

Université de Montréal

Caractérisation du domaine cytoplasmique du récepteur du
facteur autocrine de motilité et formation du complexe
AMFR/p97/ubiquitine

Par

Thao DANG

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise ès sciences (M.Sc.)
en biologie cellulaire
option biologie du cancer

Avril 2006

© THAO DANG, 2005



Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation du domaine cytoplasmique du récepteur du
facteur autocrine de motilité et formation du complexe
AMFR/p97/ubiquitine

Présenté par :

Thao DANG

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Dr Nicole Leclerc

Directeur de recherche : Dr Ivan Robert Nabi

Membre du jury : Dr Michel Bouvier

Résumé

Le récepteur du facteur autocrine de motilité (AMFR) est associé à l'invasion tumorale. Ce récepteur est localisé en surface cellulaire ainsi que dans un sous domaine lisse du réticulum endoplasmique (REL) en association avec les mitochondries. L'AMFR au niveau du REL est impliqué dans la dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD). Il a été établi que l'AMFR était une enzyme ligase (E3) dont l'activité d'ubiquitination dépend de l'intégrité du motif RING. De plus, le domaine cytoplasmique (DC) de l'AMFR contient un domaine de liaison à p97/VCP AAA ATPase qui est une composante essentielle de l'ERAD.

Nous avons d'abord caractérisé le DC de l'AMFR en générant la construction du DC fusionné à la protéine GFP (DC-GFP). Par microscopie confocale, l'expression du DC-GFP perturbe la distribution du REL marqué par l'AMFR et induit une dissociation entre l'AMFR et les mitochondries dans les cellules Cos-7. L'expression du DC-GFP induit aussi une surexpression de l'AMFR endogène et interagit avec les substrats ubiquitinés. Ces résultats suggèrent une implication possible du DC de l'AMFR dans l'association entre le REL et les mitochondries.

L'AMFR est une enzyme ligase (E3) impliqué dans l'ERAD et interagit avec p97. Nos résultats suggèrent que l'AMFR interagit avec les substrats

ubiquitinés et que cette interaction dépend du domaine Cue de l'AMFR. L'activité ubiquitine ligase de l'AMFR dépend des domaines RING et Cue de l'AMFR qui promouvoit surtout la polyubiquitination. L'AMFR interagit avec p97 via son domaine de liaison à p97 situé en C-terminal. En accord avec cette interaction, la colocalisation entre ces 2 protéines a été observée en immunofluorescence. Les évidences suggèrent ainsi la formation d'un complexe entre l'AMFR, p97 et les substrats ubiquitinés.

Mots-clés: AMFR, enzyme ligase (E3), p97, ubiquitination, motif RING, domaine Cue, ERAD.

Summary

Autocrine motility factor receptor (AMFR) is associated with tumor invasion. Cell surface AMFR is localized to caveolae mediating the internalization of AMF. This receptor is also localized to a mitochondria-associated smooth subdomain of the endoplasmic reticulum (SER). In the SER, AMFR is implicated in endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD). It has been established that AMFR is a RING finger-dependent ubiquitin ligase (E3). The AMFR cytoplasmic domain contains a p97/VCP-interacting domain. The p97/VCP AAA ATPase regulates ubiquitylation and proteasomal targeting of substrates for ERAD.

We first characterized the AMFR cytoplasmic domain. We first expressed the cytoplasmic domain of AMFR tagged with GFP. By confocal microscopy, expression of this fusion protein disrupts the expression of AMFR labeled SER and induces dissociation between AMFR and mitochondria in Cos-7 cells. Expression of the AMFR cytoplasmic domain construct also induces overexpression of endogenous AMFR and interacts with ubiquitylated substrates. These results implicate possibly the AMFR cytoplasmic domain in the association between SER and mitochondria.

AMFR is also an (E3) ubiquitin ligase for ERAD that interacts with p97. Our results suggest that AMFR interacts with ubiquitylated substrates and this interaction depends on a functional Cue domain. Mutation in both the RING and Cue domains is associated with inhibition of AMFR ubiquitin ligase activity which promotes principally polyubiquitylation. AMFR physically interacts with p97 via a C-terminal binding domain. Consistent with this interaction, the colocalisation between these 2 proteins was observed by confocal microscopy. Our results therefore show a complex formation with AMFR, p97 and ubiquitylated substrates.

Key words: AMFR, ubiquitin ligase (E3), p97, ubiquitylation, RING finger, Cue domain, ERAD.

Table des matières

Résumé	i
Summary	iii
Table des matières	v
Liste des schémas	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	x
Remerciements	xii
Contribution des autres auteurs	xiii
Introduction	1
1- Le récepteur du facteur autocrine de motilité (AMFR) -----	1
1.1 Caractéristiques -----	1
1.2 Localisation de l'AMFR -----	2
1.2.1 Au niveau du RE lisse (REL) -----	2
1.2.2 En surface de la cellule -----	2
1.2.3 Interaction entre le REL, marqué par l'AMFR, et les mitochondries -----	3
1.3 Transduction du signal dans l'augmentation de la motilité et l'invasion tumorale -----	4
2- Processus d'ubiquitination -----	6
2.1 La voie d'ubiquitination -----	6
2.2 Les principales enzymes impliquées dans l'ubiquitination -----	7
2.2.1 Enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1) -----	7
2.2.2 Enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2) -----	8
2.2.3 Enzyme ligase (E3) -----	9
2.2.3.1 Réaction catalytique de l'enzyme (E3) -----	9
2.2.3.2 La famille d'enzymes (E3) HECT -----	10
2.2.3.3 La famille d'enzymes (E3) RING -----	11
2.2.3.4 La nouvelle famille d'enzymes (E3) U-box ----	12
2.2.4 Enzyme (E4)-----	13
2.3 Le protéasome -----	14
2.4 Type d'ubiquitination -----	16
2.4.1 Polyubiquitination -----	17
2.4.2 Monoubiquitination et monoubiquitination multiple ----	18
2.5 Motifs de liaison à l'ubiquitine -----	19
2.5.1 Motif responsable de l'association à l'ubiquitine (UBA) -----	19
2.5.2 Motif responsable de l'interaction à l'ubiquitine (UIM) -	20

2.5.3 Motif responsable du couplage de l'ubiquitine pour la dégradation associée au RE (CUE) -----	21
2.6 Implication de l'ubiquitination dans le cancer -----	23
3- Dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD) -----	24
3.1 Mécanisme général -----	24
3.2 Reconnaissance des substrats -----	25
3.3 Translocation des substrats du RE au cytosol -----	27
3.3.1 Translocation à travers le canal Sec61 -----	27
3.3.2 Polyubiquitination des substrats -----	28
3.3.3 Libération du polypeptide dans le cytosol -----	29
3.4 Ciblage des protéines polyubiquitinées vers le protéasome -----	29
3.5 Implication de l'AMFR dans l'ERAD -----	32
4- p97/VCP ATPase AAA -----	34
4.1 Structure de p97/VCP -----	34
4.2 Implication de p97 dans diverses fonctions biologiques -----	37
4.2.1 Fusion membranaire -----	37
4.2.2 Chaperonne moléculaire -----	38
4.2.3 Dégradation associée au RE (ERAD) -----	40
4.2.4 Dégradation des protéines médiée par l'ubiquitine-protéasome -----	41
4.3 Interaction entre p97 et l'AMFR -----	42
Objectifs -----	44
Résultats -----	45
Partie I Caractérisation du domaine cytoplasmique de l'AMFR -----	45
1.1 Expression du domaine cytoplasmique de l'AMFR couplé à un GFP (DC-GFP) -----	45
1.2 Analyse biochimique du DC-GFP -----	48
1.3 Protéines partenaires associées au DC -----	49
1.4 L'association des protéines ubiquitinées au DC-GFP -----	49
Partie II L'expression de Flag-AMFR promouvoit la formation d'un complexe AMFR/p97/ubiquitine -----	55
2.1 Interaction entre l'AMFR et p97 -----	55
2.2 Interaction entre l'AMFR, p97 et les substrats ubiquitinés -----	55
2.3 Interaction entre l'AMFR, p97 et les substrats associés à ce dernier-----	57
2.4 Colocalisation de Flag-AMFR et ses mutants avec l'AMFR, la calnexine et p97 -----	58

Discussion	
Partie I Caractérisation du domaine cytoplasmique de l'AMFR -----	65
Partie II L'expression de Flag-AMFR promouvoit la formation d'un complexe AMFR/p97/ubiquitine -----	70
Conclusion -----	74
Matériels et méthodes -----	76
Références -----	83

Liste des schémas

Schéma 1	La voie d'ubiquitination médiée par une cascade impliquant trois enzymes.-----	7
Schéma 2	Trois familles d'enzymes ligases (E3). -----	13
Schéma 3	Différents types d'ubiquitination.-----	18
Schéma 4	Dégradation des substrats de l'ERAD par le protéasome.-----	25
Schéma 5	Deux voies distinctes pour le ciblage des substrats polyubiquitinés vers le protéasome.-----	31
Schéma 6	Modèle de l'ubiquitination médiée par l'AMFR dans l'ERAD.-----	33
Schéma 7	p97 est une chaperonne moléculaire dans la voie de dégradation par le protéasome.-----	39

Listes des figures

Partie I Caractérisation du domaine cytoplasmique de l'AMFR

- Figure 1 Le DC-GFP induit une dispersion de l'AMFR qui est un sous domaine lisse du RE. -----51
- Figure 2 Le DC-GFP n'est pas reconnu par l'anticorps 3F3A mAb.-----52
- Figure 3 L'association des protéines ubiquitinées au DC-GFP.-----54

Partie II L'expression de Flag-AMFR promouvoit la formation d'un complexe AMFR/p97/ubiquitine

- Figure 4 Interaction entre l'AMFR et p97. ----- 60
- Figure 5 Interaction entre l'AMFR, p97 et les substrats ubiquitinés.----- 61
- Figure 6 Interaction entre l'AMFR, p97 et les substrats associés à ce dernier.----- 63
- Figure 7 Colocalisation de Flag-AMFR et ses mutants avec l'AMFR, la calnexine et p97.----- 64

Liste des abréviations

AMFR	Récepteur du facteur autocrine de motilité <i>Autocrine motility factor receptor</i>
AAA	ATPases associées à une variété d'activités <i>ATPases associated with a variety of activities</i>
COS	Cellules fibroblastiques de singe transformées par le virus SV-40 <i>CV-1 origin defective SV-40</i>
CUE	Motif responsable du couplage de l'ubiquitine pour la dégradation associée au réticulum endoplasmique <i>Coupling of ubiquitin conjugation to ER degradation</i>
DC	Domaine cytoplasmique
(E1)	Enzyme d'activation de l'ubiquitine <i>Ubiquitin-activating enzyme</i>
(E2)	Enzyme de conjugaison à l'ubiquitine <i>Ubiquitin-conjugating enzyme</i>
(E3)	Enzyme ligase <i>Ubiquitin-protein ligase</i>
ERAD	Dégradation associée au réticulum endoplasmique <i>Endoplasmic Reticulum-associated Degradation</i>
GFP	Protéine fluorescente verte <i>Green fluorescent protein</i>
HECT	Homologue de la région C-terminale de la protéine E6-AP <i>Homologous to the E6-AP carboxyl terminus</i>
HSP-70	Protéine de choc thermique de 70 kDa <i>Heat shock protein 70</i>
RE	Réticulum endoplasmique
REL	Réticulum endoplasmique lisse

RING	Motif spécialisé à doigts de zinc associé à l'ubiquitination <i>Really interesting new gene finger domain</i>
UBA	Motif responsable de l'association à l'ubiquitine <i>Ubiquitin-associated domain</i>
UBC	Domaine de conjugaison à l'ubiquitine <i>Ubiquitin-conjugating domain</i>
UIM	Motif responsable de l'interaction à l'ubiquitine <i>Ubiquitin-interacting motif</i>
VCP	Protéine contenant une valosine <i>Valosin-containing protein</i>

Remerciements

Je tiens d'abord à faire un remerciement à mon superviseur, Dr Ivan Robert Nabi, qui m'a donné l'opportunité d'enrichir mes connaissances scientifiques tout en vivant une expérience incroyable à Vancouver. Sa passion pour la science, sa curiosité et ses idées m'ont été une source d'inspiration et de motivation. Il a largement contribué à l'accomplissement de ce projet. Son aide intellectuelle soutenue au plan de la formation scientifique et technique ainsi que son support humain m'ont permis de réaliser ce mémoire de maîtrise.

Un remerciement spécial à Pascal St-Pierre, un collègue de laboratoire avec qui j'ai eu le plaisir de travailler en équipe. Sa présence et son encouragement tout au long de ma maîtrise m'ont été une aide incroyable. Sa participation au niveau technique et sa contribution intellectuelle dans ce projet ont permis d'élucider plusieurs questionnements.

Je voudrais aussi remercier tous les autres membres du laboratoire pour leur aide technique et d'avoir permis de créer une harmonie rendant l'environnement de travail, un endroit agréable pour travailler.

Contribution des autres auteurs

Pascal St-Pierre a contribué à la réalisation de ce mémoire en générant deux mutants dans les domaines RING et Cue. Le premier mutant consiste en une mutation ponctuelle C356S dans le motif RING-H2 de la séquence de l'AMFR qui a ensuite été insérée dans le vecteur pcDNA 3.1. Le deuxième mutant consiste en trois mutations ponctuelles M467A, F468S et P469S dans le motif MFP du domaine Cue de la séquence de l'AMFR qui a ensuite été insérée dans le vecteur pcDNA 3.1. Ces mutants ont été utilisés dans les expériences d'immunobuvardage, d'immunoprécipitation et d'immunofluorescence présentées dans les figures 9 à 12 de la section des résultats.

Ma participation à ce mémoire de maîtrise consiste à la réalisation du domaine cytoplasmique de l'AMFR fusionné au GFP ainsi que toutes les expériences présentées dans les figures de ce mémoire de maîtrise. Ces résultats ont amené à une meilleure compréhension de l'activité du domaine cytoplasmique de l'AMFR et de son implication dans l'ubiquitination de p97.

Le produit de PCR du domaine cytoplasmique de l'AMFR a été fourni à la compagnie **Dualsystems Biotech AG** (Suisse) pour le criblage d'une librairie par double-hybride en levure dans le but d'identifier les protéines associées.

