ETS	ETS1	Thyroïde, côlon, sein, utérus, endomètre, peau, système vasculaire, gastrique, prostate, pancréas, ovaire, cerveau, os/cartilage, foie, poumon, tissu lymphoïde, thymus	Surexpression
	ETS2	Poumon, sein, oesophage, foie, côlon, thyroïde, prostate, utérus	Surexpression
ERG	FLI-1	Tumeurs d'Ewing Leucémie, prostate	Translocation Surexpression
	ERG	Tumeurs d'Ewing, Leucémie, prostate, utérus, ovaire	Translocation Surexpression
PEA3	PEA3	Tumeurs d'Ewing Sein, poumon, ovaire, utérus, côlon, foie	Translocation Surexpression
	ERM	Tumeurs d'Ewing Sein, endomètre	Translocation Surexpression
	ER81	Tumeurs d'Ewing, prostate	Translocation
ELF	ELF-1	Leucémie, prostate, endomètre, ovaire	Surexpression
	NERF-1/-2	Leucémie	Surexpression
	MEF	Leucémie	Surexpression
TEL	TEL	Leucémie, sein	Translocation
Spi	PU-1	Leucémie	Mutation ponctuelle
	SPIB	Leucémie	Surexpression
Autres	FEV	Tumeurs d'Ewing	Translocation
	PDEF	Sein, prostate	Surexpression
	ESX	Sein	Surexpression

Tableau 2 : Implication des facteurs ETS dans différents types de tumeurs.
D'après la revue de Seth et al, 2005 [270].

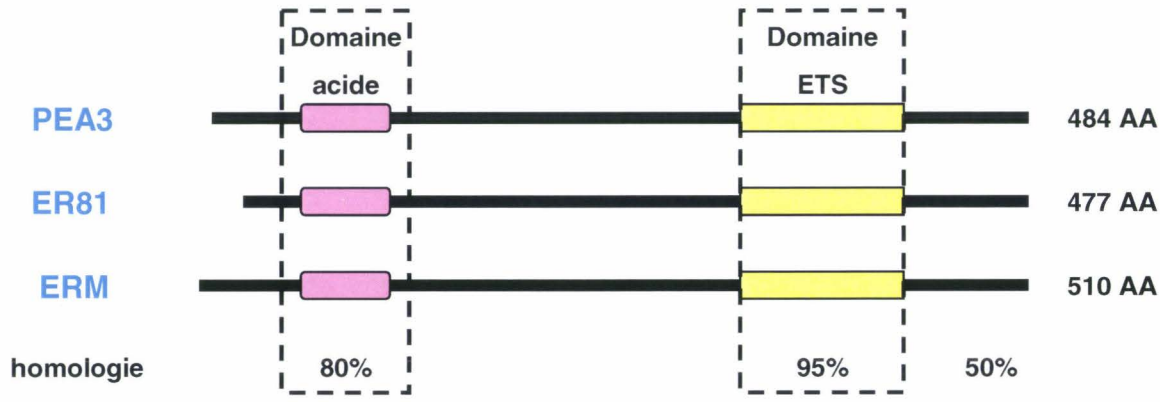


Figure 3 : Représentation des domaines conservés entre les membres du groupe PEA3.
Les pourcentages d'homologie et le nombre d'AA indiqués sont donnés pour les protéines humaines.

protéines ETS car ces protéines de fusion sont de meilleurs activateurs transcriptionnels que les facteurs ETS dont elles sont issues. Les fusions EWS-ETS ont un pouvoir transformant et transactivent des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la prolifération ou encore l'apoptose (pour revue [143]). Parmi les facteurs de transcription ETS, le gène *tel* est également fréquemment impliqué dans des translocations chromosomiques. Il se trouve alors en phase avec de nombreux gènes codant des protéines à activité tyrosine kinase comme le PDGFRβ , c-abl ou Jak-2. L'induction de l'activité kinase qui résulte de la fusion participe alors à la transformation des cellules [104, 169, 278].

Enfin, en marge des phénomènes de surexpression et de translocation chromosomique, des mutations ponctuelles affectant certains gènes *ets* ont été mis en évidence dans certains cancers. Ainsi, la mutation du gène *pu-1* a été décrite chez des patients atteints de leucémie myéloïde aiguë. Les mutations générées sont retrouvées principalement dans le domaine ETS et la protéine mutée ne peut ni transactiver ses gènes cibles ni interagir avec ses protéines partenaires [214].

B. Le groupe PEA3

1) Les trois membres du groupe PEA3

Le groupe PEA3 comporte trois protéines apparentées : PEA3 (E1AF ou ETV4), ERM (ETV5) et ER81 (ETV1). Chez l'Homme, ETV1 présente deux isoformes (α et β) qui résultent d'un épissage alternatif [47]. Ces protéines d'environ 500 AA sont des activateurs transcriptionnels et se caractérisent par leur domaine ETS et par un domaine riche en acides aminés acides, appelé domaine acide (fig. 3). Ces protéines présentent 95% d'identité de séquence dans le domaine ETS. Le domaine acide situé en position N-terminale est conservé à plus de 80% et la région C-terminale, située en aval du domaine ETS, présente plus de 50% d'identité (fig. 3, [57]).

Les trois membres du groupe ont été caractérisés chez plusieurs espèces et en particulier chez l'Homme, la souris et le poisson zèbre. Les études phylogénétiques indiquent que les gènes codant ERM et ER81 sont très proches alors que celui codant PEA3 est plus divergent [56]. Chez l'Homme et la souris, les gènes *erm*, *er81* et *pea3* sont constitués de 13 à 14 exons et s'étendent sur environ 15 kb d'ADN génomique [46, 207, 208]. Dans le génome humain, *erm* est situé sur le chromosome 3 en position q27-29, *pea3* sur le chromosome 17 en q21, et *er81* sur le chromosome 7 en position p21 (pour revue [57]).

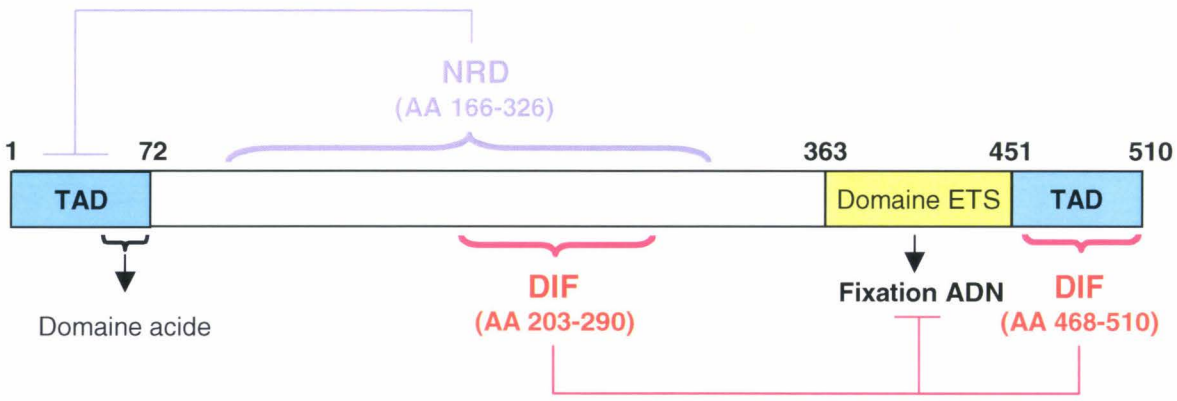


Figure 4 : Domaines fonctionnels de la protéine ERM.
TAD : domaine transactivateur. Domaine ETS : domaine de fixation à l'ADN. DIF : domaine inhibant la fixation à l'ADN. NRD (negative regulatory domain) : domaine réprimant l'activité du domaine transactivateur N-terminal.

2) Les domaines fonctionnels

Le premier domaine fonctionnel caractérisé est le domaine ETS, situé dans la partie C-terminale des protéines du groupe PEA3. Il a été montré que la protéine ERM a une affinité pour l'ADN inférieure à celle du domaine ETS seul [207]. Cette différence s'explique par la présence de deux domaines inhibiteurs de la fixation à l'ADN (DIF) qui jouxtent le domaine ETS (fig. 4, [171]). Un phénomène de même type a également été observé pour PEA3 chez la souris et le poisson zèbre [19, 96]. Toutefois, le mécanisme d'inhibition précis mis en jeu reste inconnu. L'interaction avec un partenaire protéique pourrait contribuer à la levée de l'inhibition de la fixation à l'ADN. Ainsi, l'interaction de PEA3 avec USF1 favorise l'affinité de PEA3 pour l'ADN [19]. Ce type d'inhibition n'est pas spécifique aux membres du groupe PEA3 et se retrouve également pour d'autres protéines ETS. En particulier, la fixation de ETS-1 à l'ADN est inhibée par deux régions flanquant le domaine ETS et cette inhibition s'explique par une coopération intramoléculaire de ces régions structurées en hélices α (pour revue [95]).

ERM possède deux domaines de transactivation (TAD) : le domaine N-terminal comprenant le domaine acide et la région C-terminale (fig. 4). Le domaine N-terminal est le principal domaine transactivateur et il possède une très forte activité transcriptionnelle dans le système hétérologue Gal4 [171]. Des observations similaires ont été faites pour ER81 [139]. PEA3 possède également un TAD dans la région N-terminale mais sa région C-terminale ne semble pas posséder d'activité transactivatrice [19].

Comme pour la fixation à l'ADN, l'activité du TAD est aussi régulée par des domaines internes. Ainsi, l'activité du TAD N-terminal de ERM semble être inhibée par un large domaine (NRD, negative regulatory domain, [222]) situé entre le domaine acide et le domaine ETS (fig. 4). Un phénomène similaire a également été observé pour ER81 [139]. Dans le cas de PEA3, le domaine acide est flanqué de deux régions régulant négativement et indépendamment son activité transactivatrice [19]. Le mécanisme de répression mis en jeu n'est connu pour aucun membre du groupe PEA3. Toutefois, la coopération avec le facteur de transcription c-Jun lève la régulation négative induite par le domaine interne d'ERM [222].

3) L'expression

a) Sites d'expression

Lors de l'embryogenèse chez la souris, les membres du groupe PEA3 s'expriment dans les organes se développant par des interactions épithélio-mésenchymateuses comme les poumons ou la glande mammaire. Dans ces organes, *erm* est transcrit dans l'épithélium, *er81* dans le mésenchyme alors que *pea3* s'exprime dans les deux compartiments [41, 188].

Chez l'adulte, les gènes codant les membres du groupe PEA3 sont co-exprimés dans de nombreux tissus et organes. L'analyse de leur expression par Northern-blot a révélé qu'*erm* et *er81* s'expriment de manière plutôt ubiquiste alors que *pea3* s'exprime principalement dans l'épididyme, le cerveau et plus faiblement dans le rein ou la glande mammaire (pour revues [56, 165]).

Suite aux observations faites sur les phénotypes obtenus par l'invalidation des gènes codant les membres du groupe PEA3, des études d'expression plus fines ont été menées au niveau neuronal et au niveau des organes génitaux. Les différents territoires d'expression sont présentés dans le tableau 3.

Cellules ou organes	Expression des transcrits	Références
Motoneurones	*er81, pea3*	[183]
Corpuscules de Pacini	*er81, pea3*	[268]
Zone ventriculaire du néocortex	*er81, pea3, erm*	[107]
Cellule de Schwann	*er81, erm*	[241]
Neurones pyramidaux	*er81*	[338]
Cellules pluripotentes de la crête neurale	*erm*	[240]
Tête de l'épididyme	*erm, er81, pea3*	[127], [328]
Cellules de Sertoli	*erm*	[35]
Stroma utérin	*erm, er81, pea3*	[158]

Tableau 3 : Profil d'expression des membres du groupe PEA3 au niveau neuronal et génital.

b) Régulation de leur expression

(i) Voie FGF

Chez l'embryon de poulet, l'expression de *erm* et *pea3* dans le mésenchyme « nasal » est dépendante de signaux ectodermiques et le facteur de croissance FGF8 (fibroblast growth factor) est suffisant pour induire leur expression [75]. De même, dans le sclérotome, la voie de signalisation du FGF8 est capable d'activer l'expression des gènes *pea3* et *erm* dans les cellules progénitrices des tendons somitiques [24]. Des régulations d'expression des gènes codant les membres du groupe PEA3 par la voie FGF ont aussi été mises en évidence chez d'autres espèces comme le poisson zèbre ou la souris [188, 260]. Cette régulation pourrait être importante pour les transitions épithélio-mésenchymateuses dans lesquelles les facteurs de transcription du groupe PEA3 sont impliqués.

Très récemment, une stimulation d'*erm* par le FGF2 a été mise en évidence dans les cellules de Sertoli de souris. L'effet du FGF2 est partiellement médié par les voies MAPK et PI3K [277] et pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la spermatogenèse dépendante d'ERM.

(ii) Voie GDNF/HGF

Le GDNF (glial derived neurotrophic factor) joue un rôle déterminant pour l'expression de PEA3. En effet, dans les souris *gdnf* $^{-/-}$, l'expression de *pea3* disparaît dans la plupart des motoneurones (MN) [101 , 190]. Dans un premier temps, le GDNF induit l'expression de *pea3* dans les MN en position caudale. Puis sous l'influence du HGF (Hepatocyte Growth Factor), l'expression de *pea3* est induite dans les MN situés en position rostrale [112]. GDNF et HGF sont donc des facteurs sécrétés en périphérie du trajet des axones qui régulent, dans certains MN, l'expression de *pea3* contrôlant ainsi l'expression des gènes responsables de la position des corps cellulaires et du trajet des axones (fig. 5).

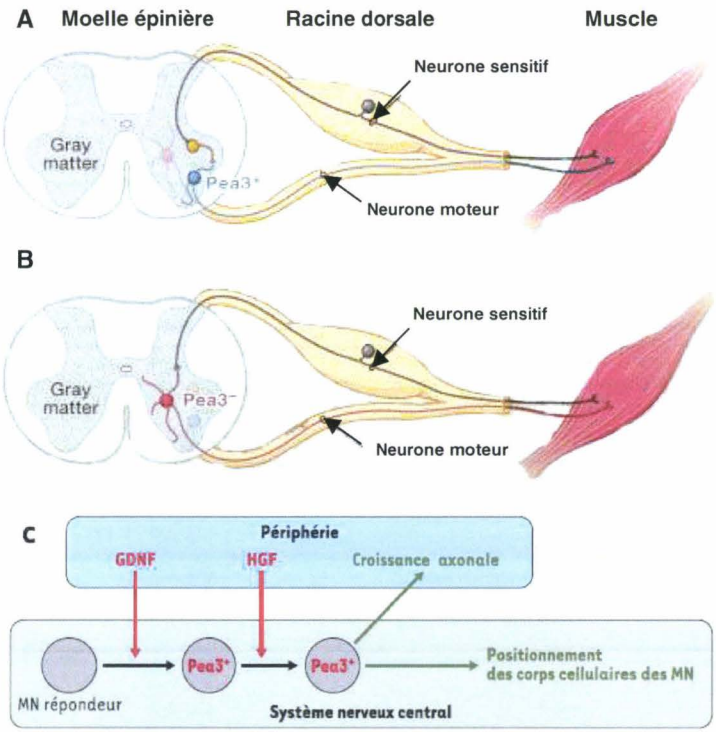


Figure 5 : Intervention du GDNF et de l'HGF dans la différenciation des motoneurones. Le GDNF puis le HGF, synthétisés à la périphérie, contrôlent la différenciation d'une sous-population de MN en contrôlant l'expression de PEA3. Schémas montrant le positionnement des corps cellulaires des MN à 12,5 jours du développement embryonnaire dans un embryon sauvage (A) et dans un embryon mutant pour GDNF ou PEA3 (B). L'absence du signal GDNF ou PEA3 entraîne le mauvais positionnement des MN qui auraient exprimé PEA3 ainsi qu'une arborisation axonale déficiente. (C) Schéma résumant le rôle de GDNF et de HGF dans la différenciation des groupes de MN via l'expression de PEA3. D'après Chauvet et al, 2004 [34] et Vrieseling et al, 2006 [310].

(iii) Autres voies de régulation

Une étude menée chez la souris dans des cellules T helper (Th) a montré qu'*erm* est induit par l'interleukine IL12 via une voie STAT4 dépendante. Par contre, l'expression des autres membres du groupe PEA3 n'est pas affectée par cette cytokine [236]. Les voies de signalisation induites par les cytokines et affectant l'expression de *erm* ne sont pas connues.

Catégorie	Gène cible	Activé par	Références
Enzymes de remodelage de la matrice extracellulaire	*collagénase type I (mmp1)*	PEA3	[21, 120]
	collagénase type IV (mmp9)	PEA3	[48, 120]
	stromélysine (mmp3)	PEA3, ER81	[120]
	matrilysine (mmp7)	PEA3, ERM, ER81	[49]
	mmp14	PEA3	[48]
	uPA	ER81	[226]
	héparanase	PEA3, ER81	[193]
	mt1-mmp	PEA3	[102]
Molécule d'adhérence et cytosquelette	*icam1*	ERM, PEA3, ER81	[55]
	ostéopontine	PEA3, ERM	[72]
	vimentine	PEA3	[37]
	muc4	PEA3	[73, 247]
	cavéoline1	PEA3, ERM	[152, 153]
Prolifération cellulaire	*htert*	PEA3, ERM, ER81	[93]
	p21waf1	PEA3	[78]
	cycline D3	PEA3, ERM, ER81	[145]
	neu / erbB2	PEA3	[73, 197, 325]
Apoptose	*bax*	PEA3, ERM, ER81	[74]
Angiogenèse	*cyclooxygénase*	PEA3, ERM, ER81	[125, 189]
	il8	PEA3	[111]
Protéine d'une voie de signalisation	*Smad7*	ER81	[68]
Glycoprotéine membranaire	*β1,4-galactosyltransférase I*	PEA3, ERM, ER81	[345]
Sécrétoglobine	*Mammaglobine*	PEA3	[115]
Récepteur à activité tyrosine kinase	*Récepteur TGF-β type II*	PEA3	[159]
Facteur de transcription	*wt1*	PEA3	[67]
	ets-1	PEA3	[36]
	e1af	PEA3	[133]
	zhx1	PEA3	[275]
	twist	PEA3, ERM, ER81	[126]
Protéine membranaire à activité enzymatique	*presenilin1*	ER81	[243]

Tableau 4 : Gènes cibles connus des membres du groupe PEA3.
Seuls les membres du groupe PEA3 testés sont indiqués. Dans le cas de *muc4* (en rose), tous les membres du groupe PEA3 ont été testés mais seul PEA3 est capable de transactiver ce gène.

L'implication des voies de MAPkinases est cependant probable car une de ces voies a déjà été impliquée dans la régulation de l'expression d'*erm*. Ainsi, dans une lignée cellulaire de myélome dépendant d'IL6 (ANBL-6), la surexpression d'une forme de Ras constitutivement activée conduit à une très forte surexpression d'*erm* [50]. D'autres voies de kinases peuvent aussi moduler l'expression de ce gène. En effet, dans la lignée lymphoblastique Molt4, un traitement PMA (phorbol myristate acétate) induit une augmentation du taux d'ARNm codant ERM. Cette régulation implique la voie PKC mais les facteurs de transcription cibles impliqués dans la régulation du promoteur du gène *erm* n'ont pas été déterminés [301].

Il existe d'autres voies de régulation de l'expression des membres du groupe PEA3. Ainsi, l'expression du gène *erm* est induite lors de l'apoptose dépendante des céramides dans la lignée neuronale PC12 [58]. Plus récemment, il a été montré que l'expression du gène *er81* est induite par les androgènes dans une lignée de cellules prostatiques dépendantes des androgènes (LNCaP) [26]. De manière intéressante, dans des lignées prostatiques androgéno-indépendantes, l'expression de *er81* est très élevée et non inductible par les androgènes suggérant qu'il existe d'autres mécanismes de régulation transcriptionnelle [26].

L'expression des membres du groupe PEA3 est régulée par les facteurs de croissance ou les cytokines. Toutefois, dans la plupart des cas, les acteurs des voies de signalisation mis en jeu ne sont pas connus et les facteurs de transcription cibles n'ont pas été identifiés. Par ailleurs, les études d'expression ont souvent été réalisées pour une seule des protéines du groupe PEA3 et il est impossible de savoir si les mécanismes de régulation sont spécifiques ou non à une protéine définie.

4) Les gènes cibles

Une liste des gènes cibles des membres du groupe PEA3 est reprise dans le tableau 4. Dans tous les cas, l'identification de ces gènes cibles est liée à la surexpression d'une ou plusieurs protéines du groupe PEA3. L'efficacité des trois facteurs de transcription a rarement été comparée sur un même gène cible. A ce jour, la seule étude qui ait montré une différence nette entre ces trois membres est celle portant sur la régulation du gène *muc4*. Ce gène est activé par PEA3 et non par les autres membres du groupe dans la lignée épithéliale mammaire murine HC11 [247] ou dans des lignées cancéreuses pancréatiques CAPAN [73]. Cet exemple montre qu'un facteur de transcription du groupe PEA3 peut avoir des gènes cibles spécifiques.

Les protéines du groupe PEA3 régulent de nombreux gènes impliqués dans diverses fonctions cellulaires comme la prolifération cellulaire, l'apoptose ou l'angiogenèse. En outre,

parmi ceux-ci, beaucoup codent des protéines impliquées dans la tumorigenèse et le processus métastatique (pour revue [57]). Toutefois, comme ils ont été identifiés dans des expériences menées en surexprimant des membres du groupe PEA3, la relevance physiologique de ces régulations reste à certifier.

5) Les fonctions biologiques normales

Afin de déterminer les fonctions des membres du groupe PEA3, la recombinaison homologue de chaque membre a été réalisée.

a) ER81

Les souris *er81* $^{-/-}$ présentent de graves dysfonctionnements moteurs s'expliquant par un défaut de connexions monosynaptiques entre les neurones afférents et les motoneurones de la moelle épinière ventrale [2]. En parallèle, la perte de fonction d'*er81* conduit à un défaut de développement et de fonctionnement des fibres musculaires. Ces défauts apparaissent dès les premiers jours suivant la naissance et entraînent la mort des animaux homozygotes dans un délai maximal de 5 semaines [2]. Par ailleurs, ER81 est essentiel à la formation d'un mécanorécepteur, le corpuscule de Pacini. En effet, les souris *er81* $^{-/-}$ n'en possèdent pas et présentent également une déficience des neurones de la racine dorsale de la moelle épinière [268]. Ces résultats soulignent l'importance d'ER81 pour la mise en place du système nerveux central. Compte tenu du fait que PEA3 s'exprime avec ER81 dans certains neurones, il pourrait exister une certaine forme de redondance fonctionnelle entre ces protéines dans ce modèle. Toutefois, la sévérité du phénotype indique que cette compensation, si elle existe, ne pourrait être que très partielle et qu'ER81 doit être un régulateur transcriptionnel spécifique de certains gènes nécessaires à la mise en place de connexions synaptiques.

b) PEA3

Contrairement aux souris *er81* $^{-/-}$, les souris *pea3* $^{-/-}$ n'ont pas de phénotype morbide. Les mâles sont stériles alors que la spermatogenèse et la spermiogenèse des animaux homozygotes apparaissent normales et les spermatozoïdes sont capables de féconder des ovules *in vitro*. Le phénotype est lié à un probable dysfonctionnement éjaculatoire dont l'origine pourrait être nerveuse [172]. En outre, les souris *pea3* $^{-/-}$ présentent une réduction du nombre de motoneurones dans la région ventrale de la moelle épinière. Contrairement à ER81, la perte d'expression de PEA3 n'engendre aucun défaut au niveau des neurones sensitifs ou de leurs afférences [170]. L'expression de *pea3* dans deux types de neurones est cependant essentielle pour le contrôle de la mise en place de leurs dendrites et de leurs connexions synaptiques [310]. Il est donc possible que le phénotype de stérilité mâle

observé chez ces souris soit lié à une défaillance des connexions synaptiques entre les motoneurones et les muscles responsables de l'éjaculation.

c) ERM

L'inactivation d'*erm* engendre aussi des défauts de la fonction reproductrice. Les souris *erm* $^{-/-}$ sont viables mais les mâles deviennent stériles. La taille des testicules de ces animaux est réduite. Cette stérilité est due à une déficience des cellules de Sertoli qui sont les seules cellules du testicule à exprimer le facteur ERM [35]. Elles présentent des défauts de sécrétion à l'origine du non-renouvellement des spermatogonies souches. Ce défaut de renouvellement provoque une disparition progressive des spermatogonies et aboutit à l'absence de spermatogenèse [35]. Néanmoins, les mécanismes moléculaires fins impliqués et le rôle précis du facteur ERM ne sont pas encore élucidés.

6) Implication dans les cancers

Très tôt, de nombreuses observations ont conduit à l'émergence d'un rôle des protéines du groupe PEA3 dans le cancer mammaire et principalement dans le processus invasif. Par la suite, plusieurs études ont montré que ces facteurs de transcription sont impliqués dans de nombreux autres cancers.

a) Surexpression dans les cancers

(i) Données de surexpression

Dès 1993, il a été montré que PEA3 est surexprimée dans les tumeurs mammaires murines induites par les oncogènes *neu* ou *ras* [299]. En fait, les tumeurs épithéliales mammaires induites par l'oncogène *neu* surexpriment les trois protéines du groupe PEA3 [273]. Chez des souris surexprimant Neu, l'expression d'un dominant négatif de ces facteurs de transcription ralentit significativement l'apparition des tumeurs qui sont également plus petites et moins nombreuses [273]. Cependant, la proportion de souris présentant des métastases pulmonaires n'est pas affectée par l'expression de ce dominant négatif [273]. Cette étude suggère que PEA3 est requise pour la tumorigenèse mammaire induite par *neu* mais ne serait peut être pas suffisante pour induire un phénotype invasif. Chez l'Homme, de nombreuses études ont démontré la corrélation d'expression entre les gènes *her2/neu* et *pea3*. Ainsi une augmentation du taux d'ARNm de *pea3* est retrouvée dans 93% des tumeurs mammaires surexprimant HER2/Neu [12] et PEA3 est un régulateur transcriptionnel de ce gène [73, 197, 325]. Enfin une étude sur la comparaison entre tissu mammaire normal et tumoral a montré une augmentation de l'expression de nombreux facteurs de transcription ETS mais surtout une très forte surexpression des trois membres du groupe PEA3 dans les tumeurs [79]. Les facteurs de transcription du groupe PEA3 sont également surexprimés dans des cancers autres que mammaire. Ceux-ci sont présentés dans le tableau 5.

Cancer	Facteur	Observations	Références
Sein	Surexpression PEA3	Induction du phénotype invasif	[154]
Squameux du tractus oral	Surexpression PEA3 Sous-expression PEA3	Surexpression de *mmp1* et *9* Diminution du potentiel invasif	[117]
Fibrosarcome	Surexpression PEA3	Induction de *mt1-mmp* Augmentation du pouvoir invasif	[102]
Tumeur lymphoproliférative	Surexpression ERM	ND	[160]
Colorectal	Surexpression PEA3	Surexpression *cox2* et *mmp7*	[17]
	Surexpression PEA3	Surexpression de *mmp1, 7, 9, cox* et *inos*	[230]
	Sous-expression PEA3	Diminution du potentiel invasif	[213]
Poumon	Surexpression PEA3	Induction de *galT1* Augmentation du pouvoir invasif	[345]
Prostate	Sous-expression ER81	Diminution du pouvoir invasif	[26]
Endomètre	Surexpression ERM	Activation de *mmp2* Augmentation du pouvoir invasif	[206]
Ovaire	Surexpression PEA3	Activation des *mmp9* et 14	[48]

Tableau 5 : Corrélations et données fonctionnelles impliquant les facteurs du groupe PEA3 dans les cancers.
Les corrélations sont surlignées en vert. Les expériences menées dans des lignées cancéreuses sont en rose. ND : non déterminé.

(ii) Relation avec la métastase

Les facteurs de transcription du groupe PEA3 sont donc surexprimés dans différentes tumeurs et de nombreuses études ont mis en avant leur relation avec le processus invasif. Ainsi, les tumeurs mammaires invasives induites par *neu* ou *ras* engendrent des métastases pulmonaires caractérisées par une surexpression des membres du groupe PEA3 [299]. Notre équipe a également montré que des lignées cancéreuses mammaires humaines et plus particulièrement celles à fort potentiel métastatique surexpriment ces facteurs de transcription [7], observations récemment confirmées par un autre groupe [14].

Dans différentes lignées cellulaires cancéreuses, des expériences de modulation d'expression des membres du groupe PEA3 ont montré leur implication dans le phénotype invasif. Des corrélations d'expression entre les protéines du groupe PEA3 et des gènes cibles impliqués dans le processus métastatique ont également été établies. Les diverses observations réalisées sont présentées dans le tableau 5. Il est intéressant de noter que d'autres gènes cibles des membres du groupe PEA3 (tableau 4) sont eux-mêmes souvent impliqués dans le processus métastatique. En outre, des facteurs angiogéniques comme le bFGF ou certaines intégrines voient leur expression corrélée positivement avec celle de *pea3* dans les cancers du sein [53, 54]. Ces données montrent une relation nette entre l'expression des protéines du groupe PEA3 et la métastase.

(iii) Valeur pronostique

En liaison probable avec le rôle des facteurs de transcription du groupe PEA3 dans les processus métastatiques, la surexpression de ceux-ci est associée à une mauvaise valeur pronostique dans certains cancers. La co-expression de *pea3* et de *her2/neu* est associée à une augmentation significative du taux de récidive du cancer du sein comparée à la seule expression de *her2/neu* [220]. Une étude menée sur 364 patientes atteintes d'un cancer du sein a révélé que plus l'expression de ERM est importante, plus les chances de survie diminuent ([43] , fig. 6). En outre, l'expression de PEA3 est un marqueur de mauvais pronostic dans les cancers ovariens [53]. Par contre, dans une étude sur le cancer du sein, la comparaison de l'expression de *pea3* entre tissus normal et cancéreux indique que cette protéine est un facteur d'agressivité mais aucune corrélation entre l'expression de *pea3* et les chances de survie et de récidive du cancer n'a été retrouvée [14].

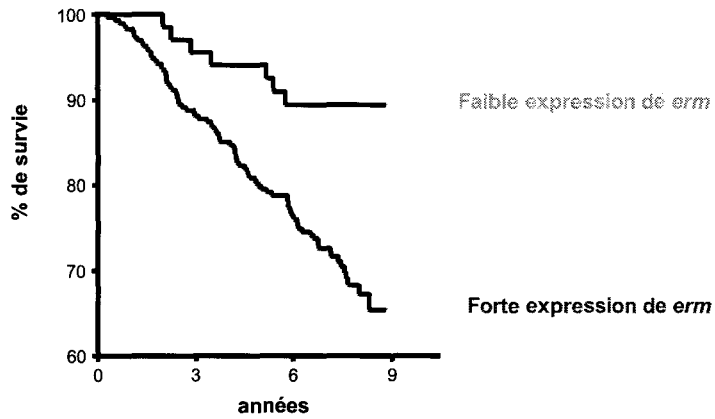


Figure 6 : Taux de survie de patientes atteintes d'un cancer du sein en fonction du niveau d'expression d'ERM.
D'après Chotteau-Lelièvre et al, 2004 [43].

(iv) Les membres du groupe PEA3 ne sont pas des oncogènes

Les protéines du groupe PEA3 étant souvent surexprimées dans les cancers, des travaux ont été réalisés afin de déterminer si elles pouvaient induire le processus de cancérisation. Au niveau cellulaire, ces facteurs de transcription ont été surexprimés de façon ectopique dans des cellules mammaires murines normales. Suite à la surexpression de membres du groupe PEA3, ces cellules présentent non seulement la capacité de faire de la morphogenèse de branchement spontanée mais aussi une capacité accrue d'invasion *in vitro* [42]. Toutefois, aucune donnée n'est disponible quant à leur phénotype dans un modèle animal. Ces gènes ne peuvent cependant pas être considérés comme des oncogènes. En effet, la surexpression de ER81 dans la glande mammaire normale n'entraîne pas chez les souris transgéniques un phénotype cancéreux, malgré l'induction de certains gènes cibles comme *uPA* ou *stromélysine* [226]. Les membres du groupe PEA3, s'ils ne sont pas des

oncogènes, peuvent toutefois être considérés comme des relais d'autres oncogènes pour favoriser l'invasion.

b) Translocations chromosomiques

En marge des phénomènes de surexpression, certains membres du groupe PEA3 sont aussi impliqués dans différents cancers suite à des translocations chromosomiques. Ainsi, dans les tumeurs d'Ewing, PEA3 et ER81 ont été identifiées à raison d'une prévalence de 1% chacun dans les fusions chromosomiques à l'origine de ces tumeurs. Dans le cas de certains cancers de la prostate, une translocation chromosomique fusionne la région 5' non codante de TMPRSS2 à l'exon 4 de ETV1 [297]. TMPRSS2 est une sérine protéase de la surface cellulaire spécifique de la prostate et répondant aux androgènes. Suite à la fusion, ETV1 devient donc dépendant d'un promoteur répondant aux androgènes et est surexprimé. Récemment, une fusion entre TMPRSS2 et PEA3 a aussi été mise en évidence et ces translocations chromosomiques pourraient être un événement initiateur des cancers de la prostate [298]. Dans les deux cas, aucune protéine de fusion n'a été décrite [297, 298]. Il est néanmoins intéressant de remarquer que le point de cassure de la translocation suggère fortement que la protéine du groupe PEA3 potentiellement générée est tronquée de son domaine transactivateur N-terminal et qu'elle pourrait alors se comporter comme un dominant négatif des membres du groupe PEA3.

7) Modulation de l'activité des membres du groupe PEA3

Les facteurs de transcription du groupe PEA3 sont des activateurs transcriptionnels exprimés dans de nombreux tissus et régulant des gènes impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires. Leur activité doit être finement régulée soit par contrôle de leur niveau d'expression soit directement au niveau de leur activité transcriptionnelle. Sur divers promoteurs, l'activité des membres du groupe PEA3 est relativement faible. Pour assurer leur fonction, ces facteurs de transcription ont donc besoin d'être activés. Cette régulation de leur activité est principalement liée à leur capacité d'interaction avec des partenaires protéiques et à des modifications post-traductionnelles.

a) Interaction protéine-protéine

Les membres du groupe PEA3 interagissent avec d'autres facteurs de transcription pour moduler spécifiquement certains de leurs gènes cibles. Dans la majorité des cas, ces interactions visent à augmenter la transcription médiée par ces protéines. Ainsi, ERM coopère avec c-Jun sur un élément de réponse EBS/CRE et cette coopération requiert le domaine N-terminal de ERM (AA 1-165) [222]. Sur le promoteur de *her2/neu*, une synergie entre PEA3 et c-Jun est importante pour activer ce gène [197]. Cette coopération fonctionnelle nécessite le recrutement du co-activateur p300 par l'un et/ou l'autre des deux

facteurs de transcription. Le même type de coopération est suggéré dans la régulation du gène *il8* codant un facteur angiogénique [129]. Une synergie entre c-Jun et les membres du groupe PEA3 a aussi été observée sur les promoteurs des gènes *matrilysine*, *stromélysine* [49] et *ostéopontine* [72]. Sur ces promoteurs, les protéines du groupe PEA3 coopèrent en outre avec le complexe β-caténine/Lef-1 [49, 72]. Ce type de synergie entre les membres du groupe PEA3 et les facteurs AP1 concerne probablement de nombreux gènes dont les promoteurs présentent des sites EBS/AP1, notamment ceux codant les métalloprotéases.

PEA3 forme un complexe avec le facteur de transcription MEF2 (Myocyte enhancer factor 2) conduisant à une légère augmentation de son activité transcriptionnelle [294]. PEA3 interagit également avec le facteur de transcription USF1 (Upstream Stimulatory Factor 1) ce qui mène à une levée de l'inhibition intramoléculaire exercée sur le domaine ETS et à la fixation coopérative des deux facteurs sur l'ADN. Les domaines de PEA3 impliqués dans cette inhibition intramoléculaire sont en fait les sites d'interaction avec USF1 [96]. Au niveau du promoteur du gène *bax*, l'interaction avec USF1 permet à PEA3 de transactiver le promoteur sans se fixer directement à l'ADN [74]. La protéine LPP (lipoma-preferred partner) potentialise la transactivation induite par PEA3 sur le promoteur du gène *mmp1* [100]. Toutefois, le rôle de LPP dans la régulation des gènes cibles du groupe PEA3 et les voies de signalisation impliquées dans ce recrutement restent à définir.

Il existe des interactions protéiques qui diminuent la capacité transactivatrice des membres du groupe PEA3. Une telle situation a été observée suite à l'interaction entre ERM et le récepteur aux androgènes (AR) sur le promoteur du gène *mmp1* [265]. De même, CHD3, un facteur de remodelage de la chromatine, interagit avec ERM et diminue l'activation induite par ERM du gène *presenilin1* [245]. Dans les cas présentés, les mécanismes mis en jeu ne sont pas connus.

L'activité des trois membres du groupe PEA3 est également liée à leur capacité à interagir avec le co-activateur transcriptionnel CBP/p300. En effet, leur activité transcriptionnelle est accrue suite à l'expression du co-facteur ([189, 239]; JL Baert résultat non publié). Pour ER81, la zone d'interaction avec CBP/p300 a été définie entre les acides aminés 249 et 429 et englobe le domaine ETS [239]. ER81 interagit aussi avec P/CAF, un co-activateur à activité acétyltransférase [88]. ACTR, un membre du groupe des co-activateurs du récepteur aux stéroïdes, possède une activité acétyltransférase qui lui permet aussi d'acétyler ER81. Cette protéine est un co-activateur des trois membres du groupe PEA3 puisqu'elle accroît leur activité transcriptionnelle sur le promoteur *mmp-1* placé en amont d'un gène rapporteur [89].

b) Modifications post-traductionnelles

L'activité d'un facteur de transcription peut être régulée par différentes modifications post-traductionnelles affectant différents résidus comme en témoigne le cas du suppresseur de tumeur p53. L'activité de cette protéine est fortement régulée par différentes voies de modification telles que la phosphorylation, l'acétylation et l'ubiquitination. De manière intéressante, il a été mis en évidence que des interconnexions entre ces modifications sont nécessaires pour la régulation fine de l'activité de p53 (pour revues [25, 336]). Ainsi, en cas de dommages à l'ADN, la phosphorylation de résidus sérine permet de renforcer l'interaction de p53 avec l'acétyltransférase CBP/p300. Cette interaction favorise l'acétylation de la région C-terminale de p53, modification essentielle à son activation transcriptionnelle au niveau des gènes codant les protéines d'arrêt du cycle cellulaire. (pour revues [25, 336]). Enfin, si les dommages à l'ADN sont réparés, p53 est inactivée suite à sa désacétylation nécessaire à son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (pour revues [25, 336]).

(i) La phosphorylation

Les protéines du groupe PEA3 sont des points de convergence pour de multiples voies de signalisation mettant en œuvre différentes kinases (fig. 7).

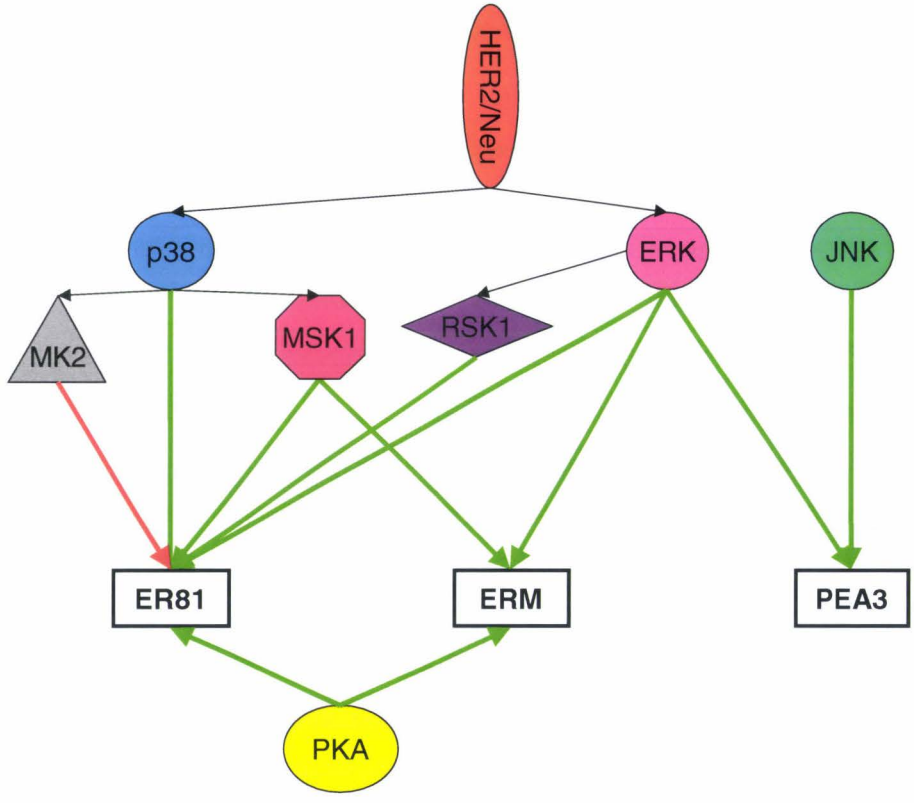


Figure 7 : Schéma des différentes voies de phosphorylation des membres du groupe PEA3. Les flèches noires représentent une activation par une autre kinase ; les flèches vertes les phosphorylations activatrice des membres du groupe PEA3 et la flèche rouge une phosphorylation inhibitrice.

Ces facteurs de transcription sont la cible de la voie de signalisation activée par le récepteur HER2/Neu impliquant les MAPkinases ERK et p38 (pour revue [57]). Ainsi, l'activation de ce récepteur conduit à la phosphorylation d'ER81 et accroît son activité transcriptionnelle sur le promoteur du gène *mmp1*. Cette activation est dépendante des voies ERK et p38 puisque les inhibiteurs spécifiques de ces voies bloquent l'effet de HER2/Neu sur ER81. La mutation des 4 sites de phosphorylation impliqués diminue de moitié l'activation d'ER81 médiée par HER2/Neu suggérant qu'il existe probablement d'autres mécanismes d'activation d'ER81 par ce récepteur [21]. L'activité transactivatrice des deux autres protéines du groupe PEA3 est également augmentée par ERK [21, 139, 140, 233]. Par contre, rien n'est connu quant à la participation de p38 à la régulation de leur activité. La MAP kinase JNK participe aussi à la régulation de l'activité de PEA3 [233].

Des kinases activées par les MAPK jouent également un rôle dans la régulation de l'activité des protéines du groupe PEA3 et les travaux réalisés concernent principalement ER81 (fig. 7 et 8). Ainsi, MSK1, une kinase activée par p38, en coopération avec une forme activée d'une MAPK kinase, augmente l'activité transcriptionnelle de ER81 et des autres membres du groupe PEA3 [142]. En outre, ER81 interagit avec la protéine kinase RSK1 (kinase activée par la kinase ERK) et cette kinase agit en synergie avec une forme activée de Raf pour accroître l'activité du facteur de transcription [322]. Par contre, l'activité d'ER81 est inhibée de façon cellule spécifique par une kinase activée par p38, la MK2 [141]. Il s'agit à ce jour du seul exemple de régulation négative de l'activité transcriptionnelle d'un des membres du groupe PEA3 par phosphorylation.

ERM et ER81 sont également activées par la kinase PKA [8, 322]. La phosphorylation par cette kinase entraîne une diminution de l'affinité d'ERM pour l'ADN tout en augmentant son activité transcriptionnelle [8]. Le site de phosphorylation conservé dans ERM et ER81 est absent de PEA3. Cette différence explique l'absence d'effet de la kinase PKA sur ce dernier. Cette observation montre que les membres du groupe PEA3 ne sont pas obligatoirement la cible des mêmes voies de signalisation intracellulaires [8].

(ii) Modifications des résidus lysine

• *Acétylation*

ER81 interagit avec les co-activateurs à activité acétyltransférase CBP/p300 et P/CAF. Suite à cette interaction, ER81 est acétylée sur des résidus lysine du domaine N-terminal et cette acétylation est nécessaire à l'activation transcriptionnelle de ER81 [88]. L'acétylation augmente la fixation d'ER81 à l'ADN *in vitro* ce qui augmente son activité transcriptionnelle. Par ailleurs, l'acétylation et/ou l'interaction avec p300 augmente également la demi-vie du facteur de transcription [88]. La surexpression de HER2/Neu

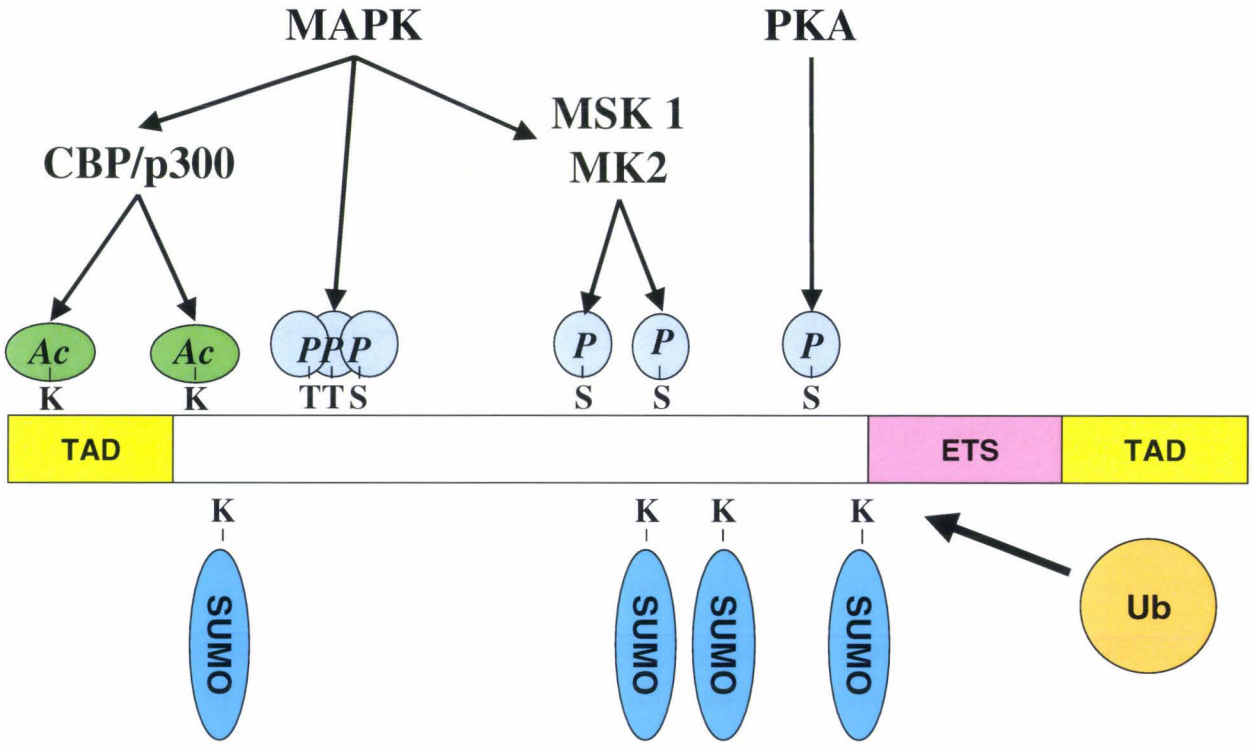


Figure 8 : Représentation d'un membre prototype du groupe PEA3 avec ses domaines fonctionnels et ses modifications post-traductionnelles.
Ac symbolise un groupement acétyl, P un groupement phosphate, Ub l'ubiquitine dont le(s) site(s) de conjugaison est (sont) inconnu(s).

semble également favoriser l'acétylation de ER81 [88]. La voie HER2/Neu provoquant la phosphorylation des membres du groupe PEA3 qui elle-même stimule l'activité transactivatrice de ces protéines, il est donc envisageable que la phosphorylation induise l'acétylation en favorisant le recrutement des protéines à activité acétyltransférase.

• *Ubiquitination*

PEA3 et ERM sont modifiées par l'ubiquitine [9, 289]. La polyubiquitination est un signal de dégradation par le protéasome et l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de ce dernier conduit à la stabilisation des deux protéines. La stabilité de PEA3 et ERM est donc régulée par la conjugaison d'ubiquitine et la dégradation par le protéasome ce qui explique leur demi-vie courte (d'environ 1 heure) [9]. L'ubiquitination d'ER81 n'a pas encore été établie mais comme sa demi-vie est proche de celle d'ERM, il est probable qu'elle soit aussi régulée par la conjugaison d'ubiquitine.

De manière intéressante, l'inhibition du protéasome favorise aussi l'activité transcriptionnelle des deux facteurs de transcription [9, 289]. En outre, elle conduit à un renforcement de la mono-ubiquitination d'ERM suggérant un rôle de la conjugaison d'ubiquitine dans l'activation transcriptionnelle de la protéine [9]. Enfin, une colocalisation de PEA3 et de l'ubiquitine est observée au niveau de corps nucléaires suggérant une localisation subcellulaire particulière des formes ubiquitinylées de cette protéine mais le devenir et la fonction des ces protéines modifiées restent indéterminés [289].

• *Sumoylation*

Des modifications par des molécules apparentées à l'ubiquitine telles qu'ISG15, Nedd8 et SUMO régulent également l'activité des facteurs de transcription (pour revue [123]). Parmi ces molécules, la plus étudiée est SUMO. Une étude récente visant à définir de nouveaux substrats de SUMO chez les mammifères a montré qu'ER81 peut être conjuguée à SUMO1 sur plusieurs sites [87]. Néanmoins, la fonctionnalité de cette modification n'a pas été établie. Très récemment, PEA3 a été décrite comme une cible de SUMO et sa conjugaison est dépendante de PIASγ [228]. A l'instar d'ERM, la conjugaison de SUMO a lieu sur plusieurs sites consensus et inhibe l'activité transcriptionnelle de PEA3 [228].

• *Conclusion*

Les membres du groupe PEA3 sont la cible de différentes modifications post-traductionnelles qui modulent leur activité transcriptionnelle afin de permettre une régulation fine des gènes cibles de ces facteurs de transcription (fig. 8). Les mécanismes mis en œuvre pour réguler l'activité de ces protéines sont cependant largement inconnus. Ces modifications pourraient influer l'interaction de ces protéines avec d'autres facteurs de transcription ou des co-activateurs et/ou avoir des conséquences sur la fonction de

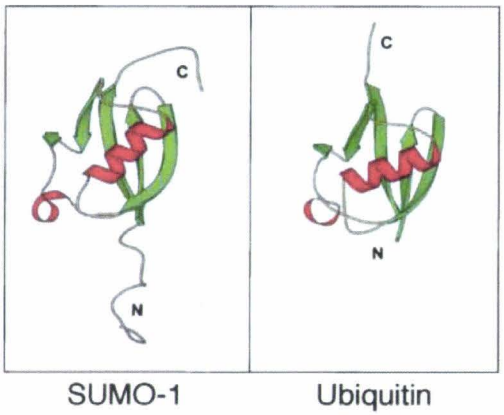


Figure 9 : Comparaison des structures tridimentionnelles de SUMO et de l'ubiquitine. Représentations en rubans où les feuillets β sont en vert et les hélices α en rouge. D'après Gill, 2004 [83].

domaines protéiques impliqués dans des mécanismes d'autoinhibition. De la même manière, les connexions potentielles entre les différentes modifications post-traductionnelles ne sont pas encore connues pour les membres du groupe PEA3. Elles ont déjà été démontrées pour d'autres protéines. Ainsi, la phosphorylation peut représenter un signal favorisant d'autres modifications de la protéine et certains résidus sont la cible de différentes voies de conjugaison provoquant ainsi un phénomène de compétition entre ces voies. Des exemples de ce type de régulation seront présentés dans la partie suivante.

II. La sumoylation

La sumoylation est un mécanisme de modification post-traductionnelle décrit assez récemment et consiste en la conjugaison de la protéine SUMO (Small Ubiquitin-related MOdifier) à un substrat protéique [198]. Cette modification covalente de certains résidus lysine a un rôle crucial dans de nombreux processus biologiques.

A. SUMO et sa voie de conjugaison

1) Gènes et protéines SUMO

a) Les gènes

Chez la levure, les insectes et les nématodes, il n'existe qu'un gène codant SUMO tandis que chez les Végétaux, 8 gènes expriment différentes formes de SUMO. Chez les Vertébrés, il existe quatre paralogues codant des protéines SUMO différentes : SUMO1 (Smt3c, PIC1, GMP1, sentrin ou Ubl1), SUMO2 (Smt3a ou sentrin3), SUMO3 (Smt3b ou sentrin2) et SUMO4. *Sumo2* et *sumo3* sont très proches puisqu'ils partagent 96% d'identité de séquence tandis que *sumo1* est plus divergent (pour revue [108]). *Sumo4* est un variant récemment identifié présentant 86% d'identité avec *sumo2* ou *3*. Contrairement à *sumo4* qui s'exprime principalement dans le rein, les autres ont une expression ubiquiste [18].

b) Les protéines

Dans la suite de ce manuscrit, le terme générique SUMO sera utilisé pour l'ensemble de ces protéines sauf précision contraire.

SUMO est une protéine d'une centaine de résidus (environ 12kDa) qui s'apparente à l'ubiquitine. Bien que l'identité de séquence entre ces deux protéines ne soit que de 18%, les structures tridimensionnelles sont quasiment superposables (fig. 9). SUMO est une protéine globulaire qui possède une queue N-terminale libre dont la fonction n'est pas connue. Malgré cette forte homologie structurale, SUMO et ubiquitine ne partagent ni les mêmes fonctions ni la même voie de conjugaison. SUMO est synthétisée sous la forme d'un précurseur qui est clivé après un doublet de glycine C-terminal par des protéases spécifiques appelées

SUMO-protéases (SENP, fig. 10). La protéine ainsi maturée sera la forme conjuguée aux substrats protéiques via le résidu glycine C-terminal [108]. Seul SUMO4 ne peut être clivée par les SUMO protéases car le doublet de glycine est suivi d'un résidu proline qui empêche la maturation [237]. Ce variant ne peut donc pas se conjuguer à un substrat comme les autres formes de SUMO. L'hypothèse d'une interaction non covalente de SUMO4 avec des protéines reste toutefois envisageable.

Dans le noyau, SUMO1 est localisée de manière diffuse dans le nucleoplasme mais concentrée au niveau des corps PML (promyelocytic leukaemia protein ; corps nucléaires liés à la présence de la protéine du même nom) et de l'enveloppe nucléaire (pour revue [269]). Très récemment, une nouvelle structure nucléaire contenant la forme activée de SUMO a été mise en évidence dans des cellules dérivées de la lignée de phéochromocytome PC12. Ces structures appelées SNB (SUMO Nuclear Bodies) concentrent certains régulateurs transcriptionnels de la différenciation neuronale tels que CBP, CREB et c-Jun. Ces corps nucléaires, différents des corps PML, pourraient être des lieux de stockage de protéines régulatrices de la différenciation neuronale [224].

D'un point de vue fonctionnel, il semblerait qu'il y ait des différences entre les quatre formes de SUMO. Au niveau cellulaire, ces protéines n'ont pas toutes la même localisation. Ainsi, si toutes sont nucléaires, une localisation cytoplasmique de SUMO3 a été décrite [286]. De plus, la majorité de SUMO1 est conjuguée aux protéines alors que SUMO2 et 3 existent majoritairement sous forme libre et sont fixées aux substrats suite à différents stress cellulaires comme l'irradiation aux UV ou l'exposition au stress oxydant par l'H_2O_2 [64]. Contrairement à SUMO1, SUMO2 et 3 présentent, dans leur région N-terminale, un site consensus de sumoylation (lysine 11) autorisant ainsi la formation de chaînes de polySUMO. *In vivo* dans des cellules surexprimant SUMO2, des liaisons isopeptidiques entre différentes molécules de SUMO2 ont été observées [293]. Toutefois, *in vitro*, SUMO1 est aussi capable de former des chaînes [329]. Enfin, des études indiquent que certains substrats comme la protéine PML sont préférentiellement conjugués à SUMO2 ou 3 [77] alors que d'autres tel que RanGAP1 sont modifiés par SUMO1 [262]. Ce type d'observation a été confirmé par le résultat d'analyses protéomiques à grande échelle dans des lignées surexprimant SUMO. En effet, ces analyses ont identifié de nouveaux substrats de la sumoylation et mis en lumière des différences de conjugaison entre les diverses formes de SUMO [309]. Toutefois, les expériences ont été menées en surexprimant SUMO et il est encore impossible de certifier qu'il existe une forme sumoylée préférentielle pour un substrat endogène défini.

2) Cascade enzymatique

La voie de conjugaison de SUMO utilise la forme mature de SUMO (après le clivage par les SUMO-protéases) et nécessite, *in vivo*, 3 activités enzymatiques : une enzyme E1 d'activation, une enzyme E2 de conjugaison et une enzyme E3 de ligation. Il existe également des enzymes de déconjugaison de SUMO qui font de la sumoylation un processus dynamique et réversible. La majorité des protéines de la voie de conjugaison de SUMO sont localisées dans le noyau (fig. 10) ce qui permet d'associer la sumoylation à un processus essentiellement nucléaire.

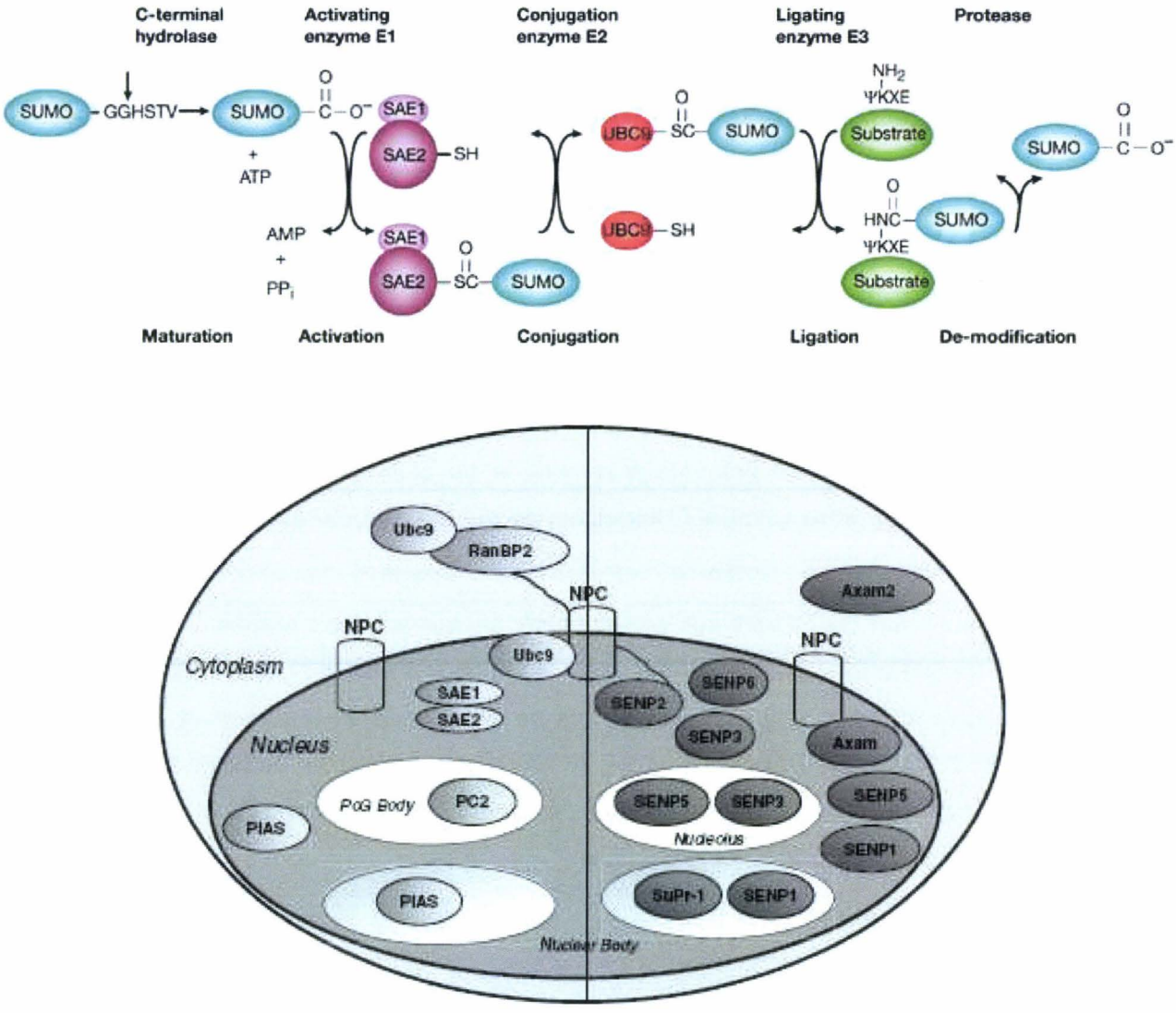


Figure 10 : Voie de conjugaison de SUMO et localisation subcellulaire de ses différents acteurs.
D'après Verger et al, 2003 et Karamousis et al, 2007 [151, 308].

a) Enzyme d'activation E1

Chez l'Homme, l'enzyme d'activation de SUMO est un hétérodimère SAE1-SAE2 (fig. 10). Pour initier la réaction, cette enzyme catalyse l'adénylylation de SUMO en liant de manière covalente une molécule d'AMP (Adénosine monophosphate) sur la glycine C-terminale de SUMO. La rupture de la liaison AMP-SUMO conduit ensuite à la formation d'une liaison thioester riche en énergie entre cette glycine et la cystéine 173 de SAE2 (pour revue [108]).

Cette enzyme est spécifique de la voie de conjugaison de SUMO car elle est incapable d'activer l'ubiquitine ou toute autre molécule apparentée. En effet, SAE2 entre en contact direct avec les acides aminés placés en amont du doublet de glycine, résidus qui sont spécifiques de SUMO. Cette sous-unité du dimère E1 interagit également directement avec l'enzyme E2 de conjugaison pour assurer le transfert du « SUMO activée » sur cette dernière (pour revue [108]).

b) Enzyme de conjugaison E2

La conjugaison de SUMO sur la lysine cible du substrat est catalysée par une enzyme E2 appelée Ubc9, unique enzyme de conjugaison de SUMO. Ubc9 est une protéine globulaire de 158 AA dont le domaine d'interaction avec SUMO est riche en résidus chargés positivement. Des interactions électrostatiques s'établissent ainsi entre ces résidus et les résidus chargés négativement présents à la surface de SUMO [66]. Ces interactions ne peuvent pas avoir lieu entre Ubc9 et l'Ubiquitine, ce qui fait d'Ubc9 une enzyme spécifique de la conjugaison de SUMO.

La conjugaison de SUMO sur son substrat se fait en deux étapes. Tout d'abord, l'enzyme E1 transfère le « SUMO activée » sur la cystéine 93 d'Ubc9. Ubc9 interagit alors directement avec le substrat au niveau du site consensus de sumoylation et catalyse le transfert de SUMO sur la protéine cible [108]. *In vitro*, cette interaction Ubc9/substrat semble suffisante pour placer la lysine cible face à la cystéine 93 du site actif d'Ubc9 et assurer la liaison isopeptidique entre SUMO et le substrat [13].

c) Les E3 ligases

Une E3 ligase (ou SUMO-ligase) est une enzyme capable d'interagir avec l'enzyme de conjugaison et d'accélérer le transfert de SUMO sur le substrat. Elle aide à la conjugaison de SUMO en augmentant la stabilité du complexe Ubc9-protéine cible et/ou en orientant le résidu lysine accepteur. Enfin, comme tous les substrats interagissent directement avec Ubc9, la spécificité de la réaction implique l'existence de différentes E3 ligases. Chez les Mammifères, plusieurs catégories d'E3 ligases ont été identifiées. La première renferme les cinq membres de la famille PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) : PIAS1, PIAS3,

PIASγ, PIASxα et PIASxβ [108]. A cette catégorie, il est possible de rattacher deux protéines, hZimp7 et 10, qui présentent des homologies avec les membres de cette famille et qui sont des E3 ligases pour le récepteur aux androgènes [271]. La deuxième catégorie de SUMO-ligase est représentée par RanBP2 qui appartient au pore nucléaire et dont les seuls substrats connus sont HDAC4 et Sp100 [156, 248]. La troisième est constituée de la protéine Polycomb Pc2, E3 ligase du corépresseur CtBP [147].

Plus récemment, d'autres protéines ont été suspectées de posséder une activité SUMO-ligase. Il s'agit en particulier de certaines HDAC de classe II (HDAC4, 5, 7 et 9) [97] ou des protéines Topors, partenaires de Topoisomérase I [318]. En ce qui concerne ces dernières, elles interagissent avec Ubc9 et leur surexpression augmente la sumoylation générale dans la cellule et plus particulièrement celle de p53 [318]. Cependant, aucun autre substrat n'a été décrit à ce jour. En ce qui concerne les HDAC de classe II, il a été montré que la surexpression de ces enzymes stimule la sumoylation de MEF2 [97]. Ce phénomène est indépendant de leur activité désacétylase ce qui rend peu probable le fait que la sumoylation soit consécutive à une désacétylation des sites de sumoylation [97]. Le même type d'observation a été fait pour le répresseur transcriptionel HIC1 [282].

La majorité des substrats de SUMO, et notamment les facteurs de transcription, ont pour ligase un membre de la famille PIAS (pour revue [276]). Les protéines de cette famille, initialement décrites comme des inhibiteurs de la voie STAT, ont une structure commune (fig. 11). Dans leur partie N-terminale se trouve le domaine SAP (Siz Acinus PIAS). Dans le cas de PIAS1 et PIASγ, ce domaine est capable de lier *in vitro* des séquences ADN riches en (A+T) [235]. De plus, ce domaine permet à PIASγ de s'associer à l'ADN retrouvé au niveau des régions d'attachement à la matrice nucléaire [261]. Ces données suggèrent que les PIAS pourraient interagir directement avec l'ADN mais la fonctionnalité d'une telle interaction n'est pas connue. Dans la région centrale des PIAS, un domaine appelé PINIT pourrait être responsable de la rétention nucléaire des protéines PIAS [70]. Le troisième domaine conservé au sein de la famille est le domaine RLD (RING-finger like zinc-binding domain) riche en cysteine et en histidine. Ce domaine est en partie responsable de l'interaction avec Ubc9 et est surtout indispensable à l'activité catalytique des ligases. La région C-terminale

Figure 11 : Présentation des domaines fonctionnels des protéines PIAS.
Le domaine SAP est représenté en bleu, le domaine PINIT en vert, le domaine RING (RLD) en rose, le domaine acide (AD) en rouge et le domaine riche en résidus sérine et thréonine (S/T) en turquoise. D'après Shuai et al, 2005 [276].

des protéines PIAS est la partie la moins conservée. Elle comprend un domaine acide et une région riche en résidus sérine et thréonine dont les fonctionnalités ne sont pas identifiées (pour revue [276]).

Bien que les protéines PIAS soient impliquées dans la spécificité de reconnaissance des cibles de la sumoylation, aucun domaine spécifique d'interaction avec leurs substrats n'est défini (pour revue [276]). Le mécanisme de reconnaissance des PIAS et de leurs partenaires reste donc à élucider.

d) Les SUMO-protéases

La sumoylation est un processus dynamique et réversible. La déconjugaison de SUMO est prise en charge par les SUMO protéases (SENP), enzymes de la famille des cystéines protéases aussi responsables de la maturation du précurseur de SUMO. Les SENP ont une structure tridimentionnelle commune. La triade catalytique est placée dans un sillon épousant le motif glycine-glycine de SUMO [252, 253].

Chez les Mammifères, 8 gènes codant potentiellement des SENP ont été identifiés dans les bases de données. Toutefois, seuls les produits de cinq d'entre eux (SENP1, 2, 3, 5 et 6) ont une activité hydrolase (maturation de SUMO) et/ou isopeptidase (élimination de SUMO des substrats) [63]. L'endopeptidase la plus efficace semble être SENP1 suggèrant qu'elle puisse être la plus fréquemment utilisée *in vivo* [202]. Leur localisation intracellulaire est différente ce qui suggère qu'elles agissent sur des substrats particuliers. SENP1 et 6 sont nucléaires, SENP3 et 5 sont nucléolaires tandis que les différentes isoformes de SENP2 (Axam, Axam2 et SuPr-1) sont cytoplasmiques ou nucléaires (fig. 10, pour revue [108]).

Les SUMO protéases semblent avoir des spécificités de reconnaissance envers les différentes formes de SUMO. En effet, l'inactivation de SENP1 conduit à une accumulation de SUMO1 immature et des substrats conjugués à SUMO1. Par contre, le processing et la déconjugaison de SUMO2 et 3 ne sont pas altérés [326]. Quant à SENP6, elle semble avoir une préférence pour les chaines de poly-SUMO et notamment celles de SUMO2 et 3 [215]. Cependant, un point encore non élucidé concerne la sélection des susbstrat à désumoyler.

3) Caractéristiques de la sumoylation

a) Le site de sumoylation

Un site consensus de sumoylation ψKxE/D a été défini : la lysine cible doit être précédée d'un acide aminé hydrophobe (ψ), suivi de n'importe quel acide aminé (x) puis d'un résidu acide le plus souvent un acide glutamique. La comparaison des régions situées en aval du site de sumoylation montre un enrichissement en résidus acides, notamment en

position 3 à 6 par rapport au résidu acide du consensus [334]. Sur trois substrats de la sumoylation (Elk-1, MEF2 et LRH-1), la mutation en alanine des résidus acides de la région en aval du site de sumoylation diminue, voire abolit, la conjugaison de SUMO. De plus, les mutations provoquent une diminution de l'affinité du substrat pour Ubc9, l'enzyme de conjugaison de SUMO. Ceci a conduit à définir un motif « étendu » de sumoylation qui a été nommé NDSM ou Negatively charged amino acid-Dependent Sumoylation Motif. Cet enrichissement en résidus acides en aval du site de sumoylation peut donc réguler l'affinité d'Ubc9 pour la protéine cible de SUMO. Cette affinité est corrélée à la présence d'une région riche en résidus basiques à la surface d'Ubc9 [334].

Sur un promoteur comprenant plusieurs sites de fixation pour un même facteur de transcription, toutes les molécules de la protéine fixées à l'ADN peuvent interagir fonctionnellement afin d'accroître la transactivation du gène concerné. Elles agissent alors en synergie. Un motif de type $PX_{0-4}(I/V)KXEX_{0-3}P$ est impliqué dans cette synergie fonctionnelle. Ce motif a été dénommé SC pour « Synergy Control » car la mutation de celui-ci favorise la coopération fonctionnelle entre plusieurs molécules d'un même facteur de transcription sur des promoteurs possédant plusieurs sites de fixation pour celui-ci [132]. D'autres études ont ensuite confirmé que le SC motif recouvre en fait un site de sumoylation fonctionnel et que l'effet synergique est corrélé au défaut de sumoylation du site [27, 124, 175]. Il faut noter que sur un promoteur ne possédant qu'un seul site de fixation pour le facteur de transcription, aucune différence d'activité n'est observée entre la forme sauvage et non sumoylable du facteur de transcription étudié [132]. Ces données montrent donc clairement que la sumoylation peut avoir des effets promoteurs spécifiques et dépendants du nombre de sites de fixation pour le facteur de transcription considéré.

b) Les cibles de SUMO

Bien que de nombreuses protéines soient sumoylées au niveau d'un site consensus de sumoylation, certaines sont conjuguées à SUMO au niveau de sites non consensuels comme la protéine PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ou l'enzyme E2-25K (pour revue [146]). Dans ce cas, le mécanisme de reconnaissance par Ubc9 n'est pas clair car cette enzyme est connue pour reconnaître et interagir avec le site consensus de sumoylation. Cette reconnaissance pourrait être liée à la structure secondaire du domaine contenant la lysine cible. En effet, l'enzyme E2-25K possède une hélice α dans laquelle se trouvent deux sites consensus de sumoylation et un site non consensuel ; la conjugaison de SUMO n'a lieu qu'au niveau du site non consensus. Par contre, si les sites consensus sont placés dans une région non structurée, ils deviennent alors conjugables à SUMO [249]. Ces données suggèrent que l'environnement de la lysine cible (présence de résidus acides ou structuration) régule l'affinité d'Ubc9 pour sa cible.

Les substrats de la sumoylation incluent des protéines cytoplasmiques telles qu'IκB, GLUT1 et GLUT4. Toutefois, la majorité des protéines cibles sont nucléaires et appartiennent à la famille des facteurs de transcription (pour revue [146], fig. 12). La localisation essentiellement nucléaire du processus de sumoylation est d'ailleurs supportée par le résultat d'une analyse d'un peptide possèdant un site de sumoylation. En effet, dans les cellules, ce peptide n'est sumoylable que lorsqu'il est fusionné à un NLS (Nuclear Localization Signal) lui permettant de se localiser dans le noyau [257].

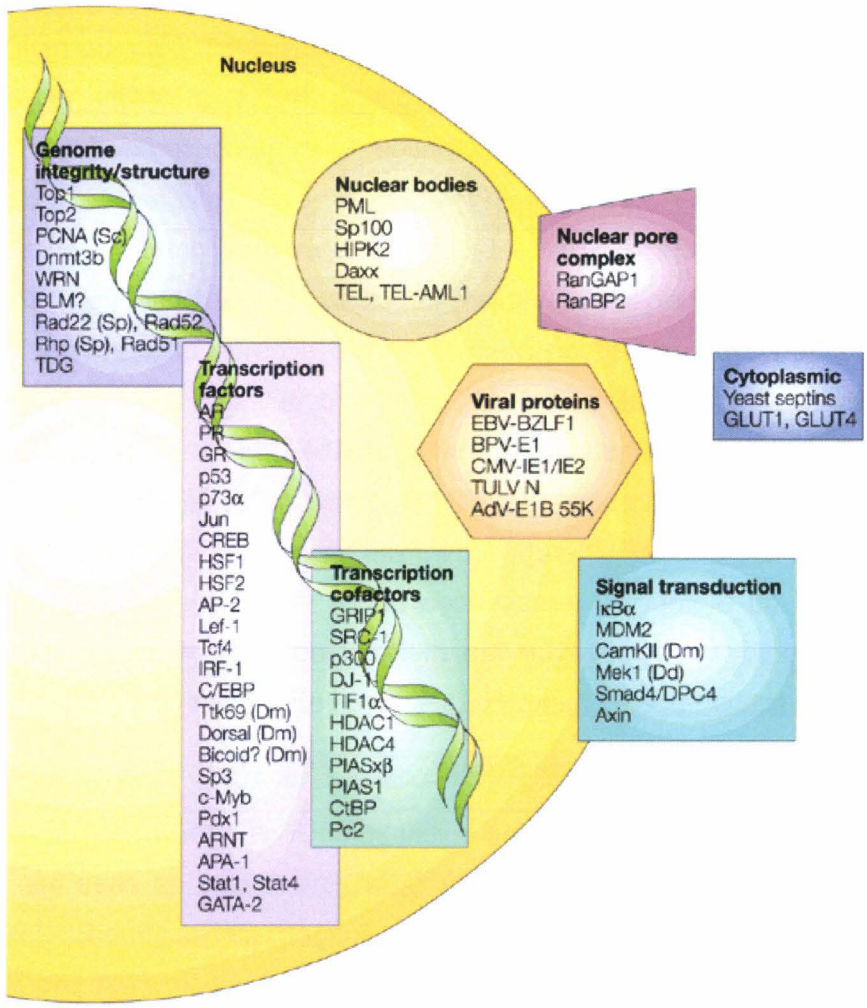


Figure 12 : Quelques substrats de la sumoylation regroupés par fonction.
La liste des substrats n'est pas exhaustive. Sc, Sp, Dm et Dd indiquent respectivement S.cerevisiae, S.pombe, Drosophile et Dictyostelium. Les autres substrats sont des protéines de Mammifères. D'après Seeler et al, 2003 [269].

c) La stœchiométrie de la sumoylation

Une des caractéristiques de la sumoylation est d'affecter à un instant donné une très faible proportion de la protéine cible. Généralement, seuls quelques pourcents d'une protéine sont concernés ce qui rend difficile la mise en évidence d'une sumoylation

endogène pour une cible potentielle. Une exception notable est la protéine RanGAP1 qui est conjuguée à SUMO à près de 50% (pour revue [146]).

Bien que la sumoylation ne concerne qu'une faible proportion d'une protéine cible donnée, les conséquences de cette modification sont très importantes. Actuellement, aucune donnée expérimentale ne permet d'expliquer ce phénomène. Une première hypothèse est de considérer que seule la fraction active d'une protéine est sumoylable : pour un facteur de transcription, seules les formes fixées sur un promoteur cible seraient visées. Une autre possibilité est d'envisager que la sumoylation est une modification transitoire de la cible mais que les conséquences fonctionnelles persistent après l'élimination de SUMO. Ainsi, la conjugaison de SUMO pourrait inhiber l'activité d'un facteur de transcription via le recrutement d'un complexe répresseur qui resterait en place après désumoylation du facteur, inhibant ainsi à plus long terme l'activité de la protéine. Dans ce modèle, la proportion visible de protéines sumoylées reste constante mais les entités modifiées à chaque instant sont différentes (pour revue [146]).

d) Interaction non covalente de SUMO

La sumoylation est caractérisée par la liaison covalente de SUMO sur la protéine cible. Toutefois, un mécanisme non covalent de sumoylation des protéines a été décrit. SUMO interagit alors avec les protéines au niveau d'un motif SBM (SUMO Binding Motif) dont la séquence est (V/I)X(V/I)(V/I) [279]. Ce motif est présent dans de nombreuses protéines sumoylables ou non et il a été impliqué dans certaines interactions protéiques telles que celles entre la protéine PML et l'enzyme de réparation TDG ou les protéines du pore nucléaire RanBP2 et RanGAP1 [279, 290]. Concernant les protéines sumoylées, il est aussi envisageable que ce motif permette une stabilisation de la forme sumoylée de la protéine en interagissant directement avec SUMO (pour revue [155]).

Indépendamment du motif SBM, d'autres interactions entre SUMO et des protéines ont été établies et les conséquences fonctionnelles sont variables. Ainsi, la fixation non covalente de SUMO sur les SUMO-protéases est nécessaire à leurs activités enzymatiques hydrolase et isopepetidase [130]. SUMO se fixe également de manière non covalente sur Ubc9 et favorise ainsi la formation de chaînes de SUMO2 [157]. Enfin, suite à l'interaction avec SUMO, la kinase ASK1 n'est plus capable de s'oligomériser et d'avoir une activité kinase [180]. Les interactions non covalentes entre SUMO et certaines protéines par le biais des motifs SBM ou d'autres motifs constituent donc un nouveau niveau de régulation des propriétés de ces protéines. Dans la suite de ce manuscrit, seul l'impact de la fixation covalente de SUMO sera abordé.

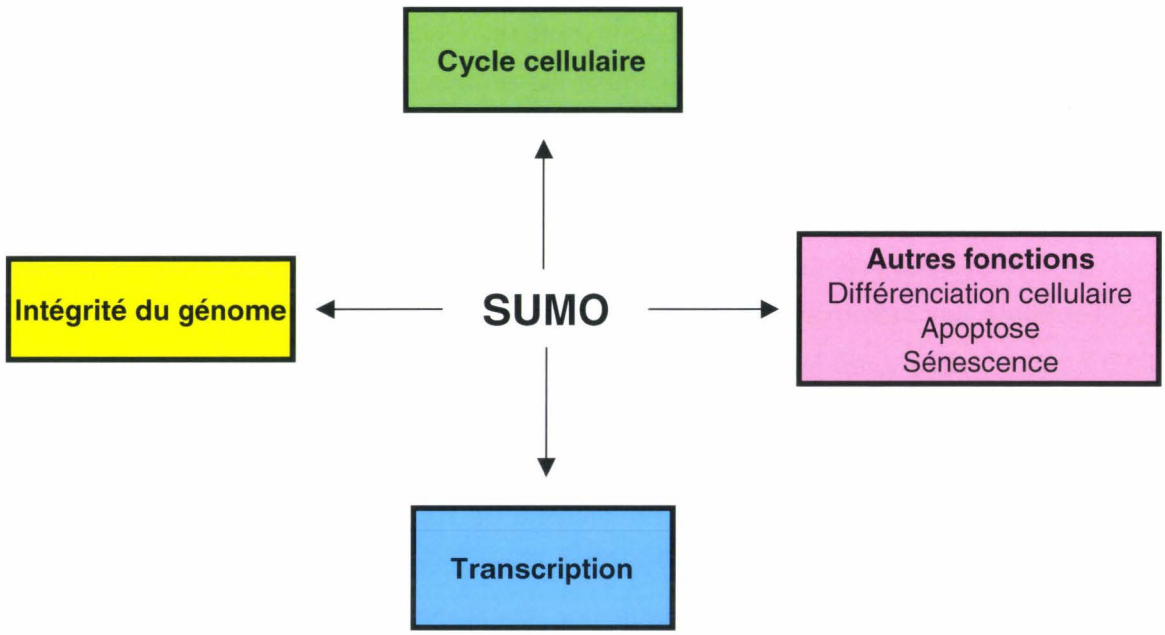


Figure 13 : Fonctions cellulaires dans lesquelles la sumoylation a été impliquée.

B. Les fonctions de SUMO

La nature et la diversité des protéines modifiées par SUMO a rapidement permis de suggérer un rôle important de la sumoylation dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires (fig. 13). Par la suite, les expériences d'inactivation de gènes codant des protéines de la voie de conjugaison de SUMO ont montré le rôle important de la sumoylation et/ou des protéines impliquées dans cette voie dans divers processus [221, 323, 326]. Nous discuterons d'abord de l'impact de la sumoylation sur la transcription puis nous présenterons d'autres fonctions cellulaires dans lesquelles SUMO est impliquée.