INTRODUCTION

1. Le récepteur du facteur autocrine de motilité (AMFR)

1.1 Caractéristiques

L'AMFR est une glycoprotéine de 78 kDa ayant la propriété d'induire la motilité cellulaire *in vitro* (Nabi, Watanabe et al. 1990; Nabi, Watanabe et al. 1991; Silletti, Watanabe et al. 1991) et les métastases *in vivo* suite à son activation par le ligand, le facteur autocrine de motilité (AMF) (Hirono, Fushida et al. 1996). Le gène de l'AMFR est hautement conservé à travers l'évolution. En fait, les séquences d'acides aminés des gènes de l'AMFR provenant de la souris et de l'humain possèdent 94,7 % d'homologie (Shimizu, Tani et al. 1999). Le gène de l'AMFR code pour une protéine de 643 acides aminés contenant 7 domaines transmembranaires chez les 2 espèces (Shimizu, Tani et al. 1999). Le domaine cytosolique de l'AMFR contient un motif RING-H2 et un domaine CUE impliqués dans la dégradation des substrats du réticulum endoplasmique (RE), ce qui lui confère le rôle d'une protéine ligase (E3) (Fang, Ferrone et al. 2001). Récemment, il a été démontré que l'AMFR possédait un domaine de liaison à p97/VCP dans la région C-terminale du domaine cytosolique (Zhong, Shen et al. 2004). P97/VCP est une chaperonne impliquée dans la translocation des protéines ayant une mauvaise conformation du RE au cytosol pour la dégradation par le protéasome.

1.2 Localisation de l'AMFR

1.2.1 Au niveau du RE lisse (REL)

L'AMFR a été identifié comme étant un marqueur spécifique d'un sous domaine lisse du RE, appelé tubule d'AMFR (Benlimame, Simard et al. 1995). Ces tubules sont distincts des endosomes et des lysosomes. À l'aide de la microscopie électronique, il a été démontré que l'AMFR était localisé principalement dans le REL et que suite au traitement à l'ilimaquinone, une drogue induisant la vésiculation de l'appareil de Golgi (Takizawa and Malhotra 1993), l'AMFR formait un réseau fenestré de tubules lisses équivalant à la morphologie du REL (Wang, Benlimame et al. 1997). Par la microscopie confocale, les tubules d'AMFR peuvent être distingués des compartiments intermédiaires du RE-Golgi ainsi que de la calnexine et la calréticuline, deux marqueurs du RE (Wang, Benlimame et al. 1997; Wang, Guay et al. 2000). Ces résultats suggèrent ainsi que les tubules d'AMFR sont un sous domaine lisse du RE.

1.2.2 En surface de la cellule

L'AMFR est un récepteur situé en surface de la cellule médiant l'activation de la motilité suite à la liaison de son ligand, l'AMF. En fait, l'AMFR est localisé plus précisément au niveau des invaginations lisses de la membrane plasmique équivalant à la morphologie des cavéoles (Benlimame, Le et al. 1998). La localisation de l'AMFR au niveau des cavéoles a été confirmée à l'aide d'un marquage en surface. Par la microscopie confocale, une

colocalisation partielle entre l'AMFR et la cavéoline, une protéine localisée spécifiquement dans les cavéoles, a été observée. Ceci suggère ainsi que l'AMF est internalisé via la voie indépendante des clathrines pour se diriger vers le REL. Ces résultats démontrent donc l'implication des cavéoles dans la signalisation de l'AMF et l'internalisation de son récepteur (Benlimame, Le et al. 1998). La signalisation de l'AMF est médiée par plusieurs facteurs soient la protéine G sensible à la toxine de pertussis, la phosphorylation de l'AMFR ainsi que l'activité de PKC et des tyrosines kinases (Nabi et al. 1990). Il a été démontré que les protéines G hétérotrimériques telles que la protéine $G_{\alpha 12}$ sensible à la toxine de pertussis sont associées aux domaines cavéolaires. L'AMFR possède un motif pour l'activation des protéines G (Silletti, Paku et al. 1996). Ainsi, son association aux cavéoles faciliterait probablement son interaction avec les protéines G suite à son activation. L'AMFR a aussi été démontré pouvant être endocyté via les vésicules enrobées de clathrine vers les corps multivésiculaires d'où il est recyclé vers les fibrilles de fibronectine (Le, Benlimame et al. 2000).

1.2.3 Interaction entre le REL, marqué par l'AMFR, et les mitochondries

L'association entre le RE et les mitochondries a été observée dans plusieurs types cellulaires. Ce contact étroit entre ces deux organites a été observé par microscopie électronique (Morre 1991) et par fractionnement cellulaire où la fraction du RE co-purifiait avec celle des mitochondries (Shore

and Tata 1977). Cette interaction est nécessaire pour la séquestration du calcium cytosolique par les mitochondries qui est médiée par le RE (voir *review* Pozzan et al. 1994). L'AMFR, une protéine enrichie dans le sous domaine lisse du RE, a été observé en interaction avec les mitochondries. Par la microscopie confocale, il a été observé que l'AMFR et les mitochondries révélait un degré élevé de colocalisation. De plus, il a été démontré par microscopie électronique que l'interaction entre l'AMFR et les mitochondries était dépendante du niveau de calcium cytosolique. Une concentration de calcium cytosolique < 100 nM favorise la dissociation entre ce récepteur et les mitochondries alors qu'une concentration $> 1\mu\text{M}$ favorise leur association. L'AMFR, un marqueur du sous domaine lisse du RE, est donc associé aux mitochondries lorsque le niveau de calcium cytosolique est supérieur au niveau physiologique (Wang, Guay et al. 2000).

1.3 Transduction du signal dans l'augmentation de la motilité et l'invasion tumorale

La voie de signalisation induite par la liaison de l'AMF à son récepteur est médiée par une protéine G sensible à la toxine de pertussis. Une fois que la protéine G est activée, une cascade d'événements mène à la production d'inositol phosphate, la phosphorylation de l'AMFR, l'activation des tyrosines kinases et protéines kinases C (PKC) ainsi que la production de la lipoxigénase (Silletti, Paku et al. 1996). C'est ainsi que suite à cette cascade, un signal de

motilité est induit par l'AMF. En fait, les voies de signalisation impliquant la lipoxigénase et la PKC sont retrouvées dans plusieurs étapes de la cascade d'événements amenant à la formation des métastases. Par exemple, l'adhésion des cellules tumorales à la matrice extracellulaire, la libération des enzymes lysosomales et la migration impliquent tous la lipoxigénase et la PKC. Il a été démontré que les composants du cycle autocrine de motilité, soient l'AMFR, la lipoxigénase et la PKC étaient surexprimés chez les tumeurs les plus agressives, suggérant une régulation de l'invasion par cette voie de signalisation (Timar, Trikha et al. 1996). Une autre étude a démontré une induction de la transformation cellulaire chez les fibroblastes NIH-3T3 surexprimant l'AMFR. Ces fibroblastes acquéraient la capacité de croître dans un milieu faible en sérum et indépendamment de l'ancrage. Ils sont plus motiles et ont la capacité d'induire des tumeurs chez des souris nues (Onishi, Tsukada et al. 2003). Il n'est donc pas surprenant que l'AMFR soit impliqué dans différents cancers. Notamment, l'AMFR est impliqué dans le cancer de la vessie où le niveau élevé d'AMFR est lié à une réduction de l'expression des E-cadhérines, une molécule d'adhésion intercellulaire (Otto, Birchmeier et al. 1994). Une augmentation de l'expression de l'AMFR est aussi associée à plusieurs autres types de cancers tels que le cancer de l'estomac (Hirono, Fushida et al. 1996), de la peau (Timar, Raso et al. 2002), du poumon (Kara, Ohta et al. 2001) et de l'œsophage (Maruyama, Watanabe et al. 1995). Ces résultats font donc de l'AMFR un marqueur potentiel pour le pronostic de ces cancers.

2. Processus d'ubiquitination

2.1 La voie d'ubiquitination

L'homéostasie de la cellule est nécessaire pour sa survie. Pour maintenir cet équilibre, la synthèse et la dégradation des protéines doivent subir une régulation rigoureuse. Parmi les mécanismes de protéolyse, la voie de dégradation par le protéasome est la voie majeure et joue un rôle central dans la régulation des protéines chez les cellules eucaryotes. La dégradation des protéines mal ou incomplètement repliées s'effectue aussi via cette voie de dégradation. Pour être dégradées par le protéasome, les protéines doivent préalablement subir une modification covalente post-traductionnelle par l'ajout de petites protéines de 76 acides aminés, l'ubiquitine. Ce processus s'appelle l'ubiquitination et est médiée par une cascade d'événements impliquant trois enzymes (Schéma 1 tiré du *review* Hatakeyama and Nakayama 2003). La réaction débute avec l'activation de l'ubiquitine par l'enzyme (E1) qui médie ensuite le transfert de cette ubiquitine à l'enzyme (E2) en présence d'ATP. L'activité de l'enzyme (E2) est impliquée dans le transfert d'une ubiquitine activée directement sur le substrat. Dépendant de l'enzyme (E3) avec laquelle elle interagit, l'enzyme (E2) peut aussi transférer l'ubiquitine sur l'enzyme (E3), qui à son tour, peut ubiquitiner spécifiquement des substrats (Hershko and Ciechanover 1998). Enfin, ce processus se termine par la reconnaissance et la dégradation des protéines ubiquitinées par le protéasome (Adams 2003).

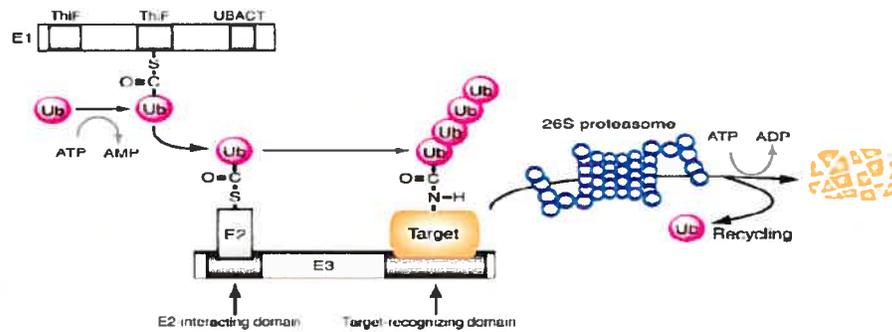


Schéma 1. La voie d'ubiquitination médiée par une cascade impliquant trois enzymes. L'enzyme (E1) contient deux motifs ThiF lui permettant de former un lien thiol ester avec l'ubiquitine en présence d'ATP. L'ubiquitine est ensuite transférée sur l'enzyme (E2), puis sur le résidu lysine du substrat qui est reconnu par l'enzyme (E3). Le substrat polyubiquitiné est ensuite reconnu par le protéasome 26S qui médie sa dégradation en présence d'ATP. (Hatakeyama and Nakayama 2003).

L'organisation des enzymes de la cascade d'ubiquitination est hiérarchique dans le sens qu'un seul type d'enzyme (E1) active un nombre significatif d'enzymes (E2), qui chacune d'elle peut interagir avec plusieurs enzymes (E3). Chaque enzyme (E3) peut à son tour reconnaître un ensemble de substrats partageant des signaux d'ubiquitination et coopérant avec les mêmes enzymes (E2) (Hochstrasser 1996; Hershko and Ciechanover 1998).

2.2 Les principales enzymes impliquées dans l'ubiquitination

2.2.1 Enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1)

L'ubiquitine doit être activée par l'enzyme (E1), préalablement à sa conjugaison aux substrats dans la cascade d'ubiquitination. La réaction d'activation est divisée en trois étapes. D'abord, l'échange ATP-AMP induit un changement conformationnel au site actif de l'enzyme (E1) afin d'augmenter son

affinité pour l'ubiquitine. L'ubiquitine est ensuite recrutée au site actif pour permettre son adénylation en C-terminal. Finalement, l'ubiquitine adénylée est transférée au site actif de l'enzyme (E1) afin de former un lien thiol ester hautement réactif entre le résidu cystéine de l'enzyme (E1) et le résidu glycine en C-terminal de l'ubiquitine. L'enzyme (E1) peut porter deux molécules d'ubiquitines actives. Chez la plupart des organismes, un seul type d'enzyme (E1) active et transfère l'ubiquitine pour toutes les enzymes de conjugaison (E2) situées en aval de la cascade (Zacksenhaus and Sheinin 1990; McGrath, Jentsch et al. 1991).

2.2.2 Enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2)

Suite à l'activation et la liaison de la molécule d'ubiquitine à l'enzyme (E1), cette dernière s'associe à la prochaine classe d'enzymes dans la cascade, les enzymes de conjugaison de l'ubiquitine (E2). L'enzyme (E1) est alors en mesure de promouvoir le transfert de l'ubiquitine au résidu cystéine du site actif de l'enzyme (E2) (Hochstrasser 1998; Hochstrasser 2000; Pickart 2001). Des études ont démontrées que chaque enzyme (E2) pouvait orchestrer la modification de multiples substrats associés à la même fonction biologique. Par exemple, les enzymes (E2) Rad6p et Cdc34p sont impliquées de façon respective dans la réponse au dommage à l'ADN et dans la transition G1-S du cycle cellulaire (Goebel, Yochem et al. 1988).

2.2.3 Enzyme ligase (E3)

2.2.3.1 Réaction catalytique de l'enzyme (E3)

L'étape finale de conjugaison de l'ubiquitine implique la troisième classe d'enzymes qui est la plus vaste, soit l'enzyme ligase (E3). Cette classe est divisée en trois différentes familles, HECT, RING et U-box correspondant à trois domaines catalytiques différents, mais partageant un mécanisme d'action similaire. Les enzymes (E3) possèdent au moins deux domaines d'interaction protéine-protéine. Un premier domaine de recrutement de l'enzyme (E2) et un second domaine de reconnaissance du substrat. Une fois liée à l'ubiquitine activée, l'enzyme (E2) interagit avec l'enzyme (E3) qui reconnaît un substrat spécifique possédant un signal d'ubiquitination. Cette interaction permet à l'enzyme (E3) de transférer directement l'ubiquitine de l'enzyme (E2) au résidu lysine sur le substrat. Certains types d'enzymes E3, tel que les enzymes ligases de la famille HECT, peuvent capturer l'ubiquitine sur son résidu cystéine avant de le transférer sur le substrat. Ensuite, un lien covalent se forme entre le résidu lysine du substrat et le résidu glycine en C-terminal de l'ubiquitine. Une répétition du cycle de cette cascade d'ubiquitination peut se produire par l'ajout d'une nouvelle ubiquitine sur la lysine de l'ubiquitine précédente résultant en la formation d'une chaîne polyubiquitine qui sera reconnue par le protéasome.

2.2.3.2 La famille d'enzymes (E3) HECT

La découverte du domaine HECT a été révélée par l'étude de la dégradation de la protéine suppresseur des tumeurs, p53. Lorsque les cellules étaient infectées avec la forme oncogène du virus du papillome humain (VPH), p53 était régulée négativement via la voie de dégradation par le protéasome (Scheffner, Werness et al. 1990). En fait, l'induction de l'ubiquitination de p53 était due au gène E6 du VPH codant pour une protéine, qui associée à d'autres partenaires, forme un complexe E6-AP. Ce complexe possède la capacité de reconnaître p53 et d'agir comme enzyme ligase (E3) spécifique à p53. Le complexe E6-AP comprend un domaine HECT (*Homologous to E6-AP Carboxy-Terminus*) qui contient des résidus cystéines requis pour l'ubiquitination de p53 (Scheffner, Nuber et al. 1995). C'est ainsi que toutes les enzymes possédant un domaine HECT et une activité ligase font parties de cette famille d'enzymes (E3). Les enzymes (E3) HECT possèdent deux domaines d'interaction dont un pour interagir avec le substrat et l'autre pour recruter l'enzyme (E2). De plus, les enzymes (E3) HECT performant la réaction d'ubiquitination en deux étapes. La première consistant en une étape transitoire dans laquelle un lien thiol ester hautement énergétique est formé entre l'ubiquitine et l'enzyme (E3) HECT, la seconde performe le couplage proprement dit de l'ubiquitine au substrat par un lien covalent sur un résidu lysine.

2.2.3.3 La famille d'enzymes (E3) RING

Les enzymes (E3) faisant parties de cette famille possèdent tous un domaine RING (*Really Interesting New Gene*) contenant une séquence consensus de huit cystéines et histidines qui coordonnent deux ions zinc pour former un domaine de liaison au zinc. Les enzymes (E3) RING ne forment pas de lien thiol ester avec l'ubiquitine mais catalyse plutôt son transfert direct de l'enzyme (E2) au résidu lysine du substrat. Les enzymes (E3) RING peuvent être divisées en deux classes, RING-H2 contenant un résidu histidine à la position 4 et 5 et RING-HC contenant seulement un résidu histidine à la position 4. Par contre, seul la classe des protéines RING-H2 possèdent une activité d'ubiquitination dont font parti la première variété d'enzyme (E3), la sous unité simple (E3) RING. Ces enzymes contiennent un motif RING et un domaine de reconnaissance du substrat localisés sur le même polypeptide. Il a été démontré *in vitro* que ces protéines RING peuvent recruter des enzymes (E2) (Lorick, Jensen et al. 1999) et catalyser leur propre ubiquitination sur un résidu lysine (Joazeiro, Wing et al. 1999; Lorick, Jensen et al. 1999). L'autoubiquitination des enzymes (E3) a même été démontrée *in vivo* représentant un mécanisme physiologique de régulation négative. La deuxième variété, la sous unité multiple (E3) RING, contient une protéine RING interagissant avec d'autres protéines pour former un complexe permettant ainsi aux protéines RING-HC d'avoir une activité d'ubiquitination. Par exemple, le complexe SCF (E3) est constitué de plusieurs protéines dont Rbx1 qui recrute

l'enzyme (E2) et transfère l'ubiquitine, F-box qui reconnaît le substrat et Skp1/Cul1 agissant comme protéine adaptatrice (Tyers and Jorgensen 2000).

2.2.3.4 La nouvelle famille d'enzymes (E3) U-box

Le domaine U-box de l'enzyme (E3) est en fait une variante du motif RING. Les résidus cystéines et histidines retrouvés dans le motif RING sont substitués par des résidus chargés et polaires pour former des liens hydrogènes. Ces liens permettent de stabiliser cette structure qui est similaire au motif RING, mais sans la coordination des ions zinc. La structure tridimensionnelle du domaine U-box est d'ailleurs semblable à celle du motif RING (Aravind and Koonin 2000). Similairement aux protéines RING, l'enzyme (E3) U-box ne forme pas de lien thiol ester avec l'ubiquitine mais transfère plutôt l'ubiquitine sur le substrat. L'enzyme (E3) U-box possède également une activité ligase. Des études ont démontré la présence de l'activité d'ubiquitination chez six enzymes U-box de mammifère en conjonction avec les enzymes (E1) et (E2) (Hatakeyama, Yada et al. 2001). De plus, des délétions ou des mutations ponctuelles dans le domaine U-box résultent dans la perte de l'activité ligase (E3). Les protéines U-box définissent ainsi une troisième famille d'enzymes (E3) s'ajoutant à la famille des enzymes HECT et RING.

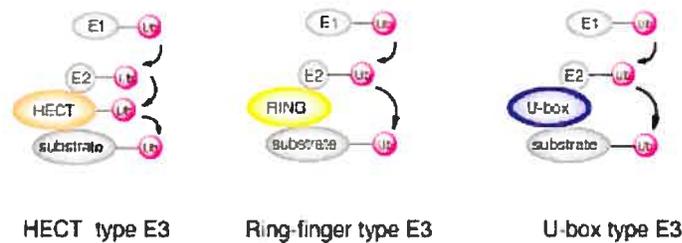


Schéma 2. Trois familles d'enzymes ligases (E3). Contrairement à la famille des enzymes HECT, les enzymes ligases RING et U-box ne forment pas de lien thiol ester avec l'ubiquitine, mais transfèrent plutôt directement l'ubiquitine de l'enzyme (E2) au substrat. (Hatakeyama and Nakayama 2003)

2.2.4 Enzyme (E4)

Le quatrième groupe d'enzymes, les enzymes (E4), reconnaît des chaînes courtes d'ubiquitines et catalyse leur élongation (Koegl, Hoppe et al. 1999). La protéine de levure Ufd2 (E4), en conjonction avec l'enzyme Uba1 (E1), Ubc4 (E2) et UFDA (E3), a été démontré pouvant promouvoir l'élongation des chaînes ubiquitine de façon spécifique sur la protéine β -galactosidase fusionnée à une ubiquitine, structure lourde (Koegl, Hoppe et al. 1999). Dans la levure, l'Ufd2 est impliquée dans la survie cellulaire sous des conditions de stress par son association avec Cdc48, une chaperonne qui appartient à la famille des ATPases de type AAA. L'équivalent se produit aussi chez les mammifères où UFD2a interagit avec p97/VCP, l'homologue de Cdc48, pour permettre l'élongation des chaînes courtes qui seront ensuite reconnues par le protéasome (Koegl, Hoppe et al. 1999; Kaneko, Hatakeyama et al. 2003). L'Ufd2 et ses homologues partagent un domaine U-box qui est conservé parmi ces protéines et qui médie l'interaction fonctionnelle avec les

ubiquitines de la chaîne conjuguée aux substrats. Ce domaine est devenu un élément fonctionnel essentiel de la famille des enzymes (E4).

2.3 Le protéasome

Les protéines polyubiquitinées par les enzymes (E1), (E2) et (E3) peuvent être dégradées par la voie du protéasome. Dans une série d'événements, le protéasome libère les molécules d'ubiquitines des substrats, déplie les protéines pour ensuite les transloquer dans la partie centrale du protéasome où la protéolyse s'effectue. Le protéasome est localisé dans le noyau et dans le cytosol et constitue plus de 1 % du contenu protéique des cellules eucaryotes (Gerards, de Jong et al. 1998). Le protéasome, aussi appelé protéasome 26S, est constitué de deux copies de 32 sous unités différentes constituant ainsi un enzyme de grande dimension (2.5 MDa). Les sous unités sont hautement conservées parmi tous les eucaryotes et la dégradation par le protéasome est la voie de régulation la plus conservée dans ce type cellulaire. Le protéasome peut se diviser en deux sous complexes fonctionnels, le protéasome 20S qui contient l'activité catalytique de dégradation et le protéasome 19S qui prépare les substrats pour la dégradation. Le protéasome 20S est la partie centrale du protéasome formée de deux anneaux externes, constitués de sous unités α , et de deux anneaux internes, constitués de sous unités β (Groll and Huber 2003). Ces anneaux forment une cavité isolée à l'intérieur de laquelle s'effectue la protéolyse sur trois sous unités β des

anneaux internes. Les sous unités α des anneaux externes ont pour fonction de réguler l'entrée des substrats vers la cavité de protéolyse. Pour être dégradé par le protéasome 20S, les substrats doivent passer par le protéasome 19S qui reconnaît les substrats, les déubiquitine, les linéarise pour finalement les transloquer dans le protéasome 20S (Glickman and Ciechanover 2002; Glickman and Maytal 2002). Le protéasome 19S peut être divisé en deux complexes, la base et le couvercle (Glickman, Rubin et al. 1998). La base contient des ATPases ayant une activité semblable aux chaperonnes pour déplier les protéines. Le couvercle du protéasome est nécessaire pour la déubiquitination des protéines. La stabilisation de l'interaction entre ces deux complexes est médiée par la sous unité Rpn10 du protéasome située entre le couvercle et la base (Glickman and Ciechanover 2002). La sous unité Rpn10 est aussi impliquée dans la reconnaissance des substrats par sa capacité de lier les chaînes polyubiquitine (Glickman, Rubin et al. 1998). Tout récemment, la ligase (E3) Parkin impliquée dans la maladie du Parkinson a été découverte interagissant avec Rpn10 (Sakata, Yamaguchi et al. 2003). Ceci suggère que les différentes sous unités du protéasome peuvent possiblement lier des enzymes (E3) qui sont elles-mêmes liées à des substrats ubiquitinés. Il est donc possible que cette liaison de l'enzyme (E3) au protéasome permette de cibler les substrats pour la dégradation. D'autres études ont démontré l'implication des récepteurs de l'ubiquitine dans le ciblage des substrats au protéasome (voir *review* (Di Fiore, Polo et al. 2003; Hicke and Dunn 2003). Rad23 est un

récepteur de l'ubiquitine pouvant s'associer aux substrats ubiquitinés, via son domaine UBA (motif responsable de l'association à l'ubiquitine) et reconnaître le protéasome, via son domaine UBL (*Ubiquitin-like domain*) (Schauber, Chen et al. 1998; Elsasser, Gali et al. 2002; Elsasser, Chandler-Militello et al. 2004), pour escorter les substrats jusqu'au protéasome. Rad23 peut aussi recruter une ubiquitine ligase spécifique pour l'élongation de la chaîne ubiquitine du substrat. Le domaine de liaison à l'ubiquitine ligase est le même que celui du protéasome constituant une liaison mutuellement exclusive. Par exemple, l'ubiquitine ligase Ufd2 compétitionne avec le protéasome pour lier le domaine UBL du récepteur Rad23 (Kim, Mi et al. 2004). Rad23 ne peut interagir avec la ligase et le protéasome simultanément, mais transporte plutôt le substrat de la ligase au protéasome qui reconnaît les chaînes polyubiquitine via sa sous unité Rpn10 (Kim, Mi et al. 2004; Richly, Rape et al. 2005).

2.4 Type d'ubiquitination

L'ubiquitination peut réguler l'activité et la localisation des protéines cibles dépendamment du type d'ubiquitination subit par les substrats. Ainsi, les chaînes polyubiquitine sont ciblées pour la dégradation par le protéasome, alors que la monoubiquitination est impliquée dans d'autres fonctions cellulaires telles que l'endocytose. Ainsi, différents types de conjugaison d'ubiquitines sont impliqués dans la régulation de différents processus cellulaires. Une question à se poser est comment la machinerie d'ubiquitines prend la décision de choisir quel type d'ubiquitination les protéines doivent subir? Une possibilité

est que les différents sous groupes d'enzymes (E3) aient une spécificité pour les différents types d'ubiquitination.

2.4.1 Polyubiquitination

La molécule d'ubiquitine contient des résidus lysines qui peuvent être la cible de l'ubiquitine suivante pour sa liaison via son résidu glycine. La formation des liens isopeptides lysine-glycine entre ces ubiquitines forme ainsi une chaîne polyubiquitine qui est rattachée à une seule lysine du substrat (Pickart 2001) (voir schéma 2(c) tiré du *review* de Haglund, Di Fiore et al. 2003). Différents types de chaînes ubiquitine peuvent être formées dépendamment du résidu sur lequel le polymère est formé. Ainsi, les chaînes formées sur les résidus Lys 29, Lys 48 et Lys 63 de l'ubiquitine formeront des types différents de polymères qui auront des activités différentes. Une protéine portant une chaîne formée par la liaison de la Gly 76 en C-terminal de l'ubiquitine à la Lys 48 de l'ubiquitine précédente médie la destruction de la protéine par le protéasome (Chau, Tobias et al. 1989). Ces polymères Lys 48-Gly 76 doivent être constitués d'au moins quatre ubiquitines pour que les protéines puissent être reconnues et dégradées de façon efficace par le protéasome. À l'opposé, le polymère formé par la liaison Lys 63-Gly 76 entre les ubiquitines module la fonction des protéines en absence de l'induction de la dégradation (Hofmann and Pickart 1999). Enfin, il a été suggéré que les chaînes courtes d'ubiquitines liées par la Lys 29 constituaient un signal de recrutement de l'enzyme (E4) précédant la protéolyse médiée par le protéasome. Hors, ce

sont les polymères formés par la liaison Lys 48-Gly 76 entre les ubiquitines qui constituent la majeure partie des chaînes polyubiquitine.

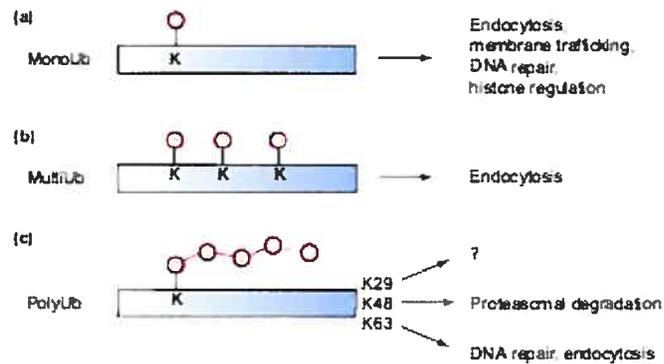


Schéma 3. Différents types d'ubiquitination. La monoubiquitination (monoUb) résulte à l'attachement d'une seule ubiquitine sur un résidu lysine (K) (a), alors que la monoubiquitination multiple (multiUb) résulte par l'ajout d'une seule ubiquitine sur plusieurs lysines (b). Ces types d'ubiquitination sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires tels que l'endocytose et le trafic des membranes. La polyubiquitination (PolyUb) consiste en la formation d'une chaîne ubiquitine via les lysines 29-48 ou 63 impliquée dans des processus différents (Haglund, Di Fiore 2003).