1) La transcription

a) Activateurs et co-activateurs

Un grand nombre d'activateurs et un nombre restreint de co-activateurs transcriptionnels sont décrits comme cibles de la voie de conjugaison de SUMO. En ce qui concerne les facteurs de transcription, le plus souvent, la mutation des lysines sumoylables en résidus arginine non conjugables à SUMO conduit à une augmentation de leur activité (pour revue [108]). De la même manière, l'utilisation de protéines interférant négativement avec la voie de conjugaison de SUMO, comme une forme inactive de l'enzyme de conjugaison Ubc9 (fonction de dominant négatif) ou les SUMO protéases, provoque généralement une activation de ces facteurs de transcription. L'ensemble des ces observations indiquent que la sumoylation réprime le plus souvent l'activité des activateurs transcriptionnels (pour revue [108]). De manière intéressante, la sumoylation affecte aussi les « complexes » activateurs. Ainsi, l'activité du complexe AP-1, formé par les protéines Jun et Fos, est inhibée par la sumoylation et la sumoylation d'un seul des deux acteurs semble suffisante pour réduire significativement l'activité du complexe [22]. Cet exemple suggère donc que la présence de SUMO au sein d'un complexe conduit à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle quelle que soit la protéine sumoylée au sein du complexe. Le mécanisme mis en jeu par le dimère Fos-Jun pourrait s'appliquer à d'autres activateurs transcriptionnels agissant en complexe.

La conjugaison de SUMO est généralement associée à une inhibition de l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription. Il existe toutefois des exemples d'activation suite à la conjugaison de SUMO. Ainsi, la sumoylation du facteur de transcription NFAT1 favorise sa rétention nucléaire et son activité transcriptionnelle [295]. Un nouvel exemple d'activation par la conjugaison de SUMO vient d'être décrit et concerne le facteur de transcription Oct-4 [319]. De même, la sumoylation des co-activateurs GRIP1 et SRC-1 est corrélée à leur activation transcriptionnelle [33, 162] ce qui n'est pas le cas de CBP/p300 [86,

163] et AIB-1, un co-activateur de la famille p160 [33, 161, 321] qui ont leur activité inhibée suite à la sumoylation.

Les exemples d'activation par SUMO restent encore peu nombreux et pourraient refléter des situations particulières liées à la régulation de certains promoteurs. Par ailleurs, il est important de signaler que la sumoylation des co-facteurs ajoute un degré de complexité supplémentaire pour la compréhension des mécanismes de régulation de l'activité des facteurs de transcription.

b) Répresseurs et co-répresseurs

L'activité des répresseurs et des co-répresseurs est également régulée par la conjugaison de SUMO. La sumoylation participe à la capacité répressive de certaines de ces protéines. Ainsi, au sein du complexe Mi-2/NuRD, les répresseurs transcriptionnels p66α et β sont des cibles de la sumoylation et la mutation des sites de conjugaison de SUMO diminue significativement leur capacité répressive [91]. Ce type de donnée est aussi retrouvé dans le cas d'autres protéines associées à la répression transcriptionnelle. Ainsi, HDAC1 et 4 sont conjuguables à SUMO et leurs mutants non sumoylables présentent une diminution de leur capacité répressive et une activité désacétylase plus faible [52, 156]. Le même type d'observation a été fait pour le co-répresseur CtBP1 [185].

Inversement, la sumoylation peut diminuer la capacité répressive d'autres protéines impliquées dans la répression transcriptionnelle. C'est le cas d'Ikaros, un facteur de transcription impliqué dans le développement et l'homéostasie du système immunitaire [90]. De même, le facteur de transcription SIP1 (Smad-interacting protein1) qui réprime le gène *E-cadherin* est régulé par la sumoylation et son mutant non sumoylable est un meilleur répresseur que la forme sauvage [192]. Néanmoins, les exemples de diminution de l'activité répressive suite à la sumoylation restent peu nombreux à ce jour.

c) Histones

La sumoylation des facteurs de transcription est un mécanisme essentiel dans la modulation de la transcription. Toutefois, la conjugaison de SUMO semble aussi agir directement au niveau d'autres acteurs de la transcription que sont les histones. Les lysines de la queue des histones sont soumises à de nombreuses modifications post-traductionnelles ayant des conséquences sur la structure de la chromatine et donc sur la régulation des promoteurs. Une étude a montré que la sumoylation de l'histone H4, sans toutefois déterminer le(s) résidu(s) lysine impliqué(s), est associée à la répression transcriptionnelle [274]. Plus récemment, une analyse menée chez la levure *S.cerevisiae* démontre que toutes les histones du nucléosome sont conjuguées à SUMO *in vivo* et que la sumoylation a lieu au sein de la chromatine et est plus dense dans les régions

subtélomériques [223]. De plus, la mutation des sites de sumoylation des histones induit une activation transcriptionnelle des gènes cibles testés. Ces données suggèrent que la sumoylation des histones pourrait contribuer à la répression transcriptionnelle et même au silencing de certains gènes [223].

d) Mécanismes mis en jeu par la sumoylation

(i) Stabilité

Contrairement à l'ubiquitination, la sumoylation ne conduit généralement pas la protéine vers la dégradation et n'affecte pas sa stabilité. Toutefois, dans de rares cas, la stabilité et/ou la dégradation de la protéine ciblée pourrait être modulée, sans que les mécanismes mis en jeu ne soient connus. Ainsi, dans l'embryon du poisson zèbre comme chez l'Homme, une protéine apparentée à p53, ΔNp63α est sumoylable. La mutation du site de sumoylation augmente de deux fois le taux de la protéine, suggérant un rôle négatif de la sumoylation sur la stabilité de la protéine [10, 81]. Inversement, la surexpression de SUMO dans des cellules HeLa augmente le taux endogène du facteur de transcription HIF-1α probablement par stabilisation de celui-ci [6].

(ii) Localisation subcellulaire et trafic intracellulaire

La conjugaison de SUMO permet également de compartimenter certains acteurs de la transcription et crée ainsi un autre niveau de contrôle de leur activité. SUMO peut jouer un rôle dans la localisation intranucléaire de certaines protéines et favoriser le ciblage des protéines sumoylées dans des corps nucléaires (pour revue [108]). La forme non-modifiée de la protéine PML se trouve ainsi dans la fraction soluble du nucléoplasme alors que la forme sumoylée est retrouvée exclusivement dans les corps PML [216]. De plus, la mutation des sites de sumoylation de PML conduit à la disparition des corps nucléaires et, en conséquence, à la relocalisation nucléaire de protéines comme CBP, Daxx ou Sp100 [216]. Ces résultats suggèrent que la sumoylation de PML permet la mise en place d'interactions protéine-protéine importantes pour l'assemblage et le maintien de structures subnucléaires nécessaires à de nombreuses fonctions cellulaires telles que la transcription ou la réparation de l'ADN (pour revue [83, 116]).

La conjugaison de SUMO est aussi responsable de la rétention nucléaire de certains facteurs de transcription. Ainsi, le répresseur transcriptionnel CtBP1 est délocalisé dans le cytoplasme si son site de conjugaison de SUMO est muté [185]. Concernant le facteur de transcription Smad4, la surexpression de SUMO favorise sa rétention nucléaire participant ainsi à l'amplification de la transduction du signal du TGF-β [184]. Le phénomène inverse peut aussi se produire et permettre une relocalisation d'une protéine nucléaire dans le cytoplasme. Ainsi, la sumoylation de c-Myb induit une relocalisation partielle du facteur de

transcription dans le cytosol de cellules M1. Cette séquestration cytoplasmique de c-Myb participe à la régulation négative de l'activité du facteur de transcription [210].

Finalement, la sumoylation régulerait le trafic nucléocytoplasmique de certaines protéines. Dans le cas de Elk-1, le transit nucléo-cytoplasmique d'un mutant non sumoylable est plus rapide que celui d'une forme sauvage dans un test d'hétérocaryon [263]. Ce résultat suggère que la sumoylation augmente la rétention nucléaire d'Elk-1 et participe ainsi à l'inhibition de son activité transcriptionnelle. De manière intéressante, la rétention nucléaire d'Elk-1 est associée à la différenciation neuronale : en bloquant la délocalisation d'Elk-1 dans le cytoplasme, la sumoylation bloque la croissance des neurites [263]. Toutefois, peu d'études ont été réalisées sur la relation SUMO et traffic nucléocytoplasmique des facteurs de transcription et l'importance de ce mécanisme dans la régulation de l'activité d'autres protéines reste à définir.

(iii) Affinité pour l'ADN

Peu d'études ont réellement évalué l'impact de SUMO sur l'affinité d'un facteur de transcription pour l'ADN. Face aux difficultés pour isoler les formes sumoylées d'une protéine et à la faible proportion de celles-ci, plusieurs équipes ont fusionné SUMO à l'extrémité de leur protéine cible et ont comparé l'affinité pour l'ADN de la protéine de fusion à celle de la protéine native. Dans la plupart des études, la sumoylation des facteurs de transcription n'a pas eu d'impact sur l'affinité pour l'ADN (pour revue [84]). Cependant dans ces conditions, la position spatiale de SUMO peut être très différente de celle existant suite à l'ancrage sur la lysine cible. Une alternative intéressante a consisté à sumoyler *in vitro* la protéine afin de mimer la sumoylation endogène puis à tester *in vitro* son affinité pour l'ADN. Il a ainsi été montré que la conjugaison de SUMO sur PLZF n'a pas modifié son affinité pour l'ADN [150] alors qu'elle diminue celle de Sox2 [302]. Peu de facteurs de transcription ont cependant été soumis à ce type d'analyse.

En dehors des facteurs de transcription, l'impact de SUMO sur la fixation à l'ADN de la thymine DNA glycolylase (TDG) a été bien décrypté. Lors d'un mésappariement au sein de la double hélice, la conjugaison de SUMO sur TDG favorise le relargage de l'enzyme du site abasique après l'excision de la base appariée. Elle coordonne aussi le transfert vers l'APE (apurinic/apyrimidinic endonucléase), responsable de l'étape suivante de la réparation. Une étude structurale indique que la sumoylation conduit à l'exposition d'une hélice α en surface de TDG interférant avec la fixation à l'ADN [4, 5].

Enfin, des observations faites sur des protéines du complexe d'initiation de la transcription démontrent l'impact différent de SUMO sur la régulation de l'affinité pour l'ADN en fonction du contexte dans lequel se trouvent les protéines au moment de leur

modification. En effet, une étude menée sur le complexe TFIID a montré que deux de ses unités (TAF5 et TAF12) sont des cibles de la sumoylation. De manière intéressante, un complexe TFIID préfixé à l'ADN peut être sumoylé sur les deux sous-unités sans compromettre la stabilité du complexe. Par contre, la sumoylation préalable de TAF5 empêche la fixation du complexe TFIID sur un fragment de promoteur immobilisé sur billes [23].

(iv) Interactions protéiques

• *SUMO favorise les interactions protéiques*

L'impact de SUMO dans l'activité répressive peut être expliqué par sa propre capacité à recruter des protéines impliquées dans la répression. La fusion de SUMO au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 génère une protéine qui réprime l'activité d'un gène rapporteur artificiel [259]. Une étude récente a mis en évidence l'importance de trois résidus lysine dans la répression exercée par SUMO2. Ces résidus joueraient un rôle important dans le recrutement par SUMO de certains partenaires [258]. Des molécules impliquées dans la répression transcriptionnelle comme SETDB1 (histone méthyltransférase), PELP1 (co-régulateur transcriptionnel), LSD1 (histone déméthylase), ARIP4 (protéine à activité ATPase DNA dépendante) et NXP-2 (protéine de la matrice nucléaire) ont ainsi été identifiées [258]. La relation entre SUMO2 et ces différents répresseurs n'est pas encore clairement établie dans des modèles d'inhibition d'activité de facteurs de transcription.

Des études ont montré que les mécanismes de répression liés à la sumoylation peuvent passer par le recrutement de différents co-répresseurs. Ainsi, la répression transcriptionnelle des gènes de la réponse inflammatoire par PPARγ passe par une première étape de sumoylation de la lysine 365 de PPARγ, modification dépendante à la fois de la fixation du ligand sur PPARγ et de PIAS1. La sumoylation de PPAR conduirait ensuite à son recrutement au niveau du promoteur du gène *inos* et à son interaction avec le co-répresseur NCoR, en complexe avec HDAC3. Le complexe transrépresseur ainsi stabilisé empêcherait alors le recrutement du complexe ubiquitination/19S protéasome nécessaire à l'activation transcriptionnelle [242]. Un mécanisme similaire a été retrouvé pour le LXR (Liver X receptor) mais implique SUMO2 et HDAC4 [82]. Le ciblage des récepteurs nucléaires dans des complexes répresseurs via SUMO pourrait ainsi représenter une stratégie générale de répression des gènes pro-inflammatoires.

NCoR n'est pas le seul co-répresseur qui soit recruté par SUMO. Dans le cas du facteur de transcription Smad4, la conjugaison de SUMO semble favoriser le recrutement de Daxx au niveau du promoteur cible [32]. De même, Daxx peut aussi être recrutée par le co-activateur CBP sumoylé et cette interaction est un pré-requis au recrutement de HDAC2

[163]. Les HDACs, molécules fréquemment impliquées dans la répression transcriptionnelle, sont aussi directement corrélées à la répression médiée par SUMO. Ainsi, un facteur de transcription de la famille ETS, Elk-1, recrute HDAC2 lorsqu'il est sumoylé [332]. De même, *in vitro*, la forme sumoylée de p300 interagit avec HDAC6 [85]. Il existe ainsi de nombreux exemples d'inhibition d'activité médiée par SUMO qui impliquent le recrutement direct ou non d'HDAC. Cependant, ce recrutement ne semble pas être un mécanisme généralisable à l'ensemble des protéines dont l'activité est réprimée suite à la sumoylation. A titre d'exemple, l'inhibition d'isoformes de Sp3 par la sumoylation est insensible à un traitement à la trichostatine A (TSA), un inhibiteur d'HDAC, suggérant l'existence de mécanismes de répression HDAC indépendants [280].

• *SUMO défavorise les interactions protéiques*

Si SUMO est une plate-forme de recrutement de protéines impliquées dans la répression transcriptionnelle, elle est aussi capable d'empêcher certaines interactions protéiques, à commencer par les interactions entre les facteurs de transcription et leurs co-régulateurs.

Ainsi, la sumoylation du facteur de transcription Ikaros diminue sa capacité répressive et cette diminution est liée à la perte d'interaction avec des co-répresseurs. En effet, lorsque la proportion d'Ikaros sumoylée est augmentée par la surexpression de SUMO, on observe une diminution du taux de certains co-répresseurs comme Sin3A ou CtBP co-immunoprécipités avec Ikaros [90]. De même, le facteur de transcription SIP1 sumoylé perd sa capacité d'interaction avec CtBP [192]. Dans le cas de la méthyltransférase Dnmt3a impliquée dans l'empreinte génomique et la répression transcriptionnelle, la sumoylation induit une perte d'interaction avec les HDAC1 et 2. Toutefois, celle-ci n'empêche pas l'interaction avec son partenaire, l'enzyme Dnmt3b. [186]. La sumoylation pourrait servir de modulateur de la capacité répressive en favorisant la formation préférentielle de certains complexes.

Enfin pour une même protéine, la sumoylation peut avoir des effets variables suivant le modèle étudié. Ainsi une étude a montré que MBD1, qui appartient au complexe SETDB1 réprimant la transcription par méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, est conjuguée à SUMO1. Après modification, MBD1 semble toujours affine pour l'ADN méthylé mais perd sa capacité d'interaction avec SETDB1 ce qui pourrait diminuer l'efficacité de la répression transcriptionnelle au niveau de certains promoteurs [194]. Toutefois, une autre étude a établi que MBD1 conjuguée à SUMO2/3 interagit mieux *in vitro* avec MCAF1 pouvant ainsi favoriser le recrutement de SETDB1 [304]. Bien que cette donnée demande à être confirmée *in vivo*, il est possible que la conjugaison des différentes formes de SUMO puisse avoir des effets opposés sur les complexes co-répresseurs associés à MBD1.

La conjugaison de SUMO peut donc induire une perte d'affinité pour les interacteurs protéiques de la protéine cible. Ce mécanisme concerne principalement des protéines dont la sumoylation diminue la capacité répressive. Pour des protéines dont l'activité est inhibée par la sumoylation, une seul étude a montré que SUMO pouvait affecter négativement le recrutement de partenaires par la protéine modifiée. En effet, *in vitro*, la forme sumoylée de NF-IL6β n'est plus capable d'interagir avec p300 [311]. Il est donc possible que SUMO interfère avec le recrutement de co-activateurs conduisant ainsi à un défaut d'activation transcriptionnelle.

2) L'intégrité du génome

a) Protéines de la voie de conjugaison de SUMO

Chez *S. cerevisiae*, l'utilisation d'anticorps dirigés contre SUMO montre que la protéine se situe au niveau des chromosomes lors de la division cellulaire [291]. De manière cohérente, la sumoylation de protéines clés au niveau des kinetochores est indispensable à la stabilité des chromosomes et au fuseau mitotique [209]. Chez *S. pombe*, Pli1p, une SUMO ligase, et par extension la sumoylation, semble jouer un rôle dans le maintien de la stabilité des séquences centromériques [323] et dans la régulation de l'activité télomérase [324].

Dans les cellules humaines, l'inactivation de PIASγ par ARN interférence provoque une délocalisation de la topoisomérase II, un allongement du temps de métaphase et une mauvaise ségrégation des chromatides sœurs [65]. De même, des cellules de souris *ubc9* $^{-/-}$ présentent de graves défauts d'organisation du noyau, de condensation et de ségrégation des chromosomes en mitose [221]. Ces données soulignent l'importance de la sumoylation pour le maintien du génome lors de la division cellulaire.

b) Protéines cibles de SUMO

Le maintien du génome est assuré par des mécanismes efficaces de réparation de l'ADN et de réplication. Le nombre croissant de protéines sumoylables impliquées dans ce processus suggère l'importance de la conjugaison de SUMO dans la régulation des mécanismes mis en jeu. TDG et PCNA sont deux protéines majeures impliquées dans le maintien du génome et régulées par SUMO. La sumoylation de TDG induit un changement de conformation qui facilite sa dissociation de l'ADN et régule ainsi son temps de fixation pour favoriser une réparation optimale des mésappariements [283]. De plus, le mutant non sumoylable de TDG s'accumule dans des corps nucléaires particuliers indiquant que la sumoylation régule négativement la translocation de l'enzyme vers ces structures. L'enzyme resterait ainsi disponible pour la réparation des mésappariements [205]. La protéine PCNA est impliquée à la fois dans les mécanismes de réplication et de réparation. En absence de

dommage à l'ADN, en phase S du cycle cellulaire, PCNA est conjuguée à SUMO ce qui bloque son rôle réparateur « trans-lésion » et l'oriente vers une fonction dans la réplication « normale » [122]. La conjugaison de SUMO permettrait alors le recrutement de l'hélicase Srs2p au niveau des fourches de réplication [238].

3) Cycle cellulaire

a) Protéines de la voie de conjugaison de SUMO

Le rôle de la sumoylation dans le cycle cellulaire a émergé suite aux études de modulation d'expression des protéines impliquées dans la voie de conjugaison de SUMO. Ainsi, des mutants conditionnels pour le gène *ubc9* ont été réalisés dans les cellules de poulet DT40 [109]. L'inactivation d'u*bc9* conduit à une croissance ralentie des clones puis à leur mort par apoptose. La majorité des cellules dépourvues d'Ubc9 tend à rester en phase G1 et le nombre de cellules polynuclées s'accroît suggérant l'existence de problèmes de cytokinèse [109]. La SUMO-ligase PIAS1 joue aussi un rôle dans la progression du cycle cellulaire par la régulation de la transition G1/S. En effet, sa surexpression diminue la proportion de cellules en phase G1 et induit l'entrée dans le cycle. Au contraire, sa sous-expression par ARN interférence (RNAi) décroît la proportion de cellules en phase S et entraîne un arrêt du cycle en G2 [218]. En outre, des travaux ont montré le rôle de la SUMO protéase SENP5 dans la division cellulaire. En effet, son inactivation par RNAi inhibe la prolifération cellulaire et engendre l'apparition de nombreuses cellules binuclées [64]. De même, dans la lignée cancéreuse prostatique LnCAP, l'inhibition de SENP1 diminue significativement la prolifération cellulaire alors que celle de SUSP4 (homologue de SENP2 chez la souris) provoque un effet contraire [178]. Enfin, SENP1 joue aussi un rôle dans la transition G1/S dans les cellules cancéreuses prostatiques PC-3 par régulation de la cycline D1 [39]. L'ensemble de ces données montre que la sumoylation est souvent impliquée dans la transition G1/S suggérant qu'elle pourrait réguler certains points de contrôle de cette transition.

b) Protéines cibles de SUMO

Des protéines importantes pour la régulation du cycle cellulaire sont des cibles de la sumoylation et cette modification a des conséquences sur leur fonction. Ainsi, la sumoylation affecte la protéine Rb et touche préférentiellement la forme hypophosphorylée de Rb qui inhibe le cycle cellulaire. La mutation du site de sumoylation augmente légèrement la capacité répressive de Rb sur un gène rapporteur E2F suggérant que la conjugaison de SUMO peut moduler la fonction de Rb dans la régulation du cycle cellulaire [176].

p53, autre protéine clé régulant le cycle cellulaire, est sumoylable. La sumoylation serait impliquée dans la régulation de la stabilité de p53 et augmenterait son activité

transcriptionnelle. De plus, elle serait nécessaire à son activité apoptotique optimale [92, 217, 256]. Toutefois, l'impact de SUMO sur l'activité de p53 reste controversé car d'autres études n'ont pas montré d'impact de la sumoylation sur les propriétés de la protéine [166]. Il est donc difficile de cerner l'importance de la sumoylation de p53 dans la régulation du cycle cellulaire.

4) Autres fonctions cellulaires

Les données issues de l'inactivation de protéines impliquées dans la voie de sumoylation ou la nature des protéines sumoylées ont aussi montré l'implication de la sumoylation dans des fonctions cellulaires autres que celles présentées ci-dessus. Nous allons brièvement évoquer les principales.

a) Différenciation cellulaire

Dans la lignée de kératinocytes humains HaCaT, un accroissement important, transitoire et coordonné des enzymes de la sumoylation est associé à une modification du profil général de conjugaison de SUMO lors du processus de différenciation induit par le calcium. Une fois les cellules différenciées, la sumoylation diminue [62]. Cette modification pourrait donc être un événement clé de la régulation du programme des étapes de différenciation des kératinocytes.

Lors de la myogenèse, la quantité de protéines sumoylées diminue progressivement au fur et à mesure de la différenciation. De manière intéressante, l'invalidation d'*ubc9* dans la lignée de myoblastes C2C12 compromet la différenciation terminale en myotubes. Comme précédemment, une augmentation de la sumoylation peut être nécessaire pour enclencher le processus de différenciation et l'inactivation d'*ubc9* empêcherait donc l'initiation du processus [254].

b) Apoptose

Chez l'embryon de souris, l'invalidation d'*ubc9* provoque une létalité embryonnaire très précoce (avant E7,5j), peu après le stade post-implantatoire. Lorsque les blastocystes *ubc9* $^{-/-}$ sont mis en culture, ils entrent rapidement en apoptose [221]. Ces données suggèrent un rôle important de la sumoylation pour la viabilité des cellules. De plus, lorsqu'un dominant négatif d'Ubc9 est surexprimé dans des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 implantées dans des souris nude, on observe une inhibition de la prolifération cellulaire et une apoptose accrue liée à une diminution de l'expression de Bcl2 [204]. Enfin, dans des fibroblastes dont la voie Rb est inactivée, la surexpression de PIASγ, et non de sa forme déficiente de son activité ligase, induit une apoptose dépendante de p53 [16].

c) Sénescence

La surexpression de PIASγ, contrairement à celle des autres PIAS, dans des fibroblastes humains normaux induit une sénescence prématurée dépendante des voies Rb et p53 et associée à l'activité SUMO ligase de PIASγ [16]. En accord avec ces données, la surexpression de SUMO2/3 est aussi responsable d'une sénescence prématurée des cellules HEK [182]. Le niveau d'expression des protéines de la voie de sumoylation semble donc important pour la régulation de la survie cellulaire et le contrôle de la sénescence. Cependant, le mécanisme liant la sumoylation et la sénescence n'est pas encore élucidé.

d) Horloge circadienne

Les cellules sont soumises à l'horloge circadienne dont la fonctionnalité est régulée par des facteurs de transcription [28]. Parmi ceux essentiels à l'horloge, BMAL1 est une cible de la sumoylation. De manière intéressante, le profil de sumoylation de BMAL1 suit le rythme circadien et est dépendant de la protéine CLOCK, partenaire de BMAL1. De plus, la surexpression d'un mutant non sumoylable de BMAL1 dans des cellules MEF *bmal1* $^{-/-}$ entraîne une accélération de l'horloge circadienne [28]. Cette étude met donc en avant le rôle de la sumoylation dans la régulation de l'horloge circadienne.

C. SUMO et tumorigenèse

De nombreuses protéines cibles de la sumoylation sont impliquées dans la tumorigenèse. Cette observation et la diversité des fonctions dans lesquelles SUMO est impliquée ont suggéré un rôle de la sumoylation dans la tumorigenèse (pour revue [108]). Par ailleurs, de nombreuses études ont montré des anomalies dans les niveaux d'expression des différentes protéines participant à la conjugaison de SUMO dans certains cancers. Ainsi, Ubc9 est surexprimée dans de nombreuses tumeurs comme les adénocarcinomes pulmonaires [200], les carcinomes ovariens [204] et les mélanomes [211]. PIAS3 est aussi surexprimée dans des tumeurs du poumon, du côlon, du cerveau et de la prostate [312]. Enfin, le taux d'ARNm de *senp1* dans des échantillons de prostate issus de tumeurs est supérieur à celui de tissus normaux ou d'adénomes thyroïdiens [39, 137]. Les souris transgéniques pour SENP1 présentent un développement de lésions semblables à des néoplasies intraépithéliales prostatiques [39]. L'ensemble de ces données suggère qu'un déséquilibre de la balance entre la sumoylation et la désumoylation puisse être un facteur important dans les processus cancéreux.

D. Régulation de la sumoylation

La sumoylation est un processus dynamique qui doit être finement régulé. A l'instar de l'ubiquitination, la conjugaison de SUMO est modulée par la phosphorylation. En outre, la

sumoylation est une modification post-traductionnelle des résidus lysine, et à ce titre, peut être modulée par un phénomène de compétition avec d'autres modifications affectant ces mêmes résidus.

1) La phosphorylation

a) Au niveau du motif de sumoylation

La première observation sur les relations phosphorylation-sumoylation est issue des études sur le facteur de transcription HSF1. L'exposition au stress induit la sumoylation de la lysine 298 de HSF1 et l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de la protéine. Cette lysine est en fait à proximité de deux résidus sérine phosphorylables. Deux équipes ont pu montrer que la phosphorylation de la sérine 303 est un prérequis à la sumoylation de HSF1 tandis que celle de la sérine 307 facilite la conjugaison de SUMO [118, 121].

Par la suite, la comparaison des sites de conjugaison de SUMO au niveau des facteurs de transcription HSF, MEF2A et GATA-1 co-régulés par la phosphorylation et la sumoylation a dévoilé un nouveau type de site de sumoylation. Ce motif ψKxE/DxxS/TP comprend le site consensus minimal de sumoylation et un résidu phosphorylable situé en aval. Il a été nommé PDSM pour Phosphorylation Dependent Sumoylation Motif [119]. Pour les protéines étudiées, la phosphorylation favorise la conjugaison de SUMO sur le résidu lysine adjacent. La kinase impliquée n'a pas toujours été identifiée mais il semble que sa nature (MAPK ou Cdk) puisse dépendre de la protéine cible considérée (pour revue [337]). Le facteur de transcription MEF2D se conforme aussi à la règle du PDSM. En effet, cette protéine nécessaire à la différenciation musculaire est conjuguée à SUMO2 sur la lysine 439 et est phosphorylée sur la sérine 444 par Cdk5. Ces deux événements conduisent à l'inhibition de son activité transcriptionnelle [98]. En fait, la phosphorylation de la sérine 444 est un prérequis à la sumoylation sur la lysine adjacente, la démonstration ayant été faite par l'utilisation de la calcineurine qui en déphosphorylant la sérine 444 inhibe alors la sumoylation [98]. Il est probable que la phosphorylation en aval du site de sumoylation mime l'effet de la présence de résidus acides dans cette région, à savoir favoriser l'interaction entre Ubc9 et la protéine cible [334].

b) Eloignée du motif de sumoylation

Il existe des exemples de régulation coordonnée par phosphorylation et sumoylation indépendamment du PDSM (pour revue [337]). Dans la plupart des cas, la phosphorylation s'accompagne alors d'une régulation négative de la conjugaison de SUMO. Ainsi, AIB1, un co-activateur de la famille SRC, est phosphorylé par différentes kinases. Un traitement par les œstrogènes conduit à une augmentation de la phosphorylation associée à une diminution de la sumoylation sans que le mécanisme impliqué soit défini [321]. De même, des études

portant sur MEF2D [97], c-Fos [22] ou encore Elk-1 [331] montrent clairement que la phosphorylation régule négativement la sumoylation des protéines étudiées. Le plus souvent, la kinase responsable de la phosphorylation et/ou les signaux régulateurs n'ont pas été identifiés et les mécanismes mis en œuvre ne sont pas connus.

2) Compétition avec d'autres voies de modification des lysines

a) Sumoylation et ubiquitination

La première évocation d'une possible compétition entre la sumoylation et d'autres modifications post-traductionnelles affectant les lysines est venue de l'étude de la protéine IκB. La phosporylation d'IκB induit en fait l'ubiquitination de la lysine 21, ce qui conduit la molécule vers sa dégradation. Cette modification défavorise alors la sumoylation de cette même lysine qui, au contraire, protège IκB de la dégradation [61]. Il n'y a pas vraiment une compétition entre la sumoylation et l'ubiquitination au niveau de la lysine 21 mais une régulation de la modification en fonction de la phosphorylation. Par la suite, NEMO, sous-unité régulatrice du complexe IKK, a offert un autre exemple de modifications post-traductionnelles séquentielles au niveau d'un même résidu lysine. La désumoylation de NEMO est corrèlée à l'augmentation d'une ubiquitination dépendante de la kinase ATM [128]. Toutefois, ATM ne semble pas requise pour la désumoylation de NEMO. Le mécanisme fin expliquant la cinétique de désumoylation/ubiquitination sur les mêmes résidus lysine reste encore à déterminer. Le dernier exemple connu à ce jour est la protéine PCNA. La lysine 164 de PCNA peut être soit ubiquitinylée soit sumoylée ce qui affecte la fonction de la protéine en mettant en jeu respectivement la formation d'un complexe soit de réparation soit de réplication [105, 122]. Toutefois, les voies de signalisation précises conduisant à l'une ou l'autre conjugaison ne sont pas connues, même si l'ubiquitination semble induite par les dommages à l'ADN. Une étude récente indique que, chez la levure, les deux systèmes de modification ne semblent pas en compétition puisqu'aucun des systèmes n'est affecté par une mutation perte de fonction de l'autre [238].

Aucun exemple de compétition entre SUMO et ubiquitine n'a pour le moment été évoqué pour des facteurs de transcription. Le rôle de l'ubiquitination dans la régulation de la transcription est encore flou bien que la monoubiquitination ait été associée à l'activation transcriptionnelle des protéines [187]. Comme la sumoylation est souvent synonyme d'inhibition de l'activité transcriptionnelle, une compétition entre ces deux modifications post-traductionnelles pourrait exister et permettre une régulation fine de l'activité de certains facteurs de transcription.

Très récemment, une relation entre les voies de sumoylation et d'ubiquitination vient d'être décrite simultanément par deux équipes différentes [250, 288]. Des protéines

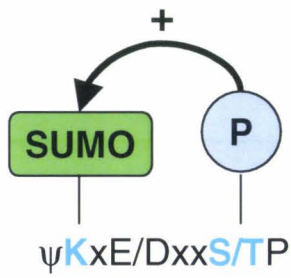
appelées STUbL (SUMO-Targeted Ubiquitin Ligase) sont impliquées dans la reconnaissance et l'ubiquitination des protéines sumoylées. Cette famille de protéines est conservée à travers l'évolution et chez les Mammifères, l'ubiquitine ligase RNF4 en est la représentante. La manière dont les protéines sumoylées sont reconnues par les STUbL n'est pas clairement définie mais il est probable que SUMO serve de palte-forme de recrutement. En effet, les STUbL présentent des motifs SBM capables de recuter SUMO. Les deux équipes s'accordent sur le fait que ces enzymes peuvent induire soit la dégradation ou la désumoylation des cibles ubiquitinylées [250, 288]. De manière intéressante, l'inhibition du protéasome chez l'Homme ou la levure entraîne une accumulation de protéines à la fois sumoylées et ubiquitinylées suggérant que la poly-sumoylation puisse être reconnue comme un signal de dégradation [306].

b) Sumoylation et acétylation

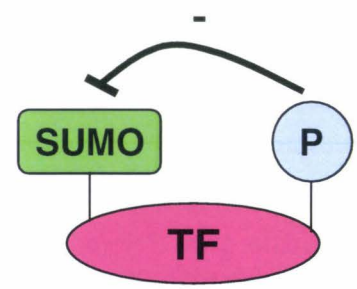
La sumoylation peut entrer en compétition avec l'acétylation mais ce phénomène n'a été observé que pour un nombre réduit de facteurs de transcription. NF-IL6β est régulé par la sumoylation et acétylation et est probablement le mieux décrit en ce qui concerne la séquentialité des modifications post-traductionnelles. La mutation de la lysine 120 entraîne un gain d'activité du facteur sur le promoteur *cox-2* suggérant une inhibition de l'activité transcriptionnelle de NF-IL6β par la sumoylation [311]. Cette mutation diminue également très fortement l'acétylation dépendante de l'activité acétyltransférase de p300, acétylation nécessaire à l'activation transcriptionnelle de la protéine. Cette diminution de l'acétylation pourrait être liée à un défaut de recrutement de p300 car p300 est incapable d'interagir *in vitro* avec la forme sumoylée de NF-IL6β. Le modèle de régulation proposé est que la sumoylation du facteur provoque une inactivation du gène *cox-2*. Sous l'impulsion de l'EGF, il y aurait une désumoylation permettant le recrutement de p300 et donc l'acétylation de NF-IL6β qui conduirait finalement à l'activation du gène *cox-2* [311].

Une compétition sumoylation-acétylation a aussi été suggérée pour le facteur de transcription Sp3 car la lysine 539 est acétylée et représente un site majeur de sumoylation [259]. Une situation similiare a été décrite pour les facteurs de transcription PLAG1 [341], MEF2 [340] et HIC1 [282]. Dans ces deux derniers cas, la surexpression de HDAC4 stimule la sumoylation sans que le mécanisme impliqué ne soit clairement défini puisqu'elle ne participe pas à la désacétylation du résidu lysine. A ce jour, aucune démonstration claire ne prouve la compétition directe entre l'acétylation et la sumoylation. Les études précédentes montrent que certaines lysines sumoylables sont aussi acétylables et il serait intéressant de savoir si ces deux modifications sont exclusives l'une de l'autre ou séquentielles comme dans le cas de NF-IL6β.

Phosphorylation



Activation
(cas du PDSM)



Inhibition

Modifications de lysines

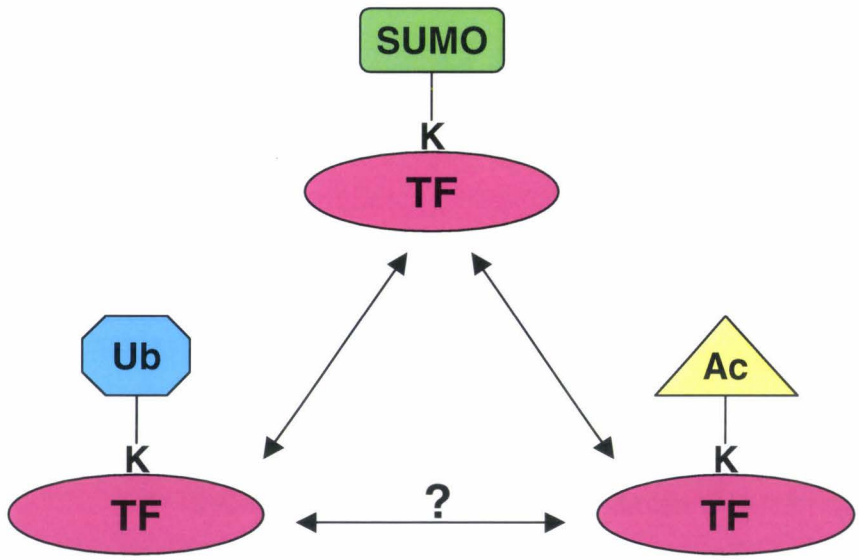


Figure 14 : Régulation de la sumoylation par d'autres modifications post-traductionnelles. TF représente un facteur de transcription. P symbolise un groupement phosphate, Ub l'Ubiquitine et Ac un groupement acétyl. Le point d'interrogation signale une compétition qui n'a pas encore été démontrée.

c) Conclusion

Il est maintenant clairement établi que la phosphorylation est une modification post-traductionnelle régulant la sumoylation (fig. 14). Elle est prérequise pour la conjugaison de SUMO dans le cadre des PDSM et plutôt inhibitrice lorsqu'elle se fait à « distance » du site de sumoylation. A l'inverse, il n'a encore jamais été montré que la phosphorylation pouvait être dépendante de la sumoylation *in vivo*. Un tel phénomène peut être envisagé car l'encombrement stérique lié à SUMO pourrait masquer des sites de phosphorylation ou des sites d'interaction avec des kinases. Dans ce sens, un travail très récent sur une protéine de fusion entre Ubc9 et STAT1 a indiqué que la phosphorylation de la tyrosine 701 de STAT1 semble être inhibée par la sumoylation de la lysine adjacente [138].

Face à d'autres modifications post-traductionnelles de résidus lysine, l'accent s'est principalement porté sur la compétition entre la conjugaison de SUMO et l'acétylation ou l'ubiquitination (fig. 14). Même s'il existe peu d'exemples de compétition directe, un mécanisme de compétition pourrait s'appliquer pour de nombreux facteurs de transcription. Les résidus lysine sont aussi la cible d'autres modifications comme la méthylation (touchant notamment les histones) ou la conjugaison d'autres membres de la famille de l'ubiquitine. Aucune donnée n'est actuellement disponible quant à la relation possible entre sumoylation et ces autres modifications. Il est néanmoins probable que les relations entre les différentes modifications post-traductionnelles soient fondamentales dans les mécanismes fins mis en jeu dans la régulation de l'activité des facteurs de transcription.

E. Facteurs ETS et sumoylation

1) Les répresseurs de la famille ETS

a) TEL

Le répresseur TEL est le premier membre de la famille ETS décrit comme cible de la sumoylation [31]. Cette protéine co-localise avec SUMO1 et est retrouvée dans des corps nucléaires dont la fonctionnalité n'est pas connue. La sumoylation de la lysine 99 semble conditionner cette localisation car la mutation de ce résidu entraîne une délocalisation nucléaire diffuse [31]. TEL est localisée dans le noyau mais cette protéine est aussi faiblement détectée dans le cytoplasme [320]. Cette localisation cytoplasmique pourrait concerner la forme sumoylée de TEL puisque la mutation du site de sumoylation décroît son exportation nucléaire. Par ailleurs, le mutant non sumoylable de TEL est aussi un répresseur transcriptionnel plus efficace que la forme sauvage. La capacité répressive de TEL pourrait être donc régulée par la sumoylation et l'exportation nucléaire [320].

b) Net

Parmi les autres répresseurs de la famille ETS, seul Net est actuellement défini comme une protéine sumoylable. La répression transcriptionnelle exercée par cette protéine est liée à deux domaines inhibiteurs : l'un est autonome (NID) tandis que l'autre est dépendant de CtBP1 (CID) [315]. La lysine 162 se trouvant dans le NID est le site majeur de sumoylation et dans le système hétérologue Gal4, la sumoylation augmente l'activité répressive de ce domaine. Par ailleurs, il faut remarquer que Net est un répresseur qui est converti en activateur suite à sa phosphorylation par les MAP kinases. Dans ce contexte, la sumoylation diminue l'activation dépendante de la voie Ras [315]. La sumoylation semble donc pouvoir réguler le passage de Net de l'état de répresseur à celui d'activateur transcriptionnel.

2) Les activateurs de la famille ETS

a) Elf4

Elf4/ MEF est un facteur de transcription qui est sumoylable [287]. La mutation du site de sumoylation augmente son activité transcriptionnelle tandis que la surexpression de SUMO et Ubc9 provoque une diminution de celle-ci. De manière cohérente, lorsque la sumoylation d'Elf4 est favorisée, sa présence au niveau d'un promoteur cible endogène est diminuée [287]. La sumoylation de Elf4 pourrait donc affecter négativemant son affinité à l'ADN ou délocaliser la protéine vers des zones transcriptionnellements inactives.

b) Elk-1

L'activation des MAP kinases conduit à la phosphorylation du domaine transactivateur d'Elk-1 et participe ainsi à l'activation de la protéine. En amont du domaine transactivateur se trouve un motif de répression transcriptionnelle, le motif R. Ce motif contient deux lysines (K230 et K249) conjuguables à SUMO [331]. La lysine 249 est le site majeur de sumoylation et cette modification est nécessaire à l'activité inhibitrice du motif R [331]. Alors que la phosphorylation ERK-dépendante d'Elk-1 augmente, la sumoylation diminue de manière simultanée montrant ainsi une relation temporelle entre phosphorylation et sumoylation. En fait, la sumoylation du motif R favorise le recrutement de HDAC2 alors qu'une désumoylation induite par divers moyens (dominant négatif Ubc9 ou induction de la phosphorylation) corrèle avec une perte d'interaction avec cette HDAC et une augmentation de l'acétylation de l'histone H4 au niveau des promoteurs répondant au facteur Elk-1 [332].

Cette régulation sumoylation dépendante d'Elk-1 fait intervenir PIASxα et se trouve sous la dépendance des voies de signalisation ERK et p38 [333]. En effet, Elk-1 interagit avec la SUMO ligase PIASxα mais celle-ci n'est pas responsable de la sumoylation du

facteur de transcription. Selon la nature de la voie de signalisation activée, l'interaction Elk-1/ PIAS xα aura des effets opposés. Suite à l'activation de la voie ERK, PIASxα favoriserait la désumoylation d'Elk-1 indépendamment de son activité ligase. Elle défavoriserait l'interaction du facteur de transcription avec HDAC2 et potentialiserait l'action de CBP/p300 conduisant ainsi à l'activation transcriptionnelle de Elk-1 [333]. Par contre, l'activation de la voie de signalisation p38 réduirait l'activation d'Elk-1 car PIASxα phosphorylée maintiendrait la sumoylation et le complexe avec HDAC2 [335]. PIASxα agirait donc comme un intégrateur de différentes voies de signalisation permettant ainsi une régulation fine des gènes dépendants du facteur de transcription Elk-1 (fig. 15).

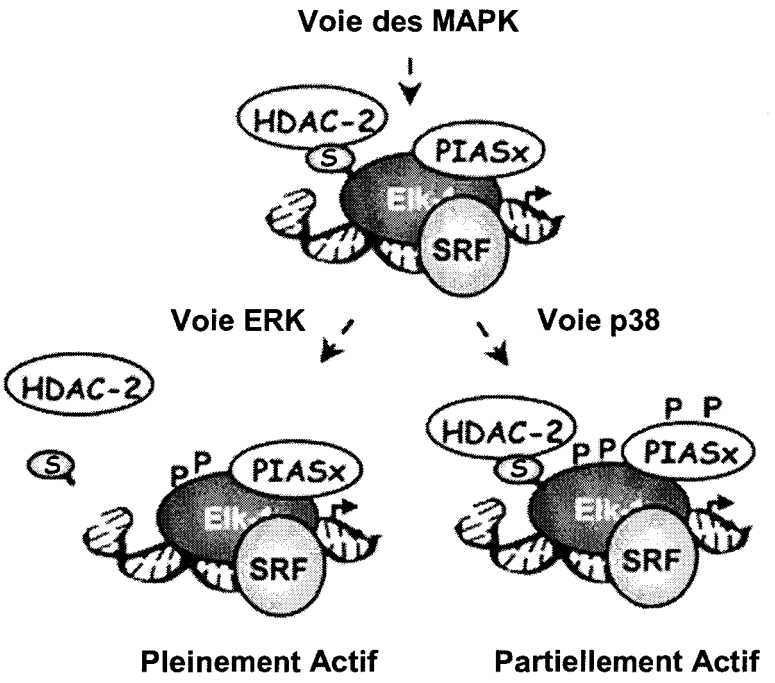


Figure 15 : Modèle d'action de PIASxα en fonction des voies MAPkinases activées sur l'activité du facteur de transcription Elk-1.
S représente SUMO. P un groupement phosphate. D'après Yang et al, 2006 [335].

c) Ets-1

Très tôt, une interaction entre Ets-1 et Ubc9 a été montrée sans qu'aucune conséquence fonctionnelle ne soit décrite [103]. Récemment, nous avons montré qu'Ets-1 est sumoylée sur deux résidus lysine et que la sumoylation inhibe son activité transcriptionnelle. En outre, nous avons mis en évidence que PIASγ est une SUMO ligase responsable de la conjugaison de SUMO à Ets-1 [144]. Ces données ont été confirmées par un autre groupe qui a aussi montré que PIASγ réprime l'activité transcriptionnelle d'Ets-1 indépendamment du statut de sumoylation de ce dernier [227]. PIASγ régule également positivement la stabilité d'Ets-1 en bloquant sa dégradation par le protéasome sans moduler

son ubiquitination [229]. Enfin, une étude structurale par RMN indique que la liaison covalente de SUMO à Ets-1 ne perturbe pas la conformation du facteur de transcription [196].

d) Fli-1

Le cas de la sumoylation de Fli-1 est assez particulier. En effet, Fli-1 est sumoylée sur la lysine 67 mais aucune conséquence fonctionnelle n'a été mise en évidence [307]. Par contre, l'étude réalisée montre que l'interaction spécifique de Fli-1 avec la SUMO-ligase PIASxα délocalise une partie de Fli-1 dans des corps nucléaires et inhibe son activité transcriptionnelle. Ce phénomène est cependant indépendant de la sumoylation de Fli-1 puisque le mutant non sumoylable se comporte de la même manière que la protéine sauvage [307].

F. Conclusion

La conjugaison de SUMO est une modification post-traductionnelle qui concerne un nombre croissant de protéines et plus particulièrement les facteurs de transcription. La sumoylation est très souvent associée à des phénomènes d'inhibition de l'activité transcriptionnelle et elle intervient dans de nombreuses fonctions cellulaires. Toutefois, les mécanismes mis en jeu par la conjugaison de SUMO et les voies de signalisation qui induisent cette modification sont encore mal connus. La sumoylation peut affecter directement les propriétés intrinsèques des facteurs de transcription cibles (stabilité, localisation subcellulaire, affinité pour l'ADN) et/ou moduler l'activité transcriptionnelle des protéines cibles. La conjugaison de SUMO peut avoir des effets variés et complexes comme dans le cas des facteurs de transcription Elk-1 [331, 332] et Smad4 [179, 184, 191] qui sont affectés dans leur localisation subcellulaire et leur capacité transcriptionnelle.

En ce qui concerne les protéines ETS, très peu de données concernant leur sumoylation étaient disponibles au début de mon travail de thèse. Seule la sumoylation des facteurs de transcription TEL [31, 320] et Elk-1 [331, 332] avait été décrite. Rien n'était connu concernant les membres du groupe PEA3 en dehors du fait que lors d'un crible double hybride en cellules de levure réalisé dans le laboratoire, Ubc9, l'enzyme de conjugaison de SUMO, a été trouvée parmi les interacteurs d'ERM. L'hypothèse selon laquelle l'activité des protéines du groupe PEA3 pouvait être modulée par la conjugaison de SUMO était donc séduisante. Mon travail de thèse a donc consisté à démontrer qu'ERM pouvait être une cible de la voie de conjugaison de SUMO et à définir les conséquences de cette modifcation sur l'activité de ce facteur de transcription.

Résultats

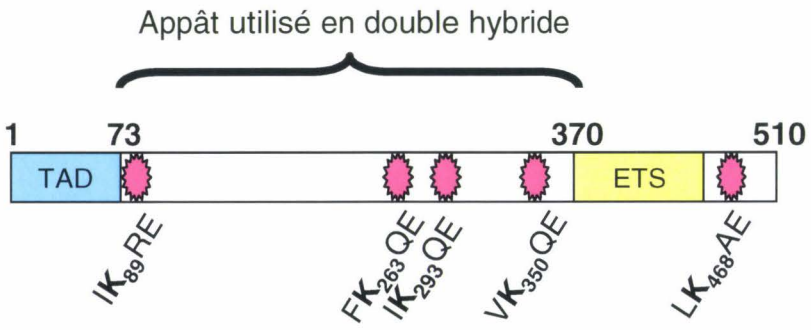


Figure 16 : Localisation du domaine d'ERM utilisé comme appât dans le système double hybride et position des sites consensus de sumoylation.
TAD : domaine transactivateur. ETS, domaine de liaison à l'ADN. Les sites consensus de sumoylation sont représentés en rose et la position des lysines conjugables à SUMO est indiquée.

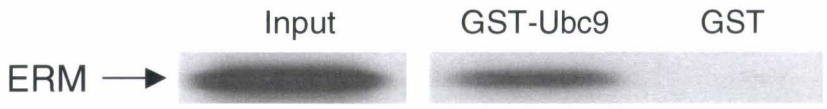


Figure 17 : ERM interagit *in vitro* avec Ubc9.
ERM est produit *in vitro* en lysat de réticulocytes et marqué par l'incorporation de méthionine ^{35}S. Le lysat exprimant ERM est mis en contact avec les protéines GST et GST-Ubc9 immoblisées sur des billes de glutathion-sépharose. L'input correspond à 10% du lysat mis en contact avec les billes. La présence d'ERM est détectée par autoradiographie.

I. Sumoylation et répression de l'activité d'ERM

Avant mon arrivée au laboratoire, une recherche de partenaires pour le facteur de transcription ERM a été menée par l'utilisation du système double hybride chez la levure. Le domaine d'ERM utilisé pour l'expérience est la région couvrant les acides aminés 73 à 370. Comme l'illustre la figure 16, cette région ne contient ni les domaines transactivateurs (TAD) de la protéine ni le domaine ETS, choix lié à la nécessité d'utiliser une protéine appât transcriptionnellement inactive et à la volonté d'obtenir des partenaires spécifiques d'ERM par l'élimination des régions les plus conservées dans les protéines du groupe PEA3. Une banque de cDNA humains issus de la rétrotranscription des ARN messagers isolés de la glande mammaire a été criblée en utilisant ce domaine et parmi les clones isolés, certains correspondaient au gène *ubc9* codant l'enzyme de conjugaison de SUMO.

L'interaction entre ERM et Ubc9 observée en levure a été confirmée *in vitro* par des expériences de GST pull-down (C. Beaudoin, non publié). Comme l'illustre la figure 17, nous avons également établi cette interaction par des expériences similaires en utilisant une protéine GST-Ubc9 immobilisée sur des billes de glutathion-sépharose et ERM produit *in vitro* en lysat de réticulocytes. En effet, ERM interagit spécifiquement avec la fusion Ubc9 et non avec la protéine GST seule. Nous avons cherché à confirmer l'existence d'un complexe ERM/Ubc9 *in vivo*. Cependant, dans des cellules surexprimant transitoirement ERM et Ubc9, nous n'avons pas réussi à démontrer l'existence de ce complexe par co-immunoprécipitation en utilisant des anticorps dirigés contre ERM ou Ubc9. Il est envisageable qu'*in vivo* cette interaction soit trop transitoire pour permettre la visualisation du complexe ERM/ enzyme de conjugaison.

ERM interagit donc avec la seule enzyme de conjugaison de SUMO et de manière intéressante, ce facteur de transcription contient cinq sites consensus de sumoylation (ψKxE/D) dont quatre sont présents dans l'appât utilisé dans le système double hybride (fig. 16). Ces observations nous ont amenés à rechercher dans quelle mesure ERM pouvait être une cible de la sumoylation. Les résultats de cette étude ont été publiés dans *The Journal of Biological Chemistry*. Nous avons tout d'abord montré par des tests de sumoylation *in vitro* qu'ERM pouvait être conjuguée à SUMO (article 1, fig. 1A). Cette donnée a également été confirmée dans un contexte cellulaire. En effet, en co-exprimant ERM et SUMO, nous avons détecté par Western-blot l'existence de plusieurs signaux correspondant à des formes sumoylées d'ERM (article 1, fig. 1B). Nous avons alors cherché à identifier les sites conjugables à SUMO parmi les cinq sites consensus de la protéine. La mutation ponctuelle de chacun des sites n'abolit pas la conjugaison de SUMO sur ERM. Nous avons ensuite combiné les mutations et seule la protéine mutée sur les quatres premiers sites

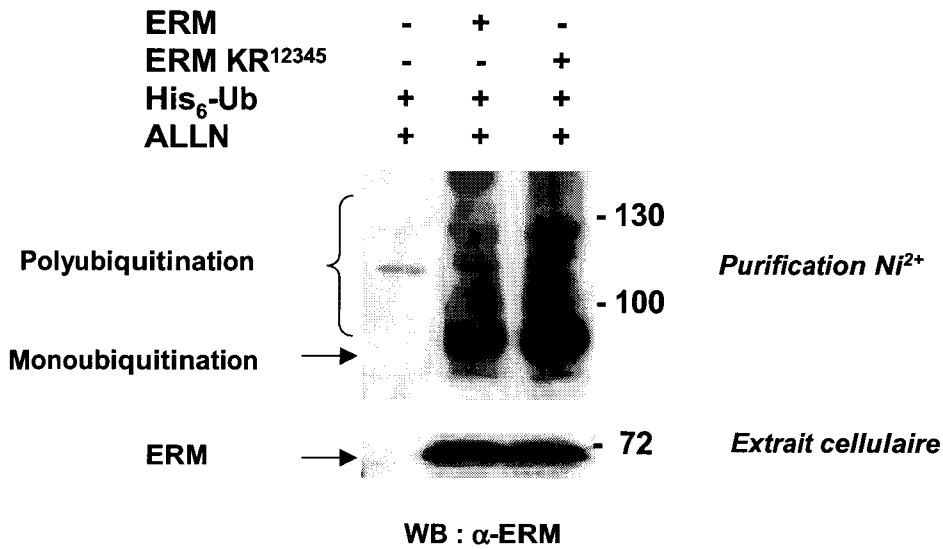


Figure 18 : La mutation des sites de sumoylation n'affecte pas l'ubiquitination d'ERM. Des cellules COS-7 ont été transfectées par les plasmides exprimant ERM sauvage ou non sumoylable (KR^{12345}) et His_6-ubiquitin (Ub) puis traitées 16h avec un inhibiteur du protéasome (ALLN). Les extraits cellulaires ont été préparés et les protéines conjuguées à l'ubiquitine ont été purifiées sur billes de Ni^{2+} (purification Ni^{2+}) et analysées par Western-blot avec un anticorps anti-ERM.

n'est plus significativement modifiée indiquant qu'ERM contient quatre sites majeurs de sumoylation (article 1, fig. 2B). Nous n'avons toutefois pas pu montrer la sumoylation de la protéine endogène. Celle-ci est trop faiblement exprimée dans les cellules et les formes sumoylées ne représentent qu'une très faible proportion de la protéine. Nous avons cependant établi qu'une stimulation par H_2O_2 est capable d'induire la sumoylation d'ERM exogène sans surexpression de SUMO dans les cellules COS-7 (article 1, fig. 3) mettant ainsi en évidence qu'ERM est une cible de la voie de sumoylation endogène suite à un stress cellulaire.

Nous avons ensuite analysé l'impact de la sumoylation sur l'activité d'ERM. Pour cela, nous avons comparé l'activité de la protéine sauvage à celle de la protéine mutée sur l'ensemble des sites consensus de sumoylation. Ce mutant a une activité transcriptionnelle nettement supérieure à la forme sauvage sur des promoteurs cibles d'ERM (article 1, fig. 4A). Nous avons également mesuré l'impact fonctionnel de molécules interférant négativement avec la voie de conjugaison de SUMO sur l'activité d'ERM sauvage (article 1, fig. 7). Nous avons ainsi surexprimé une SUMO-protéase, SENP1, responsable de l'élimination de SUMO conjugué à certains substrats (pour revue [108]), une protéine virale, Gam1, connue pour bloquer l'enzyme d'activation de SUMO et délocaliser SUMO dans le cytoplasme [44] ou encore un dominant négatif d'Ubc9 [13] (donnée non montrée). La surexpression de ces protéines augmente l'activité transcriptionnelle d'ERM sans affecter significativement celle du mutant non sumoylable. L'ensemble de ces résultats s'accorde parfaitement avec le fait que la sumoylation inhibe l'activité du facteur de transcription.

Afin d'expliquer le gain d'activité de la forme non sumoylable d'ERM, nous avons cherché à établir l'impact de la mutation des sites consensus de sumoylation sur les propriétés d'ERM. Par immunofluorescence, nous n'avons observé aucun changement de localisation intracellulaire entre ERM et sa forme non sumoylable dans les cellules transfectées (article 1, fig. 4B). Par des expériences de retard sur gel, nous avons comparé la fixation sur l'ADN d'ERM avec celle de sa forme sumoylée *in vitro* et nous n'avons constaté aucune différence significative (article 1, fig. 5B). Nous avons finalement testé l'influence de la sumoylation sur la stabilité du facteur de transcription. Des cellules co-exprimant SUMO et ERM muté ou sauvage ont été traitées à la cycloheximide afin de déterminer la demi-vie d'ERM non modifiée et de ses formes sumoylées. Nous n'avons observé aucune différence significative de stabilité entre les différentes formes de la protéine (article 1, fig. 5A). Enfin, en accord avec l'absence d'effet sur la stabilité, nous n'avons pas mis en évidence de diminution du niveau d'ubiquitination d'ERM suite à la mutation des sites consensus de sumoylation (fig. 18). Cette donnée suggère donc que les sites de sumoylation

ne sont pas des sites majeurs d'ubiquitination et que la sumoylation ne régule pas la dégradation ubiquitine-protéasome dépendante d'ERM.

Nos résultats indiquent clairement qu'ERM est sumoylable et que cette modification régule négativement son activité. Le gain d'activité obtenu avec le mutant non sumoylable d'ERM n'est lié ni à une délocalisation de la protéine, ni à une diminution de son affinité pour l'ADN ou encore à un défaut de stabilité. L'ensemble de ces données suggère donc que la conjugaison de SUMO joue probablement un rôle dans l'inhibiton de la capacité transactivatrice d'ERM.

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Vol. 280, No. 26, Issue of July 1, pp. 24330–24338, 2005
Printed in U.S.A.
© 2005 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

SUMO Modification of the Ets-related Transcription Factor ERM Inhibits Its Transcriptional Activity*

Received for publication, October 1, 2004, and in revised form, March 29, 2005
Published, JBC Papers in Press, April 27, 2005, DOI 10.1074/jbc.M411250200

Cindy Degerny‡§, Didier Monte‡, Claude Beaudoin‡¶, Ellis Jaffray‖, Laurence Portois‡, Ron T. Hay‖, Yvan de Launoit‡ ‡‡§§, and Jean-Luc Baert‡

From the ‡UMR 8117, CNRS, Université de Lille I, Institut Pasteur de Lille, Institut de Biologie de Lille, BP 447, 1 rue Calmette, 59021 Lille Cedex, France, the ‖School of Biology, University of St. Andrews, The North Haugh, St. Andrews KY16 9ST, United Kingdom, and ‡‡Laboratoire de Virologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, CP 614, 808 route de Lennik, 1070 Brussels, Belgium

A variety of transcription factors are post-translationally modified by SUMO, a 97-residue ubiquitin-like protein bound covalently to the targeted lysine. Here we describe SUMO modification of the Ets family member ERM at positions 89, 263, 293, and 350. To investigate how SUMO modification affects the function of ERM, Ets-responsive intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and E74 reporter plasmids were employed to demonstrate that SUMO modification causes inhibition of ERM-dependent transcription without affecting the subcellular localization, stability, or DNA-binding capacity of the protein. When the adenoviral protein Gam1 or the SUMO protease SENP1 was used to inhibit the SUMO modification pathway, ERM-dependent transcription was de-repressed. These results demonstrate that ERM is subject to SUMO modification and that this post-translational modification causes inhibition of transcription-enhancing activity.

Covalent modification of proteins with ubiquitin-like proteins creates new proteins with unique protein surfaces that can mediate a range of protein-protein interactions (reviewed in Ref. 1). Modification of proteins by the small ubiquitin-related modifier (SUMO) is increasingly recognized as an important regulatory mechanism that can affect the stability, subnuclear localization, and transcription-activating capacity of the protein (reviewed in Refs. 1 and 2). Several transcription factors are reported to undergo SUMO modification, including the androgen receptor (3, 4), c-Myb (5), AP-2 (6), and c-Jun and p53 (7). In addition, other transcriptional regulators, such as GRIP (8) and histone deacetylases 1 (9) and 4 (10), are also SUMO targets (the currently established targets of SUMO are reviewed in Ref. 1). Three different types of enzyme constitute the SUMO pathway: ubiquitin-activating enzyme (E1),[1] ubiquitin-conjugating enzyme or carrier protein (E2), and ubiquitin-protein isopeptide ligase (E3). Although Ubc9 is the only E2 (conjugating enzyme) found in humans, multiple E3 ligases have recently been identified. SUMO modification is a reversible process, and several SUMO proteases have been identified in mammalian cells (reviewed in Ref. 1).

In mammals, the *ets* genes encode a large family of transcription factors, characterized by their ETS DNA-binding domain. On the basis of conservation of this and other domains, these factors have been subclassified into 13 groups (for a review, see Ref. 11). Some Ets transcription factors have been identified as targets of SUMO. For instance, Elk-1 is modified by SUMO, a modification that is reversed by signaling via the prototype extracellular signal-regulated kinase (ERK) MAPK pathway, which induces a switch from the repressed to the transcriptionally active state (12, 13). SUMO modification of Elk-1 results in the recruitment of histone deacetylase activity to promoters; this indicates the existence of an important integration point for two protein-modifying pathways in the cell, the SUMO and deacetylation pathways, which combine to promote inhibition of transcription-enhancing activity (14). SUMO has also been shown to enhance the recruitment of the Ets transcription factor Tel into repressive domains such as the PML bodies (15–17).

The three PEA3 group members (PEA3/E1AF, ER81/ETV1, and ERM/ETV5) show high conservation of their ETS domain and of the two transcriptional activation domains (reviewed in Ref. 18). These factors are involved in a number of developmental processes. For example, they play a role in the organization of the germ layers showing high proliferation and migration rates (19) and in the development of motor and sensory neurons (20, 21). These factors have also been found to be deregulated in cancer and are over-expressed in metastatic human breast cancer cells (22) and Neu-induced mouse mammary tumors (23, 24).

Post-translational modifications such as phosphorylation regulate the function of the PEA3 group members. In particular, components of the MAPK pathway have been found to

* This work was supported in part by grants from the "Centre National de la Recherche Scientifique" (France), the "Institut Pasteur de Lille," the "Association pour la Recherche contre le Cancer" (France), the "Ligue Nationale Contre le Cancer" (Comité Nord, France), the "Fonds National de la Recherche Scientifique" (Belgium), the "Action de Recherche Concertée, Communauté Française de Belgique" (Belgium) the Conseil Régional Nord/pas-de-Calais (France), and the European Regional Development Fund. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Supported by a Ph.D. grant from the French Research Ministry.

¶ Recipient of a postdoctoral fellowship from the Canadian Institutes of Health Research. Present address: CNRS UMR 6547, Equipe Physiologie Comparée et Endocrinologie Moléculaire, Université Blaise Pascal Clermont II, Campus Universitaire des Cézeaux, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière, France.

** Laboratory supported by the Biology and Biotechnology Research Council (UK).

§§ To whom correspondence should be addressed: UMR 8117 CNRS, Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, Université de Lille 1, 1 rue du professeur Calmette, 59021 Lille Cedex, France. Tel.: 33-320-87-11-17; Fax: 33-320-87-11-11; E-mail: yvan.delaunoit@ibl.fr.

[1] The abbreviations used are: E1, ubiquitin-activating enzyme; E2, ubiquitin-conjugating enzyme; E3, ubiquitin-protein isopeptide ligase; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ICAM, intercellular adhesion molecule; KR^{12345}, K89R,K263R,K293R,K350R,K468R; EA^{12345}, E89A,E263A,E293A, E350A,E468A; CPB, CREB-binding protein; CREB, cAMP-response element-binding protein.

This paper is available on line at http://www.jbc.org

Downloaded from www.jbc.org at Institut Pasteur de Lille on July 9, 2007

increase the transactivation capacity of these factors. This suggests that these factors may contribute to the nuclear response to cell stimulation and also to Ras-induced transformation (25–30). The c-Jun NH_2-terminal kinase/ stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) and cAMP-dependent protein kinase (PKA) pathways are also involved in regulating the transcription-enhancing activity of the PEA3 group members (30–32).

In the present study we have investigated whether ERM undergoes SUMO modification. We show that of the five putative SUMO modification sites of this protein, the first four can be conjugated to SUMO. We present the results of functional studies showing that this post-translational modification can inhibit ERM transcription-enhancing activity.

MATERIALS AND METHODS

Yeast Two-hybrid Screen—The yeast two-hybrid screening was performed with the MATCHMAKER two-hybrid system as recommended by the manufacturer (Clontech). A DNA fragment encoding amino acids 72–370 of ERM was generated by PCR amplification and subcloned in-frame with the LexA DNA-binding domain contained in the yeast expression vector pLexA (Clontech) at the EcoRI restriction site. The resulting plasmid was transformed using a standard polyethylene glycol/LiAc-mediated transformation procedure into the EGY48 strain of yeast. An oligo(dT)-primed mammary gland cDNA library (Clontech) constructed in the yeast galactose-inducible expression plasmid pB42AD was introduced into the EGY48 yeast strain harboring the pLexA-ERM construct. The resulting co-transformants were grown at 30 °C in the absence of histidine, tryptophan, and uracil (selective minimal media). A total of 3×10^6 clones were screened for the capacity to grow on selective minimal media. Colonies growing in the absence of leucine and scoring positive for β-galactosidase activity by the filter assay method were directly recovered from the plate and grown in selective media lacking leucine. cDNA inserts from the positive yeast colonies were electrotransformed into KC8 *Escherichia coli* tryptophan auxotrophic bacterial cells. Transformants were grown on M9 (−Trp, −Amp) minimal medium to select for plasmids containing the pB42AD vector. The cDNA inserts were then sequenced by automated sequence analysis (ABI sequence analyzer).

Plasmid Constructs—The full-length and amino-terminal truncated pSG5-ERM expression vectors and the pSV-HA-ERM vector have been described elsewhere (32). The 5′ FLAG-tagged ERM vector (pSV-FLAG-ERM) was constructed using the ERM cDNA and the pSV plasmid used previously (33) (details are available upon request). The various ERM mutants (Lys to Arg and Glu to Ala) were generated with a QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and verified by DNA sequencing. His_6-SUMO-1, -SUMO-2, and -SUMO-3 expression plasmids have been described elsewhere (34). As luciferase reporter plasmids, we used the 3xE74-tk-Luc vector (25) and the $ICAM_{WT}$-Luc vector corresponding to the wild-type human ICAM-1 promoter fragment (bp −44 to −178) (Ets binding sites at positions −158 and −138) (35). The pSG5-βGal vector was used to normalize transfections (32). SENP1 and $SENP1^{mut}$ expression vectors were kindly provided by Dr E. T. H. Yeh (University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston) (36) and the Gam1 and $Gam1^{mut}$ expression vectors were a gift from Dr S. Chiocca (European Institute of Oncology, Milan, Italy).

Cell Culture and Transfections—Rabbit kidney (RK13), monkey kidney (COS-7), and human cervix (HeLa) carcinoma cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (Invitrogen) and cultured at 37 °C in water-saturated 5% CO_2 atmosphere. 1.5×10^5 RK13 or HeLa cells/well were plated in 12-well plates, and the next day transient transfections were performed using the polyethyleneimine Exgen 500 procedure (Euromedex) using 150 ng of DNA/well including 25 ng of reporter plasmid, 10 ng of pSV expression vector, and 10 ng of β-galactosidase expression vector. When indicated, 20 ng of the plasmids expressing the wild-type or mutated SUMO-interfering molecule were used. Luciferase activity was determined 24 h after transfection and normalized with respect to the β-galactosidase activity (used as a measure of the transfection efficiency) as described previously (35). The data presented are means ± S.E. of at least three independent experiments. To detect SUMO-modified forms of ERM, COS-7 or RK13 cells were transfected with 300 ng of ERM expression plasmid and, when indicated, with 700 ng of His_6-tagged SUMO-1, -2, or -3 plasmids. After 24 h, cells were rinsed with phosphate-buffered saline and lysed in immunoprecipitation, immunoblot, or Ni^{2+} purification buffers. For the determination of protein half-life, COS-7 cells were transfected with ERM and SUMO-2 plasmids for 24 h and then treated with 80 μg/ml cycloheximide (Sigma). After the indicated time, cells were processed for Western blotting.

Immunoprecipitation and Western Blot Analyses—Cells transfected with FLAG-tagged ERM were treated with 100 mM H_2O_2 for 20 min and lysed in phosphate-buffered saline containing 1% SDS, 10 mM iodoacetamide, and protease inhibitors. After the addition of 9 volumes of phosphate-buffered saline containing 1% Triton X-100 and 10 mM iodoacetamide, the cellular extract was centrifuged at $100,000 \times g$ for 30 min at 4 °C. The supernatant was then immunoprecipitated with anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma) overnight at 4 °C. After washing, the immunopurified proteins were eluted with Laemmli sample buffer and analyzed by SDS-PAGE. Prestained broad-range molecular weight markers (New England BioLabs) were used as standards in each SDS-PAGE. Proteins were then electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes. Immunoblot analyzes were performed with the rabbit anti-ERM antibodies (22) or with the purified rabbit polyclonal antibodies against SUMO-1 or SUMO-2/3 (Abgent) followed by treatment with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Immune complexes were visualized by enhanced chemiluminescence according to manufacturer's instructions (Santa Cruz Biotechnology).

Identification of His-SUMO-ERM Conjugates—Transfected cells were lysed in denaturing buffer containing 6 M guanidine hydrochloride. His_6-SUMO conjugates were purified by metal-chelate affinity chromatography as described previously (37). Briefly, cells plated in 6-well plates were washed twice in ice-cold phosphate-buffered saline and lysed in 400 μl of lysis buffer (6 M guanidine hydrochloride, 0.1 M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, pH 8.0, 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0)/35-mm well. The lysates were centrifuged at $100,000 \times g$ for 90 min at 4 °C. Each sample was mixed with 20 μl of packed Ni^{2+}-nitrilotriacetic acid beads (Qiagen) and rotated 3 h at room temperature. The beads were then washed twice with lysis buffer, three times with 8 M urea, 0.1 M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, pH 6.4, and once with phosphate-buffered saline before being resuspended in Laemmli gel loading buffer and analyzed by SDS-PAGE. Proteins were then electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes, and His-SUMO-ERM conjugates were detected by Western blotting using a rabbit polyclonal anti-ERM antibody as described above.

In Vitro SUMO Modification Reaction—[^{35}S]Methionine-labeled substrates for SUMO modification reactions were generated by *in vitro* transcription/translation in wheat germ extract according to the manufacturer's instructions (Promega). *In vitro* modification was carried out with purified recombinant products as described (34). Reaction products were fractionated by SDS-PAGE and detected by phosphorimaging.

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)—ERM was produced and sumoylated *in vitro* as described above. A portion of the reaction mixture was mixed with 1 ng of the ^{32}P-labeled E74 probe (sense strand, 5′-GAGCTGAATAACCGGAAGTAACTCAT-3′) in the presence of 25 mM Hepes, pH 7.9, 25 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 0.05% Nonidet P-40, 10% glycerol, 1 mM dithiothreitol, and 1 μg of poly(dI·dC). The mixture was incubated for 1 h at room temperature and loaded onto a 6% polyacrylamide gel. The gel was run at 4 °C in 0.5× Tris borate-EDTA buffer at 180 V (32).

Immunofluorescence Studies—RK13 cells plated on coverslip slides were transfected with the different FLAG-tagged ERM plasmids. Twenty-four h later the cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature and then incubated for 2 h with 1:1000 diluted anti-FLAG antibody. This was followed by incubation for 1 h with 1:1000 diluted goat anti-rabbit Alexa 488 antibody.

RESULTS

SUMO Modification of ERM—To identify ERM-interacting proteins, we screened a human mammary gland cDNA library in the yeast two-hybrid system using a nontransactivating portion of the ERM molecule (amino acids 72–370) as bait. Twelve isolated clones were found to encode the human Ubc9. GST pull-down assays were used to obtain direct evidence for ERM binding to Ubc9 (data not shown), thus confirming Ubc9 as a novel ERM-interacting protein.

Because Ubc9 is the only-known SUMO-conjugating enzyme (38) and because ERM displays five minimal consensus sumoylation motifs (ψKXE; ψ, large hydrophobic residue (39)), we sought to determine whether ERM is a sumoylation target using *in vitro* and *in vivo* approaches. To show directly that

Downloaded from www.jbc.org at Institut Pasteur de Lille on July 9, 2007

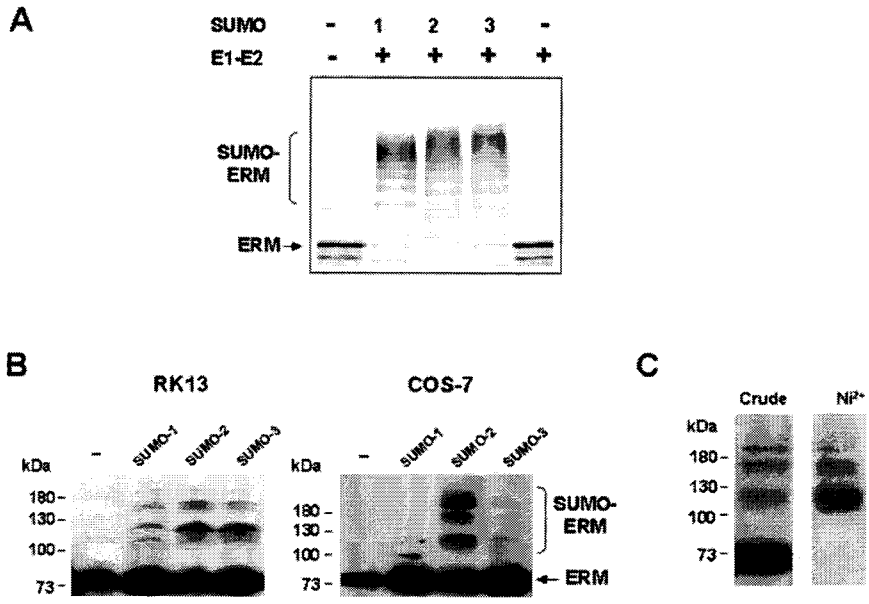


FIG. 1. **ERM is modified by SUMO *in vitro* and *in vivo*.** *A*, SUMO modification of ERM *in vitro*. ERM was labeled with [^{35}S]Met by *in vitro* translation in a wheat germ extract and incubated in the presence of recombinant SUMO-1, SUMO-2, or SUMO-3 plus E1 (SAE1/2) and E2 (Ubc9). A control reaction lacking these molecules was also carried out. The products were analyzed by SDS-PAGE and phosphorimaging. The *in vitro* translated protein gives a two-band pattern because of internal methionine initiation. *B*, *in vivo* modification of ERM by SUMO. RK13 and COS-7 cells were transfected for 24 h with an ERM-expressing plasmid alone or with this plasmid plus a plasmid expressing His-tagged SUMO-1, -2, or -3. ERM was detected by Western blotting with an anti-ERM antibody. The *upper bands* correspond to SUMO-modified ERM forms. *C*, COS-7 cells were transfected as described in *B* with plasmids expressing His-tagged SUMO-2 and ERM. Crude extract (*Crude*) and SUMO-conjugated proteins isolated by nickel affinity chromatography (*Ni*$^{2+}$) were analyzed by SDS-PAGE, and ERM was then detected by Western blotting with an anti-ERM antibody.

ERM is a SUMO modification substrate, ^{35}S-labeled ERM was generated by *in vitro* transcription/translation and incubated with purified components required for SUMO modification (34). As illustrated in Fig. 1*A*, analysis of the products indicates that a large proportion of the ERM was converted by SUMO-1, SUMO-2, or SUMO-3 to more slowly migrating forms in a reaction requiring the SUMO-activating enzyme E1 and the E2 enzyme Ubc9. To establish that ERM is modified by SUMO *in vivo*, we co-transfected RK13 cells with expression plasmids for ERM and His$_6$-tagged SUMO-1, -2, or -3. Cells were lysed under conditions preserving SUMO modification, and ERM proteins were identified by Western blotting with an anti-ERM antibody. In the absence of SUMO, we observed a major 70-kDa protein species, corresponding to unmodified ERM. Higher molecular weight species were detected only when SUMO-1, SUMO-2, or SUMO-3 was present (Fig. 1*B*). Under these conditions, the presence of multiple high molecular weight species suggests that multiple SUMO modifications take place on ERM. Similar *in vivo* experiments were performed on other cell lines, such as COS-7. Again, the upper bands also appeared in the presence of each SUMO and were much pronounced in the presence of SUMO-2 (Fig. 1*B*). To prove that these upper bands corresponded to SUMO-modified forms of ERM, COS-7 cells transfected with ERM and His-SUMO-2 were lysed under highly denaturing conditions, and SUMO-modified proteins were isolated on nickel-agarose (Ni^{2+}-nitrilotriacetic acid). Nickel-nitrilotriacetic acid-bound proteins were then eluted and analyzed by Western blot with anti-ERM antibody. As expected, unmodified ERM was absent, and the higher molecular weight ERM species were observed in the SUMO-conjugated cellular fraction (Fig. 1*C*). It thus appears that ERM is modified by SUMO at multiple sites both *in vitro* and *in vivo*.

SUMO Modification Sites on ERM—ERM contains five copies of the ψKXE sequence required for modification by SUMO (Fig. 2*A*). To locate sites of SUMO modification on the ERM protein, we generated amino-terminal deletion mutants of ERM and tested their ability to be SUMO-modified *in vivo* by co-transfection with His-SUMO-2 (as in Fig. 1*C*). Although wild-type ERM was modified by SUMO at multiple sites, ERM-(276–510) was modified at only one site and ERM-(354–510) did not appear to be SUMO-modified (Fig. 2*A*). These data suggest that residues Lys^{89} and Lys^{263} are likely targets of SUMO modification, along with either Lys^{263} or Lys^{350}. It is unlikely that Lys^{468}, although in a sequence matching perfectly the consensus sumoylation motif, is a site of SUMO modification.

To determine precisely the sites of SUMO modification, we therefore replaced each potential acceptor lysine, separately or in combination, with an arginine unable to act as a SUMO acceptor. COS-7 cells were then co-transfected with a plasmid coding for wild-type or mutated ERM together with the SUMO-2 expression vector. ERM was revealed by Western blotting. Fig. 2*B* shows that the single mutation of Lys^{468} (*KR*^{5}) has no significant effect on ERM SUMO modification. A single mutation of Lys^{89} (Fig. 2*B*, *KR*^{1}), Lys^{263} (*KR*^{2}), or Lys^{350} (*KR*^{4}) reduced the intensity of at least some SUMO-modified ERM species, and a more pronounced effect was observed for the Lys^{293} mutation (*KR*^{3}). When Lys^{263} and Lys^{293} (*KR*^{23}) were mutated in combination, the more slowly migrating SUMO-conjugated species of ERM were no longer observed, but the major 110–120 kDa was still clearly detected. Further mutation of Lys^{350} (Fig. 2*B*, *KR*^{234}) had little effect on the SUMO modification pattern, whereas mutation of Lys^{89} in combination with KR^{23} (*KR*^{123}) caused the amount of the major SUMO-modified species to decrease markedly. This modified form was practically undetectable when Lys^{89}, Lys^{263}, Lys^{293}, and Lys^{350} were mutated simultaneously (Fig. 2*B*, *KR*^{1234}), and no further change was observed with ERM mutated at all five consensus sumoylation sites (*KR*^{12345}). Simultaneous mutation at all of the five consensus sites completely prevented SUMO modification of ERM *in vitro* (Fig. 2*C*). These findings suggest that SUMO modification occurs only at consensus sites and that, of the five consensus sites identified in ERM, the motif containing Lys^{468} in the carboxyl-terminal part of ERM is the only one that is not SUMO-modified *in vivo*.