2.4.2 Monoubiquitination et monoubiquitination multiple

La monoubiquitination est la conjugaison d'une seule molécule d'ubiquitine sur un résidu lysine du substrat. Lorsque plusieurs résidus lysines du substrat sont attachés à une seule molécule d'ubiquitine, le processus est appelé monoubiquitination multiple (voir schéma 2(a et b) tiré du *review* de Haglund, Di Fiore et al. 2003). Contrairement à la polyubiquitination ciblant les protéines pour la dégradation par le protéasome, la monoubiquitination et la monoubiquitination multiple régulent plutôt des processus cellulaires tels que

l'endocytose. Ce processus est l'internalisation et le transport des protéines de la membrane plasmique de la surface cellulaire vers des domaines intracellulaires. Plusieurs protéines de la membrane plasmique subissent une régulation négative suivant leur internalisation dans la voie d'endocytose. Pour être internalisées, certaines protéines doivent subir une monoubiquitination de leur domaine cytoplasmique afin d'envoyer un signal d'endocytose. Ainsi, les récepteurs, suite à un signal extracellulaire, sont ubiquitinés, puis internalisés dans la cellule (Strous, van Kerkhof et al. 1996; Hicke 1999; Levkowitz, Waterman et al. 1999). L'étape finale de ce processus se termine par la dégradation des protéines ubiquitinées dans le lysosome.

2.5 Motifs de liaison à l'ubiquitine

La reconnaissance des protéines ubiquitinées se fait par l'intermédiaire des motifs de liaison à l'ubiquitine qui recrute de façon spécifique les molécules d'ubiquitines rattachées au substrat. Des domaines tels que UBA, UIM et CUE ont la capacité de reconnaître et de lier l'ubiquitine.

2.5.1 Motif responsable de l'association à l'ubiquitine (UBA)

Le domaine UBA est un domaine de 40 acides aminés. Il est retrouvé dans les enzymes d'ubiquitination et de déubiquitination (Hofmann and Bucher 1996). Ce domaine est aussi présent dans les protéines impliquées dans le ciblage des substrats vers le protéasome, tel que Rad23, et dans les protéines adaptatrices des complexes ATPases AAA (Bertolaet, Clarke et al. 2001). De

plus, il a été démontré que le domaine UBA interagissait avec la mono- et la polyubiquitine avec une plus grande affinité pour cette dernière (Bertolaet, Clarke et al. 2001). Récemment, des études ont démontré que les protéines contenant un motif UBA se liaient directement à la chaîne polyubiquitine (Ortolan, Tongaonkar et al. 2000; Bertolaet, Clarke et al. 2001). Des essais *in vitro* ont révélé que le domaine UBA de la protéine Rad23 pouvait inhiber la formation de la chaîne polyubiquitine (Ortolan, Tongaonkar et al. 2000). De plus, l'inhibition de l'élongation par Rad23 est spécifique à la chaîne formée par la liaison Lys 48-Gly 76 (Raasi and Pickart 2003). Ainsi, le domaine UBA est retrouvé dans un grand nombre de protéines ayant des fonctions diverses et impliquées dans différents processus cellulaires.

2.5.2 Motif responsable de l'interaction à l'ubiquitine (UIM)

Le motif UIM est un petit domaine de 20 acides aminés qui a été découvert dans la sous unité Rpn10 du protéasome 19S et qui avait la capacité de lier la chaîne polyubiquitine (Deveraux, Ustrell et al. 1994). La sous unité Rpn10 est impliquée dans la reconnaissance des protéines polyubiquitinées destinées pour la dégradation. Le domaine UIM est aussi retrouvé dans les enzymes (E3) et les enzymes de déubiquitination (Hofmann and Falquet 2001). Contrairement à Rpn10, plusieurs protéines de la voie d'endocytose intégrant le domaine UIM peuvent lier des protéines monoubiquitinées qui envoient un signal d'internalisation (Polo, Sigismund et al. 2002). Ces protéines peuvent

elles-mêmes être monoubiquitinées par des protéines contenant un motif UIM (Klapisz, Sorokina et al. 2002; Oldham, Mohney et al. 2002).

2.5.3 Motif responsable du couplage de l'ubiquitine pour la dégradation associée au RE (CUE)

Le domaine CUE est une variante du domaine UBA et est constitué de 42-43 acides aminés. Basé sur la découverte de l'interaction entre le domaine CUE de la protéine de levure Cue1p et l'enzyme (E2) Ubc7p, le domaine CUE a été découvert interagissant avec les enzymes de conjugaison (E2). Le recrutement de l'Ubc7p au RE par la protéine Cue1p est essentiel pour la dégradation des protéines ayant une mauvaise conformation dans la lumière du RE (Biederer, Volkwein et al. 1997). Ce processus, appelé ERAD (dégradation associée au RE), permet l'élimination des protéines anormales ou non assemblées dans le RE. Les substrats ciblés pour la dégradation sont sélectionnés par un système de contrôle de la qualité des protéines dans la lumière du RE. Les substrats de l'ERAD sont ensuite transloqués dans le cytosol, ubiquitinés puis dégradés par le protéasome 26S. Le processus d'ERAD sera décrit plus en détail dans la prochaine section. L'AMFR, une enzyme ligase (E3), est un exemple de protéine ayant un domaine CUE associé à l'enzyme de conjugaison MmUbc7 et qui est impliqué dans l'ERAD (Fang, Ferrone et al. 2001). Des études récentes suggèrent un rôle plus général pour le domaine CUE qui serait en fait un domaine de liaison à l'ubiquitine (Donaldson, Yin et al. 2003; Shih, Prag et al. 2003). Ces études ont démontré

que la région C-terminale de la protéine de levure Vps9, une protéine impliquée dans la voie de l'endocytose, interagissait spécifiquement avec la monoubiquitine. La région requise pour la liaison de la monoubiquitine coïncide avec le domaine CUE de Vps9 indiquant que ce domaine est impliqué dans l'interaction directe avec la monoubiquitine. Ce domaine contient deux motifs conservés, le motif MFP en N-terminal et le motif dileucine en C-terminal qui sont essentiels pour l'interaction avec l'ubiquitine. Le domaine CUE de Vps9 peut même promouvoir la monoubiquitination de sa propre protéine Vps9 en conjonction avec l'enzyme ligase (E3) Rsp5 (Donaldson, Yin et al. 2003; Shih, Prag et al. 2003). Il a été proposé que la région d'interaction du domaine Cue sur la molécule d'ubiquitine est à proximité de la Lys 48, le site de formation des chaînes polyubiquitine. Cette interaction entraînerait possiblement un changement de la polarité et de la charge de la Lys 48 empêchant la formation de liens covalents avec l'ubiquitine suivante (Kang, Daniels et al. 2003). Bien que le domaine CUE interagisse avec la monoubiquitine, certaines protéines ayant un domaine Cue peuvent aussi interagir avec la polyubiquitine. Ceci s'explique par le fait que la dernière ubiquitine d'une chaîne polyubiquitine est en fait équivalente à une monoubiquitine reconnue par le domaine Cue.

2.6 Implication de l'ubiquitination dans le cancer

Le cancer peut être le résultat d'une stabilisation des oncoprotéines ou d'une déstabilisation des gènes suppresseurs des tumeurs. Plusieurs protéines associées au cancer sont régulées par le système ubiquitine-protéasome, telles que les protéines suppresseurs des tumeurs (p53 et p27) et les récepteurs de facteurs de croissance (EGFR) (Glickman and Ciechanover 2002; Adams 2003). Des études récentes ont investigué le niveau de protéasome 20S dans le plasma d'individus en santé versus la plasma d'individus atteints de différentes néoplasies. Les résultats ont révélé que le niveau de protéasome 20S était 1000 fois plus élevé dans le plasma des patients ayant des tumeurs solides comparativement au plasma de personnes normales (Dutaud, Aubry et al. 2002). Parallèlement, d'autres études ont démontré une augmentation de l'expression des enzymes de conjugaison (E2) et des enzymes ligase (E3) dans le cancer (Fukuchi, Fukai et al. 2002; Pray, Parlati et al. 2002; Nalepa and Wade Harper 2003; Okamoto, Ozaki et al. 2003). Pris ensemble, ces études suggèrent que les cellules cancéreuses maintiennent un niveau plus élevé de la machinerie d'ubiquitination que les cellules normales pour faciliter la dégradation des protéines suppresseurs des tumeurs ou l'activation des proto-oncogènes (Glickman and Ciechanover 2002).

3. Dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD)

3.1 Mécanisme général

Chez les cellules eucaryotes, environ 30 % des protéines nouvellement synthétisées subissent une mauvaise conformation durant leur biogenèse et sont dégradées (Schubert, Anton et al. 2000). La cellule doit se débarrasser de façon efficace des protéines défectueuses puisqu'elles pourraient compétitionner avec les protéines fonctionnelles et inhiber l'activité de ces dernières (Goldberg 2003; Romisch 2004). Ainsi, un contrôle de la qualité des protéines à leur site de biogenèse dans le RE est essentiel pour la survie de la cellule. Le processus de transport sélectif des protéines du RE vers le cytosol suivi de la dégradation par le protéasome est connu sous le nom de dégradation associée au RE (ERAD). Normalement, les protéines nouvellement synthétisées entrent dans la voie sécrétoire à travers le canal Sec61 localisé dans la membrane du RE. Une fois à l'intérieur du RE, les protéines se replient, sont modifiées de façon covalente et s'oligomérisent avant d'être transportées dans des vésicules jusqu'au Golgi. Par contre, les protéines ayant subi une mauvaise conformation dans le RE sont sélectivement transportées de retour dans le cytosol où elles subiront une dégradation par le protéasome. Dépendant de la topologie du défaut de la protéine, certaines chaperonnes du RE ou du cytosol seront impliquées dans la reconnaissance des protéines pour la dégradation. Les protéines anormales sont ensuite transloquées à travers le canal Sec61 avec l'aide de p97/VCP, une chaperonne qui fournit l'énergie pour tirer les protéines

vers le cytosol. Puis, les protéines sont ubiquitinées dans le cytosol avant leur dégradation. L'ERAD peut être divisée en trois étapes, la reconnaissance du substrat, la translocation des substrats du RE au cytosol et le ciblage des protéines ubiquitinées vers le protéasome.

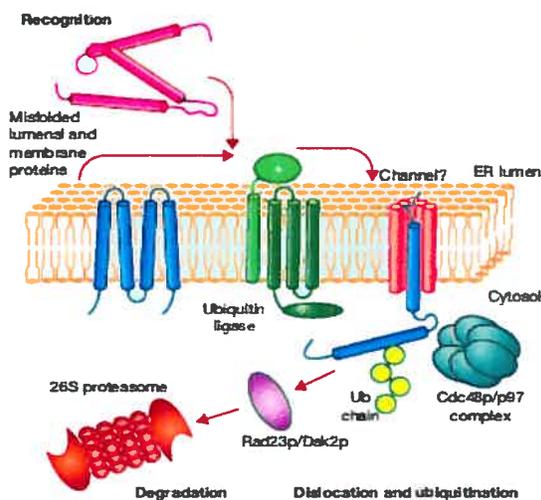


Schéma 4. Dégradation des substrats de l'ERAD par le protéasome. Les protéines anormales sont reconnues dans la lumière du RE puis exportées partiellement à travers un canal vers le cytosol. Dès que le résidu lysine de la protéine émerge dans le cytosol, l'enzyme ligase médie l'ubiquitination de cette protéine. La translocation à travers le canal est complétée par p97 pour extraire la protéine de la membrane qui est ensuite ciblée au protéasome par Rad23p et Dsk2p (Meusser, Hirsch, et al. 2005).

3.2 Reconnaissance des substrats

La machinerie responsable de la reconnaissance des substrats doit être en mesure de discriminer les protéines fonctionnelles des protéines aberrantes. Lorsque les protéines sont mal repliées, des plaques hydrophobiques sont exposées à la lumière du RE qui sont reconnues par des chaperonnes moléculaires. Ces chaperonnes ont pour fonction de faciliter le repliement des

protéines nouvellement synthétisées à se replier et de cibler les protéines mal repliées pour la dégradation (Fewell, Travers et al. 2001; Ellgaard and Helenius 2003). Par contre, selon que les protéines sont solubles ou transmembranaires, les protéines requerront des chaperonnes différentes pour leur reconnaissance. En fait, la reconnaissance des substrats solubles est dépendante des chaperonnes dans le RE tel que BiP, alors que les protéines transmembranaires avec un grand domaine cytosolique requière la présence de chaperonnes cytosoliques telles que Hsp70 et BiP (Zhang, Nijbroek et al. 2001; Taxis, Hitt et al. 2003; Huyer, Piluek et al. 2004). Une étude a déterminé les chaperonnes requises pour la reconnaissance des protéines solubles et transmembranaires. Deux types de substrats membranaires et un substrat soluble ont été générés et qui contenaient tous une mauvaise conformation de la carboxypeptidase yscY (CPY*), qui est le motif de reconnaissance de l'ERAD dans la lumière du RE. Alors que le premier substrat membranaire ne possédait pas de domaine cytosolique, le deuxième possédait une protéine fluorescente verte (GFP) émergeant dans le cytosol. Contrairement aux deux substrats membranaires, ils ont démontré que le substrat CPY* soluble requérait les chaperonnes BiP et Der1p du RE pour sa reconnaissance. La reconnaissance du substrat membranaire CPY* fusionné à un GFP dans le cytosol requérait plutôt les chaperonnes cytosoliques Hsp70, Hsp40 et Hsp104p nécessaires pour le dépliement de la molécule de GFP. Ces études révèlent ainsi que la dégradation des substrats solubles et membranaires impliquent différentes composantes de la machinerie de l'ERAD (Taxis, Hitt et al. 2003).

Il a aussi été proposé que la structure N-glycan pouvait contribuer à la reconnaissance des substrats dans le RE (voir *review* Trombetta and Parodi 2003; Helenius and Aebi 2004). Les protéines N-glycosylées dans le RE entre dans un cycle calnexine/calréticuline (Helenius and Aebi 2004). Ces lectines reconnaissent le résidu terminal glucose sur le N-glycan qui peut être clivé par la glucosidase II. La déglucosylation par la glucosidase II entraîne le repliement complet du substrat pour sortir du cycle, alors que les intermédiaires non repliés complètement sont glycosylés à nouveau pour lier la calnexine/calréticuline (Helenius and Aebi 2004). Ce cycle peut se produire indéfiniment jusqu'à ce qu'une mannosidase I du RE vienne cliver un résidu terminal mannose du N-glycan entraînant l'arrêt du cycle et de la déglucosylation. Ceci permet de prolonger l'association entre le substrat et la calnexine par l'intermédiaire du résidu glucose du N-glycan pour finalement cibler le substrat vers l'ERAD (Herscovics 2001; Molinari, Calanca et al. 2003).

3.3 Translocation des substrats du RE au cytosol

3.3.1 Translocation à travers le canal Sec61

Après avoir été sélectionnées par les chaperonnes pour la dégradation, les protéines retournent au cytosol en traversant la membrane du RE par le complexe Sec61. Ce canal doit s'ouvrir latéralement pour accommoder les protéines transmembranaires et transversalement pour permettre le passage des protéines solubles. Le canal Sec61 est un conduit passif qui nécessite des facteurs accessoires pour fournir l'énergie nécessaire pour exercer une force sur

le substrat et déterminer la direction du transport (voir *review* Matlack, Mothes et al. 1998).

3.3.2 Polyubiquitination des substrats

L'ajout des chaînes polyubiquitine aux substrats est essentiel pour leur translocation. Par contre, les protéines solubles du RE sont séparées de la machinerie d'ubiquitination par la membrane du RE. Une translocation partielle du substrat doit s'effectuer jusqu'à ce qu'un résidu lysine soit exposé à la face cytoplasmique de la membrane où l'ubiquitination s'effectue. Par contre, les substrats transmembranaires avec un résidu lysine dans son domaine cytoplasmique peuvent être ubiquitinés avant leur translocation. Dans les deux cas, l'ubiquitination s'effectue à la face cytoplasmique de la membrane du RE avant leur exportation complète dans le cytosol (Hiller, Finger et al. 1996; Shamu, Story et al. 1999; Shamu, Flierman et al. 2001). En fait, plusieurs composants de la machinerie d'ubiquitination pour l'ERAD sont localisés à cet endroit. Par exemple, l'enzyme ligase (E3) Hrd1/Der3 est une protéine transmembranaire du RE impliquée dans l'ERAD (Hampton, Gardner et al. 1996; Knop, Finger et al. 1996; Bordallo, Plemper et al. 1998). Son domaine RING-H2, faisant face au cytosol, interagit avec les enzymes de conjugaison Ubc1 et Ubc7 (Bays, Gardner et al. 2001; Deak and Wolf 2001) et est impliqué dans l'ubiquitination des substrats solubles. Une autre enzyme ligase localisée dans la membrane du RE est la protéine Doa10p qui coopère avec les enzymes (E2) Ubc6p et Cue1p/Ubc7p pour ubiquitiner des protéines transmembranaires

ayant un grand domaine cytoplasmique (Swanson, Locher et al. 2001; Vashist and Ng 2004). L'AMFR, une enzyme ligase (E3) RING, est aussi localisé dans la membrane du RE et est impliqué dans l'ERAD en recrutant l'enzyme de conjugaison MmUbc7 (Fang, Ferrone et al. 2001).

3.3.3 Libération du polypeptide dans le cytosol

La polyubiquitination du substrat est insuffisante pour libérer le substrat de la membrane du RE dans le cytosol. Une énergie supplémentaire est nécessaire pour extraire le substrat hors de la membrane. Dès que la chaîne polyubiquitine atteint une certaine longueur, le complexe p97-Ufd1-NPL4 possédant une activité ATPase reconnaît et interagit avec la chaîne avec une grande affinité. Puis, p97-Ufd1-NPL4 hydrolyse de l'ATP pour fournir l'énergie et la force nécessaires à l'extraction des substrats de la membrane du RE (Ye, Meyer et al. 2003).

3.4 Ciblage des protéines polyubiquitinées vers le protéasome

Une étude récente a démontré l'existence d'une voie permettant le transport des substrats polyubiquitinés jusqu'au protéasome où ils sont escortés par une succession de facteurs (Richly, Rape et al. 2005). Tous ces facteurs impliqués sont des protéines de liaison à l'ubiquitine. Dans le modèle, les substrats oligoubiquitinés (une ou deux ubiquitines) sont d'abord reconnus par les cofacteurs Ufd1/NPL4 de p97 capable de lier les chaînes ubiquitine. P97 est une ATPase possédant une activité chaperonne (DeLaBarre and Brunger 2003)

et impliquée dans l'ERAD (Braun, Matuschewski et al. 2002; Jarosch, Taxis et al. 2002; Rabinovich, Kerem et al. 2002). P97 interagit avec l'Ufd2, une enzyme (E4), pour l'élongation de la chaîne du substrat. Après une certaine longueur, la chaîne polyubiquitinée est reconnue par les récepteurs de l'ubiquitine RAD23/DSK2 pour finalement les cibler vers le protéasome (Richly, Rape et al. 2005) (voir schéma 4 tiré de l'article Bazirgan and Hampton 2005).

D'abord, cette voie implique les cofacteurs Ufd1/NPL4 de p97 qui recrutent des substrats portant une ou deux ubiquitines seulement. Il a été démontré que l'enzyme (E4) Ufd2 permettait l'élongation de la chaîne ubiquitine et pouvait interagir avec p97 et les protéines ubiquitinées (Koegl, Hoppe et al. 1999). Ils ont observé que la chaîne ubiquitine catalysée par Ufd2, en présence de p97, était restreinte à 3-6 molécules d'ubiquitines (Richly, Rape et al. 2005). Les résultats révèlent que c'est plutôt p97 qui restreint la chaîne ubiquitine à 3-6 molécules (Richly, Rape et al. 2005). Ces résultats sont en accord avec une autre étude montrant que la longueur de cette chaîne contient suffisamment de molécules d'ubiquitines (Raasi, Orlov et al. 2004) pour être reconnue par les récepteurs de l'ubiquitine RAD23 et DSK2. Ces récepteurs possèdent un domaine UBL, qui interagit avec l'Ufd2 ou le protéasome (Schauber, Chen et al. 1998; Hiyama, Yokoi et al. 1999; Wilkinson, Seeger et al. 2001; Elsasser, Gali et al. 2002; Elsasser, Chandler-Militello et al. 2004), et un domaine UBA pour lier les substrats ubiquitinés (Hofmann and Bucher

1996). RAD23 et DSK2 ont la capacité d'escorter les substrats polyubiquitinés jusqu'au protéasome où ils sont dégradés. Sans l'élongation par l'Ufd2, les chaînes seraient trop courtes (une ou deux ubiquitines) pour être reconnues par RAD23/DSK2. Ufd2 est donc essentielle pour cibler les substrats pour la dégradation en rajoutant seulement une ou deux molécules d'ubiquitines. RAD23 et DSK2 peuvent lier l'Ufd2 et le protéasome 26S de façon mutuellement exclusive (Kim, Mi et al. 2004) suggérant que suite à la liaison avec la protéine polyubiquitinée, RAD23 et DSK2 se dissocient de l'Ufd2 pour interagir avec le protéasome (Kim, Mi et al. 2004). Finalement, p97 agit comme ségrégase pour dissocier le substrat ubiquitiné de ses partenaires avant de le transférer au protéasome.

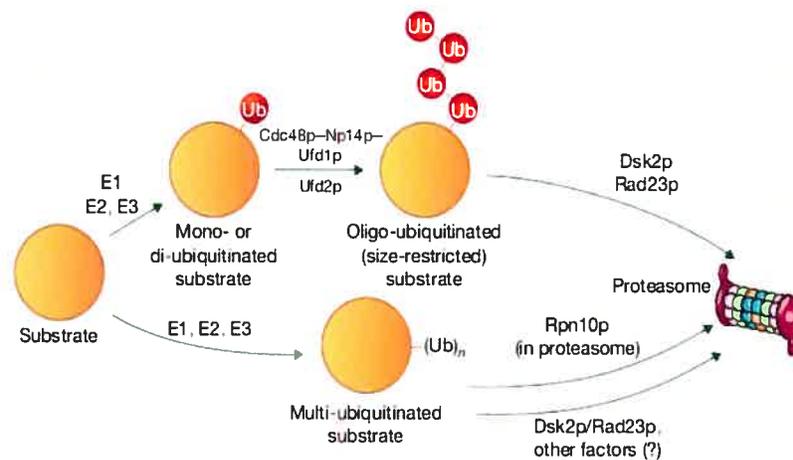


Schéma 5. Deux voies distinctes pour le ciblage des substrats polyubiquitinés vers le protéasome. Les chaînes courtes mono- ou di-ubiquitinées sont reconnues par Cdc48-Np14p-Ufd1p qui régule l'élongation de la chaîne par Ufd2p, une enzyme E4. Les substrats sont ensuite escortés jusqu'au protéasome par Rad23p et Dsk2p. La voie classique implique la sous unité Rpn10p du protéasome dans la reconnaissance des longues chaînes polyubiquitinées (Bazirgan and Hampton 2005).

La voie classique pour cibler les substrats pour la dégradation se fait généralement par l'intermédiaire de la sous unité Rpn10 qui possède un domaine UIM pouvant reconnaître les chaînes polyubiquitinées (Wilkinson, Seeger et al. 2001). La sous unité Rpn10 a toutefois une faible affinité pour les chaînes restreintes en taille. C'est plutôt par les récepteurs RAD23/DSK2 que les chaînes restreintes en taille sont ciblées au protéasome puisque ces récepteurs ont plus d'affinité pour les chaînes courtes portant 3-6 ubiquitines (Richly, Rape et al. 2005). Ces résultats suggèrent alors que dépendamment de la longueur de la chaîne ubiquitine, les substrats utiliseront des voies distinctes pour être ciblés au protéasome (voir schéma 4 tiré du *review* Bazirgan and Hampton 2005).

3.5 Implication de l'AMFR dans l'ERAD

Le récepteur du facteur autocrine de motilité (AMFR) est une protéine transmembranaire dont l'expression est corrélée avec les métastases des tumeurs. Il a été démontré que l'AMFR était une enzyme ligase (E3) de l'ERAD dont l'activité ligase était dépendante du motif RING (Fang, Ferrone et al. 2001). En accord avec ces résultats, l'AMFR recrute spécifiquement MmUbc7, une enzyme de conjugaison (E2) soluble impliquée dans l'ERAD (Fang, Ferrone et al. 2001) (Voir schéma 5 tiré du *review* de Fang, Lorick et al. 2003).

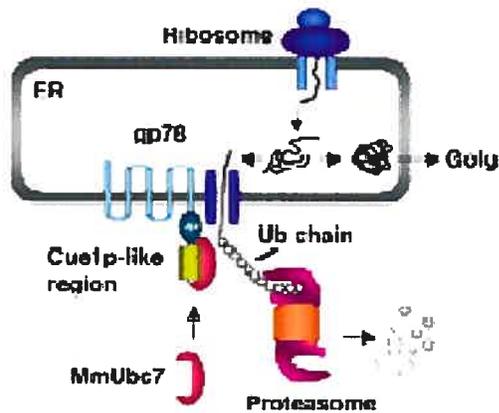


Schéma 6. Modèle de l'ubiquitination médiée par l'AMFR dans l'ERAD. Chez les mammifères, l'AMFR (gp78) recrute MmUbc7, une enzyme (E2) cytosolique, vers la membrane du RE pour médier l'ubiquitination des substrats (Fang, Lorick et al. 2003).

La région de l'AMFR responsable de l'interaction avec l'enzyme MmUbc7 est distincte du motif RING. En fait, l'interaction se fait dans la région en aval du motif RING en C-terminal. Cette région est similaire à celle de la protéine Cue1p qui recrute l'Ubc7p à la membrane du RE chez la levure (Fang, Ferrone et al. 2001). L'intégrité du motif RING de l'AMFR, en conjonction avec l'enzyme (E2) MmUbc7, permet à l'AMFR de médier l'ubiquitination des substrats. L'AMFR fusionné à un GFP peut s'autoubiquitiner pour être dégradé par le protéasome. Cette autoubiquitination nécessite aussi un motif RING fonctionnel et la présence de la protéine MmUbc7. L'AMFR est donc lui-même un substrat de l'ERAD (Fang, Ferrone et al. 2001). L'AMFR peut aussi dégrader d'autres substrats de l'ERAD tels que CD3 δ , une sous unité du récepteur des cellules T (Fang, Ferrone et al. 2001) et l'apolipoprotéine B (Liang, Kim et al. 2003). Récemment, Registre et ses collègues ont démontré que la protéine codée par le gène de l'AMFR était reconnue par l'anticorps monoclonal 3F3A mAb (Registre, Goetz et al. 2004). De plus, cet anticorps

peut reconnaître l'AMFR fusionné à une protéine FLAG en N-terminal lorsque l'AMFR est immunoprécipité avec l'anticorps anti-FLAG et révélé avec 3F3A mAb. Ils ont aussi observé par immunofluorescence que les cellules transfectées avec FLAG-AMFR ou AMFR-GFP induisaient une surexpression de l'AMFR révélée avec 3F3A mAb. Les cellules transfectées avec ces mêmes constructions, mais révélées avec l'anti-FLAG et par la fluorescence du GFP pour détecter le FLAG-AMFR et l'AMFR-GFP respectivement, révèlent que l'AMFR transfecté est localisé dans la région périnucléaire du RE qui n'est pas reconnu par 3F3A mAb. Ce résultat suggère que c'est la forme mal repliée de l'AMFR qui est retenue dans le RE et qui ne peut être reconnue par l'anticorps. Par contre, l'AMFR transfecté localisé dans le réseau périphérique du RE est reconnu par 3F3A mAb, mais induit une dispersion de l'AMFR qui ne présente plus la forme tubulaire associée aux mitochondries. Ces résultats démontrent que l'anticorps 3F3A mAb reconnaît spécifiquement un sous domaine du RE marqué par l'AMFR (Registre, Goetz et al. 2004).