ERM Is SUMO-modified in Response to Stress in Vivo—Because cell stresses such as heat shock or oxidative stress induce SUMO conjugation (40), we investigated the ability of endogenous SUMO to modify ERM *in vivo* upon exposure of cells to hydrogen peroxide (H_2O_2). For this purpose, COS-7 cells were transfected with plasmids coding for wild-type or KR^{12345} FLAG-ERM, and transfected cells were treated or not with H_2O_2. The cell extracts were then subjected to immunoprecipitation with anti-FLAG antibody, and the immunoprecipitates were analyzed by Western blot with antibodies

Downloaded from www.jbc.org at Institut Pasteur de Lille on July 9, 2007

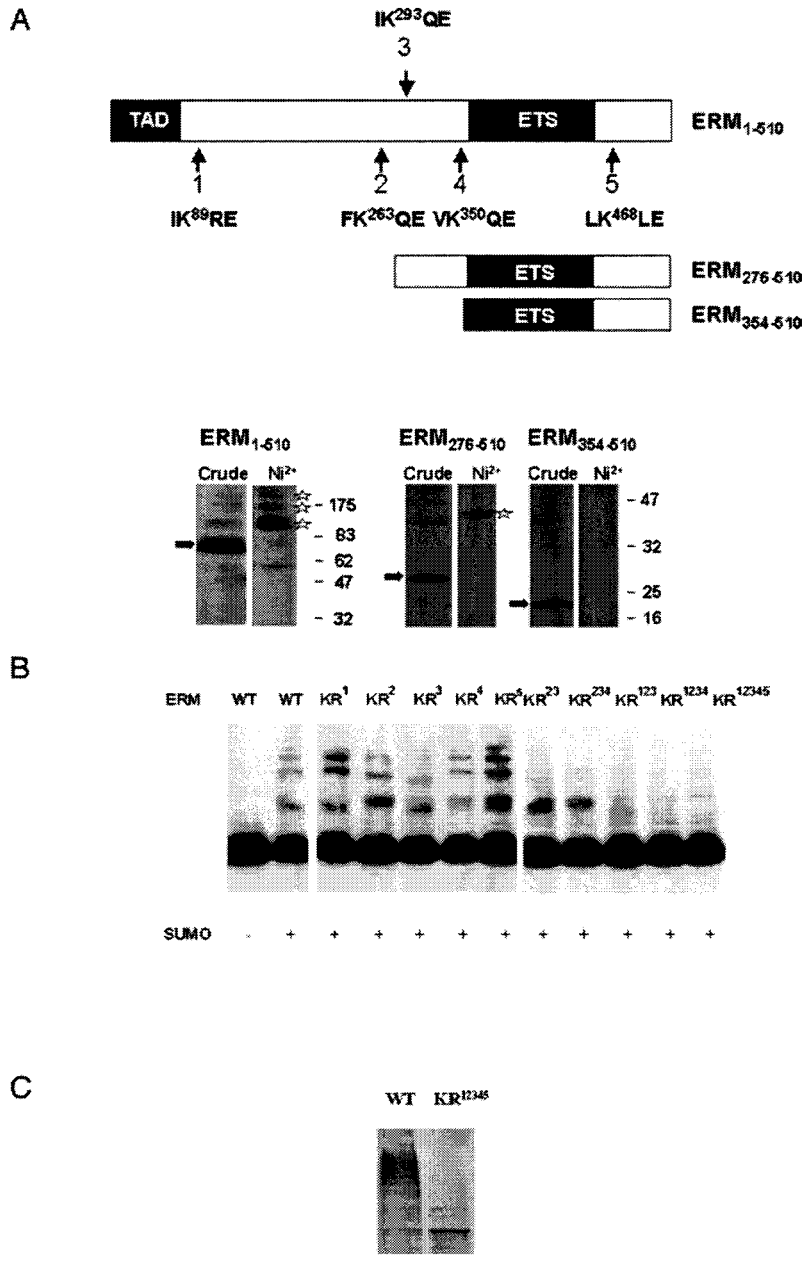


FIG. 2. **Identification of the SUMO modification sites of ERM.** *A*, SUMO modification of ERM after various deletions. *Upper panel*, schematic representation of the positions of the five putative SUMO modification sites (*ψKXE*) within ERM and of the deletion mutants used. The main functional ERM domains are indicated (*ETS*, ETS domain; *TAD*, main transactivation domain). *Lower panel*, COS-7 cells were transfected with plasmids expressing ERM deletion mutants, and SUMO modification was assessed by Western blotting with an anti-ERM antibody on the crude extracts (*Crude*) and after purification on an Ni^{2+} column. The positions of unmodified (*arrow*) and SUMO-modified (*star*) ERM forms are indicated. *B*, *in vivo* SUMO modification of ERM after the replacement of lysine with arginine (KR) in the putative SUMO modification sites. SUMO modification of ERM mutants in COS-7 cells was determined by Western blotting with an anti-ERM antibody as described for Fig. 1*B*. As a control, cells were transfected with a plasmid expressing wild-type ERM (*WT*) in the absence or the presence of a co-transfecting plasmid expressing SUMO-2. *Superior numbers 1, 2, 3, 4,* and *5* correspond, respectively, to Lys^{89}, Lys^{263}, Lys^{293}, Lys^{350}, and Lys^{468}. *C*, *in vitro* SUMO modification of wild-type ERM and of ERM mutated at all five putative SUMO modification sites (KR^{12345}). The assay was performed as described for Fig. 1*A*.

against ERM or SUMO. With the anti-ERM antibody, unmodified ERM was detected independently on H_2O_2 treatment. In contrast, more slowly migrating ERM species were observed specifically in the H_2O_2-treated cells. These H_2O_2-induced more slowly migrating ERM species were not observed with the FLAG-ERM KR^{12345} mutant (Fig. 3); their appearance was thus dependent on the presence of the sumoylation sites. To determine which form of SUMO was conjugated to ERM, extracts from H_2O_2-treated cells immunoprecipitated with the anti-FLAG antibody were analyzed by Western blotting using either an anti-SUMO-1 or an anti-SUMO-2/3 antibody. The more slowly migrating forms of ERM were detected with the anti-SUMO-2/3 antibody but not with the anti-SUMO-1 antibody. These forms were absent when ERM KR^{12345} was used. This indicates that endogenous SUMO-2 or/and -3 are responsible for H_2O_2-induced ERM sumoylation *in vivo*.

SUMO Sites in ERM Correlate with Inhibition of Transcription-enhancing Activity—To investigate the effect of SUMO modification on ERM transcription-enhancing activity, we analyzed the ability of wild-type and mutant forms of the protein to activate ERM-dependent reporter genes. In experiments with the human Ets-responsive ICAM-1 minimal promoter (35), the wild-type ERM caused an ~20-fold increase in transactivation (Fig. 4*A*, *WT*). ERM singly mutated at any one of the five consensus sumoylation sites showed the same or nearly the same transactivation power as wild-type ERM (Fig. 4*A*, *left panel*). Triply mutated ERM proteins KR^{123} and KR^{234}, however, showed an ~3-fold higher transactivation capacity. No further increase was observed with the KR^{1234} and KR^{12345} ERM mutants (Fig. 4*A*). The second luciferase reporter vector used contains three E74 Ets-binding sites cloned upstream from the minimal thymidine kinase promoter. Although ERM specifically interacts with the E74 binding site, it cannot activate the E74 reporter construct without stimulation by post-translational modification such as phosphorylation (32). As shown in Fig. 4*A* (*right panel*), RK13 cells co-transfected with

Downloaded from www.jbc.org at Institut Pasteur de Lille on July 9, 2007

the E74 reporter and a plasmid expressing either the wild-type or a singly mutated ERM showed similar, near basal level luciferase activity. When a multiply mutated ERM was used, transactivation increased about 4-fold (KR^{234}) to 8-fold (KR^{123}, KR^{1234} and KR^{12345}) (Fig. 4*A*). As assessed by immunofluorescence, the sumoylable (Fig. 4*B*, *WT*) and the nonsumoylable (KR^{12345}) ERM forms similarly localized in the nucleus in a diffuse manner. Localization of ERM was not affected by overexpression of SUMO-2. Altogether, these results clearly show that the nonsumoylable ERM mutant has an enhanced transcriptional capacity and that it is not due to change in intracellular localization.

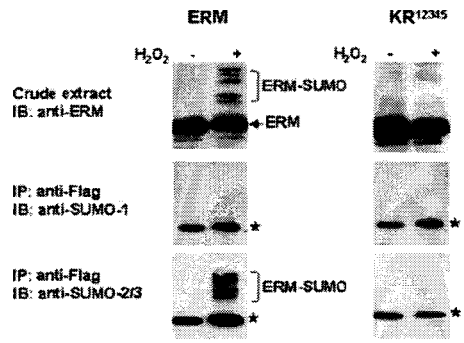


FIG. 3. **SUMO modification of ERM is induced by H_2O_2 stress.** COS-7 cells were transfected for 24 h with a plasmid expressing FLAG-ERM (*left panels*) or FLAG-ERM KR^{12345} (*right panels*). The cells were then treated or not with H_2O_2. *Upper panels*, Western blots obtained from crude protein extracts with anti-ERM antibody as described for Fig. 1*B*. *Lower panels*, following ERM immunoprecipitation (*IP*) with an anti-FLAG antibody, protein extracts were subjected to Western blotting (immunoblot (*IB*)) with anti-SUMO-1 or anti-SUMO-2/3 antibody. *, indicates immunoprecipitated ERM-like forms recognized by anti-SUMO antibodies.

We then investigated whether change in the transcriptional activity of the sumoylation defective ERM mutant is due to variation of protein stability as previously reported for other proteins (41, 42). We thus examined the steady-state levels of wild-type and nonsumoylable ERM following inhibition of protein synthesis. COS-7 cells transfected with ERM plasmid were treated from 20 to 80 min with the protein synthesis inhibitor cycloheximide and analyzed by Western blotting. In contrast to actin, which is not influenced by cycloheximide treatment, wild-type ERM is relatively unstable with a half-life of about 40 min; this relatively weak stability is also found in the nonsumoylable KR^{12345} ERM mutant (Fig. 5*A*). Similar experiments were also performed in cells transfected with wild-type ERM and SUMO-2 to examine the stability of the SUMO-modified forms of ERM. As illustrated in Fig. 5*A*, the SUMO-modified forms showed similar stability as compared with un-

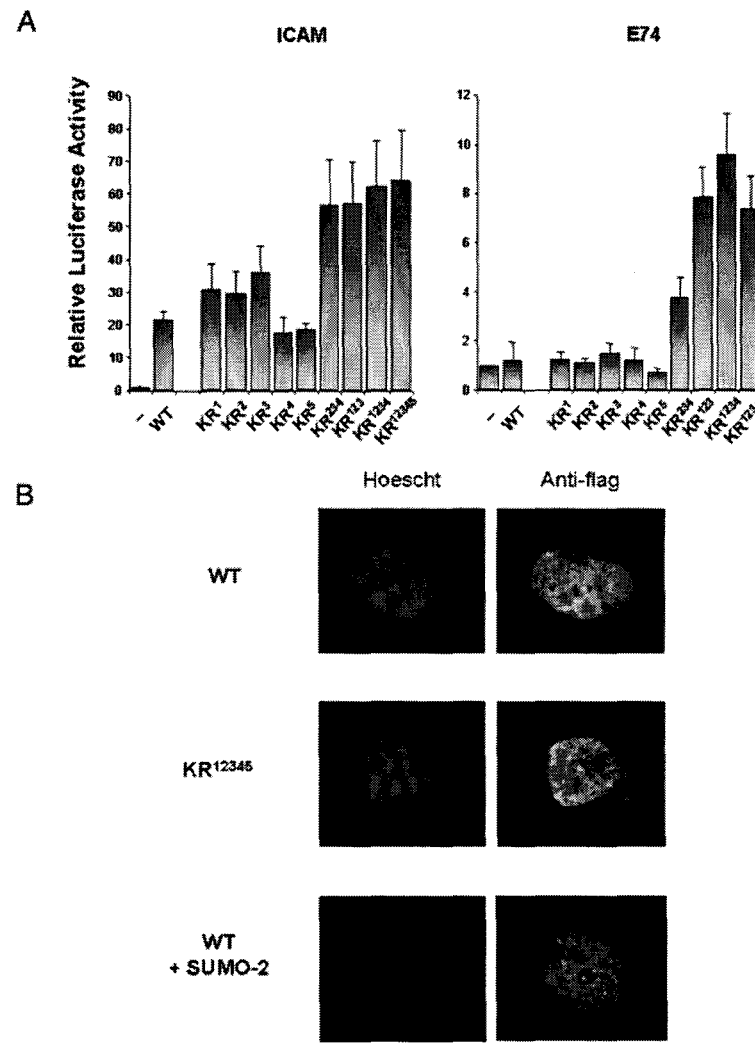


FIG. 4. **Lysine-to-arginine mutations at the ERM SUMO modification sites increase transcription.** *A*, effect of lysine-to-arginine mutations. RK13 cells were transiently transfected for 24 h with ICAM-1-Luc (*ICAM*) or 3xE74-TK-Luc (*E74*) reporter plasmid in the presence of pSV-ERM wild-type (*WT*) and lysine-to-arginine (*KR*) mutants in the SUMO modification sites. The data presented here are representative of four experiments with two different dishes per experiment and are expressed as means ± S.E. The activity of cells transfected with the reporter plasmid and the empty pSV expression vector (−) is arbitrarily set at 1. *B*, subcellular distribution of ERM. RK13 cells were transfected with FLAG-tagged ERM (*WT*) or FLAG-tagged ERM-KR^{12345} (KR^{12345}) in the presence or absence of SUMO-2. Expressed proteins were detected by immunofluorescence microscopy. Hoechst staining shows nuclei.

Downloaded from www.jbc.org at Institut Pasteur de Lille on July 9, 2007

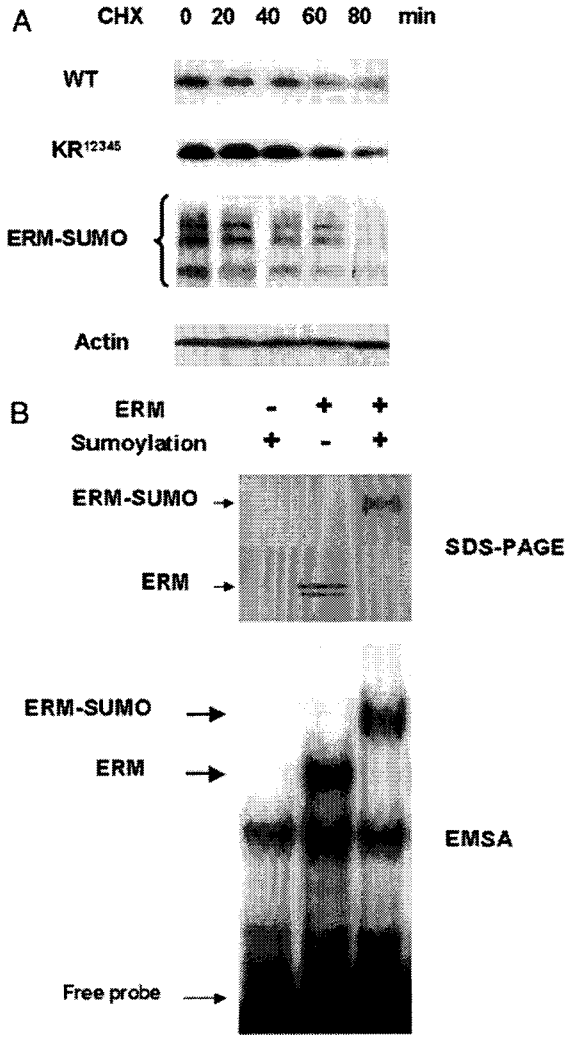


FIG. 5. **Protein stability and DNA-binding capacity of SUMO-modified ERM.** *A*, protein stability. Wild-type ERM (*WT*) and ERM-KR^{12345} (*KR^{12345}*) were expressed in COS-7 cells in the presence or absence of SUMO-2 and then treated with cycloheximide (*CHX*) for the indicated times. Proteins were revealed by Western blotting analysis with anti-ERM antibody or anti-actin antibody. *B*, DNA-binding capacity. Wild-type ERM protein was produced by *in vitro* translation in wheat germ extract and SUMO-modified as described for Fig. 1*A*. SUMO-modified and unmodified ERM proteins, revealed by SDS-PAGE and fluorography, were used in gel shift retardation assays with a double-stranded E74 ^{32}P-labeled probe (*EMSA*).

modified wild-type ERM or the KR^{12345} ERM mutant. These results indicate that neither mutation of the sumoylation sites nor sumoylation of ERM significantly affects ERM stability.

We also tested whether the DNA-binding capacity of the nonsumoylable ERM form varies from that of wild-type protein. Using EMSA with nuclear extracts of COS-7 cells overexpressing ERM or its nonsumoylable mutant KR^{12345}, we showed that the specific DNA binding was not affected by the mutation of the sumoylation sites (data not shown). We had shown previously, however, that *in vivo* only a small proportion of the overexpressed ERM protein is SUMO-modified, and the influence of sumoylation on ERM DNA-binding capacity was thus difficult to evaluate in these conditions (Fig. 2*B*). To circumvent that, we subjected ERM produced by *in vitro* translation to *in vitro* SUMO modification and then tested its DNA-binding ability. Under these conditions, ERM was almost fully SUMO-modified (Fig. 5*B*, *SDS-PAGE*), and gel shift analysis with an E74 probe specifically recognized by ERM (32) revealed a lower mobility of SUMO-modified ERM-DNA complex (Fig. 5*B*, *EMSA*). However, similar band intensities were observed for the SUMO-modified ERM-DNA and the unmodified ERM-DNA complexes (Fig. 5*B*, *EMSA*; compare *lanes 2* and *3*). This indicates that difference in transcriptional activity between wild-type and sumoylation-defective ERM is independent of DNA-binding ability.

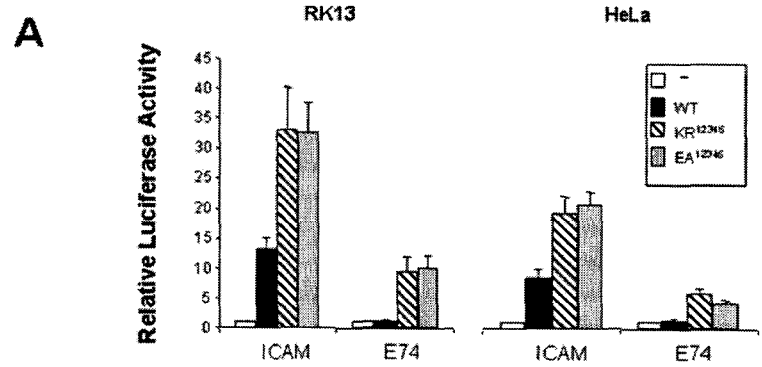
Sumoylation Has a Negative Effect on Transcription Regulation by ERM—We thus have shown that SUMO modification of ERM did not affect the subcellular localization, the protein stability, and the DNA-binding activity of ERM, whereas mutation of the lysine within the SUMO sites induced transcriptional activation. However, in addition to sumoylation, the lysine residue can be modified by a number of post-translational modifications including methylation, ubiquitination, and acetylation. To ensure that enhanced transcriptional activity of ERM mutated at all of the lysine acceptor sites (KR^{12345}) is specifically due to defective SUMO modification, we tested the activity of the mutant protein obtained by changing the glutamic acid of each consensus sumoylation site to alanine, without mutating the lysine residue of the site. Such mutations are reported to disrupt SUMO transfer by affecting the interaction of the substrate with the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 (43). In RK13 cells, the effect on transcription of ERM mutated at all five glutamic acid residues (EA^{12345}) was similar to that of the KR^{12345} ERM mutant in both the ICAM-1 and E74 reporter systems (Fig. 6*A*). Similar results were also obtained in HeLa cells. As expected, the EA^{12345} ERM mutant, like the KR^{12345} ERM mutant, could not be modified by SUMO, in contrast to wild-type ERM (Fig. 6*B*), thus confirming that the loss of SUMO modification correlates with enhanced transcriptional activation of ERM.

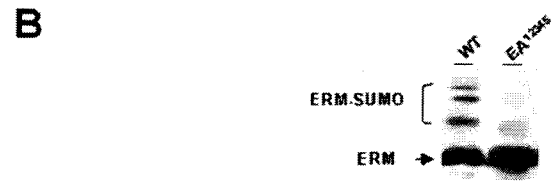
The data obtained strongly suggested that sumoylation inhibits the transcriptional activity of ERM. We thus determined whether decreased sumoylation reverses the inhibition. In reporter gene assays, we used two proteins known to interfere with the SUMO conjugation pathway: the adenoviral protein Gam1, which inhibits the SUMO pathway by inducing the degradation of SUMO-activating (E1) and -conjugating (E2) enzymes (44); and SENP1, a SUMO-specific protease involved in desumoylation (36). Neither protein had any effect on basal transcription from the ICAM-1 and E74 reporter plasmids (Fig. 7). In the E74 reporter system, both Gam1 and SENP1 caused a major (~6-fold) increase in the activity of wild-type ERM. This increase was dependent on the presence of the sumoylation sites, since neither Gam1 nor SENP1 altered the transcriptional activity of the KR^{12345} ERM mutant (Fig. 7). In reporter system based on the ICAM-1, results were similar. Both interfering proteins increased transactivation by wild-type ERM, and KR^{12345}-induced activity remained unaltered in the presence of these molecules. Moreover, the enhancement of ERM transactivation capacity was due to the ability of these two proteins to interfere with the SUMO pathway, as the transcriptional activity of ERM was only marginally changed by coexpression of inactive versions of Gam1 and SENP1 ($Gam1^{mut}$, $Gam1^{L258,265A}$, $SENP1^{mut}$, $SENP1^{R630L,K631M}$) (Fig. 7). These data therefore demonstrate that the transcriptional activity of ERM is inhibited by the SUMO pathway.

DISCUSSION

ERM transcription-enhancing activity is regulated by post-translational modifications such as phosphorylation via the MAPK and cAMP-dependent protein kinase pathways (25, 32). Here we show that ERM interacts with the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 and is modified by SUMO. We further show that

Downloaded from www.jbc.org at Institut Pasteur de Lille on July 9, 2007





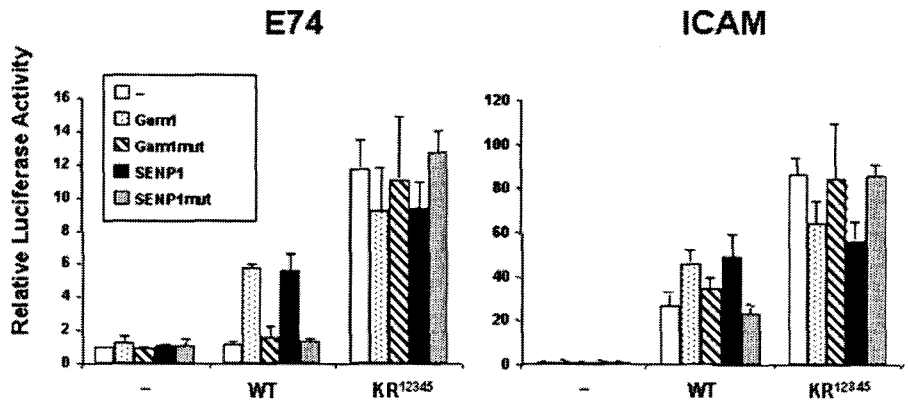


FIG. 6. **Effect of glutamic acid-to-alanine mutations on transcriptional activation by ERM.** The glutamic acid residue present in each of the five SUMO modification sites (ψKXE) of ERM was replaced with an alanine (*EA*^{12345}). *A*, the transcription-activating capacity of the EA^{12345} ERM mutant was compared with that of wild-type ERM (*WT*) and of the KR^{12345} ERM mutant. Experiments were performed in RK13 and HeLa cells, and the results are presented as in Fig. 4*A*. *B*, *in vivo* SUMO modification of EA^{12345} ERM was carried out in COS-7 cells, as described for Fig. 1*B*, and compared with wild-type ERM.

FIG. 7. **Effect of inhibitors of the SUMO pathway on ERM transcription-enhancing activity.** RK13 cells were transiently transfected for 24 h as described for Fig. 4*A* in the presence of either the wild-type (*Gam1*) or mutated (*Gam1mut*) adenoviral SUMO-interfering protein or the wild-type (*SENP1*) or mutated (*SENP1mut*) SUMO protease. The transcriptional activity of ERM (*WT*) and ERM-KR^{12345} (*KR*^{12345}) proteins was determined on ICAM and E74 promoters, and the results are as described for Fig. 4*A*.

SUMO modification of this Ets transcription factor affects its ability to activate transcription.

We have demonstrated that four of the five lysines located in optimal sumoylation consensus motifs (ψKXE (39)) within the ERM amino acid sequence, Lys^{89}, Lys^{263}, Lys^{293}, and Lys^{350}, are modified by SUMO both *in vitro* and *in vivo*. When either the acceptor lysines or the glutamic acid residues of these sites are mutated, SUMO modification of the mutated ERM does not occur. These SUMO acceptor sites are conserved in human, mouse, chicken, and zebrafish ERM homologues. This suggests that SUMO modification of the ERM transcription factor plays an important role in vertebrates. These sites are also perfectly conserved in the two other PEA3 group members, ETV1 and PEA3. We have observed that both of these also undergo *in vivo* SUMO modification (data not shown). On the contrary, the fifth sumoylation consensus site (Lys^{468}), which is not modified in ERM, is not conserved in zebrafish ERM, human ETV1, or mouse PEA3. In these three molecules, the glutamic acid of this consensus site is replaced by an aspartic acid (data not shown).

ERM can thus be modified by SUMO at multiple sites, and multiple SUMO-modified forms of ERM are indeed detected in cells. Although SUMO-2 seems to conjugate preferentially with ERM, the SUMO modification profiles obtained for ERM in RK13 cells are similar for SUMO-1, -2, and 3. Unlike SUMO-2, SUMO-1 cannot form poly-SUMO chains (34). It is likely that the more slowly migrating SUMO-modified forms observed reflect monosumoylation of ERM at multiple sites. SUMO modification at a single acceptor site also occurs. The corresponding modified protein must be the major ERM species (about 110–120 kDa), because this SUMO-modified ERM form is the only one remaining when three of the four SUMO conjugation sites are mutated. The observed molecular mass of this modified ERM form is, however, much higher as expected (about 85 kDa; ERM is about 70 kDa, and His-SUMO is about 15 kDa). Although surprising, this phenomenon is common for SUMO-modified molecules and is probably due to an altered conformation of the modified proteins.

Selective addition of SUMO-1, -2, and -3 (SUMO-2 and -3

Downloaded from www.jbc.org at Institut Pasteur de Lille on July 9, 2007

being highly homologous) to protein targets has not been studied extensively. Studies have indicated that SUMO-1 can conjugate with proteins via mechanisms similar to the conjugation mechanism of SUMO-2 and SUMO-3, but it has been suggested that SUMO-1 on the one hand and SUMO-2/-3 on the other show different substrate specificities (40, 45). When ectopically expressed, all three SUMO isoforms have the capacity to become conjugated to ERM, although SUMO-2 conjugates predominate in COS-7 cells. Interestingly, when ERM was expressed in COS-7 cells treated with H_2O_2, only the covalent attachment of endogenous SUMO-2 and/or -3 was visualized. This is in agreement with the observation that the incorporation of SUMO-2/-3 into conjugates increases in response to oxidative stress (40). Whether this actually reflects a preferential modification by SUMO-2 remains, however, to be determined.

SUMO modification has been reported for several proteins, and most of them exert their main function within the nucleus as transcription factors or transcriptional co-activators or co-repressors (for review, see Ref. 1). Here, we show that the Ets transcription factor, ERM, is submitted to SUMO modification and that this post-translational modification negatively affects its transcription-activating function, because SUMO modification-deficient mutant ERM proteins display a greater capacity to activate transcription. Moreover, two molecules known to down-regulate SUMO modification by distinct mechanisms (Gam1 and SENP1) enhanced ERM transcriptional activity, whereas they induced only a slight variation of the KR^{12345} transcriptional activity. Altogether, these data argue for an important role of SUMO modification on ERM transcriptional activity. A correlation between SUMO modification and inhibition of transcription-regulating activity has previously been observed for other transcription factors such as Elk-1, Sp3, and c-Myb (for review, see Ref. 1). Most of these SUMO-modified proteins possess fewer SUMO acceptor sites than ERM, which has four of them. This relatively high number of SUMO sites may be responsible for fine regulation through sumoylation. It appears that SUMO modification of all sites is not necessarily required to block the full transcriptional activity of ERM. Although mutation of a single sumoylation site does not significantly increase the action of ERM on the promoters used, mutation of three of the four sites (KR^{123} and KR^{234}) is sufficient to obtain the full transcriptional de-repression observed when ERM is mutated at all five consensus sites (KR^{12345}). This applies, however, only to the ICAM-1 promoter context, because on the E74 promoter, ERM KR^{123} displays a weaker transcription-enhancing effect than ERM KR^{234}. This suggests that according to the promoter context, the repressive effect of sumoylation may vary in function of the number and identity of SUMO-modified sites.

As reported for other SUMO-modified proteins, such as the Ets protein Elk-1 (13), only a small proportion of total ERM protein is SUMO-conjugated. However, mutation of the sumoylation sites on ERM or inhibition of the sumoylation process has a significant effect on the ERM transcription-enhancing activity. This is probably because SUMO modification is a highly dynamic process and this modification, although required to initiate transcriptional inhibition, is not necessary to maintain this inhibition. The molecular mechanism associated to SUMO on inhibition of transcription-enhancing activity is still unclear. Here, we show that this inhibition is not related to changes in the stability or DNA-binding activity of ERM. It might be that repression could be linked to SUMO itself, because SUMO possesses an intrinsic repressive ability when fused to the DNA binding of Gal4 (1). Such a repressive mechanism could involve histone deacetylase recruitment, as demonstrated previously for p300 (46) and Elk-1 (14). It is, however, possible that SUMO interferes with the recruitment of co-factors by ERM by decreasing the interaction with transcriptional elements required for transcriptional activity. In fact, SUMO-induced transcriptional activity of ERM could be regulated by CBP, which is a co-activator of the PEA3 group members (47) and a target of SUMO modification. Indeed, sumoylation could disfavor the recruitment of CBP by ERM, thus reducing the ERM transcriptional activity, and reduced ERM activity could be enhanced by the SUMO-dependent repression of CBP activity by recruitment of HDAC6 (46).

It has been shown that SUMO conjugation targets proteins to different cellular localizations. We observed no difference in nuclear localization between wild-type ERM and its SUMO conjugation-deficient mutant. Yet, we cannot exclude the possibility that SUMO modification of ERM might direct the protein, in a subtle manner not currently observed, into some particular nuclear domains or might affect the nuclear import/export shuttling of this transcription factor, as shown previously for the Ets proteins Tel and Elk-1 (17, 48). More experiments are needed to specify the mechanisms by which SUMO controls the activity of ERM.

Acknowledgment—We are grateful to Yves Rouillé for helpful discussions.

REFERENCES

1. Seeler, J. S., and Dejean, A. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4,** 690–699
2. Girdwood, D. W., Tatham, M. H., and Hay, R. T. (2004) *Semin. Cell Dev. Biol.* **15,** 201–210
3. Poukka, H., Karvonen, U., Janne, O. A., and Palvimo, J. J. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97,** 14145–14150
4. Callewaert, L., Verrijdt, G., Haelens, A., and Claessens, F. (2004) *Mol. Endocrinol.* **18,** 1438–1449
5. Bies, J., Markus, J., and Wolff, L. (2002) *J. Biol. Chem.* **277,** 8999–9009
6. Eloranta, J. J., and Hurst, H. C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277,** 30798–30804
7. Muller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, J. S., Haupt, Y., and Dejean, A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275,** 13321–13329
8. Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O. A., and Palvimo, J. J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277,** 30283–30288
9. David, G., Neptune, M. A., and DePinho, R. A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277,** 23658–23663
10. Kirsh, O., Seeler, J. S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F., and Dejean, A. (2002) *EMBO J.* **21,** 2682–2691
11. Sharrocks, A. D. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2,** 827–837
12. Yang, S. H., Jaffray, E., Hay, R. T., and Sharrocks, A. D. (2003) *Mol. Cell* **12,** 63–74
13. Yang, S. H., Jaffray, E., Senthinathan, B., Hay, R. T., and Sharrocks, A. D. (2003) *Cell Cycle* **2,** 528–530
14. Yang, S. H., and Sharrocks, A. D. (2004) *Mol. Cell* **13,** 611–617
15. Chakrabarti, S. R., and Nucifora, G. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264,** 871–877
16. Chakrabarti, S. R., Sood, R., Nandi, S., and Nucifora, G. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97,** 13281–13285
17. Wood, L. D., Irvin, B. J., Nucifora, G., Luce, K. S., and Hiebert, S. W. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100,** 3257–3262
18. de Launoit, Y., Chotteau-Lelievre, A., Beaudoin, C., Coutte, L., Netzer, S., Brenner, C., Huvent, I., and Baert, J. L. (2000) *Adv. Exp. Med. Biol.* **480,** 107–116
19. Chotteau-Lelièvre, A., Montesano, R., Soriano, J. V., Soulie, P., Desbiens, X., and de Launoit, Y. (2003) *Dev. Biol.* **259,** 241–257
20. Lin, J. H., Saito, T., Anderson, D. J., Lance-Jones, C., Jessell, T. M., and Arber, S. (1998) *Cell* **95,** 393–407
21. Livet, J., Sigrist, M., Stroebel, S., De Paola, V., Price, S. R., Henderson, C. E., Jessell, T. M., and Arber, S. (2002) *Neuron* **35,** 877–892
22. Baert, J. L., Monte, D., Musgrove, E. A., Albagli, O., Sutherland, R. L., and de Launoit, Y. (1997) *Int. J. Cancer* **70,** 590–597
23. Trimble, M. S., Xin, J. H., Guy, C. T., Muller, W. J., and Hassell, J. A. (1993) *Oncogene* **8,** 3037–3042
24. Shepherd, T. G., Kockeritz, L., Szrajber, M. R., Muller, W. J., and Hassell, J. A. (2001) *Curr. Biol.* **11,** 1739–1748
25. Janknecht, R., Monte, D., Baert, J. L., and de Launoit, Y. (1996) *Oncogene* **13,** 1745–1754
26. O'Hagan, R. C., Tozer, R. G., Symons, M., McCormick, F., and Hassell, J. A. (1996) *Oncogene* **13,** 1323–1333
27. O'Hagan, R. C., and Hassell, J. A. (1998) *Oncogene* **16,** 301–310
28. Bosc, D. G., Goueli, B. S., and Janknecht, R. (2001) *Oncogene* **20,** 6215–6224
29. Bosc, D. G., and Janknecht, R. (2002) *J. Cell. Biochem.* **86,** 174–183
30. Janknecht, R. (2003) *Oncogene* **22,** 746–755
31. Wu, J., and Janknecht, R. (2002) *J. Biol. Chem.* **277,** 42669–42679
32. Baert, J. L., Beaudoin, C., Coutte, L., and de Launoit, Y. (2002) *J. Biol. Chem.* **277,** 1002–1012
33. Laget, M. P., Defossez, P. A., Albagli, O., Baert, J. L., Dewitte, F., Stehelin, D.,

The Journal of Biological Chemistry
Downloaded from www.jbc.org at Institut Pasteur de Lille on July 9, 2007

and de Launoit, Y. (1996) *Oncogene* **12,** 1325–1336
34. Tatham, M. H., Jaffray, E., Vaughan, O. A., Desterro, J. M., Botting, C. H., Naismith, J. H., and Hay, R. T. (2001) *J. Biol. Chem.* **276,** 35368–35374
35. de Launoit, Y., Audette, M., Pelczar, H., Plaza, S., and Baert, J. L. (1998) *Oncogene* **16,** 2065–2073
36. Cheng, J., Wang, D., Wang, Z., and Yeh, E. T. (2004) *Mol. Cell. Biol.* **24,** 6021–6028
37. Treier, M., Staszewski, L. M., and Bohmann, D. (1994) *Cell* **78,** 787–798
38. Desterro, J. M., Thomson, J., and Hay, R. T. (1997) *FEBS Lett.* **417,** 297–300
39. Rodriguez, M. S., Dargemont, C., and Hay, R. T. (2001) *J. Biol. Chem.* **276,** 12654–12659
40. Saitoh, H., and Hinchey, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275,** 6252–6258
41. Desterro, J. M., Lin, X., Liang, M., Liang, Y. Y., Brunicardi, F. C., and Feng X. H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278,** 31043–31048
42. Desterro, J. M., Rodriguez, M. S., and Hay, R. T. (1998) *Mol. Cell* **2,** 233–239
43. Bernier-Villamor, V., Sampson, D. A., Matunis, M. J., and Lima, C. D. (2002) *Cell* **108,** 345–356
44. Boggio, R., Colombo, R., Hay R. T., Draetta, G. F., and Chiocca, S. (2004) *Mol. Cell* **16,** 549–561
45. Azuma, Y., Arnaoutov, A., and Dasso, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **163,** 477–487
46. Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thain, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N. D., and Hay, R. T. (2003) *Mol. Cell* **11,** 1043–1054
47. Goel, A., and Janknecht, R. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23,** 6243–6254
48. Salinas, S., Briancon-Marjollet, A., Bossis, G., Lopez, M. A., Piechaczyk, M., Jariel-Encontre, I., Debant, A., and Hipskind, R. A. (2004) *J. Cell Biol.* **165,** 767–773

The Journal of Biological Chemistry
Downloaded from www.jbc.org at Institut Pasteur de Lille on July 9, 2007

II. Sumoylation et domaine inhibiteur interne d'ERM

Dans les expériences de transfection cellulaire visant à définir l'activité d'un facteur de transcription sur un promoteur défini, ERM, comme d'autres protéines de la famille ETS, est apparu comme un faible activateur transcriptionnel [171, 222]. Cette faible activité basale est au moins partiellement liée à des mécanismes d'auto-inhibition. Ainsi dans le cas d'Ets-1, une inhibition de la fixation à l'ADN est due à deux régions flanquant le domaine ETS. Ces régions forment un module inhibant la fonctionnalité du domaine ETS et limitent ainsi l'activité transcriptionnelle d'Ets-1 [177]. Des domaines d'inhibition de la fixation à l'ADN ont aussi été décrits pour les facteurs de transcription ERM et PEA3 mais le mécanisme mis en jeu reste inconnu [19, 171]. La fonctionnalité des TAD peut aussi être inhibée par des domaines de la protéine. Ainsi, ce type d'autoinhibition a été décrit pour Elk-1, Net et les membres du groupe PEA3 [222 , 284, 330]. Concernant ces derniers, les études menées dans le système hétérologue Gal4 ont révélé l'existence d'un domaine capable de réprimer la fonction du TAD N-terminal [171, 222]. Ce domaine appelé NRD (Negative Regulatory Domain) se situe en aval du TAD mais sa délimitation reste incertaine (fig. 19). En effet, elle varie en fonction des études menées et des protéines du groupe PEA3 étudiées. Néanmoins, dans tous les cas, ce domaine renferme au moins un des sites de sumoylation, sites qui sont parfaitement conservés chez les trois membres du groupe PEA3. Ayant montré que la sumoylation réprime l'activité transactivatrice d'ERM, il était envisageable que cette modification post-traductionnelle puisse jouer un rôle dans la fonction négative du NRD.

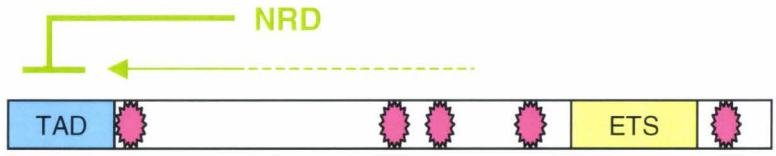


Figure 19 : Localisation du NRD et des sites de sumoylation dans les membres du groupe PEA3.

TAD, domaine de transactivation ; NRD, negative regulatory domain dont la bordure C-terminale n'est pas clairement établie (définie par les pointillés) ; ETS, domaine de liaison à l'ADN. Les sites de sumoylation sont représentés en rose.

Les résultats de l'étude que nous avons réalisée pour tester cette hypothèse ont été soumis à *Biochimica et Biophysica Acta*. La première étape de ce travail a consisté à définir plus précisément la localisation du NRD dans ERM. Nous avons ainsi testé dans le système Gal4 l'activité de différents mutants de délétion d'ERM fusionnés au DBD Gal4. La répression maximale de l'activité du TAD d'ERM (AA 1-72) est encore obtenue en présence du domaine couvrant les AA 73 à 298 et contenant trois sites de sumoylation (article 2, fig. 1). Nous avons défini cette région comme le NRD d'ERM. Nous avons ensuite vérifié que la chimère ne contenant que le TAD et le NRD (G4-ERM$_{1\text{-}298}$) était effectivement sumoylable

(article 2, fig. 2). Des cellules COS-7 ont été transfectées par les plasmides exprimant G4-ERM$_{1-298}$ et His$_6$-SUMO. Les protéines sumoylées ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur billes de Ni^{2+} puis analysées par Western-blot. Deux formes sumoylées d'ERM de 75 et 85kDa ont ainsi été identifiées. L'utilisation de mutants sur les différents sites de sumoylation a permis de montrer que la forme à 85kDa est une forme d'ERM monosumoylée sur la lysine 89 alors que celle de 75kDa est le mélange d'une forme monosumoylée sur la lysine 263 et d'une forme monosumoylée sur la lysine 293 (article 2, fig. 2).

Comme G4-ERM$_{1-298}$ est sumoylée, nous avons comparé son activité transcriptionnelle à celle d'une forme non sumoylable obtenue par mutation des trois sites de sumoylation, G4-ERM$_{1-298}$ KR^{123}. Cette mutation entraîne une très forte augmentation de l'activité transcriptionnnelle de G4-ERM$_{1-298}$ sur un gène rapporteur Gal4 (article 2, fig. 3). Nous avons également déterminé le niveau d'activité de G4-ERM$_{1-298}$ en exprimant la SUMO-protéase SenP1 pour diminuer la sumoylation de le protéine de fusion. Cette diminution est effective et corrèle avec une augmentation de l'activité transcriptionnelle de la protéine. Enfin, nous n'avons remarqué aucun changment significatif de localisation subcellulaire, de stabilité ou de fixation à l'ADN de G4-ERM$_{1-298}$ suite à la mutation des sites de sumoylation (données non montrées). Ces données valident parfaitement le fait que le défaut de sumoylation du NRD est responsable de la levée d'inhibition exercée par le NRD sur l'activité du TAD (article 2, fig. 4).

Nous nous sommes interrogés sur la nécessité de la sumoylation des trois sites du NRD pour inhiber l'activité du TAD. Nous avons donc comparé l'activité de G4-ERM$_{1-298}$ à celle de différents mutants sur les trois sites de sumoylation (article 2, fig. 5). Les protéines chimères dans lesquelles un seul site de sumoylation est muté sont plus actives que la forme sauvage mais leur activité reste très faible. La mutation supplémentaire d'un autre site de sumoylation permet d'accroître l'activité transcriptionnelle de ces protéines mais celle-ci est encore diminuée de près de 70% par rapport à l'activité de la protéine mutée au niveau des trois sites de sumoylation (article 2, fig.5). En conclusion, la sumoylation d'un seul des trois sites est suffisante pour réprimer significativement l'activité transcriptionnelle de G4-ERM$_{1-298}$, quelle que soit la position du site dans le NRD.

Afin de déterminer la capacité du NRD à diminuer le pouvoir transactivateur d'autres TAD, nous l'avons fusionné au TAD de la protéine virale VP16. Nous avons ainsi montré qu'il réprime l'activité de ce TAD (article 2, fig 6A). Nous avons aussi fusionné le NRD au domaine de fixation à l'ADN de LexA et constaté que cette chimère LexA-NRD réprime en *trans* l'activité du TAD de VP16 fusionné au DBD de Gal4 sur un promoteur composite comprenant des sites de fixation pour une fusion Gal4 et une fusion LexA (article 2, fig. 6B). Par ailleurs, la mutation des sites de sumoylation du NRD et l'utilisation de la

SUMO-protéase SENP1 ont montré que la fonction inhibitrice du NRD est corrélée à sa capacité à être sumoylé (article 2, fig.6). L'ensemble des résultats indique que le NRD est un domaine inhibiteur portable et que sa sumoylation gouverne sa fonction inhibitrice.

Finalement, nous avons voulu déterminer dans quelle mesure la mutation des trois sites de sumoylation du NRD est nécessaire pour lever l'inhibition de l'activité de la protéine de pleine longueur fusionnée au DBD Gal4. Nous avons ainsi créé la fusion G4-ERM$_{1-510}$ KR^{123} et comparé son activité à celle de G4-ERM$_{1-510}$. Cette mutation confère un léger gain d'activité transcriptionnelle à la protéine de fusion (article 2, fig. 7B) mais, comme dans le cas d'ERM non fusionné à Gal4 (article 1, fig. 2B), cette mutation n'abolit pas totalement la conjugaison de SUMO (article 2, fig. 7A). Par contre, la combinaison de cette mutation avec celle des deux sites de sumoylation situés en dehors du NRD (article 2, fig. 7B, G4-ERM$_{1-510}$ KR^{12345}) abolit la conjugaison de SUMO et augmente plus nettement l'activité transcriptionnelle de la protéine de fusion. Ce résultat suggère qu'au moins un des sites de sumoylation présents hors du NRD participe à l'inhibition de l'activité d'ERM.

Très récemment, nous avons combiné la mutation des trois sites du NRD avec la mutation d'un seul des deux autres sites situés en dehors du NRD. Les protéines ainsi obtenues (G4-ERM$_{1-510}$ KR^{1234} ou G4-ERM$_{1-510}$ KR^{1235}) sont encore sumoylables (données non montrées) et leur activité transcriptionnelle est supérieure à celle de G4-ERM$_{1-510}$ KR^{123} tout en restant nettement inférieure à celle de G4-ERM$_{1-510}$ KR^{12345} (fig. 20). Ces résultats indiquent que chaque site de sumoylation situé en dehors du NRD participe aussi à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle d'ERM dans le systèeme hétérologue Gal4.

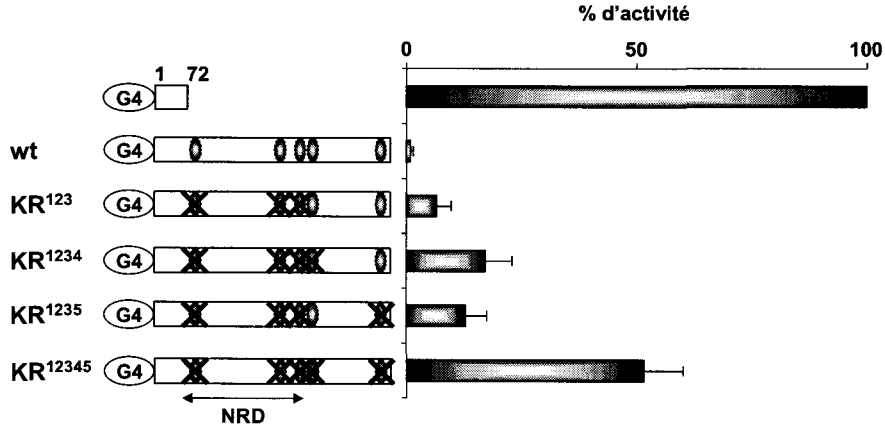


Figure 20 : Les deux sites de sumoylation situés en dehors du NRD participent à l'inhibition de l'activité d'ERM.

Des cellules RK13 ont été transfectées avec les plasmides codant les protéines illustrées à gauche (25ng) et le vecteur rapporteur (Gal4)$_5$-TK-luc (25ng). L'activité des cellules transfectées par le vecteur rapporteur et le plasmide d'expression G4-ERM$_{1-72}$ est fixée à 100. 1, 2, 3, 4 et 5 correspondent respectivement aux résidus lysine sumoylables K^{69}, K^{263}, K^{293}, K^{350} et K^{468}. Les résultats sont la moyenne (+/- SEM) de 4 expériences indépendantes réalisées en duplicats.

L'ensemble de ces résultats montre donc que la fonction inhibitrice du NRD sur l'activité du TAD est liée à sa sumoylation. En outre, un seul site de sumoylation dans le NRD suffit à réprimer significativement l'activité du TAD. Néanmoins, dans la protéine de pleine longueur, les deux sites consensus de sumoylation situés en dehors du NRD participent aussi à l'inhibition de l'activité d'ERM. En fait, ERM ne semble pas contenir une région inhibitrice mais des modules inhibiteurs correspondant aux différents sites de sumoylation. La notion de NRD peut donc être remplacée par celle de modules inhibiteurs de l'activité transcriptionnelle. Finalement, nous avons montré que le NRD est un domaine autonome qui peut réprimer l'activité d'un autre TAD aussi bien en *cis* qu'en *trans*. Les effets observés sont nettement reliés à la capacité du NRD à être sumoylé ce qui suggère que ceux-ci reflètent probablement un rôle de SUMO dans la répression de la transcription par des mécanismes autres qu'une interaction entre le NRD sumoylé et le TAD d'ERM.

ERM transcription factor contains an inhibitory domain which functions in sumoylation-dependent manner

Cindy DEGERNY, Yvan de LAUNOIT and Jean-Luc BAERT*

UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, CNRS / Université de Lille I / Université de Lille II, Institut Pasteur de Lille, IFR 142, BP 447, 1 rue Calmette, 59021 Lille Cedex, France.

* To whom all correspondence should be addressed: Jean-Luc Baert,
CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, 1 rue Calmette, Lille Cedex 59021, France.
Phone: +33 320 87 11 26 - Fax: +33 320 87 11 11
E-mail: jean-luc.baert@ibl.fr

Short Title: ERM negative regulatory domain is SUMO-dependent

Keywords: ETS, ERM, transcription factor, SUMO, regulation of transcription

Summary

ERM, PEA3 and ETV1 belong to the PEA3 group of ETS transcription factors. They are involved in many developmental processes and are transcriptional regulators in metastasis. The PEA3 group members share a N-terminal transactivation domain (TAD) whose activity is inhibited by a flanking domain named negative regulatory domain (NRD). Mechanism of this inhibition is still unknown. Here we show that NRD maps residues 73 to 298 in ERM and contains three of the five SUMO sites previously identified in the protein. We demonstrate that these three SUMO sites are responsible for NRD inhibitory function in the Gal4 system. Although the presence of the three sites is required to obtain maximal inhibition, only one SUMO site is sufficient to repress transcription whatever its localisation within the NRD. We also show that NRD is a SUMO-dependent repression domain that can act in *cis* and in *trans* to downregulate the powerful TAD of the VP16 viral protein. In addition, we find that the SUMO sites outside the NRD also play a role in the negative regulation of full length ERM activity. We thus postulate that each SUMO site in ERM functions as an inhibitory motif.

INTRODUCTION

ERM (ETV5), PEA3 (E1AF/ ETV4) and ER81 (ETV1) belong to the PEA3 group of ETS transcription factors, which contain a common DNA-binding domain (ETS domain) of about 85 residues binding the consensus core sequence 5' GGAA/T 3' (for review [1, 2]). These factors are involved in a number of developmental processes. They play a role in the organisation of germ layers with high proliferation and migration rates [3] and in development of motor and sensory neurons [4, 5]. Recently, it has been demonstrated that ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche [6]. These factors have also been found deregulated in many cancers including breast cancer and they are overexpressed in metastatic human breast cancer cells [7]. In humans, PEA3 and ERM have been described as poor prognostic factors in ovarian and breast tumours, respectively [8, 9]. Moreover, several PEA3 group member regulated genes are involved in invasive process [1, 10].

The precise regulation of protein activity may involve intramolecular interactions. Such interactions between separated domains provide a regulatory strategy to modulate protein function. Many transcription factors contain domains which interact with DNA binding domain (DBD) or transactivation domain (TAD) to negatively regulate them and are thus subject to autoinhibitory mechanisms. Concerning the ETS transcription factors, their DNA binding activity is subjected to autoinhibition and autoinhibitory domains lowering DNA affinity have been described for many proteins including Elk-1 [11], Elf3 [12] or Ets-1 [13]. The most studied model is the DNA binding of Ets-1 in which the inhibition domains flanking the ETS domain fold together to form an inhibitory module. This inhibitory module can be destabilized by protein partners allowing enhanced DNA binding. Otherwise, inhibition can be reinforced by phosphorylation which stabilizes the inhibitory module (for review [14]). DNA binding of the PEA3 group members ERM and PEA3 is also regulated by internal domains. Two domains lying N- and C-terminally to the ETS domain have been implicated in the negative regulation of DNA binding [15, 16]. However, there is no conservation between the inhibitory modules of Ets-1 and ERM/PEA3 and it is currently unclear how DNA binding of PEA3 group members is inhibited.

In addition to the regulation of DNA binding, the transcriptional activity of ETS transcription factors can also be autoinhibited. TAD activity of the ETS transcription factors Elk-1 [17] and Net [18] is inhibited by an internal repression domain. Such domain could also be involved in the regulation of the PEA3 group member transactivation capacity. Indeed, the three transcription factors share an N-terminal TAD including a highly conserved acidic domain and TAD activity is considerably reduced in the presence of a region lying C-terminally to this TAD. This domain which negatively regulates TAD activity has been named negative regulatory domain (NRD) [16, 19]. Although function of this region in ERM is partially relieved by cooperation with the transcription factor c-Jun [19], precise mechanism of this inhibition is still unknown.

The NRD is localized in the central region of the PEA3 group members between the acidic domain and the ETS domain but its borders are not clearly defined. This central region is not conserved among the PEA3 group members except some motifs including sumoylation consensus sites. Moreover, NRD mapping of some transcription factors such nuclear receptors [20], c-Myb [21], C/EBP [22], Elk-1 [23], Sp3 [24] or p300 [25] has led to the implication of putative SUMO sites in transcriptional inhibition. Since we recently showed that ERM is modified by SUMO and that sumoylation inhibits the transcriptional activity of the protein [26], we wished to examine whether SUMO modification of the NRD is responsible for the negative effect of this domain on N-terminal TAD activity. In this report, we demonstrate that SUMO modification of NRD plays a crucial role in NRD function and that sumoylation of one of the three SUMO sites identified in the NRD is effective in transcriptional inhibition. We also show that NRD is a repression domain which inhibits VP16 TAD in *cis* and in *trans*. Finally, we show that SUMO sites outside the NRD also contribute to inhibit ERM activity.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructs

The G4-ERM fusions made by cloning ERM coding regions in frame with the DNA-binding domain of yeast GAL4 (G4) in pGAP have been previously described [27, 28]. To generate G4-ERM$_{1-298}$ with a single SUMO site mutation (KR^{1}, ^{2} or ^{3}) and multiple SUMO sites mutations (KR^{12}, ^{13}, ^{23} and ^{123}), the pSV-ERM KR plasmids previously described [26] were digested by *Sma*I and *Bgl*II enzymes and the fragments were subcloned in the same sites in pGAP-ERM$_{1-298}$ vector. The full-length coding region of ERM mutated on the consensus SUMO modification sites (KR^{123} and KR^{12345}) was subcloned in the *Eco*RI site of the pGAP vector to produce pGAP-ERM$_{1-510}$ KR^{123} and pGAP-ERM$_{1-510}$ KR^{12345}. Each SUMO-acceptor lysine was mutated into arginine (K into R) in ERM plasmid thanks to kit QuickChange (Stratagene).

The TAD VP16 coding region was cloned into *Bam*HI and *Xba*I sites of the pBIND vector (Promega) to generate pBIND-VP16 expressing G4-VP16. To generate the G4-VP16 NRD and G4-VP16 NRD KR^{123} expression vectors, the sequence coding the NRD either wild type or mutated was cloned in frame into *Sal*I and *Xba*I sites of pBIND-VP16. The sequence encoding the NRD either wild-type or mutated on the sumoylation sites (KR^{123}) was also cloned in frame into *EcoR*I and *Not*I sites in pCDNA3-LexA [29] yielding pCDNA3-LexA NRD or pCDNA3-LexA NRD KR^{123}.

As luciferase reporter plasmid, we used the (Gal4)$_5$-TK-Luc vector [27] and the (LexA)$_8$-(Gal4)$_5$-TK-luc vector [29]. The pSG5-βGal vector was used to normalize transfections [27]. SenP1 and SenP1$_{mut}$ expression vectors were kindly provided by Dr E.T. H. Yeh (University of Texas-M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas). His$_6$-SUMO$_2$ expression plasmid and Ubc9 C^{93}S mutant expression plasmid were a generous gift from Dr R. Hay (University of St Andrew, St Andrews, United Kingdom).

Cell Culture and Transfections

Rabbit kidney (RK-13) and monkey COS-7 cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (Gibco BRL) and cultured at 37°C in water-saturated 5% CO_2 atmosphere. 150 000 RK13 cells per well were plated in 12 well-plates and the next day, transient transfections were performed using the PEI Exgen 500 procedure (Euromedex) using 150 ng of DNA per well, including 25 ng of reporter plasmid, 20 ng of effector vectors and 10 ng of β-galactosidase expression vector. When indicated, 20 ng of the plasmids expressing Ubc9 $C^{93}S$ or SenP1 were used. Luciferase activity was determined 24h after transfection and normalized with respect to the transfection efficiency by assaying β-galactosidase activity as previously described [30]. The data presented are the mean ± SEM of at least three independent experiments. To detect SUMO modified forms of ERM, COS-7 cells were transfected with 300 ng of ERM expression plasmid and when indicated with 400 ng of His_6-$SUMO_2$ plasmid and 400 ng of Ubc9 $C^{93}S$ or SenP1 expression vector. After 24h, cells were rinsed with PBS and lysed in immunoblot or Ni^{2+} purification buffers.

Western blot analyses

Transfected cells were lysed in Laemmli gel loading buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 10% sucrose) and analyzed by SDS-PAGE. Prestained broad range molecular weight markers (New England BioLabs) were used as standards in each gel. Proteins were then electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes. Westernblot analyzes were performed with the rabbit antibody to ERM [7], the mouse antibody anti-DBD Gal4, the mouse antibody anti-LexA (Santa Cruz Biotechnology) and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Immune complexes were visualized by enhanced chemiluminescence according to manufacturer's instructions (Santa Cruz Biotechnology).

Identification of His-SUMO-ERM conjugates

Transfected cells were lysed in denaturing buffer containing 6M guanidium-HCl and His_6-SUMO conjugates were purified as previously described [31]. Briefly, cells plated in 6-well plates were washed twice in ice cold PBS and lysed into 400 µl lysis buffer (6 M guanidium-HCl, 0.1 M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0, 0.01 M Tris-HCl pH 8,0) per 35 mm well. The lysates were centrifuged at 100,000 ***g*** for 90 min at 4°C. Each sample was mixed with 20 µl packed Ni^{2+}-NTA beads (Qiagen) and rotated 3h at room temperature. The beads were then washed twice with lysis buffer, three times with 8 M Urea, 0.1 M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 6.4 and once with PBS before being resuspended in Laemmli gel loading buffer and analyzed by SDS-PAGE. Proteins were then electrophorectically transferred to nitrocellulose membranes and His_6-SUMO ERM conjugates were detected by Western blotting using a rabbit polyclonal anti-ERM antibody [7].

RESULTS

The NRD is sumoylated

We and others reported that when fused to the heterologous Gal4 DNA binding domain, ERM (G4-ERM$_{1-510}$, Fig. 1) exhibits a very low transactivation ability relative to that of the N-terminal TAD (G4-ERM$_{1-72}$) fusion protein [15, 19, 27, 28]. Removal of residues 299 to 510 including the DBD and the C-terminal domain (G4-ERM$_{1-298}$) had only a marginal impact on activity. By contrast, further C-terminal deletion from amino acid 227 to 298 (G4-ERM$_{1-226}$) yielded a protein with an enhanced transcriptional activity. However, this activity was still lower than that of G4-ERM$_{1-72}$ (Fig.1). From these data, the NRD of ERM can thus be mapped between amino acid 73 to 298. As illustrated in figure 1, three of the five SUMO consensus sites in ERM are localized in this region (K^{89}, K^{263} and K^{293} named K^1, K^2 and K^3, respectively) suggesting that sumoylation of the NRD could be involved in inhibition of the N-terminal TAD activity.

To test this hypothesis, we first examined whether G4-ERM$_{1-298}$ which contains only the N-terminal TAD and the NRD is effectively sumoylated in cells. For this purpose, COS-7 cells were co-transfected with G4-ERM$_{1-298}$ and His$_6$-SUMO. SUMO-modified proteins were then purified on Ni^{2+} agarose-beads and analyzed by Western blot with anti-ERM antibody. As shown in figure 2 (lane 1), G4-ERM$_{1-298}$ is detected in the cellular extract as a protein with a molecular mass of nearly 62 kDa. In the SUMO-conjugated fraction (Ni^{2+} purification), higher molecular mass G4-ERM$_{1-298}$ species were observed. In fact, two major forms of about 75 and 85 kDa were detected. These two ERM forms were observed only when SUMO and G4-ERM$_{1-298}$ were co-expressed (data not shown). Furthermore, these Ni^{2+} purified proteins disappeared when the experiment was performed with mutated ERM in which the three lysine residues within the sumoylation consensus motifs were mutated into arginine (G4-ERM$_{1-298}$ $K^{89, 263, 293}$R noted KR^{123}: Fig. 2, lane 8), while, compared to wild-type G4-ERM$_{1-298}$, the mutated form was similarly produced. This indicates that sumoylation of G4-ERM$_{1-298}$ occurs in cells and results in the appearance of two major SUMO-conjugated ERM forms. It must however be noted

that these two sumoylated forms could not be detected in the cellular extract indicating that the SUMO-modified forms represent only a few percent of G4-ERM$_{1-298}$ as previously described for many sumoylated proteins [32].

To characterize the two SUMO-conjugated ERM forms, we performed site-directed mutagenesis of the three lysines to arginine, alone or in combination, and tested the sumoylation status of each mutant as described above. When the first lysine SUMO acceptor was mutated alone ($K^{89}R$ noted KR^{1}) or in combination with another site ($K^{89,\ 263}R$ noted KR^{12} and $K^{89,\ 293}R$ noted KR^{13}), only the upper band disappeared (compare lanes 1, 2, 5 and 6, Fig. 2). Furthermore, this band was the sole remaining after mutation of both K^{2} and K^{3} (KR^{23}, lane 7) indicating that this 85kDa ERM species is a monosumoylated form of ERM on K^{1}. By contrast neither mutation of the second SUMO site (KR^{2}) nor mutation of the third one (KR^{3}) abolished the 75kDa form. However, mutation of both sites (KR^{23}) prevented the appearance of this form (compare lanes 3, 4 and 7). This indicates that G4-ERM$_{1-298}$ can be monosumoylated on site 2 or on site 3 and that these two modified forms have in fact similar pattern of migration yielding the 75kDa ERM form. Altogether, our data suggest that the observed SUMO-conjugated forms of ERM correspond to a mix of ERM monosumoylated on each of the three sumoylation motifs. This however implies that the impact of SUMO conjugation on the molecular mass is dependent of the position of the modified site on the protein. Abnormal migration of SUMO-modified proteins has often been observed [32] and a similar situation has particularly been described for the BKLF protein [33].

Loss of SUMO modification relieves the NRD function

Since the mutation of the three lysine residues within the sumoylation motifs completely prevented SUMO modification of G4-ERM$_{1-298}$, we used G4-ERM$_{1-298}$ KR^{123} which mimics unsumoylated G4-ERM$_{1-298}$ to investigate the role of G4-ERM$_{1-298}$ sumoylation. As illustrated in figure 3, G4-ERM$_{1-298}$ activity on a Gal4-driven luciferase reporter plasmid is very weak. It was nearly 2% of that of the G4-ERM$_{1-72}$ and showed only about 3-fold increase when compared to the Gal4 DBD alone (Fig. 1). By contrast, G4-ERM$_{1-298}$ KR^{123} exhibited a dramatic increase in transcriptional activity, nearly 110 fold higher than its wild-type counterpart and this mutated protein was more active than the

N-terminal TAD of ERM, G4-ERM$_{1-72}$. Increasing the doses of expression plasmid for G4-ERM$_{1-72}$ and G4-ERM$_{1-298}$ KR^{123} did not further increase the activity of both proteins and activity of G4-ERM$_{1-72}$ remained significantly lower than that of G4-ERM$_{1-298}$ KR^{123} (Fig. 3). Therefore it seems that this difference in activity cannot be explained by differences in protein expression and/or stability. A similar observation can also be made concerning the difference in activity observed between wild-type and mutated G4-ERM$_{1-298}$. Furthermore we previously showed that both proteins were expressed at similar levels in COS-7 cells (Fig. 2). Thus mutation of the SUMO sites leads to the disappearance of the sumoylated forms of ERM and to a dramatic increase in transcriptional activity.

To more precisely investigate the role of sumoylation in the NRD activity, we tested the effect of proteins involved in sumoylation on the transcriptional activity of G4-ERM$_{1-298}$. We used SenP1, a protease deconjugating SUMO on target proteins [34]. As expected, expression of the active form of SenP1 strongly decreased G4-ERM$_{1-298}$ sumoylation (compare lanes 2 and 4, Fig. 4A) whereas overexpression of an inactive SenP1 protein (SenP1 mut ; R^{630}L, K^{631}M [35]) did not reduce G4-ERM$_{1-298}$ sumoylation (compare lanes 2 and 3). In reporter gene assay, overexpression of the wild-type SenP1 caused a major increase (about 50 fold) in the activity of G4-ERM$_{1-298}$: transcription activity level of the fusion protein was near that of G4-ERM$_{1-72}$ without reaching that of its mutated counterpart (Fig. 4B). This effect was linked to the presence of the SUMO sites as neither G4-ERM$_{1-72}$ activity nor G4-ERM$_{1-298}$ KR^{123} activity increased when the active SUMO protease was expressed. Furthermore, transcriptional activity of G4-ERM$_{1-298}$ remained very weak after expression of the inactive form of SenP1 indicating that SenP1 activates ERM-dependent transcription through its desumoylation activity. Similar results were also obtained with Ubc9 C^{93}S, a mutated form of the SUMO conjugating enzyme Ubc9 which is inactive and functions as a dominant negative form [36, 37] (data not shown). Thus, altogether these results show that SUMO modification of NRD inhibits the transcriptional activity of the N-terminal TAD of ERM.

One SUMO site is effective in inhibiting transcriptional activity

As shown above, decreased sumoylation of G4-ERM$_{1-298}$ led to an increase in its transcriptional activity. However, it was not clear whether sumoylation of all the three NRD SUMO

sites is required for effective transcriptional inhibition and whether inhibition is similarly mediated by each SUMO site. We thus compared the activity of G4-ERM$_{1-298}$ with that of G4-ERM$_{1-298}$ mutated on the three lysines, individually or in combination (Fig. 5).

Proteins with only one mutated SUMO site (KR^{1}, KR^{2} or KR^{3}), i.e. with two intact SUMO sites, were transcriptionally more active than the wild-type. The activity of these three mutants was comparable but still very low since it did not exceed 5% of the unsumoylated G4-ERM$_{1-298}$ KR^{123} form (set to 100%, Fig.5). As compared to the wild-type protein, further increase in activity was observed for the mutated proteins in which only one sumoylation site remained intact (G4-ERM$_{1-298}$ KR^{12}, KR^{13} and KR^{23}). Among these mutated ERM forms, G4-ERM$_{1-298}$ KR^{13} was slightly more active but its activity was however only about one third of the unsumoylated counterpart. The transcriptional activity of these mutated proteins was thus still significantly inhibited. To confirm whether inhibition of transcriptional activity of the different mutants is effectively linked to sumoylation on the remaining SUMO sites, we also looked for the transcriptional capacity of these proteins in the presence of SenP1. Except for the unsumoylated mutant G4-ERM$_{1-298}$ KR^{123}, activity of all the mutants was increased when SenP1 was overexpressed (Fig. 5). As the wild-type protein, activity of ERM mutated on a single SUMO site was not fully derepressed. By contrast, activity of ERM mutated on two SUMO sites and more particularly that of G4-ERM$_{1-298}$ KR^{13} nearly reached the activity of G4-ERM$_{1-298}$ KR^{123} which can not be anymore SUMO modified. This clearly indicates that inhibition of transcriptional activity of these mutants is related to sumoylation of the remaining SUMO sites.

In conclusion, it appears that only one free lysine SUMO-acceptor within the NRD is sufficient to efficiently inhibit the activity of G4-ERM$_{1-298}$ and that the inhibition efficiency is only poorly affected by the position of SUMO attachment. Nevertheless, all the SUMO sites of the NRD are required for the maximal inhibition of transcriptional activity.

NRD can repress a VP16 transactivation domain

As sumoylated NRD is involved in the inhibition of ERM TAD activity, we wondered whether this inhibition was specific of ERM TAD or whether NRD fused to another TAD could also inhibit its activity. For this purpose, we fused the activation domain of VP16 to Gal4 DBD to generate

G4-VP16 and the NRD of ERM to G4-VP16 to create G4-VP16-NRD. As shown in figure 6A, G4-VP16 significantly activated reporter gene expression whereas fusion with the NRD totally repressed this expression. When the three SUMO sites in the NRD were mutated (G4-VP16-NRD KR^{123}), the transcriptional activity of the mutant protein was similar to that of G4-VP16. Since expression of wild-type and mutant G4-VP16-NRD was similar (Fig. 6A, right panel), the difference in activity was likely due to sumoylation. We also co-expressed the three fusion proteins with SenP1 and observed that only G4-VP16-NRD activity was derepressed. Therefore, we can conclude that SUMO modification is responsible for transcriptional inhibition mediated by the NRD and that the SUMO-dependent repressive function of the NRD is not specific to the ERM TAD. Furthermore, NRD can thus be considered as a repression domain acting in *cis* in a heterologous context.

We next designed experiments to test whether NRD targeted to a DNA binding site in a promoter could repress the activity of a transactivator targeted to another site in the same promoter. We used a composite reporter element consisting of a promoter preceded by both LexA and Gal4 DNA-binding sites. Transfection of the G4-VP16 effector plasmid along with this reporter gene resulted in a strong transcriptional activation (Fig. 6B). However, when a LexA-NRD expression vector was transfected with the G4-VP16 plasmid, a significant reduction in activation was observed in a dose-dependent manner. By contrast, unsumoylable LexA-NRD KR^{123} had only a marginal impact on G4-VP16 activity although it was expressed at same level as the sumoylable LexA-NRD (Fig. 6B, right panel). Furthermore in the absence of the G4-VP16 effector plasmid, expression of LexA-NRD but not its mutated counterpart also resulted in a significant reduction of the reporter gene expression suggesting that NRD is also dominant over endogenous transcriptional activators conferring the basal activity of the reporter gene (Fig. 6C). Clearly, these results indicate that NRD can confer a SUMO-dependent repression in *trans*.

SUMO sites outside the NRD are also inhibition motifs

We showed above that mutation of the three NRD SUMO sites abolished SUMO modification of G4-ERM_{1-298} and increased its transcriptional activity. We thus wondered whether the sumoylation of the NRD had the same impact on full length ERM, i.e. whether mutation of the NRD SUMO sites

could restore the full activity of ERM. To this aim, we mutated the three NRD SUMO sites in full length ERM fused to Gal4 DBD (G4-ERM$_{1-510}$ KR^{123}) and then compared the status of sumoylation of this protein to the wild-type counterpart. As previously described, the fusion proteins and His$_6$-SUMO were coexpressed and purified His$_6$-SUMO-conjugated proteins were analysed by Western blot with anti-ERM antibody. For the wild-type protein, we found major immunoreactive bands at about 140 and 180 kDa (Fig. 7A). Mutation of the SUMO sites within the NRD (KR^{123}) induced disappearance of the highest immunoreactive forms. Nevertheless, a major SUMO-conjugated form at about 130 kDa was still observed. Whether this protein is minor in SUMO-conjugated wild-type G4-ERM$_{1-510}$ species and amplified in the mutated protein and/or is affected in electrophoretic mobility due to the lysine mutations remains to be determined. However, whatever it is, mutation of NRD SUMO sites did not suppress sumoylation of G4-ERM$_{1-510}$ suggesting that sites outside the NRD are also conjugated to SUMO.

We then compared the transcriptional activity of the two proteins on the Gal4-driven reporter gene. As illustrated in figure 7B, G4-ERM$_{1-510}$ was nearly inert and mutation of the NRD SUMO sites resulted in a large increased transcriptional activity. However, the resulting activity was still low compared to the G4-ERM$_{1-72}$ one, suggesting that remaining sumoylation of G4-ERM$_{1-510}$ KR^{123} could confer repression. Since two consensus SUMO sites were present downstream the NRD (K^{350} and K^{468} noted K^4 and K^5, respectively), we further mutated G4-ERM$_{1-510}$ KR^{123} on these motifs yielding G4-ERM$_{1-510}$ KR^{12345}. This chimera protein was produced similarly to G4-ERM$_{1-510}$ wild-type or KR^{123} mutant (Fig. 7A, lower panel) and could not be sumoylated anymore (Fig. 7A, upper panel) thus indicating that the remaining sumoylation on G4-ERM$_{1-510}$ KR^{123} occurred on the two SUMO sites outside the NRD. At the transcriptional level, further increase in activity was observed for G4-ERM$_{1-510}$ KR^{12345} as compared to G4-ERM$_{1-510}$ KR^{123} (Fig. 7B). This observation thus strongly suggests that the SUMO sites outside the NRD also function as repression motifs. Nevertheless, the activity of G4-ERM$_{1-510}$ KR^{12345} was only about 40% of that of G4-ERM$_{1-72}$, indicating that mechanisms other than sumoylation are also involved in the repression of G4-ERM$_{1-510}$ activity.

DISCUSSION

Structure / function studies on the PEA3 group members have identified negative regulatory domains (NRD) that are able to inhibit the activity of the adjacent N-terminal TAD [15, 16, 19, 38]. The present data show that the three sumoylation motifs present in the ERM NRD are the functional components of this domain since their mutation and proteins interfering with the SUMO pathway relieve the inhibitory function of the NRD. ERM thus acts like several transcription factors as c-Myb [21], C/EBP [22], Elk-1 [23] or Sp3 [24] in which SUMO sites are involved in repression of activity. As the sumoylation motifs are also present in PEA3 and ER81 and are highly conserved in the human, mouse and zebrafish versions, it is likely that inhibition of TAD activity due to SUMO modification of the NRD might be a general feature of the PEA3 group members.

Site directed mutagenesis of the sumoylation motifs eliminated inhibition of ERM_{1-298} without affecting neither protein stability nor localization or DNA-binding of the mutated protein (data not shown). Mutagenesis yielded however a protein about two fold more active than the N-terminal TAD, ERM_{1-72}. One possibility is that the 73-298 region of ERM harbours an activation domain. However, using Gal4 fusion proteins, the occurrence of a putative TAD in this region was neither observed in human ERM [27], nor in mouse PEA3 and ER81 [16, 39]. Another hypothesis is that the N-terminal TAD extends downstream of AA 72 which corresponds to the end of the acidic domain highly conserved in the PEA3 group proteins [15]. Accordingly, in mouse PEA3, the N-terminal TAD has been extended to AA 84 (which corresponds to AA 80 in ERM) because mutants with N-terminal end point at residues 74 and 85 were progressively affected in their activity [16]. In mouse ER81, a TAD was mapped in the first 182 residues of protein which include the first sumoylation motif [38]. Nevertheless, no experiment comparing activity of this region with further deletion downstream the acidic domain was performed.

The difference in the C-terminal border of the N-terminal TAD among the PEA3 group members explains at least partially the difference in the NRD mapping. Initially, this region in human ERM was defined between AA 166 and 326 while TAD was extended to AA 166 [19]. In mouse PEA3, a region lying AA 85 to 100 was found to repress the activity of the TAD mapped upstream

[16]. Finally, it has been reported that AA 183 to 249 dampen the transcriptional activity of the AA 1-182 transactivation domain in ER81 protein [38]. Nevertheless, the delimited inhibitory region in the PEA3 group members contains at least one SUMO site which is probably responsible for the observed inhibitory function. Indeed, we show here that the presence of only one intact SUMO site is sufficient to significantly repress ERM_{1-298} activity. The activity of such mutant is only 30% of that of the unsumoylated protein and is similar to that of the C-terminal deletion mutant G4-ERM_{1-226} (Fig. 1) in which only the first SUMO site remained. Moreover, we also show that the position of the remaining SUMO site had no crucial impact on inhibition capacity. Nevertheless, it remains that all SUMO sites are required to maximize the repression of activity.

Although the three SUMO sites participated to maximal repression of activity, we were not able to show that an ERM molecule was modified by SUMO at multiple sites. Indeed, we have only detected monosumoylated ERM although in some rare experiments, we have also observed higher immunoreactive bands probably corresponding to ERM monosumoylated on multiple sites (data not shown). It must however be kept in mind that overexpression of SenP1 only partially derepressed activity of ERM_{1-298} either wild-type or mutated on a single SUMO site while total derepression was observed for mutants with only one remaining SUMO site. This indicates that full repression of ERM_{1-298} activity must be mediated by the sumoylation of more than one site. Accordingly, *in vitro* sumoylation assays have revealed the presence of G4-ERM_{1-298} forms above 100kDa reflecting that several SUMO moieties may be added per ERM molecule (data not shown). The difficulty to detect *in vivo* polysumoylation is probably due to the fact that, as in the majority of cases, *in vivo* SUMO modification of ERM is substoichiometric which is probably due to the transient and dynamic nature of sumoylation (for review [32]).

Our Gal4 studies have shown that NRD represses ERM TAD activity. However it also functions as a repression domain when fused to the potent activation domain of VP16. Moreover, results presented here reveal that sumoylated NRD can function independently when fused to a heterologous DBD. In fact, it is still able to repress basal or G4-VP16-induced activity of a reporter gene. In ERM protein, it is thus unlikely that NRD confers repression by an intramolecular mechanism involving direct interaction between NRD and N-terminal TAD. More probably, NRD is dominant

over the transactivation domain within ERM as well as over other transactivation domains such as the VP16 one. At the ERM level, we cannot exclude the possibility that sumoylated NRD represses the TAD activity by mechanisms such as steric hindrance or conformational change affecting the capacity of the TAD to interact with components necessary for transcriptional activation such as TBP and TAFII60 [28]. Such mechanisms should however be independent of the position of the SUMO site modified since we gave evidence that inhibition of G4-ERM_{1-298} activity is nearly the same whatever the SUMO site remaining in the NRD. NRD represents also a domain interacting with proteins involved in transcriptional activation such as c-Jun for ERM [19] or the PEA3 group member coactivators ACTR [40] and p300 [41] for ER81. It may thus be that SUMO modification of the NRD prevents the recruitment of such proteins to repress transcription. Conversely, interaction with PEA3 group member partners could alter the recruitment of the sumoylation machinery which would explain why c-Jun can enhance the transcriptional activity of a Gal4 fusion protein containing both the TAD and the NRD of ERM [19].

The sumoylable NRD does not lose its ability to repress transcription when artificially targeted to a promoter suggesting that SUMO itself can mediate a transcriptional effect. Accordingly, SUMO enables the recruitment of proteins required for transcriptional repression. Thus SUMO-modified PPARγ and LXR bind NCoR, a co-repressor containing HDAC activity [42, 43] and the sumoylated inhibitory domain of Elk-1 interacts with HDAC2 activity [44]. However, using HDAC inhibitors (Trichostatin A and Nicotinamide), we were unable to show a significant role for HDAC activities in the sumoylation-dependent function of the NRD (data not shown). Nevertheless, others proteins implicated in transcriptional repression such as NXP-2, LSD1 or SetDB1 have recently been identified as SUMO interacting factors [45]. It remains now to identify the protein partners recruited by SUMO modified ERM.

Our results clearly show that the SUMO motifs downstream the NRD are also implicated in the sumoylation-dependent repression of full size ERM activity in the Gal4 system. Their impact on ERM transcriptional activity was not so marked in the context of the ICAM1 or E74 promoters but, as suggested, the repressive effect of sumoylation probably varies in function of the number and identity of SUMO-modified sites according to the promoter context [26]. We thus postulate that ERM does not

contain a negative regulatory region *per se* but multiple short inhibitory modules corresponding to sumoylation motifs. Similar observation was made in the nuclear receptor SF-1 in which each SUMO site is also an intrinsic repression domain [46]. Furthermore, our data clearly indicate that sumoylation is probably not the only mechanism repressing ERM activity since activity of unsumoylable ERM_{1-510} was significantly lower than that of unsumoylable ERM_{1-298}. The C-terminal region of ERM including the DBD could thus exert a repressive activity in a sumoylation-independent context. As shown for PEA3 and two other ETS proteins, Elk-1 and SAP1, this might reflect the capacity of DBD to recruit a mSin3A-HDAC corepressor complex [47]. Future studies will be needed to test this possibility and precise the multiple mechanisms used to repress and relieve inhibition of activity of the PEA3 group members.

ACKNOWLEGMENTS

We are grateful Dr D. Monté for helpful discussions and insightful comments on this manuscript. We thank E. Ferreira for skillful technical assistance. CD is supported by a PhD grant from the French Research Ministry. This work was carried out thanks to grants awarded by the "Centre National de la Recherche Scientifique" (France), the "Ligue Nationale Contre le Cancer" (Comité Nord, France) and « the Conseil Régional Nord/Pas-de-Calais » (France, the European Regional Developmental Fund).

REFERENCES

[1]Y. de Launoit, J.L. Baert, A. Chotteau-Lelievre, D. Monte, L. Coutte, S. Mauen, V. Firlej, C. Degerny and K. Verreman, The Ets transcription factors of the PEA3 group: transcriptional regulators in metastasis, Biochim Biophys Acta 1766 (2006) 79-87.

[2]N.A. Kurpios, N.A. Sabolic, T.G. Shepherd, G.M. Fidalgo and J.A. Hassell, Function of PEA3 Ets transcription factors in mammary gland development and oncogenesis, J Mammary Gland Biol Neoplasia 8 (2003) 177-90.