4. P97/VCP ATPase AAA

4.1 Structure de p97/VCP

La protéine de 97 kDa contenant une valosine (p97 ou VCP) fait partie de la famille des ATPases AAA de type II (ATPases associées à une variété d'activités) et est caractérisée par la présence de deux domaines conservés d'ATPases, aussi appelés domaine AAA (Neuwald, Aravind et al. 1999; Zwickl

and Baumeister 1999; Vale 2000; Maurizi and Li 2001; Ogura and Wilkinson 2001). P97, une protéine bien conservée à travers l'évolution, est aussi connue sous le nom de CDC48 chez la levure, TER94 chez la drosophile et VCP chez les plantes et mammifères (Peters, Walsh et al. 1990; Frohlich, Fries et al. 1991; Pamnani, Tamura et al. 1997). La séquence de CDC48 chez la levure partage 69 % d'identité avec la séquence de p97 chez l'humain, révélant une bonne conservation de la protéine (Frohlich, Fries et al. 1991). De plus, p97 est hautement abondante dans la cellule constituant plus de 1 % du nombre total de protéines. La structure de p97 forme un homo-hexamère comprenant deux anneaux d'ATPases superposés (Peters, Harris et al. 1992; Rouiller, Butel et al. 2000; Zhang, Shaw et al. 2000). La molécule p97 peut être divisée en quatre domaines, soient N, D1, D2 et C.

Le domaine N est la région la moins conservée dans la famille des protéines AAA et est responsable de la reconnaissance d'un substrat spécifique. Ce domaine recrute à la fois les cofacteurs de p97 et les protéines ubiquitinées (Dai and Li 2001). Les cofacteurs de p97 sont p47, impliqué dans la fusion membranaire et Ufd1-NPL4, impliqués dans l'ERAD (Meyer, Shorter et al. 2000). P47 et le complexe Ufd1-NPL4 interagissent avec le domaine N de p97 de manière mutuellement exclusive, indiquant que ces cofacteurs dictent la fonction biologique de p97 (Meyer, Shorter et al. 2000).

Le domaine D1 est responsable de la formation des hexamères stables. Les domaines ATPases s'oligomèrent ensemble pour donner une structure hexamérique en forme d'anneau fournissant la base mécanique pour l'activité chaperonne. La plupart des protéines de la famille AAA nécessite la présence de nucléotides pour s'oligomériser, alors que p97 ne requière aucune présence de nucléotides et est exceptionnellement stable en forme d'hexamère (Wang, Song et al. 2003; Wang, Song et al. 2003).

Le domaine D2 est responsable de la majeure partie de l'activité ATPase nécessaire pour les fonctions biologiques. Comme toutes les protéines AAA, p97 requière du Mg^{2+} pour son activité enzymatique et est inhibée par du NEM (*N-ethylmaleimide*) (Peters, Walsh et al. 1990; Song, Wang et al. 2003). Une grande similarité est retrouvée entre les domaines D1 et D2 suggérant la contribution des deux domaines dans l'activité ATPase. Par contre, ces domaines n'ont pas une implication équivalente. C'est plutôt à l'intérieur du domaine D2 qu'a lieu la plupart de l'hydrolyse de l'ATP pour fournir l'énergie nécessaire à l'accomplissement des diverses activités de la cellule. Étant une chaperonne moléculaire, l'activité ATPase de p97 est modulée par des facteurs environnementaux. En fait, son activité est favorisée par des températures et pH élevés, mais supprimée par les sels, l'alcool, l'ADP et des agents oxydants (Song, Wang et al. 2003). L'activité ATPase atteint son sommet à 50-55°C et c'est plutôt l'activité ATPase du domaine D1 qui est augmentée et donc

sensible à la température (Song, Wang et al. 2003). Ainsi, le domaine D2 compte pour la majeure partie de l'activité ATPase et le domaine D1 contribue à l'augmentation de cette activité suite à un stress cellulaire, tel qu'une élévation de la température.

Enfin, la région C-terminale de p97 comprend la majeure partie des sites de phosphorylation et régule la localisation cellulaire de la protéine. La phosphorylation sur tyrosine du domaine C régule l'assemblage du RE (Egerton and Samelson 1994) et sa translocation dans le noyau durant la phase G1 du cycle cellulaire (Dai, Chen et al. 1998).

4.2 Implication de p97 dans diverses fonctions biologiques

4.2.1 Fusion membranaire

Chez les eucaryotes, la membrane nucléaire, le RE et l'appareil de Golgi sont fragmentés lors de la mitose pour diviser les organelles également entre les cellules filles. Une fois la mitose terminée, ces fragments de membrane doivent se fusionner de façon homotypique afin de reconstituer de manière spécifique les organelles (Rothman and Warren 1994). Des études ont démontré que VCP/CDC48 participait dans la fusion des membranes du RE (Zhang, Ashendel et al. 1994; Latterich, Frohlich et al. 1995) et dans la reconstitution de l'appareil de Golgi (Acharya, Jacobs et al. 1995; Rabouille, Levine et al. 1995). Un cofacteur de p97 essentiel dans la fusion des membranes est p47 (Kondo, Rabouille et al. 1997). P47 et p97 forment un complexe stable qui interagit avec

syntaxine 5, un récepteur de p47 localisé à la membrane, et un membre de la famille des t-SNARE (*target-soluble NSF attachment protein receptor*) (Rabouille, Kondo et al. 1998). Un deuxième cofacteur essentiel à la fusion membranaire est la protéine VCIP135, une enzyme de déubiquitination pouvant s'associer avec le complexe p97/p47/syntaxine 5 et s'en dissocier par l'hydrolyse de l'ATP de p97. Des études ont démontré que l'activité de déubiquitination de la protéine VCIP135 était requise pour l'assemblage de l'appareil de Golgi et la formation du réseau du RE *in vitro et in vivo* (Uchiyama, Jokitalo et al. 2002; Wang, Satoh et al. 2004).

4.2.2 Chaperonne moléculaire

La molécule p97, avec l'aide de ses cofacteurs, se lie spécifiquement aux protéines ubiquitinées et les prépare pour le transfert dans le protéasome 26S. Après le processus d'ubiquitination, p97 utilise l'énergie générée par l'hydrolyse de l'ATP pour désassembler le complexe de protéines auquel est rattachée la protéine ubiquitinée. La protéine p97 agit donc comme une ségrégase pour tirer la protéine ubiquitinée hors du complexe afin de la présenter au protéasome 26S (voir schéma 6 tiré du *review* de Wang, Song et al. 2004).

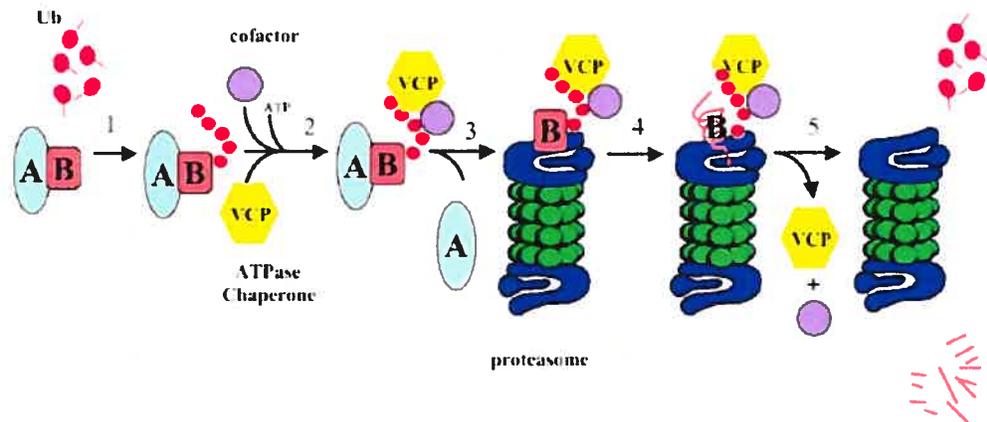


Schéma 7. P97 est une chaperonne moléculaire dans la voie de dégradation par le protéasome. La protéine B est d'abord polyubiquitinée puis reconnue par VCP (p97) et ses cofacteurs qui désassemblent le complexe protéine A/B en hydrolysant de l'ATP. La protéine B est ensuite escortée par VCP jusqu'au protéasome pour être dégradée (Wang, Song et al. 2004).

Le processus similaire de désassemblage est aussi observé dans l'ERAD, lorsque p97 extrait la protéine cible hors du RE. Dans ces deux événements, p97 utilise l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour isoler la protéine cible des autres protéines associées pour la translocation subséquente (Braun, Matuschewski et al. 2002; Ye, Meyer et al. 2003). Outre le rôle de chaperonne interagissant spécifiquement avec les protéines ubiquitinées, p97 présente aussi des caractéristiques générales de chaperonne. Une étude a démontré que CDC48 pouvait distinguer des protéines natives des protéines matures et se lier à ces dernières pour prévenir leur agrégation (Thoms 2002).

4.2.3 Dégradation associée au RE (ERAD)

Les protéines nouvellement synthétisées dans le RE des cellules eucaryotes sont sujettes à un contrôle de qualité rigoureux. Lorsque les protéines acquièrent une mauvaise conformation ou assemblage dans le RE, ces protéines retournent au cytosol. Cet événement est appelé rétrotranslocation et est suivie par la polyubiquitination de ces protéines menant à leur dégradation par le protéasome 26S. Ce processus d'ERAD (dégradation associée au RE), peut cibler des protéines membranaires ainsi que des protéines solubles du RE pour la dégradation. Des études ont démontré que p97 était requise dans l'ERAD et agissait comme chaperonne pour extraire les protéines ubiquitinées de la membrane du RE avant leur dégradation (Bays, Wilhovsky et al. 2001; Hitchcock, Krebber et al. 2001; Rape, Hoppe et al. 2001; Ye, Meyer et al. 2001; Jarosch, Taxis et al. 2002; Rabinovich, Kerem et al. 2002). p97 est en fait impliquée dans la rétrotranslocation des protéines du RE vers le cytosol (Ye, Meyer et al. 2003) avec l'aide de deux cofacteurs, Ufd1 et NPL4. Ce processus débute par l'émergence d'une chaîne polypeptidique mal repliée à la surface cytosolique du RE. Puis, le complexe p97-Ufd1-NPL4 est recruté à la membrane du RE. Lorsque la protéine anormale devient accessible à la machinerie d'ubiquitination localisée près du RE dans le cytosol, le substrat subit une polyubiquitination. Une fois atteint une certaine longueur, la chaîne polyubiquitine interagit avec le complexe p97-Ufd1-NPL4 avec une grande affinité dû à une liaison synergique de la chaîne polyubiquitine avec VCP et le cofacteur Ufd1 (Park, Isaacson et al. 2005). Finalement, p97 utilise l'énergie de

l'hydrolyse de l'ATP pour tirer le polypeptide dans le cytosol où il sera dégradé par le protéasome 26S (Ye, Meyer et al. 2003). La protéine p97 est donc impliquée à différents niveaux dans le processus d'ERAD. Une étude récente a démontré l'implication de p97 dans l'ubiquitination du récepteur de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3R) en réponse à un stimulus hormonal. Suite à l'activation de certains récepteurs couplés à une protéine G et l'élévation de la concentration de l'inositol 1,4,5-triphosphate, l'IP3R est ubiquitiné et dégradé par le protéasome. Le processus de dégradation nécessite l'association de p97 à l'IP3R et implique l'enzyme de conjugaison mamUbc7 (Alzayady, Panning et al. 2005).

4.2.4 Dégradation des protéines médiée par l'ubiquitine-protéasome

Les diverses activités accomplies par p97, telles que la fusion des membranes, la réponse au stress, la dégradation associée au RE (ERAD) et la dégradation des protéines sont presque toutes régulées directement ou indirectement par le système ubiquitine-protéasome. Il a été démontré que des mutations dans le gène de CDC48 résultaient en l'accumulation des protéines polyubiquitinées chez la levure (Dai and Li 2001). De plus, l'implication de p97 dans la voie de dégradation par le protéasome est supportée par le fait que p97 lie directement les protéines polyubiquitinées, le protéasome 26S et les cofacteurs impliqués dans le système ubiquitine-protéasome (Ufd1, Ufd2 et Ufd3) (Dai, Chen et al. 1998; Koegl, Hoppe et al. 1999; Meyer, Shorter et al. 2000; Kaneko, Hatakeyama et al. 2003).

4.3 Interaction entre p97 et l'AMFR

Il a été récemment établi que l'AMFR interagissait avec p97 (Zhong, Shen et al. 2004). Cette étude démontre par une approche GST que le domaine responsable de cette interaction est situé à l'intérieur des 49 acides aminés de la région C-terminale de l'AMFR contenant ni le motif RING, ni le domaine Cue. Des résultats similaires ont été obtenus au niveau cellulaire où seul l'AMFR contenant la partie C-terminale (49 acides aminés) était co-immunoprécipité avec p97 (Zhong, Shen et al. 2004). Ainsi, ni le motif RING, ni le domaine Cue de l'AMFR est responsable de cette interaction. L'étude a démontré que le domaine Cue interagissait plutôt avec les chaînes polyubiquitine. Ce résultat est en accord avec le fait que le domaine Cue de la protéine Vps9 chez la levure interagit directement avec les chaînes monoubiquitine ou polyubiquitine (Donaldson, Yin et al. 2003; Shih, Prag et al. 2003). Le domaine Cue de l'AMFR recrute les chaînes polyubiquitine alors que les 49 acides aminés de la région C-terminale de l'AMFR contient un domaine interagissant avec p97 (Zhong, Shen et al. 2004). Des études ont démontré que l'association du dimère Ufd1-NPL4 avec p97 permettait d'augmenter l'affinité de p97 pour les chaînes ubiquitine (Ye, Meyer et al. 2003). Similairement, l'interaction entre l'AMFR et p97 augmente aussi l'affinité de p97 pour les chaînes polyubiquitine suggérant que le domaine Cue de l'AMFR pourrait fournir un site supplémentaire de liaison à l'ubiquitine. D'ailleurs, cette étude a démontré que l'augmentation de l'interaction de p97 pour les chaînes polyubiquitine entraînait une augmentation de la dégradation de ces substrats de l'ERAD lors

d'un stress cellulaire. Ce résultat est consistant avec la fonction de p97 dans le ciblage des protéines polyubiquitinées pour la dégradation par le protéasome. Ceci suggère que l'interaction entre l'AMFR et p97 permet de réduire le stress du RE induit par les protéines ubiquitinées. Finalement, d'après les résultats obtenus, il a été suggéré que l'interaction entre l'AMFR et p97 était un mécanisme pour coupler l'ubiquitination, la rétrotranslocation et la dégradation par le protéasome durant l'ERAD (Zhong, Shen et al. 2004).

OBJECTIFS

Partie I Caractérisation du domaine cytoplasmique de l'AMFR

Le but de cette étude est de caractériser l'effet du domaine cytoplasmique de l'AMFR sur l'expression ainsi que sur la distribution des tubules d'AMFR. L'activité transducteur du signal cytokine aussi bien que son trafic intracellulaire complexe de l'AMFR impliquent un rôle important des adaptateurs cytosoliques dans la régulation de son activité. Ainsi, ce projet vise à identifier les protéines associées au domaine cytoplasmique de ce récepteur. Ce domaine sera utilisé comme « bait » pour cribler une librairie par double hybride en levure.

Partie II L'expression de Flag-AMFR promouvoit la formation d'un complexe AMFR/p97/ubiquitine

Le but de cette partie du projet vise à étudier l'interaction entre l'AMFR, p97 et les substrats ubiquitinés. Différentes mutations dans les domaines RING et Cue ainsi qu'une délétion du domaine de liaison à p97 en C-terminal ont été générées. Les cellules seront d'abord co-transfectées avec les différentes constructions de l'AMFR et une ubiquitine normale couplées au polypeptide HA (HA-Ub) ou mutée sur les lysines 29, 48 et 63 (HA-Ub mono). Les techniques d'immunoprécipitation et d'immunofluorescence seront utilisées pour étudier l'interaction et la colocalisation entre les protéines.

RÉSULTATS

Partie I Caractérisation du domaine cytoplasmique de l'AMFR

1.1 Expression du domaine cytoplasmique de l'AMFR couplé à un GFP (DC-GFP)

Le domaine cytoplasmique (DC) de l'AMFR comporte des domaines importants pour l'accomplissement de l'activité ligase de ce récepteur. Le motif RING, le domaine Cue et le domaine de liaison à p97 situés sur l'AMFR sont tous impliqués dans l'ubiquitination et l'ERAD. Il était donc intéressant de caractériser ce DC afin de mieux comprendre son activité au niveau cellulaire. Nous avons alors isolé le DC de l'AMFR comportant uniquement le domaine carboxyl-terminal, sans les domaines transmembranaires, puis fusionné à une protéine fluorescente verte, le GFP, en C-terminal (DC-GFP). Pour vérifier son expression et sa colocalisation, les cellules Cos-7 ont été transfectées de façon transitoire avec le DC-GFP pendant 24 heures. Il a été décrit que l'AMFR était localisé dans le RE et associé aux mitochondries, mais est-ce que seul le domaine cytoplasmique est suffisant pour conserver cette association ? Les cellules transfectées et non transfectées (NT) ont été marquées avec les anticorps 3F3A mAb et anti-HSP70 pour révéler respectivement l'AMFR et les mitochondries. Les cellules NT présentent des tubules d'AMFR colocalisant parfaitement avec les mitochondries (Figure 1A [a-c]). Les cellules transfectées avec le DC-GFP révèle une distribution cytosolique du GFP, ce qui est en

accord avec le fait que la délétion des domaines transmembranaires l'empêche de s'ancrer dans la membrane du RE (Figure 1A [d]). Le marquage des cellules transfectées révèle une dispersion de l'AMFR, décrite par un marquage ponctuel, qui ne présente plus la forme tubulaire caractéristique du sous-domaine lisse du RE (Figure 1A [e]). De plus, cette dispersion entraîne une dissociation partielle de l'AMFR des mitochondries (Figure 1A [g]). Enfin, l'expression du DC-GFP semble modifier la distribution des mitochondries où une redistribution du marquage de l'HSP70 vers la région périnucléaire a été constatée.

Nous avons observé que le marquage ponctuel de l'AMFR chez les cellules transfectées avec le DC-GFP était semblable à celui du marquage de l'AMFR en surface. Il a été démontré que le marquage de l'AMFR en surface, effectué à 4°C avant fixation et perméabilisation des cellules, colocalisait avec la cavéoline, une protéine spécifique des cavéoles en surface de la cellule (Benlimame, Le et al. 1998). Par microscopie électronique, il a été observé que l'AMFR était principalement localisé dans le REL et que seulement une faible partie était distribuée au niveau des cavéoles (Benlimame, Le et al. 1998). Nous avons effectué un marquage intracellulaire de la cavéoline et de l'AMFR après fixation des cellules transfectées avec le DC-GFP afin de vérifier si une partie de l'AMFR dispersé se retrouvait localisée en surface. Le marquage révèle une colocalisation partielle entre la cavéoline et l'AMFR chez les cellules

transfectées (Figure 1B [a-d]), indiquant probablement une redistribution de l'AMFR vers la surface de la cellule. Consistant avec les résultats démontrant que l'AMFR est principalement localisé dans le REL, le marquage de l'AMFR après fixation chez les cellules NT correspond aux tubules d'AMFR localisés dans le REL ne colocalisant pas avec la cavéoline (Figure 1B [b-d]). Pour confirmer ce résultat, un marquage de l'AMFR en surface chez les cellules transfectées avec le DC-GFP devra être effectué et d'autres marqueurs de surface cellulaire devront être utilisés dans les expériences de colocalisation.

Une légère augmentation du marquage de l'AMFR a été observée chez les cellules transfectées (Figure 1A [e]). De plus, les résultats de l'expérience d'immunobuvardage sont aussi indicatifs d'une augmentation de l'expression de l'AMFR. Les cellules transfectées avec le DC-GFP et l'AMFR-GFP présentent un niveau d'expression plus élevé de l'AMFR (~78 kDa) reconnu par 3F3A mAb comparativement aux contrôles (Figure 2A lignes 1-4). Sachant que l'AMFR est associé à p97 (Zhong, Shen et al. 2004), nous étions intéressés à savoir si le DC-GFP induisait aussi une surexpression de p97. L'immunobuvardage démontre plutôt un niveau stable de p97 pour toutes les conditions (Figure 2B).

Ces résultats révèlent que l'expression du DC-GFP est associée à une dispersion de l'AMFR colocalisant moins avec les mitochondries. De plus, le

DC-GFP semble induire une redistribution de l'AMFR du REL vers la surface de la cellule où il colocalise partiellement avec la cavéoline. Enfin, le DC-GFP semble induire une surexpression de l'AMFR sans toutefois affecter le niveau d'expression de p97, une protéine associée à l'AMFR.

1.2 Analyse biochimique du DC-GFP

Nous avons vérifié l'expression du DC-GFP et de la protéine entière, l'AMFR-GFP, par immunobuvardage. Les résultats révèlent que les deux constructions sont reconnues par l'anticorps anti-GFP et ont migré au bon poids moléculaire de ~70 et ~103 kDa pour le DC-GFP et l'AMFR-GFP respectivement (Figure 2A [lignes 5 et 6]). Les 25 kDa du GFP ont été additionnés au poids moléculaire de la protéine. Par contre, le DC-GFP et l'AMFR-GFP ne sont pas reconnus par l'anticorps 3F3A mAb puisque aucune bande correspondant à ~70 et ~103 kDa n'a été observée sur l'immunoblot révélé avec l'anticorps 3F3A mAb (Figure 2A [lignes 1 et 2]). D'ailleurs, les bandes correspondant au DC-GFP et à l'AMFR-GFP n'ont pas migré à la même hauteur que les bandes révélées avec l'anticorps 3F3A mAb (Figure 2A [lignes 1 et 5 / 2 et 6]). Nous avons vérifié par immunofluorescence la colocalisation entre le DC-GFP et l'AMFR révélé par 3F3A mAb. Les cellules transfectées avec le DC-GFP (Figure 2C [a]) ont été marquées avec l'anticorps 3F3A mAb contre l'AMFR (Figure 2C [b]). La distribution du GFP montre un

marquage périnucléaire plus dense qu'en périphérie de la cellule qui n'est pas reconnu par l'anticorps 3F3A mAb (Figure 2C [c]).

1.3 Protéines partenaires associées au DC

Le DC de l'AMFR contient un motif RING et un domaine Cue responsables de l'ubiquitination des substrats en conjonction avec d'autres protéines. Afin d'identifier les protéines partenaires, nous avons utilisé le domaine cytosolique pour cribler une librairie par double-hybride en levure. Les protéines partenaires identifiées sont associées à la machinerie d'ubiquitination. Trois enzymes de conjugaison (E2) ont été identifiées, l'Ubc7, l'Ubc4/5 et l'Ube2n. Les résultats révèlent que les partenaires du DC sont des protéines ayant des fonctions reflétant l'activité ligase (E3) de l'AMFR.

1.4 L'association des protéines ubiquitinées au DC-GFP

L'AMFR est connu pour médier l'ubiquitination de plusieurs substrats par le motif RING et lier les protéines ubiquitinées via le domaine Cue. Nous voulions déterminer si le DC-GFP pouvait interagir avec les protéines ubiquitinées. Les cellules Cos-7 ont été co-transfectées avec une ubiquitine fusionnée à la protéine HA (HA-Ub), en combinaison avec soit le DC-GFP ou l'AMFR-GFP. Les protéines extraites des cellules transfectées ont ensuite été sujettes à une immunoprécipitation anti-GFP, puis révélée avec l'anticorps anti-HA. Les résultats révèlent une co-immunoprécipitation des protéines ubiquitinées avec le DC-GFP et l'AMFR-GFP (Figure 3). Ceci suggère que le

DC-GFP peut interagir avec les protéines ubiquitinées semblablement à l'AMFR-GFP.

Figure 1. Le DC-GFP induit une dispersion de l'AMFR qui est un sous domaine lisse du RE.

A. Schéma de représentation du domaine cytoplasmique de l'AMFR comprenant les domaines RING, Cue et de liaison à p97.

B. Le DC-GFP induit une dispersion de l'AMFR entraînant une dissociation partielle des mitochondries. Les cellules Cos-7 ont été transfectées avec le DC-GFP (d) de façon transitoire pendant 24 heures et fixées avec le méthanol/acétone. Un double marquage a ensuite été effectué sur les cellules transfectées et non transfectées (NT) avec les anticorps primaires 3F3A mAb (a, e) et anti-HSP70 (b, f) suivi du marquage avec les anticorps secondaires appropriés, Rhodamine red-X ou Alexa 647. Les images au confocal montrant la double colocalisation présentent l'AMFR en rouge et l'HSP70 en vert (c, g). Barre = 10 μ m. (6x)*

C. Le DC-GFP induit une redistribution partielle de l'AMFR du REL vers la surface cellulaire. Les cellules Cos-7 ont été transfectées avec le DC-GFP (a) de façon transitoire pendant 24 heures et fixées avec le méthanol/acétone. Un double marquage a ensuite été effectué avec les anticorps primaires 3F3A mAb (b) et anti-cavéoline (c), suivi du marquage avec les anticorps secondaires appropriés, Rhodamine red-X ou Alexa 647. Une double colocalisation a été réalisée au confocal entre l'AMFR en rouge et la cavéoline en vert (d). Barre = 10 μ m. (2x)*

* Nombre de fois que l'expérience a été réalisée.

Figure 1

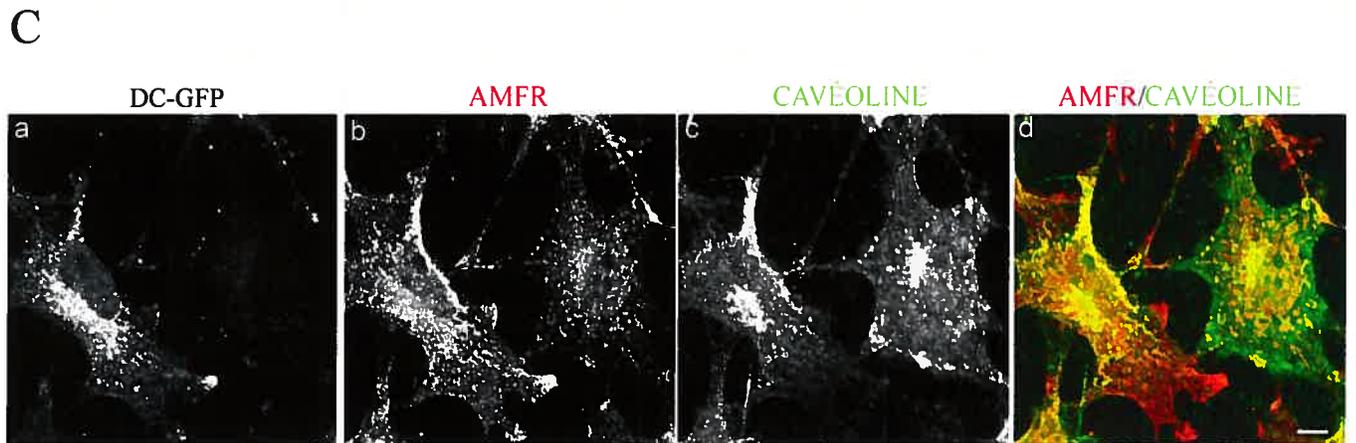
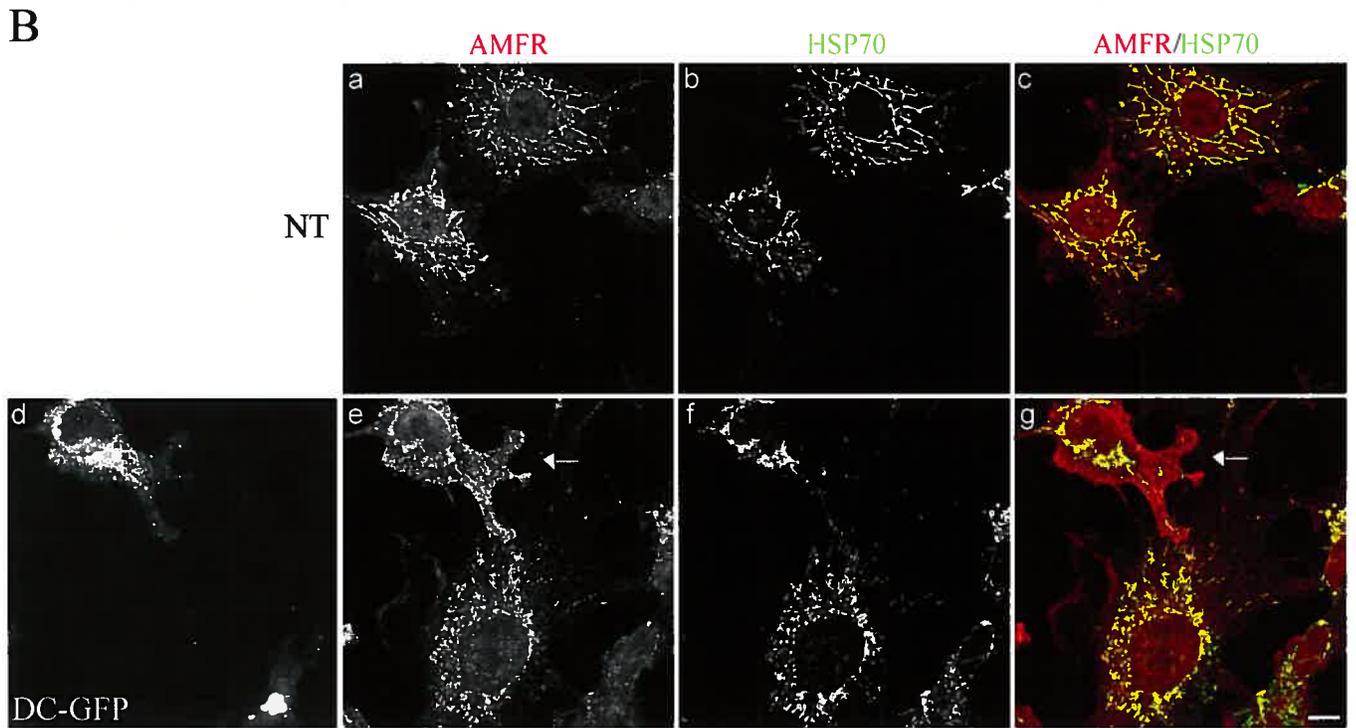
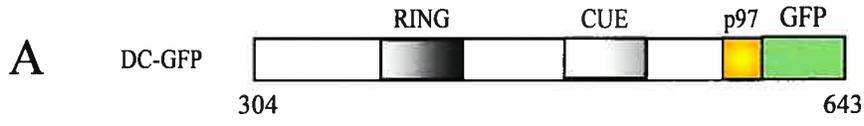