[3]A. Chotteau-Lelievre, R. Montesano, J. Soriano, P. Soulie, X. Desbiens and Y. de Launoit, PEA3 transcription factors are expressed in tissues undergoing branching morphogenesis and promote formation of duct-like structures by mammary epithelial cells in vitro, Dev Biol 259 (2003) 241-57.

[4]S. Arber, D.R. Ladle, J.H. Lin, E. Frank and T.M. Jessell, ETS gene Er81 controls the formation of functional connections between group Ia sensory afferents and motor neurons, Cell 101 (2000) 485-98.

[5]J.H. Lin, T. Saito, D.J. Anderson, C. Lance-Jones, T.M. Jessell and S. Arber, Functionally related motor neuron pool and muscle sensory afferent subtypes defined by coordinate ETS gene expression, Cell 95 (1998) 393-407.

[6]C. Chen, W. Ouyang, V. Grigura, Q. Zhou, K. Carnes, H. Lim, G.Q. Zhao, S. Arber, N. Kurpios, T.L. Murphy, A.M. Cheng, J.A. Hassell, V. Chandrashekar, M.C. Hofmann, R.A. Hess and K.M. Murphy, ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche, Nature 436 (2005) 1030-4.

[7]J.L. Baert, D. Monte, E.A. Musgrove, O. Albagli, R.L. Sutherland and Y. de Launoit, Expression of the PEA3 group of ETS-related transcription factors in human breast-cancer cells, Int J Cancer 70 (1997) 590-7.

[8]A. Chotteau-Lelievre, F. Revillion, V. Lhotellier, L. Hornez, X. Desbiens, V. Cabaret, Y. de Launoit and J.P. Peyrat, Prognostic value of ERM gene expression in human primary breast cancers, Clin Cancer Res 10 (2004) 7297-303.

[9]B. Davidson, I. Goldberg, W.H. Gotlieb, J. Kopolovic, G. Ben-Baruch and R. Reich, PEA3 is the second Ets family transcription factor involved in tumor progression in ovarian carcinoma, Clin Cancer Res 9 (2003) 1412-9.

[10]S. Netzer, F. Leenders, P. Dumont, J.L. Baert and Y. de Launoit, Ectopic expression of the ets transcription factor ER81 in transgenic mouse mammary gland enhances both urokinase plasminogen activator and stromelysin-1 transcription, Transgenic Res 11 (2002) 123-31.

[11]S.H. Yang, P. Shore, N. Willingham, J.H. Lakey and A.D. Sharrocks, The mechanism of phosphorylation-inducible activation of the ETS-domain transcription factor Elk-1, Embo J 18 (1999) 5666-74.

[12]J.L. Kopp, P.J. Wilder, M. Desler, L. Kinarsky and A. Rizzino, Different domains of the transcription factor ELF3 are required in a promoter-specific manner and multiple domains control its binding to DNA, J Biol Chem 282 (2007) 3027-41.

[13]G.M. Lee, L.W. Donaldson, M.A. Pufall, H.S. Kang, I. Pot, B.J. Graves and L.P. McIntosh, The structural and dynamic basis of Ets-1 DNA binding autoinhibition, J Biol Chem 280 (2005) 7088-99.

[14]M.A. Pufall and B.J. Graves, Autoinhibitory domains: modular effectors of cellular regulation, Annu Rev Cell Dev Biol 18 (2002) 421-62.

[15]M.P. Laget, P.A. Defossez, O. Albagli, J.L. Baert, F. Dewitte, D. Stehelin and Y. de Launoit, Two functionally distinct domains responsible for transactivation by the Ets family member ERM, Oncogene 12 (1996) 1325-36.

[16]B.B. Bojovic and J.A. Hassell, The PEA3 Ets transcription factor comprises multiple domains that regulate transactivation and DNA binding, J Biol Chem 276 (2001) 4509-21. Epub 2000 Nov 28.

[17]S.H. Yang, D.C. Bumpass, N.D. Perkins and A.D. Sharrocks, The ETS domain transcription factor Elk-1 contains a novel class of repression domain, Mol Cell Biol 22 (2002) 5036-46.

[18]J. Stinson, T. Inoue, P. Yates, A. Clancy, J.D. Norton and A.D. Sharrocks, Regulation of TCF ETS-domain transcription factors by helix-loop-helix motifs, Nucleic Acids Res 31 (2003) 4717-28.
[19]K. Nakae, K. Nakajima, J. Inazawa, T. Kitaoka and T. Hirano, ERM, a PEA3 subfamily of Ets transcription factors, can cooperate with c-Jun, J Biol Chem 270 (1995) 23795-800.
[20]H. Abdel-Hafiz, G.S. Takimoto, L. Tung and K.B. Horwitz, The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression, Journal of biological chemistry, The 277 (2002) 33950-6.
[21]J. Bies, J. Markus and L. Wolff, Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity, Journal of biological chemistry, The 277 (2002) 8999-9009.
[22]J. Kim, C.A. Cantwell, P.F. Johnson, C.M. Pfarr and S.C. Williams, Transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding proteins is controlled by a conserved inhibitory domain that is a target for sumoylation, Journal of biological chemistry, The 277 (2002) 38037-44.
[23]S.H. Yang, E. Jaffray, R.T. Hay and A.D. Sharrocks, Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity, Molecular cell 12 (2003) 63-74.
[24]A. Sapetschnig, G. Rischitor, H. Braun, A. Doll, M. Schergaut, F. Melchior and G. Suske, Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1, EMBO journal, The 21 (2002) 5206-15.
[25]D. Girdwood, D. Bumpass, O.A. Vaughan, A. Thain, L.A. Anderson, A.W. Snowden, E. Garcia-Wilson, N.D. Perkins and R.T. Hay, P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification, Molecular cell 11 (2003) 1043-54.
[26]C. Degerny, D. Monte, C. Beaudoin, E. Jaffray, L. Portois, R.T. Hay, Y. de Launoit and J.L. Baert, SUMO modification of the Ets-related transcription factor ERM inhibits its transcriptional activity, J Biol Chem 280 (2005) 24330-8.
[27]J.L. Baert, C. Beaudoin, L. Coutte and Y. de Launoit, ERM transactivation is up-regulated by the repression of DNA binding after the PKA phosphorylation of a consensus site at the edge of the ETS domain, J Biol Chem 277 (2002) 1002-12. Epub 2001 Oct 26.
[28]P.A. Defossez, J.L. Baert, M. Monnot and Y. de Launoit, The ETS family member ERM contains an alpha-helical acidic activation domain that contacts TAFII60, Nucleic Acids Res 25 (1997) 4455-63.
[29]P. Maurer, F. T'Sas, L. Coutte, N. Callens, C. Brenner, C. Van Lint, Y. de Launoit and J.L. Baert, FEV acts as a transcriptional repressor through its DNA-binding ETS domain and alanine-rich domain, Oncogene 22 (2003) 3319-29.
[30]Y. de Launoit, M. Audette, H. Pelczar, S. Plaza and J.L. Baert, The transcription of the intercellular adhesion molecule-1 is regulated by Ets transcription factors, Oncogene 16 (1998) 2065-73.
[31]M. Treier, L.M. Staszewski and D. Bohmann, Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain, Cell 78 (1994) 787-98.
[32]E.S. Johnson, Protein modification by sumo, Annu Rev Biochem 73 (2004) 355-82.
[33]J. Perdomo, A. Verger, J. Turner and M. Crossley, Role for SUMO Modification in Facilitating Transcriptional Repression by BKLF, Mol Cell Biol 25 (2005) 1549-59.
[34]R.T. Hay, SUMO A History of Modification, Mol Cell 18 (2005) 1-12.
[35]J. Cheng, D. Wang, Z. Wang and E.T. Yeh, SENP1 Enhances Androgen Receptor-Dependent Transcription through Desumoylation of Histone Deacetylase 1, Mol Cell Biol 24 (2004) 6021-8.
[36]V. Bernier-Villamor, D.A. Sampson, M.J. Matunis and C.D. Lima, Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1, Cell 108 (2002) 345-56.
[37]J.J. Eloranta and H.C. Hurst, Transcription factor AP-2 interacts with the SUMO-conjugating enzyme UBC9 and is sumolated in vivo, Journal of biological chemistry, The 277 (2002) 30798-804.
[38]R. Janknecht, Analysis of the ERK-stimulated ETS transcription factor ER81, Mol Cell Biol 16 (1996) 1550-6.

[39]R. Janknecht and D. Monte, The ETS-related transcription factor ERM is a nuclear target of signaling cascades involving MAPK and PKA, Oncogene 13 (1996) 1745-54.
[40]A. Goel and R. Janknecht, Acetylation-mediated transcriptional activation of the ETS protein ER81 by p300, P/CAF, and HER2/Neu, Mol Cell Biol 23 (2003) 6243-54.
[41]S. Papoutsopoulou and R. Janknecht, Phosphorylation of ETS transcription factor ER81 in a complex with its coactivators CREB-binding protein and p300, Mol Cell Biol 20 (2000) 7300-10.
[42]S. Ghisletti, W. Huang, S. Ogawa, G. Pascual, M.E. Lin, T.M. Willson, M.G. Rosenfeld and C.K. Glass, Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma, Mol Cell 25 (2007) 57-70.
[43]G. Pascual, A.L. Fong, S. Ogawa, A. Gamliel, A.C. Li, V. Perissi, D.W. Rose, T.M. Willson, M.G. Rosenfeld and C.K. Glass, A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma, Nature (2005) 1.
[44]S.H. Yang and A.D. Sharrocks, SUMO Promotes HDAC-Mediated Transcriptional Repression, Mol Cell 13 (2004) 611-7.
[45]A. Rosendorff, S. Sakakibara, S. Lu, E. Kieff, Y. Xuan, A. Dibacco, Y. Shi and G. Gill, NXP-2 association with SUMO-2 depends on lysines required for transcriptional repression, Proc Natl Acad Sci U S A 103 (2006) 5308-13.
[46]W.Y. Chen, W.C. Lee, N.C. Hsu, F. Huang and B.C. Chung, SUMO modification of repression domains modulates function of nuclear receptor 5A1 (steroidogenic factor-1), J Biol Chem 10 (2004) 10.
[47]S.H. Yang, E. Vickers, A. Brehm, T. Kouzarides and A.D. Sharrocks, Temporal recruitment of the mSin3A-histone deacetylase corepressor complex to the ETS domain transcription factor Elk-1, Mol Cell Biol 21 (2001) 2802-14.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: ERM protein bears a negative regulatory domain.

Transcriptional activity of Gal4 DBD alone (G4) and different Gal4 DBD-ERM (G4-ERM) fusion proteins. RK13 cells were transiently transfected for 24h with the reporter plasmid $(Gal4)_5$-TK-luc and the different pGAP effector plasmids encoding the ERM proteins illustrated on the left. The activity of the cells transfected with the reporter plasmid and pGAP vector encoding G4 is arbitrarily set at 1. SUMO sites (ψKXE) are symbolized by stars. NRD is the negative regulatory domain. TAD is the N-terminal transactivation domain and DBD the ETS DNA-binding domain. The numbers indicate the positions of amino acids in ERM protein.

Figure 2: Sumoylation status of G4-ERM $_{1\text{-}298}$ wild-type and SUMO site mutants.

COS-7 cells were transfected with plasmids encoding G4-$ERM_{1\text{-}298}$ wild-type (wt) or lysine to arginine mutants (KR) and His-tagged-SUMO plasmid. 1, 2 and 3 correspond to the lysine SUMO-acceptor K^{89}, K^{263} and K^{293} respectively. G4-$ERM_{1\text{-}298}$ in the cell crude extract (crude extract) and in the SUMO-conjugated protein fraction isolated by nickel affinity chromatography (Ni^{2+} purification) was detected by Western-blot using anti-ERM antibody. Stars indicate non specific proteins recognized by anti-ERM antibody.

Figure 3: Mutation of the NRD sumoylation sites increases the transcriptional activity of G4-$ERM_{1\text{-}298}$.

Comparison of transcriptional activity of G4-$ERM_{1\text{-}298}$, G4-$ERM_{1\text{-}298}$ KR^{123} and G4-$ERM_{1\text{-}72}$. Experiments were done as described in figure 1 with increasing amounts of effector plasmids as indicated. The activity of the cells transfected with the reporter plasmid and pGAP vector is arbitrarily set at 1.

Figure 4: Effect of SUMO-protease SenP1 on G4-ERM$_{1-298}$ sumoylation and transcriptional activity.

(A) *In vivo* modification of G4-ERM$_{1-298}$ by SUMO in presence of SenP1 wild-type (wt) or mutant (mut). Experiment was performed as described in figure 2. Star indicates a non-specific protein recognized by anti-ERM antibody.

(B) Impact of SenP1 on transcriptional activity of G4-ERM proteins. RK13 cells were transfected as described in figure 1 with G4-ERM$_{1-298}$, G4-ERM$_{1-298}$ KR^{123} or G4-ERM$_{1-72}$ vector in presence or not of either wild-type (SenP1 wt) or mutated (SenP1 mut) SUMO protease SenP1 (20 ng). The activity of the cells transfected with the reporter plasmid and pGAP ERM$_{1-72}$ encoding G4-ERM$_{1-72}$ is set arbitrarily at 100.

Figure 5: One SUMO site in the NRD is sufficient to repress transcriptional activity

RK13 cells were transfected as described in figure 1 with plasmids encoding G4-ERM$_{1-298}$ either wild-type (wt) or mutated on the different SUMO sites (KR) as indicated in presence or not of wild-type SenP1. The activity of the cells transfected with the reporter plasmid and the effector plasmid encoding G4-ERM$_{1-298}$ KR^{123} is set arbitrarily at 100. 1, 2 and 3 correspond to the lysine SUMO-acceptor K^{89}, K^{263} and K^{293} respectively.

Figure 6: NRD is an inhibition domain acting in *cis* and *trans*.

(A) Left panel: RK 13 cells were transfected with the reporter plasmid (Gal4)$_5$-TK-luc and 25 ng of plasmids encoding either G4-VP16 or G4-VP16 NRD either wild-type or mutated on the three SUMO sites (G4-VP16 NRD KR^{123}) in presence or not of the wild-type SUMO protease SenP1 (20 ng). The activity of the cells transfected with the reporter plasmid and pGAP vector is arbitrarily set at 1. Right panel: expression in COS-7 cells of the three fusion proteins described in the left panel. The proteins were detected by Western-blot using anti-DBD Gal4 antibody.

(B) Left panel: RK13 cells were transiently transfected with 50 ng of the reporter plasmid (LexA)$_8$-(Gal4)$_5$-TK-luc, 2,5 ng of activator plasmid encoding G4-VP16 and increasing amounts of

plasmid encoding LexA-NRD wild-type or mutated (KR^{123}) (20 to 100 ng). Results are presented as in **(A)**. A schematic representation of LexA-Gal4-driven TK promoter-reporter construct is presented. LexA-NRD represents a repressor and G4-VP16 an activator in this context. Right panel: expression in COS-7 cells of the LexA fusion proteins. The proteins were detected by Western-blot using anti-LexA antibody.

(C) RK13 cells were transfected with 50 ng of the reporter plasmid $(LexA)_8$-$(Gal4)_5$-TK-luc and 100 ng of plasmid encoding LexA-NRD either wild-type or mutated (KR^{123}) as indicated. Results are presented as in **(A)**.

Figure 7: SUMO sites outside the NRD are involved in transcriptional repression.

(A) *In vivo* modification of G4-ERM_{1-510} by SUMO. G4-ERM_{1-510} wild-type (wt) or mutant (KR^{123} or KR^{12345}) was expressed with His-tagged-SUMO in COS-7 cells. ERM in the crude extract and in the SUMO-conjugated protein fraction isolated by nickel affinity chromatography (Ni^{2+} purification) was detected by Western blot using anti-ERM antibody.

(B) RK13 cells were transfected as described in figure 1 with plasmids encoding G4-ERM_{1-72} or G4-ERM_{1-510} either wild-type (wt) or mutated on the different SUMO sites (KR) as indicated. The activity of the cells transfected with the reporter plasmid and the effector plasmid encoding G4-ERM_{1-72} is set arbitrarily at 100.

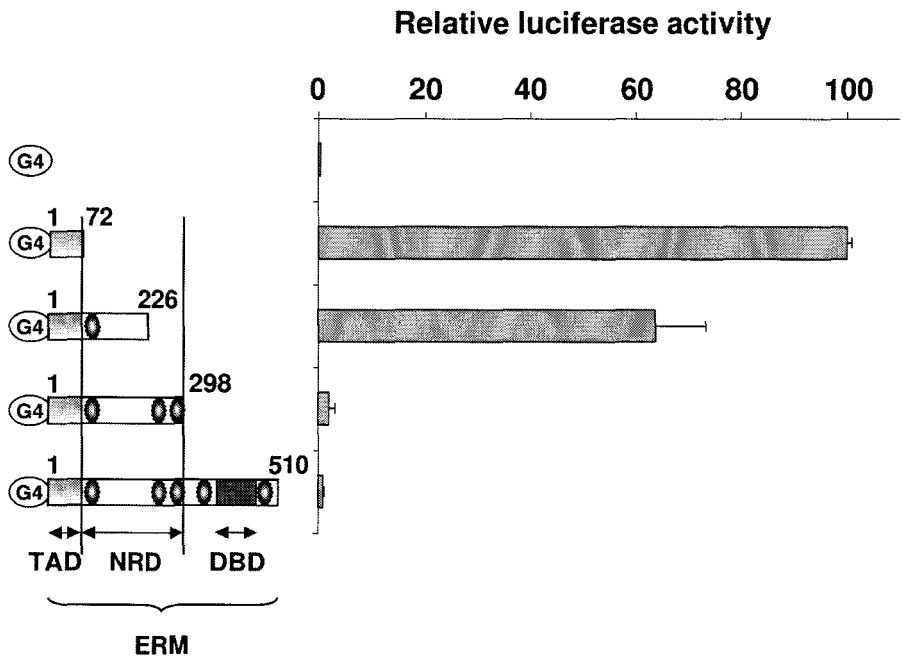


Fig 1

Degerny et al.

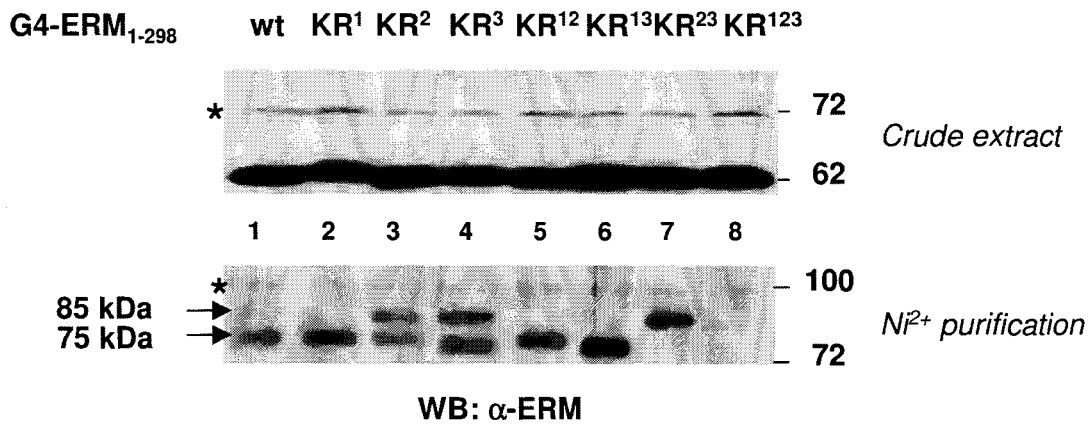


Fig 2

Degerny et al.

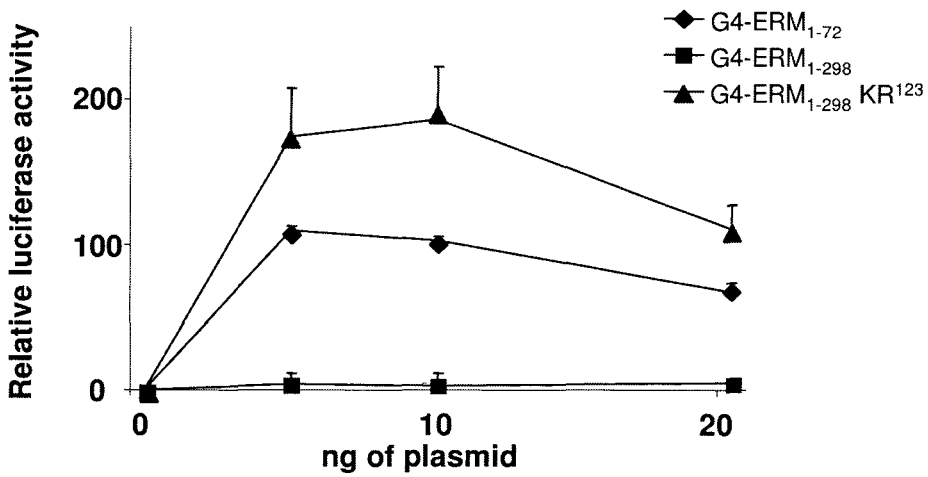


Fig 3

Degerny et al.

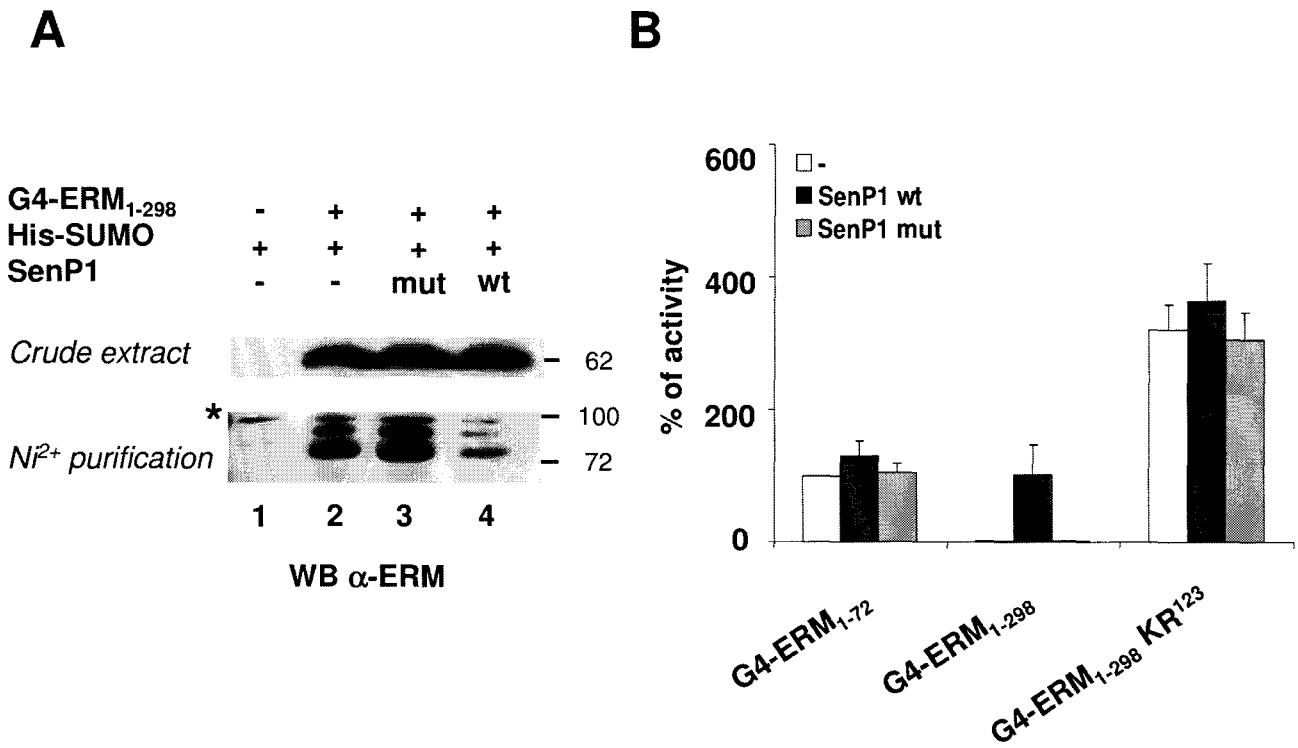


Fig 4

Degerny et al.

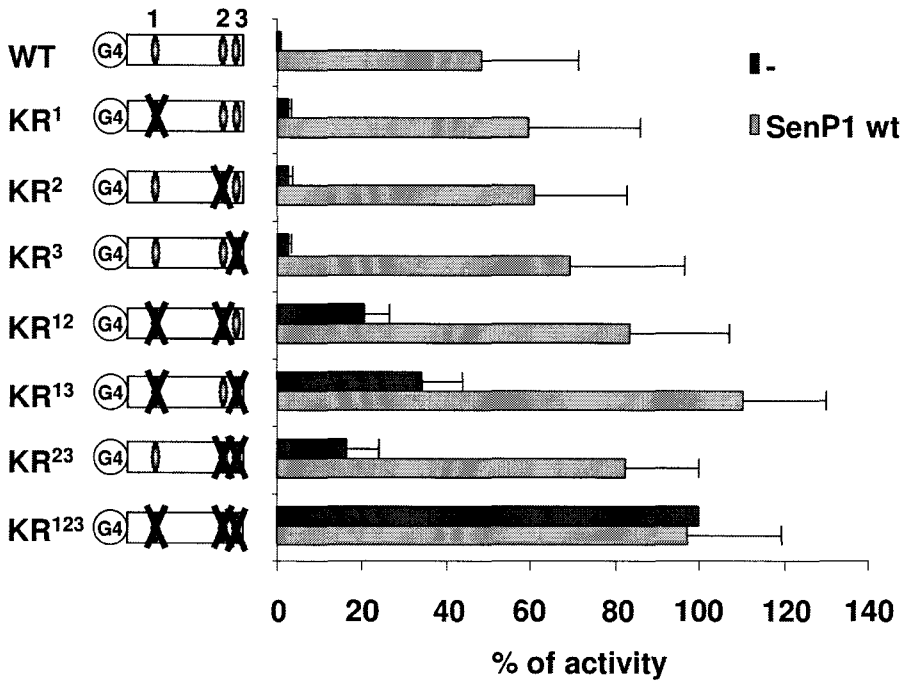
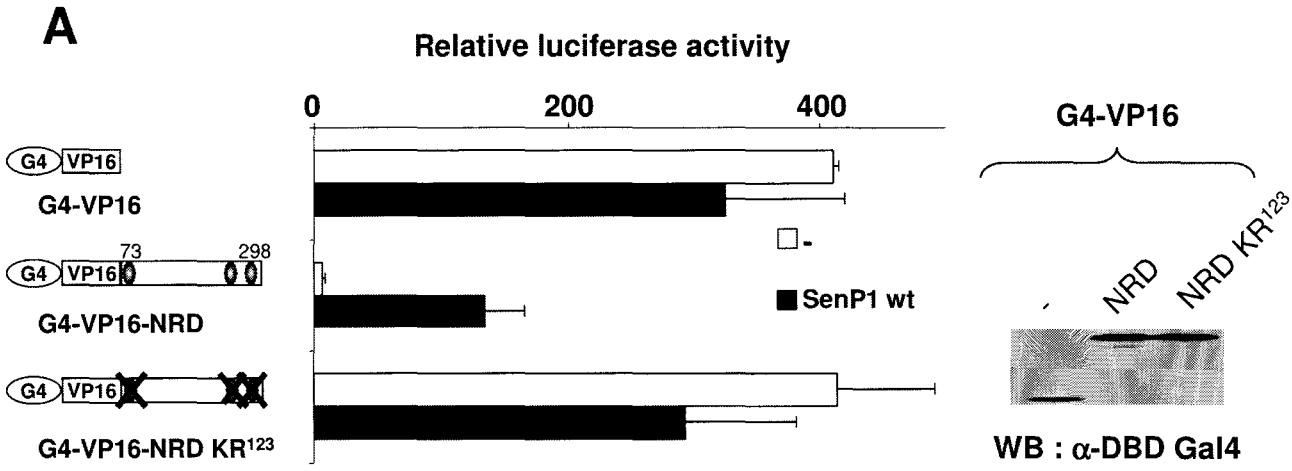


Fig 5

Degerny et al.



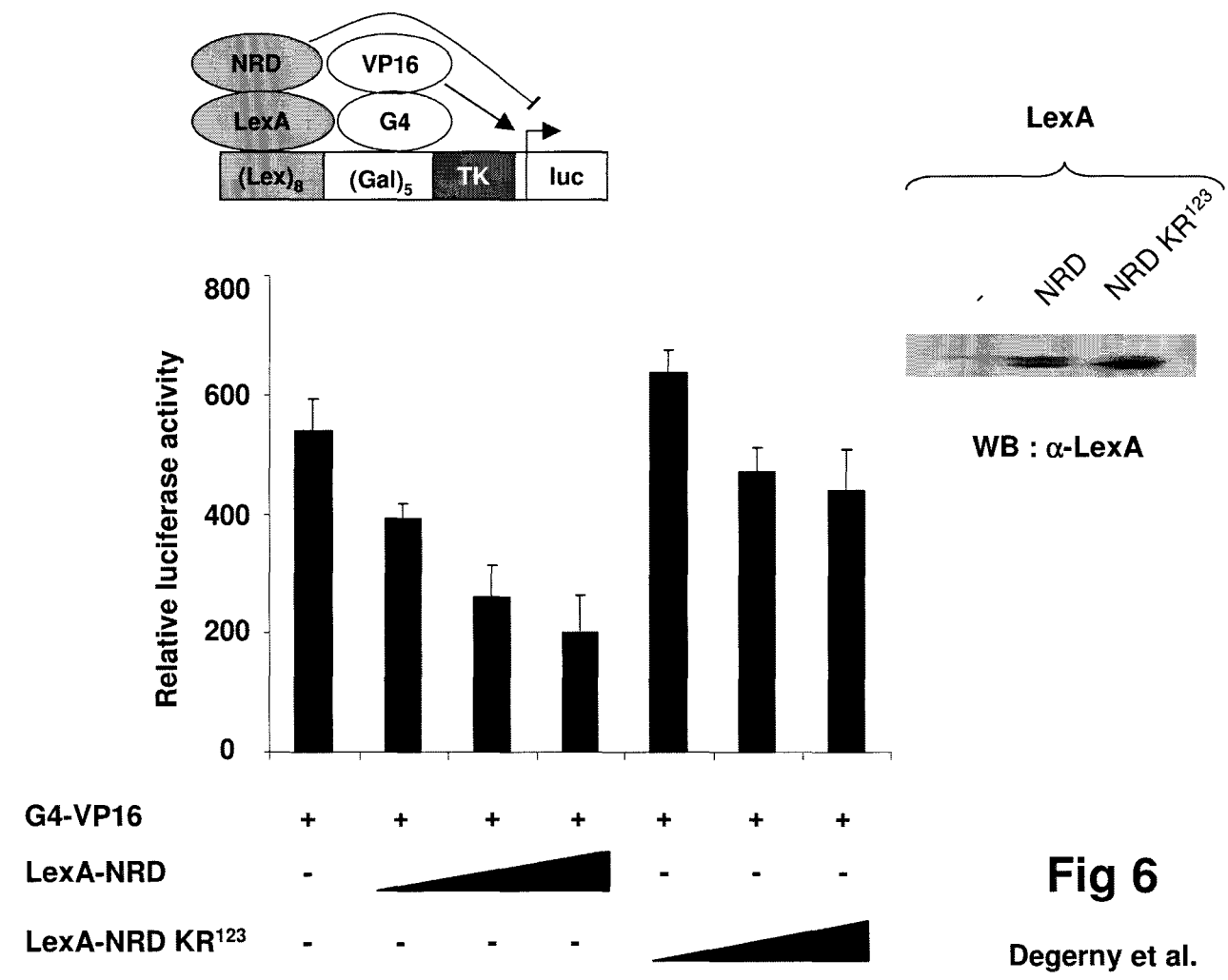


Fig 6

Degerny et al.

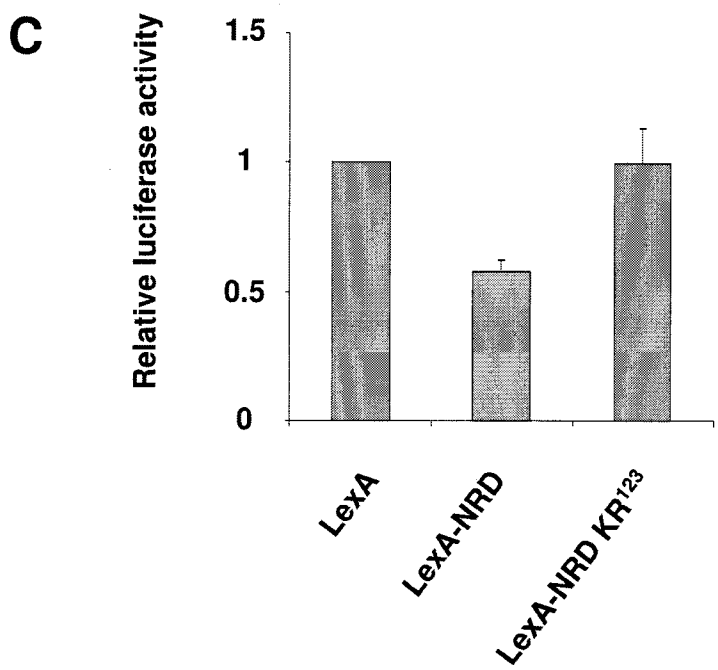
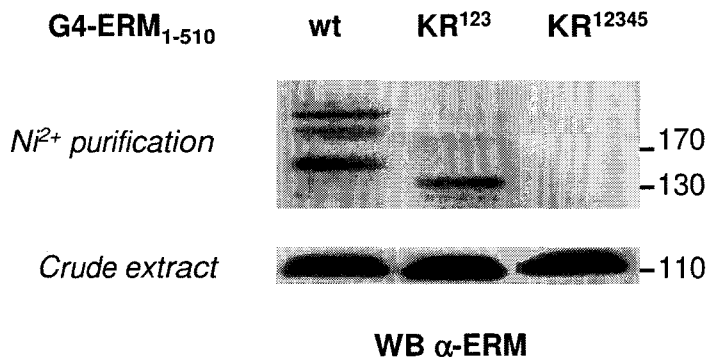


Fig 6

Degerny et al.

A



B

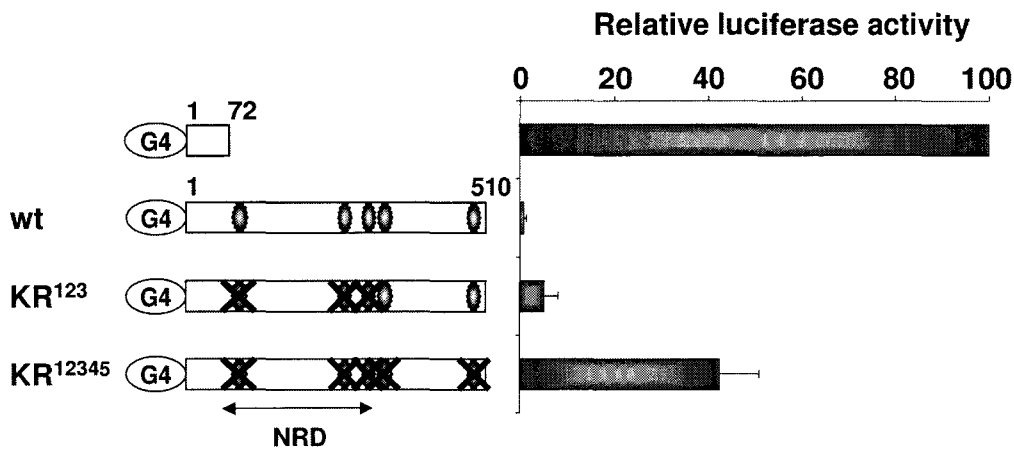


Fig 7

Degerny et al.

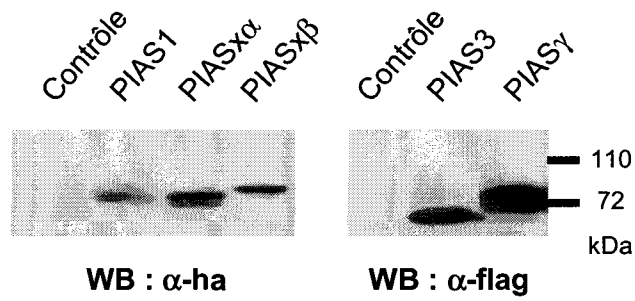


Figure 21 : Expression des différents membres de la famille PIAS.
Des cellules RK13 sont transfectées transitoirement par le plasmide pCDNA3 (contrôle) ou les plasmides exprimant les différentes PIAS étiquetées ha (1, xα et xβ) ou flag (3 et γ) (500ng). Les extraits cellulaires sont directement analysés par Western-blot à l'aide des anticorps anti-ha ou anti-flag.

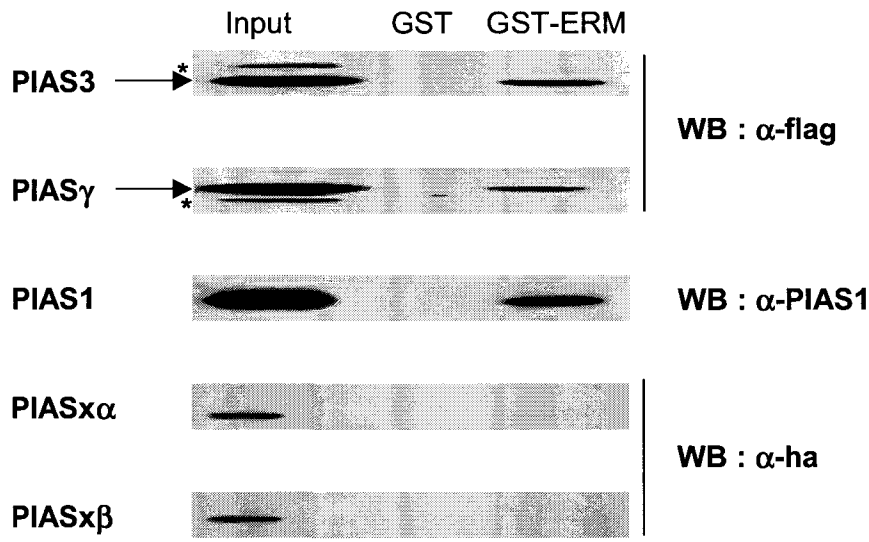


Figure 22 : Interaction *in vitro* entre les différentes PIAS et ERM.
Des extraits cellulaires de cellules RK surexprimant les différentes PIAS sont mis en contact avec la protéine de fusion GST-ERM ou la GST immobilisées sur des billes de glutathion-sépharose. L'input correspond à l'analyse directe de 5% de l'extrait cellulaire mis en contact avec les billes. La présence des protéines PIAS est détectée par Western-blot à l'aide des anticorps précisés. L'étoile signale une protéine aspécifique reconnue par l'anticorps anti-flag.

III. Sumoylation et SUMO-ligase pour ERM

Nous avons montré précédemment que la sumoylation est responsable de l'inhibition de l'activité transcriptionnelle d'ERM. Toutefois, les mécanismes conduisant à la sumoylation et à la régulation de celle-ci sont inconnus. Un acteur essentiel de la régulation de la conjugaison de SUMO est la SUMO-ligase. En effet, alors qu'il n'existe qu'une seule enzyme de conjugaison de SUMO, plusieurs SUMO-ligases ont été décrites ; ces protéines participent à la spécificité de reconnaissance du substrat et favorisent la sumoylation de la protéine ainsi ciblée (pour revue [108]).

A. Certaines PIAS interagissent avec ERM

Contrairement à d'autres facteurs de transcription sumoylables, le crible double hybride en cellules de levure n'a pas permis l'identification d'interacteurs susceptibles de correspondre à une SUMO-ligase (C.Beaudoin, communication personnelle). Pour cette raison, nous avons réalisé une approche ciblée en utilisant des SUMO-ligases connues. Parmi celles-ci, nous nous sommes focalisés sur les protéines de la famille PIAS (PIAS 1, 3, γ, xα et xβ) car elles participent à la conjugaison de SUMO sur la majorité des facteurs de transcription (pour revue [276]).

Dans une première étape, nous avons transfecté des cellules RK13 avec les plasmides codant les différentes protéines PIAS et, comme le montre la figure 21, ces cinq protéines sont parfaitement détectées par Western-blot dans les extraits des cellules transfectées. Nous avons alors utilisé ces extraits pour réaliser des tests d'interaction avec ERM par l'utilisation de la technique de GST pull-down. Les extraits cellulaires (input) ont été mis en présence de GST ou de la protéine de fusion GST-ERM fixées sur un support de glutathion-sépharose. Après lavages et élution, les protéines ont été analysées par Western-blot à l'aide des anticorps appropriés (fig. 22). Parmi les cinq protéines, seules les PIAS1, 3 et γ sont nettement retenues par la fusion GST-ERM et non par la GST seule. ERM n'interagissant pas très significativement avec les protéines PIAS xα et xβ, leur étude n'a pas été poursuivie.

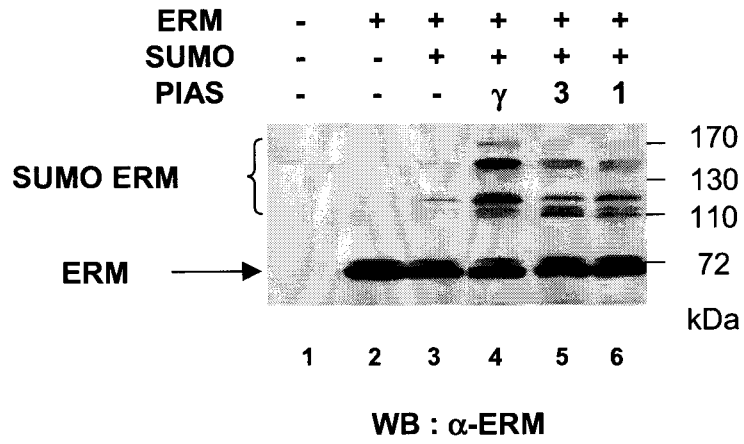


Figure 23 : Niveau de sumoylation d'ERM en présence des différentes PIAS.
Des plasmides codant SUMO (300ng), ERM (300ng) et les différentes PIAS (100ng) sont co-exprimées comme indiqué dans les cellules RK13. Les extraits cellulaires sont analysés par Western-blot avec un anticorps anti-ERM.

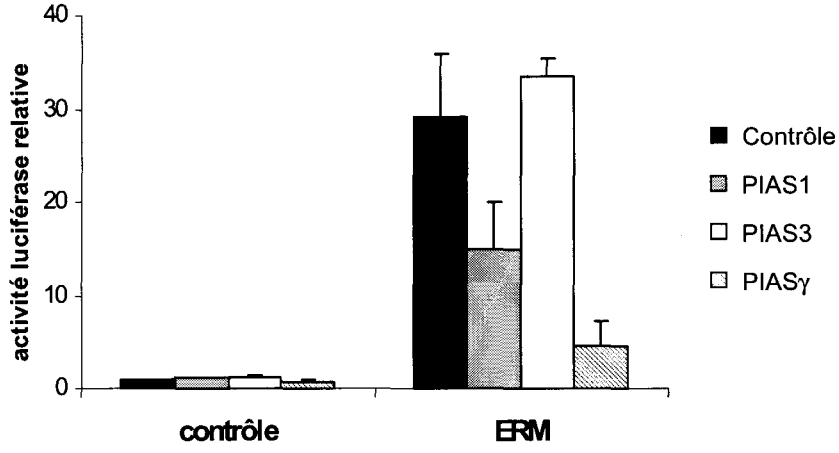


Figure 24 : Impact de l'expression des protéines PIAS sur l'activité transcriptionnelle d'ERM.
Les cellules RK13 sont transfectées transitoirement pendant 24h avec 10ng des différents plasmides d'expression PIAS, 10ng de plasmide pSV (contrôle) ou effecteur codant ERM et 100ng de vecteur rapporteur ICAM-luc. L'activité des cellules transfectées par le vecteur rapporteur et le plasmide pSV en absence de PIAS est fixée à 1. Les résultats sont la moyenne (+/- SEM) de 4 expériences indépendantes réalisées en duplicats.

B. Les PIAS qui modulent le niveau de sumoylation et l'activité d'ERM

1) Sumoylation d'ERM

Les SUMO-ligases interagissent avec le substrat et stimulent la sumoylation en orientant la lysine cible (pour revue [108]). Nous avons donc cherché à déterminer l'impact de l'expression des trois protéines PIAS interagissant avec ERM sur le niveau de sumoylation de la protéine. Nous avons co-exprimé ERM, SUMO et les PIAS 1, 3 et γ dans les cellules RK13 et les extraits cellulaires ont été analysés par Western-blot avec un anticorps anti-ERM. En présence de SUMO, nous détectons, outre la forme non modifiée d'ERM à 70kDa, des formes sumoylées entre 110 et 150 kDa (fig. 23, comparer les pistes 2 et 3). Suite à la surexpression des différentes protéines PIAS, un renforcement de l'ensemble des formes sumoylées est observé et une forme supplémentaire proche de 170kDa apparaît. L'effet le plus net est obtenu de manière reproductible lors de la surexpression de PIASγ (piste 4), alors que son affinité relative en pull-down ne semble pas supérieure à celle des deux autres PIAS (fig. 22). Ces résultats indiquent que les trois protéines PIAS interagissant avec ERM sont également capables d'augmenter son niveau de sumoylation lorsqu'elles sont co-exprimées avec SUMO.

2) Activité d'ERM

Puisque les PIAS 1, 3 et γ interagissent avec ERM et augmentent sa sumoylation, nous avons cherché à déterminer si ces protéines modulent aussi son activité transcriptionnelle. Nous avons donc évalué l'impact de l'expression des protéines PIAS 1, 3 et γ sur l'activité transcriptionnelle d'ERM en utilisant le vecteur rapporteur ICAM [55] (fig. 24). De manière surprenante, l'expression de PIAS3 n'a pas d'effet significatif sur l'activité transcriptionnelle d'ERM. Nous avons testé différentes doses de plasmide codant cette protéine sans observer de variations significatives (donnée non montrée). Par contre, l'expression des PIAS1 et γ réprime l'activité du facteur de transcription. Ainsi, la co-expression de PIAS1 réduit d'environ 50% l'activité d'ERM tandis que celle de PIASγ la diminue de près de 90%. Seules les PIAS1 et γ ont donc un impact significatif sur l'activité d'ERM et l'effet d'inhibition observé s'accorde parfaitement avec l'augmentation de la sumoylation d'ERM observée suite à l'expression de ces ligases.

L'ensemble de ces résultats indique que les PIAS1 et γ sont de bonnes candidates au rôle de SUMO-ligase pour ERM et nous avons donc poursuivi l'étude de ces protéines.

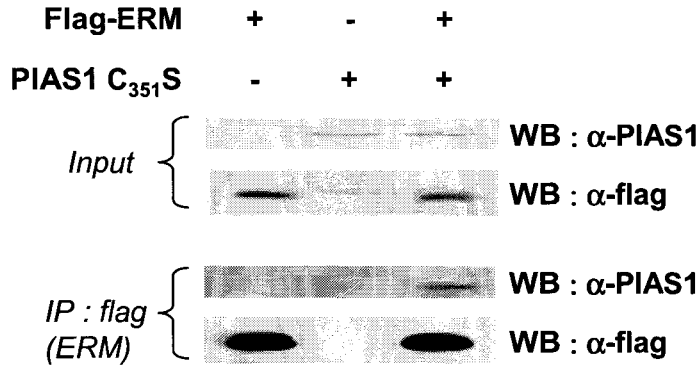


Figure 25 : PIAS1 $C_{351}S$ interagit *in vivo* avec ERM
Des cellules RK13 sont transfectées avec les plasmides d'expression ERM (200ng) et/ou PIAS1 $C_{351}S$ (500ng). Les lysats cellulaires sont incubés avec l'anticorps d'immunoprécipitation flag (IP flag) et les immuns précipités ainsi que 5% du lysat cellulaire (input) sont analysés par Western-blot à l'aide des anticorps flag ou PIAS1.

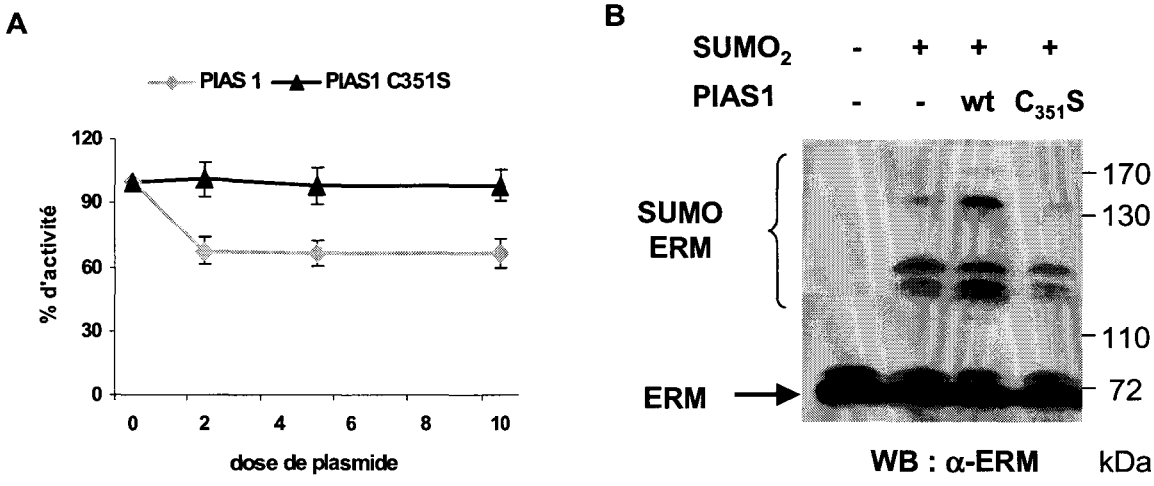


Figure 26 : Impact de l'expression de PIAS1 et PIAS1 $C_{351}S$ sur l'activité transcriptionnelle et la sumoylation d'ERM.
A/ Activité transcriptionnelle du facteur de transcription ERM. Les expériences sont réalisées comme décrit dans la figure 24. Les résultats sont présentés en % d'activité d'ERM en l'absence de PIAS. B/ Profil de sumoylation de la protéine ERM. Les expériences ont été réalisées comme décrit dans la figure 23.

C. PIAS1 : une potentielle SUMO-ligase pour ERM

1) Interaction entre PIAS1 et ERM *in vivo*

Nous avons montré précédemment l'existence d'une interaction entre ERM et PIAS1 *in vitro* (fig. 22). Nous avons donc cherché à établir l'existence de cette interaction *in vivo*. Nous avons co-exprimé ERM et PIAS1 dans les cellules RK13 et immunoprécipité soit ERM soit PIAS avec les anticorps appropriés. Dans ces conditions, nous avons été incapables de démontrer la co-existence des deux protéines dans les immuncomplexes obtenus (donnée non montrée).

Ces résultats pouvant être attribués à l'existence d'une interaction très transitoire entre ERM et PIAS, nous avons donc décidé d'utiliser une forme mutée de PIAS1 connue pour abolir sa fonction SUMO-ligase [148] et pouvant potentiellement stabiliser les interactions avec le substrat. Nous avons généré cette forme inactive en mutant la cystéine 351 du site catalytique en un résidu sérine (PIAS1 $C_{351}S$) et nous l'avons co-exprimée avec ERM dans les cellules RK13 (fig. 25, Input). Suite à l'immunoprécipitation d'ERM, PIAS1 $C_{351}S$ est spécifiquement retrouvée dans l'immun précipité des cellules co-exprimant à la fois ERM et PIAS1 et non dans celui des cellules n'exprimant que PIAS1 ou ERM (fig. 25, IP flag). Seule la forme inactive de PIAS1 est donc capable de former un complexe détectable avec ERM *in vivo*.

2) L'activité SUMO-ligase de PIAS1 est nécessaire à l'inhibition de l'activité d'ERM

PIAS1 diminue l'activité transcriptionnelle d'ERM (fig.24). Pour préciser l'importance de l'activité SUMO-ligase de PIAS1 dans cette inhibition, nous avons comparé l'impact de l'expression de PIAS1 sauvage et de la forme mutée $C_{351}S$ sur l'activité d'ERM. Comme illustré dans la figure 26A, l'expression de PIAS1 diminue d'environ 40% l'activité du facteur de transcription, cet effet étant rapidement obtenu pour des doses faibles de plasmide codant PIAS1. Au contraire, l'expression de PIAS1 $C_{351}S$ n'a pas d'effet significatif sur l'activité d'ERM, quelle que soit la dose de plasmide utilisée. Nous avons également évalué l'impact de l'expression de cette PIAS inactive sur le niveau de sumoylation du facteur de transcription (fig. 26B). De manière reproductible, l'expression de PIAS1 $C_{351}S$ ne provoque aucune augmentation du niveau de sumoylation d'ERM. A l'opposé, elle induit une légère diminution des différentes formes d'ERM sumoylées

La diminution du niveau de sumoylation d'ERM pourrait s'expliquer par un effet dominant négatif de PIAS $C_{351}S$. En effet, nous avons montré que, contrairement à la protéine sauvage, cette protéine inactivée forme un complexe détectable avec ERM (fig. 25). Toutefois, dans ce contexte, une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'ERM en

présence de PIAS1 $C_{351}S$ pouvait être attendue. Il est néanmoins possible que la diminution de la sumoylation d'ERM soit insuffisante pour induire cette augmentation d'activité. Il est aussi envisageable que la diminution apparente de la sumoylation n'ait pas lieu dans les tests d'activité, car, contrairement aux expériences de sumoylation, SUMO n'est pas exprimée dans ces tests et pourrait ainsi représenter un facteur limitant. Enfin, un possible effet activateur par défaut de sumoylation pourrait éventuellement être compensé par un effet co-répresseur de la PIAS mutée.

3) Les effets de PIAS1 sur l'activité d'ERM sont liés à la présence des sites de sumoylation

L'effet de PIAS1 sur la sumoylation et l'activité transcriptionnelle d'ERM passe par son activité SUMO-ligase. Nous avons donc cherché à établir si, dans ces conditions, l'effet observé sur l'activité d'ERM est lié à la présence des sites de sumoylation et donc à la capacité d'ERM de pouvoir être sumoylée. Nous avons donc comparé l'impact de PIAS1 sur l'activité d'ERM et du mutant non sumoylable (ERM KR^{12345}) en utilisant le vecteur rapporteur ICAM. Comme l'illustre la figure 27, l'expression de PIAS1 diminue l'activité transcriptionnelle de la forme sauvage mais n'a pas d'effet significatif sur celle de la forme non sumoylable. L'impact de PIAS1 est donc lié à la présence des sites de sumoylation d'ERM suggérant que les effets observés sont donc directement liés à la modulation de la sumoylation du facteur de transcription.

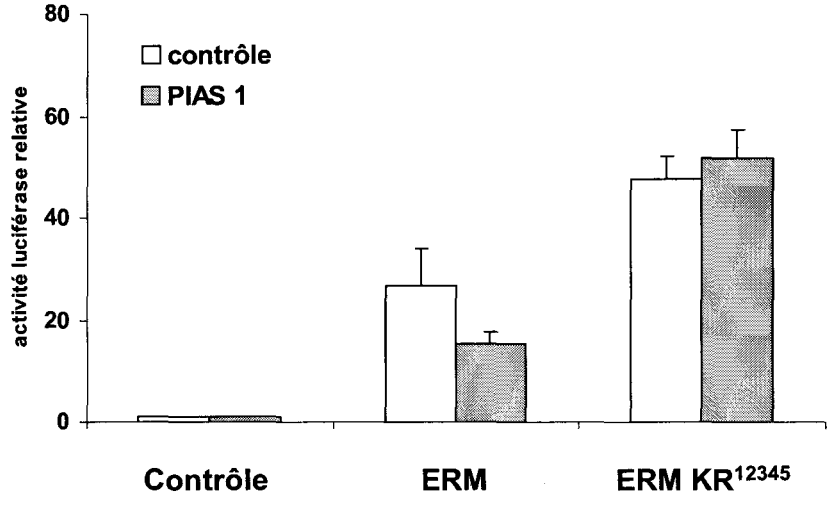


Figure 27 : Effet de l'expression de PIAS 1 sur l'activité d'ERM et du mutant non sumoylable. Les expériences ont été réalisées comme décrit dans la figure 24.

4) La sous-expression de PIAS1 augmente l'activité d'ERM

Nous avons cherché à abolir l'expression de PIAS1 par la technique d'ARN interférence afin de confirmer son rôle dans la régulation de l'activité d'ERM. Nous avons sélectionné un shRNA dont la séquence est 5'-GCTCCATATGAACACCTTA-3'. Dans les cellules HeLa, l'expression transitoire de ce shRNA diminue significativement l'expression de la protéine endogène par rapport au contrôle, alors que le niveau d'actine est équivalent dans les deux conditions (fig. 28A). Ce shRNA semble spécifique de PIAS1 puisqu'il n'a pas d'effet sur l'expression d'autres membres de la famille PIAS (donnée non montrée). Dans la même lignée cellulaire, nous avons co-exprimé ERM et le shRNA afin d'évaluer l'impact de la diminution de l'expression de la protéine sur l'activité transcriptionnelle d'ERM. En présence du shRNA PIAS1, l'activité du facteur de transcription augmente d'environ 50% par rapport à la condition contrôle (fig. 28B). La sous-expression de PIAS1 dans les cellules corrèle donc avec une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'ERM.

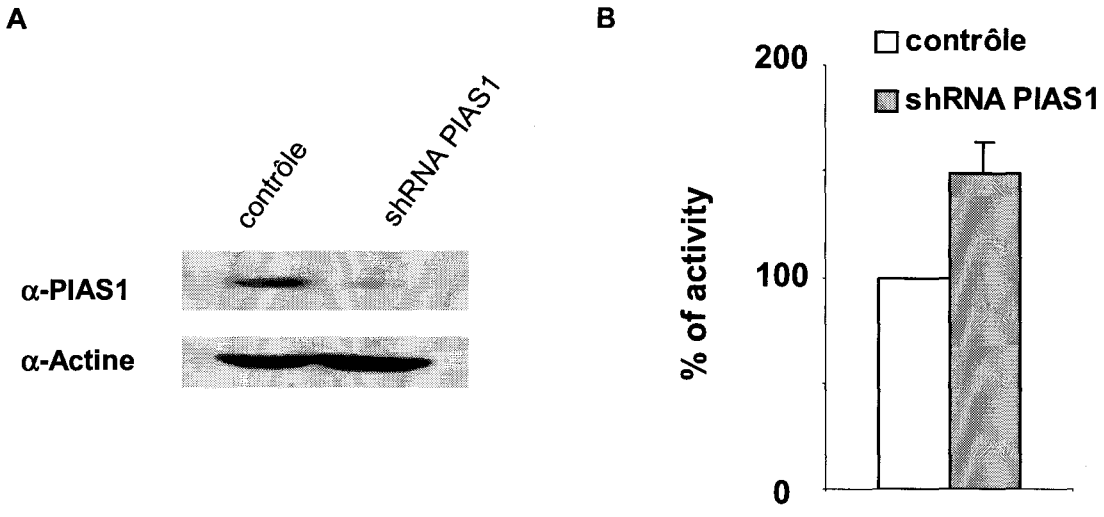


Figure 28 : La diminution d'expression de PIAS1 corrèle avec l'augmentation d'activité transcriptionnelle d'ERM dans les cellules HeLa.
A/ Efficacité du shRNA PIAS1. Des extraits de cellules HeLa transfectées par le pSUPER (contrôle) ou le pSUPER-shRNA PIAS1 sont analysés par Western-blot à l'aide d'un anticorps anti-PIAS1. L'actine sert de contrôle d'équicharge. B/ Activité transcriptionnelle d'ERM dans les cellules Hela en présence de shRNA PIAS1. Les cellules HeLa ont été transfectées pendant 24h par le plasmide rapporteur ICAM-luc (100ng), le plasmide effecteur ERM (10ng) et le pSUPER ou pSUPER-shRNA PIAS1. L'activité des cellules transfectées par le vecteur rapporteur, ERM et le pSUPER est fixée à 100%. Le résultat présenté est la moyenne (+/- SEM) de 4 expériences indépendantes menées en duplicat.

Ces résultats s'accordent avec l'hypothèse selon laquelle la diminution de l'expression de PIAS1 induite par le shRNA augmente l'activité transcriptionnelle d'ERM via une diminution de la sumoylation du facteur de transcription. Pour valider cette supposition, nous avons donc co-exprimé ERM et SUMO avec le shRNA PIAS1 ou un shRNA contrôle,

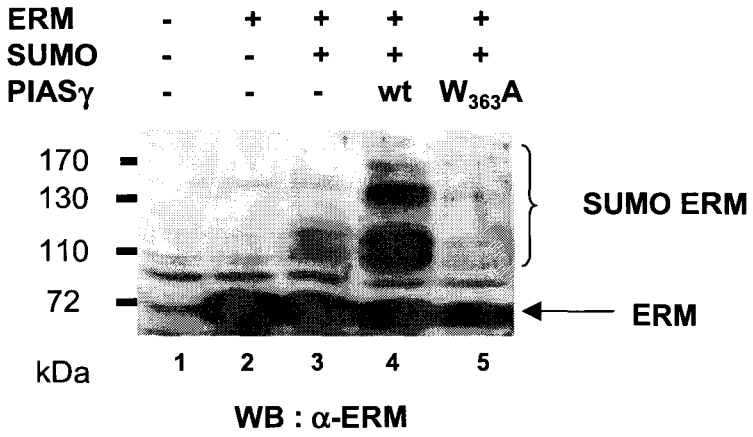


Figure 29 : Sumoylation d'ERM en présence de PIASγ.
Des cellules RK13 ont été transfectées avec les combinaisons indiquées des plasmides exprimant ERM (300ng), SUMO (300ng) et PIASγ sauvage (wt) ou déficiente dans son activité ligase ($W_{363}A$) (100ng). Les extraits cellulaires ont été analysés par Western-blot à l'aide d'un anticorps anti-ERM.

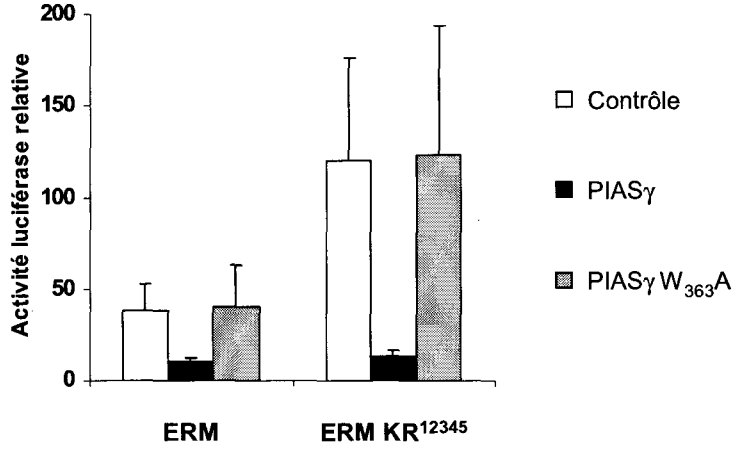


Figure 30 : PIASγ réprime l'activité transcriptionnelle d'ERM.
Les expériences sont réalisées comme décrit en figure 24. PIASγ $W_{363}A$ est déficiente dans son activité SUMO-ligase

dans les cellules HeLa et déterminé l'impact du shRNA sur le niveau de sumoylation d'ERM. Nous n'avons pas obtenu le résultat escompté, à savoir une réduction du niveau de sumoylation d'ERM dans les cellules transfectées (donnée non montrée). Il est envisageable que le défaut de sumoylation que pourrait provoquer la diminution d'expression de PIAS1 soit masqué par la surexpression de SUMO. Cette surexpression est nécessaire à la visualisation des formes sumoylées d'ERM mais pourrait favoriser une sumoylation d'ERM indépendante de PIAS1.

D. Quid de PIASγ ?

La deuxième protéine de la famille PIAS capable d'interagir *in vitro* avec ERM et de diminuer son activité transcriptionnelle est PIASγ (fig. 22). Comme précédemment, nous avons cherché à confirmer l'interaction entre ERM et PIASγ *in vivo*. Nous avons donc co-exprimé les deux protéines dans des cellules RK13 et réalisé des expériences de co-immunoprécipitation. Malheureusement, aucune interaction n'a pu être détectée entre ERM et PIASγ, quelle que soit la protéine immunoprécipitée. Comme dans le cas de PIAS1, nous avons généré une forme de PIASγ déficiente pour son activité ligase et susceptible de pouvoir former des complexes plus stables avec ERM. Nous avons donc muté le résidu tryptophane 363 en alanine créant ainsi PIASγ $W_{363}A$ [99]. Comme le montre la figure 29, ce mutant n'est plus capable de favoriser la sumoylation d'ERM dans un contexte cellulaire (comparer lignes 4 et 5). Toutefois, la réalisation d'expérience de co-immunoprécipitation avec le mutant PIASγ $W_{363}A$ n'a pas permis de montrer l'existence d'un complexe ERM/PIASγ, et ce quelle que soit la protéine immunoprécipitée.

Afin de déterminer si l'effet répresseur de PIASγ sur l'activité d'ERM pouvait être lié à son activité enzymatique, nous avons testé l'impact de la forme inactive de PIASγ sur l'activité transcriptionnelle d'ERM en utilisant le vecteur rapporteur ICAM (fig. 30). L'expression de PIASγ $W_{363}A$ n'a aucun effet inhibiteur sur l'activité du facteur de transcription ERM montrant ainsi la relation entre l'effet répresseur de PIASγ et son activité SUMO-ligase. Nous avons également réalisé le même type d'expérience avec la forme non sumoylable d'ERM (ERM KR^{12345}). Alors que l'expression de PIASγ $W_{363}A$ n'affecte pas l'activité d'ERM mutée, celle de PIASγ sauvage entraîne une chute importante de son activité transcriptionnelle (fig. 30). L'effet médié par PIASγ n'apparaît donc pas relié à la présence des sites de sumoylation d'ERM.

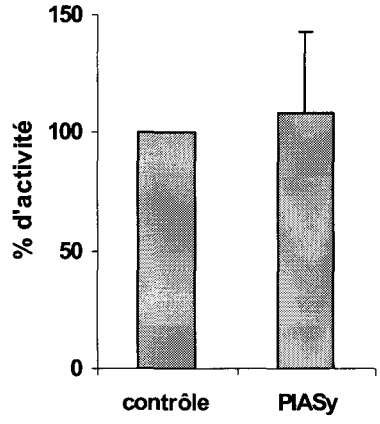


Figure 31 : Effet de l'expression de PIASγ sur l'activité de p53 sur le promoteur Mdm2.
Les cellules RK13 ont été transfectées avec 25ng de plasmide exprimant un vecteur rapporteur exprimant la luciférase sous le contrôle du promoteur du gène *mdm2*, 5ng de plasmide exprimant PIASγ et 20ng de plasmide exprimant p53. Les activités sont exprimées en % de l'activité de p53 en l'absence de PIASγ.

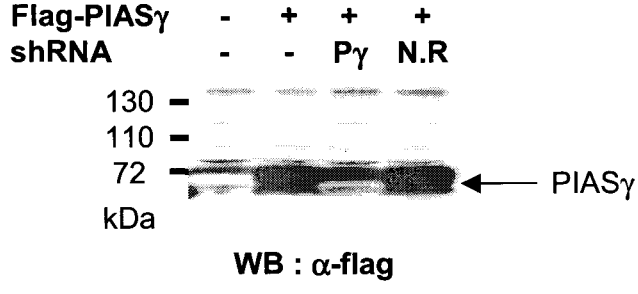


Figure 32 : Efficacité d'un shRNA dirigé contre PIASγ
Des extraits de cellules RK13 transfectées par les combinaisons indiquées d'un plasmide exprimant Flag-PIASγ et d'un plasmide exprimant un shRNA contrôle (N.R) ou dirigé contre PIASγ (Pγ) sont analysés par Western-blot à l'aide d'un anticorps anti-flag

A titre de contrôle, nous avons aussi testé l'influence de PIASγ sur l'activité de p53 au niveau d'un de ses promoteurs cibles, Mdm2 [225]. Comme l'illustre la figure 31, PIASγ n'a aucun impact sur l'activité de p53 dans les cellules RK13 indiquant que ses effets sont bien spécifiques de la régulation d'ICAM par ERM

Pour mieux évaluer le rôle de PIASγ dans la régulation de l'activité du facteur de transcription ERM, nous avons aussi cherché à en diminuer l'expression dans les cellules à l'aide de la technique d'ARN interférence. Nous avons défini un shRNA dirigé contre PIASγ et nous l'avons co-exprimé avec un plasmide codant PIASγ étiquetée Flag (fig. 32). Cette protéine de 70kDa est nettement détectée dans les cellules transfectées et son expression est fortement diminuée en présence du shRNA PIASγ alors qu'elle n'est pas affectée par l'expression d'un shRNA non relevant. L'efficacité de ce shRNA étant établie, nous l'avons testé sur sa capacité à diminuer l'expression endogène de PIASγ dans plusieurs lignées cellulaires et en particulier dans les cellules HeLa connues pour exprimer cette SUMO-ligase [65]. Malheureusement, aucun signal spécifique n'a pu être détecté. L'efficacité du shRNA sur la protéine endogène n'a donc pas pu être évaluée dans les cellules étudiées malgré l'utilisation de deux anticorps commerciaux différents.

IV. Conclusion

Nous avons cherché à identifier la ou les SUMO-ligase(s) d'ERM afin de pouvoir mieux appréhender la régulation de la sumoylation de ce facteur de transcription. Nous nous sommes focalisés sur les membres de la famille PIAS car ils régulent la conjugaison de SUMO sur de nombreuses protéines nucléaires. Dans cette famille, nous avons montré que PIAS1 est une SUMO-ligase pour ERM. Ce résultat ouvre ainsi une nouvelle voie pour l'étude des mécanismes impliqués dans la régulation de la sumoylation d'ERM, notamment ceux mis en jeu dans le recrutement de cette SUMO-ligase par ERM.

De nombreuses questions restent posées concernant les autres protéines de la famille PIAS dans la régulation de la sumoylation d'ERM. Les PIAS xα et xβ ne semblent pas interagir significativement avec ERM *in vitro* alors qu'elles ont un impact sur son niveau de sumoylation (donnée non montrée). Les deux autres PIAS, PIAS3 et PIASγ, interagissent *in vitro* avec le facteur de transcription mais PIAS3 n'a pas d'impact sur son activité alors que PIASγ la réprime indépendamment de la présence des sites de sumoylation d'ERM. Le rôle de SUMO-ligase pour ERM ne peut donc pas être absolument exclu pour certaines de ces protéines et pourrait être masqué par des propriétés propres à chacune.

Discussion

I. La sumoylation réprime l'activité transcriptionnelle des membres du groupe PEA3

Ubc9, la seule enzyme de conjugaison de SUMO, a été définie comme un interacteur du facteur de transcription ERM. ERM possèdant cinq sites consensus de sumoylation, cette protéine pouvait donc être une cible de la voie de conjugaison de SUMO. Nous avons effectivement montré qu'ERM est sumoylable et que quatre des cinq sites consensus sont nettement conjugables à SUMO. Le cinquième site situé en aval du domaine ETS semble peu sumoylable en cellule. En effet, après la mutation des quatre autres sites, aucun signal de conjugaison de SUMO n'est clairement détecté pour la protéine fusionnée ou non au DBD Gal4. Ce cinquième site est pourtant retrouvé dans ERM quelle que soit son origine (humain, souris et poisson zèbre) et au-delà dans tous les membres du groupe PEA3 quelle que soit l'espèce considérée. Nous avons cependant montré que ce site pouvait participer à la régulation de l'activité transcriptionnelle d'ERM. En effet, alors que l'activité d'ERM KR^{12345} est similaire à celle d'ERM KR^{1234} sur les promoteurs E74 ou ICAM, G4-ERM KR^{12345} est transcriptionnellement plus active que G4-ERM KR^{1234} sur un promoteur répondant aux protéines de fusion avec le DBD Gal4. Il est donc possible d'envisager que ce site pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'activité d'ERM par la sumoylation en fonction de la nature du promoteur considéré. D'ailleurs, l'impossibilité de détecter une forme sumoylée sur un site ne corrèle pas nécessairement avec l'absence de rôle dans la régulation de l'activité transcriptionnelle. Ainsi, pour le récepteur aux minéralocorticoïdes, la mutation du cinquième site de sumoylation, quoique non sumoylable *in vitro*, confère un gain d'activité transcriptionnelle au niveau de certains promoteurs [292].

Les sites consensus de sumoylation d'ERM sont conservés chez PEA3 et ER81 suggérant que la conjugaison de SUMO est une modification post-traductionnelle commune à l'ensemble des membres de ce groupe. Nous avons réalisé des tests de sumoylation pour PEA3 et ER81 et nous avons effectivement montré que ces protéines sont sumoylées en cellules. Ces résultats s'accordent avec ceux d'un travail récent visant à identifier de nouveaux substrats de la voie de conjugaison de SUMO et qui a montré qu'ER81 est effectivement sumoylable [87]. De plus, la conjugaison de SUMO sur PEA3 vient juste d'être décrite [228]. L'ensemble de ces données montre clairement que PEA3, ER81 et ERM sont des cibles de la voie de conjugaison de SUMO. PEA3, comme ERM, est conjuguée à SUMO au niveau de plusieurs sites [228]. La complexité du profil de sumoylation d'ER81 suggère fortement que cette protéine possède aussi plusieurs sites de sumoylation [87]. Les membres du groupe PEA3 présentent ainsi un profil de sumoylation rare car la majorité des substrats ne possède qu'un site majeur de sumoylation (pour revue [269]). Comme ERM, seul le récepteur aux minéralocorticoïdes présente également quatre sites majeurs de

conjugaison de SUMO [292]. Ce nombre important de sites est probablement à l'origine d'une grande complexité dans la régulation de l'activité de la protéine par la sumoylation. En effet, la mutation individuelle ou combinée des sites consensus de sumoylation dans ce facteur de transcription n'a pas le même impact suivant le promoteur considéré [292]. Un phénomène similaire existe pour PEA3 [228] et il faut également remarquer que certains mutants de sumoylation d'ERM n'ont pas le même niveau d'activité transcriptionnelle sur les promoteurs ICAM et E74.

La sumoylation a des conséquences fonctionnelles importantes sur ERM. Dans les cellules transfectées, le mutant non sumoylable d'ERM a une activité transcriptionnelle nettement supérieure à celle de la forme sauvage sur les promoteurs ICAM et E74. L'influence de SUMO sur l'activité d'ERM a été confirmée par l'expression de protéines qui interfèrent négativement avec la voie de conjugaison de SUMO, à savoir la SUMO protéase SENP1, la protéine virale Gam1 et un dominant négatif d'Ubc9 (donnée non montrée). En parallèle, nous avons montré que l'expression de PIAS1, une SUMO-ligase pour ERM augmente le niveau de sumoylation d'ERM et diminue son activité transcriptionnelle. Enfin, dans le système hétérologue Gal4, nous avons observé qu'une diminution de la sumoylation corrèle avec une levée de l'inhibition transcriptionnelle. L'ensemble de ces données montre donc clairement que la sumoylation d'ERM inhibe son activité transcriptionnelle comme cela a été mis en évidence pour de nombreux autres facteurs de transcription (pour revue [84]). Il faut remarquer que la sumoylation est, à ce jour, la seule modification post-traductionnelle connue pour inhiber l'activité d'ERM. En ce qui concerne le groupe PEA3, seule la phosphorylation d'ER81 par la kinase MK2 a été décrite comme provoquant une diminution de l'activité transcriptionnelle de la protéine [141]. La phosphorylation régulant la sumoylation de nombreux facteurs de transcription (pour revue [337]), il serait possible que la phosphorylation d'ER81 MK2-dépendante provoque la sumoylation de la protéine. Ce point mériterait d'être examiné tout comme la régulation par MK2 de l'activité des deux autres membres du groupe PEA3.

La sumoylation d'un facteur de transcription n'a pas obligatoirement le même effet suivant le promoteur considéré. Dans les cas où ce phénomène a été observé, il est parfois corrélé au nombre de sites de fixation pour le facteur de transcription. Ainsi, sur un promoteur ne comprenant qu'un site de fixation pour la protéine, la conjugaison de SUMO ne semble pas avoir d'effet alors que sur un promoteur possédant plusieurs sites de fixation pour ce même facteur de transcription, une coopération fonctionnelle s'installe entre les différentes molécules fixées. Sur ces promoteurs, la sumoylation limite la synergie existant entre ces molécules [27, 132]. Toutefois, indépendamment du nombre de sites de fixation pour le facteur de transcription, les effets de la sumoylation peuvent être différents suivant le

promoteur considéré. En effet, ce phénomène a été particulièrement décrit pour le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) et Oct-4. Alors que la mutation de sites de sumoylation du GR augmente son activité sur un promoteur *ARE4-tk-luc*, elle tend à la diminuer sur un promoteur *MMTV-luc* [296]. La sumoylation du facteur de transcription Oct-4 quant à elle augmenterait la transcription du gène *cYes* mais n'aurait pas d'impact sur d'autres promoteurs [319, 339]. En ce qui concerne ERM, l'inhibition d'activité par SUMO n'est pas retrouvée au niveau de tous les promoteurs répondant à ERM. Ainsi, sur un promoteur TORU contenant trois éléments de réponse de type EBS/AP1 [59], la mutation des sites de sumoylation tend à diminuer l'activité transcriptionnelle d'ERM. Cette diminution ne semble pas liée au nombre de sites EBS/AP1 puisque sur le promoteur *collagénase1* n'en contenant qu'un, la même tendance est observée (données non montrées). Sur ces promoteurs, une coopération entre le facteur ETS et le complexe AP1 s'établit [314]. Il serait intéressant de savoir si cette coopération pourrait être favorisée par la sumoylation.

L'inhibition de l'activité transcriptionnelle d'ERM observée suite à la modification par SUMO n'est pas due à une perte d'affinité pour l'ADN ou à un défaut de stabilité de la protéine. Nous avons aussi envisagé la possibilité d'une relocalisation subcellulaire du facteur de transcription modifié. En effet, ce phénomène n'est pas rare et peut jouer un rôle important dans la régulation de l'activité des protéines sumoylées comme dans le cas de la protéine PML [69, 149, 173, 342] ou le facteur de transcription TEL [31]. Par immunofluorescence, nous n'avons pas observé de différence significative entre la localisation d'ERM sauvage et celle de son mutant non sumoylable, même en co-exprimant SUMO. De la même manière, l'expression de SUMO ne modifie pas non plus la localisation subcellulaire d'ER81 et PEA3 [87 , 228]. Toutefois, il faut noter que la forme sumoylée d'ERM, même en exprimant SUMO, est très minoritaire dans les cellules. Cette faible proportion de forme sumoylée est un phénomène commun à la grande majorité des substrats de la sumoylation sans que la raison ne soit parfaitement connue (voir Introduction p111). Si SUMO devait induire une relocalisation de la protéine, celle-ci pourrait donc passer inaperçue ou être masquée par une localisation diffuse de la protéine non modifiée. Une situation de ce type existe pour le facteur de transcription Elk-1. Par immunofluorescence, la forme non sumoylable d'Elk-1 a une localisation nucléaire similaire à celle de la forme sauvage [263]. Par contre, des analyses de vitesse de transit entre les compartiments subcellulaires ont mis en évidence que la sumoylation d'Elk-1 régule le trafic nucléocytoplasmique de la protéine en réduisant sa vitesse d'exportation du noyau [263]. Un tel processus pourrait s'appliquer à d'autres facteurs de transcription dont les membres du groupe PEA3 et avoir une importance encore ignorée dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de protéines sumoylées.

Les facteurs ETS ont souvent été décrits comme de faibles activateurs transcriptionnels. Plus particulièrement, lorsqu'ils sont fusionnés au DBD Gal4, les protéines chimériques obtenues sont quasiment inactives [29, 40, 330]. Cette situation particulière s'applique aux membres du groupe PEA3 et plusieurs études dans le système Gal4 ont montré qu'une inhibition de l'activité de ces protéines est due à la présence d'un domaine inhibiteur appelé NRD (Negative Regulatory Domain) [19, 171, 222]. Nous avons défini celui d'ERM entre les acides aminés 73 et 298 et nous avons démontré que la sumoylation de ce domaine est impliquée dans sa fonction inhibitrice. En fait, la sumoylation d'un seul des trois sites de sumoylation de ce domaine est suffisante pour réprimer significativement l'activité. Toutefois, nos données indiquent que les sites de sumoylation en dehors du NRD participent aussi à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle d'ERM. Il semble donc que la notion de NRD devrait maintenant être remplacée par celle de modules inhibiteurs représentés par les différents sites de sumoylation. Cette notion de NRD a été décrite pour de nombreux facteurs de transcription et une relation entre fonction inhibitrice du domaine et sumoylation a été établie [1, 15, 38 , 51 , 85 , 315]. Dans la plupart des cas, le domaine inhibiteur caractérisé ne contient qu'un site de sumoylation [1, 15, 38 , 51 , 85 , 315]. Une exception notable concerne le récepteur nucléaire SF-1 [38]. En effet, celui-ci possède un domaine inhibiteur contenant deux sites de sumoylation et comme dans le cas d'ERM, chaque site semble agir comme un module répresseur autonome. Ainsi, les observations faites sur ERM et SF-1 suggèrent que la notion de domaine inhibiteur peut être remplacée par celle de modules inhibiteurs lorsque le domaine comprend plusieurs sites de sumoylation.

Dans la famille ETS, outre les membres du groupe PEA3, les facteurs de transcription Ets-1 [246], Elk-1 [330], ERG [29] et ESE-2 [40] ont aussi été décrits comme de faibles activateurs transcriptionnels dans le système hétérologue Gal4. De manière intéressante, ces protéines contiennent un ou plusieurs sites consensus de sumoylation. Comme dans le cas d'ERM et d'Elk-1 [331], l'inhibition de l'activité d'Ets-1 pourrait donc être liée à la conjugaison de SUMO [144, 227]. De même, la sumoylation pourrait donc être responsable de la quasi-inactivité des autres protéines ETS dans le système Gal4. Néanmoins, il faut remarquer que les facteurs de transcription ETS ne sont pas les seules protéines dont l'activité transcriptionnelle est faible lorsqu'elles sont fusionnées au DBD Gal4, c'est aussi le cas d'autres protéines sumoylables comme Sp3 [259], MEF2 [97] ou SF-1 [38].

II. Les SUMO-ligases

Avant le début de ce travail, seules TEL [31] et Elk-1 [331] avaient été décrites comme des cibles de la sumoylation dans la famille ETS. Actuellement, ERM et les protéines

ER81, Ets-1 [144, 227], Net [315], Fli-1 [307], Elf4 [287] et PEA3 [228] ont rejoint le groupe des protéines ETS sumoylables. A l'exception d'ER81 et Fli-1, SUMO inhibe l'activité transcriptionnelle des facteurs ETS décrits. Concernant ER81, l'impact fonctionnel de la sumoylation n'a pas été étudié [87]. Toutefois, par analogie avec les deux autres membres du groupe PEA3 [228], il est très probable que la sumoylation d'ER81 provoque une diminution de son activité transcriptionnelle. Fli-1 est quant à lui un cas plus particulier. Cette protéine est sumoylée mais la conjugaison de SUMO ne semble pas réguler son activité au niveau des promoteurs testés [307]. Par contre, un des membres de la famille PIAS, PIASxα, a été caractérisé comme une SUMO-ligase de Fli-1 mais surtout comme un co-répresseur impliqué dans sa relocalisation subnucléaire et ce indépendamment de la sumoylation du facteur de transcription [307]. PIASxα, tout comme son isoforme PIASxβ, ne semble pas interagir avec ERM *in vitro*. Ces deux enzymes n'affectent pas l'activité transcriptionnelle d'ERM mais leur expression induit une augmentation de la sumoylation d'ERM (données non montrées). Ces protéines possèdant un motif SBM (SUMO-binding motif) qui favorise l'interaction non-covalente avec SUMO (pour revue [155]), il est donc possible qu'elles puissent interagir avec les formes sumoylées d'ERM et ainsi les stabiliser. Dans cette hypothèse, PIASxα et/ou xβ agirait(aient) comme co-régulateur(s) de la sumoylation car elle(s) interviendrait(aient) indépendamment de son (leur) activité SUMO-ligase. Ce type de phénomène a déjà été mis en évidence entre PIASxα et le facteur de transcription Elk-1 [333] (voir introduction page 79). Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que PIASxα et xβ soient également capables de sumoyler ERM. Dans ce cas, la variation de la sumoylation d'ERM liée à l'expression de ces PIAS serait insuffisante pour affecter significativement l'activité du facteur de transcription.

Parmi les protéines de la famille PIAS, nous avons défini PIAS1 comme une SUMO-ligase pour ERM. En effet, l'expression de cette protéine augmente la sumoylation d'ERM et provoque une diminution de son activité liée à la présence des sites de sumoylation. Cette protéine a aussi été décrite comme SUMO-ligase pour de nombreux facteurs de transcription tels que les récepteurs nucléaires, Sp3, c-Jun (pour revue [264]) ou encore Net, membre de la famille ETS [315]. De manière intéressante, la plupart de ces protéines sont sumoylées au niveau d'un domaine inhibiteur comme c'est le cas d'ERM. PIAS1 pourrait donc correspondre à une SUMO-ligase préférentiellement recrutée au niveau de domaines inhibiteurs sans qu'un mécanisme de recrutement de celle-ci ne soit décrit. Pour la majorité des facteurs de transcription, l'identification de leur(s) SUMO-ligase(s) potentielle(s) s'est fondée sur leur seule capacité à stimuler *in vitro* et/ou *in vivo* la sumoylation de la protéine étudiée. Dans ce contexte, il n'est pas rare que plusieurs membres de la famille PIAS aient été définis comme des SUMO-ligases pour une même

protéine (pour revue [264]). Dans nos expériences, nous avons remarqué que le critère de stimulation de sumoylation ne corrèle pas obligatoirement avec un impact sur l'activité du facteur de transcription. Ainsi, PIAS3 interagit *in vitro* avec ERM, stimule sa sumoylation mais n'affecte pas son activité transcriptionnelle. Il faut toutefois noter que les expériences de sumoylation et les tests de mesure de l'activité transcriptionnelle ne sont pas directement comparables. En effet pour visualiser les formes sumoylées d'ERM, nous co-exprimons PIAS et SUMO dans les cellules. Dans les tests de mesure d'activité transcriptionnelle, SUMO n'est pas exprimée et SUMO endogène peut alors être limitante quand une protéine PIAS est exprimée. Dans ces conditions, l'expression de PIAS3 seule induirait insuffisamment la conjugaison de SUMO sur ERM pour affecter son activité transcriptionnelle. Toutefois, dans les mêmes conditions, PIAS1 est capable de réprimer l'activité d'ERM suggérant que PIAS3, s'il s'agit d'une SUMO-ligase pour ERM, est probablement moins efficace ou moins affine vis-à-vis du facteur de transcription.

Comme pour PIAS1, PIASγ stimule la sumoylation d'ERM et induit une diminution de son activité transcriptionnelle. Cet effet est dépendant de l'activité ligase de PIASγ mais ne semble pas dû à la présence des sites de sumoylation d'ERM. Bien que nous ne puissions pas totalement exclure que l'effet inhibiteur de cette protéine passe partiellement par la sumoylation d'ERM, il apparaît clairement que cet effet est majoritairement lié à d'autres mécanismes. PIASγ pourrait jouer un rôle de co-répresseur pour ERM. En effet, cette ligase a été identifiée comme un co-répresseur pour le récepteur aux androgènes, ce rôle étant corrélé à sa capacité à recruter des HDAC mais indépendant de son activité SUMO-ligase [99]. Cependant, l'absence de détection du complexe ERM/PIASγ *in vivo* et la dépendance à l'activité SUMO-ligase ne favorisent pas cette hypothèse. Il est également possible que ces effets soient liés à la sumoylation par PIASγ de protéines nécessaires à l'activité transcriptionnelle d'ERM. Une situation similaire pourrait s'appliquer à d'autres protéines ETS. En effet, PIASγ est une SUMO ligase pour Ets-1 [227] et PEA3 [228] et elle a un effet répresseur indépendant de la présence des sites de sumoylation de ces facteurs de transcription mais lié à son activité ligase [227 , 228]. Parmi les protéines nécessaires à l'activité des facteurs de transcription ETS, le co-activateur CBP pourrait être un candidat sérieux pour médier l'effet de PIASγ. En effet, il participe à l'activité transcriptionnelle des protéines ETS [76 , 189] et il est une cible de la voie de conjugaison de SUMO, sa sumoylation inhibant son activité par le recrutement de HDAC6 [85]. PIASγ pourrait donc stimuler la sumoylation de CBP, inhibant son activité et l'empêchant ainsi de participer à l'activation transcriptionnelle médiée par ERM, PEA3 et Ets-1. Néanmoins, il faut remarquer que CBP est un co-activateur pour de nombreux autres facteurs de transcription et que l'effet répresseur de PIASγ indépendant de la sumoylation de la protéine n'a pas été décrit pour

d'autres facteurs de transcription [60, 99, 131, 195, 225]. CBP pourrait alors être beaucoup plus important pour l'activation transcriptionnelle des protéines ETS comparé à d'autres facteurs de transcription. Il est également tout à fait possible que l'effet de PIASγ soit associé à la sumoylation d'une autre protéine cible spécifique des facteurs de transcription de la famille ETS. Enfin, une dernière possibilité est qu'une partie de l'effet inhibiteur de PIASγ soit corrélée à une relocalisation des facteurs de transcription. Ainsi, l'expression de PIASγ induit la présence de Ets-1 dans la fraction insoluble du noyau [227] et relocalise PEA3 dans des corps nucléaires [228]. Toutefois, en ce qui concerne ERM, nous n'avons pas observé de différence dans sa répartition en présence de PIASγ (donnée non montrée).

Cinq protéines PIAS se partagent la sumoylation de la majorité des substrats de la voie de conjugaison de SUMO (pour revue [264]). Au contraire, l'ubiquitination fait intervenir un grand nombre d'E3 ligases pour assurer une grande specificité dans la sélection du substrat (pour revue [114]). Il est donc très probable que la sélectivité de la sumoylation soit en partie assurée par le substrat lui-même. Ainsi, les phosphorylations auxquelles ce dernier est soumis peuvent favoriser le recrutement de SUMO-ligases comme cela a été décrit pour les ubiquitine-ligases (pour revue [114]). La non-stimulation des voies de signalisation mettant en œuvre les enzymes nécessaires à ces modifications post-traductionnelles pourrait alors expliquer l'impossibilité de mettre en évidence des complexes ERM/PIAS par co-immunoprécipitation dans des cellules transfectées. Enfin d'autres SUMO-ligases ont été décrites sur des substrats particuliers (pour revue [108]). Parmi celles-ci, HDAC4 est suspectée d'agir comme une SUMO-ligase pour les facteurs de transcription MEF2 et HIC-1 [97, 282]. Nous avons testé l'impact de l'expression d'HDAC4 sur la sumoylation d'ERM et nous n'avons observé aucune différence significative suggérant que HDAC4 n'agit pas comme une SUMO-ligase pour ce facteur (donnée non montrée). En dehors de la famille PIAS et de HDAC4, il serait également intéressant de tester l'influence des autres SUMO-ligases connues sur la sumoylation d'ERM.

III. Mécanismes mis en jeu par SUMO

La sumoylation d'ERM inhibe clairement son activité transcriptionnelle mais les mécanismes à l'origine de cette inhibition ne sont pas connus. Un mécanisme d'inhibition intramoléculaire entre le TAD et le NRD était envisageable. Dans ce contexte, l'interaction devait être médiée par SUMO et bloquerait la fonction du TAD. Toutefois, l'analyse de la séquence du TAD d'ERM ne montre pas de séquence pouvant correspondre à un SBM (donnée non montrée) et il est donc peu probable que SUMO contacte directement le TAD et diminue ainsi son activité. La conjugaison de SUMO pourrait aussi masquer, par encombrement stérique ou changement de conformation, les sites d'interaction pour

certaines protéines de la machinerie basale de transcription connues pour interagir avec ERM comme TAFII60 ou TBP [59] ou pour le co-activateur CBP/p300 (JL Baert, non publié). Un changement conformationnel est peu probable si on considère que la majorité des protéines sumoylables dont la structure a été réalisée ne montre pas de modifications structurales notables suite à la conjugaison de SUMO [4, 71, 196]. En ce qui concerne ERM, sa structure tridimensionnelle n'est pas connue mais une collaboration est engagée dans ce sens avec l'équipe de cristallographie de Vincent Villeret (UMR8161, équipe 2, IBL). La cristallisation de la forme sauvage et sumoylée d'ERM permettra de tester l'éventualité d'un changement de conformation de la protéine suite à la conjugaison de SUMO. En outre, les informations de structure permettront de positionner les sites de sumoylation dans l'espace et peut être d'expliquer le fait que l'inhibition par SUMO soit équivalente quelle que soit la position du site de sumoylation dans la séquence du NRD. L'encombrement stérique dû à la fixation de SUMO semble plus vraisemblable pour expliquer un éventuel défaut de recrutement de protéines impliquées dans l'activation transcriptionnelle d'ERM. La diminution de l'affinité d'un co-facteur pour une protéine sumoylée a déjà été décrite. En effet, le facteur de transcription NF-IL6β, quand il est sumoylé, perd sa capacité à interagir *in vitro* avec le co-activateur CBP [311]. En outre, SUMO est aussi capable de défavoriser la formation de complexes nécessaires à l'activité répressive de certains facteurs de transcription ; c'est le cas de Smad4 [32], SIP1 [192] ou Ikaros [90]. Pour tester cette hypothèse, nous envisageons de comparer les interactions entre les protéines partenaires considérées et une forme sumoylée ou non d'ERM par GST pull-down. Nous cherchons donc actuellement à sumoyler ERM fusionnée à la GST. Deux approches sont mises au point par l'équipe de Vincent Villeret. La première consiste à sumoyler la fusion GST-ERM dans un système consistant à co-exprimer, en bactéries, les protéines de la voie de conjugaison de SUMO et ERM [303]. Pour le moment, le rendement de sumoylation est d'environ 20% et est donc insuffisant pour réaliser des tests de pull-down efficaces. Une seconde approche vise à produire et purifier les différentes enzymes de la voie de conjugaison de SUMO afin de réaliser la sumoylation *in vitro* de la fusion GST-ERM.

Bien que la sumoylation puisse affecter la capacité d'interaction d'ERM avec certains de ces partenaires, il est probable que d'autres mécanismes soient impliqués dans l'inhibition de l'activité d'ERM. En effet, le NRD d'ERM est capable d'inhiber de manière sumoylation-dépendante en *cis* comme en *trans* le domaine transactivateur d'une autre protéine. En outre, ce domaine seul recruté à l'ADN peut également réprimer l'activité basale d'un promoteur. Ces données indiquent que le NRD réprime la transcription en dehors du contexte d'ERM et que les effets observés sont au moins en partie liés à la capacité de SUMO à recruter des protéines impliquées dans la répression transcriptionnelle. Dans ce

sens, une étude a montré que SUMO2 interagit directement avec la déméthylase LSD1 ou la méthyltransférase SETDB1 [258]. SUMO est aussi impliquée dans le recrutement de co-répresseurs [32, 136, 163, 332] ou de complexes co-répresseurs [108]. Ainsi, la sumoylation de PPARγ ou de LXR permet le recrutement du complexe NCoR [82, 242] tandis que celle du facteur de transcription Elk-1 conduit au recrutement de HDAC2 [332]. Dans la mesure où les mécanismes d'inhibition médiés par SUMO impliquent souvent le recrutement d'activité HDAC [82, 85, 242, 332], nous avons émis cette hypothèse pour ERM. Nous avons ainsi testé l'effet d'inhibiteurs d'HDAC sur l'activité d'ERM et nous n'avons pas observé une dérepression de cette activité (donnée non montrée) suggérant que la répression induite par SUMO est peut-être indépendante d'une activité désacétylase. ERM ne serait pas le premier facteur de transcription sumoylé dont l'inhibition soit indépendante des HDAC car cela a été également décrit pour le facteur de transcription Sp3 [280]. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que les protéines HDAC puissent être recrutées sans que leur activité enzymatique soit nécessaire ou du moins primordiale dans l'inhibition de l'activité d'ERM. Une stratégie d'inhibition de ces différents co-répresseurs par ARN interférence pourrait aider à mieux définir le(s) co-répresseur(s) potentiellement impliqué(s) dans la répression médiée par SUMO.

En marge des mécanismes d'inhibition liés à la conjugaison de SUMO, il faut noter que l'activité d'ERM est également inhibée par l'expression d'une protéine de remodelage de la chromatine, CHD3, au niveau du promoteur *presinilin1* [245] mais le mécanisme mis en jeu est inconnu. De manière intéressante, CHD3 interagit avec ERM dans un région comprise entre les sites de sumoylation 2 et 4 [245] et il semble que CHD3 soit capable d'interagir avec SUMO [203]. Il est donc possible que l'inhibition causée par CHD3 puisse être corrélée à la conjugaison de SUMO sur ERM. Dans l'hypothèse où le promoteur *presinilin1* serait régulé par la sumoylation d'ERM, il serait donc intéressant de tester l'impact de l'expression de CHD3 sur l'activité du mutant non sumoylable d'ERM. Enfin, ZNF237, un autre interacteur connu d'ERM [244], possède un SBM lui permettant de recruter SUMO [110]. Son recrutement par la forme sumoylée d'ERM et sa potentielle participation à l'inhibition de l'activité d'ERM restent à évaluer.

Il existe probablement plusieurs mécanismes expliquant l'inhibition de l'activité transcriptionnelle d'ERM parmi lesquels un défaut d'activation par modification des interactions protéine-protéine et un recrutement de co-répresseurs. La présence de plusieurs sites de sumoylation fonctionnels dans ERM pourrait favoriser cette complexité supposée. En effet, chaque site de sumoylation pourrait engager un processus d'inhibition différent, notamment en fonction de sa position spatiale. Par ailleurs, d'autres possibilités de

régulation sont envisageables. En particulier, la sumoylation pourrait affecter d'autres modifications post-traductionnelles nécessaires à l'activation d'ERM.

IV. Relations entre la sumoylation et d'autres modifications post-traductionnelles

A. La phosphorylation

La phosphorylation et la sumoylation sont des processus importants pour la régulation fine de l'activité de certains facteurs de transcription. De plus, la phosphorylation module la sumoylation de certaines protéines (pour revue [337]). En effet, elle peut être un signal favorisant le recrutement d'Ubc9 et potentiellement de SUMO-ligases afin de stimuler la sumoylation des protéines. La phosphorylation peut aussi favoriser le recrutement de SUMO-protéase et entraîner une désumoylation d'une protéine cible. C'est probablement le cas du facteur de transcription Elk-1 car la phosphorylation de cette protéine peut favoriser sa désumoylation [331].

Les membres du groupe PEA3 sont des facteurs de transcription dont l'activité transcriptionnelle est modulée positivement par phosphorylation (pour revue [57]). Ces phosphorylations ont donc un effet opposé à la sumoylation et une partie de leur effet positif pourrait donc être liée à une régulation négative de la sumoylation. Pour tester cette hypothèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux MAPK, qui sont impliquées dans la phosphorylation des trois membres du groupe PEA3 (pour revue [57]). Nous avons ainsi évalué l'impact de différents inducteurs ou inhibiteurs de ces kinases sur le profil de sumoylation d'ERM et nous n'avons pas obtenu de modulation significative de ce dernier. Nous avons également testé le niveau de sumoylation basal d'ERM mutée au niveau de différents sites de phosphorylation pour les MAPK et nous n'avons pas constaté de différence significative par rapport au profil de sumoylation d'ERM sauvage (données non montrées). Toutefois, il existe d'autres voies de phosphorylation ayant un effet positif sur l'activité d'ERM, comme celle de la kinase PKA [8]. Leur implication possible dans la régulation de la sumoylation d'ERM mériterait également d'être étudiée.

La modulation de la phosphorylation par les MAPK ne semble pas avoir d'impact sur le niveau de sumoylation d'ERM. Toutefois, la séquence entourant le premier site consensus de sumoylation $IK_{89}RELHS_{94}P$ correspond au motif PDSM dans lequel la phosphorylation est un prérequis à la sumoylation de la lysine adjacente [119]. Ce motif est présent dans ERM, quelle que soit l'espèce considérée, et est conservé au sein du groupe PEA3 suggérant son importance potentielle pour la régulation de l'activité transcriptionnelle de ces protéines. Pour vérifier le rôle de ce motif, nous avons muté le résidu sérine 94 en alanine pour abolir la phosphorylation ou en un résidu acide pour mimer la conjugaison d'un groupement

phosphate. Nous avons alors comparé l'activité transcriptionnelle de ces mutants avec celle de la forme sauvage et nous n'avons pas constaté de différence significative entre ces protéines sur différents promoteurs répondant à ERM. De plus, nous n'avons observé aucune modification significative du profil de sumoylation par rapport à la forme sauvage (données non montrées). Comme ERM comprend cinq sites consensus de sumoylation, la régulation de la sumoylation de la lysine 89 par la phosphorylation pouvait être masquée par la conjugaison de SUMO sur les autres sites. Pour visualiser l'impact de la phosphorylation sur la sumoylation du premier site uniquement, les différentes mutations du résidu sérine 94 ont été introduites dans une protéine ERM mutée sur les quatre autres sites de sumoylation. Cependant, aucune différence significative n'a été observée en comparant les profils de sumoylation des différents mutants ou en mesurant leur activité transcriptionnelle (donnée non montrée). Ces résultats obtenus avec ERM sont en accord avec ceux obtenus sur ER81. En effet, la mutation de ce résidu n'a pas d'impact sur l'activité transcriptionnelle d'ER81 dans les modèles cellulaires utilisés [21]. Le motif de sumoylation entourant la lysine 89 n'est probablement pas un PDSM. Toutefois, même si les mutations n'ont pas eu d'effet, nous ne pouvons cependant pas exclure qu'il puisse exister une voie de signalisation particulière menant à la phosphorylation de la sérine 94 et modulant ainsi la sumoylation de la lysine voisine.

Le PDSM est un motif de sumoylation-phosphodépendante [119]. Dans le cas d'ERM, la phosphorylation de ce motif doit s'accompagner de sa sumoylation et donc d'une diminution de son activité transcriptionnelle. Seule une phosphorylation ayant un impact négatif sur l'activité des membres du groupe PEA3 pourrait donc induire cette sumoylation. A ce jour, une seule phosphorylation de ce type a été décrite et concerne ER81 dans les cellules Mv1Lu. Il s'agit de celle induite par MK2, une kinase activée par la MAPK p38 [141]. Cette phosphorylation a lieu au niveau de deux résidus sérine conservés entre les membres du groupe PEA3 et situés en amont du deuxième site de sumoylation, donc hors du potentiel PDSM. L'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de p38 (SB-202190) ou l'expression de cette MAPK n'ont pas eu d'effet sur la sumoylation d'ERM dans les cellules RK13. Néanmoins, vu la spécificité cellulaire de la phosphorylation par MK2 [141], des tests dans la lignée Mv1Lu devront être envisagés. L'expression directe d'une forme activée ou inactive de la kinase MK2 est un piste intéressante pour visualiser son impact potentiel sur l'activité et le profil de sumoylation d'ERM.

La phosphorylation peut moduler la sumoylation de certains substrats. A l'inverse, la sumoylation pourrait inhiber certaines phosphorylations soit en masquant les sites de phosphorylation, soit en diminuant l'affinité des kinases pour leur substrat. Pour déterminer si ce mécanisme peut s'appliquer à ERM, nous envisageons de sumoyler *in vitro* ERM et de

réaliser des tests de phosphorylation *in vitro.* La forme sumoylée de la protéine de fusion GST-ERM permettra aussi de tester par pull-down l'affinité de certaines kinases responsables des phosphorylations activatrices d'ERM. Les études de relation entre la sumoylation et la phosphorylation d'ERM pourraient également être réalisée grâce au système UFDS (Ubc9 fusion-directed SUMOylation) récemment décrit [138]. Ce système qui fusionne directement Ubc9 au substrat permet d'obtenir une protéine hautement sumoylée dans un contexte cellulaire [138]. Ainsi, ce système a permis de montrer que la sumoylation peut inhiber la phosphorylation de la sérine adjacente à la lysine modifiée sur la protéine STAT1 [138]. En effet, la protéine de fusion Ubc9-STAT1 n'est plus phosphorylée même après la surexpression de la kinase ou l'induction de la voie de signalisation responsable de la phosphorylation. Cette observation est le premier argument en faveur de l'hypothèse d'une inhibition de la phosphorylation par la sumoylation.

B. L'ubiquitination

La sumoylation est une modification post-traductionnelle des résidus lysine. Ces résidus sont également la cible d'autres voies de modification dont l'ubiquitination. Des phénomènes de compétition entre SUMO et l'ubiquitine ont été décrits pour un nombre restreint de substrats n'incluant aucun facteur de transcription (pour revue [305]). Nous n'avons constaté aucun défaut d'ubiquitination de la forme non sumoylable d'ERM suggérant que les lysines des sites de sumoylation ne sont pas des sites accepteurs majeurs pour la conjugaison d'ubiquitine. De même, nous avons montré que la mutation des sites de sumoylation d'Ets-1 ne modifie pas son ubiquitination ([144], annexe). Il ne semble donc pas y avoir de compétition directe entre SUMO et l'ubiquitine dans le cas de ces deux protéines ETS. En ce qui concerne les autres membres de la famille ETS sumoylables, une possible relation entre la sumoylation et l'ubiquitination n'a pas été étudiée. De la même manière, très peu d'études concernant les relations entre la conjugaison d'ubiquitine et SUMO ont été menées au niveau d'autres facteurs de transcription et aucune n'a fait de lien direct entre ces deux voies de conjugaison. La stabilité des protéines est souvent corrélée à leur ubiquitination et peu d'études montrent un impact de SUMO sur la stabilité protéique indiquant que les relations entre l'ubiquitine et la sumoylation sont probablement restreintes.

La monoubiquitination d'ERM est corrélée à son activation transcriptionnelle [9] contrairement à la sumoylation. Malgré l'absence apparente de compétition entre SUMO et l'ubiquitine au niveau des mêmes résidus lysine, il est néanmoins possible que les formes sumoylées d'ERM ne soient pas ubiquitinées. En effet, la présence de SUMO pourrait interférer avec le recrutement d'ubiquitine-ligases ou en diminuer l'affinité. SUMO pourrait aussi défavoriser la stabilité des complexes d'activation éventuellement liés à la monoubiquitination. Il a ainsi été montré que la monoubiquitination de VP16 favorise

l'interaction avec la protéine P-TEFb (positive transcription elongation factor b) ce qui permet une augmentation du taux d'élongation de la transcription et participe ainsi à l'activation transcriptionnelle [164]. Dans ce contexte, le défaut d'ubiquitination d'une forme sumoylée d'ERM devrait favoriser la stabilité de la protéine sumoylée en empêchant ou en limitant sa dégradation protéasome-dépendante [9]. Toutefois, dans les expériences que nous avons réalisées, la demi-vie d'ERM sumoylée est similaire à celle d'ERM non sumoylée. Néanmoins, il demeure possible que seule la forme non conjuguée à SUMO soit ubiquitinée et donc dégradée par le protéasome et que la disparition progressive des formes sumoylées lors d'un traitement par la cycloheximide (voir figure 5A, article 1) reflète uniquement le maintien d'un équilibre entre la forme non conjuguée et celles conjuguées à SUMO. *A contrario*, l'ubiquitination pourraitt empêcher la conjugaison de SUMO en empêchant le recrutement d'Ubc9 ou de la SUMO-ligase ou en masquant les sites consensus de sumoylation nécessaires au recrutement d'Ubc9. Enfin, comme dans le cas de la protéine NEMO [128], la sumoylation et l'ubiquitination pourraient être des modifications séquentielles induites par une même voie de signalisation. Des études fines de cinétique des modifications post-traductionnelles seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse et requièrent la connaissance des voies de signalisation conduisant à ces modifications post-traductionnelles.

C. L'acétylation

L'acétylation est une modification post-traductionnelle des résidus lysine et qui s'applique à la régulation de l'activité d'ER81 [88]. Concernant ERM, cette protéine interagit avec l'acétyltransférase CBP, co-activateur nécessaire à son activité transcriptionnelle et elle est acétylée de manière CBP dépendante (JL Baert, non publié). A l'instar d'ER81, il est envisageable que l'acétylation d'ERM corrèle avec une activation transcriptionnelle. Dans ce contexte, une compétition entre l'acétylation et la sumoylation est possible pour moduler l'activité du facteur de transcription. Pour éprouver cette hypothèse, la capacité d'un mutant non sumoylable d'ERM à être acétylé par CBP a été testée. Nos résultats préliminaires indiquent qu'une partie des lysines acceptrices de SUMO seraient aussi acétylables (JL Baert, non publié). Une situation similaire a d'ailleurs été décrite pour les facteurs de transcription MEF2, HIC1, PLAG et Sp3 [97, 282, 340, 341]. Il reste maintenant à définir précisément les lysines capables d'être conjuguées à SUMO comme à un groupement acétyl. L'hypothèse d'une compétition entre ces deux modifications post-traductionnelles rejoint celle selon laquelle l'affinité de CBP pourrait être modulée par la sumoylation d'ERM.

Un motif de sumoylation/acétylation a été décrit et correspond à la séquence ψKxEP [97, 282]. De manière intéressante, les sites consensus de sumoylation 3 et 4 d'ERM correspondent à ce motif renforçant ainsi l'idée d'une compétition possible entre la

sumoylation et l'acétylation. Il est à noter que ces sites sont conservés dans ER81 mais qu'aucune acétylation n'a été décrite à leur niveau [88]. Par contre, dans PEA3, le motif supposé de sumoylation/ acétylation est absent suggérant que si une relation sumoylation/ acétylation existe, les membres du groupe PEA3 pourraient être régulés différemment par l'acétylation.

V. Impact *in vivo* de la sumoylation de ERM

En dehors des stricts mécanismes moléculaires liés à la conjugaison de SUMO, nous avons cherché à définir l'impact de la sumoylation d'ERM au niveau cellulaire. Très peu d'études ont été réalisées dans ce sens mais il faut noter qu'une approche a été menée avec succès dans des précurseurs hématopoïétiques de souris dans lesquels une fusion PML/RAR sauvage ou non sumoylable a été surexprimée. Il a ainsi été montré que la sumoylation de la protéine de fusion est requise pour l'immortalisation des cellules [344].

Pour mieux caractériser le rôle de la sumoylation d'ERM *in vivo*, nous avons choisi de réaliser des clones stables exprimant ERM sauvage ou non sumoylable. Pour réaliser cette expérience, nous avons cherché à sélectionner une lignée cellulaire se prêtant facilement à l'obtention de clones stables et avec une capacité basale de sumoylation suffisante pour assurer un net différentiel d'activité entre ERM sauvage et sa forme non sumoylée. Ce point n'a pu être testé que par la comparaison de l'activité transcriptionnelle des deux protéines dans les cellules. Nous avons ainsi utilisé quatre lignées cellulaires: RK13, COS-7, HeLa et U2OS. Pour l'ensemble des lignées, nous n'avons observé de différence ni au niveau du taux d'obtention de clones stables ni au niveau morphologique entre les différentes conditions. En outre, dans les cellules HeLa, aucune différence de prolifération n'est apparue entre les clones surexprimant ERM sauvage et sa forme non sumoylable (données non montrées). La connaissance des voies de signalisation régulant la conjugaison de SUMO sera un atout fondamental pour la poursuite de ces études.

La modulation de l'expression des membres du groupe PEA3 dans certaines lignées cellulaires mammaires a été décrite comme ayant des conséquences sur les propriétés cellulaires notamment au niveau de la capacité d'invasion *in vitro* [145, 154]. Ainsi, au sein de notre équipe, il a été montré que la surexpression d'*erm* ou *pea3* dans des cellules de la lignée épithéliale mammaire TAC-2.1 augmente leur capacité à former des structures branchées et accroît leur capacité invasive [42]. La surexpression de la forme non sumoylable d'ERM dans cette lignée permettrait d'évaluer l'impact d'un défaut de sumoylation d'ERM sur les propriétés cellulaires. Enfin, la surexpression de PEA3 est suffisante pour induire un phénotype invasif dans la lignée mammaire MCF-7 [154]. Il serait

intéressant de reprendre ce type d'expérience en comparant le phénotype induit par PEA3 à celui généré par sa forme non sumoylable et d'étendre cette analyse à ERM.

Au-delà des modèles cellulaires, une autre approche visant à déterminer l'importance de la sumoylation d'ERM *in vivo* pourrait être envisagée dans un modèle animal. Ainsi, le « knock-in » du gène codant la forme non sumoylable d'ERM sous la dépendance de son promoteur naturel permettrait de savoir si une forme d'activation constitutive d'ERM suite à un défaut de sumoylation engendre des conséquences au niveau du développement des souris. Une autre possibilité est de réaliser une expression ciblée d'ERM sauvage et de sa forme non sumoylable. Les souris dans lesquelles *erm* a été inactivé ayant récemment été décrites [35], il est donc possible dans ces animaux d'envisager le « knock-in » des gènes *erm* et *erm* KR^{12345} dans les organes où *erm* a une fonction connue tels que le testicule [35] ou le cerveau [240].

VI. Conclusion et perspectives

Durant notre travail de thèse, nous avons montré qu'ERM est un facteur de transcription sumoylable au niveau de plusieurs sites et que la conjugaison de SUMO inhibe son activité transcriptionnelle. Nous avons établi que de nombreuses propriétés d'ERM n'étaient pas affectées par la conjugaison de SUMO et que le pouvoir transactivateur semble être une cible directe de cette modification. Une étude plus approfondie de la relation entre SUMO et l'inhibition du pouvoir transactivateur a montré que chaque site de sumoylation constitue un module inhibiteur, quelle que soit sa position dans la protéine. Les mécanismes mis en jeu sont pour le moment inconnus. Néanmoins, plusieurs hypothèses sont envisageables afin d'expliquer comment l'activité d'ERM pourrait être régulée par SUMO. Il est très probable que plusieurs mécanismes participent à ce phénomène et agissent directement par ERM en empêchant les évènements nécessaires à l'activation transcriptionnelle de cette protéine et par SUMO via sa capacité à recruter des protéines impliquées dans la répression transcriptionnelle. Une condition indispensable à la poursuite de l'étude de ces mécanismes passe par le besoin de disposer d'ERM sumoylée. Cet objectif est actuellement poursuivi au sein de l'UMR8161. Lorsque celui-ci sera atteint, de nombreuses voies d'investigation seront ouvertes qui permettront d'apporter de nouvelles connaissances sur la régulation de l'activité des facteurs de transcription par la sumoylation.

Notre travail ouvre aussi le champ d'investigation des voies de signalisation impliquées dans la régulation de la sumoylation. En effet, nous avons caractérisé un premier acteur de la régulation de la sumoylation via l'identification d'une SUMO-ligase pour ERM, PIAS1. Il reste cependant possible que des protéines autres que PIAS1 puissent jouer un rôle de SUMO-ligase pour ERM. Des études plus approfondies méritent donc d'être menées

dans cette direction. Il sera maintenant important de définir les signaux qui participent à la modulation du recrutement de PIAS1 et éventuellement des autres SUMO-ligases pour ERM. En effet, la conjugaison de SUMO peut être régulée par d'autres modifications post-traductionnelles et même entrer en compétition avec certaines d'entre elles. Il sera important de bien définir les interconnexions potentiellement existantes entre ces modifications afin de mieux comprendre comment elles modulent finement l'activité des membres du groupe PEA3 au niveau de leurs gènes cibles. La connaissance de ces voies de signalisation sera aussi d'une grande utilité dans le cadre des études sur le rôle de la sumoylation d'ERM *in vivo* afin de pouvoir moduler la conjugaison de SUMO.

La sumoylation module l'activité transcriptionnelle d'ERM mais l'impact fonctionnel de cette modification n'est pas connu *in vivo*. Les études *in vivo* sont donc à poursuivre afin de mieux cerner le rôle de SUMO dans la régulation de l'activité du facteur de transcription ERM. Elles devraient amener à pouvoir engager des études transcriptomiques de manière à déterminer les gènes cibles d'ERM potentiellement régulés par la sumoylation. L'ensemble de ces données permettra de mieux cerner le rôle des membres du groupe PEA3 dans les processus morphologique et pathologique.

Bibliographie

1. Abdel-Hafiz, H., Takimoto, G.S., Tung, L., and Horwitz, K.B., *The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression.* Journal of biological chemistry, The, 2002. **277**(37): p. 33950-6.
2. Arber, S., Ladle, D.R., Lin, J.H., Frank, E., and Jessell, T.M., *ETS gene Er81 controls the formation of functional connections between group Ia sensory afferents and motor neurons.* Cell, 2000. **101**(5): p. 485-98.
3. Ayadi, A., Zheng, H., Sobieszczuk, P., Buchwalter, G., Moerman, P., Alitalo, K., and Wasylyk, B., *Net-targeted mutant mice develop a vascular phenotype and up-regulate egr-1.* Embo J, 2001. **20**(18): p. 5139-52.
4. Baba, D., Maita, N., Jee, J.G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugasawa, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H., and Shirakawa, M., *Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1.* Nature, 2005. **435**(7044): p. 979-82.
5. Baba, D., Maita, N., Jee, J.G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugasawa, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H., and Shirakawa, M., *Crystal Structure of SUMO-3-modified Thymine-DNA Glycosylase.* J Mol Biol, 2006. **359**(1): p. 137-47.
6. Bae, S.H., Jeong, J.W., Park, J.A., Kim, S.H., Bae, M.K., Choi, S.J., and Kim, K.W., *Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **324**(1): p. 394-400.
7. Baert, J.L., Monte, D., Musgrove, E.A., Albagli, O., Sutherland, R.L., and de Launoit, Y., *Expression of the PEA3 group of ETS-related transcription factors in human breast-cancer cells.* Int J Cancer, 1997. **70**(5): p. 590-7.
8. Baert, J.L., Beaudoin, C., Coutte, L., and de Launoit, Y., *ERM transactivation is up-regulated by the repression of DNA binding after the PKA phosphorylation of a consensus site at the edge of the ETS domain.* J Biol Chem, 2002. **277**(2): p. 1002-12. Epub 2001 Oct 26.
9. Baert, J.L., Beaudoin, C., Monte, D., Degerny, C., Mauen, S., and de Launoit, Y., *The 26S proteasome system degrades the ERM transcription factor and regulates its transcription-enhancing activity.* Oncogene, 2007. **26**(3): p. 415-24.
10. Bakkers, J., Camacho-Carvajal, M., Nowak, M., Kramer, C., Danger, B., and Hammerschmidt, M., *Destabilization of DeltaNp63alpha by Nedd4-mediated ubiquitination and Ubc9-mediated sumoylation, and its implications on dorsoventral patterning of the zebrafish embryo.* Cell Cycle, 2005. **4**(6): p. 790-800.
11. Bartel, F.O., Higuchi, T., and Spyropoulos, D.D., *Mouse models in the study of the Ets family of transcription factors.* Oncogene, 2000. **19**(55): p. 6443-54.
12. Benz, C.C., O'Hagan, R.C., Richter, B., Scott, G.K., Chang, C.H., Xiong, X., Chew, K., Ljung, B.M., Edgerton, S., Thor, A., and Hassell, J.A., *HER2/Neu and the Ets transcription activator PEA3 are coordinately upregulated in human breast cancer.* Oncogene, 1997. **15**(13): p. 1513-25.
13. Bernier-Villamor, V., Sampson, D.A., Matunis, M.J., and Lima, C.D., *Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1.* Cell, 2002. **108**(3): p. 345-56.
14. Bieche, I., Tozlu, S., Girault, I., Onody, P., Driouch, K., Vidaud, M., and Lidereau, R., *Expression of PEA3/E1AF/ETV4, an Ets-related transcription factor, in breast tumors: positive links to MMP2, NRG1 and CGB expression.* Carcinogenesis, 2004. **25**(3): p. 405-11.
15. Bies, J., Markus, J., and Wolff, L., *Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity.* Journal of biological chemistry, The, 2002. **277**(11): p. 8999-9009.

16. Bischof, O., Schwamborn, K., Martin, N., Werner, A., Sustmann, C., Grosschedl, R., and Dejean, A., *The E3 SUMO Ligase PIASy Is a Regulator of Cellular Senescence and Apoptosis.* Mol Cell, 2006. **22**(6): p. 783-94.
17. Boedefeld, W.M., 2nd, Soong, R., Weiss, H., Diasio, R.B., Urist, M.M., Bland, K.I., and Heslin, M.J., *E1A-F is overexpressed early in human colorectal neoplasia and associated with cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-7.* Mol Carcinog, 2005. **43**(1): p. 13-7.
18. Bohren, K.M., Nadkarni, V., Song, J.H., Gabbay, K.H., and Owerbach, D., *A M55V Polymorphism in a Novel SUMO Gene (SUMO-4) Differentially Activates Heat Shock Transcription Factors and Is Associated with Susceptibility to Type I Diabetes Mellitus.* J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27233-8. Epub 2004 Apr 29.
19. Bojovic, B.B. and Hassell, J.A., *The PEA3 Ets transcription factor comprises multiple domains that regulate transactivation and DNA binding.* J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 4509-21. Epub 2000 Nov 28.
20. Bories, J.C., Willerford, D.M., Grevin, D., Davidson, L., Camus, A., Martin, P., Stehelin, D., and Alt, F.W., *Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene.* Nature, 1995. **377**(6550): p. 635-8.
21. Bosc, D.G., Goueli, B.S., and Janknecht, R., *HER2/Neu-mediated activation of the ETS transcription factor ER81 and its target gene MMP-1.* Oncogene, 2001. **20**(43): p. 6215-24.
22. Bossis, G., Malnou, C.E., Farras, R., Andermarcher, E., Hipskind, R., Rodriguez, M., Schmidt, D., Muller, S., Jariel-Encontre, I., and Piechaczyk, M., *Down-regulation of c-Fos/c-Jun AP-1 dimer activity by sumoylation.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(16): p. 6964-79.
23. Boyer-Guittaut, M., Birsoy, K., Potel, C., Elliott, G., Jaffray, E., Desterro, J.M., Hay, R.T., and Oelgeschlager, T., *SUMO-1 modification of human transcription factor (TF) IID complex subunits: inhibition of TFIID promoter-binding activity through SUMO-1 modification of hsTAF5.* J Biol Chem, 2005. **280**(11): p. 9937-45. Epub 2005 Jan 6.
24. Brent, A.E. and Tabin, C.J., *FGF acts directly on the somitic tendon progenitors through the Ets transcription factors Pea3 and Erm to regulate scleraxis expression.* Development, 2004. **131**(16): p. 3885-96. Epub 2004 Jul 14.
25. Brooks, C.L. and Gu, W., *Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation.* Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(2): p. 164-71.
26. Cai, C., Hsieh, C.L., Omwancha, J., Zheng, Z., Chen, S.Y., Baert, J.L., and Shemshedini, L., *ETV1 Is a Novel Androgen Receptor-Regulated Gene That Mediates Prostate Cancer Cell Invasion.* Mol Endocrinol, 2007. **21**(8): p. 1835-46.
27. Callewaert, L., Verrijdt, G., Haelens, A., and Claessens, F., *Differential effect of small ubiquitin-like modifier (SUMO)-ylation of the androgen receptor in the control of cooperativity on selective versus canonical response elements.* Mol Endocrinol, 2004. **18**(6): p. 1438-49. Epub 2004 Mar 18.
28. Cardone, L., Hirayama, J., Giordano, F., Tamaru, T., Palvimo, J.J., and Sassone-Corsi, P., *Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1.* Science, 2005. **309**(5739): p. 1390-4.
29. Carrere, S., Verger, A., Flourens, A., Stehelin, D., and Duterque-Coquillaud, M., *Erg proteins, transcription factors of the Ets family, form homo, heterodimers and ternary complexes via two distinct domains.* Oncogene, 1998. **16**(25): p. 3261-8.
30. Cesari, F., Rennekampff, V., Vintersten, K., Vuong, L.G., Seibler, J., Bode, J., Wiebel, F.F., and Nordheim, A., *Elk-1 knock-out mice engineered by Flp recombinase-mediated cassette exchange.* Genesis, 2004. **38**(2): p. 87-92.

31. Chakrabarti, S.R., Sood, R., Nandi, S., and Nucifora, G., *Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(24): p. 13281-5.
32. Chang, C.C., Lin, D.Y., Fang, H.I., Chen, R.H., and Shih, H.M., *Daxx mediates the SUMO-dependent transcriptional repression of Smad4.* J Biol Chem, 2005. **6**: p. 6.
33. Chauchereau, A., Amazit, L., Quesne, M., Guiochon-Mantel, A., and Milgrom, E., *Sumoylation of the progesterone receptor and of the steroid receptor coactivator SRC-1.* Journal of biological chemistry, The, 2003. **278**(14): p. 12335-43.
34. Chauvet, S., Dessaud, E., and de Lapeyriere, O., *[Molecular mechanisms leading to spinal motoneurons specialization in vertebrates].* Med Sci (Paris), 2004. **20**(2): p. 135-9.
35. Chen, C., Ouyang, W., Grigura, V., Zhou, Q., Carnes, K., Lim, H., Zhao, G.Q., Arber, S., Kurpios, N., Murphy, T.L., Cheng, A.M., Hassell, J.A., Chandrashekar, V., Hofmann, M.C., Hess, R.A., and Murphy, K.M., *ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche.* Nature, 2005. **436**(7053): p. 1030-4.
36. Chen, J.H. and Wright, C.D., *PEA3, Oct 1 and Oct 2 positively regulate the human ETS1 promoter.* Oncogene, 1993. **8**(12): p. 3375-83.
37. Chen, J.H., Vercamer, C., Li, Z., Paulin, D., Vandenbunder, B., and Stehelin, D., *PEA3 transactivates vimentin promoter in mammary epithelial and tumor cells.* Oncogene, 1996. **13**(8): p. 1667-75.
38. Chen, W.Y., Lee, W.C., Hsu, N.C., Huang, F., and Chung, B.C., *SUMO modification of repression domains modulates function of nuclear receptor 5A1 (steroidogenic factor-1).* J Biol Chem, 2004. **10**: p. 10.
39. Cheng, J., Bawa, T., Lee, P., Gong, L., and Yeh, E.T., *Role of desumoylation in the development of prostate cancer.* Neoplasia, 2006. **8**(8): p. 667-76.
40. Choi, Y.S. and Sinha, S., *Determination of the consensus DNA-binding sequence and a transcriptional activation domain for ESE-2.* Biochem J, 2006. **398**(3): p. 497-507.
41. Chotteau-Lelievre, A., Desbiens, X., Pelczar, H., Defossez, P.A., and de Launoit, Y., *Differential expression patterns of the PEA3 group transcription factors through murine embryonic development.* Oncogene, 1997. **15**(8): p. 937-52.
42. Chotteau-Lelievre, A., Montesano, R., Soriano, J., Soulie, P., Desbiens, X., and de Launoit, Y., *PEA3 transcription factors are expressed in tissues undergoing branching morphogenesis and promote formation of duct-like structures by mammary epithelial cells in vitro.* Dev Biol, 2003. **259**(2): p. 241-57.
43. Chotteau-Lelievre, A., Revillion, F., Lhotellier, V., Hornez, L., Desbiens, X., Cabaret, V., de Launoit, Y., and Peyrat, J.P., *Prognostic value of ERM gene expression in human primary breast cancers.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(21): p. 7297-303.
44. Colombo, R., Boggio, R., Seiser, C., Draetta, G.F., and Chiocca, S., *The adenovirus protein Gam1 interferes with sumoylation of histone deacetylase 1.* EMBO reports, 2002. **3**(11): p. 1062-8.
45. Costello, P.S., Nicolas, R.H., Watanabe, Y., Rosewell, I., and Treisman, R., *Ternary complex factor SAP-1 is required for Erk-mediated thymocyte positive selection.* Nat Immunol, 2004. **5**(3): p. 289-98.
46. Coutte, L., Monte, D., Baert, J., and de Launoit, Y., *Genomic organization of the human elaf gene,a member of Ets transcription factors.* Gene, 1999. **240**(1): p. 201-7.
47. Coutte, L., Monte, D., Imai, K., Pouilly, L., Dewitte, F., Vidaud, M., Adamski, J., Baert, J.L., and de Launoit, Y., *Characterization of the human and mouse ETV1/ER81 transcription factor genes: role of the two alternatively spliced isoforms in the human.* Oncogene, 1999. **18**(46): p. 6278-86.

48. Cowden Dahl, K.D., Zeineldin, R., and Hudson, L.G., *PEA3 is necessary for optimal epidermal growth factor receptor-stimulated matrix metalloproteinase expression and invasion of ovarian tumor cells.* Mol Cancer Res, 2007. **5**(5): p. 413-21.
49. Crawford, H.C., Fingleton, B., Gustavson, M.D., Kurpios, N., Wagenaar, R.A., Hassell, J.A., and Matrisian, L.M., *The PEA3 subfamily of Ets transcription factors synergizes with beta-catenin-LEF-1 to activate matrilysin transcription in intestinal tumors.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(4): p. 1370-83.
50. Croonquist, P.A., Linden, M.A., Zhao, F., and Van Ness, B.G., *Gene profiling of a myeloma cell line reveals similarities and unique signatures among IL-6 response, N-ras-activating mutations, and coculture with bone marrow stromal cells.* Blood, 2003. **102**(7): p. 2581-92.
51. Dahle, O., Andersen, T.O., Nordgard, O., Matre, V., Del-Sal, G., and Gabrielsen, O.S., *Transactivation properties of c-Myb are critically dependent on two SUMO-1 acceptor sites that are conjugated in a PIASy enhanced manner.* European journal of biochemistry FEBS, 2003. **270**(6): p. 1338-48.
52. David, G., Neptune, M.A., and DePinho, R.A., *SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities.* Journal of biological chemistry, The, 2002. **277**(26): p. 23658-63.
53. Davidson, B., Goldberg, I., Gotlieb, W.H., Kopolovic, J., Ben-Baruch, G., and Reich, R., *PEA3 is the second Ets family transcription factor involved in tumor progression in ovarian carcinoma.* Clin Cancer Res, 2003. **9**(4): p. 1412-9.
54. Davidson, B., Konstantinovsky, S., Nielsen, S., Dong, H.P., Berner, A., Vyberg, M., and Reich, R., *Altered expression of metastasis-associated and regulatory molecules in effusions from breast cancer patients: a novel model for tumor progression.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(21): p. 7335-46.
55. de Launoit, Y., Audette, M., Pelczar, H., Plaza, S., and Baert, J.L., *The transcription of the intercellular adhesion molecule-1 is regulated by Ets transcription factors.* Oncogene, 1998. **16**(16): p. 2065-73.
56. de Launoit, Y., Chotteau-Lelievre, A., Beaudoin, C., Coutte, L., Netzer, S., Brenner, C., Huvent, I., and Baert, J.L., *The PEA3 group of ETS-related transcription factors. Role in breast cancer metastasis.* Adv Exp Med Biol, 2000. **480**: p. 107-16.
57. de Launoit, Y., Baert, J.L., Chotteau-Lelievre, A., Monte, D., Coutte, L., Mauen, S., Firlej, V., Degerny, C., and Verreman, K., *The Ets transcription factors of the PEA3 group: transcriptional regulators in metastasis.* Biochim Biophys Acta, 2006. **1766**(1): p. 79-87.
58. Decraene, C., Brugg, B., Ruberg, M., Eveno, E., Matingou, C., Tahi, F., Mariani, J., Auffray, C., and Pietu, G., *Identification of genes involved in ceramide-dependent neuronal apoptosis using cDNA arrays.* Genome Biol, 2002. **3**(8): p. RESEARCH0042.
59. Defossez, P.A., Baert, J.L., Monnot, M., and de Launoit, Y., *The ETS family member ERM contains an alpha-helical acidic activation domain that contacts TAFII60.* Nucleic Acids Res, 1997. **25**(22): p. 4455-63.
60. Deng, Z., Wan, M., and Sui, G., *PIASy-mediated sumoylation of Yin Yang 1 depends on their interaction but not the RING finger.* Mol Cell Biol, 2007. **27**(10): p. 3780-92.
61. Desterro, J.M., Rodriguez, M.S., and Hay, R.T., *SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation.* Molecular cell, 1998. **2**(2): p. 233-9.
62. Deyrieux, A.F., Rosas-Acosta, G., Ozbun, M.A., and Wilson, V.G., *Sumoylation dynamics during keratinocyte differentiation.* J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 1): p. 125-36.
63. Di Bacco, A. and Gill, G., *SUMO-Specific Proteases and the Cell Cycle: An essential role for SENP5 in cell proliferation.* Cell Cycle, 2006. **5**(20): p. 2310-2313.

64. Di Bacco, A., Ouyang, J., Lee, H.Y., Catic, A., Ploegh, H., and Gill, G., *The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division.* Mol Cell Biol, 2006. **26**(12): p. 4489-98.
65. Diaz-Martinez, L.A., Gimenez-Abian, J.F., Azuma, Y., Guacci, V., Gimenez-Martin, G., Lanier, L.M., and Clarke, D.J., *PIASgamma Is Required for Faithful Chromosome Segregation in Human Cells.* PLoS ONE, 2006. **1**: p. e53.
66. Ding, H., Xu, Y., Chen, Q., Dai, H., Tang, Y., Wu, J., and Shi, Y., *Solution Structure of Human SUMO-3 C47S and Its Binding Surface for Ubc9(,).* Biochemistry, 2005. **44**(8): p. 2790-9.
67. Discenza, M.T., Vaz, D., Hassell, J.A., and Pelletier, J., *Activation of the WT1 tumor suppressor gene promoter by Pea3.* FEBS Lett, 2004. **560**(1-3): p. 183-91.
68. Dowdy, S.C., Mariani, A., and Janknecht, R., *HER2/Neu- and TAK1-mediated up-regulation of the transforming growth factor beta inhibitor Smad7 via the ETS protein ER81.* J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 44377-84.
69. Duprez, E., Saurin, A.J., Desterro, J.M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M.N., Solomon, E., de-The, H., Hay, R.T., and Freemont, P.S., *SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation.* Journal of cell science, 1999. **112**(Pt 3): p. 381-93.
70. Duval, D., Duval, G., Kedinger, C., Poch, O., and Boeuf, H., *The 'PINIT' motif, of a newly identified conserved domain of the PIAS protein family, is essential for nuclear retention of PIAS3L.* FEBS Lett, 2003. **554**(1-2): p. 111-8.
71. Dye, B.T. and Schulman, B.A., *Structural mechanisms underlying posttranslational modification by ubiquitin-like proteins.* Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2007. **36**: p. 131-50.
72. El-Tanani, M., Platt-Higgins, A., Rudland, P.S., and Campbell, F.C., *Ets gene, PEA3 cooperates with beta-Catenin-Lef-1 and c-jun in regulation of Osteopontin transcription.* J Biol Chem, 2004. **5**: p. 5.
73. Fauquette, V., Perrais, M., Cerulis, S., Jonckheere, N., Ducourouble, M.P., Aubert, J.P., Pigny, P., and Seuningen, I.V., *The antagonistic regulation of human MUC4 and ErbB-2 genes by the Ets protein PEA3 in pancreatic cancer cells: implications for the proliferation/differentiation balance in the cells.* Biochem J, 2005. **386**(Pt 1): p. 35-45.
74. Firlej, V., Bocquet, B., Desbiens, X., de Launoit, Y., and Chotteau-Lelievre, A., *Pea3 Transcription Factor Cooperates with USF-1 in Regulation of the Murine bax Transcription without Binding to an Ets-binding Site.* J Biol Chem, 2005. **280**(2): p. 887-898. Epub 2004 Oct 5.
75. Firnberg, N. and Neubuser, A., *FGF signaling regulates expression of Tbx2, Erm, Pea3, and Pax3 in the early nasal region.* Dev Biol, 2002. **247**(2): p. 237-50.
76. Foulds, C.E., Nelson, M.L., Blaszczak, A.G., and Graves, B.J., *Ras/mitogen-activated protein kinase signaling activates Ets-1 and Ets-2 by CBP/p300 recruitment.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(24): p. 10954-64.
77. Fu, C., Ahmed, K., Ding, H., Ding, X., Lan, J., Yang, Z., Miao, Y., Zhu, Y., Shi, Y., Zhu, J., Huang, H., and Yao, X., *Stabilization of PML nuclear localization by conjugation and oligomerization of SUMO-3.* Oncogene, 2005. **24**(35): p. 5401-13.
78. Funaoka, K., Shindoh, M., Yoshida, K., Hanzawa, M., Hida, K., Nishikata, S., Totsuka, Y., and Fujinaga, K., *Activation of the p21(Waf1/Cip1) promoter by the ets oncogene family transcription factor E1AF.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **236**(1): p. 79-82.
79. Galang, C.K., Muller, W.J., Foos, G., Oshima, R.G., and Hauser, C.A., *Changes in the expression of many ets family transcription factors and of potential target genes in*

normal mammary tissue and tumors. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 11281-92. Epub 2003 Dec 8.

80. Gegonne, A., Leprince, D., Duterque-Coquillaud, M., Vandenbunder, B., Flourens, A., Ghysdael, J., Debuire, B., and Stehelin, D., *Multiple domains for the chicken cellular sequences homologous to the v-ets oncogene of the E26 retrovirus.* Mol Cell Biol, 1987. **7**(2): p. 806-12.
81. Ghioni, P., D'Alessandra, Y., Mansueto, G., Jaffray, E., Hay, R.T., Mantia, G.L., and Guerrini, L., *The Protein Stability and Transcriptional Activity of p63alpha are Regulated by SUMO-1 Conjugation.* Cell Cycle, 2005. **4**: p. 1.
82. Ghisletti, S., Huang, W., Ogawa, S., Pascual, G., Lin, M.E., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K., *Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma.* Mol Cell, 2007. **25**(1): p. 57-70.
83. Gill, G., *SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?* Genes Dev, 2004. **18**(17): p. 2046-59.
84. Gill, G., *Something about SUMO inhibits transcription.* Curr Opin Genet Dev, 2005.
85. Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O.A., Thain, A., Anderson, L.A., Snowden, A.W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N.D., and Hay, R.T., *P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification.* Molecular cell, 2003. **11**(4): p. 1043-54.
86. Girdwood, D.W., Tatham, M.H., and Hay, R.T., *SUMO and transcriptional regulation.* Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(2): p. 201-10.
87. Gocke, C.B., Yu, H., and Kang, J., *Systematic Identification and Analysis of Mammalian Small Ubiquitin-like Modifier Substrates.* J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 5004-12. Epub 2004 Nov 23.
88. Goel, A. and Janknecht, R., *Acetylation-mediated transcriptional activation of the ETS protein ER81 by p300, P/CAF, and HER2/Neu.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(17): p. 6243-54.
89. Goel, A. and Janknecht, R., *Concerted activation of ETS protein ER81 by p160 coactivators, the acetyltransferase p300 and the receptor tyrosine kinase HER2/Neu.* J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 14909-16.
90. Gomez-Del Arco, P., Koipally, J., and Georgopoulos, K., *Ikaros SUMOylation: Switching Out of Repression.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(7): p. 2688-97.
91. Gong, Z., Brackertz, M., and Renkawitz, R., *SUMO Modification Enhances p66-Mediated Transcriptional Repression of the Mi-2/NuRD Complex.* Mol Cell Biol, 2006. **26**(12): p. 4519-28.
92. Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S.E., Scheffner, M., and Del-Sal, G., *Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1.* EMBO journal, The, 1999. **18**(22): p. 6462-71.
93. Goueli, B.S. and Janknecht, R., *Upregulation of the Catalytic Telomerase Subunit by the Transcription Factor ER81 and Oncogenic HER2/Neu, Ras, or Raf.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(1): p. 25-35.
94. Graf, T., McNagny, K., Brady, G., and Frampton, J., *Chicken "erythroid" cells transformed by the Gag-Myb-Ets-encoding E26 leukemia virus are multipotent.* Cell, 1992. **70**(2): p. 201-13.
95. Graves, B.J. and Petersen, J.M., *Specificity within the ets family of transcription factors.* Adv Cancer Res, 1998. **75**: p. 1-55.
96. Greenall, A., Willingham, N., Cheung, E., Boam, D.S., and Sharrocks, A.D., *DNA binding by the ETS-domain transcription factor PEA3 is regulated by intramolecular*

and intermolecular protein.protein interactions. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16207-15. Epub 2001 Jan 17.

97. Gregoire, S. and Yang, X.J., *Association with Class IIa Histone Deacetylases Upregulates the Sumoylation of MEF2 Transcription Factors.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(6): p. 2273-87.
98. Gregoire, S., Tremblay, A.M., Xiao, L., Yang, Q., Ma, K., Nie, J., Mao, Z., Wu, Z., Giguere, V., and Yang, X.J., *Control of MEF2 Transcriptional Activity by Coordinated Phosphorylation and Sumoylation.* J Biol Chem, 2006. **281**(7): p. 4423-33.
99. Gross, M., Yang, R., Top, I., Gasper, C., and Shuai, K., *PIASy-mediated repression of the androgen receptor is independent of sumoylation.* Oncogene, 2004. **23**(17): p. 3059-66.
100. Guo, B., Sallis, R.E., Greenall, A., Petit, M.M., Jansen, E., Young, L., Van de Ven, W.J., and Sharrocks, A.D., *The LIM Domain Protein LPP Is a Coactivator for the ETS Domain Transcription Factor PEA3.* Mol Cell Biol, 2006. **26**(12): p. 4529-38.
101. Haase, G., Dessaud, E., Garces, A., de Bovis, B., Birling, M., Filippi, P., Schmalbruch, H., Arber, S., and deLapeyriere, O., *GDNF acts through PEA3 to regulate cell body positioning and muscle innervation of specific motor neuron pools.* Neuron, 2002. **35**(5): p. 893-905.
102. Habelhah, H., Okada, F., Kobayashi, M., Nakai, K., Choi, S., Hamada, J., Moriuchi, T., Kaya, M., Yoshida, K., Fujinaga, K., and Hosokawa, M., *Increased E1AF expression in mouse fibrosarcoma promotes metastasis through induction of MT1-MMP expression.* Oncogene, 1999. **18**(9): p. 1771-6.
103. Hahn, S.L., Wasylyk, B., and Criqui-Filipe, P., *Modulation of ETS-1 transcriptional activity by huUBC9, a ubiquitin-conjugating enzyme.* Oncogene, 1997. **15**(12): p. 1489-95.
104. Hannemann, J.R., McManus, D.M., Kabarowski, J.H., and Wiedemann, L.M., *Haemopoietic transformation by the TEL/ABL oncogene.* Br J Haematol, 1998. **102**(2): p. 475-85.
105. Haracska, L., Torres-Ramos, C.A., Johnson, R.E., Prakash, S., and Prakash, L., *Opposing effects of ubiquitin conjugation and SUMO modification of PCNA on replicational bypass of DNA lesions in Saccharomyces cerevisiae.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(10): p. 4267-74.
106. Hart, A., Melet, F., Grossfeld, P., Chien, K., Jones, C., Tunnacliffe, A., Favier, R., and Bernstein, A., *Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygously deleted in patients with thrombocytopenia.* Immunity, 2000. **13**(2): p. 167-77.
107. Hasegawa, H., Ashigaki, S., Takamatsu, M., Suzuki-Migishima, R., Ohbayashi, N., Itoh, N., Takada, S., and Tanabe, Y., *Laminar patterning in the developing neocortex by temporally coordinated fibroblast growth factor signaling.* J Neurosci, 2004. **24**(40): p. 8711-9.
108. Hay, R.T., *SUMO A History of Modification.* Mol Cell, 2005. **18**(1): p. 1-12.
109. Hayashi, T., Seki, M., Maeda, D., Wang, W., Kawabe, Y., Seki, T., Saitoh, H., Fukagawa, T., Yagi, H., and Enomoto, T., *Ubc9 is essential for viability of higher eukaryotic cells.* Experimental cell research, 2002. **280**(2): p. 212-21.
110. Hecker, C.M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P., and Dikic, I., *Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting Motifs.* J Biol Chem, 2006. **281**(23): p. 16117-27.
111. Hedvat, C.V., Yao, J., Sokolic, R.A., and Nimer, S.D., *Myeloid ELF1-like factor is a potent activator of interleukin-8 expression in hematopoietic cells.* J Biol Chem, 2004. **279**(8): p. 6395-400.

112. Helmbacher, F., Dessaud, E., Arber, S., deLapeyriere, O., Henderson, C.E., Klein, R., and Maina, F., *Met signaling is required for recruitment of motor neurons to PEA3-positive motor pools.* Neuron, 2003. **39**(5): p. 767-77.
113. Hendricks, T., Francis, N., Fyodorov, D., and Deneris, E.S., *The ETS domain factor Pet-1 is an early and precise marker of central serotonin neurons and interacts with a conserved element in serotonergic genes.* J Neurosci, 1999. **19**(23): p. 10348-56.
114. Herrmann, J., Lerman, L.O., and Lerman, A., *Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation.* Circ Res, 2007. **100**(9): p. 1276-91.
115. Hesselbrock, D.R., Kurpios, N., Hassell, J.A., Watson, M.A., and Fleming, T.P., *PEA3, AP-1, and a unique repetitive sequence all are involved in transcriptional regulation of the breast cancer-associated gene, mammaglobin.* Breast Cancer Res Treat, 2005. **89**(3): p. 289-96.
116. Heun, P., *SUMOrganization of the nucleus.* Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(3): p. 350-5.
117. Hida, K., Shindoh, M., Yoshida, K., Kudoh, A., Furaoka, K., Kohgo, T., Fujinaga, K., and Totsuka, Y., *Expression of E1AF, an ets-family transcription factor, is correlated with the invasive phenotype of oral squamous cell carcinoma.* Oral Oncol, 1997. **33**(6): p. 426-30.
118. Hietakangas, V., Ahlskog, J.K., Jakobsson, A.M., Hellesuo, M., Sahlberg, N.M., Holmberg, C.I., Mikhailov, A., Palvimo, J.J., Pirkkala, L., and Sistonen, L., *Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1.* Molecular and cellular biology, 2003. **23**(8): p. 2953-68.
119. Hietakangas, V., Anckar, J., Blomster, H.A., Fujimoto, M., Palvimo, J.J., Nakai, A., and Sistonen, L., *PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(1): p. 45-50.
120. Higashino, F., Yoshida, K., Noumi, T., Seiki, M., and Fujinaga, K., *Ets-related protein E1A-F can activate three different matrix metalloproteinase gene promoters.* Oncogene, 1995. **10**(7): p. 1461-3.
121. Hilgarth, R.S., Hong, Y., Park-Sarge, O.K., and Sarge, K.D., *Insights into the regulation of heat shock transcription factor 1 SUMO-1 modification.* Biochemical and biophysical research communications, 2003. **303**(1): p. 196-200.
122. Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S., *RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO.* Nature, 2002. **419**(6903): p. 135-41.
123. Hoeller, D., Hecker, C.M., and Dikic, I., *Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis.* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(10): p. 776-88.
124. Holmstrom, S., Van Antwerp, M.E., and Iniguez-Lluhi, J.A., *Direct and distinguishable inhibitory roles for SUMO isoforms in the control of transcriptional synergy.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 15758-63. Epub 2003 Dec 8.
125. Howe, L.R., Crawford, H.C., Subbaramaiah, K., Hassell, J.A., Dannenberg, A.J., and Brown, A.M., *PEA3 is up-regulated in response to Wnt1 and activates the expression of cyclooxygenase-2.* J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20108-15. Epub 2001 Mar 26.
126. Howe, L.R., Watanabe, O., Leonard, J., and Brown, A.M., *Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation.* Cancer Res, 2003. **63**(8): p. 1906-13.
127. Hsia, N. and Cornwall, G.A., *DNA microarray analysis of region-specific gene expression in the mouse epididymis.* Biol Reprod, 2004. **70**(2): p. 448-57.

128. Huang, T.T., Wuerzberger-Davis, S.M., Wu, Z.H., and Miyamoto, S., *Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress.* Cell, 2003. **115**(5): p. 565-76.
129. Iguchi, A., Kitajima, I., Yamakuchi, M., Ueno, S., Aikou, T., Kubo, T., Matsushima, K., Mukaida, N., and Maruyama, I., *PEA3 and AP-1 are required for constitutive IL-8 gene expression in hepatoma cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **279**(1): p. 166-71.
130. Ihara, M., Koyama, H., Uchimura, Y., Saitoh, H., and Kikuchi, A., *Noncovalent Binding of Small Ubiquitin-related Modifier (SUMO) Protease to SUMO Is Necessary for Enzymatic Activities and Cell Growth.* J Biol Chem, 2007. **282**(22): p. 16465-75.
131. Imoto, S., Sugiyama, K., Muromoto, R., Sato, N., Yamamoto, T., and Matsuda, T., *Regulation of transforming growth factor-beta signaling by protein inhibitor of activated STAT, PIASy through Smad3.* Journal of biological chemistry, The, 2003. **278**(36): p. 34253-8.
132. Iniguez-Lluhi, J.A. and Pearce, D., *A common motif within the negative regulatory regions of multiple factors inhibits their transcriptional synergy.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(16): p. 6040-50.
133. Ishida, S., Higashino, F., Aoyagi, M., Takahashi, A., Suzuki, T., Shindoh, M., Fujinaga, K., and Yoshida, K., *Genomic structure and promoter activity of the E1AF gene, a member of the ETS oncogene family.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(1): p. 325-30.
134. Ivanov X, M.Z., Nedyalkov S, Todorov TG, *Experimental investigation into avian leukosis. Transmission experiments of certains diseases of the avian leukosis complex found in Bulgaria.* Bulgarian Acad Sci Inst Pathol Comp Animaux Domestiques, 1962. **5**: p. 5-36.
135. Iwama, A., Zhang, P., Darlington, G.J., McKercher, S.R., Maki, R., and Tenen, D.G., *Use of RDA analysis of knockout mice to identify myeloid genes regulated in vivo by PU.1 and C/EBPalpha.* Nucleic Acids Res, 1998. **26**(12): p. 3034-43.
136. Jacobs, A.M., Nicol, S.M., Hislop, R.G., Jaffray, E.G., Hay, R.T., and Fuller-Pace, F.V., *SUMO modification of the DEAD box protein p68 modulates its transcriptional activity and promotes its interaction with HDAC1.* Oncogene, 2007. **26**(40): p. 5866-76.
137. Jacques, C., Baris, O., Prunier-Mirebeau, D., Savagner, F., Rodien, P., Rohmer, V., Franc, B., Guyetant, S., Malthiery, Y., and Reynier, P., *Two-step differential expression analysis reveals a new set of genes involved in thyroid oncocytic tumors.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(4): p. 2314-20.
138. Jakobs, A., Koehnke, J., Himstedt, F., Funk, M., Korn, B., Gaestel, M., and Niedenthal, R., *Ubc9 fusion-directed SUMOylation (UFDS): a method to analyze function of protein SUMOylation.* Nat Methods, 2007. **4**(3): p. 245-50.
139. Janknecht, R., *Analysis of the ERK-stimulated ETS transcription factor ER81.* Mol Cell Biol, 1996. **16**(4): p. 1550-6.
140. Janknecht, R., Monte, D., Baert, J.L., and de Launoit, Y., *The ETS-related transcription factor ERM is a nuclear target of signaling cascades involving MAPK and PKA.* Oncogene, 1996. **13**(2): p. 1745-54.
141. Janknecht, R., *Cell type-specific inhibition of the ETS transcription factor ER81 by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2.* J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 41856-61. Epub 2001 Sep 10.
142. Janknecht, R., *Regulation of the ER81 transcription factor and its coactivators by mitogen- and stress-activated protein kinase 1 (MSK1).* Oncogene, 2003. **22**(5): p. 746-55.

143. Janknecht, R., *EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing tumors.* Gene, 2005. **363**: p. 1-14.
144. Ji, Z., Degerny, C., Vintonenko, N., Deheuninck, J., Foveau, B., Leroy, C., Coll, J., Tulasne, D., Baert, J.L., and Fafeur, V., *Regulation of the Ets-1 transcription factor by sumoylation and ubiquitinylation.* Oncogene, 2007. **26**(3): p. 395-406.
145. Jiang, J., Wei, Y., Liu, D., Zhou, J., Shen, J., Chen, X., Zhang, S., Kong, X., and Gu, J., *E1AF promotes breast cancer cell cycle progression via upregulation of Cyclin D3 transcription.* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **358**(1): p. 53-8.
146. Johnson, E.S., *Protein modification by sumo.* Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 355-82.
147. Kagey, M.H., Melhuish, T.A., Powers, S.E., and Wotton, D., *Multiple activities contribute to Pc2 E3 function.* Embo J, 2004. **9**: p. 9.
148. Kahyo, T., Nishida, T., and Yasuda, H., *Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53.* Molecular cell, 2001. **8**(3): p. 713-8.
149. Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H.P., Wada, H., Fukuda-Kamitani, T., and Yeh, E.T., *Identification of three major sentrinization sites in PML.* Journal of biological chemistry, The, 1998. **273**(41): p. 26675-82.
150. Kang, S.I., Chang, W.J., Cho, S.G., and Kim, I.Y., *Modification of promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF) by SUMO-1 conjugation regulates its transcriptional repressor activity.* Journal of biological chemistry, The, 2003. **278**(51): p. 51479-83.
151. Karamouzis, M.V., Konstantinopoulos, P.A., Badra, F.A., and Papavassiliou, A.G., *SUMO and estrogen receptors in breast cancer.* Breast Cancer Res Treat, 2007.
152. Kathuria, H., Cao, Y.X., Ramirez, M.I., and Williams, M.C., *Transcription of the Caveolin-1 Gene Is Differentially Regulated in Lung Type I Epithelial and Endothelial Cell Lines: A ROLE FOR ETS PROTEINS IN EPITHELIAL CELL EXPRESSION.* J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30028-36. Epub 2004 May 10.
153. Kathuria, H., Cao, Y., Hinds, A., Ramirez, M.I., and Williams, M.C., *ERM is expressed by alveolar epithelial cells in adult mouse lung and regulates caveolin-1 transcription in mouse lung epithelial cell lines.* J Cell Biochem, 2007.
154. Kaya, M., Yoshida, K., Higashino, F., Mitaka, T., Ishii, S., and Fujinaga, K., *A single ets-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells.* Oncogene, 1996. **12**(2): p. 221-7.
155. Kerscher, O., *SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs.* EMBO Rep, 2007. **8**(6): p. 550-5.
156. Kirsh, O., Seeler, J.S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F., and Dejean, A., *The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase.* Embo J, 2002. **21**(11): p. 2682-91.
157. Knipscheer, P., van Dijk, W.J., Olsen, J.V., Mann, M., and Sixma, T.K., *Noncovalent interaction between Ubc9 and SUMO promotes SUMO chain formation.* Embo J, 2007. **26**(11): p. 2797-807.
158. Koo, T.B., Song, H., Moon, I., Han, K., Chen, C., Murphy, K., and Lim, H., *Differential expression of the PEA3 subfamily of ETS transcription factors in the mouse ovary and peri-implantation uterus.* Reproduction, 2005. **129**(5): p. 651-7.
159. Kopp, J.L., Wilder, P.J., Desler, M., Kim, J.H., Hou, J., Nowling, T., and Rizzino, A., *Unique and selective effects of five Ets family members, Elf3, Ets1, Ets2, PEA3 and PU.1, on the promoter of the type II TGF-beta receptor gene.* J Biol Chem, 2004. **26**: p. 26.

160. Korz, C., Pscherer, A., Benner, A., Mertens, D., Schaffner, C., Leupolt, E., Dohner, H., Stilgenbauer, S., and Lichter, P., *Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes.* Blood, 2002. **99**(12): p. 4554-61.
161. Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O.A., and Palvimo, J.J., *PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases.* Molecular and cellular biology, 2002. **22**(14): p. 5222-34.
162. Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O.A., and Palvimo, J.J., *The nuclear receptor interaction domain of GRIP1 is modulated by covalent attachment of SUMO-1.* Journal of biological chemistry, The, 2002. **277**(33): p. 30283-8.
163. Kuo, H.Y., Chang, C.C., Jeng, J.C., Hu, H.M., Lin, D.Y., Maul, G.G., Kwok, R.P., and Shih, H.M., *SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of Daxx.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(47): p. 16973-8.
164. Kurosu, T. and Peterlin, B.M., *VP16 and ubiquitin; binding of P-TEFb via its activation domain and ubiquitin facilitates elongation of transcription of target genes.* Curr Biol, 2004. **14**(12): p. 1112-6.
165. Kurpios, N.A., Sabolic, N.A., Shepherd, T.G., Fidalgo, G.M., and Hassell, J.A., *Function of PEA3 Ets transcription factors in mammary gland development and oncogenesis.* J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2003. **8**(2): p. 177-90.
166. Kwek, S.S., Derry, J., Tyner, A.L., Shen, Z., and Gudkov, A.V., *Functional analysis and intracellular localization of p53 modified by SUMO-1.* Oncogene, 2001. **20**(20): p. 2587-99.
167. Lacorazza, H.D., Miyazaki, Y., Di Cristofano, A., Deblasio, A., Hedvat, C., Zhang, J., Cordon-Cardo, C., Mao, S., Pandolfi, P.P., and Nimer, S.D., *The ETS protein MEF plays a critical role in perforin gene expression and the development of natural killer and NK-T cells.* Immunity, 2002. **17**(4): p. 437-49.
168. Lacorazza, H.D. and Nimer, S.D., *The emerging role of the myeloid Elf-1 like transcription factor in hematopoiesis.* Blood Cells Mol Dis, 2003. **31**(3): p. 342-50.
169. Lacronique, V., Boureux, A., Valle, V.D., Poirel, H., Quang, C.T., Mauchauffe, M., Berthou, C., Lessard, M., Berger, R., Ghysdael, J., and Bernard, O.A., *A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia.* Science, 1997. **278**(5341): p. 1309-12.
170. Ladle, D.R. and Frank, E., *The role of the ETS gene PEA3 in the development of motor and sensory neurons.* Physiol Behav, 2002. **77**(4-5): p. 571-6.
171. Laget, M.P., Defossez, P.A., Albagli, O., Baert, J.L., Dewitte, F., Stehelin, D., and de Launoit, Y., *Two functionally distinct domains responsible for transactivation by the Ets family member ERM.* Oncogene, 1996. **12**(6): p. 1325-36.
172. Laing, M.A., Coonrod, S., Hinton, B.T., Downie, J.W., Tozer, R., Rudnicki, M.A., and Hassell, J.A., *Male sexual dysfunction in mice bearing targeted mutant alleles of the PEA3 ets gene.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(24): p. 9337-45.
173. Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., Puvion, F., Koken, M., Honore, N., Doubeikovsky, A., Duprez, E., Pandolfi, P.P., Puvion, E., Freemont, P., and de-The, H., *Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation.* Journal of experimental medicine, The, 2001. **193**(12): p. 1361-71.
174. Laudet, V., Hanni, C., Stehelin, D., and Duterque-Coquillaud, M., *Molecular phylogeny of the ETS gene family.* Oncogene, 1999. **18**(6): p. 1351-9.

175. Le Drean, Y., Mincheneau, N., Le Goff, P., and Michel, D., *Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation.* Endocrinology, 2002. **143**(9): p. 3482-9.
176. Ledl, A., Schmidt, D., and Muller, S., *Viral oncoproteins E1A and E7 and cellular LxCxE proteins repress SUMO modification of the retinoblastoma tumor suppressor.* Oncogene, 2005. **4**: p. 4.
177. Lee, G.M., Donaldson, L.W., Pufall, M.A., Kang, H.S., Pot, I., Graves, B.J., and McIntosh, L.P., *The structural and dynamic basis of Ets-1 DNA binding autoinhibition.* J Biol Chem, 2005. **280**(8): p. 7088-99.
178. Lee, M.H., Lee, S.W., Lee, E.J., Choi, S.J., Chung, S.S., Lee, J.I., Cho, J.M., Seol, J.H., Baek, S.H., Kim, K.I., Chiba, T., Tanaka, K., Bang, O.S., and Chung, C.H., *SUMO-specific protease SUSP4 positively regulates p53 by promoting Mdm2 self-ubiquitination.* Nat Cell Biol, 2006. **8**(12): p. 1424-31.
179. Lee, P.S., Chang, C., Liu, D., and Derynck, R., *Sumoylation of Smad4, the common Smad mediator of transforming growth factor-beta family signaling.* Journal of biological chemistry, The, 2003. **278**(30): p. 27853-63.
180. Lee, Y.S., Jang, M.S., Lee, J.S., Choi, E.J., and Kim, E., *SUMO-1 represses apoptosis signal-regulating kinase 1 activation through physical interaction and not through covalent modification.* EMBO Rep, 2005. **6**(10): p. 949-55.
181. Leprince, D., Gegonne, A., Coll, J., de Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C., and Stehelin, D., *A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26.* Nature, 1983. **306**(5941): p. 395-7.
182. Li, T., Santockyte, R., Shen, R.F., Tekle, E., Wang, G., Yang, D.C., and Chock, P.B., *Expression of SUMO-2/3 Induced Senescence through p53- and pRB-mediated Pathways.* J Biol Chem, 2006. **281**(47): p. 36221-7.
183. Lin, J.H., Saito, T., Anderson, D.J., Lance-Jones, C., Jessell, T.M., and Arber, S., *Functionally related motor neuron pool and muscle sensory afferent subtypes defined by coordinate ETS gene expression.* Cell, 1998. **95**(3): p. 393-407.
184. Lin, X., Liang, M., Liang, Y.Y., Brunicardi, F.C., and Feng, X.H., *SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4.* Journal of biological chemistry, The, 2003. **278**(33): p. 31043-8.
185. Lin, X., Sun, B., Liang, M., Liang, Y.Y., Gast, A., Hildebrand, J., Brunicardi, F.C., Melchior, F., and Feng, X.H., *Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding.* Molecular cell, 2003. **11**(5): p. 1389-96.
186. Ling, Y., Sankpal, U.T., Robertson, A.K., McNally, J.G., Karpova, T., and Robertson, K.D., *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, 2004. **32**(2): p. 598-610 Print 2004.
187. Lipford, J.R. and Deshaies, R.J., *Diverse roles for ubiquitin-dependent proteolysis in transcriptional activation.* Nat Cell Biol, 2003. **5**(10): p. 845-50.
188. Liu, Y., Jiang, H., Crawford, H.C., and Hogan, B.L., *Role for ETS domain transcription factors Pea3/Erm in mouse lung development.* Dev Biol, 2003. **261**(1): p. 10-24.
189. Liu, Y., Borchert, G.L., and Phang, J.M., *Polyoma enhancer activator 3, an ets transcription factor, mediates the induction of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in colorectal cancer cells.* J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18694-700. Epub 2004 Feb 19.
190. Livet, J., Sigrist, M., Stroebel, S., De Paola, V., Price, S.R., Henderson, C.E., Jessell, T.M., and Arber, S., *ETS gene Pea3 controls the central position and terminal arborization of specific motor neuron pools.* Neuron, 2002. **35**(5): p. 877-92.

191. Long, J., Wang, G., He, D., and Liu, F., *Repression of Smad4 transcriptional activity by SUMO modification.* Biochem J, 2004. **30**.
192. Long, J., Zuo, D., and Park, M., *Pc2-mediated Sumoylation of Smad-interacting Protein 1 Attenuates Transcriptional Repression of E-cadherin.* J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35477-89.
193. Lu, W.C., Liu, Y.N., Kang, B.B., and Chen, J.H., *Trans-activation of heparanase promoter by ETS transcription factors.* Oncogene, 2003. **22**(6): p. 919-23.
194. Lyst, M.J., Nan, X., and Stancheva, I., *Regulation of MBD1-mediated transcriptional repression by SUMO and PIAS proteins.* Embo J, 2006. **25**(22): p. 5317-28.
195. Mabb, A.M., Wuerzberger-Davis, S.M., and Miyamoto, S., *PIASy mediates NEMO sumoylation and NF-kappaB activation in response to genotoxic stress.* Nat Cell Biol, 2006. **8**(9): p. 986-93.
196. Macauley, M.S., Errington, W.J., Scharpf, M., Mackereth, C.D., Blaszczak, A.G., Graves, B.J., and McIntosh, L.P., *Beads-on-a-string, characterization of ETS-1 sumoylated within its flexible N-terminal sequence.* J Biol Chem, 2006. **281**(7): p. 4164-72.
197. Matsui, K., Sugimori, K., Motomura, H., Ejiri, N., Tsukada, K., and Kitajima, I., *PEA3 cooperates with c-Jun in regulation of HER2/neu transcription.* Oncol Rep, 2006. **16**(1): p. 153-8.
198. Matunis, M.J., Coutavas, E., and Blobel, G., *A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex.* Journal of cell biology, The, 1996. **135**(6 Pt 1): p. 1457-70.
199. Mavrothalassitis, G. and Ghysdael, J., *Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity.* Oncogene, 2000. **19**(55): p. 6524-32.
200. McDoniels-Silvers, A.L., Nimri, C.F., Stoner, G.D., Lubet, R.A., and You, M., *Differential gene expression in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas.* Clin Cancer Res, 2002. **8**(4): p. 1127-38.
201. McKercher, S.R., Torbett, B.E., Anderson, K.L., Henkel, G.W., Vestal, D.J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A.J., Wu, G.E., Paige, C.J., and Maki, R.A., *Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities.* Embo J, 1996. **15**(20): p. 5647-58.
202. Mikolajczyk, J., Drag, M., Bekes, M., Cao, J.T., Ronai, Z., and Salvesen, G.S., *Small Ubiquitin-related Modifier (SUMO)-specific Proteases: PROFILING THE SPECIFICITIES AND ACTIVITIES OF HUMAN SENPs.* J Biol Chem, 2007. **282**(36): p. 26217-24.
203. Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M., and Caput, D., *Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif.* Journal of biological chemistry, The, 2000. **275**(46): p. 36316-23.
204. Mo, Y.Y., Yu, Y., Theodosiou, E., Rachel Ee, P.L., and Beck, W.T., *A role for Ubc9 in tumorigenesis.* Oncogene, 2005. **21**: p. 21.
205. Mohan, R.D., Rao, A., Gagliardi, J., and Tini, M., *SUMO-1-Dependent Allosteric Regulation of Thymine DNA Glycosylase Alters Subnuclear Localization and CBP/p300 Recruitment.* Mol Cell Biol, 2007. **27**(1): p. 229-43.
206. Monge, M., Colas, E., Doll, A., Gonzalez, M., Gil-Moreno, A., Planaguma, J., Quiles, M., Arbos, M.A., Garcia, A., Castellvi, J., Llaurado, M., Rigau, M., Alazzouzi, H., Xercavins, J., Alameda, F., Reventos, J., and Abal, M., *ERM/ETV5 Up-regulation Plays a Role during Myometrial Infiltration through Matrix Metalloproteinase-2 Activation in Endometrial Cancer.* Cancer Res, 2007. **67**(14): p. 6753-9.

207. Monte, D., Baert, J.L., Defossez, P.A., de Launoit, Y., and Stehelin, D., *Molecular cloning and characterization of human ERM, a new member of the Ets family closely related to mouse PEA3 and ER81 transcription factors.* Oncogene, 1994. **9**(5): p. 1397-406.
208. Monte, D., Coutte, L., Baert, J.L., Angeli, I., Stehelin, D., and de Launoit, Y., *Molecular characterization of the ets-related human transcription factor ER81.* Oncogene, 1995. **11**(4): p. 771-9.
209. Montpetit, B., Hazbun, T.R., Fields, S., and Hieter, P., *Sumoylation of the budding yeast kinetochore protein Ndc10 is required for Ndc10 spindle localization and regulation of anaphase spindle elongation.* J Cell Biol, 2006. **174**(5): p. 653-63.
210. Morita, Y., Kanei-Ishii, C., Nomura, T., and Ishii, S., *TRAF7 sequesters c-Myb to the cytoplasm by stimulating its sumoylation.* Mol Biol Cell, 2005. **16**(11): p. 5433-44.
211. Moschos, S.J. and Mo, Y.Y., *Role of SUMO/Ubc9 in DNA damage repair and tumorigenesis.* J Mol Histol, 2006. **37**(5-7): p. 309-19.
212. Moscovici, C., Samarut, J., Gazzolo, L., and Moscovici, M.G., *Myeloid and erythroid neoplastic responses to avian defective leukemia viruses in chickens and in quail.* Virology, 1981. **113**(2): p. 765-8.
213. Moss, A.C., Lawlor, G., Murray, D., Tighe, D., Madden, S.F., Mulligan, A.M., Keane, C.O., Brady, H.R., Doran, P.P., and Macmathuna, P., *ETV4 and Myeov knockdown impairs colon cancer cell line proliferation and invasion.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **345**(1): p. 216-21.
214. Mueller, B.U., Pabst, T., Osato, M., Asou, N., Johansen, L.M., Minden, M.D., Behre, G., Hiddemann, W., Ito, Y., and Tenen, D.G., *Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia.* Blood, 2002. **100**(3): p. 998-1007.
215. Mukhopadhyay, D., Ayaydin, F., Kolli, N., Tan, S.H., Anan, T., Kametaka, A., Azuma, Y., Wilkinson, K.D., and Dasso, M., *SUSP1 antagonizes formation of highly SUMO2/3-conjugated species.* J Cell Biol, 2006. **174**(7): p. 939-49.
216. Muller, S., Matunis, M.J., and Dejean, A., *Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus.* EMBO journal, The, 1998. **17**(1): p. 61-70.
217. Muller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, J.S., Haupt, Y., and Dejean, A., *c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification.* Journal of biological chemistry, The, 2000. **275**(18): p. 13321-9.
218. Munarriz, E., Barcaroli, D., Stephanou, A., Townsend, P.A., Maisse, C., Terrinoni, A., Neale, M.H., Martin, S.J., Latchman, D.S., Knight, R.A., Melino, G., and De Laurenzi, V., *PIAS-1 Is a Checkpoint Regulator Which Affects Exit from G1 and G2 by Sumoylation of p73.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(24): p. 10593-610.
219. Muthusamy, N., Barton, K., and Leiden, J.M., *Defective activation and survival of T cells lacking the Ets-1 transcription factor.* Nature, 1995. **377**(6550): p. 639-42.
220. Myers, E., Hill, A.D., Kelly, G., McDermott, E.W., O'Higgins N, J., and Young, L.S., *A positive role for PEA3 in HER2-mediated breast tumour progression.* Br J Cancer, 2006. **95**(10): p. 1404-9.
221. Nacerddine, K., Lehembre, F., Bhaumik, M., Artus, J., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., Pandolfi, P.P., and Dejean, A., *The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice.* Dev Cell, 2005. **9**(6): p. 769-79.
222. Nakae, K., Nakajima, K., Inazawa, J., Kitaoka, T., and Hirano, T., *ERM, a PEA3 subfamily of Ets transcription factors, can cooperate with c-Jun.* J Biol Chem, 1995. **270**(40): p. 23795-800.
223. Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D.E., Bylebyl, G.R., Dokmanovic, M., Dorsey, J.A., Whelan, K.A., Krsmanovic, M., Lane, W.S., Meluh, P.B., Johnson, E.S., and

Berger, S.L., *Histone sumoylation is a negative regulator in Saccharomyces cerevisiae and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications.* Genes Dev, 2006. **20**(8): p. 966-76.

224. Navascues, J., Bengoechea, R., Tapia, O., Vaque, J.P., Lafarga, M., and Berciano, M.T., *Characterization of a new SUMO-1 nuclear body (SNB) enriched in pCREB, CBP, c-Jun in neuron-like UR61 cells.* Chromosoma, 2007.
225. Nelson, V., Davis, G.E., and Maxwell, S.A., *A putative protein inhibitor of activated STAT (PIASy) interacts with p53 and inhibits p53-mediated transactivation but not apoptosis.* Apoptosis, 2001. **6**(3): p. 221-34.
226. Netzer, S., Leenders, F., Dumont, P., Baert, J.L., and de Launoit, Y., *Ectopic expression of the ets transcription factor ER81 in transgenic mouse mammary gland enhances both urokinase plasminogen activator and stromelysin-1 transcription.* Transgenic Res, 2002. **11**(2): p. 123-31.
227. Nishida, T., Terashima, M., and Fukami, K., *PIASy-mediated repression of the Ets-1 is independent of its sumoylation.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **345**(4): p. 1536-46.
228. Nishida, T., Terashima, M., Fukami, K., and Yamada, Y., *Repression of E1AF transcriptional activity by sumoylation and PIASy.* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **360**(1): p. 226-32.
229. Nishida, T., Terashima, M., Fukami, K., and Yamada, Y., *PIASy controls ubiquitination-dependent proteasomal degradation of Ets-1.* Biochem J, 2007.
230. Nosho, K., Yoshida, M., Yamamoto, H., Taniguchi, H., Adachi, Y., Mikami, M., Hinoda, Y., and Imai, K., *Association of Ets-related transcriptional factor E1AF expression with overexpression of matrix metalloproteinases, COX-2 and iNOS in the early stage of colorectal carcinogenesis.* Carcinogenesis, 2005. **26**(5): p. 892-9.
231. Nunn, M.F., Seeburg, P.H., Moscovici, C., and Duesberg, P.H., *Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene.* Nature, 1983. **306**(5941): p. 391-5.
232. Nye, J.A., Petersen, J.M., Gunther, C.V., Jonsen, M.D., and Graves, B.J., *Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif.* Genes Dev, 1992. **6**(6): p. 975-90.
233. O'Hagan, R.C., Tozer, R.G., Symons, M., McCormick, F., and Hassell, J.A., *The activity of the Ets transcription factor PEA3 is regulated by two distinct MAPK cascades.* Oncogene, 1996. **13**(6): p. 1323-33.
234. Oikawa, T. and Yamada, T., *Molecular biology of the Ets family of transcription factors.* Gene, 2003. **303**: p. 11-34.
235. Okubo, S., Hara, F., Tsuchida, Y., Shimotakahara, S., Suzuki, S., Hatanaka, H., Yokoyama, S., Tanaka, H., Yasuda, H., and Shindo, H., *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, 2004. **279**(30): p. 31455-61.
236. Ouyang, W., Jacobson, N.G., Bhattacharya, D., Gorham, J.D., Fenoglio, D., Sha, W.C., Murphy, T.L., and Murphy, K.M., *The Ets transcription factor ERM is Th1-specific and induced by IL-12 through a Stat4-dependent pathway.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3888-93.
237. Owerbach, D., McKay, E.M., Yeh, E.T., Gabbay, K.H., and Bohren, K.M., *A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **337**(2): p. 517-20.
238. Papouli, E., Chen, S., Davies, A.A., Huttner, D., Krejci, L., Sung, P., and Ulrich, H.D., *Crosstalk between SUMO and Ubiquitin on PCNA Is Mediated by Recruitment of the Helicase Srs2p.* Mol Cell, 2005. **19**(1): p. 123-33.

239. Papoutsopoulou, S. and Janknecht, R., *Phosphorylation of ETS transcription factor ER81 in a complex with its coactivators CREB-binding protein and p300.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(19): p. 7300-10.
240. Paratore, C., Brugnoli, G., Lee, H.Y., Suter, U., and Sommer, L., *The role of the Ets domain transcription factor Erm in modulating differentiation of neural crest stem cells.* Dev Biol, 2002. **250**(1): p. 168-80.
241. Parkinson, D.B., Langner, K., Namini, S.S., Jessen, K.R., and Mirsky, R., *beta-Neuregulin and autocrine mediated survival of Schwann cells requires activity of Ets family transcription factors.* Mol Cell Neurosci, 2002. **20**(1): p. 154-67.
242. Pascual, G., Fong, A.L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A.C., Perissi, V., Rose, D.W., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K., *A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma.* Nature, 2005: p. 1.
243. Pastorcic, M. and Das, H.K., *Ets transcription factors ER81 and Elk1 regulate the transcription of the human presenilin 1 gene promoter.* Brain Res Mol Brain Res, 2003. **113**(1-2): p. 57-66.
244. Pastorcic, M. and Das, H.K., *Analysis of transcriptional modulation of the presenilin 1 gene promoter by ZNF237, a candidate binding partner of the Ets transcription factor ERM.* Brain Res, 2006. **1128**(1): p. 21-32.
245. Pastorcic, M. and Das, H.K., *The C-terminal region of CHD3/ZFH interacts with the CIDD region of the Ets transcription factor ERM and represses transcription of the human presenilin 1 gene.* Febs J, 2007. **274**(6): p. 1434-48.
246. Paumelle, R., Tulasne, D., Kherrouche, Z., Plaza, S., Leroy, C., Reveneau, S., Vandenbunder, B., and Fafeur, V., *Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway.* Oncogene, 2002. **21**(15): p. 2309-19.
247. Perez, A., Barco, R., Fernandez, I., Price-Schiavi, S.A., and Carraway, K.L., *PEA3 transactivates the Muc4/sialomucin complex promoter in mammary epithelial and tumor cells.* J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36942-52. Epub 2003 Jul 10.
248. Pichler, A., Gast, A., Seeler, J.S., Dejean, A., and Melchior, F., *The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity.* Cell, 2002. **108**(1): p. 109-20.
249. Pichler, A., Knipscheer, P., Oberhofer, E., van Dijk, W.J., Korner, R., Olsen, J.V., Jentsch, S., Melchior, F., and Sixma, T.K., *SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K.* Nat Struct Mol Biol, 2005. **20**: p. 20.
250. Prudden, J., Pebernard, S., Raffa, G., Slavin, D.A., Perry, J.J., Tainer, J.A., McGowan, C.H., and Boddy, M.N., *SUMO-targeted ubiquitin ligases in genome stability.* Embo J, 2007.
251. Radke, K., Beug, H., Kornfeld, S., and Graf, T., *Transformation of both erythroid and myeloid cells by E26, an avian leukemia virus that contains the myb gene.* Cell, 1982. **31**(3 Pt 2): p. 643-53.
252. Reverter, D. and Lima, C.D., *A Basis for SUMO Protease Specificity Provided by Analysis of Human Senp2 and a Senp2-SUMO Complex.* Structure (Camb), 2004. **12**(8): p. 1519-31.
253. Reverter, D. and Lima, C.D., *Structural basis for SENP2 protease interactions with SUMO precursors and conjugated substrates.* Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(12): p. 1060-8.
254. Riquelme, C., Barthel, K.K., Qin, X.F., and Liu, X., *Ubc9 expression is essential for myotube formation in C2C12.* Exp Cell Res, 2006. **312**(11): p. 2132-41.

255. Ristevski, S., O'Leary, D.A., Thornell, A.P., Owen, M.J., Kola, I., and Hertzog, P.J., *The ETS transcription factor GABPalpha is essential for early embryogenesis.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(13): p. 5844-9.
256. Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Midgley, C.A., Lane, D.P., and Hay, R.T., *SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53.* EMBO journal, The, 1999. **18**(22): p. 6455-61.
257. Rodriguez, M.S., Dargemont, C., and Hay, R.T., *SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting.* Journal of biological chemistry, The, 2001. **276**(16): p. 12654-9.
258. Rosendorff, A., Sakakibara, S., Lu, S., Kieff, E., Xuan, Y., Dibacco, A., Shi, Y., and Gill, G., *NXP-2 association with SUMO-2 depends on lysines required for transcriptional repression.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(14): p. 5308-13.
259. Ross, S., Best, J.L., Zon, L.I., and Gill, G., *SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization.* Molecular cell, 2002. **10**(4): p. 831-42.
260. Roussigne, M. and Blader, P., *Divergence in regulation of the PEA3 family of ETS transcription factors.* Gene Expr Patterns, 2006. **6**(8): p. 777-82.
261. Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., and Grosschedl, R., *PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies.* Genes Dev, 2001. **15**(23): p. 3088-103.
262. Saitoh, H. and Hinchey, J., *Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3.* Journal of biological chemistry, The, 2000. **275**(9): p. 6252-8.
263. Salinas, S., Briancon-Marjollet, A., Bossis, G., Lopez, M.A., Piechaczyk, M., Jariel-Encontre, I., Debant, A., and Hipskind, R.A., *SUMOylation regulates nucleo-cytoplasmic shuttling of Elk-1.* J Cell Biol, 2004. **165**(6): p. 767-73.
264. Schmidt, D. and Muller, S., *PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation.* Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(12): p. 2561-74.
265. Schneikert, J., Peterziel, H., Defossez, P.A., Klocker, H., Launoit, Y., and Cato, A.C., *Androgen receptor-Ets protein interaction is a novel mechanism for steroid hormone-mediated down-modulation of matrix metalloproteinase expression.* J Biol Chem, 1996. **271**(39): p. 23907-13.
266. Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J., and Singh, H., *Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages.* Science, 1994. **265**(5178): p. 1573-7.
267. Scott, E.W., Fisher, R.C., Olson, M.C., Kehrli, E.W., Simon, M.C., and Singh, H., *PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors.* Immunity, 1997. **6**(4): p. 437-47.
268. Sedy, J., Tseng, S., Walro, J.M., Grim, M., and Kucera, J., *ETS transcription factor ER81 is required for the Pacinian corpuscle development.* Dev Dyn, 2006. **235**(4): p. 1081-9.
269. Seeler, J.S. and Dejean, A., *Nuclear and unclear functions of SUMO.* Nature reviews. Molecular cell biology, 2003. **4**(9): p. 690-9.
270. Seth, A. and Watson, D.K., *ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer.* Eur J Cancer, 2005. **41**(16): p. 2462-78.
271. Sharma, M., Li, X., Wang, Y., Zarnegar, M., Huang, C.Y., Palvimo, J.J., Lim, B., and Sun, Z., *hZimp10 is an androgen receptor co-activator and forms a complex with SUMO-1 at replication foci.* EMBO journal, The, 2003. **22**(22): p. 6101-14.
272. Sharrocks, A.D., *The ETS-domain transcription factor family.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(11): p. 827-37.

273. Shepherd, T.G., Kockeritz, L., Szrajber, M.R., Muller, W.J., and Hassell, J.A., *The pea3 subfamily ets genes are required for HER2/Neu-mediated mammary oncogenesis.* Curr Biol, 2001. **11**(22): p. 1739-48.
274. Shiio, Y. and Eisenman, R.N., *Histone sumoylation is associated with transcriptional repression.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13225-30. Epub 2003 Oct 24.
275. Shou, Z., Yamada, K., Inazu, T., Kawata, H., Hirano, S., Mizutani, T., Yazawa, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Kajitani, T., Okada, K., and Miyamoto, K., *Genomic structure and analysis of transcriptional regulation of the mouse zinc-fingers and homeoboxes 1 (ZHX1) gene.* Gene, 2003. **302**(1-2): p. 83-94.
276. Shuai, K. and Liu, B., *Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system.* Nat Rev Immunol, 2005. **5**(8): p. 593-605.
277. Simon, L., Ekman, G.C., Tyagi, G., Hess, R.A., Murphy, K.M., and Cooke, P.S., *Common and distinct factors regulate expression of mRNA for ETV5 and GDNF, Sertoli cell proteins essential for spermatogonial stem cell maintenance.* Exp Cell Res, 2007. **313**(14): p. 3090-9.
278. Sjoblom, T., Boureux, A., Ronnstrand, L., Heldin, C.H., Ghysdael, J., and Ostman, A., *Characterization of the chronic myelomonocytic leukemia associated TEL-PDGF beta R fusion protein.* Oncogene, 1999. **18**(50): p. 7055-62.
279. Song, J., Durrin, L.K., Wilkinson, T.A., Krontiris, T.G., and Chen, Y., *Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(40): p. 14373-8.
280. Spengler, M.L., Kennett, S.B., Moorefield, K.S., Simmons, S.O., Brattain, M.G., and Horowitz, J.M., *Sumoylation of internally initiated Sp3 isoforms regulates transcriptional repression via a Trichostatin A-insensitive mechanism.* Cell Signal, 2005. **17**(2): p. 153-166.
281. Spyropoulos, D.D., Pharr, P.N., Lavenburg, K.R., Jackers, P., Papas, T.S., Ogawa, M., and Watson, D.K., *Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(15): p. 5643-52.
282. Stankovic-Valentin, N., Deltour, S., Seeler, J., Pinte, S., Vergoten, G., Guerardel, C., Dejean, A., and Leprince, D., *An acetylation/deacetylation-SUMOylation switch through a phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor HIC1 regulates transcriptional repression activity.* Mol Cell Biol, 2007. **27**(7): p. 2661-75.
283. Steinacher, R. and Schar, P., *Functionality of Human Thymine DNA Glycosylase Requires SUMO-Regulated Changes in Protein Conformation.* Curr Biol, 2005. **15**(7): p. 616-23.
284. Stinson, J., Inoue, T., Yates, P., Clancy, A., Norton, J.D., and Sharrocks, A.D., *Regulation of TCF ETS-domain transcription factors by helix-loop-helix motifs.* Nucleic Acids Res, 2003. **31**(16): p. 4717-28.
285. Su, G.H., Chen, H.M., Muthusamy, N., Garrett-Sinha, L.A., Baunoch, D., Tenen, D.G., and Simon, M.C., *Defective B cell receptor-mediated responses in mice lacking the Ets protein, Spi-B.* Embo J, 1997. **16**(23): p. 7118-29.
286. Su, H.L. and Li, S.S., *Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins.* Gene, 2002. **296**(1-2): p. 65-73.
287. Suico, M.A., Nakamura, H., Lu, Z., Saitoh, H., Shuto, T., Nakao, M., and Kai, H., *SUMO down-regulates the activity of Elf4/myeloid Elf-1-like factor.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **348**(3): p. 880-8.
288. Sun, H., Leverson, J.D., and Hunter, T., *Conserved function of RNF4 family proteins in eukaryotes: targeting a ubiquitin ligase to SUMOylated proteins.* Embo J, 2007.

289. Takahashi, A., Higashino, F., Aoyagi, M., Yoshida, K., Itoh, M., Kobayashi, M., Totsuka, Y., Kohgo, T., and Shindoh, M., *E1AF degradation by a ubiquitin-proteasome pathway.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **327**(2): p. 575-80.
290. Takahashi, H., Hatakeyama, S., Saitoh, H., and Nakayama, K.I., *Noncovalent SUMO-1 binding activity of thymine DNA glycosylase (TDG) is required for its SUMO-1 modification and colocalization with the promyelocytic leukemia protein.* J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 5611-21. Epub 2004 Nov 29.
291. Takahashi, Y., Iwase, M., Konishi, M., Tanaka, M., Toh-e, A., and Kikuchi, Y., *Smt3, a SUMO-1 homolog, is conjugated to Cdc3, a component of septin rings at the mother-bud neck in budding yeast.* Biochemical and biophysical research communications, 1999. **259**(3): p. 582-7.
292. Tallec, L.P., Kirsh, O., Lecomte, M.C., Viengchareun, S., Zennaro, M.C., Dejean, A., and Lombes, M., *Protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription 1 interacts with the N-terminal domain of mineralocorticoid receptor and represses its transcriptional activity: implication of small ubiquitin-related modifier 1 modification.* Mol Endocrinol, 2003. **17**(12): p. 2529-42. Epub 2003 Sep 18.
293. Tatham, M.H., Jaffray, E., Vaughan, O.A., Desterro, J.M., Botting, C.H., Naismith, J.H., and Hay, R.T., *Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9.* J Biol Chem, 2001. **276**(38): p. 35368-74.
294. Taylor, J.M., Dupont-Versteegden, E.E., Davies, J.D., Hassell, J.A., Houle, J.D., Gurley, C.M., and Peterson, C.A., *A role for the ETS domain transcription factor PEA3 in myogenic differentiation.* Mol Cell Biol, 1997. **17**(9): p. 5550-8.
295. Terui, Y., Saad, N., Jia, S., McKeon, F., and Yuan, J., *Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1.* J Biol Chem, 2004. **26**: p. 26.
296. Tian, S., Poukka, H., Palvimo, J.J., and Janne, O.A., *Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor.* Biochemical journal, The, 2002. **367**(Pt 3): p. 907-11.
297. Tomlins, S.A., Rhodes, D.R., Perner, S., Dhanasekaran, S.M., Mehra, R., Sun, X.W., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., Kuefer, R., Lee, C., Montie, J.E., Shah, R.B., Pienta, K.J., Rubin, M.A., and Chinnaiyan, A.M., *Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer.* Science, 2005. **310**(5748): p. 644-8.
298. Tomlins, S.A., Mehra, R., Rhodes, D.R., Smith, L.R., Roulston, D., Helgeson, B.E., Cao, X., Wei, J.T., Rubin, M.A., Shah, R.B., and Chinnaiyan, A.M., *TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer.* Cancer Res, 2006. **66**(7): p. 3396-400.
299. Trimble, M.S., Xin, J.H., Guy, C.T., Muller, W.J., and Hassell, J.A., *PEA3 is overexpressed in mouse metastatic mammary adenocarcinomas.* Oncogene, 1993. **8**(11): p. 3037-42.
300. Truong, A.H. and Ben-David, Y., *The role of Fli-1 in normal cell function and malignant transformation.* Oncogene, 2000. **19**(55): p. 6482-9.
301. T'Sas, F., Brenner, C., Mauen, S., Putmans, P., Monte, D., Van Lint, C., Moser, M., Baert, J.L., and de Launoit, Y., *Expression of the Ets transcription factor Erm is regulated through a conventional PKC signaling pathway in the Molt4 lymphoblastic cell line.* FEBS Lett, 2005. **579**(1): p. 66-70.
302. Tsuruzoe, S., Ishihara, K., Uchimura, Y., Watanabe, S., Sekita, Y., Aoto, T., Saitoh, H., Yuasa, Y., Niwa, H., Kawasuji, M., Baba, H., and Nakao, M., *Inhibition of DNA*

binding of Sox2 by the SUMO conjugation. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **351**(4): p. 920-6.

303. Uchimura, Y., Nakamura, M., Sugasawa, K., Nakao, M., and Saitoh, H., *Overproduction of eukaryotic SUMO-1- and SUMO-2-conjugated proteins in Escherichia coli.* Anal Biochem, 2004. **331**(1): p. 204-6.
304. Uchimura, Y., Ichimura, T., Uwada, J., Tachibana, T., Sugahara, S., Nakao, M., and Saitoh, H., *Involvement of SUMO modification in MBD1- and MCAF1-mediated heterochromatin formation.* J Biol Chem, 2006. **281**(32): p. 23180-90.
305. Ulrich, H.D., *Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest.* Trends Cell Biol, 2005. **15**(10): p. 525-32.
306. Uzunova, K., Gottsche, K., Miteva, M., Weisshaar, S.R., Glanemann, C., Schnellhardt, M., Niessen, M., Scheel, H., Hofmann, K., Johnson, E.S., Praefcke, G.J., and Dohmen, R.J., *Ubiquitin-dependent proteolytic control of SUMO conjugates.* J Biol Chem, 2007.
307. van den Akker, E., Ano, S., Shih, H.M., Wang, L.C., Pironin, M., Palvimo, J.J., Kotaja, N., Kirsh, O., Dejean, A., and Ghysdael, J., *FLI-1 functionally interacts with PIASxalpha, a member of the PIAS E3 SUMO ligase family.* J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 38035-46.
308. Verger, A., Perdomo, J., and Crossley, M., *Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation.* EMBO Rep, 2003. **4**(2): p. 137-42.
309. Vertegaal, A.C., Ogg, S.C., Jaffray, E., Rodriguez, M.S., Hay, R.T., Andersen, J.S., Mann, M., and Lamond, A.I., *A proteomic study of SUMO-2 target proteins.* J Biol Chem, 2004. **2**: p. 2.
310. Vrieseling, E. and Arber, S., *Target-Induced Transcriptional Control of Dendritic Patterning and Connectivity in Motor Neurons by the ETS Gene Pea3.* Cell, 2006. **127**(7): p. 1439-52.
311. Wang, J.M., Ko, C.Y., Chen, L.C., Wang, W.L., and Chang, W.C., *Functional role of NF-IL6beta and its sumoylation and acetylation modifications in promoter activation of cyclooxygenase 2 gene.* Nucleic Acids Res, 2006. **34**(1): p. 217-31.
312. Wang, L. and Banerjee, S., *Differential PIAS3 expression in human malignancy.* Oncol Rep, 2004. **11**(6): p. 1319-24.
313. Wang, L.C., Kuo, F., Fujiwara, Y., Gilliland, D.G., Golub, T.R., and Orkin, S.H., *Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL.* Embo J, 1997. **16**(14): p. 4374-83.
314. Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., Leprince, D., and Stehelin, D., *The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation.* Nature, 1990. **346**(6280): p. 191-3.
315. Wasylyk, C., Criqui-Filipe, P., and Wasylyk, B., *Sumoylation of the net inhibitory domain (NID) is stimulated by PIAS1 and has a negative effect on the transcriptional activity of Net.* Oncogene, 2005. **24**(5): p. 820-8.
316. Watson, D.K., McWilliams, M.J., and Papas, T.S., *Molecular structure of the avian and mammalian ets genes.* Prog Clin Biol Res, 1987. **246**: p. 115-30.
317. Watson, D.K., McWilliams, M.J., Lapis, P., Lautenberger, J.A., Schweinfest, C.W., and Papas, T.S., *Mammalian ets-1 and ets-2 genes encode highly conserved proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(21): p. 7862-6.
318. Weger, S., Hammer, E., and Heilbronn, R., *Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo.* FEBS Lett, 2005. **579**(22): p. 5007-12.
319. Wei, F., Scholer, H.R., and Atchison, M.L., *Sumoylation of Oct4 enhances its stability, DNA binding, and transactivation.* J Biol Chem, 2007. **282**(29): p. 21551-60.

320. Wood, L.D., Irvin, B.J., Nucifora, G., Luce, K.S., and Hiebert, S.W., *Small ubiquitin-like modifier conjugation regulates nuclear export of TEL, a putative tumor suppressor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(6): p. 3257-62. Epub 2003 Mar 7.
321. Wu, H., Sun, L., Zhang, Y., Chen, Y., Shi, B., Li, R., Wang, Y., Liang, J., Fan, D., Wu, G., Wang, D., Li, S., and Shang, Y., *Coordinated regulation of AIB1 transcriptional activity by sumoylation and phosphorylation.* J Biol Chem, 2006. **281**(31): p. 21848-56.
322. Wu, J. and Janknecht, R., *Regulation of the ETS transcription factor ER81 by the 90-kDa ribosomal S6 kinase 1 and protein kinase A.* J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42669-79. Epub 2002 Sep 3.
323. Xhemalce, B., Seeler, J.S., Thon, G., Dejean, A., and Arcangioli, B., *Role of the fission yeast SUMO E3 ligase Pli1p in centromere and telomere maintenance.* Embo J, 2004. **23**(19): p. 3844-53.
324. Xhemalce, B., Riising, E.M., Baumann, P., Dejean, A., Arcangioli, B., and Seeler, J.S., *Role of SUMO in the dynamics of telomere maintenance in fission yeast.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 893-8.
325. Xing, X., Wang, S.C., Xia, W., Zou, Y., Shao, R., Kwong, K.Y., Yu, Z., Zhang, S., Miller, S., Huang, L., and Hung, M.C., *The ets protein PEA3 suppresses HER-2/neu overexpression and inhibits tumorigenesis.* Nat Med, 2000. **6**(2): p. 189-95.
326. Yamaguchi, T., Sharma, P., Athanasiou, M., Kumar, A., Yamada, S., and Kuehn, M.R., *Mutation of SENP1/SuPr-2 Reveals an Essential Role for Desumoylation in Mouse Development.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(12): p. 5171-82.
327. Yamamoto, H., Flannery, M.L., Kupriyanov, S., Pearce, J., McKercher, S.R., Henkel, G.W., Maki, R.A., Werb, Z., and Oshima, R.G., *Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of Ets2.* Genes Dev, 1998. **12**(9): p. 1315-26.
328. Yang, L., Fox, S.A., Kirby, J.L., Troan, B.V., and Hinton, B.T., *Putative regulation of expression of members of the Ets variant 4 transcription factor family and their downstream targets in the rat epididymis.* Biol Reprod, 2006. **74**(4): p. 714-20.
329. Yang, M., Hsu, C.T., Ting, C.Y., Liu, L.F., and Hwang, J., *Assembly of a polymeric chain of SUMO1 on human topoisomerase I in vitro.* J Biol Chem, 2006. **281**(12): p. 8264-74.
330. Yang, S.H., Bumpass, D.C., Perkins, N.D., and Sharrocks, A.D., *The ETS domain transcription factor Elk-1 contains a novel class of repression domain.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(14): p. 5036-46.
331. Yang, S.H., Jaffray, E., Hay, R.T., and Sharrocks, A.D., *Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity.* Molecular cell, 2003. **12**(1): p. 63-74.
332. Yang, S.H. and Sharrocks, A.D., *SUMO Promotes HDAC-Mediated Transcriptional Repression.* Mol Cell, 2004. **13**(4): p. 611-7.
333. Yang, S.H. and Sharrocks, A.D., *PIASx acts as an Elk-1 coactivator by facilitating derepression.* Embo J, 2005. **24**(12): p. 2161-71.
334. Yang, S.H., Galanis, A., Witty, J., and Sharrocks, A.D., *An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO.* Embo J, 2006. **25**(21): p. 5083-93.
335. Yang, S.H. and Sharrocks, A.D., *PIASxalpha differentially regulates the amplitudes of transcriptional responses following activation of the ERK and p38 MAPK pathways.* Mol Cell, 2006. **22**(4): p. 477-87.
336. Yang, X.J., *Multisite protein modification and intramolecular signaling.* Oncogene, 2005. **24**(10): p. 1653-62.

337. Yang, X.J. and Gregoire, S., *A recurrent phospho-sumoyl switch in transcriptional repression and beyond.* Mol Cell, 2006. **23**(6): p. 779-86.
338. Yoneshima, H., Yamasaki, S., Voelker, C.C., Molnar, Z., Christophe, E., Audinat, E., Takemoto, M., Nishiwaki, M., Tsuji, S., Fujita, I., and Yamamoto, N., *Er81 is expressed in a subpopulation of layer 5 neurons in rodent and primate neocortices.* Neuroscience, 2006. **137**(2): p. 401-12.
339. Zhang, Z., Liao, B., Xu, M., and Jin, Y., *Post-translational modification of POU domain transcription factor Oct-4 by SUMO-1.* Faseb J, 2007.
340. Zhao, X., Sternsdorf, T., Bolger, T.A., Evans, R.M., and Yao, T.P., *Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4- and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(19): p. 8456-64.
341. Zheng, G. and Yang, Y.C., *Sumoylation and acetylation play opposite roles in the transactivation of PLAG1 and PLAGL2.* J Biol Chem, 2005. **280**(49): p. 40773-81.
342. Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P.S., Dejean, A., and Pandolfi, P.P., *Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation.* Blood, 2000. **95**(9): p. 2748-52.
343. Zhou, J., Chehab, R., Tkalcevic, J., Naylor, M.J., Harris, J., Wilson, T.J., Tsao, S., Tellis, I., Zavarsek, S., Xu, D., Lapinskas, E.J., Visvader, J., Lindeman, G.J., Thomas, R., Ormandy, C.J., Hertzog, P.J., Kola, I., and Pritchard, M.A., *Elf5 is essential for early embryogenesis and mammary gland development during pregnancy and lactation.* Embo J, 2005. **24**(3): p. 635-44.
344. Zhu, J., Zhou, J., Peres, L., Riaucoux, F., Honore, N., Kogan, S., and de The, H., *A sumoylation site in PML/RARA is essential for leukemic transformation.* Cancer Cell, 2005. **7**(2): p. 143-153.
345. Zhu, X., Jiang, J., Shen, H., Wang, H., Zong, H., Li, Z., Yang, Y., Niu, Z., Liu, W., Chen, X., Hu, Y., and Gu, J., *Elevated beta1,4-galactosyltransferase I in highly metastatic human lung cancer cells. Identification of E1AF as important transcription activator.* J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 12503-16.

Annexes

Les articles suivants sont présentés en annexe :

Revues

1. de Launoit Y, Baert JL, Chotteau-Lelievre A, Monte D, Coutte L, Mauen S, Firlej V, Degerny C, Verreman K. The Ets transcription factors of the PEA3 group: transcriptional regulators in metastasis. Biochim Biophys Acta. 2006 Aug;1766(1):79-87. Review.

2. de Launoit Y, Baert JL, Chotteau-Lelievre A, Monte D, Coutte L, Mauen S, Firlej V, Degerny C, Verreman K. [PEA3 family of transcription factors and the regulation of oncogenesis]. Bull Cancer. 2006 Oct 1;93(10):985-9. Review. French.

Articles en collaboration

3. Ji Z, Degerny C, Vintonenko N, Deheuninck J, Foveau B, Leroy C, Coll J, Tulasne D, Baert JL, Fafeur V. Regulation of the Ets-1 transcription factor by sumoylation and ubiquitinylation. Oncogene. 2007 Jan; 26(3) : 395-406.

4. Baert JL, Beaudoin C, Monte D, Degerny C, Mauen S, de Launoit Y. The 26S proteasome system degrades the ERM transcription factor and regulates its transcription-enhancing activity. Oncogene. 2007 Jan; 26(3) : 415-24.

5. Baert JL, Monte D, Degerny C, Coutte L, de Launoit Y. An E3 ubiquitin ligase complex component, COP1, regulates PEA3 group member transcriptional activity. *Soumis à Molecular and Cellular Biology*

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Biochimica et Biophysica Acta 1766 (2006) 79–87
BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA
BBA
www.elsevier.com/locate/bbacan

Review

The Ets transcription factors of the PEA3 group: Transcriptional regulators in metastasis

Yvan de Launoit [a,b,*], Jean-Luc Baert [a], Anne Chotteau-Lelievre [a], Didier Monte [a], Laurent Coutte [a,c], Sébastien Mauen [b], Virginie Firlej [a], Cindy Degerny [a], Kathye Verreman [a]

[a] *UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, CNRS/Université de Lille I/Université de Lille II/Institut Pasteur de Lille, BP 447, 1 rue Calmette, 59021 Lille Cedex, France*
[b] *Laboratoire de Virologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, CP 614, 808 route de Lennik, 1070 Brussels, Belgium*
[c] *Laboratoire de Biologie Animale Bâtiment 470, Faculté des Sciences d'Orsay, Université de Paris Sud, 91405 Orsay, France*

Received 12 January 2006; received in revised form 7 February 2006; accepted 7 February 2006
Available online 3 March 2006

Abstract

The PEA3 group is composed of three highly conserved Ets transcription factors: Erm, Er81, and Pea3. These proteins regulate transcription of multiple genes, and their transactivating potential is affected by post-translational modifications. Among their target genes are several matrix metalloproteases (MMPs), which are enzymes degrading the extracellular matrix during normal remodelling events and cancer metastasis. In fact, PEA3-group genes are often over-expressed in different types of cancers that also over-express these MMPs and display a disseminating phenotype. Experimental regulation of the synthesis of PEA3 group members influences the metastatic process. This suggests that these factors play a key role in metastasis.
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Metastasis; Transcription factor; Ets; PEA3 group; MMP

Contents

1. Introduction . . . 80
2. The PEA3 group . . . 80
3. PEA3-dependent transcriptional activity is regulated by post-translational modifications . . . 80
4. Role in normal embryonic and adult tissues . . . 80
5. Role in the metastatic process . . . 81
   5.1. In the oral tract . . . 81
   5.2. In the lungs . . . 82
   5.3. In the gastrointestinal tract . . . 82
   5.4. In gynaecological tissues . . . 82
6. The PEA3 group members and chromosomal rearrangement in cancer . . . 83
Acknowledgements . . . 84
References . . . 84

* Corresponding author. UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, CNRS/Université de Lille I/Université de Lille II/Institut Pasteur de Lille, BP 447, 1 rue Calmette, 59021 Lille Cedex, France. Tel.: +33 3 20 87 11 17; fax: +33 3 20 87 11 11.
E-mail address: yvan.delaunoit@ibl.fr (Y. de Launoit).

0304-419X/$ - see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bbcan.2006.02.002

1. Introduction

The *ets* genes encode a family of transcription factors of about 30 members. In most cases these are transcriptional activators, and in some rare cases, transcriptional repressors [1]. These transcription factors share a conserved 85-amino-acid motif, the ETS-domain, which is the signature of the family [1]. This domain enables the transcription factors to bind to a 9-nucleotide DNA sequence with the central consensus core 5′-GGAA/T-3′: the "ETS Binding Site" (EBS) [2]. The sequences flanking this central motif determine the binding specificity for each Ets family member [3,4]. Phylogenetically, the members of this transcription factor family are classified in groups according to the sequence of the ETS-domain, the position of this domain in the protein, and the presence of other specific conserved functional domains. The 13 groups identified are: ETS, TEL, YAN, SPI, ERG, PEA3, ELF, DETS4, ELK, GABP, ER71, ERF, and ESE [5].

2. The PEA3 group

The PEA3 group is composed of three members: Erm (also called Etv5) [6–8], Er81 (also called Etv1) [9–11], and Pea3 (also called E1Af or Etv4) [12–14], which share the highly conserved ETS-domain and two conserved transactivating domains, one located at the amino-terminus (AD) and the other at the carboxy-terminus (Ct) [15]. The human and mouse *er81, erm*, and *pea3* genes are structured in 13–14 exons distributed over more than 15 kbp of genomic DNA [16–18]. In the human genome, *erm* is located on chromosome 3 at position 3q27–29 [7,17], *e1af* on chromosome 17 at position 17q21 [19], and *er81* on chromosome 7 at position 7q21 [10].

In most of the cases, the PEA3 group members are described as transcriptional activators [11,12,20] with two transcriptional domains (AD and Ct), which are able to synergize. Negative regulatory domains encompass the transactivating domains in Pea3 and Erm [20,21]. Recent data on Erm and Pea3 suggest that the Ct domain also plays a role in the stability of the protein [22,23].

As for the other Ets transcription factors, it is unlikely that these transcription factors alone regulate transcription of their target genes. They in fact interact with transcriptional partners. Thus, Erm associates with the basal transcription complex proteins $TAF_{II}60$, TBP and $TAF_{II}40$ [24]. Erm also interacts with the androgen receptor, which leads to the repression of Ets-mediated transactivation [25]. One of the AP1 complex proteins, c-Jun, also interacts physically with the Ct domain of Erm to synergistically enhance transcriptional activation [7]. Furthermore, Er81 [26], Pea3 [27] and Erm (unpublished) interact with the p300 transcriptional co-activator, an enzyme with histone acetyltransferase activity (HAT). Er81 also interacts with the p300 associated partner P/CAF [26]. More recently, the SUMO conjugating enzyme Ubc9 was also shown to interact with Er81 [28] and Erm [29]. Interestingly, Pea3 has recently been shown to interact with the USF-1 transcription factor to synergistically regulate expression of the *bax* gene without directly binding to DNA [30].

3. PEA3-dependent transcriptional activity is regulated by post-translational modifications

Like many transcription factors, the PEA3 group members undergo post-translational modification that regulates their transactivation capacity. The most common modification found in the PEA3 group proteins is phosphorylation, as they are targets of the MAPK pathway including Ras, Raf-1, MEK, ERK-1, and ERK-2. Phosphorylation of specific serine and threonine residues generally increases the transactivation capacity of the PEA3 group member [31–34]. Moreover, Erm and Er81 are also phosphorylated through the PKA-mediated pathway [16,31,35,36].

Post-translational modifications at lysines also play crucial roles in the regulation of transcription, generally on histone proteins but also on transcription factors. For instance, activation of p300 through the Ras/MAPK pathway results in Er81 acetylation and this causes the transcriptional activity of this factor to increase [26]. Recently, Er81 and Erm have been shown to undergo another lysine modification; i.e. SUMO modification via the Ubc9 SUMO conjugating enzyme [28]; this modification leads to inhibition of Erm-dependent transactivation [29]. Erm and Pea3 are also conjugated to ubiquitin and degraded via the ubiquitin–proteasome pathway, which probably regulates the activity of these transcription factors [22,23] (see Fig. 1).

4. Role in normal embryonic and adult tissues

These transcription factors are expressed in multiple developing mouse organs derived from all three germ layers, such as lung, salivary glands, kidney, gut... Yet, when co-expressed in the same organ, they are generally present in different tissues. The general expression pattern for these three genes during branching morphogenesis is as follows: *erm* is expressed in the distal portion of epithelial buds, *pea3* in a more restricted region of the growing epithelium, and *er81* in the adjacent mesenchyme 1 [8,37]. This pattern is not restricted to branching morphogenesis but is also found during conversion of mesenchyme to epithelium (e.g., in developing kidneys) and during the development of the nervous system. In fact, motor and sensory neurons innervating the same muscle express the same PEA3 group member, indicating the requirement of a certain expression pattern for functional circuit formation [38,39].

In adult mouse tissues *erm*, and to a lesser extent *er81*, are almost ubiquitously expressed. High-level *erm* expression is observed in brain, colon, testis, and lung, while *er81* is expressed to a high level in brain, lung and heart [6,8]. As for mouse *pea3* mRNA, it shows a more restricted distribution than the two other members, being found mainly in the brain [8] and epididymis [12]. These expression profiles have been confirmed in human tissues [6,11]. In the male mouse, Erm is required for spermatogonial stem cell self-renewal [40] and Pea3 for ejaculation [41]. Altogether, these data suggest that expression

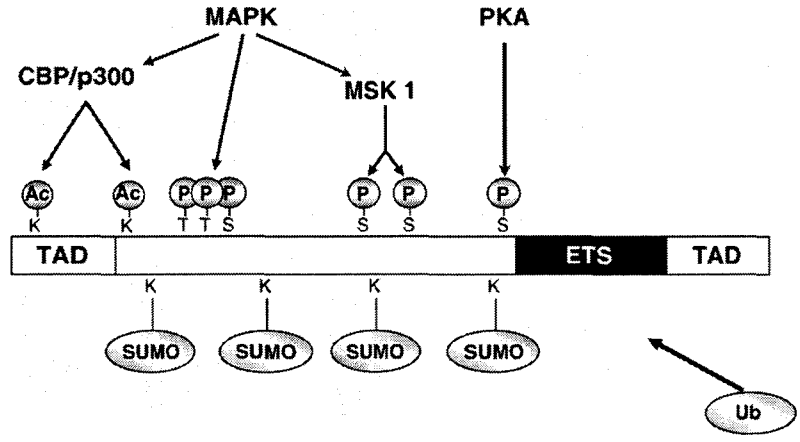


Fig. 1. Schematic representation of a "generic" PEA3 group prototype with its different functional domains and regulating pathways. The ETS-domain is responsible for DNA-binding. The two TAD regions are the transcriptional activation domains. Post-translational modifications up-regulating (above the protein) or down-regulating (below the protein) the transcriptional activity of the PEA3 group members on their target gene are also shown. Ac: acetyl group; P: phosphate group; SUMO: sumo peptide; Ub: ubiquitin. Except when indicated below, all the modification sites are conserved among the three PEA3 group members. So far, ubiquitination site(s) has (have) not been established, but Pea3 [22] and Erm [23] are ubiquitinylated. Mapping of CBP/p300-dependent acetylation sites has been performed only for Er81 [26]. However, activation by these co-activators has been shown for Pea3 [27] and Erm (J.L. Baert, unpublished data). Note that the second acetylation site is not conserved in PEA3. Mapping of SUMO sites has been performed for only Erm [29]. However, SUMO modification has also been shown for Er81 [28]. The unique PKA-dependent phosphorylation site has been mapped to the edge of the ETS-domain of mammalian Erm and Er81 but it is absent from mammalian Pea3 [36,104]. The three mammalian PEA3 members are phosphorylated and activated by MAPK [31–33], but precise mapping of MAPK-dependent phosphorylation sites has been performed only for Er81 at position S_{94}, T_{139}, T_{143} and S_{146}. Transcriptional activation of Er81 is enhanced also by a MAPK-stimulated protein kinase, MSK1 [104].

of the PEA3 group members is involved in multiple biological events.

5. Role in the metastatic process

As described above, the PEA3 group factors are expressed during remodelling events, cell differentiation and proliferation. It is thus of interest to know which genes they target. Many papers report their involvement in the transcriptional regulation of matrix metalloprotease enzymes (MMP). These latter are involved in degrading the extracellular matrix to permit tissue rearrangement, a common phenomenon in cancer metastasis. In reporter assay experiments, the PEA3 group members enhance transcription from different MMP promoters, such as the human stromelysin-1, the type I and IV collagenases [42] and matrilysin [43] promoters. In vivo, ectopic expression of Er81 in the normal mouse mammary gland induces up-regulation of the urokinase plasminogen activator gene [44]. They can also positively regulate the promoters of the genes coding for vimentin [45], the intercellular adhesion molecule ICAM-1 [46], osteopontin [47] and cyclooxygenase-2 [48] genes. This ability to enhance such promoters suggests that they could play a role in tumorigenesis. In fact, PEA3-overe-xpressing cell lines display a high metastasis potential correlated with high expression of several MMPs [49–52], whereas *pea3* knock-down reduces MMP-1 and MMP-9 expression [53]. Below, we summarize current knowledge of the roles of the PEA3 group members in cancers of different origins (see Fig. 2). Table 1 summarizes the clinical or experimental studies (described below) demonstrating the correlation between PEA3 group member expression and metastasis.

5.1. In the oral tract

Pea3 is highly expressed in squamous carcinoma cell lines which are of highly invasive and express high levels of type I

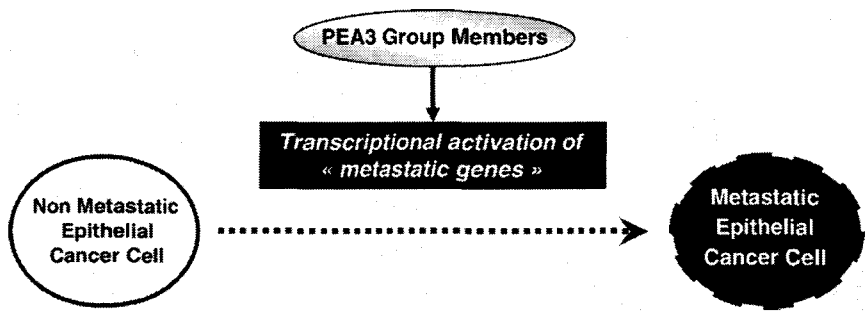


Fig. 2. Model for the roles of the PEA3 group members in turning on the metastatic phenotype of epithelial cancer cells.

Table 1
Correlation of PEA3 group member expression and metastasis or bad prognosis in human cancers

Tissue	PEA3 members	References	
		Cell lines	Clinical studies
Oral tract	Pea3	[51,53,54]	[49,51,55]
Lung (NSCLC)	Pea3	[56,60]	[56,60]
Stomach	Pea3	[61,62]	[61][a]
Liver	Pea3		[63]
Colon	Pea3	[27,66]	[43,66–68]
Ovary	Pea3		[70,71]
Breast	Pea3/Erm	[50,86]	[71,79,80,90]
Endometrium	Erm		[91]

[a] The expression of ER81 or ERM was not correlated with survival or the expression of MMPs analyzed in this clinical study (100 gastric cancers).

and IV collagenases (respectively MMP-1 and MMP-9) [49]. Moreover, cells transfected with *pea3* antisense exhibit decreased expression of these two MMPs [53]. This experiment is crucial as it demonstrates for the first time that down-regulation of endogenous *pea3* expression causes transcriptional regulation of a target gene. In these cells, Pea3-induced MMP expression is also stimulated by the hepatocyte growth factor (HGF) [54]. In in vivo tumors, *pea3* mRNA is detected by in situ hybridisation in the majority of the invasive squamous cell carcinoma specimens studied, and increased expression of *pea3* correlates with nodal metastasis [51]. It has also been recently demonstrated in these cells that exogenous Pea3 is able to up-regulate expression of *MT1-MMP*, a trans-membrane MMP that activates the proMMP-2, and thus indirectly activates MMP-2 [55]. For this experiment, and in general for each result presented in this review in which a specific PEA3 group member is exogenously over-expressed, we can hypothesise that the identified target genes are not only PEA3 target genes, but more general Ets target genes, since all 27 mammalian Ets family members possess a conserved ETS-domain.

5.2. In the lungs

In contrast to *pea3*, both *erm* and *er81* are highly expressed in the normal adult lung [6,8,11]. Interestingly, Pea3 is currently the only member of the PEA3 group to have been implicated in the lung cancer process. In non-small-cell lung cancers (NSCLC) which are characterized by cell invasiveness, *pea3* mRNA is found in the primary tumors and not in the surrounding normal tissues. Ectopic expression of *pea3* in NSCLC cells significantly increases in vitro cell motility and invasion [56].

Previous papers described the involvement of β1,4-galactosyltransferase I (GalT I) in cellular processes such as cell migration [57]. Although little is known on the role of GalT I in metastasis, several studies have shown that its increased expression at the cell surface is specific to highly metastatic cell lines [58,59]. Recently, expression of *pea3* and *GalT I* has been found to correlate with a highly metastatic phenotype in lung cancer cells [60].

5.3. In the gastrointestinal tract

The PEA3 group members are also expressed. In the case of gastric cancer, the level of *pea3* mRNA correlates significantly with tumor invasiveness and recurrence, indicating a bad prognosis for patient survival [61]. In this study, moreover, a correlation was found in cancer tissues between *matrilysin* (MMP-7), a marker of invasiveness in gastric cancer [62], and the level of *pea3* mRNA. *MMP-7* and *pea3* co-localize at the "invasive front" and, when endogenous *pea3* expression is knocked-down, *MMP-7* expression is dramatically decreased, and cells are less invasive in vitro. In contrast, the expression of *er81* or *erm* was not correlated with survival or the expression of MMPs, thus suggesting that Pea3 is the specific PEA3 group member that activates the target matrilysin gene in gastric cancer.

In human hepatocellular carcinoma (HCC), the *interleukin IL-8*, which is a potent angiogenic factor, is constitutively induced by Pea3 in association with the transcription factor AP-1. Moreover, *pea3* and *IL-8* are both expressed in HCC, and not in the surrounding tissues, thus indicating a potential role of Pea3 in IL-8-induced hepatoma tumorigenesis [63].

Promoters of several *MMP* genes involved in human colorectal adenocarcinomas possess specific DNA binding sites for the PEA3 group members. This is the case of the genes coding for *meprin beta* [64] and *matrilysin* (for a review, see [65]); in the latter case, Pea3 co-operates with AP1. The β-*catenin* gene is also regulated by the PEA3 group members in mouse colon tumor cells, since both *pea3* and *erm* are co-expressed in these cells and they both, in synergy with β-catenin, up-regulate the *MMP-7* promoter, thus finally contributing to tumorigenesis [43]. In colorectal tumors, *pea3* expression also correlates significantly with invasion, metastasis and advanced tumor stages, and is co-expressed with the β-*catenin*, *MMP-1* and *MMP-7* genes; these two latter genes are down-regulated by *pea3* knock-down [66]. In this experiment, HT-29 colon cancer cells were transfected with antisense human *pea3* in order to specifically target the endogenous gene. Moreover, recent immunochemistry studies also demonstrate that *pea3* expression, in pre-malignant tissues such as colorectal adenomas, correlates with over-expression not only of *MMP*s, but also of *COX-2* and *iNos* genes coding for two factors involved in tumor angiogenesis [27,67,68]. Altogether, these data suggest that Pea3, in association with β-catenin, plays a role in colorectal tumor progression, by targeting specific key target genes.

5.4. In gynaecological tissues

These factors play important roles. The *er81* gene is weakly expressed in the human ovary and *erm* is not expressed in this organ. However, *erm* expression is found in human ovarian adenocarcinoma [6,11]. In the mouse ovary, only *erm* is expressed to low level [8]. In ovarian and endometrial cancer cell lines, exogenously expressed *er81* activates transcription of *Smad7*, which can participate in inhibition of the TGF-β signalling pathway with anti-proliferative effects [69]. Pea3 has

also been implicated in ovarian carcinoma, being expressed in the majority of carcinomas studied. Interestingly, intense *pea3* expression in the stroma is also detected in the vicinity of grade II and III tumors and it correlates with *MMP-2* expression within the carcinoma cells, thus, illustrating the dialogue between these two compartments. Expression of *pea3* also correlates with the expression of genes coding for MMP-1, EMMPRIN (an MMP inducer) and angiogenic factors such as bFGF, IL-8 and integrins [70,71].

The role of the PEA3 group members in normal and pathological mammary development has been extensively studied these last years. The corresponding genes are indeed expressed at different steps of mouse mammary gland development. During embryogenesis, they are highly expressed in the epithelial buds of the mammary gland [8], and after birth, *pea3* and *erm* mRNAs are detected throughout all stages of mammary gland development, whereas *er81* is present only in pubescent gland. During puberty, *pea3* and *erm* expression correlates with ductal elongation and branching [72]. Supporting this observation, normal murine mammary cells over-expressing the PEA3 group members show an increased capacity to form in vitro branching duct-like structures [72].

We have shown above that PEA3 group expression in cancers of the respiratory and gastrointestinal tracts correlates strongly with a bad prognosis for the patient. In mammary cancer, expression of the HER2/Neu growth factor receptor, whose expression correlates with bad prognosis, led to the suggestion that it might be co-expressed with the transcription factors of the PEA3 group. This relationship has been widely studied. The first experimental evidence was the over-expression of *pea3* in *neu*-induced mouse mammary primary adenocarcinomas, as well as the corresponding metastatic lesions [73]. The *er81* and *erm* genes are also expressed in such tumors [74]. In contrast, inhibition of the transcriptional activity of the PEA3 group members by expressing a dominant-negative form in these transgenic mice delays the onset of tumorigenesis and reduces tumor progression [75]. It should be noted here, however, that this dominant-negative form might act not only on PEA3 target genes, but also on Ets target genes, as this chimera consists of the ETS- and the Ct-domains of Pea3 fused to the *Drosophila* Engrailed repression domain. In human breast cell lines, all the three PEA3 group members are highly expressed, especially in estradiol receptor negative cells, which display an aggressive phenotype in nude mice [76]. Although over-expression of HER2/neu is observed only in 20–30% of all breast carcinomas [77], *pea3* expression was, in a series of 74 patients, observed in more than 90% of HER2/neu-positive breast carcinomas, and in less than 50% of the HER2/neu-negative ones [78]. Moreover, *pea3* and *neu* expression correlates positively with invasive breast tumors [78,79]. However, provocative data concerning *pea3* expression in human breast carcinomas show better overall survival when this factor is present [80]. This might be due in part of the ethnic origin of the patients (they were Japanese). Yet, in a French study performed on 130 patients, expression of this factor was characterized as a tumor aggressiveness marker and not as a prognostic factor for overall survival [79]. Whatever the case may be, the molecular mechanism by which Pea3 regulates the *HER2/neu* gene operates at the transcriptional level, since the factor binds to the promoter [81] and, when exogenously expressed, enhances reporter gene expression from a plasmid containing this promoter [78]. Moreover, HER2/neu is able to enhance Pea3 transactivation through the ERK and SAPK/JNK pathways [78,82] and can thus lead to its own transactivation. Over-expressed Pea3 also enhances transcription of other genes involved in mammary metastasis; i.e., the *osteopontin* in rat mammary cell lines [47], and the *Muc4/sialomucin* complex genes in HC11 normal mouse mammary cells [83], *cyclooxygenase-2* gene in human breast epithelial cell lines 184B5 and 184B5/HER [84]. HER2/neu-induced activation also targets Er81 through the Ras–Raf–MAPK pathway, thus increasing the transcriptional activity of this transcription factor on different target genes such as *MMP-1*, the *Smad7* gene coding for the TGFbeta inhibitor and the telomerase reverse transcriptase gene *hTERT* [34,69,85]. Whatever the case may be, two provocative papers from the same group report that Pea3 can act on the *HER2/neu* promoter as a transcriptional repressor in specific mammary cancer cell lines [86,87]. These results seem to be restricted to the human mammary cell lines used in these experiments [86]; i.e., SK-BR-3 and MDA-MB-453 for HER-2/neu over-expressing cells and MDA-MB-435 for HER-2/neu low-expressing cells, whilst we have shown, for example, that in MCF-7 cells expressing low levels of *HER-2/neu*, the expression of the PEA3 group members induces HER-2/neu promoter activity (J.L. Baert; personal communication). Although the authors of this 6-year-old study proposed to increase Pea3 expression in HER-2/neu over-expressing tumor patients [86], we suggest first precisely checking for the Pea3-responsiveness of the tumor cells. Similar "contradictory" observations have been made on other systems. For example, normal human fibroblasts were found to undergo senescence in response to Ras or its downstream effectors, the two Ets proteins Ets-1 and Ets-2, but dermal fibroblasts from a patient carrying mutations in the INK4a/ARF tumor suppressor locus did not [88,89]. This highlights the importance of the genetic context of the tumor. In the case of mammary cell lines, other genetic alterations might explain the different results observed. Here again, *pea3* was exogenously over-expressed and could thus probably alter not only Pea3-dependent pathways, but probably also Ets transcription factor pathways. These are maybe less sensitive to Pea3, but they might be activated by high levels of this protein. Finally, recent studies have demonstrated that *erm* expression correlates with invasiveness and poor prognosis in breast cancer [90] and with invasiveness in endometrial carcinoma [91]. The functional role of this transcription factor in these cancers should be examined in more details.

6. The PEA3 group members and chromosomal rearrangement in cancer

To be exhaustive on the roles of the PEA3 group members in human cancer, we should mention here that in a very few cases, genes of these transcription factors are rearranged. For example Ewing's sarcoma, which is an aggressive cancer predominantly

affecting children and young adults, results from a chromosomal translocation between an *ets* gene and the *ews* RNA-binding protein gene. Two members of the *ets* gene family are currently described to be fused with *ews*: *fli-1* in 85% of cases [92] and *erg* in 14% of cases [93]. However, *er81* [10], *pea3* [94,95], and *fev* [96] have also been found to form a fusion protein containing the amino-terminal transactivation domain of EWS and the ETS DNA-binding domain from the *ets* gene (for a review, see [97]). These chimeric Ews-Ets proteins display an increased potential to transactivate the promoters of Ets target genes as compared to the wild-type Ets proteins [98]. Moreover, due to the *ews* promoter, these chimeras also display ubiquitous high expression, thus suggesting that in Ewing's sarcoma, Ets-target genes could be up-regulated by the high amount of chimera. However, although Ews-Er81 is able in vitro to transactivate the *MMP-1* promoter in association with p300 and c-Jun [99], the opposite occurs in vivo. Ewing's sarcoma expressing *ews-pea3* does not express *MMP-1* or *MMP-3*, probably because the chimera has lost access to EBS [100]. Both Ews-Er81 and Ews-Pea3 can also increase the transcription of *hTERT*, a catalytic subunit of telomerase which activates telomerase and thus induces cell immortalization [101,102].

Finally, both *er81 (etv1)* and *erg* have been identified as rearranged in prostate cancers, with fusion of the 5′-untranslated region of the *TMPRSS2* gene to *er81* or *erg* with outlier expression. In fact, 23 of the 29 prostate cancer samples studied were found to harbour rearrangements in *erg* or *er81*, and the androgen-responsive promoter elements of *TMPRSS2* mediate over-expression of Ets-family members in these cells. These very recent data have implications for the molecular diagnosis and treatment of prostate cancer [103].

In conclusion, the PEA3 group members are functional transcription factors of the Ets family, playing a role in human cancer. In particular, they regulate the expression of target genes involved in metastasis.

Acknowledgements

This work was carried out thanks to grants awarded by the "Centre National de la Recherche Scientifique" (France), the "Institut Pasteur de Lille", the "Association pour la Recherche contre le Cancer" (France), the "Ligue Nationale Contre le Cancer" (Comité Nord, France), ≪the Conseil Régional Nord/Pas-de-Calais≫ (France, the European Regional Developmental Fund, the ≪ Université de Lille I ≫ (France), the "Fonds National de la Recherche Scientifique" (FNRS, Belgium) and the "Action de Recherche Concertée (Communauté Française de Belgique)" (Belgium).

References

[1] B.J. Graves, J.M. Petersen, Specificity within the ets family of transcription factors, Adv. Cancer Res. 75 (1998) 1–55.
[2] A.D. Sharrocks, A.L. Brown, Y. Ling, P.R. Yates, The ETS-domain transcription factor family, Int. J. Biochem. Cell Biol. 29 (1997) 1371–1387.
[3] A.D. Sharrocks, The ETS-domain transcription factor family, Nat. Rev., Mol. Cell Biol. 2 (2001) 827–837.
[4] T. Oikawa, T. Yamada, Molecular biology of the Ets family of transcription factors, Gene 303 (2003) 11–34.
[5] V. Laudet, C. Hanni, D. Stehelin, M. Duterque-Coquillaud, Molecular phylogeny of the ETS gene family, Oncogene 18 (1999) 1351–1359.
[6] D. Monte, J.L. Baert, P.A. Defossez, Y. de Launoit, D. Stehelin, Molecular cloning and characterization of human ERM, a new member of the Ets family closely related to mouse PEA3 and ER81 transcription factors, Oncogene 9 (1994) 1397–1406.
[7] K. Nakae, K. Nakajima, J. Inazawa, T. Kitaoka, T. Hirano, ERM, a PEA3 subfamily of Ets transcription factors, can cooperate with c-Jun, J. Biol. Chem. 270 (1995) 23795–23800.
[8] A. Chotteau-Lelievre, X. Desbiens, H. Pelczar, P.A. Defossez, Y. de Launoit, Differential expression patterns of the PEA3 group transcription factors through murine embryonic development, Oncogene 15 (1997) 937–952.
[9] T.A. Brown, S.L. McKnight, Specificities of protein–protein and protein–DNA interaction of GABP alpha and two newly defined ets-related proteins, Genes Dev. 6 (1992) 2502–2512.
[10] I.S. Jeon, J.N. Davis, B.S. Braun, J.E. Sublett, M.F. Roussel, C.T. Denny, D.N. Shapiro, A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1, Oncogene 10 (1995) 1229–1234.
[11] D. Monte, L. Coutte, J.L. Baert, I. Angeli, D. Stehelin, Y. de Launoit, Molecular characterization of the ets-related human transcription factor ER81, Oncogene 11 (1995) 771–779.
[12] J.H. Xin, A. Cowie, P. Lachance, J.A. Hassell, Molecular cloning and characterization of PEA3, a new member of the Ets oncogene family that is differentially expressed in mouse embryonic cells, Genes Dev. 6 (1992) 481–496.
[13] F. Higashino, K. Yoshida, Y. Fujinaga, K. Kamio, K. Fujinaga, Isolation of a cDNA encoding the adenovirus E1A enhancer binding protein: a new human member of the ets oncogene family, Nucleic Acids Res. 21 (1993) 547–553.
[14] L.S. Friedman, E.A. Ostermeyer, E.D. Lynch, C.I. Szabo, L.A. Anderson, P. Dowd, M.K. Lee, S.E. Rowell, J. Boyd, M.C. King, The search for BRCA1, Cancer Res. 54 (1994) 6374–6382.
[15] Y. de Launoit, J.L. Baert, A. Chotteau, D. Monte, P.A. Defossez, L. Coutte, H. Pelczar, F. Leenders, Structure–function relationships of the PEA3 group of Ets-related transcription factors, Biochem. Mol. Med. 61 (1997) 127–135.
[16] L. Coutte, D. Monte, K. Imai, L. Pouilly, F. Dewitte, M. Vidaud, J. Adamski, J.L. Baert, Y. de Launoit, Characterization of the human and mouse ETV1/ER81 transcription factor genes: role of the two alternatively spliced isoforms in the human, Oncogene 18 (1999) 6278–6286.
[17] D. Monte, L. Coutte, F. Dewitte, P.A. Defossez, M. Le Coniat, D. Stehelin, R. Berger, Y. de Launoit, Genomic organization of the human ERM (ETV5) gene, a PEA3 group member of ETS transcription factors, Genomics 35 (1996) 236–240.
[18] L. Coutte, D. Monte, J. Baert, Y. de Launoit, Genomic organization of the human e1af gene, a member of Ets transcription factors, Gene 240 (1999) 201–207.
[19] C. Desmaze, F. Brizard, C. Turc-Carel, T. Melot, O. Delattre, G. Thomas, A. Aurias, Multiple chromosomal mechanisms generate an EWS/FLI1 or an EWS/ERG fusion gene in Ewing tumors, Cancer Genet. Cytogenet. 97 (1997) 12–19.
[20] M.P. Laget, P.A. Defossez, O. Albagli, J.L. Baert, F. Dewitte, D. Stehelin, Y. de Launoit, Two functionally distinct domains responsible for transactivation by the Ets family member ERM, Oncogene 12 (1996) 1325–1336.
[21] B.B. Bojovic, J.A. Hassell, The PEA3 Ets transcription factor comprises multiple domains that regulate transactivation and DNA binding, J. Biol. Chem. 276 (2001) 4509–4521.
[22] A. Takahashi, F. Higashino, M. Aoyagi, K. Yoshida, M. Itoh, M. Kobayashi, Y. Totsuka, T. Kohgo, M. Shindoh, E1AF degradation by a ubiquitin-proteasome pathway, Biochem. Biophys. Res. Commun. 327 (2005) 575–580.
[23] J.-L. Baert, C. Beaudoin, D. Monté, C. Degerny, S. Mauën, Y. de Launoit, ERM transcription factor is degraded by the 26S proteasome pathway regulating its transcription-enhancing activity. (submitted for publication).

[24] P.A. Defossez, J.L. Baert, M. Monnot, Y. de Launoit, The ETS family member ERM contains an alpha-helical acidic activation domain that contacts TAFII60, Nucleic Acids Res. 25 (1997) 4455–4463.
[25] J. Schneikert, H. Peterziel, P.A. Defossez, H. Klocker, Y. Launoit, A.C. Cato, Androgen receptor–Ets protein interaction is a novel mechanism for steroid hormone-mediated down-modulation of matrix metalloproteinase expression, J. Biol. Chem. 271 (1996) 23907–23913.
[26] A. Goel, R. Janknecht, Acetylation-mediated transcriptional activation of the ETS protein ER81 by p300, P/CAF, and HER2/Neu, Mol. Cell. Biol. 23 (2003) 6243–6254.
[27] Y. Liu, G.L. Borchert, J.M. Phang, Polyoma enhancer activator 3, an ets transcription factor, mediates the induction of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in colorectal cancer cells, J. Biol. Chem. 279 (2004) 18694–18700.
[28] C.B. Gocke, H. Yu, J. Kang, Systematic identification and analysis of mammalian small ubiquitin-like modifier substrates, J. Biol. Chem. 280 (2005) 5004–5012.
[29] C. Degerny, D. Monte, C. Beaudoin, E. Jaffray, L. Portois, R.T. Hay, Y. de Launoit, J.L. Baert, SUMO modification of the Ets-related transcription factor ERM inhibits its transcriptional activity, J. Biol. Chem. 280 (2005) 24330–24338.
[30] V. Firlej, B. Bocquet, X. Desbiens, Y. de Launoit, A. Chotteau-Lelievre, Pea3 transcription factor cooperates with USF-1 in regulation of the murine bax transcription without binding to an Ets-binding site, J. Biol. Chem. 280 (2005) 887–898.
[31] R. Janknecht, D. Monte, J.L. Baert, Y. de Launoit, The ETS-related transcription factor ERM is a nuclear target of signaling cascades involving MAPK and PKA, Oncogene 13 (1996) 1745–1754.
[32] R. Janknecht, Analysis of the ERK-stimulated ETS transcription factor ER81, Mol. Cell. Biol. 16 (1996) 1550–1556.
[33] R.C. O'Hagan, R.G. Tozer, M. Symons, F. McCormick, J.A. Hassell, The activity of the Ets transcription factor PEA3 is regulated by two distinct MAPK cascades, Oncogene 13 (1996) 1323–1333.
[34] D.G. Bosc, B.S. Goueli, R. Janknecht, HER2/Neu-mediated activation of the ETS transcription factor ER81 and its target gene MMP-1, Oncogene 20 (2001) 6215–6224.
[35] L.A. Brown, A. Amores, T.F. Schilling, T. Jowett, J.L. Baert, Y. de Launoit, A.D. Sharrocks, Molecular characterization of the zebrafish PEA3 ETS-domain transcription factor, Oncogene 17 (1998) 93–104.
[36] J.L. Baert, C. Beaudoin, L. Coutte, Y. de Launoit, ERM transactivation is up-regulated by the repression of dNA binding after the PKA phosphorylation of a consensus site at the edge of the ETS domain, J. Biol. Chem. 277 (2002) 1002–1012.
[37] A. Chotteau-Lelievre, P. Dolle, V. Peronne, L. Coutte, Y. de Launoit, X. Desbiens, Expression patterns of the Ets transcription factors from the PEA3 group during early stages of mouse development, Mech. Dev. 108 (2001) 191–195.
[38] J.H. Lin, T. Saito, D.J. Anderson, C. Lance-Jones, T.M. Jessell, S. Arber, Functionally related motor neuron pool and muscle sensory afferent subtypes defined by coordinate ETS gene expression, Cell 95 (1998) 393–407.
[39] S. Arber, D.R. Ladle, J.H. Lin, E. Frank, T.M. Jessell, ETS gene Er81 controls the formation of functional connections between group Ia sensory afferents and motor neurons, Cell 101 (2000) 485–498.
[40] C. Chen, W. Ouyang, V. Grigura, Q. Zhou, K. Carnes, H. Lim, G.Q. Zhao, S. Arber, N. Kurpios, T.L. Murphy, A.M. Cheng, J.A. Hassell, V. Chandrashekar, M.C. Hofmann, R.A. Hess, K.M. Murphy, ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche, Nature 436 (2005) 1030–1034.
[41] M.A. Laing, S. Coonrod, B.T. Hinton, J.W. Downie, R. Tozer, M.A. Rudnicki, J.A. Hassell, Male sexual dysfunction in mice bearing targeted mutant alleles of the PEA3 ets gene, Mol. Cell. Biol. 20 (2000) 9337–9345.
[42] F. Higashino, K. Yoshida, T. Noumi, M. Seiki, K. Fujinaga, Ets-related protein E1A-F can activate three different matrix metalloproteinase gene promoters, Oncogene 10 (1995) 1461–1463.
[43] H.C. Crawford, B. Fingleton, M.D. Gustavson, N. Kurpios, R.A. Wagenaar, J.A. Hassell, L.M. Matrisian, The PEA3 subfamily of Ets transcription factors synergizes with beta-catenin-LEF-1 to activate matrilysin transcription in intestinal tumors, Mol. Cell. Biol. 21 (2001) 1370–1383.
[44] S. Netzer, F. Leenders, P. Dumont, J.L. Baert, Y. de Launoit, Ectopic expression of the ets transcription factor ER81 in transgenic mouse mammary gland enhances both urokinase plasminogen activator and stromelysin-1 transcription, Transgenic Res. 11 (2002) 123–131.
[45] J.H. Chen, C. Vercamer, Z. Li, D. Paulin, B. Vandenbunder, D. Stehelin, PEA3 transactivates vimentin promoter in mammary epithelial and tumor cells, Oncogene 13 (1996) 1667–1675.
[46] Y. de Launoit, M. Audette, H. Pelczar, S. Plaza, J.L. Baert, The transcription of the intercellular adhesion molecule-1 is regulated by Ets transcription factors, Oncogene 16 (1998) 2065–2073.
[47] M. El-Tanani, A. Platt-Higgins, P.S. Rudland, F.C. Campbell, Ets gene PEA3 cooperates with beta-catenin-Lef-1 and c-Jun in regulation of osteopontin transcription, J. Biol. Chem. 279 (2004) 20794–20806.
[48] L.R. Howe, H.C. Crawford, K. Subbaramaiah, J.A. Hassell, A.J. Dannenberg, A.M. Brown, PEA3 is up-regulated in response to Wnt1 and activates the expression of cyclooxygenase-2, J. Biol. Chem. 276 (2001) 20108–20115.
[49] M. Shindoh, F. Higashino, M. Kaya, M. Yasuda, K. Funaoka, M. Hanzawa, K. Hida, T. Kohgo, A. Amemiya, K. Yoshida, K. Fujinaga, Correlated expression of matrix metalloproteinases and ets family transcription factor E1A-F in invasive oral squamous-cell-carcinoma-derived cell lines, Am. J. Pathol. 148 (1996) 693–700.
[50] M. Kaya, K. Yoshida, F. Higashino, T. Mitaka, S. Ishii, K. Fujinaga, A single ets-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells, Oncogene 12 (1996) 221–227.
[51] K. Hida, M. Shindoh, K. Yoshida, A. Kudoh, K. Furaoka, T. Kohgo, K. Fujinaga, Y. Totsuka, Expression of E1AF, an ets-family transcription factor, is correlated with the invasive phenotype of oral squamous cell carcinoma, Oral Oncol. 33 (1997) 426–430.
[52] H. Habelhah, F. Okada, M. Kobayashi, K. Nakai, S. Choi, J. Hamada, T. Moriuchi, M. Kaya, K. Yoshida, K. Fujinaga, M. Hosokawa, Increased E1AF expression in mouse fibrosarcoma promotes metastasis through induction of MT1-MMP expression, Oncogene 18 (1999) 1771–1776.
[53] K. Hida, M. Shindoh, M. Yasuda, M. Hanzawa, K. Funaoka, T. Kohgo, A. Amemiya, Y. Totsuka, K. Yoshida, K. Fujinaga, Antisense E1AF transfection restrains oral cancer invasion by reducing matrix metalloproteinase activities, Am. J. Pathol. 150 (1997) 2125–2132.
[54] M. Hanzawa, M. Shindoh, F. Higashino, M. Yasuda, N. Inoue, K. Hida, M. Ono, T. Kohgo, M. Nakamura, K. Notani, H. Fukuda, Y. Totsuka, K. Yoshida, K. Fujinaga, Hepatocyte growth factor upregulates E1AF that induces oral squamous cell carcinoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase genes, Carcinogenesis 21 (2000) 1079–1085.
[55] Y. Izumiyama, Y. Ohiro, F. Higashino, K. Yoshida, K. Taguchi, S. Todo, T. Kohgo, Y. Totsuka, M. Shindoh, E1AF expression is closely correlated with malignant phenotype of tongue squamous cell carcinoma through activation of MT1-MMP gene promoters, Oncol. Rep. 13 (2005) 715–720.
[56] H. Hiroumi, H. Dosaka-Akita, K. Yoshida, M. Shindoh, T. Ohbuchi, K. Fujinaga, M. Nishimura, Expression of E1AF/PEA3, an Ets-related transcription factor in human non-small-cell lung cancers: its relevance in cell motility and invasion, Int. J. Cancer 93 (2001) 786–791.
[57] P.A. Appeddu, B.D. Shur, Molecular analysis of cell surface beta-1,4-galactosyltransferase function during cell migration, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91 (1994) 2095–2099.
[58] M.B. Penno, A. Passaniti, R. Fridman, G.W. Hart, C. Jordan, S. Kumar, A.F. Scott, In vitro galactosylation of a 110-kDa glycoprotein by an endogenous cell surface galactosyltransferase correlates with the invasiveness of adrenal carcinoma cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 (1989) 6057–6061.
[59] A. Passaniti, G.W. Hart, Metastasis-associated murine melanoma cell surface galactosyltransferase: characterization of enzyme activity and identification of the major surface substrates, Cancer Res. 50 (1990) 7261–7271.
[60] X. Zhu, J. Jiang, H. Shen, H. Wang, H. Zong, Z. Li, Y. Yang, Z. Niu, W. Liu, X. Chen, Y. Hu, J. Gu, Elevated beta1,4-galactosyltransferase I in

highly metastatic human lung cancer cells. Identification of E1AF as important transcription activator, J. Biol. Chem. 280 (2005) 12503–12516.
[61] H. Yamamoto, S. Horiuchi, Y. Adachi, H. Taniguchi, K. Nosho, Y. Min, K. Imai, Expression of ets-related transcriptional factor E1AF is associated with tumor progression and over-expression of matrilysin in human gastric cancer, Carcinogenesis 25 (2004) 325–332.
[62] X.P. Liu, S. Kawauchi, A. Oga, K. Tsushimi, M. Tsushimi, T. Furuya, K. Sasaki, Prognostic significance of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) expression at the invasive front in gastric carcinoma, Jpn. J. Cancer Res. 93 (2002) 291–295.
[63] A. Iguchi, I. Kitajima, M. Yamakuchi, S. Ueno, T. Aikou, T. Kubo, K. Matsushima, N. Mukaida, I. Maruyama, PEA3 and AP-1 are required for constitutive IL-8 gene expression in hepatoma cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 279 (2000) 166–171.
[64] G.L. Matters, J.S. Bond, Expression and regulation of the meprin beta gene in human cancer cells, Mol. Carcinog. 25 (1999) 169–178.
[65] C.L. Wilson, L.M. Matrisian, Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions, Int. J. Biochem. Cell Biol. 28 (1996) 123–136.
[66] S. Horiuchi, H. Yamamoto, Y. Min, Y. Adachi, F. Itoh, K. Imai, Association of ets-related transcriptional factor E1AF expression with tumour progression and overexpression of MMP-1 and matrilysin in human colorectal cancer, J. Pathol. 200 (2003) 568–576.
[67] W.M. Boedefeld II, R. Soong, H. Weiss, R.B. Diasio, M.M. Urist, K.I. Bland, M.J. Heslin, E1A-F is overexpressed early in human colorectal neoplasia and associated with cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-7, Mol. Carcinog. 43 (2005) 13–17.
[68] K. Nosho, M. Yoshida, H. Yamamoto, H. Taniguchi, Y. Adachi, M. Mikami, Y. Hinoda, K. Imai, Association of Ets-related transcriptional factor E1AF expression with overexpression of matrix metalloproteinases, COX-2 and iNOS in the early stage of colorectal carcinogenesis, Carcinogenesis 26 (2005) 892–899.
[69] S.C. Dowdy, A. Mariani, R. Janknecht, HER2/Neu- and TAK1-mediated up-regulation of the transforming growth factor beta inhibitor Smad7 via the ETS protein ER81, J. Biol. Chem. 278 (2003) 44377–44384.
[70] B. Davidson, I. Goldberg, W.H. Gotlieb, J. Kopolovic, G. Ben-Baruch, R. Reich, PEA3 is the second Ets family transcription factor involved in tumor progression in ovarian carcinoma, Clin. Cancer Res. 9 (2003) 1412–1419.
[71] B. Davidson, I. Goldberg, L. Tell, S. Vigdorchik, M. Backelandt, A. Berner, G.B. Kristensen, R. Reich, J. Kopolovic, The clinical role of the PEA3 transcription factor in ovarian and breast carcinoma in effusions, Clin. Exp. Metastasis 21 (2004) 191–199.
[72] A. Chotteau-Lelievre, R. Montesano, J. Soriano, P. Soulie, X. Desbiens, Y. de Launoit, PEA3 transcription factors are expressed in tissues undergoing branching morphogenesis and promote formation of duct-like structures by mammary epithelial cells in vitro, Dev. Biol. 259 (2003) 241–257.
[73] M.S. Trimble, J.H. Xin, C.T. Guy, W.J. Muller, J.A. Hassell, PEA3 is overexpressed in mouse metastatic mammary adenocarcinomas, Oncogene 8 (1993) 3037–3042.
[74] C.K. Galang, W.J. Muller, G. Foos, R.G. Oshima, C.A. Hauser, Changes in the expression of many Ets family transcription factors and of potential target genes in normal mammary tissue and tumors, J. Biol. Chem. 279 (2004) 11281–11292.
[75] T.G. Shepherd, L. Kockeritz, M.R. Szrajber, W.J. Muller, J.A. Hassell, The pea3 subfamily ets genes are required for HER2/Neu-mediated mammary oncogenesis, Curr. Biol. 11 (2001) 1739–1748.
[76] J.L. Baert, D. Monte, E.A. Musgrove, O. Albagli, R.L. Sutherland, Y. de Launoit, Expression of the PEA3 group of ETS-related transcription factors in human breast-cancer cells, Int. J. Cancer 70 (1997) 590–597.
[77] T.P. Singleton, J.G. Strickler, Clinical and pathologic significance of the c-erbB-2 (HER-2/neu) oncogene, Pathol. Annu. 27 (Pt. 1) (1992) 165–190.
[78] C.C. Benz, R.C. O'Hagan, B. Richter, G.K. Scott, C.H. Chang, X. Xiong, K. Chew, B.M. Ljung, S. Edgerton, A. Thor, J.A. Hassell, HER2/Neu and the Ets transcription activator PEA3 are coordinately upregulated in human breast cancer, Oncogene 15 (1997) 1513–1525.
[79] I. Bieche, S. Tozlu, I. Girault, P. Onody, K. Driouch, M. Vidaud, R. Lidereau, Expression of PEA3/E1AF/ETV4, an Ets-related transcription factor, in breast tumors: positive links to MMP2, NRG1 and CGB expression, Carcinogenesis 25 (2004) 405–411.
[80] J. Kinoshita, K. Kitamura, S. Tanaka, K. Sugimachi, M. Ishida, H. Saeki, Clinical significance of PEA3 in human breast cancer, Surgery 131 (2002) S222–S225.
[81] G.K. Scott, J.C. Daniel, X. Xiong, R.A. Maki, D. Kabat, C.C. Benz, Binding of an ETS-related protein within the DNase I hypersensitive site of the HER2/neu promoter in human breast cancer cells, J. Biol. Chem. 269 (1994) 19848–19858.
[82] R.C. O'Hagan, J.A. Hassell, The PEA3 Ets transcription factor is a downstream target of the HER2/Neu receptor tyrosine kinase, Oncogene 16 (1998) 301–310.
[83] A. Perez, R. Barco, I. Fernandez, S.A. Price-Schiavi, K.L. Carraway, PEA3 transactivates the Muc4/sialomucin complex promoter in mammary epithelial and tumor cells, J. Biol. Chem. 278 (2003) 36942–36952.
[84] K. Subbaramaiah, L. Norton, W. Gerald, A.J. Dannenberg, Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3, J. Biol. Chem. 277 (2002) 18649–18657.
[85] B.S. Goueli, R. Janknecht, Upregulation of the catalytic telomerase subunit by the transcription factor ER81 and oncogenic HER2/Neu, Ras, or Raf, Mol. Cell. Biol. 24 (2004) 25–35.
[86] X. Xing, S.C. Wang, W. Xia, Y. Zou, R. Shao, K.Y. Kwong, Z. Yu, S. Zhang, S. Miller, L. Huang, M.C. Hung, The ets protein PEA3 suppresses HER-2/neu overexpression and inhibits tumorigenesis, Nat. Med. 6 (2000) 189–195.
[87] M.C. Hung, S.C. Wang, Suppressing HER2/neu-mediated cell transformation by transcriptional repressors, Breast Dis 11 (2000) 133–144.
[88] N. Ohtani, Z. Zebedee, T.J. Huot, J.A. Stinson, M. Sugimoto, Y. Ohashi, A.D. Sharrocks, G. Peters, E. Hara, Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence, Nature 409 (2001) 1067–1070.
[89] T.J. Huot, J. Rowe, M. Harland, S. Drayton, S. Brookes, C. Gooptu, P. Purkis, M. Fried, V. Bataille, E. Hara, J. Newton-Bishop, G. Peters, Biallelic mutations in p16(INK4a) confer resistance to Ras- and Ets-induced senescence in human diploid fibroblasts, Mol. Cell. Biol. 22 (2002) 8135–8143.
[90] A. Chotteau-Lelievre, F. Revillion, V. Lhotellier, L. Hornez, X. Desbiens, V. Cabaret, Y. de Launoit, J.P. Peyrat, Prognostic value of ERM gene expression in human primary breast cancers, Clin. Cancer Res. 10 (2004) 7297–7303.
[91] J. Planaguma, M. Abal, A. Gil-Moreno, M. Diaz-Fuertes, M. Monge, A. Garcia, T. Baro, J. Xercavins, J. Reventos, F. Alameda, Up-regulation of ERM/ETV5 correlates with the degree of myometrial infiltration in endometrioid endometrial carcinoma, J. Pathol. 207 (2005) 422–429.
[92] O. Delattre, J. Zucman, B. Plougastel, C. Desmaze, T. Melot, M. Peter, H. Kovar, I. Joubert, P. de Jong, G. Rouleau, et al., Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours, Nature 359 (1992) 162–165.
[93] P.H. Sorensen, S.L. Lessnick, D. Lopez-Terrada, X.F. Liu, T.J. Triche, C.T. Denny, A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG Nat. Genet. 6 (1994) 146–151.
[94] F. Urano, A. Umezawa, W. Hong, H. Kikuchi, J. Hata, A novel chimera gene between EWS and E1A-F, encoding the adenovirus E1A enhancer-binding protein, in extraosseous Ewing's sarcoma, Biochem. Biophys. Res. Commun. 219 (1996) 608–612.
[95] Y. Kaneko, K. Yoshida, M. Handa, Y. Toyoda, H. Nishihira, Y. Tanaka, Y. Sasaki, S. Ishida, F. Higashino, K. Fujinaga, Fusion of an ETS-family gene, EIAF, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy, Genes Chromosomes Cancer 15 (1996) 115–121.

[96] M. Peter, J. Couturier, H. Pacquement, J. Michon, G. Thomas, H. Magdelenat, O. Delattre, A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors, Oncogene 14 (1997) 1159–1164.

[97] A. Arvand, C.T. Denny, Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors, Oncogene 20 (2001) 5747–5754.

[98] R.A. Bailly, R. Bosselut, J. Zucman, F. Cormier, O. Delattre, M. Roussel, G. Thomas, J. Ghysdael, DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing sarcoma, Mol. Cell. Biol. 14 (1994) 3230–3241.

[99] B. Fuchs, C.Y. Inwards, R. Janknecht, Upregulation of the matrix metalloproteinase-1 gene by the Ewing's sarcoma associated EWS-ER81 and EWS-Fli-1 oncoproteins, c-Jun and p300, FEBS Lett. 553 (2003) 104–108.

[100] H. Yabe, M. Fukuma, F. Urano, K. Yoshida, S. Kato, Y. Toyama, J. Hata, A. Umezawa, Lack of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and -3 expression in Ewing sarcoma may be due to loss of accessibility of the MMP regulatory element to the specific fusion protein in vivo, Biochem. Biophys. Res. Commun. 293 (2002) 61–71.

[101] B. Fuchs, C. Inwards, S.P. Scully, R. Janknecht, hTERT Is highly expressed in Ewing's sarcoma and activated by EWS-ETS oncoproteins, Clin. Orthop. Relat. Res. (2004) 64–68.

[102] M. Shindoh, F. Higashino, T. Kohgo, E1AF, an ets-oncogene family transcription factor, Cancer Lett. 216 (2004) 1–8.

[103] S.A. Tomlins, D.R. Rhodes, S. Perner, S.M. Dhanasekaran, R. Mehra, X.W. Sun, S. Varambally, X. Cao, J. Tchinda, R. Kuefer, C. Lee, J.E. Montie, R.B. Shah, K.J. Pienta, M.A. Rubin, A.M. Chinnaiyan, Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer, Science 310 (2005) 644–648.

[104] J. Wu, R. Janknecht, Regulation of the ETS transcription factor ER81 by the 90-kDa ribosomal S6 kinase 1 and protein kinase A, J. Biol. Chem. 277 (2002) 42669–42679.

POINT SUR
© John Libbey Eurotext

Bull Cancer 2006 ; 93 (10) : 1-5

Les facteurs de transcription du groupe PEA3 : régulateurs transcriptionnels dans le processus de cancérisation

PEA3 family of transcription factors and the regulation of oncogenesis

Yvan DE LAUNOIT[1,2]
Jean-Luc BAERT[1]
Anne CHOTTEAU-LELIEVRE[1]
Didier MONTE[1]
Laurent COUTTE[1,3]
Sébastien MAUEN[2]
Virginie FIRLEJ[1]
Cindy DEGERNY[1]
Kathye VERREMAN[1]

[1] UMR 8161, Institut de biologie de Lille, CNRS, Université de Lille I, Université de Lille II, Institut Pasteur de Lille, BP447, 1 rue Calmette, 59021 Lille Cedex
[2] Laboratoire de virologie moléculaire, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, CP 614, 808 route de Lennik, 1070 Brussels, Belgium
<yvan.delaunoit@ibl.fr>
[3] Laboratoire de biologie animale, Bâtiment 470, Faculté des Sciences d'Orsay, Université de Paris Sud, 91405 Orsay

Article reçu le 20 mars 2006, accepté le 10 juin 2006

Résumé. Erm, Er81 et Pea3 sont les trois membres du groupe PEA3 qui fait partie de la grande famille des facteurs de transcription Ets. Ces facteurs régulent la transcription des nombreux gènes, dont plusieurs codant des métalloprotéases de la matrice (MMP), qui sont des enzymes contribuant à la dégradation de la matrice extracellulaire, entre autres, lors de la métastase. De fait, les gènes du groupe PEA3 sont souvent surexprimés dans différents types de cancers humains qui surexpriment également ces MMP et présentent un phénotype de dissémination. Par ailleurs, dans des modèles expérimentaux, la régulation ectopique de l'expression des membres du groupe PEA3 influence le processus métastatique, confirmant ainsi son rôle important dans ce processus. ▲

Mots clés : métastase, facteurs de transcription, Ets, PEA3

Abstract. *Erm, Er81, and Pea3 are the three members of the PEA3 group which belong to the Ets transcription factors family. These proteins regulate transcription of multiple target genes, such as those encoding several matrix metalloproteinases (MMP), which are enzymes degrading the extracellular matrix during cancer metastasis. In fact, PEA3-group genes are often overexpressed in different types of human cancers that also over-express these MMP and display a disseminating phenotype. In experimental models, regulation of PEA3 group member expression has been shown to influence the metastatic process, thus suggesting that these factors play a key role in metastasis.* ▲

Key words: *metastasis, transcription factor, Ets, PEA3*

ÉPREUVES

Les gènes *ets* codent une famille des facteurs de transcription d'environ 30 membres. Dans la plupart des cas, ce sont des activateurs transcriptionnels et, dans quelques rares cas, ils agissent comme répresseurs transcriptionnels. Ces facteurs partagent un motif conservé de 85 résidus, le domaine ETS, qui est la signature de la famille et qui est responsable de la liaison à l'ADN sur un site consensus appelé EBS (*Ets-binding site*) [1-3]. Les membres de cette famille sont classés en différents groupes suivant la conservation des différents domaines, principalement au niveau de la séquence du domaine ETS. Les 13 groupes ainsi identifiés sont les suivants : ETS, TEL, YAN, SPI, ERG, PEA3, ELF, DETS4, ELG, GABP, ER71, ERF, et ESE [4].

Le groupe PEA3 se compose de trois membres : Erm/Etv5, Er81/Etv1 et Pea3/E1Af/Etv4, qui partagent, outre le domaine ETS fortement conservé, deux domaines *trans*-activateurs [5]. Chez l'homme et la souris, les gènes *pea3*, *er81* et *erm* sont répartis sur 13 à 14 exons distribués sur plus 15 kpb d'ADN génomique. Dans le génome humain, *erm* est situé sur le chromosome 3 à la position 3q27-29, *e1af* sur le chromosome 17 à la position 17q21, et *er81* sur le chromosome 7 à la position 7q21. Dans la plupart des cas, les membres du groupe PEA3 sont décrits comme activateurs transcriptionnels [6].

Comme beaucoup de facteurs de transcription, ils subissent des modifications post-traductionnelles qui régulent leur capacité de transactivation. La modification la plus commune retrouvée est la phosphorylation. En effet, ces protéines sont des cibles de la voie des MAPK et de la PKA. Les modifications post-traductionnelles sur les résidus lysines : acétylation, sumoylation et ubiquitinylation, jouent également des rôles cruciaux dans la régulation de la transcription [5].

Tirés à part : Y. de Launoit

Chez la souris, ces facteurs sont exprimés dans de nombreux tissus et organes, notamment dans les organes se mettant en place par morphogenèse de branchement comme le poumon, le rein, la glande salivaire. La morphogenèse de branchement correspond à un compartiment épithélial progressant dans un compartiment mésenchymateux en formant une arborescence. Le modèle général d'expression de ces trois gènes lors de la morphogenèse de branchement est le suivant : *erm* est exprimé dans les parties distales des bourgeons épithéliaux, *pea3* dans une région plus restreinte de l'épithélium en croissance, et *er81* dans le mesenchyme adjacent [7-9]. Ce modèle n'est pas limité à la morphogenèse de branchement mais est également retrouvé lors de la conversion du mesenchyme en épithélium (par exemple dans le développement du rein) et pendant le développement du système nerveux.

Rôles dans le processus métastatique

Les métalloprotéases matricielles (MMP) constituent une famille de protéases impliquées dans la dégradation protéolytique de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire, mais aussi de protéines non matricielles. Elles jouent un rôle important dans plusieurs étapes de la progression des cellules cancéreuses et leur caractère invasif. De même, les molécules d'adhérence interviennent dans l'architecture de la matrice extracellulaire et facilitent la croissance tumorale, l'invasion et la métastase. Les facteurs du groupe PEA3 ont la capacité d'activer la transcription de gènes codant certaines MMP ou des molécules d'adhérence [10]. Ainsi par exemple, des lignées cellulaires surexprimant ces facteurs présentent un potentiel hautement métastatique qui est souvent corrélé à la forte expression de plusieurs MMP [11-14], tandis que l'inhibition de l'expression de *pea3* réduit l'expression de MMP1 et de MMP9 [15]. Le *tableau 1* résume certaines études cliniques ou expérimentales démontrant la corrélation entre l'expression de membres du groupe PEA3 et celle de molécules facilitant la dérive tumorale.

Dans le tractus oral, *pea3* est fortement exprimé dans des lignées de carcinomes squameux qui présentent un haut potentiel métastatique et expriment des niveaux élevés de MMP1 et de MMP9 [11]. De plus, lorsque dans ces mêmes cellules l'expression de *pea3* est inhibée, l'expression de ces deux MMP est diminuée [15]. Cette expérience est cruciale car elle démontre pour la première fois que la sous-expression de *pea3* endogène induit la régulation transcriptionnelle d'un de ses gènes cibles. Dans ces cellules, l'expression des MMP induite par Pea3 est également stimulée par le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) [16]. Dans les tumeurs humaines, l'ARNm de *pea3* est détecté par l'hybridation *in situ* dans la majorité des spécimens de cellules de carcinome squameux envahissant, et la plus forte expression de *pea3* est corrélée à la métastase ganglionnaire [13].

Dans les poumons, seul Pea3 est impliqué dans le processus de cancérisation. Ainsi, dans les cancers de poumon non à petites cellules (NSCLC) qui sont caractérisés par une forte invasion, l'ARNm de *pea3* est retrouvé dans les tumeurs primaires et non dans les tissus normaux environnants. L'expression ectopique de *pea3* dans les cellules de NSCLC augmente *in vitro* la motilité et l'invasion cellulaires [17]. Récemment, le marqueur de métastase 1,4-galactosyltransférase (*GalTI*) a été montré co-exprimé avec *pea3* dans les cellules de cancer de poumon qui présentent un phénotype hautement métastatique [18].

Dans le cancer gastrique, le niveau de l'ARNm de *pea3* et celui de la *matrilysine* (MMP7) sont corrélés à l'invasion tumorale, indiquant un mauvais pronostic pour la survie des patients [19]. Aussi, *MMP7* et *pea3* sont colocalisés au niveau du « front d'invasion » et, quand l'expression de *pea3* endogène est inhibée, l'expression de *MMP7* est nettement diminuée, et les cellules sont moins invasives *in vitro*.

Dans le carcinome hépatocellulaire (HCC), l'interleukine IL8, qui est un facteur angiogénique efficace, est induite par Pea3 en association avec le facteur de transcription AP1. D'ailleurs, pea3 et IL8 sont tous les deux exprimés dans les HCC, et non dans les tissus environnants, indiquant ainsi un rôle potentiel de Pea3 dans la tumorigenèse des hépatocytes induite par l'IL8 [20].

Dans les tumeurs colorectales, plus particulièrement les adénomes prémalins, l'expression de pea3 est corrélée à la surexpression, non seulement de MMP, mais également des gènes CO2 et iNos codant deux facteurs impliqués dans l'angiogenèse tumorale [21-23].

Dans les adénocarcinomes ovariens, l'expression d'erm a été observée [24]. Pea3 est également impliqué dans les carcinomes ovariens où une forte expression a été observée dans le stroma à proximité des tumeurs de types II et III qui expriment la MMP2 dans les cellules de carcinomes adjacents, illustrant ainsi le dialogue entre ces deux compartiments. L'expression de pea3 est également corrélée à l'expression des gènes codant la MMP1, l'EMMPRIN (un inducteur de MMP) et des facteurs angiogéniques tels que le bFGF, l'IL8 et certaines intégrines [25, 26].

Tableau 1. Expression des membres du groupe PEA3 dans les cancers humains

Tissu	Membre du groupe PEA3	Références	
		Lignées cellulaires	Etudes cliniques
Tractus oral	Pea3	13, 15, 16	11, 13
Poumon (NSCLC)	Pea3	17, 18	18, 17
Estomac	Pea3	19	19[a]
Foie	Pea3		20
Côlon	Pea3	21	22, 23
Ovaire	Pea3		25, 26
Sein	Pea3/Erm	12, 42	26, 33, 34, 43
Endomètre	Erm		43

[a] Dans cette étude, l'expression d'*er81* et de *erm* n'est corrélée ni à la survie des patients ni à l'expression des MMP (100 cancers gastriques).

Dans le développement de la glande mammaire, le rôle de ces facteurs a fait l'objet ces dernières années de nombreux travaux. Ainsi, chez la souris, les gènes correspondants sont en effet exprimés à différents stades du développement de la glande mammaire [7] et ils y jouent un rôle dans la formation des structures embranchées [27, 28]. Dans les tumeurs mammaires, la première évidence de leur rôle potentiel a été obtenue chez la souris. En effet, *pea3* est surexprimé dans les adénocarcinomes induits par l'oncogène récepteur tyrosine kinase *HER2/neu*, ainsi que dans les métastases [29], phénomène qui a été ensuite décrit pour les gènes *er81* et *erm* [30]. Dans des lignées humaines de cellules de cancer du sein, les trois membres du groupe PEA3 sont fortement exprimés, dans les cellules n'exprimant pas le récepteur aux œstrogènes ; ces cellules présentant d'ailleurs un phénotype agressif lorsqu'elles sont implantées chez des souris immunodéficientes [31]. Parallèlement, ces facteurs sont exprimés dans les cellules qui surexpriment *HER2/neu*. Ainsi, sur une série de 74 patientes ayant un cancer du sein, l'expression de *pea3* est présente dans plus de 90 % de cancers qui expriment *HER2/neu* et dans seulement 50 % de n'expriment pas ce gène [32]. D'ailleurs, l'expression de *pea3* et de *Her2/neu* est corrélée dans les tumeurs invasives [32, 33]. Cependant, des données provocatrices au sujet de l'expression de *pea3* dans des cancers du sein montrent une survie plus favorable quand ce facteur est présent [34]. Cela pourrait être dû, en partie, à l'origine ethnique des patientes. En effet, cette étude a été réalisée chez une population des patientes japonaises. Aussi, dans une étude réalisée en France sur 130 patientes, l'expression de ce facteur a été caractérisée comme marqueur d'agressivité tumorale [33]. Le mécanisme moléculaire par lequel Pea3 régule le gène *HER2/neu* se situe au niveau transcriptionnel. En effet, Pea3 se lie au promoteur d'*HER2/neu* [35] et active un gène rapporteur dirigé par son promoteur [32]. La surexpression de Pea3 augmente également la transcription d'autres gènes qui joueraient aussi un rôle dans la métastase mammaire, tels que *l'ostéopontine* dans les lignes mammaires de cellules de rat [36], les gènes du complexe *Muc4/sialomucine* dans les cellules mammaires normales murines HC11 [37], le gène de la *cyclooxygenase 2* dans les cellules épithéliales mammaires humaines 184B5 et 184B5/HER [38]. L'activation dépendante d'HER2/neu cible également Er81 par la voie Ras-RAF-MAPK, en augmentant l'activité transcriptionnelle de ce facteur sur différents gènes cibles, tels que la *MMP1*, le gène *Smad7* codant l'inhibiteur du TGFβ et le gène *hTERT* codant la transcriptase inverse de la télomérase [39-41]. Néanmoins, une étude provocatrice rapporte que Pea3 peut agir sur le promoteur d'*HER2/neu* comme répresseur transcriptionnel dans des lignées mammaires spécifiques de cellules de cancer [42], mais ces résultats semblent être limités aux lignées de cellules testées. Enfin, en ce qui concerne *erm*, il a été démontré que son expression est corrélée à l'invasion et au mauvais pronostic dans le cancer de sein [43] ainsi que dans le carcinome endométrial [44]. Le rôle fonctionnel de ce facteur de transcription dans ces cancers devrait être maintenant examiné plus en détail.

Réarrangements chromosomiques des membres du groupe PEA3 dans certains cancers

Pour être complet sur les rôles des membres du groupe PEA3 dans les cancers humains, mentionnons aussi que, dans quelques rares cas de sarcomes d'Ewing chez l'enfant, ces gènes ont été associés à des réarrangements chromosomiques [45, 46] qui conduisent à des protéines chimériques disposant d'un potentiel de transactivation accru vis-à-vis des gènes cibles de la famille Ets.

Enfin, très récemment, *er81* (*etv1*) a été montré, avec un autre membre de la famille Ets, *erg*, comme étant réarrangé dans des cancers prostatiques. Dans ce cas, il s'agit de la fusion d'une part de la région 5' non traduite du gène *TMPRSS2* à d'autre part le gène *er81* ou *erg*. Ainsi, sur 23 des 29 échantillons étudiés, l'expression des gènes *er81* et *erg* est régulée comme celle du gène *TMPRSS2* qui est lui-même sous la dépendance des androgènes. Ces résultats pourraient donc avoir des implications sur le diagnostic et le traitement moléculaires du cancer de la prostate [47].

En conclusion, les membres du groupe PEA3 sont des facteurs de transcription de la famille Ets exerçant un rôle dans divers cancers humains. En particulier, ils régulent l'expression de gènes cibles impliqués dans la métastase, tels que par exemple certaines MMP dans les cancers mammaires *(figure 1)*. ▼

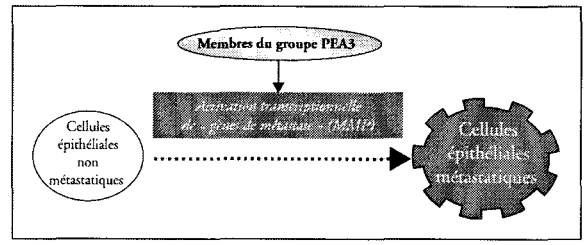


Figure 1. Les membres du groupe PEA3 activent le phénotype métastatique des cellules épithéliales cancéreuses en régulant certains gènes cibles, tels que les MMP.

Remerciements. Ce travail fut réalisé grâce aux subventions accordées par le Centre national de la recherche scientifique (France), l'Institut Pasteur de Lille, l'Association pour la recherche contre le cancer (ARC, France), la Ligue nationale contre le cancer (comité Nord, France), le Conseil régional Nord/Pas-de-Calais (France), le Fonds européen de développements régionaux (Feder), le programme Interreg Intergènes, l'Université de Lille 1 (France), l'Université de Lille 2 (France), le Fonds national de la recherche scientifique (FNRS, Belgique) et l'Action de recherche concertée (Communauté française de Belgique, Belgique).

Références

1. Graves BJ, Petersen JM. Specificity within the ets family of transcription factors. *Adv Cancer Res* 1998 ; 75 : 1-55.

2. Sharrocks AD. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 ; 2 : 827-37.

3. Lelievre E, Lionneton F, Soncin F. Role des facteurs de transcription ETS dans le controle de la specificite d'expression endotheliale et l'angiogenese. *Bull Cancer* 2001 ; 88 : 137-42.

4. Laudet V, Hanni C, Stehelin D, Duterque-Coquillaud M. Molecular phylogeny of the ETS gene family. *Oncogene* 1999 ; 18 : 1351-9.

5. de Launoit Y, Baert JL, Chotteau-Lelievre A, Monte D, Coutte L, Mauen S, et al. The Ets transcription factors of the PEA3 group : transcriptional regulators in metastasis. BBA Reviews on cancer 2006 ; in press.

6. de Launoit Y, Chotteau-Lelievre A, Beaudoin C, Coutte L, Netzer S, Brenner C, *et al.* The PEA3 group of ETS-related transcription factors. Role in breast cancer metastasis. *Adv Exp Med Biol* 2000 ; 480 : 107-16.

7. Chotteau-Lelievre A, Desbiens X, Pelczar H, Defossez PA, de Launoit Y. Differential expression patterns of the PEA3 group transcription factors through murine embryonic development. *Oncogene* 1997 ; 15 : 937-52.

8. Chotteau-Lelievre A, Dolle P, Peronne V, Coutte L, de Launoit Y, Desbiens X. Expression patterns of the Ets transcription factors from the PEA3 group during early stages of mouse development. *Mech Dev* 2001 ; 108 : 191-5.

9. Liu Y, Jiang H, Crawford HC, Hogan BL. Role for ETS domain transcription factors Pea3/Erm in mouse lung development. *Dev Biol* 2003 ; 261 : 10-24.

10. Remy L, Bellaton C, Pourreyron C, Anderson W, Pereira A, Dumortier J, *et al.* Integrins et metalloproteinases : une collaboration efficace dans le processus invasif. *Bull Cancer* 1999 ; 86 : 154-8.

11. Shindoh M, Higashino F, Kaya M, Yasuda M, Funaoka K, Hanzawa M, *et al.* Correlated expression of matrix metalloproteinases and ets family transcription factor E1A-F in invasive oral squamous-cell-carcinoma-derived cell lines. *Am J Pathol* 1996 ; 148 : 693-700.

12. Kaya M, Yoshida K, Higashino F, Mitaka T, Ishii S, Fujinaga K. A single ets-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells. *Oncogene* 1996 ; 12 : 221-7.

13. Hida K, Shindoh M, Yoshida K, Kudoh A, Furaoka K, Kohgo T, *et al.* Expression of E1AF, an ets-family transcription factor, is correlated with the invasive phenotype of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1997 ; 33 : 426-30.

14. Habelhah H, Okada F, Kobayashi M, Nakai K, Choi S, Hamada J, *et al.* Increased E1AF expression in mouse fibrosarcoma promotes metastasis through induction of MT1-MMP expression. *Oncogene* 1999 ; 18 : 1771-6.

15. Hida K, Shindoh M, Yasuda M, Hanzawa M, Funaoka K, Kohgo T, *et al.* Antisense E1AF transfection restrains oral cancer invasion by reducing matrix metalloproteinase activities. *Am J Pathol* 1997 ; 150 : 2125-32.

16. Hanzawa M, Shindoh M, Higashino F, Yasuda M, Inoue N, Hida K, *et al.* Hepatocyte growth factor upregulates E1AF that induces oral squamous cell carcinoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase genes. *Carcinogenesis* 2000 ; 21 : 1079-85.

17. Hiroumi H, Dosaka-Akita H, Yoshida K, Shindoh M, Ohbuchi T, Fujinaga K, *et al.* Expression of E1AF/PEA3, an Ets-related transcription factor in human non-small-cell lung cancers : its relevance in cell motility and invasion. *Int J Cancer* 2001 ; 93 : 786-91.

18. Zhu X, Jiang J, Shen H, Wang H, Zong H, Li Z, *et al.* Elevated beta1,4-galactosyltransferase I in highly metastatic human lung cancer cells. Identification of E1AF as important transcription activator. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 12503-16.

19. Yamamoto H, Horiuchi S, Adachi Y, Taniguchi H, Nosho K, Min Y, *et al.* Expression of ets-related transcriptional factor E1AF is associated with tumor progression and over-expression of matrilysin in human gastric cancer. *Carcinogenesis* 2004 ; 25 : 325-32.

20. Iguchi A, Kitajima I, Yamakuchi M, Ueno S, Aikou T, Kubo T, *et al.* PEA3 and AP-1 are required for constitutive IL-8 gene expression in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 ; 279 : 166-71.

21. Liu Y, Borchert GL, Phang JM. Polyoma enhancer activator 3, an ets transcription factor, mediates the induction of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in colorectal cancer cells. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 18694-700.

22. Boedefeld 2nd WM, Soong R, Weiss H, Diasio RB, Urist MM, Bland KI, *et al.* E1A-F is overexpressed early in human colorectal neoplasia and associated with cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-7. *Mol Carcinog* 2005 ; 43 : 13-7.

23. Nosho K, Yoshida M, Yamamoto H, Taniguchi H, Adachi Y, Mikami M, *et al.* Association of Ets-related transcriptional factor E1AF expression with overexpression of matrix metalloproteinases, COX-2 and iNOS in the early stage of colorectal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005 ; 26 : 892-9.

24. Monte D, Baert JL, Defossez PA, de Launoit Y, Stehelin D. Molecular cloning and characterization of human ERM, a new member of the Ets family closely related to mouse PEA3 and ER81 transcription factors. *Oncogene* 1994 ; 9 : 1397-406.

25. Davidson B, Goldberg I, Gotlieb WH, Kopolovic J, Ben-Baruch G, Reich R. PEA3 is the second Ets family transcription factor involved in tumor progression in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003 ; 9 : 1412-9.

26. Davidson B, Goldberg I, Tell L, Vigdorchik S, Baekelandt M, Berner A, *et al.* The clinical role of the PEA3 transcription factor in ovarian and breast carcinoma in effusions. *Clin Exp Metastasis* 2004 ; 21 : 191-9.

27. Chotteau-Lelievre A, Montesano R, Soriano J, Soulie P, Desbiens X, de Launoit Y. PEA3 transcription factors are expressed in tissues undergoing branching morphogenesis and promote formation of duct-like structures by mammary epithelial cells in vitro. *Dev Biol* 2003 ; 259 : 241-57.

28. Kurpios NA, Sabolic NA, Shepherd TG, Fidalgo GM, Hassell JA. Function of PEA3 Ets transcription factors in mammary gland development and oncogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003 ; 8 : 177-90.

29. Trimble MS, Xin JH, Guy CT, Muller WJ, Hassell JA. PEA3 is overexpressed in mouse metastatic mammary adenocarcinomas. *Oncogene* 1993 ; 8 : 3037-42.

30. Galang CK, Muller WJ, Foos G, Oshima RG, Hauser CA. Changes in the expression of many Ets family transcription factors and of potential target genes in normal mammary tissue and tumors. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 11281-92.

31. Baert JL, Monte D, Musgrove EA, Albagli O, Sutherland RL, de Launoit Y. Expression of the PEA3 group of ETS-related transcription factors in human breast-cancer cells. *Int J Cancer* 1997 ; 70 : 590-7.

32. Benz CC, O'Hagan RC, Richter B, Scott GK, Chang CH, Xiong X, *et al.* HER2/Neu and the Ets transcription activator PEA3 are coordinately upregulated in human breast cancer. *Oncogene* 1997 ; 15 : 1513-25.

33. Bieche I, Tozlu S, Girault I, Onody P, Driouch K, Vidaud M, *et al.* Expression of PEA3/E1AF/ETV4, an Ets-related transcription factor, in breast tumors : positive links to MMP2, NRG1 and CGB expression. *Carcinogenesis* 2004 ; 25 : 405-11.

34. Kinoshita J, Kitamura K, Tanaka S, Sugimachi K, Ishida M, Saeki H. Clinical significance of PEA3 in human breast cancer. *Surgery* 2002 ; 131 : S222-S225.

35. Scott GK, Daniel JC, Xiong X, Maki RA, Kabat D, Benz CC. Binding of an ETS-related protein within the DNase I hypersensitive site of the HER2/neu promoter in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 19848-58.

36. El-Tanani M, Platt-Higgins A, Rudland PS, Campbell FC. Ets gene PEA3 cooperates with beta-catenin-Lef-1 and c-Jun in regulation of osteopontin transcription. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 20794-806.

37. Perez A, Barco R, Fernandez I, Price-Schiavi SA, Carraway KL. PEA3 transactivates the Muc4/sialomucin complex promoter in mammary epithelial and tumor cells. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 36942-52.

38. Subbaramaiah K, Norton L, Gerald W, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer : evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 18649-57.

39. Bosc DG, Goueli BS, Janknecht R. HER2/Neu-mediated activation of the ETS transcription factor ER81 and its target gene MMP-1. *Oncogene* 2001 ; 20 : 6215-24.

EPREUVES

40. Janknecht R. Cell type-specific inhibition of the ETS transcription factor ER81 by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 41856-61.

41. Goueli BS, Janknecht R. Upregulation of the Catalytic Telomerase Subunit by the Transcription Factor ER81 and Oncogenic HER2/Neu, Ras, or Raf. *Mol Cell Biol* 2004 ; 24 : 25-35.

42. Xing X, Wang SC, Xia W, Zou Y, Shao R, Kwong KY, *et al.* The ets protein PEA3 suppresses HER-2/neu overexpression and inhibits tumorigenesis. *Nat Med* 2000 ; 6 : 189-95.

43. Chotteau-Lelievre A, Revillion F, Lhotellier V, Hornez L, Desbiens X, Cabaret V, *et al.* Prognostic value of ERM gene expression in human primary breast cancers. *Clin Cancer Res* 2004 ; 10 : 7297-303.

44. Planaguma J, Abal M, Gil-Moreno A, Diaz-Fuertes M, Monge M, Garcia A, *et al.* Up-regulation of ERM/ETV5 correlates with the degree of myometrial infiltration in endometrioid endometrial carcinoma. *J Pathol* 2005 ; 207(4) : 422-9.

45. Jeon IS, Davis JN, Braun BS, Sublett JE, Roussel MF, Denny CT, *et al.* A variant Ewing's sarcoma translocation (7 ; 22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene* 1995 ; 10 : 1229-34.

46. Kaneko Y, Yoshida K, Handa M, Toyoda Y, Nishihira H, Tanaka Y, *et al.* Fusion of an ETS-family gene, EIAF, to EWS by t (17 ; 22) (q12 ; q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. *Genes Chromosomes Cancer* 1996 ; 15 : 115-21.

47. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, *et al.* Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005 ; 310 : 644-8.

ÉPREUVES

Oncogene (2007) 26, 395–406
© 2007 Nature Publishing Group All rights reserved 0950-9232/07 $30.00
www.nature.com/onc

ORIGINAL ARTICLE

Regulation of the Ets-1 transcription factor by sumoylation and ubiquitinylation

Z Ji, C Degerny, N Vintonenko, J Deheuninck, B Foveau, C Leroy, J Coll, D Tulasne, J-L Baert and V Fafeur

UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, CNRS – Institut Pasteur de Lille – Université de Lille 1, Université de Lille 2, Lille Cedex, France

Sumoylation and ubiquitinylation reversibly regulate the activity of transcription factors through covalent attachment to lysine residues of target proteins. We examined whether the Ets-1 transcription factor is modified by sumoylation and/or ubiquitinylation. Among four potential SUMO motifs in Ets-1, we identified lysines 15 and 227 within the LK^{15}YE and IK^{227}QE motifs, as being the sumoylation acceptor sites. Using transfection of Ets-1 wildtype (WT) or its sumoylation deficient version (Ets-1 K15R/K227R), as well as WT or mutant proteins of the SUMO pathway, we further demonstrated that the E2 SUMO-conjugating enzyme Ubc9 and a E3 SUMO ligase, PIASy, can enhance Ets-1 sumoylation, while a SUMO protease, SENP1, can desumoylate Ets-1. We also found that Ets-1 is modified by K48-linked polyubiquitinylation independently of the sumoylation acceptor sites and is degraded through the 26S proteasome pathway, while sumoylation of Ets-1 does not affect its stability. Finally, sumoylation of Ets-1 leads to reduced transactivation and we demonstrated that previously identified critical lysine residues in Synergistic Control motifs are the sumoylation acceptor sites of Ets-1. These data show that Ets-1 can be modified by sumoylation and/or ubiquitinylation, with sumoylation repressing transcriptional activity of Ets-1 and having no clear antagonistic action on the ubiquitin-proteasome degradation pathway.
Oncogene (2007) **26**, 395–406. doi:10.1038/sj.onc.1209789; published online 24 July 2006

Keywords: Ets-1; transcription factor; SUMO; ubiquitin

Introduction

Ets proteins are a family of transcription factors that share a highly conserved DNA-binding domain of approximately 80 amino acids, which specifically recognizes DNA sequence containing a GGAA/T core element. Ets-1 is the founding member of the ETS family and was found to play an important role in hematopoïetic development, angiogenesis and tumor progression (Wernert *et al.*, 1992, 1994; Bories *et al.*, 1995; Muthusamy *et al.*, 1995). In addition to its C-terminal DNA-binding domain, Ets-1 contains an N-terminal transactivation domain, an original protein–protein interaction domain (also called Pointed domain) that is shared by many ETS proteins and a central regulatory domain corresponding to exon VII (see Dittmer (2003)).

The transcriptional activity of Ets-1 is known to be regulated by phosphorylation. The N-terminal sequence of Ets-1 is phosphorylated at threonine 38, within a MAPK phosphorylation motif activated following RAS activation. This phosphorylation enhances Ets-1 transcriptional activity (Rabault *et al.*, 1996; Wasylyk *et al.*, 1997; Slupsky *et al.*, 1998; Paumelle *et al.*, 2002). In particular, we demonstrated that such activation of Ets-1 is triggered by hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) through a RAS-ERK pathway, leading to transcriptional activation of Ets-1 and activation of promoters containing RAS-Responsive Elements constituted by combined EBS/AP1-binding sites (Fafeur *et al.*, 1997; Paumelle *et al.*, 2002). Within the central regulatory domain, corresponding to exon VII, several Ets-1 serine phosphorylation sites have been identified. These serine residues (Ser^{251}, Ser^{257}, Ser^{282} and Ser^{285}) are calcium-responsive phosphorylation sites and their phosphorylation inhibits its DNA binding activity (Rabault and Ghysdael, 1994; Cowley and Graves, 2000).

Ubiquitinylation is another post-translational modification, which can reversibly regulate the activity of transcription factors (Herrera and Triezenberg, 2004). Ubiquitin is a highly conserved protein of ~9 kDa that becomes covalently attached to lysine residues of target proteins (Hershko and Ciechanover, 1998). This occurs through a three-step process involving ubiquitin-activating (E1), ubiquitin-conjugating (E2) and ubiquitin-ligating (E3) enzymes. In the best-characterized ubiquitin pathway, target proteins are tagged with ubiquitin chains linked via lysine 48 (K48) of ubiquitin. The produced polyubiquitinylated proteins are then targeted to and degraded by the 26S proteasome. Nonetheless,

Correspondence: Dr V Fafeur, CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, 1, rue Calmette, B.P.447, Lille 59021, France.
E-mail: veronique.fafeur@ibl.fr
Received 18 January 2006; revised 11 May 2006; accepted 18 May 2006; published online 24 July 2006

other ubiquitin modifications can occur, including polyubiquitinylation on other lysine residues of ubiquitin or monoubiquitinylation or multiple monoubiquitinylation (Haglund and Dikic, 2005). It is now clear that ubiquitinylation functions not only for proteolysis, but also contribute to protein–protein interaction, endocytosis, DNA repair and transcriptional regulation (see (Hershko and Ciechanover, 1998). To our knowledge, within the Ets family of transcription factors, only E1AF is known to be modified by polyubiquitinylation and to be degraded by the ubiquitin-proteasome dependent pathway (Takahashi *et al.*, 2005)

More recently, the small ubiquitin-related modifier (SUMO) has also been shown to reversibly modify many proteins (Matunis *et al.*, 1996). Three different SUMO proteins (~11 kDa) were identified in mammalian cells: SUMO-1, SUMO-2 and SUMO-3, with SUMO-2 and SUMO-3 having very high sequence similarity (Hay, 2005). A tissue-specific SUMO-4 has also been recently identified, with sequence homology to SUMO-2/3 (Bohren *et al.*, 2004). SUMO modification consists in the covalent attachment of SUMO to a lysine residue, that generally lies within the consensus motif φ-K-x-D/E (Rodriguez *et al.*, 2001; Sampson *et al.*, 2001). The enzymes involved in the reversible conjugation of SUMO are similar to those mediating the ubiquitin conjugation (see (Hay, 2005). SUMOs are activated by an E1 enzyme, Aos1/Uba2, and then are transferred to Ubc9, the E2 conjugation enzyme specific for SUMO (Desterro *et al.*, 1997; Johnson and Blobel, 1997) and finally the rates of sumoylation of target proteins can be increased by E3 ligases, such as PIAS family members, RanBP2 or PC2. This modification is reversible by means of specific SUMO proteases, including SENP1, 2, 3 and 6 (Johnson, 2004). SUMO modification appears to play a role in a variety of cellular processes including protein–protein interaction, subcellular localization, protein stabilization and transcriptional regulation (Dohmen, 2004). A large number of SUMO target proteins have been identified, including several members of the Ets transcription factors family (Chakrabarti *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2003; Degerny *et al.*, 2005; Leight *et al.*, 2005; van den Akker *et al.*, 2005; Wasylyk *et al.*, 2005). Recently, we reported that the ERM Ets protein is sumoylated and that sumoylation of ERM represses its transcriptional activity (Degerny *et al.*, 2005).

The transcriptional activity of Ets-1 is also regulated by interaction with other transcriptional factors and cofactors, allowing combinatorial control of gene expression and enhanced specificity of action of Ets-1 (Oikawa and Yamada, 2003). Among these factors, Ubc9, initially known as an ubiquitin conjugating enzyme, was identified as a partner of Ets-1 able to bind both the N-terminal and the C-terminal part of Ets-1 (Hahn *et al.*, 1997). As Ubc9 is now known as an E2 enzyme involved in the conjugation of SUMO (Desterro *et al.*, 1997; Johnson and Blobel, 1997), we decided to examine whether Ets-1 can be sumoylated and/or ubiquitinylated.

Results

Ets-1 is a substrate for SUMO modification

To determine whether Ets-1 can undergo sumoylation, we analysed HEK293T cells that were transiently co-transfected with plasmids encoding HA-tagged mouse Ets-1 and His-tagged SUMO-1 or -2. Following transfection, cells were lysed, SUMO proteins were purified by nickel affinity chromatography and SUMO-Ets-1 conjugates were analysed by immunoblotting using an anti-HA antibody (Figure 1a). In the absence of SUMO, Ets-1 was detected as a doublet with a major band of ~58 kDa and a minor band of ~62 kDa (Figure 1a, middle panel). When Ets-1 and SUMO-2 were co-transfected, SUMO-modified Ets-1 products with molecular weight of ~75 and 90 kDa and a minor one at ~110 kDa were detected (Figure 1a, top panel). Their apparent increase in size of about 10–15 kDa is in agreement with addition of SUMO moieties. No bands were observed when cells were transfected with Ets-1 alone or together with SUMO-1. These results show that Ets-1 is modified by sumoylation.

To examine further the specificity of Ets-1 sumoylation, we analysed RK13, COS-7 and HEK293T cells that were transiently co-transfected with plasmids encoding HA-tagged Ets-1 and His-tagged SUMO-1, -2 or -3. Cells were then lysed and Ets-1 species were detected directly by immunoblotting using an anti-HA antibody (Figure 1b). In RK13 cells, detection of high molecular weight bands was obtained with SUMO-1, -2 or -3, with the most prominent bands having a molecular mass of ~75, 90 and 110 kDa. The similar SUMO-Ets-1 profile obtained with SUMO-1, -2 or -3 indicates that all SUMOs were capable to form polysumoylation chains at a single lysine site and/or multiple sumoylation at distinct lysine sites. In COS-7 and HEK293T cells (Figure 1b), as well as in MDCK cells (Figure 1c and data not shown), the higher molecular weight migrating bands of ~75 and 90 kDa were obtained mainly in the presence of SUMO-2, indicating that in these cell types, SUMO-2 is more efficient than SUMO-1 and -3 in generating SUMO-Ets-1 conjugates. Similar results were obtained with another sumoylated substrate ERM, indicating that the ability and/or efficiency of SUMO-1, -2, -3 to sumoylate substrates can be cell type specific (Degerny *et al.*, 2005). These results show that Ets-1 can be modified by sumoylation in several cell types.

We next asked whether SUMO-2 modification of Ets-1 can be regulated by survival and/or stress stimuli. To this purpose, we used MDCK epithelial cells that we know to be responsive both to survival factors, such as HGF/SF (Fafeur *et al.*, 1997), and to stress stimuli, such as TNFα, H_2O_2 or anisomycin (Reveneau *et al.*, 2003; Tulasne *et al.*, 2004). Cells were transfected with Ets-1 and SUMO-2 and then treated by HGF/SF, TNFα, H_2O_2 or anisomycin for 10 min. We found that H_2O_2 treatment specifically stimulated SUMO-2 modification of Ets-1 (Figure 1c). This effect of H_2O_2 on SUMO-2 modification of Ets-1 was confirmed using the nickel affinity pull-down assay (data not shown). As HGF/SF

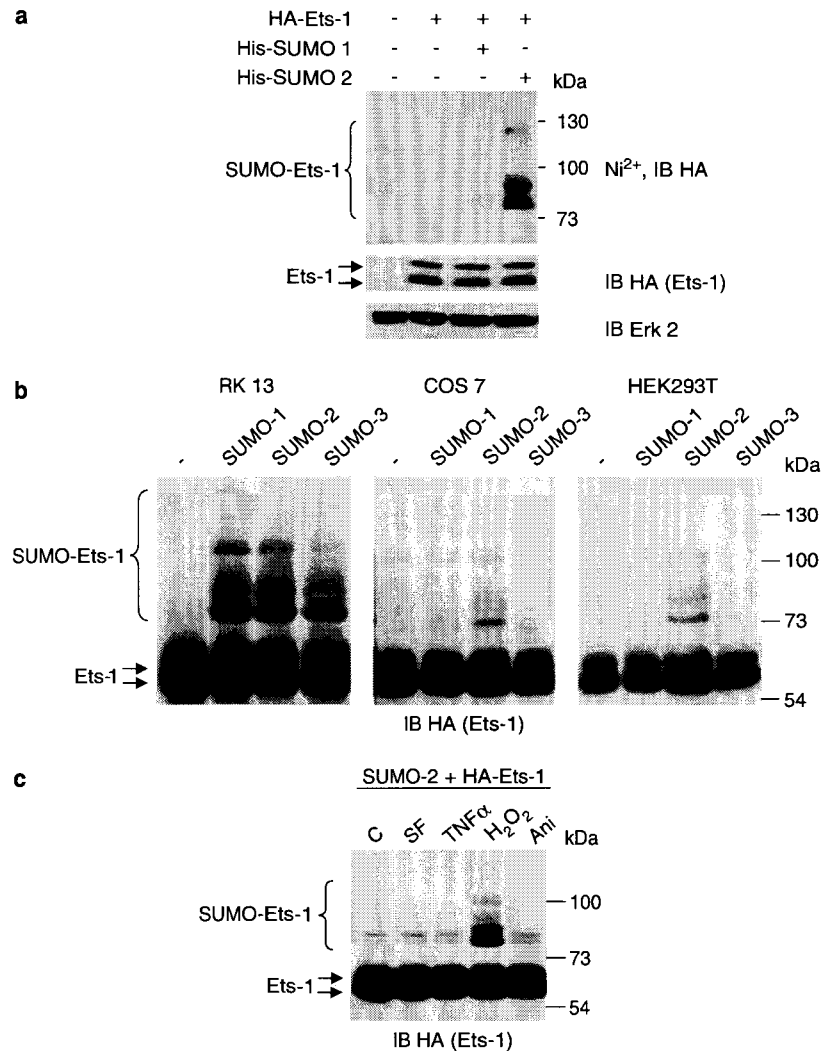


Figure 1 Ets-1 is modified by SUMO. (**a**) HEK293T cells (3×10^5) were transfected with plasmids expressing His-tagged SUMO-1 or 2 (0.7 μg) and HA-tagged Ets-1 (0.3 μg). SUMO-conjugated proteins were isolated by nickel affinity chromatography (Ni^{2+}) and separated by SDS–PAGE. Ets-1 was detected by immunoblotting using an anti-HA antibody (top panel). The expression of Ets-1 in crude extract was also detected using an anti-HA antibody (middle panel). The filter was stripped and reprobed using an anti-Erk2 antibody to assess comparable loading (lower panel). (**b**) RK13, COS-7 and HEK293T cells (3×10^5) were transfected with HA-tagged Ets-1 alone (0.3 μg) or with a plasmid expressing His-tagged SUMO-1, -2 or -3 (0.7 μg). Ets-1 was detected by immunoblotting using an anti-HA antibody. (**c**) MDCK cells (5×10^4) were co-transfected for 24 h with Ets-1 (0.6 μg) and SUMO-2 (1.4 μg). Cells were then treated with 100 ng/ml SF or TNFα, 600 μM H_2O_2 or 50 μM anisomycin for 10 min. Ets-1 was detected by immunoblotting using an anti-HA antibody.

is known to regulate Ets-1 activity (Paumelle *et al.*, 2002) and to protect cells against various stress stimuli (Xiao *et al.*, 2001), we investigated whether HGF/SF can regulate sumoylation of Ets-1 induced by H_2O_2. The strong sumoylation of Ets-1 induced by H_2O_2 was not prevented by a pretreatment by HGF/SF (data not shown). Taken together these data show that H_2O_2 stress can induce Ets-1 modification by SUMO-2

Ets-1 is modified by SUMO at Lysine residues 15 and 227
In order to identify SUMO modification sites in Ets-1, we analysed the amino-acid sequence of Ets-1 by SUMOplot software (http://www.expasy.org/tools), which indicated the presence of four putative sumoylation motifs: $IK^{15}TE$, $LK^{200}YE$, $IK^{227}QE$ and $VK^{436}PD$ (Figure 2a). Four Ets-1 mutants were then generated: K15R, K200R, K227R and K436R, with lysine to arginine point mutations.

Following co-transfection of HA-tagged Ets-1 wild-type (WT) or mutants and His-tagged SUMO-2 in COS-7 cells, cell lysates were subjected to nickel affinity pull-down assay and ETS1-SUMO-2 conjugates were detected by immunoblotting (Figure 2b). Using WT Ets-1, we detected sumoylated forms of Ets-1 at ~75 and ~90 kDa, as well as at ~110 kDa, as a minor form.

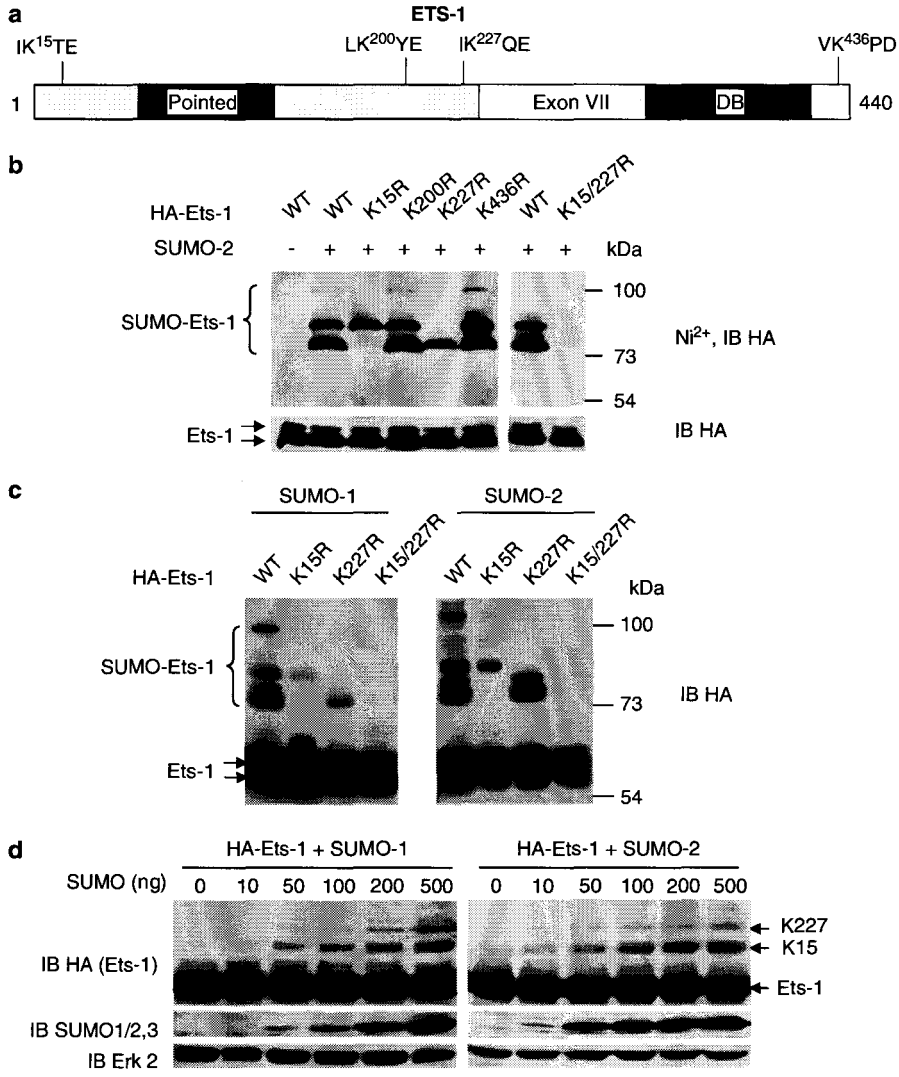


Figure 2 Identification of SUMO modification sites in ETS-1. (**a**) Schematic representation of the four putative consensus sumoylation sites (1K*X*E) and domain structure in murine Ets-1. Pointed domain (pointed, black) (Slupsky *et al.*, 1998) and DNA-binding domain (DB, black) (Donaldson *et al.*, 1996) are indicated. The transactivation domain (gray) and the central regulatory domain corresponding to exon VII are also indicated. (**b**) COS-7 cells (6×10^5) were co-transfected for 24 h with WT Ets-1 or its KR mutants (0.6 μg) with or without His tagged SUMO-2 (1.4 μg). SUMO-conjugated Ets-1 proteins were isolated by nickel affinity chromatography (Ni^{2+}) and detected using an anti-HA antibody (upper panel). Expression of Ets-1 was directly detected by immunoblotting in the whole cell lysate using an anti-HA antibody (lower panel). (**c**) RK13 cells (3×10^5) were co-transfected with WT Ets-1 or its KR mutants (0.3 μg) with or without His tagged SUMO-1 or SUMO-2 (0.7 μg). Ets-1 species were detected by immunoblotting using an anti-HA antibody. (**d**) RK13 cells (3×10^5) were transiently transfected with 1 μg plasmid including a fixed amount of Ets-1 plasmid (0.5 μg) and an increasing amount of SUMO-1 or SUMO-2 plasmids (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5 μg). Ets-1 was detected by immunoblotting using anti-HA (top panel) antibody, SUMO-1 or SUMO-2 were detected by anti-SUMO-1 and anti-SUMO 2/3 antibody, respectively (middle panel). Filter was stripped and reprobed with an anti-Erk 2 antibody (lower panel).

The K200R and K436R Ets-1 mutants gave a profile similar to WT Ets-1, showing that they are not lysine sumoylation acceptor sites.

In contrast, the K15R and K227R Ets-1 mutants gave distinct profiles compared to WT Ets-1 (Figure 2b). The 75 and the 90 kDa sumoylated forms of Ets-1 were not detected using the K15R and the K227R Ets-1 mutant, respectively, and the additional minor band of ~110 kDa band disappeared using either the K15R or the K227R mutant, indicating that both K15 and K227 lysine residues are SUMO acceptor sites. Nonetheless, the specific disappearance of a sumoylated form of Ets-1 for K15 and K227 mutants at a different molecular weight was not expected (K15R and K227R leading to disappearance of the 75 and 90 kDa band, respectively). According to these molecular weights, it is possible that

the number of SUMO proteins attaching to K15 and K227 are distinct. Alternatively, both sites are similarly sumoylated and depending on the position of the lysine residue in the sequence of Ets-1, their SUMO modification alters differently their conformation, resulting in their migration in gel electophoresis at different molecular sizes. It should be noticed that this second possibility is commonly observed for SUMO-modified molecules and was recently established for the BKLF transcription factor, which similarly contains two lysine SUMO acceptor sites (Perdomo *et al.*, 2005).

These results with individual mutants indicate that both K15 and K227 lysine residues are SUMO acceptor sites and this was confirmed using a K15R/K227R double mutant. Indeed, all sumoylated forms of Ets-1 were abolished using the K15R/K227R double mutant (Figure 2b) and similar results were obtained using either SUMO-1 or SUMO-2 in RK13 cells (Figure 2c). We further examined the contribution of each site by titrating levels of SUMO-1 and SUMO-2 in RK13 cells. The results showed that both K15 and K227 sites are modified by SUMO-1 or SUMO-2, with K15 having a higher affinity for SUMO than K227 (Figure 2d). These data show that Ets-1 is modified by monosumoylation at lysine residues 15 and 227.

Ets-1 sumoylation is regulated by enzymes of the SUMO pathway

As Ubc9 has been identified as an interaction partner of Ets-1 (Hahn *et al.*, 1997), we asked whether Ubc9 can enhance Ets-1 sumoylation. RK13 cells were co-transfected with expression plasmids encoding Ets-1, SUMO-2 and/or Ubc9 and the results were analysed by immunoblotting using an anti-HA antibody to detect Ets-1 species (Figure 3a). Ubc9 was found to increase sumoylation of conjugated Ets-1 species, and in particular by leading to the generation of higher molecular weight forms of Ets-1 that may result form enhanced polysumoylation at K15 and K227 or from polysumoylation at multiple lysines, in addition to K15 and K227. To investigate whether Ubc9 directly affected Ets-1 sumolylation, we used the sumoylation-defective mutant, Ubc9-C93S, which abrogates the formation of a thioester bond between SUMO and Ubc9 (Desterro *et al.*, 1997). The Ubc9 inactive mutant was found to decrease strongly Ets-1 sumoylation. The double K15/227R mutant of Ets-1 was not modified by SUMO-2, neither when transfected alone nor when co-transfected with Ubc9 WT or mutant. These data show that Ubc9 acts as an E2 SUMO conjugating enzyme contributing to SUMO modification of Ets-1.

PIAS family proteins are conserved SUMO E3 ligases that can enhance SUMO conjugation of various targets (Schmidt and Muller, 2003). In man, four PIAS genes have been identified (PIAS1, PIAS3, PIASx and PIASy) which encode proteins that share a similar domain structure, but differ in their specificity of interaction with other proteins. We investigated the possibility that PIASy can enhance Ets-1 sumoylation in RK13 cells. Cells were co-transfected with Ets-1 (WT or KR mutant), SUMO-2 and/or PIASy (WT or inactive W363A mutant), and the results were analysed by immunoblotting (Figure 3b). Similarly to Ubc9, PIASy was found to increase sumoylation of conjugated Ets-1 species and to generate higher molecular weight forms of Ets-1 The double K15/227R mutant of Ets-1 was not modified by SUMO-2, neither when transfected alone nor when co-transfected with PIASy WT or mutant.

We then analysed whether PIASy can interact with Ets-1. Following their transfection, PIASy was immunoprecipitated using an anti-Flag antibody and the samples were immunoblotted using an anti-HA antibody to detect Ets-1. PIASy was found to interact with Ets-1, as well as with the K15R/K227R Ets-1 mutant (Figure 3c), showing that PIASy interacts with Ets-1 independently of its SUMO acceptor sites. The fact that PIASy favors Ets-1 sumoylation and interacts with Ets-1 shows that PIASy acts as an E3 ligase for SUMO modification of Ets-1.

The SUMO pathway is reversible by means of specific isopeptidases, including SENP1 (Cheng *et al.*, 2004). We investigated the possibility that SENP1 can reverse Ets-1 sumoylation in RK13 cells. Cells were co-transfected with Ets-1 (WT or K15R/K227R mutant), SUMO-2 and/or SENP1 (WT or R360L/K631M mutant), and the results were analysed by immunoblotting. SENP1 was found to desumoylate all conjugated Ets-1 species, in contrast to its mutant version (Figure 3d).

Ets-1 is ubiquitinylated independently of the SUMO modification sites

SUMO and ubiquitin are covalently attached to lysine residues of target proteins and in some cases these post-translational modifications occur at the same lysine residues (Desterro *et al.*, 1998). To investigate this, we first explored whether Ets-1 can undergo ubiquitinylation. HEK293T cells were co-transfected with HA-tagged Ets-1 and His-tagged ubiquitin and then treated for 6 h with MG132, a proteasome inhibitor. Ubiquitin-binding proteins were purified by nickel affinity chromatography and Ets-1 was detected by immunoblotting using an anti-HA antibody. A ladder of higher molecular weight ubiquitinated Ets-1 products was detected only in the case of co-transfection of ubiquitin and Ets-1 (Figure 4a). We then transfected cells with an ubiquitin K48R mutant, to check whether this protein profile correspond to polyubiquitinylation through K48 linkages. This mutant prevented formation of the ladder of higher molecular weight-ubiquitinylated Ets-1 products (Figure 4a). A remaining ubiquitinylated-Ets1 conjugated band of about 65 kDa was detected, which can correspond to a single ubiquitin K48R mutant conjugated to Ets-1. By immunoblotting of the whole cell lysate, we noticed that co-expression of ubiquitin and Ets-1 yielded to an increase in Ets-1 signal detection. This result cannot be simply explained by a stabilization of Ets-1 ubiquitinylated forms in the presence of proteasome inhibitor, since a similar result was obtained in the absence of MG132, and was also obtained using MG101, another proteasome inhibitor

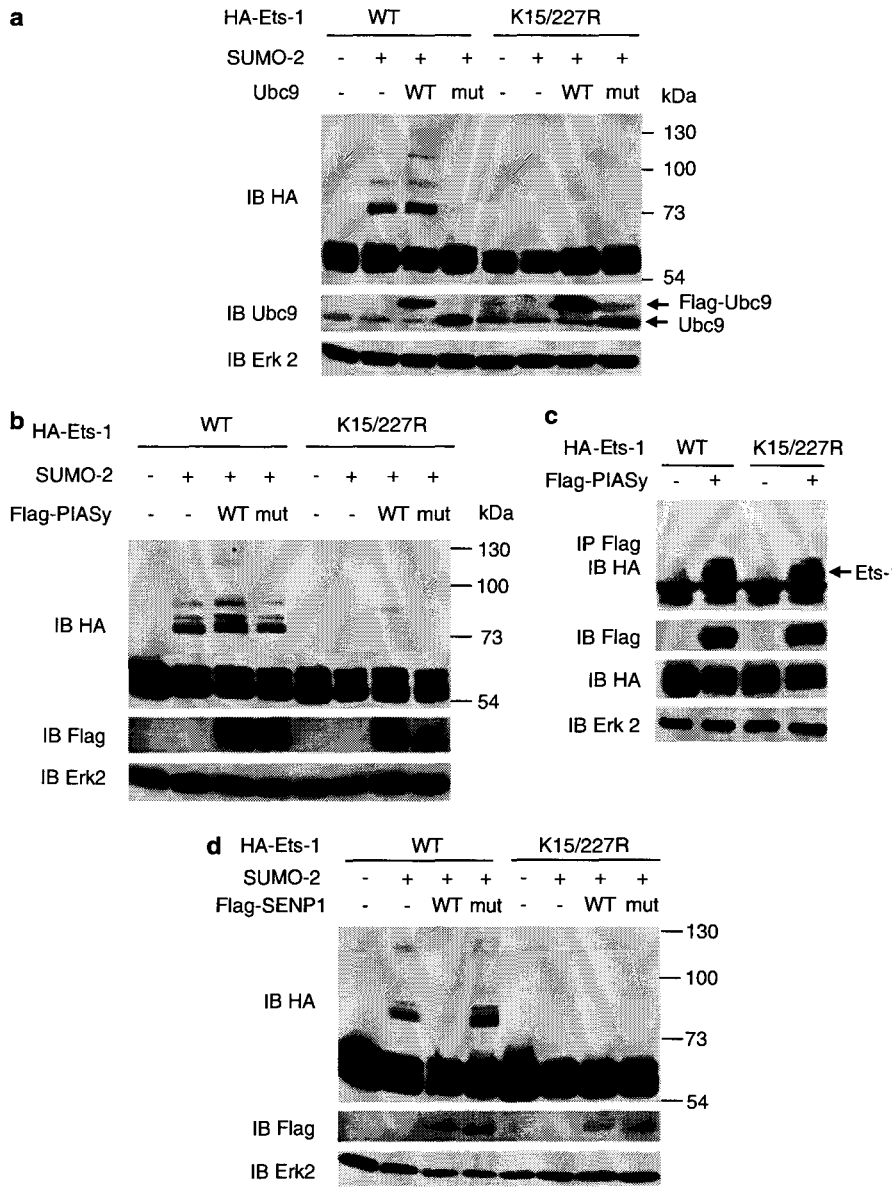


Figure 3 Regulation of Ets-1 sumoylation by SUMO modification enzymes. (**a**) RK13 cells (3×10^5) were transfected with expression plasmids encoding WT or K15/227R mutant of Ets-1 (0.3 μg), His-SUMO-2 (0.7 μg), Flag-tagged Ubc9 (Ubc9 WT) or inactive mutant Ubc9/C93S (Ubc9 mut) (0.5 μg). Ets-1 was detected by immunoblotting using an anti-HA antibody (upper panel). The expression of either Ubc9 or Ubc9/C93S was detected with an anti-Ubc9 antibody, which also detected endogenous Ubc9 (middle panel). As only Ubc9 is Flag-tagged, Ubc9 migrated at a higher molecular weight than Ubc9-C93S. The filter was stripped and reprobed using an anti-Erk2 antibody (lower panel). (**b**) RK13 cells (3×10^5) were co-transfected for 24 h with HA-tagged WT or K15/227R mutant of Ets-1 (0.3 μg) and Flag-tagged PIASy WT (PIASy WT) or inactive W363A mutant (PIASy mut) (0.05 μg) with or without SUMO-2 (0.5 μg). Ets-1 was detected by immunoblotting using an anti-HA antibody (top panel). The expression of WT or mutant PIASy was detected using an anti-Flag antibody (middle panel). The filter was stripped and reprobed using an anti-Erk2 antibody (lower panel). (**c**) RK13 cells (2×10^6) were transfected for 24 h with HA-tagged wildtype Ets-1 (WT) or the K15R/K227R Ets-1 mutant (KR) (5 μg) alone or in combination with Flag-tagged PIASy (5 μg). Following immunoprecipitation of PIASy proteins with an anti-Flag antibody, Ets-1 proteins were detected using an anti-HA antibody (top panel). The expression of PIASy (Flag antibody) and Ets-1 (HA antibody) in whole cell lysate is also shown. The filter was stripped and reprobed using an anti-Erk2 antibody (lower panel). (**d**) RK13 cells (3×10^5) were co-transfected for 24 h with HA-tagged WT or K15/227R mutant of Ets-1 (0.3 μg) and Flag-tagged SENP1 WT (SENP1 WT) or R360L/K631M mutant (SENP1 mut) (0.2 μg) with or without SUMO-2 (0.5 μg). Ets-1 was detected by immunoblotting using an anti-HA antibody (top panel). The expression of WT or mutant SENP1 was detected using anti-Flag antibody (middle panel). The filter was stripped and reprobed using an anti-Erk2 antibody (lower panel).

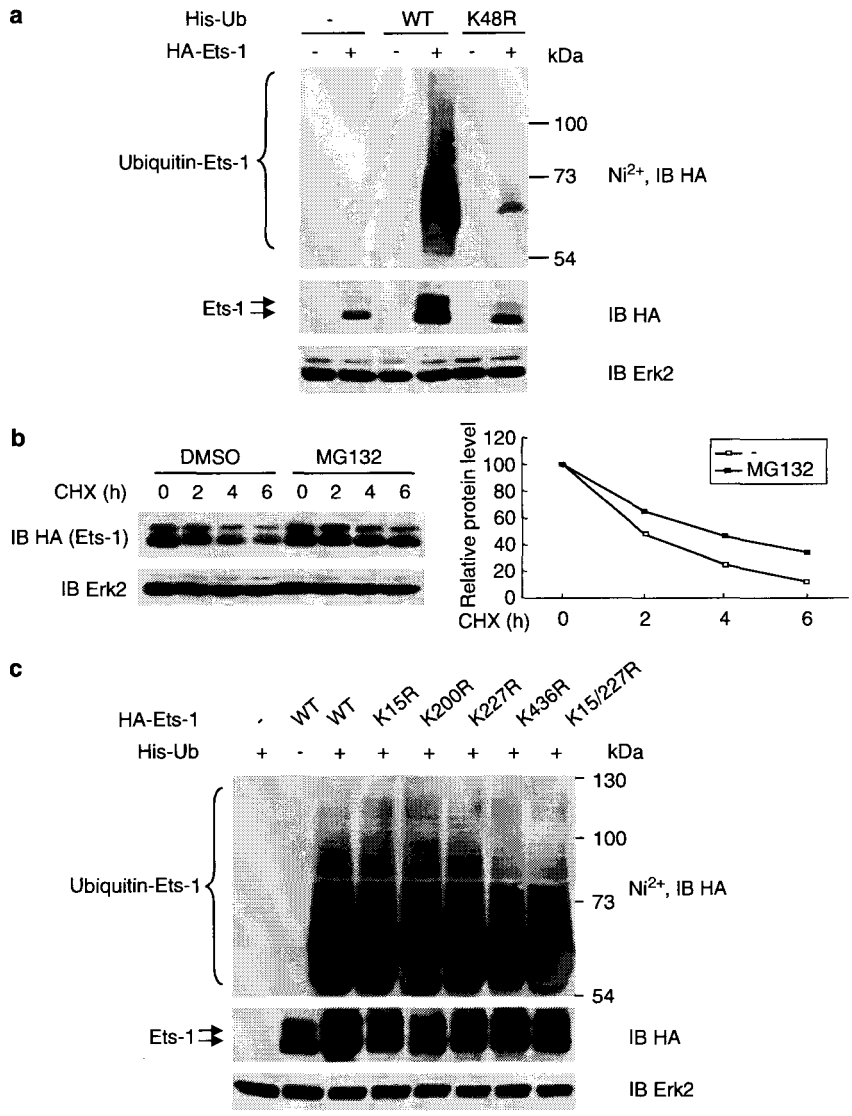


Figure 4 Ets-1 is a target for K48-linked ubiquitinylation and disruption of the sumoylation site does not prevent Ets-1 ubiquitinylation. (**a**) HEK293T cells (6×10^5) were co-transfected with HA-tagged Ets-1 (0.6 μg) and His-tagged WT ubiquitin or its mutant version K48R (1.4 μg) for 24 h. Cells were then treated with 25 μM MG132 for 6 h. Ubiquitin-modified Ets-1 was purified by nickel affinity chromatography (Ni^{2+}) and was detected by immunoblotting using an anti-HA antibody (top panel). The expression of Ets-1 in whole cell lysate was detected by immunoblotting using an anti-HA antibody (middle panel). The filter was stripped and reprobed using anti-Erk 2 antibody (lower panel). (**b**) COS-7 cells were transfected with HA-tagged Ets-1 for 24 h. The cells were then treated or not with 25 μM MG132 for 1 h, followed by addition of CHX (25 μg/ml) for the indicated times. At the end of the experiment, 50 μg of cell lysates were subjected to SDS–PAGE and Ets-1 was detected by immunoblotting using an anti-HA antibody (left panel) and chemiluminescence intensity was quantified (right panel). The filter was stripped and reprobed using an anti-Erk 2 antibody (lower panel). (**c**) HEK293T cells (6×10^5 cells) were co-transfected with HA-tagged Ets-1 (WT or K15R, K200R, K227R, K436R or K15R/K227R mutants, 0.6 μg) and His-tagged ubiquitin (1.4 μg) for 24 h and then were treated by 25 μM MG132 for another 6 h. Ubiquitin-modified Ets-1 was purified and analyzed as described above (top panel). The expressions of Ets-1 (middle panel) and Erk 2 (lower panel) in cell lysate are also shown.

(data not shown). Overall, our results show that Ets-1 is mainly modified by K48-linked polyubiquitinylation.

As K48-linked polyubiquitinylation of a target protein represents a signal for its degradation by the 26S proteasome-dependent pathway (Hershko and Ciechanover, 1998), we examined whether Ets-1 can be degraded by the proteasome. Under conditions of protein synthesis inhibition by cycloheximide (CHX), we checked the effect of the 26S proteasome inhibitor MG132 on Ets-1 stability. Results were analysed by immunoblotting (Figure 4b, left panel) and quantified (Figure 4b, right panel). Protein level of Ets-1 was

higher in the presence of MG132, showing that Ets-1 is degraded by the 26S proteasome pathway.

We then assayed whether disruption of the lysine sumoylation acceptor sites prevented Ets-1 ubiquitinylation. We transiently co-transfected HEK293T cells with ubiquitin and WT Ets-1 or its corresponding mutants K15R, K200R, K227R, K436R or K15R/K227R. Ubiquitin-conjugated Ets-1 species were detected by nickel affinity pull down assay. We found that Ets-1 WT and KR mutants were ubiquitinylated at similar levels (Figure 4c), showing that disruption of the Ets-1 sumoylation sites does not prevent Ets-1 polyubiquitinylation.

Effects of sumoylation on Ets-1 stability and subcellular localization

We investigated whether SUMO modification can affect Ets-1 stability. Ets-1 WT or non-sumoylable mutant K15R/K227R were expressed in RK13 cells and then treated with CHX for various periods of time. Results were analysed by immunoblotting (Figure 5a). Both Ets-1 WT and K15R/K227R mutant had a similar steady-state under CHX treatment, with a half-life of about 45 min. Nonetheless, we noticed a slight increase of the stability of the K15R/K227R mutant, indicating that these mutations affected Ets-1 stability.

We then compared the stability of non-sumoylated and sumoylated forms of Ets-1. SUMO-2 and Ets-1 WT were co-transfected in RK13 cells and were then treated with CHX for the indicated times. Results were analysed by immunoblotting (Figure 5b). The sumoylated and non-sumoylated forms of Ets-1 had a similar steady state. These results show that SUMO modification of Ets-1 has no major effect on its stability.

We also asked whether sumoylation of Ets-1 modified its subcellular localization. MDCK cells were transfected with Ets-1 WT or mutant K15R/K227R with or without SUMO-2, and localization was performed using indirect immunoflorescence microscopy. Ets-1 WT or K15R/K227R mutant were detected in the nucleus. Overexpression of SUMO-2 did not affect significantly the nuclear localization of Ets-1 (Figure 5c). We also found that H_2O_2 treatment did not modify Ets-1 subcellular localization in the presence of SUMO-2 (data not shown). These results indicate that SUMO modification of Ets-1 does not affect its localization.

Effects of SUMO modification on Ets-1 transcriptional activity

Sumoylation has been reported to affect the transcriptional activity of various transcription factors. We examined the effect of SUMO-2 on the transcriptional

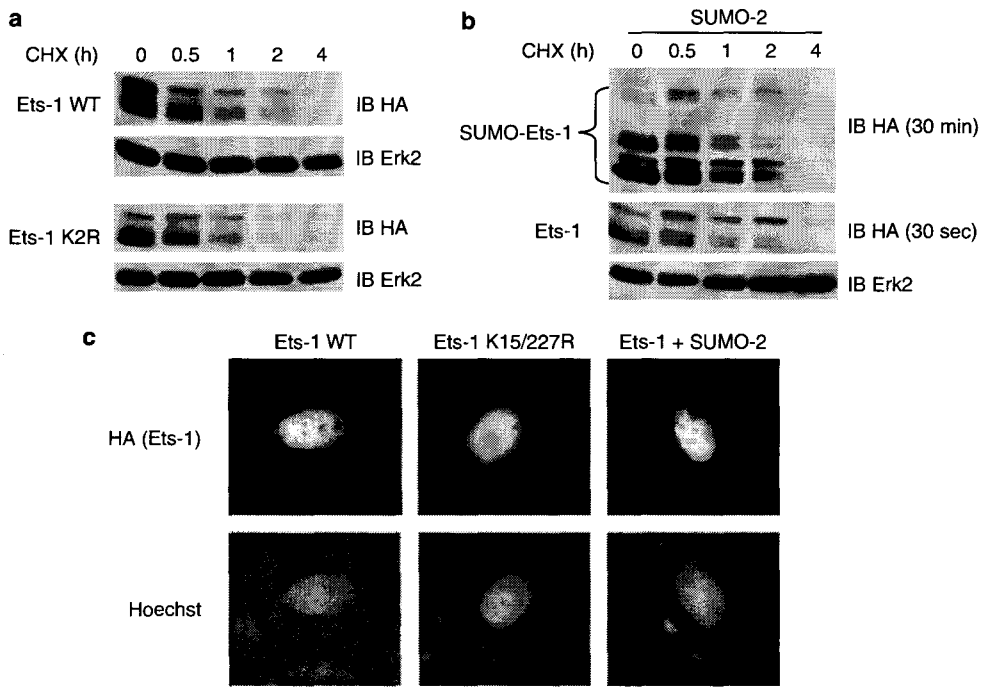


Figure 5 Effects of sumoylation on Ets-1 stability and subcellular localization. (**a**) RK13 cells (3×10^5 cells) were transfected with HA-tagged Ets-1 WT or mutant K15R/K227R (0.5 μg). The following day, cells were treated with 25 μg/ml CHX for the indicated times. Ets-1 proteins were detected by immunoblotting using anti-HA antibody (left panel). The membrane was stripped and reprobed using an anti-Erk 2 antibody. (**b**) RK13 cells (3×10^5) were transfected with HA-tagged WT or K15/227 mutant of Ets-1 (0.3 μg) in the presence or absence of SUMO-2 plasmid (0.7 μg). The following day, cells were treated with 25 μg/ml CHX for the indicated times. Ets-1 proteins were detected by immunoblotting using an anti-HA antibody (left panel). Time exposure was of 30 min for the sumoylated forms of Ets-1 and of 30 s for the non-sumoylated form, to avoid saturation of the signal. The membrane was stripped and reprobed using an anti-Erk 2 antibody. (**c**) MDCK cells (5×10^4) were seeded on glass cover slips and transfected with WT or KR mutant HA-tagged Ets-1 (0.3 μg) in the presence or absence of SUMO-2 (0.7 μg). Ets-1 expression was detected by immunofluorescence using an anti-HA antibody. Nuclei were visualized by Hoechst staining.

response to Ets-1 using a RAS-Responsive Element (RRE)-Luc reporter vector, which contains three combined Ets/AP1-binding sites in HEK293T cells. SUMO-2 was found to repress the transcriptional response to Ets-1 (Figure 6a). Similar results were obtained with SUMO-1 in RK13 cells (data not shown). Conversely, we challenged the ability of Ets-1 WT and sumoylation mutants (K15R, K227R and K15R/K227R) to transactivate this RRE-luc reporter vector. The Ets-1 single site sumoylation K15R and K227R mutants were more efficient in inducing a transcriptional response than WT Ets-1, and the double K15R/K227R mutant gave an additional increase of transcriptional response in HEK293T cells (Figure 6b). Similar results were obtained in RK13 cells, with the single and double Ets-1 mutants leading to the same enhancement of a transcriptional response (Figure 6c). We also examined distinct Ets-dependent reporter genes, that is the E74-luc reporter vector which contains three Ets-binding sites and the ICAM-1-luc reporter vector in which transcription is directed from the human ICAM-1 promoter containing two Ets-binding sites (de Launoit *et al.*, 1998). Enhancement of the transcriptional response using the double Ets-1 sumoylation mutant was observed for both reporter vectors (Figure 6d and data not shown). These results show that expression of SUMO represses a transcriptional response to Ets-1, while disruption of the Ets-1 SUMO modification sites enhance it.

We then investigated whether the transcriptional response to Ets-1 was modified by enzymes of the SUMO pathway. To this purpose, cells were co-transfected with Ets-1 WT or sumoylation mutant K15R/K227R and the inactive C93S mutant version of Ubc9 (Ubc9 mut) (Figure 6e). While mutant Ubc9 enhanced the transcriptional response to Ets-1, it did not impair increased transcription by the sumoylation mutant K15R/K227R Ets-1, indicating that sumoylation activity of Ubc9 is involved in the transcriptional response to Ets-1. Nonetheless, in agreement with a previous report (Hahn *et al.*, 1997), we found that the WT version of Ubc9 both enhanced the transcriptional response to Ets-1 WT and K15R/K227R mutant (data not shown). It remains possible that Ubc9 in addition to its sumoylation activity can function as a co-activator in transcription and that these activities are separable, as previously demonstrated for the COUP-TF1 transcription factor (Kurihara *et al.*, 2005). To further examine the contribution of the enzymes of the SUMO pathway, we analysed the effect of the SENP1 protease, that we demonstrated to be effective in desumoylating Ets-1 (Figure 3d). Cells were co-transfected with Ets-1 WT or sumoylation mutant K15R/K227R and the WT or inactive R360L/K631M mutant of SENP1 (Figure 6f). While SENP1 WT enhanced the transcriptional response to Ets-1, its mutant version was ineffective. In contrast, SENP1 WT and inactive mutant did not impair increased transcription by the Ets-1 sumoylation mutant K15R/K227R. Thus, desumoylation of Ets-1 by means of a specific SUMO protease enhances its transcriptional activity, and this confirmed that the transcriptional activity of Ets-1 is inhibited by the SUMO pathway.

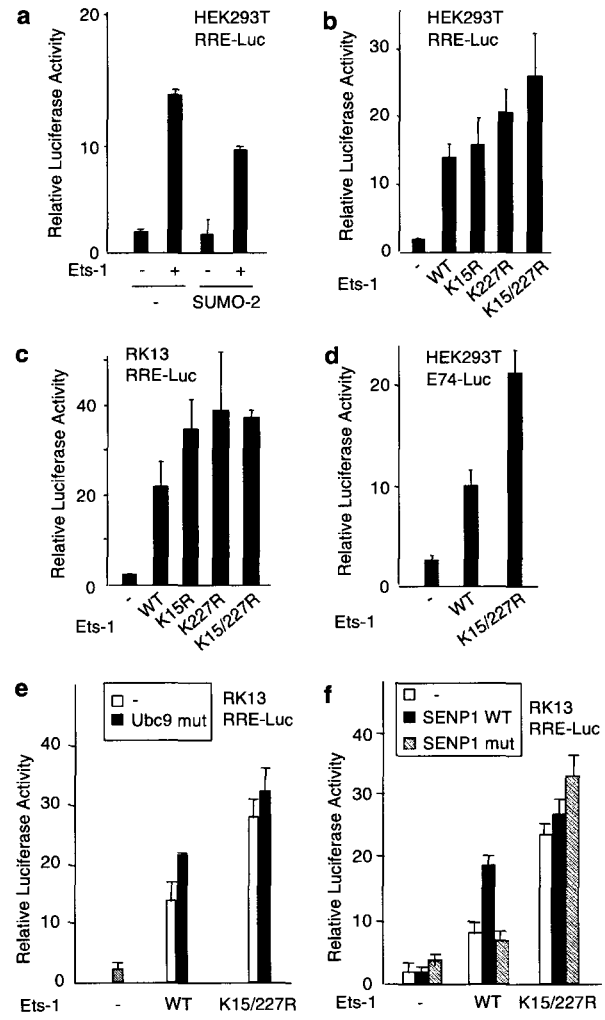


Figure 6 Effects of SUMO on Ets-1-dependent transcription. (**a**) HEK293T cells were co-transfected with the RRE-Luc reporter vector and HA-Ets-1 in the absence or presence of SUMO-2. At the end of the experiment, luciferase activities were determined in cell extracts. Results are means ± s.d. of triplicate samples. (**b–d**) HEK293T (**b**) or RK13 cells (**c**) were co-transfected with the RRE-Luc reporter vector and HA-Ets-1 WT or mutants (K15R, K227R or K15R/K227R). HEK293T cells (**d**) were co-transfected with the 3 × E74-TK-Luc (E74-luc) reporter vector and Ets-1 WT or mutant K15R/K227R. Luciferase activities were analysed as described in (**a**). (**e**, **f**) RK13 cells were co-transfected with the RRE-Luc reporter vector, WT and K15/227R mutant of Ets-1 and (**e**): C93S mutant of Ubc 9 (Ubc9 mut) or (**f**): SENP1 WT (SENP1 WT) or R360L/K631M mutant (SENP1 mut). Luciferase activities were analysed as described in (**a**).

Discussion

Ets-1 transcriptional activity is known to be regulated by phosphorylation via RAS and Ca^{2+}-dependent

protein kinase pathways (Rabault and Ghysdael, 1994; Rabault *et al.*, 1996; Wasylyk *et al.*, 1997; Slupsky *et al.*, 1998; Cowley and Graves, 2000; Paumelle *et al.*, 2002). Here, we demonstrated that Ets-1 is also modified by other post-translational modifications, that is sumoylation and ubiquitinylation. Ets-1 is modified by sumoylation at lysines K15 and K227 and these residues are not required for its 48K-linked polyubiquitinylation. These modifications appear to distinctly regulate Ets-1 activity, with polyubiquitinylation regulating its protein stability and sumoylation reducing its transcriptional activity.

In the SUMO cycle, target proteins are reversibly conjugated with SUMO chains via isopeptide bonds, catalysed by the sequential actions of E1 activating enzyme (Uba2/Aos1), E2 conjugating enzyme (Ubc9) and E3 ligases (PIAS, RanBP2 or Pc2) (see (Hay, 2005). As Ets-1 has been reported as a partner of Ubc9 (Hahn *et al.*, 1997), the only known E2 conjugation enzyme for SUMO (Desterro *et al.*, 1997; Johnson and Blobel, 1997), the possibility was raised that Ets-1 could be modified by sumoylation. Our data reveal that Ets-1 indeed undergoes SUMO modifications, with Ubc9 being able to enhance sumoylation of Ets-1. We also examined whether PIAS proteins can act as E3 ligases for SUMO modification of Ets-1, since these proteins can enhance SUMO conjugation of many transcription factors, including ETS transcription factors, such as Elk-1 (Yang and Sharrocks, 2005) and Net (Wasylyk *et al.*, 2005). Our data show that PIASy is able to interact and to enhance sumoylation of Ets-1. Finally, the SENP1 SUMO protease was found to desumoylate Ets-1 confirming that enzymes of the SUMO pathway are effective in modifying Ets-1. Although, these data demonstrated sumoylation of Ets-1 by enforced expression, we were not able to convincingly demonstrate endogenous sumoylation of Ets-1. As reported by others, we can mention that usually only a small fraction of the substrate, often $<1\%$, is sumoylated at any given time, with possibly SUMO-cleaving enzymes rapidly desumoylating all conjugates (reviewed by Johnson (2004)). We decided to further address the question of the sumoylation of Ets-1 by identifying the sumoylation sites and by exploring the role of SUMO in regulating Ets-1 activity.

Among the four putative sumoylation consensus motifs: $IK^{15}TE$, $LK^{200}YE$, $IK^{227}QE$ and $VK^{436}PD$ in the sequence of Ets-1, we identified lysine residues K15 and K227 as being the effective SUMO acceptor sites. Indeed, the sumoylation profile of Ets-1 consisted in two major sumoylated Ets-1 bands having a molecular mass of ~ 75 and ~ 90 kDa and a minor band at ~ 110 kDa and all these bands were abolished using the double Ets-1 K15R/K277R mutant. A recent structural study adds to the knowledge of recognition of SUMO by Ets-1 (Macauley *et al.*, 2005). These authors also identified K15 as being a SUMO-1 acceptor site in Ets-1. Using NMR spectroscopy, they show that the covalent attachment of SUMO-1 to the N-terminal part of Ets-1 (1-118) does not perturb the structure and dynamic properties of either SUMO-1 or of the flexible N-terminal segment of Ets-1, suggesting that SUMO-1 and Ets-1 may retain their independent conformation, when SUMO-1 is attached to K15.

The physiological mechanisms that regulate sumoylation of target proteins are far to be understood. Following short time exposure of epithelial cells either to growth factor stimulation or to various stresses, we found that only H_2O_2 led to a strong stimulation of Ets-1 sumoylation by SUMO-2. This is in agreement with previous demonstrations that SUMO-2 is involved in cellular responses to environmental stress, such as oxidative stress (Degerny *et al.*, 2005) or acute temperature fluctuation (Saitoh and Hinchey, 2000). Whether this increased sumoylation of Ets-1 by H_2O_2 has a functional consequence on Ets-1 activity, in particular in modifying resistance of cells to stress remains to be determined.

Both SUMO and ubiquitin are linked to proteins through lysine residues and some SUMO target proteins were also found to be modified by ubiquitin. By investigating this possibility, we found that in addition to be sumoylated, Ets-1 is ubiquitinylated. The ubiquitinylation profile of Ets-1 consisted in a ladder of high molecular weight-ubiquitinylated Ets-1 products. This ladder was prevented using an ubiquitin K48R mutant, showing that Ets-1 is mainly modified by K48-linked polyubiquitinylation. Of interest, it was found in some cases that target proteins can be modified by sumoylation and ubiquitinylation at the same lysine residue (Desterro *et al.*, 1998; Hoege *et al.*, 2002). For example, IκB is modified at Lys^{21} both by SUMO-1 and ubiquitin, and the SUMO-1 modified IκB cannot be ubiquitinylated and is resistant to proteasome-mediated degradation (Desterro *et al.*, 1998). These results demonstrated antagonistic action of SUMO-1 and ubiquitin modifications on IκB protein, with sumoylation stabilizing the target protein by competition with ubiquitin. We rather found that disruption of the Ets-1 sumoylation acceptor sites did not prevent Ets-1 polyubiquitinylation, showing that Ets-1 can be polyubiquitinylated independently of lysine residues 15 and 227. We further investigated whether sumoylation or ubiquitinylation of Ets-1 modified its protein stability. Ets-1 was protected from degradation by a 26S proteasome inhibitor, indicating that K48-linked polyubiquitinylated forms of Ets-1 were degraded through the 26S proteasome pathway. In contrast, we found no major effect of the sumoylation of Ets-1 on its stability, with the sumoylated forms of Ets-1 being degraded at a similar rate than non-sumoylated forms of Ets-1. Taken together, these data show that Ets-1 can be modified both by sumoylation and ubiquitinylation and we did not evidence an antagonistic effect of SUMO on the polyubiquitinylation or degradation of Ets-1.

Modification of transcription factor by SUMO is known to be an important regulation mechanism for the transcriptional activity of these targets. Sumoylation of transcription factors and co-factors inhibits transcription in most cases and activates transcription in others (Seeler and Dejean, 2003; Johnson, 2004; Muller *et al.*, 2004). We found that sumoylation of Ets-1 leads to reduced transcription, with the sumoylation defective

mutants having a greater capacity to activate transcription than Ets-1. Of interest, we demonstrated that lysines K15 and K227 sumoylation sites in Ets-1 are the critical lysine sites previously identified in synergistic control (SC) motifs, which repress synergistic transcription from promoters containing multiple ETS-binding sites (Iniguez-Lluhi and Pearce, 2000) or combined ETS/AP1 binding sites, as demonstrated in this study. It was commonly found that Ets-1 is a weak modulator of gene expression by itself, while its activity is greatly increased by interaction with partner proteins (Crepieux *et al.*, 1994; Dittmer, 2003). The proposed mechanisms involve interaction with either DNA-bound or non-DNA-binding transcription factors. Our present data show that modification of Ets-1 by sumoylation is an additional mechanism for regulating its transcriptional activity.

In conclusion, we have identified sumoylation and ubiquitinylation as two novel post-translational modifications for Ets-1. Sumoylation does not affect ubiquitinylation and protein stability, but does modulate transcriptional activity of Ets-1. Our data reflect the diversity of outcomes that can result from the action of these two modifiers.

Materials and methods

Cell culture, reagents and antibodies

HEK293T, COS-7, MDCK and RK13 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen). Human recombinant HGF/SF and TNFα were purchased from PeproTech Inc (Rocky Hill, NJ, USA), Anisomycin and MG132 from Calbiochem (San Diego, CA, USA), H_2O_2 from Merck (Eurolab, Fontenay, France) and CHX from ICN Biochemicals Inc. (Aurora, Ohio, USA). Anti-Flag M5 and anti-Flag M2 monoclonal antibody (Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, MI, USA) were used for immunoblotting and immunoprecipitation, respectively. Anti-HA mouse monoclonal antibody was purchased from Babco (Richmond, CA, USA), SUMO-1 and SUMO-2/3 from Abgent (San Diego, CA, USA), and anti-Ubc9 and anti-Erk2 from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA).

Plasmids

His_6-SUMO-1, -2, -3 expression vectors and Flag-tagged Ubc9 and its C93S mutant (without tag) expression plasmids were a generous gift from Dr Ron Hay (University of St Andrew, St Andrews, UK). His-Ubiquitin (WT and K48R mutant) plasmids were a gift from Dr M Benkirane (IGH, Montpellier, France). PIASy plasmid was kindly provided by Dr Maria Estela Andres (Catholic University of Chile, Santiago, Chile) and the PIASy (W363A) inactive mutant was constructed using a QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and was verified by DNA sequencing. SENP1 WT and inactive mutant (R360L, K631M) expression vectors were kindly provided by Dr ETH Yeh (University of Texas-MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA) (Cheng *et al.*, 2004). The murine Ets-1 expression vector (pcDNA3-HA-Ets-1^{1-440}) was previously described (Paumelle *et al.*, 2002). HA-tagged pcDNA3-Ets-1 K15R, K200R, K227R, K436R and K15R/K227R mutants, were constructed using the QuickChange site-directed mutagenesis kit and were verified by DNA sequencing.

Luciferase reporter vectors used were as follows: the RAS-Responsive Element (RRE)-Luc reporter contains three tandem copies of polyoma-virus enhancer derived sequence, with EBS/AP1-binding sites linked to the thymidine kinase promoter (Fafeur *et al.*, 1997); the E74-Luc vector contains three E74 Ets-binding sites cloned upstream from the minimal thymidine kinase promoter (Janknecht and Nordheim, 1996). The pSG5-βGal vector was used to normalize transfections.

Transfection

RK13, COS-7 and HEK293T cells were transfected by PEI (Exgen 500 reagent, Euromedex) according to manufacturer's instructions. MDCK cells were transfected with Lipofectamine (Invitrogen) as described previously (Tulasne *et al.*, 1999).

Immunoprecipitation and immunoblotting

For immunoprecipitation, 500 μg cell lysate were incubated with anti-Flag antibody at 4°C for 4 h. The immune complexes were recovered with protein A sepharose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) at 4°C for another 1 h. The immunoprecipitates were separated by sodium dodecyl–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and analysed by immunoblotting and blots were developed using enhanced chemiluminescence (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA), as described previously (Paumelle *et al.*, 2002). As necessary, blots were visualized using a 16-bit charge-coupled device (CCD) cooled camera (Gene Gnome; Syngene) and quantification was carried out using GeneTools software (Syngene, Frederick, MA, USA).

For detecting sumoylation of Ets-1 by immunoblotting, transfected cells were scrapped into 200 μl phosphate-buffered saline (PBS). After brief centrifuge, 100 μl supernatant were mixed immediately with 100 μl 2 × Laemmli gel loading buffer (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 4.4% SDS, 20% glycerol, 2% 2-mercaptoethanol, and bromophenol blue in distilled/deionized water) and boiled for 5 min. Proteins were then separated by SDS–PAGE and immunoblotted using an anti-HA antibody. This procedure prevents action of isopeptidases and thus preserves SUMO modifications of target substrates.

Nickel affinity pull-down assay

His-SUMO-Ets-1 or His-Ub-Ets-1 conjugates were purified by Nickel affinity pull down assay, as described previously (Degerny *et al.*, 2005). Briefly, following their transfection, cells were lysed in denaturing buffer (6 M guanidinium-HCl, 0.1 M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0) and incubated with Ni^{2+}–NTA beads (Qiagen, Valencia, CA, USA) for 2-3 h at room temperature. The beads were washed twice with lysis buffer, three times with wash buffer containing 8 M urea, 0.1 M Na_2PO_4/NaH_2PO_4, 0.01 M Tris-HCl, pH 6.3, and once with PBS. Bound proteins were resuspended in Laemmli gel loading buffer and separated by SDS–PAGE, His-SUMO-Ets-1 or His-Ub-Ets-1 conjugates were detected by immunoblotting using the anti-HA antibody.

Immunofluorescence microscopy

MDCK cells (5×10^4 cells/24 mm-dish) were cultured for 1 day in DMEM-10% FCS on glass cover slips and were transfected by Lipofectamine. At 24 h after transfection, cells were fixed in 4% paraformaldehyde, then incubated for 2 h with 1:1000 diluted anti-HA antibody. This was followed by incubation for 1 h with 1:1000 diluted fluorescein-conjugated anti-mouse IgG (7 μg/ml). Cell nuclei were counterstained using Hoechst 33258.

Luciferase reporter gene assay
Cells (1.5×10^5 cells/well) were grown in DMEM-10% FBS and the next day transient transfections were performed using the PEI procedure with 150 ng of DNA/well including 25 ng of reporter vector, 10 ng of Ets-1 expression vectors and 10 ng of β-galactosidase expression vector. In each transfection, plates were incubated with the same amount of plasmid DNA, completed as necessary with the corresponding empty vector. Luciferase activity was determined 24 h after transfection and normalized with respect to the β-galactosidase activity, as described previously (Degerny *et al.*, 2005).

Acknowledgements

This work was supported by CNRS, Institut Pasteur de Lille, University of Lille 1, University of Lille 2, and INSERM, and by grants from the Fondation de France, the FEDER-Région Nord Pas de Calais and the Ligue Contre le Cancer-Comité Nord. ZJ was supported by a Fondation de France fellowship, NV by a Ligue Nationale Contre le Cancer fellowship, BF by a Institut Pasteur/Région Nord- Pas de Calais fellowship and JD by Association pour la Recherche sur le Cancer fellowship.

References

Bohren KM, Nadkarni V, Song JH, Gabbay KH, Owerbach D. (2004). *J Biol Chem* **279**: 27233–27238.
Bories JC, Willerford DM, Grevin D, Davidson L, Camus A, Martin P *et al.* (1995). *Nature* **377**: 635–638.
Chakrabarti SR, Sood R, Nandi S, Nucifora G. (2000). *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 13281–13285.
Cheng J, Wang D, Wang Z, Yeh ET. (2004). *Mol Cell Biol* **24**: 6021–6028.
Cowley DO, Graves BJ. (2000). *Genes Dev* **14**: 366–376.
Crepieux P, Coll J, Stehelin D. (1994). *Crit Rev Oncogol* **5**: 615–638.
de Launoit Y, Audette M, Pelczar H, Plaza S, Baert JL. (1998). *Oncogene* **16**: 2065–2073.
Degerny C, Monte D, Beaudoin C, Jaffray E, Portois L, Hay RT *et al.* (2005). *J Biol Chem* **280**: 24330–24338.
Desterro JM, Rodriguez MS, Hay RT. (1998). *Mol cell* **2**: 233–239.
Desterro JM, Thomson J, Hay RT. (1997). *FEBS lett* **417**: 297–300.
Dittmer J. (2003). *Mol Cancer* **2**: 29.
Dohmen RJ. (2004). *Biochim Biophys Acta* **1695**: 113–131.
Donaldson LW, Petersen JM, Graves BJ, McIntosh LP. (1996). *EMBO J* **15**: 125–134.
Fafeur V, Tulasne D, Queva C, Vercamer C, Dimster V, Mattot V *et al.* (1997). *Cell Growth Differ* **8**: 655–665.
Haglund K, Dikic I. (2005). *EMBO J* **24**: 3353–3359.
Hahn SL, Wasylyk B, Criqui-Filipe P. (1997). *Oncogene* **15**: 1489–1495.
Hay RT. (2005). *Mol Cell* **18**: 1–12.
Herrera FJ, Triezenberg SJ. (2004). *Curr Biol* **14**: R622–R624.
Hershko A, Ciechanover A. (1998). *Annu Rev Biochem* **67**: 425–479.
Hoege C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S. (2002). *Nature* **419**: 135–141.
Iniguez-Lluhi JA, Pearce D. (2000). *Mol Cell Biol* **20**: 6040–6050.
Janknecht R, Nordheim A. (1996). *Oncogene* **12**: 1961–1969.
Johnson ES, Blobel G. (1997). *J Biol Chem* **272**: 26799–26802.
Johnson ES. (2004). *Annu Rev Biochem* **73**: 355–382.
Kurihara I, Shibata H, Kobayashi S, Suda N, Ikeda Y, Yokota K *et al.* (2005). *J Biol Chem* **280**: 6721–6730.
Leight ER, Glossip D, Kornfeld K. (2005). *Development* **132**: 1047–1056.
Macauley MS, Errington WJ, Scharpf M, Mackereth CD, Blaszczak AG, Graves BJ *et al.* (2005). *J Biol Chem* **281**: 4164–4172.
Matunis MJ, Coutavas E, Blobel G. (1996). *J Cell Biol* **135**: 1457–1470.
Muller S, Ledl A, Schmidt D. (2004). *Oncogene* **23**: 1998–2008.
Muthusamy N, Barton K, Leiden JM. (1995). *Nature* **377**: 639–642.
Oikawa T, Yamada T. (2003). *Gene* **303**: 11–34.
Paumelle R, Tulasne D, Kherrouche Z, Plaza S, Leroy C, Reveneau S *et al.* (2002). *Oncogene* **21**: 2309–2319.
Perdomo J, Verger A, Turner J, Crossley M. (2005). *Mol Cell Biol* **25**: 1549–1559.
Rabault B, Ghysdael J. (1994). *J Biol Chem* **269**: 28143–28151.
Rabault B, Roussel MF, Quang CT, Ghysdael J. (1996). *Oncogene* **13**: 877–881.
Reveneau S, Paumelle R, Deheuninck J, Leroy C, De Launoit Y, Fafeur V. (2003). *Ann NY Acad Sci* **1010**: 100–103.
Rodriguez MS, Dargemont C, Hay RT. (2001). *J Biol Chem* **276**: 12654–12659.
Saitoh H, Hinchey J. (2000). *J Biol Chem* **275**: 6252–6258.
Sampson DA, Wang M, Matunis MJ. (2001). *J Biol Chem* **276**: 21664–21669.
Schmidt D, Muller S. (2003). *Cell Mol Life Sci* **60**: 2561–2574.
Seeler JS, Dejean A. (2003). *Mol Cell Biol* **4**: 690–699.
Slupsky CM, Gentile LN, Donaldson LW, Mackereth CD, Seidel JJ, Graves BJ *et al.* (1998). *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12129–12134.
Takahashi A, Higashino F, Aoyagi M, Yoshida K, Itoh M, Kobayashi M *et al.* (2005). *Biochem Biophys Res Commun* **327**: 575–580.
Tulasne D, Deheuninck J, Lourenco FC, Lamballe F, Ji Z, Leroy C *et al.* (2004). *Mol Cell Biol* **24**: 10328–10339.
Tulasne D, Paumelle R, Weidner KM, Vandenbunder B, Fafeur V. (1999). *Mol Biol Cell* **10**: 551–565.
van den Akker E, Ano S, Shih HM, Wang LC, Pironin M, Palvimo JJ *et al.* (2005). *J Biol Chem* **280**: 38035–38046.
Wasylyk C, Bradford AP, Gutierrez-Hartmann A, Wasylyk B. (1997). *Oncogene* **14**: 899–913.
Wasylyk C, Criqui-Filipe P, Wasylyk B. (2005). *Oncogene* **24**: 820–828.
Wernert N, Gilles F, Fafeur V, Bouali F, Raes MB, Pyke C *et al.* (1994). *Cancer Res* **54**: 5683–5688.
Wernert N, Raes MB, Lassalle P, Dehouck MP, Gosselin B, Vandenbunder B *et al.* (1992). *Am J Pathol* **140**: 119–127.
Xiao GH, Jeffers M, Bellacosa A, Mitsuuchi Y, Vande Woude GF, Testa JR. (2001). *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 247–252.
Yang SH, Jaffray E, Hay RT, Sharrocks AD. (2003). *Mol cell* **12**: 63–74.
Yang SH, Sharrocks AD. (2005). *EMBO J* **24**: 2161–2171.

Oncogene (2007) 26, 415–424
© 2007 Nature Publishing Group All rights reserved 0950-9232/07 $30.00
www.nature.com/onc

ORIGINAL ARTICLE

The 26S proteasome system degrades the ERM transcription factor and regulates its transcription-enhancing activity

J-L Baert[1], C Beaudoin[1,3], D Monte[1], C Degerny[1], S Mauen[2] and Y de Launoit[1,2]

[1]*UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, CNRS/Université de Lille 1/Université de Lille 2/Institut Pasteur de Lille, IFR 142, Lille Cedex, France and* [2]*Laboratoire de Virologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium*

ERM is a member of the ETS transcription factor family. High levels of the corresponding mRNA are detected in a variety of human breast cancer cell lines, as well as in aggressive human breast tumors. As ERM protein is almost undetectable in these cells, high degradation of this transcription factor has been postulated. Here we have investigated whether ERM degradation might depend on the proteasome pathway. We show that endogenous and ectopically expressed ERM protein is short-lived protein and undergoes proteasome-dependent degradation. Deletion mutagenesis studies indicate that the 61 C-terminal amino acids of ERM are critical for its proteolysis and serve as a degradation signal. Although ERM conjugates with ubiquitin, this post-translational modification does not depend on the C-terminal domain. We have used an Ets-responsive ICAM-1 reporter plasmid to show that the ubiquitin–proteasome pathway can affect transcriptional function of ERM. Thus, ERM is subject to degradation via the 26S proteasome pathway, and this pathway probably plays an important role in regulating ERM transcriptional activity.
Oncogene (2007) **26,** 415–424. doi:10.1038/sj.onc.1209801; published online 10 July 2006

Keywords: ETS; ERM; transcription factor; 26S proteasome; degradation; ubiquitin; regulation of transcription

Introduction

Covalent modification of proteins by ubiquitin (Ub) creates new proteins with unique protein surfaces that can mediate a range of protein–protein interactions. Three different types of enzymes constitute the Ub pathway: E1 activating enzymes, E2 conjugating enzyme and E3 ligases important for establishing reaction specificity (Pickart, 2001). In most cases, numerous cycles of ubiquitination result in the formation of long polyubiquitin chains on the target protein; these are recognized by the 26S proteasome as a signal for destruction. Interestingly, other roles have recently been proposed for ubiquitination, including regulation of transcription factor activity (Lipford and Deshaies, 2003; Muratani and Tansey, 2003). Numerous transcription factors are reported to undergo Ub modification, including the transcription factor PEA3/E1AF (Takahashi *et al.*, 2005). This factor and also ERM and ER81 belong to the PEA3 group of Ets transcription factors, which possess a common DNA-binding domain of about 85 residues binding the consensus core sequence 5′-GGAA/T-3′ (for a review, see Sharrocks, 2001). The PEA3 group members are involved in a variety of developmental processes, such as gland organogenesis through epithelium/mesenchyme interactions (Chotteau-Lelièvre *et al.*, 1997, 2001, 2003). In pathological processes, the presence of ERM mRNA has been associated with breast cancer metastasis. High levels of this messenger are detected in human (Baert *et al.*, 1997) and mouse (Galang *et al.*, 2004) metastatic mammary cancer cells. *In vivo,* in mouse mammary tumors producing high levels of ERM mRNA, ectopic expression of a dominant-negative Ets mutant increases the mouse survival rate (Shepherd *et al.*, 2001). Recently, we have also shown on a large series of primary breast cancers that ERM gene expression is an adverse prognostic factor for overall survival (Chotteau Lelièvre *et al.*, 2004). In these studies, data on ERM protein levels are scant because of the difficulty of detecting the protein. Rapid protein degradation might explain this observation, but no significant information is available on the stability and degradation of Ets-family proteins.

In the present study, we have investigated whether ERM stability is regulated in cells. We show that this factor undergoes rapid degradation via the 26S proteasome pathway and that this instability is related to a degradation signal located in the C-terminal extremity of ERM. We also show that ERM is ubiquitinated and that this post-translational modification may enhance the transcriptional activity of the protein.

Correspondence: Professor Y de Launoit, UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, CNRS/Institut Pasteur de Lille/Universités de Lille 1 et Lille 2, 1 rue du Professeur Calmette, Lille Cedex 59021, France.
E-mail: yvan.delaunoit@ibl.fr
[3]Current address: CNRS UMR 6547, Equipe Physiologie Comparée et Endocrinologie Moléculaire, Université Blaise Pascal Clermont II, Campus Universitaire des Cézeaux, 24 Avenue des Landais, Aubière 63177, France.
Received 11 November 2005; revised 20 April 2006; accepted 6 June 2006; published online 10 July 2006

Results

ERM is a short-lived protein regulated by the proteasome
We have previously shown that ERM mRNA is present at high levels in most human breast cancer cell lines. Yet, ERM protein is hardly detectable in these cell lines, even those displaying the highest levels of ERM mRNA, such as MDA-MB-231 (Baert *et al.*, 1997). As illustrated in Figure 1a, detection was achieved after immunoprecipitation from extracts of cells that had been metabolically labeled with [^{35}S]methionine, as the protein was nearly undetectable in lysates by immunoblotting (Figure 1b). It is often also difficult to detect ERM protein after ectopic expression, probably because of its rapid degradation in cells. To test this hypothesis, we estimated ERM turnover in MDA-MB-231 cells by pulse–chase analysis. For this purpose, ERM was immunoprecipitated after pulse-labeling with [^{35}S]methionine followed by chasing with unlabeled methionine. As shown in Figure 1a, ERM is in fact a highly unstable protein with a half-life of 30–60 min.

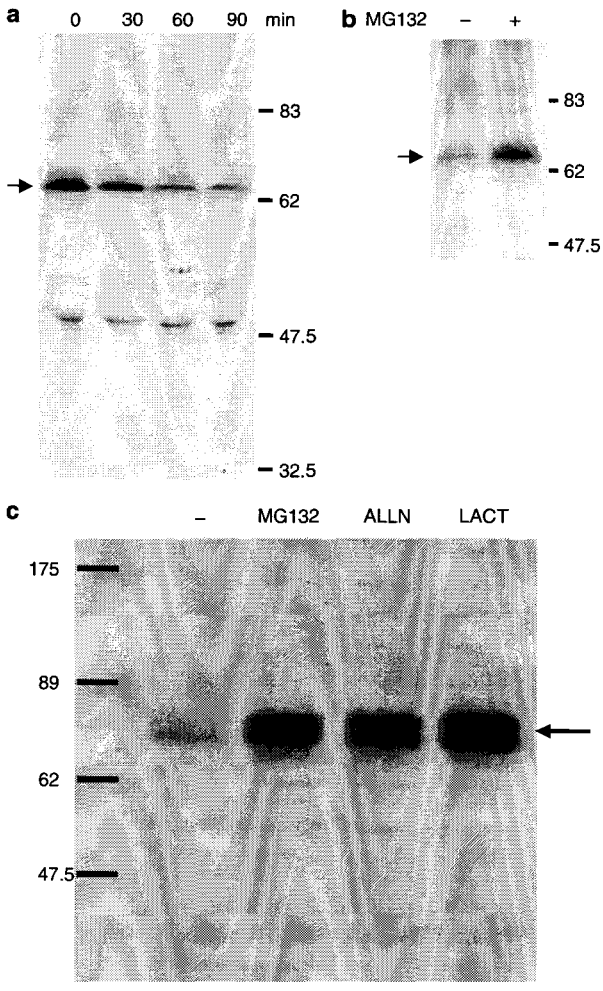


Figure 1 ERM is an unstable protein degraded by the proteasome. (**a**) MDA-MB-231 human mammary cells were incubated for 3 h with [^{35}S]methionine. ERM protein was then immunoprecipitated after chasing for various times with unlabeled methionine. The immunoprecipitated proteins were resolved by SDS–PAGE and visualized by autoradiography. The arrow indicates the position of the ERM protein. (**b**) MDA-MB-231 cells were incubated for 5 h without (–) or with MG132 (+). Total cell extracts were analysed by Western blotting, and endogenous ERM protein (arrow) was revealed with anti-ERM antibody. (**c**) U2OS cells were transfected for 24 h with a plasmid expressing HA-tagged ERM. The cells were then incubated for 5 h without (–) or with the proteasome inhibitor MG132, ALLN or lactacystin (LACT). Ectopically expressed ERM protein (arrow) was revealed by Western blotting with anti-ERM antibody.

Degradation of transcription factors occurs predominantly via the 26S proteasome pathway (Dalton, 2004). To investigate whether this pathway plays an important role in the degradation of ERM, we examined the effect of the proteasome-specific inhibitor MG132. MDA-MB-231 cells were treated with the inhibitor and the level of ERM protein was estimated by Western blotting with antibody raised against ERM. Although ERM protein was nearly undetectable in the absence of inhibitor, treatment of cells with MG132 resulted in a dramatic accumulation of the endogenous protein (Figure 1b). Similar experiments were performed with U2OS cells expressing ERM ectopically. As observed for endogenous ERM in MDA-MB-231 cells, ERM protein produced by ectopic gene expression was poorly detected in transfected U2OS cells, and in the presence of MG132, its level dramatically increased (Figure 1c). Two other specific proteasome inhibitors, ALLN and lactacystin, also caused the steady-state level of ERM to increase significantly (Figure 1c). These results indicate that ERM protein is degraded under basal conditions via the proteasome pathway both in cells where ERM gene expression is endogenous and in cells where the gene is exogenously expressed.

ERM undergoes ubiquitination in vivo
We next wondered whether ERM might become a proteasome target as a consequence of polyubiquitin modification. To test this hypothesis, we co-transfected COS-7 cells transiently with a vector expressing the ERM coding sequence and a construct coding for His$_6$-tagged Ub. The cells were then incubated with or without the proteasome inhibitor ALLN, used to block degradation of Ub-modified protein. The cells were finally harvested in denaturing lysis buffer, and Ub-modified proteins isolated on nickel agarose (Ni-NTA) were analysed by Western blotting with anti-ERM antibody. As seen in Figure 2a, a major ERM species was observed at about 85 kDa in the Ni-NTA-bound protein fraction as a result of Ub overproduction (left panel, compare lanes 1 and 2); this species was enhanced, like unconjugated ERM in the crude extract, by inhibition of the proteasome with ALLN (lane 3). In addition to this Ub–ERM conjugate, a high molecular mass smear, characteristic of polyubiquitination, was also detected in the presence of the proteasome inhibitor (more exposed blot, Figure 2a, right panel). This result clearly indicates that ERM protein is ubiquitinated and

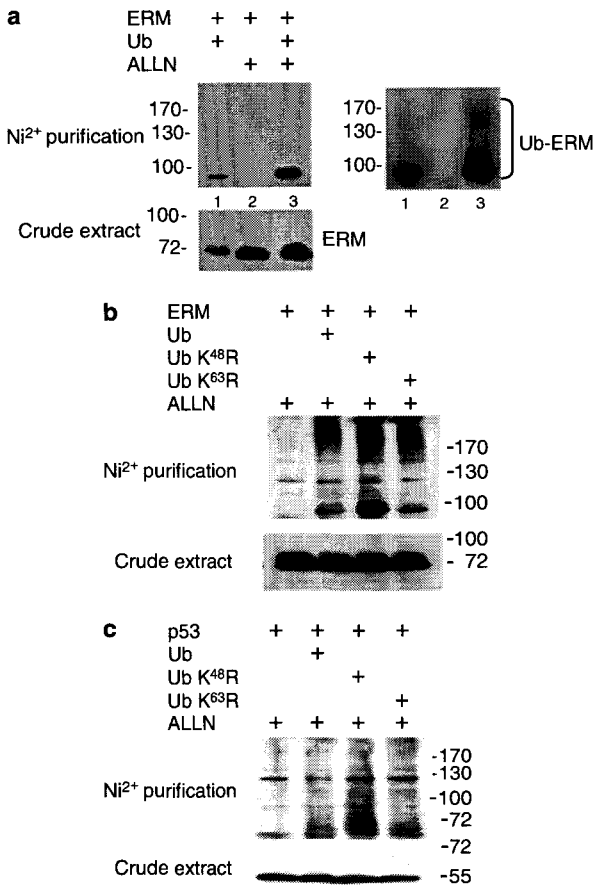


Figure 2 Modification of ERM by ubiquitination *in vivo*. (**a**) COS-7 cells were transiently transfected for 24 h with vectors expressing ERM, in the presence or absence of a vector expressing His_6-tagged Ub. Cells were then treated as indicated for 5 h with ALLN. Cell extracts were prepared and Ub-modified proteins were isolated on Ni-NTA (Ni^{2+} purification). An aliquot of the crude extract and an aliquot of the Ni^{2+}-bound protein fraction were analysed by Western blotting with anti-ERM antibody. The right panel shows a more exposed version of the left panel. (**b**) COS-7 cells were transfected with an ERM-expressing construct in the absence or presence of a construct expressing wt (Ub) or mutated (Ub $K^{48}R$ or Ub $K^{63}R$) His_6-tagged Ub. The cells were then treated as in (**a**) and Western blot analysis was performed with anti-ERM antibody. (**c**) Same experiment as in (**b**) except that COS-7 cells were co-transfected with expression vectors encoding HA-p53 and MDM2. Western blot analysis was performed with anti-HA antibody.

strongly suggests that polyubiquitination of ERM precedes its proteosomal degradation. Thus far, we have been unable to detect this modification in untransfected cells, presumably because of limited expression of the relevant ERM species at the endogenous protein level. Indeed, as judged for the results of transfection-mediated overexpression, only a small fraction of ERM was found to be ubiquitinated. The same was also observed for ERM sumoylation (Degerny *et al.*, 2005).

The apparent molecular weight of the major ubiquitinated ERM species is about 15 kDa higher than that of unmodified ERM (about 70 kDa). As the apparent molecular weight of His_6-tagged Ub is about 11 kDa, it is likely that this ERM species is a mono-ubiquitinated ERM form. To confirm this hypothesis, we repeated the experiment described above, replacing the construct coding for His_6-tagged Ub with a construct supporting the synthesis of a mutant Ub characterized by a lysine-to-arginine substitution at either position 48 (Ub $K^{48}R$) or position 63 (Ub $K^{63}R$). Residues 48 and 63 are involved in the assembly of polyubiquitin chains; their mutation renders Ub unable to form these chains with other Ub molecules and favors mono-ubiquitination. In these experiments, although mutation of K^{63} had no effect, mutation of K^{48} was found to affect ERM ubiquitination by increasing the level of the 85-kDa modified ERM species as compared to the level observed with wt Ub (Figure 2b, upper panel). In contrast, the total level of ERM protein in cell extracts was the same whether wt or mutated Ub was present (Figure 2b, lower panel). This is consistent with the hypothesis that the 85-kDa ERM species corresponds to mono-ubiquitinated ERM form(s) and suggests that K^{48} in Ub plays a role in ERM polyubiquitination. Interestingly, K^{48}-linked polyubiquitin chains are believed to function as a signal designating substrates as proteasome targets, whereas K^{63}-linked polyubiquitin chains have a regulatory function that does not involve proteolysis (Pickart, 2004). It must however be noted that in these experiments, expression of Ub $K^{48}R$ did not lead to a decrease of the higher molecular weight Ub-modified ERM forms. As shown in Figure 2c, similar observation was also made when p53 was used in place of ERM in same experiments. It cannot be ruled out that such results may reflect mono-ubiquitination of the proteins at multiple sites and/or polyubiquitination at one or multiple sites owing to the competition of exogenously expressed Ub with the endogenous Ub pool.

ERM contains a degradation domain

A major determinant of protein instability is the presence of degradation signals. To identify such regions in ERM, we generated a series of ERM deletion mutants. Figure 3a shows the portion of the coding sequence remaining in each mutant. To examine the stability of the truncated ERM proteins, we transfected U2OS cells with the plasmids expressing the mutant constructs and treated them or not with the proteasome inhibitor ALLN. Steady-state ERM levels were then examined by Western blotting with anti-ERM antibodies, the level of actin being used to normalize for sample loading. Using the same concentration of each expression plasmid for transfection, we found that, as for full-length ERM, cellular levels of all N-terminally truncated mutants were low in the absence of proteasome inhibitor and significantly higher in the presence of inhibitor (Figure 3a, lanes 1–8). Similarly, ERM lacking the DNA-binding domain (ERMΔ328–444, lanes 9–10) was detected at a much lower level in the absence than in the presence of ALLN. In contrast, each mutant lacking the C-terminal domain encompassing residues 449–510

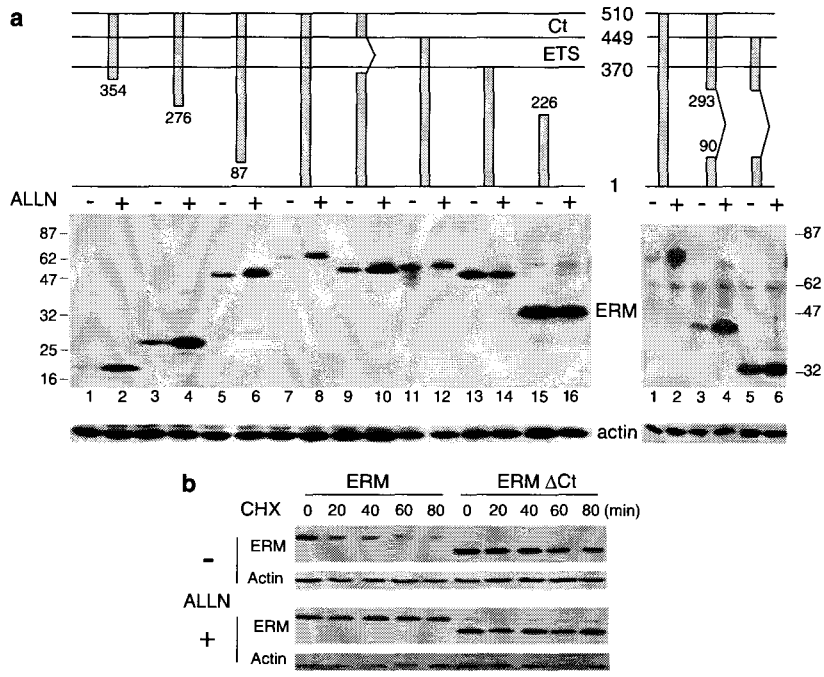


Figure 3 Mapping of ERM degradation domain. (**a**) U2OS cells were transfected with expression plasmids for full-length ERM (amino acids 1–510) or ERM deletion mutants as indicated (Ct: C-terminal domain, amino acids 450–510; ETS: DNA-binding domain, amino acids 370–449). Twenty-four hours after transfection, cells were incubated with or without the proteasome inhibitor ALLN. Levels of the different proteins were estimated by Western blot analysis with anti-ERM antibodies (upper panel) and anti-actin antibody (lower panel). (**b**) Full-length ERM and ERM lacking the C-terminal domain (ERMΔCt) were expressed in U2OS cells for 24 h. Cells were then incubated for the indicated time with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX). For ALLN treatment, the reagent was added 4 h before the addition of CHX. Cell extracts were then analyzed as in (**a**) with anti-ERM antibody.

(Ct) was detected at a relatively high level, whether the proteasome inhibitor was added or not (lanes 11–16). In keeping with this observation, deletion of the central domain (residues 90–293) did not influence ERM stability, but further deletion of the C-terminal domain clearly increased the level of mutated protein, which remained nearly constant in the presence of ALLN (Figure 3a, right panel). Altogether, these data suggest that ERM degradation depends on the C-terminal domain of the protein. To further confirm that protein stability is responsible for the differences observed between wt and C-terminally deleted ERM, U2OS cells transfected with a plasmid coding for wt or C-terminally truncated ERM were treated with cycloheximide to block new protein synthesis, and the stability of the remaining protein was determined by immunoblotting with anti-ERM antibody. We showed that, like endogenous ERM, exogenously expressed wt ERM is rapidly degraded (Figure 3b). After 40 min of cycloheximide treatment, the detected level of full-length protein was significantly reduced in cells not treated with ALLN but not in cells treated with the inhibitor. In contrast, the amount of ERM protein lacking the C-terminal domain (ERMΔCt, Figure 3b) remained more constant over time whether ALLN was present or not, indicating that the increased level of the truncated protein results from its stabilization. Taken together, these results indicate that rapid turnover of ERM requires the presence of a degradation domain in the C-terminal part of the protein.

Stabilization of C-terminally truncated ERM is not owing to decreased ubiquitination

The C-terminal region of ERM contains a single lysine residue (K^{468}) that might be a critical site for ubiquitination leading to ERM degradation via the Ub–proteasome pathway. To investigate the potential role of K^{468} in ERM turnover, we examined the effect of the $K^{468}R$ mutation on the stability of ERM. The detected level of ERM $K^{468}R$ was similar to that observed for wt ERM when cells were transfected with equal amounts of ERM-expressing plasmid and treated or not with ALLN. Furthermore, this mutation did not reduce the level of ubiquitinated ERM in cell extracts (data not shown), thus indicating that the instability of ERM is not related to ubiquitination of the C-terminal part of the protein. Another possibility is that this C-terminal region might contain specific motifs enabling the protein to recruit E3 Ub ligase that would subsequently tag other sites with polyubiquitin chains (Laney and Hochstrasser, 1999). To test this hypothesis, we compared in COS cells the overall ubiquitination level of wt ERM with that of the C-terminally truncated protein. We found no difference in ubiquitination between wt and truncated ERM (Figure 4a). The major

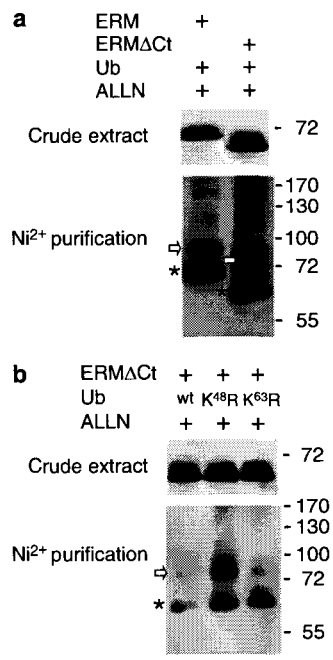


Figure 4 The Ct domain is not required for ubiquitination of ERM. (**a**) Full-length ERM and the C-terminal deletion mutant (ERMΔCt) were ectopically expressed in COS-7 cells for 24 h in the presence of a plasmid expressing His_6-tagged Ub and treated for 5 h with ALLN. Crude cell extracts and Ni^{2+}-bound fractions were analysed as in Figure 2 with anti-ERM antibody. (**b**) Cells were transfected with constructs expressing ERMΔCt and wt or mutated ($K^{48}R$ or $K^{63}R$) His_6-tagged Ub. Cell treatment and ERM detection were as in (**a**). * Indicates background binding of ERM to the Ni-NTA resin: these species are not ubiquitinated ERM. The major ERM species, corresponding to mono-ubiquitination, are indicated with arrows.

band for ubiquitinated truncated ERM was found at about 75 kDa. As shown above (Figure 2b) for wt ERM, the amount of this Ub conjugate increased significantly when wt Ub was replaced with Ub $K^{48}R$, but not when it was replaced with Ub $K^{63}R$ (Figure 4b). Altogether, these results indicate that the major Ub-modified form of C-terminally truncated ERM is mono-ubiquitinated and that the C-terminal region of ERM is not essential for ubiquitination of the protein.

The region spanning the 61 C-terminal amino acids of ERM must thus contain a signal that targets the protein for degradation by the proteasome and is apparently ubiquitination independent. To determine whether this domain can act as an independent signal for ERM processing, we constructed a fusion protein in which the yeast Gal4 DNA-binding domain (Gal4) is fused to the C-terminal domain of ERM (Gal4-Ct ERM). As previously described, cells were transfected with a plasmid encoding Gal4 or Gal4-Ct ERM and extracts of these cells were subjected to Western blot analysis. Steady-state levels of both proteins were determined in the presence and absence of ALLN. As illustrated in Figure 5, Gal4 accumulated to a fairly high level whether ALLN was present or not. This agrees with the observation that the DBD of Gal4 is relatively stable

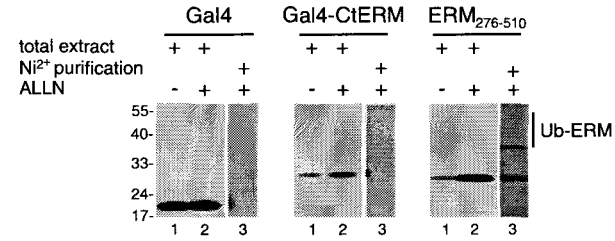


Figure 5 The C-terminal domain of ERM is sufficient to target proteins for rapid proteosomal degradation. A construct encoding the Gal4 DNA-binding domain, alone (Gal4) or fused to the C-terminal domain of ERM (Gal4-Ct ERM), was expressed in COS-7 cells for 24 h with a construct coding for His_6-tagged Ub. The cells were treated or not (as indicated) for 5 h with ALLN. An aliquot of total cell extract was analyed by Western blotting with anti-Gal4 (Gal4 and Gal4-Ct ERM) or anti-ERM antibody ($ERM_{276-510}$). Extracts of cells treated with ALLN were incubated with Ni^{2+}-NTA agarose beads and the bound fractions were analysed as described above. Similar results were obtained when the Gal4-Ct ERM fusion protein was detected with anti-ERM antibody.

(Tworkowski *et al.*, 2002). In contrast, Gal4-Ct ERM accumulated to a significantly lower level in the absence of proteasome inhibitor but to an increased level in its presence. This indicates that Gal4-Ct ERM, in contrast to Gal4 alone, is rapidly degraded via a proteasome-dependent mechanism. To examine whether this Gal4-Ct ERM instability is related to ubiquitination, we transfected cells as above with a plasmid expressing His-Ub and treated the cells with ALLN. In the His-Ub-enriched fraction obtained by affinity chromatography of cell extracts on Ni^{2+} beads, neither Gal4 nor Gal4-Ct ERM was detected by Western blot analysis with anti-Gal4 antibody (or with anti-ERM antibody for Gal4-Ct ERM) (Figure 5, lane 3). In contrast, the unstable $ERM_{276-510}$ containing the ETS DNA-binding domain and the C-terminal region of ERM was clearly ubiquitinated under the same conditions (Figure 5, right panel). Thus, ubiquitination of the fusion protein seems not to be required for its recognition by the proteasome-dependent system.

Ubiquitination of ERM and transcriptional activity

Finally, we sought to determine whether the proteasome pathway affects ERM-mediated transactivation. We measured luciferase activities owing to the presence of the Ets-responsive ICAM-1 reporter construct after co-transfection of RK13 cells with this construct and ERM expression vectors (Figure 6a), followed by incubation with or without ALLN. Figure 6b shows that treatment with the inhibitor resulted in about a twofold increase in ERM activity, as compared to the control. As ALLN increases ERM stability and thus the ERM level (Figure 6c, upper panel), this increase might merely reflect the greater amount of ERM present in ALLN-treated cells. Yet as illustrated in Figure 6c (lower panel), no luciferase activity increase was observed in the absence of ALLN when the amount of ERM expression plasmid used exceeded the 10 ng used in the above experiment. It would thus seem that proteasome

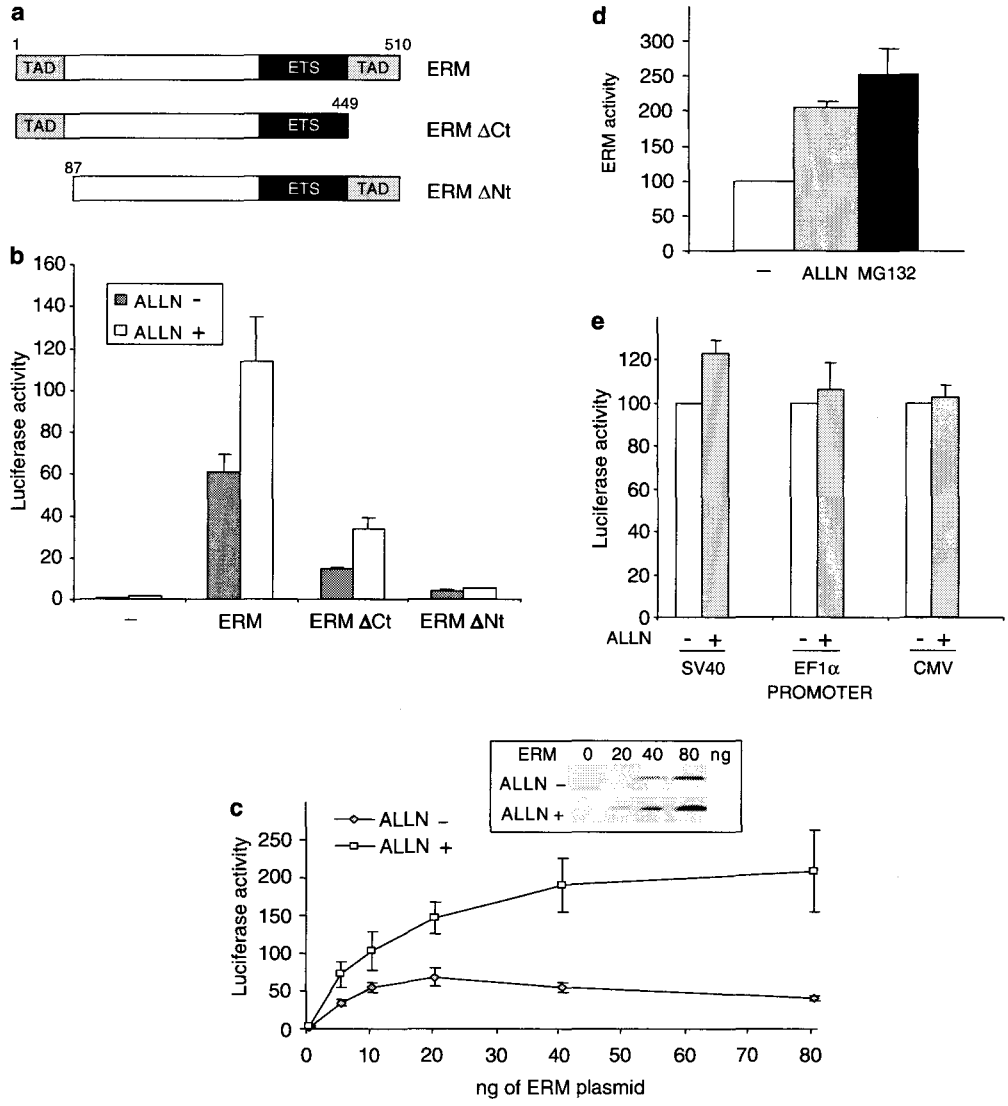


Figure 6 Effects of proteasome inhibitors on ERM transcriptional activity. (**a**) Schematic representation of the constructs used in (**b**). (**b**) RK13 cells were transfected for 24 h with 10 ng of the indicated expression constructs and ICAM-1-Luc (ICAM) reporter plasmid. The cells were treated with ethanol (ALLN−) or 10 μM ALLN (ALLN+) for 16 h. The data presented here are representative of four experiments with two different dishes per experiment and are expressed as means ± s.e.m. The activity of cells co-transfected with the reporter plasmid and the empty expression vector (−) is arbitrarily set at 1. (**c**) lower-panel: a dose–response curve of ERM transcriptional activity in the presence (ALLN+) or absence (ALLN−) of ALLN was obtained as in (**b**). Upper panel: extracts from cells transfected and treated as above were analysed by Western blotting with anti-ERM antibody. (**d**) RK13 cells were transfected with a plasmid expressing wt ERM and were treated with ethanol (−), 10 μM ALLN (ALLN) or 1 μM MG132 (MG132) for 16 h. (**e**) A 10 ng portion of pSV2-Luc (SV40 promoter), pEFIN-Luc (EF1a promoter) and pCMV-Luc (CMV promoter) was transfected into RK13 cells. The cells were treated with ethanol or 10 μM ALLN for 16 h and then collected for luciferase assay.

inhibition can increase ERM-mediated transactivation independently of its ERM-stabilizing effect. Similar experiments were performed on cells co-transfected with the same reporter plasmid and a plasmid expressing an ERM mutant lacking either the N-terminal or the C-terminal transactivation domain. As previously described (Janknecht *et al.*, 1996), both truncated proteins showed reduced transcriptional activity. Yet only the C-terminal deletion mutant displayed (about twofold) increased transcriptional activity after ALLN treatment (Figure 6b). It is interesting that ALLN has little effect on the level of C-terminal deletion mutant but it does affect its activity, whereas the same treatment markedly increases the level of N-terminally truncated protein (Figure 3) without significantly altering its activity.

To rule out the possibility that the observed effects of ALLN are nonspecific, similar experiments were performed with another proteasome inhibitor, MG132. As illustrated in Figure 6d for wt ERM, this inhibitor also increased ERM transactivation by twofold. On the

other hand, the ALLN or MG132 treatment did not significantly affect the transcription driven by the CMV, SV40 or EF1α promoter, indicating that proteasome inhibitor treatment does not interfere with luciferase activity under the conditions of our assay and that activation of ERM-mediated transcription is specific (Figure 6e). Altogether, these experiments suggest that the observed effects of the proteasome inhibitors on ERM-dependent transcription reflect a change in transactivation potential rather than merely ERM stabilization. Furthermore, these data indicate that the ALLN-triggered increase in ERM activity is mediated by the N-terminal transactivation domain.

ALLN treatment not only increases the ERM protein level but also enhances the degree of ubiquination of the protein. To determine whether the degree of ubiquitination affects ERM transcriptional activity, we compared the activity of ERM in cells cotransfected with an ERM-expressing plasmid and a plasmid expressing either wt Ub or one of the two Ub mutants, $K^{48}R$ or $K^{63}R$ Ub. As shown above, the level of ubiquitinated ERM is higher in the presence of $K^{48}R$ Ub than in the presence of either $K^{63}R$ Ub or wt Ub (both of these yielding similar results) (see Figure 2b). Is this reflected in the transcriptional activity of ERM? As shown in Figure 7, ERM as well as its N- and C-terminally truncated mutants displayed similar activities in the presence of wt or $K^{63}R$ Ub. The presence of $K^{48}R$ Ub, however, was found to affect ERM-mediated transcription. Indeed, a 60% increase in luciferase activity was observed with both full-length and C-terminally truncated ERM, whereas the activity of N-terminally truncated ERM was unaffected. Altogether, these data suggest that ubiquitination of ERM may be a mechanism resulting in transcriptional activation independent of the C-terminal transactivation domain. Accordingly, we failed to detect significant change in the activity of this domain fused to the DBD of Gal4 either following treatment by the proteasome inhibitors ALLN and MG132 or by the expression of $K^{48}R$ Ub (Figure 8).

Discussion

We show here that the ERM transcription factor is a highly unstable protein with a half-life of 30–60 min. This instability appears both in MDA-MB-231 cells, where ERM synthesis is endogenous, and in COS-7, U2OS and RK13 cells expressing exogenous ERM. The two other PEA3 group members, ER81 and E1AF, also show short half-lives when overproduced (Goel and Janknecht, 2003; Takahashi *et al.*, 2005). Yet the half-lives determined for these proteins, exceeding 2 h, are somewhat longer than the ERM half-life determined here. This may reflect a real difference in stability among the PEA3-group members or merely different experimental approaches and/or cell types analysed. It should be noted that in MDA-MB-231 cells expressing all three group members, we found a similar half-life for ER81 and ERM (not shown). It is thus likely that at least ERM and its closest relative ER81 have a very similar turnover rate.

ERM is a short-lived protein like many transcription factors. The rapid turnover of these regulatory proteins is necessary to keep their intracellular levels low and responsive to environmental stimuli (Conaway *et al.*, 2002; Muratani and Tansey, 2003). In fact, it is now established that the proteasome system plays a major role in the rapid elimination of these transcription factors (Ciechanover *et al.*, 2000). Among the PEA3-group transcription factors, only overproduced E1AF protein has been shown to be stabilized by proteasome inhibition (Takahashi *et al.*, 2005). We show here that endogenous and exogenous ERM steady-state levels and the ERM half-life increase in the presence of proteasome inhibitors, indicating that the proteasome is important in the control of cellular ERM levels.

An interesting finding of this study is that the C-terminal domain of ERM seems to be essential for rapid protein degradation. The ERM mutant lacking this domain (amino acids 449–510) displays increased stability in all cell lines tested here. Protein stabilization

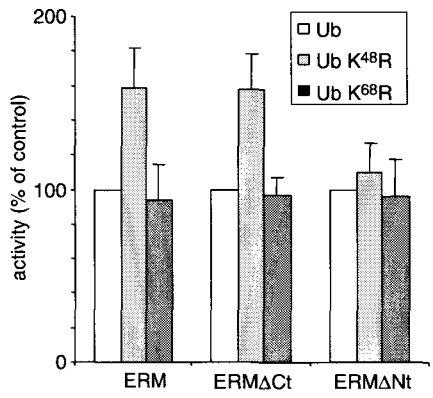


Figure 7 Effects of Ub on ERM transcriptional activity. Cells were transfected as in Figure 6b in the presence of His-tagged Ub either wt (Ub), $K^{48}R$ (Ub $K^{48}R$) or $K^{63}R$ (Ub $K^{63}R$). Promoter activities in the absence of mutant Ub are represented as 100%.

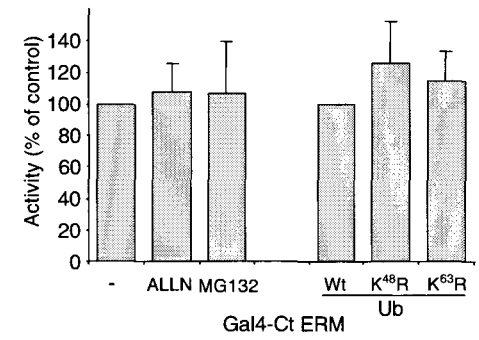


Figure 8 Effects of the proteasome inhibitors and Ub on the transcriptional activity of the ERM C-terminal domain. The luciferase reporter Gal4-tk-Luc (25 ng) and a plasmid encoding the Gal4 DNA-binding domain fused to the C-terminal domain of ERM (Gal4-Ct ERM, 20 ng) were transfected into RK13 cells. The cells were either treated with ALLN and MG132 as described in Figure 5 or co-transfected with plasmids expressing His-tagged Ub either wt (Ub), $K^{48}R$ (Ub $K^{48}R$) or $K^{63}R$ (Ub $K^{63}R$).

is not owing to removal of a critical ubiquitination site. Nor, as shown previously (Janknecht *et al.*, 1996), is it owing to an altered localization of the mutant protein. In fact, the C-terminal domain of ERM is sufficient for acceleration of proteolysis, as its fusion to a heterologous protein significantly destabilizes that protein. We therefore propose, for the first time, that this domain acts as a degradation signal. Degradation signals are multiple and generally increase the turnover of a protein by recruiting a Ub ligase, that is, an enzyme that conjugates Ub to the substrate (Laney and Hochstrasser, 1999). We show here, however, that removal of the C-terminal domain does not significantly affect the level of Ub conjugation to ERM. The mechanism leading to ERM instability may thus be largely independent of ubiquitination and might involve direct interaction of the C-terminal region of ERM with the proteasome. Such a mechanism has been demonstrated in the case of $p21^{Cip1}$ and IkBα, which bind respectively to subunit C8 or C3 of the 20S proteasome (Touitou *et al.*, 2001; Alvarez-Castelao and Castano, 2005). Alternatively, proteasome recognition might involve a cofactor as shown for ODC. Degradation of ODC depends on the presence of an antizyme which enhances the ODC–proteasome association (Murakami *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2003). The fact remains, however, that ERM does undergo ubiquitination, so we cannot exclude a rôle for this process in proteosomal degradation of the protein. For instance a Ub-modified site might serve as a proteasome recognition element, the C-terminal domain being an initiation site for efficient proteasome-mediated degradation. In keeping with this view, a recent study has demonstrated that, although many proteins are marked for destruction by attachment of a polyubiquitin chain that directs binding to the proteasome, a region of the substrate must also be recognized in order for proteolytic engagement, leading to rapid degradation, to begin (Prakash *et al.*, 2004). The substrate region required for engagement must be unstructured. Interestingly, structural predictions obtained with different algorithms reveal that the C-terminal region of ERM may be unstructured or only slightly structured.

In some unstable transcription factors, investigators report an overlap between sequences that activate transcription and those that signal degradation, so that the transcriptional activity of these proteins is coupled to their proteolytic destruction (Molinari *et al.*, 1999; Salghetti *et al.*, 2000; Muratani and Tansey, 2003). In ERM, likewise, deletion of the C-terminal domain previously characterized as a transactivation domain (TAD) (Laget *et al.*, 1996) affects both the ability to transactivate and the rate of degradation. Yet ERM contains a second TAD, which has been mapped to the N-terminal part of the protein (amino acids 1–72; Laget *et al.*, 1996; Defossez *et al.*, 1997). Curiously, although deletion of the N-terminal TAD severely affects the transcriptional activity of ERM, it does not improve its stability. The degradation signal is thus apparently restricted to the C-terminal TAD of ERM, and inhibition of ERM transcriptional activity is not necessarily sufficient to prevent rapid degradation of the protein.

There is increasing evidence that ubiquitination and proteasome-mediated degradation of transcription factors are closely linked to the transactivating function of these factors. It has recently been demonstrated that inhibition of proteosomal degradation enhances the transcriptional response mediated by some nuclear receptors (Blanquart *et al.*, 2002; Deroo *et al.*, 2002; Pollenz, 2002) and the Ets protein E1AF (Takahashi *et al.*, 2005). We show here that blocking protein turnover with the proteasome inhibitor ALLN or MG132 also induces a change in ERM transcriptional activity. Enhanced ERM-mediated transactivation was observed only when the N-terminal TAD was present; it appeared unrelated to the increase in the level of native protein owing to proteasome inhibition. A similar effect was achieved by expressing a Ub mutant, $K^{48}R$, which reinforces mono-ubiquitination of ERM. As proteasome inhibitor also causes accumulation of Ub-conjugated ERM, including the mono-ubiquitinated form, it might be suggested that ubiquitination, and particularly mono-ubiquitination, is required for full ERM transcriptional activity. In this view, polyubiquitinated forms might be targeted for degradation, whereas a transient state of mono-ubiquitination might regulate protein activity before its targeting for degradation. Ubiquitination has been linked to the regulation of the activity of some transcription factors (Bres *et al.*, 2003; Greer *et al.*, 2003; Peloponese *et al.*, 2004; Muratani *et al.*, 2005). Furthermore, ubiquitination is reported to be essential to the activity of the TADs of the VP16 and Tat proteins (Salghetti *et al.*, 2001; Bres *et al.*, 2003), and ubiquitination of these TADs has been shown to increase their interaction with the positive transcription elongation factor b (P-TEFb), thus augmenting the rate of transcription elongation (Kurosu and Peterlin, 2004). In this regard, it is noteworthy that the effects of ALLN and of $K^{48}R$ Ub depend on the presence of the N-terminal TAD, which belongs, like the VP16 TAD, to the acidic TAD class; it has been postulated that these two transactivating domains might be functionally related (Laget *et al.*, 1996). It will now be interesting to test whether the N-terminal TAD of ERM conjugates with Ub and associates with P-TEFb to enhance transcription. Alternatively, we cannot exclude the possibility that enhanced transcription mediated by ERM is related, at least in part, to co-activators whose activity or levels might be affected by inhibition of the proteasome or ubiquitination. It will also be important to identify the ubiquitination sites on ERM to precise the role of ERM ubiquitination in transcriptional activation.

Like many transcription factors, ERM is a target of several post-translational modifications that regulate its transcriptional activity. Of these, one has recently emerged as a major mechanism for inhibiting ERM-mediated transcription; sumoylation, which has been shown to negatively affect the protein's capacity to activate transcription (Degerny *et al.*, 2005). ERM thus serves as a substrate for both ubiquitination and

sumoylation, which probably control its properties in opposite manners. Crosstalk between the SUMO and Ub conjugation systems can thus be suspected. Preliminary results indicate that ERM mutated at the five lysine residues lying within consensus sumoylation sites remains significantly ubiquitinated. This suggests that the two types of modification do not involve the same lysine residues (data not shown). Yet we cannot exclude that SUMO modification of ERM might affect ubiquitination of the modified protein at other lysine residues, as part of a mechanism mediating transcriptional silencing. Whether deregulation in ERM modification pathways contributes to the role of this transcription factor in breast cancer metastasis remains to be elucidated.

Materials and methods

Plasmid constructs
The full-length pSG5-ERM expression vector, the amino-terminally truncated (ERM_{87-510} (ERMΔNt), $ERM_{276-510}$, $ERM_{354-510}$) and the carboxy-terminally truncated (ERM_{1-449} (ERMΔCt), ERM_{1-370}, ERM_{1-226}) pSG5-ERM expression vectors have been described elsewhere (Janknecht *et al.*, 1996; de Launoit *et al.*, 1998). The following truncated ERM proteins were generated from constructs produced by PCR: $ERM_{1-370/449-510}$, $ERM_{1-90/293-510}$ and $ERM_{1-90/293-449}$ (oligonucleotide sequences are available on request). All PCR products were cloned into the pCRII vector, entirely sequenced and then cloned into the pSG5 vector ($ERM_{1-370/449-510}$) or the pSV-HA vector ($ERM_{1-90/293-510}$ and $ERM_{1-90/293-449}$) (Laget *et al.*, 1996) using restriction sites introduced into the PCR primers. The full-length pSV-HA-ERM expression vector has been described previously (Baert *et al.*, 2002) and so are the pGAP-Ct ERM vector expressing the 147 residues of the GAL4 DNA-binding domain fused to the C-terminal domain of ERM residues 449–510 and the GAL4 reporter construct containing five copies of the GAL4 binding sequence (Defossez *et al.*, 1997). Wt and mutated ($K^{48}R$ and $K^{63}R$) His_6-tagged Ub expression plasmids were kindly provided by Dr M Benkirane (CNRS-UPR 1142, Montpellier, France) (Bres *et al.*, 2003). As Ets-responsive luciferase reporter plasmid, we used the $ICAM_{WT}$-Luc (ICAM) plasmid corresponding to the human ICAM-1 promoter fragment (bp −44 to −178) (de Launoit *et al.*, 1998). pSV2-Luc (SV40 promoter), pCMV-Luc (CMV promoter) and pEFIN-Luc (EF1a promoter) reporter plasmids were also used (Maurer *et al.*, 2003). The pSG5-β-galactosidase vector was used to normalize transfection (Baert *et al.*, 2002).

Cell cultures and transfections
Rabbit kidney cells (RK13), monkey kidney cells (COS-7), human U2OS osteosarcoma cells and MDA-MB-231 breast cancer cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% (v:v) heat-inactivated fetal calf serum (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA) and cultured at 37°C in a water-saturated 5% CO_2 atmosphere. 1.5×10^5 cells/well were plated in 12-well plates, and the next day transient transfections were performed using the PEI Exgen 500 procedure (Euromedex, Souffelweyersheim, France) with 250 ng total DNA per well, including 100 ng reporter plasmid, 10 ng pSG5 expression vector and 10 ng β-galactosidase expression vector. Luciferase activity was determined 24 h after transfection and normalized with respect to the β-galactosidase activity (used as a measure of the transfection efficiency) as previously described (Degerny *et al.*, 2005). The data presented are means ± s.e.m. of at least three independent experiments. To detect ERM or Ub-modified forms of ERM, we transfected COS-7, U2OS or RK13 cells with 300 ng/well (six-well plates) of ERM expression plasmid and, when indicated, with 700 ng plasmid coding for wt or mutated His_6-tagged-Ub. After 24 h, the cells were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in immunoblot or Ni^{2+} purification buffer.

Western blot analysis
Transfected cells, either untreated or treated with a proteasome inhibitor (ALLN: 50 μM, 5 h; MG132: 40 μM, 5 h; or lactacystin: 10 μM, 5 h) or with cycloheximide (80 μg/ml), were washed twice with PBS and lysed in Laemmli gel loading buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE), 5% β-mercaptoethanol, 10% sucrose). After separation by SDS–PAGE, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes. Immunoblot analyses were performed with rabbit anti-ERM antibodies (anti-ERM_{12-226} or anti-$ERM_{355-510}$; Janknecht *et al.*, 1996), anti-Gal4 antibody or anti-actin antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), followed by treatment with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Immune complexes were visualized by enhanced chemiluminescence according to the manufacturer's instructions (Santa Cruz Biotechnology).

Identification of His-Ub-ERM conjugates
Transfected cells were lysed in denaturing buffer containing 6 M guanidium-HCl. His_6-Ub conjugates were purified by Metal-Chelate Affinity Chromatography as described previously (Degerny *et al.*, 2005). Briefly, cells plated in six-well plates were washed twice in ice-cold PBS and lysed in 400 μl lysis buffer (6 M guanidium-HCl, 0.1 M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0, 0.01 M Tris-HCl pH 8.0) per 35-mm well. The lysates were centrifuged at 100 000 *g* for 90 min at 4°C. Each sample was mixed with 20 μl packed Ni^{2+}-NTA beads (Qiagen, Valencia, CA, USA) and rotated for 3 h at room temperature. The beads were then washed twice with lysis buffer, three times with 8 M urea, 0.1 M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 (pH 6.4) and once with PBS before being resuspended in Laemmli gel loading buffer and analysed by SDS–PAGE. Proteins were then electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes and His-Ub conjugates were detected with an appropriate antibody as described above.

Labeling of cells and immunoprecipitation
MDA-MB-231 cells were allowed to grow for 40 h before labeling. Cells were then placed in Met/Cys-free DMEM for 2 h, after which 100 μCi ^{35}S labeledMet/Cys per ml was added to the medium. After 3 h, the cells were washed with PBS and incubated in medium supplemented with unlabeled Met for the time indicated. Cell lysis and immunoprecipitation with anti-ERM antibody were then performed as described previously (Baert *et al.*, 2002). Immunocomplexes were finally eluted in Laemmli gel loading buffer, separated by SDS–PAGE and autoradiographed.

Acknowledgements

CD is supported by a PhD grant from the French Research Ministry. This work was carried out thanks to grants awarded by the 'Centre National de la Recherche Scientifique' (France),

the 'Institut Pasteur de Lille', the 'Association pour la Recherche contre le Cancer' (France), the 'Ligue Nationale Contre le Cancer' (Comité Nord, France), 'the Conseil Régional Nord/Pas-de-Calais' (France), the European Regional Development Fund, the Interreg program 'Intergènes', the 'Fonds National de la Recherche Scientifique' (FNRS, Belgium) and the 'Action de Recherche Concertée (Communauté Française de Belgique)' (Belgium). CB was the recipient of a postdoctoral fellowship from the Canadian Institutes of Health Research.

References

Alvarez-Castelao B, Castano JG. (2005). *FEBS Lett* **579**: 4797–4802.
Baert JL, Beaudoin C, Coutte L, de Launoit Y. (2002). *J Biol Chem* **277**: 1002–1012.
Baert JL, Monte D, Musgrove EA, Albagli O, Sutherland RL, de Launoit Y. (1997). *Int J Cancer* **70**: 590–597.
Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C. (2002). *J Biol Chem* **277**: 37254–37259.
Bres V, Kiernan RE, Linares LK, Chable-Bessia C, Plechakova O, Treand C *et al.* (2003). *Nat Cell Biol* **5**: 754–761.
Chotteau-Lelièvre A, Desbiens X, Pelczar H, Defossez PA, de Launoit Y. (1997). *Oncogene* **15**: 937–952.
Chotteau-Lelièvre A, Dolle P, Peronne V, Coutte L, de Launoit Y, Desbiens X. (2001). *Mech Dev* **108**: 191–195.
Chotteau-Lelièvre A, Montesano R, Soriano JV, Soulie P, Desbiens X, de Launoit Y. (2003). *Dev Biol* **259**: 241–257.
Chotteau Lelièvre A, Révillion F, Lhotellier V, Hornez L, Desbiens X, Cabaret V *et al.* (2004). *Clin Cancer Res* **19**: 7297–7303.
Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. (2000). *BioEssays* **22**: 442–451.
Conaway RC, Brower CS, Conaway JW. (2002). *Science* **296**: 1254–1258.
Dalton WS. (2004). *Semin Oncol* **31**: 3–9; discussion 33.
de Launoit Y, Audette M, Pelczar H, Plaza S, Baert JL. (1998). *Oncogene* **16**: 2065–2073.
Defossez PA, Baert JL, Monnot M, de Launoit Y. (1997). *Nucleic Acids Res* **25**: 4455–4463.
Degerny C, Monté D, Beaudoin C, Jaffray E, Portois L, Hay RT *et al.* (2005). *J Biol Chem* **280**: 24330–24338.
Deroo BJ, Rentsch C, Sampath S, Young J, DeFranco DB, Archer TK. (2002). *Mol Cell Biol* **22**: 4113–4123.
Galang CK, Muller WJ, Foos G, Oshima RG, Hauser CA. (2004). *J Biol Chem* **279**: 11281–11292.
Goel A, Janknecht R. (2003). *Mol Cell Biol* **23**: 6243–6254.
Greer SF, Zika E, Conti B, Zhu XS, Ting JP. (2003). *Nat Immunol* **4**: 1074–1082.
Janknecht R, Monte D, Baert JL, de Launoit Y. (1996). *Oncogene* **13**: 1745–1754.
Kurosu T, Peterlin BM. (2004). *Curr Biol* **14**: 1112–1116.
Laget MP, Defossez PA, Albagli O, Baert JL, Dewitte F, Stehelin D *et al.* (1996). *Oncogene* **12**: 1325–1336.
Laney JD, Hochstrasser M. (1999). *Cell* **97**: 427–430.
Lipford JR, Deshaies RJ. (2003). *Nat Cell Biol* **5**: 845–850.
Maurer P, T'Sas F, Coutte L, Callens N, Brenner C, Van Lint C *et al.* (2003). *Oncogene* **22**: 3319–3329.
Molinari E, Gilman M, Natesan S. (1999). *EMBO J* **18**: 6439–6447.
Murakami Y, Matsufuji S, Hayashi SI, Tanahashi N, Tanaka K. (1999). *Mol Cell Biol* **19**: 7216–7227.
Muratani M, Kung C, Shokat KM, Tansey WP. (2005). *Cell* **120**: 887–899.
Muratani M, Tansey WP. (2003). *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 192–201.
Peloponese Jr JM, Iha H, Yedavalli VR, Miyazato A, Li Y, Haller K *et al.* (2004). *J Virol* **78**: 11686–11695.
Pickart CM. (2001). *Annu Rev Biochem* **70**: 503–533.
Pickart CM. (2004). *Cell* **116**: 181–190.
Pollenz RS. (2002). *Chem Biol Interact* **141**: 41–61.
Prakash S, Tian L, Ratliff KS, Lehotzky RE, Matouschek A. (2004). *Nat Struct Mol Biol* **11**: 830–837.
Salghetti SE, Caudy AA, Chenoweth JG, Tansey WP. (2001). *Science* **293**: 1651–1653.
Salghetti SE, Muratani M, Wijnen H, Futcher B, Tansey WP. (2000). *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3118–3123.
Sharrocks AD. (2001). *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 827–837.
Shepherd TG, Kockeritz L, Szrajber MR, Muller WJ, Hassell JA. (2001). *Curr Biol* **11**: 1739–1748.
Takahashi A, Higashino F, Aoyagi M, Yoshida K, Itoh M, Kobayashi M *et al.* (2005). *Biochem Biophys Res Commun* **327**: 575–580.
Touitou R, Richardson J, Bose S, Nakanishi M, Rivett J, Allday MJ. (2001). *EMBO J* **20**: 2367–2375.
Tworkowski KA, Salghetti SE, Tansey WP. (2002). *Oncogene* **21**: 8515–8520.
Zhang M, Pickart CM, Coffino P. (2003). *EMBO J* **22**: 1488–1496.

UNIVERSITÉ DES SC. ET TECHN. BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE LILLE