Figure 2. Le DC-GFP n'est pas reconnu par l'anticorps 3F3A mAb.

A. L'anticorps 3F3A mAb ne reconnaît pas la construction du DC-GFP. De plus, cette dernière induit une légère surexpression de l'AMFR endogène marqué avec l'anticorps 3F3A mAb. Les cellules Cos-7 non transfectées (NT) ou transfectées avec le DC-GFP, l'AMFR-GFP ou le GFP pendant 24 heures ont été lysées. Les lysats cellulaires totaux ont été soumis à un immunobuvardage, puis révélé avec les anticorps primaires 3F3A mAb ou anti-GFP tel qu'indiqué. La quantification de la densité du marquage de 3F3A a été effectuée sur 2 expériences indépendantes. La migration du DC-GFP (~70 kDa), l'AMFR-GFP (~103 kDa) et le GFP (25 kDa) est indiquée à droite du gel. (2x)*

B. Le niveau d'expression de p97 reste inchangé. Les cellules Cos-7 non transfectées (NT) ou transfectées avec le DC-GFP, l'AMFR-GFP ou le GFP pendant 24 heures ont été lysées. Les lysats cellulaires totaux ont été soumis à un immunobuvardage puis révélé avec les anticorps primaires anti-p97 ou anti- β actine tel qu'indiqué. La quantification de la densité du marquage de p97 a été effectuée sur 2 expériences indépendantes. (2x)*

C. Absence de colocalisation entre le marquage de l'AMFR révélé avec 3F3A mAb et le DC-GFP. Les cellules Cos-7 ont été transfectées avec le DC-GFP (a) de façon transitoire pendant 24 heures et fixées avec le méthanol/acétone. Un marquage a ensuite été effectué avec l'anticorps primaire 3F3A mAb contre l'AMFR (b) suivi du marquage avec l'anticorps secondaire

Rhodamine red-X. Les images au confocal montrant la double colocalisation présentent le DC-GFP en vert et l'AMFR en rouge (c). Barre = 10 μm . (3x)^{*}

* Nombre de fois que l'expérience a été réalisée.

Figure 2

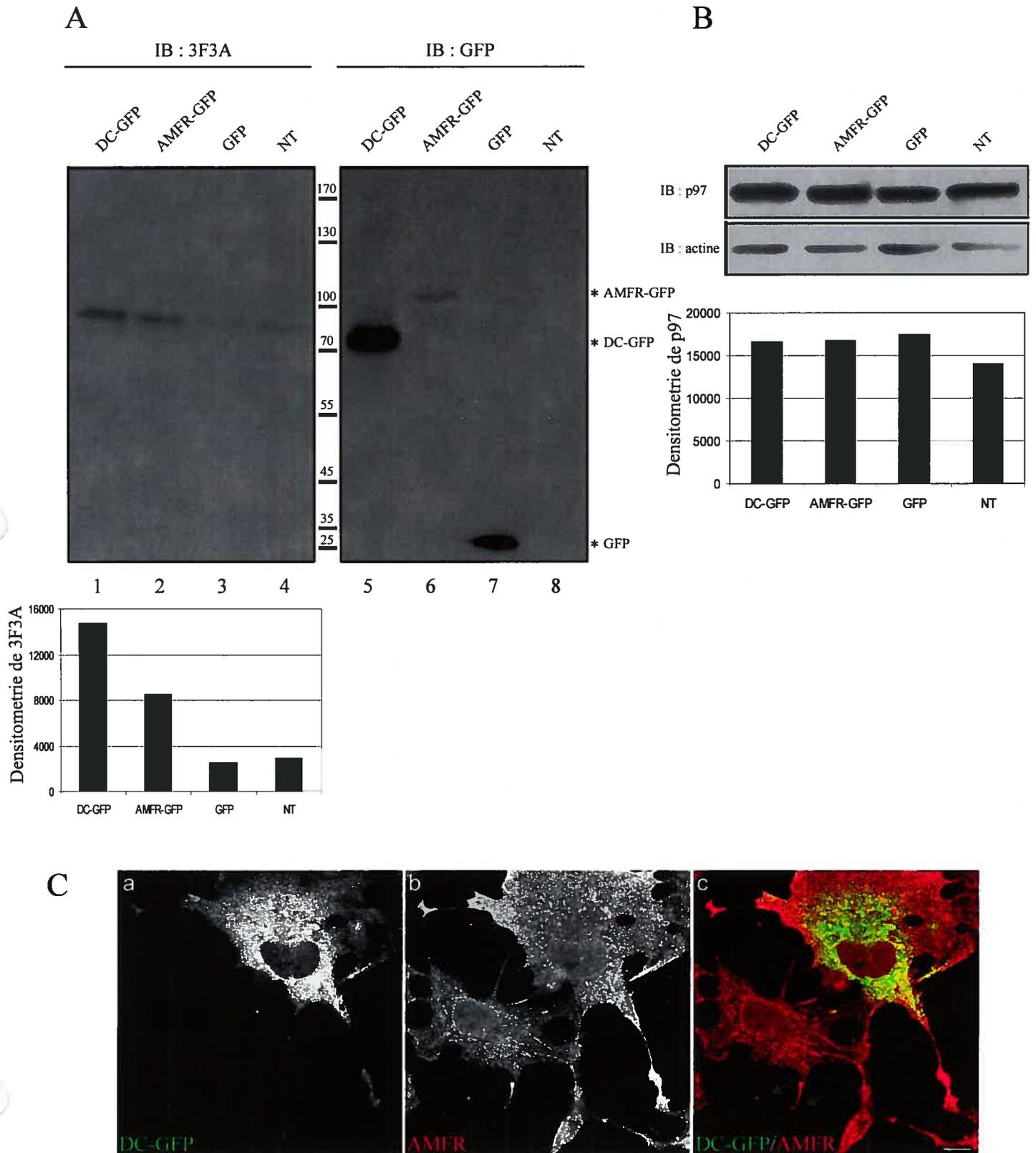
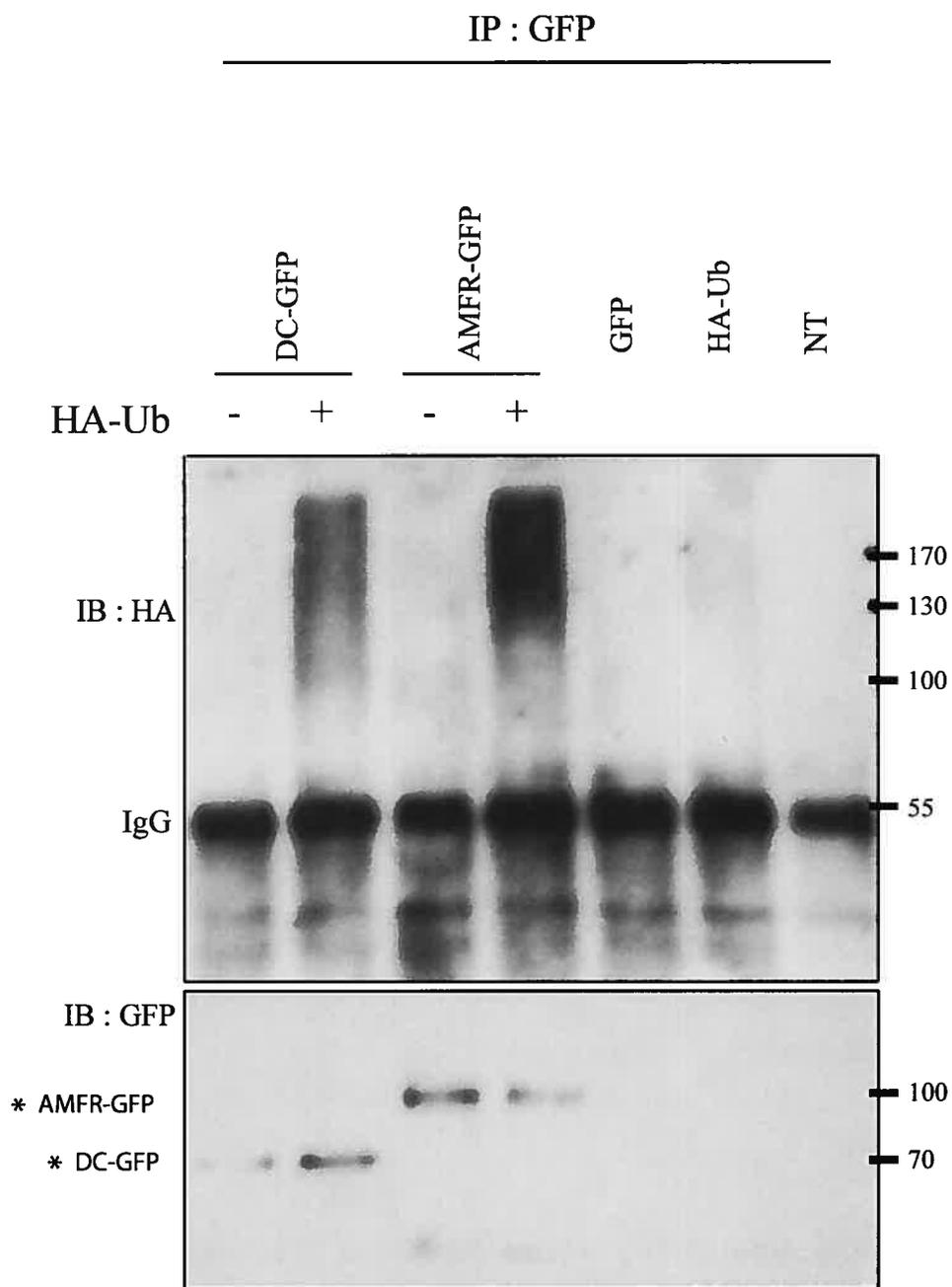


Figure 3. L'association des protéines ubiquitinées au DC-GFP.

Les cellules Cos-7 ont été co-transfectées pendant 24 heures avec HA-Ub en combinaison avec soit le DC-GFP ou l'AMFR-GFP. Comme contrôle, les cellules Cos-7 ont été transfectées avec le GFP ou l'HA-Ub. Les cellules ont ensuite été lysées et les lysats cellulaires ont été assujettis à une immunoprécipitation anti-GFP suivi d'un immunoblot (IB) avec les anticorps anti-HA ou anti-GFP tel qu'indiqué. Les marqueurs de poids moléculaire sont indiqués à droite du gel alors que la migration du DC-GFP (~70 kDa), de l'AMFR-GFP (~103 kDa) et de la bande IgG provenant des billes de protéines G est indiquée à gauche du gel. (2x)*

* Nombre de fois que l'expérience a été réalisée.

Figure 3



Partie II L'expression de Flag-AMFR promouvoit la formation d'un complexe AMFR/p97/ubiquitine

2.1 Interaction entre l'AMFR et p97

Il a été démontré par une approche GST que l'AMFR interagissait physiquement avec p97 pour une coopération fonctionnelle (Zhong, Shen et al. 2004). Nous voulions examiner leur localisation par immunofluorescence dans les cellules Cos-7 et NIH-3T3 en utilisant les anticorps 3F3A mAb et anti-p97. En accord avec l'interaction entre l'AMFR et p97, une colocalisation entre ces 2 protéines a été observée par immunofluorescence au niveau des tubules de REL (Figure 4).

2.2 Interaction entre l'AMFR, p97 et les substrats ubiquitinés

L'AMFR est une enzyme ligase (E3) localisé dans la membrane du RE et médit l'ubiquitination de plusieurs substrats de l'ERAD (Fang, Ferrone et al. 2001). p97 est recruté à la membrane du RE durant ou après l'ubiquitination pour exercer une force sur les substrats afin de les extraire de la membrane (Bays, Wilhovsky et al. 2001; Hitchcock, Krebber et al. 2001; Rape, Hoppe et al. 2001; Ye, Meyer et al. 2001; Jarosch, Taxis et al. 2002; Rabinovich, Kerem et al. 2002). Nous voulions d'abord déterminer si p97 interagit avec les différentes constructions de l'AMFR (Figure 5A). Flag-AMFR, Flag- Δ p97, les mutants RING et Cue ont été transfectés de façon transitoire dans les cellules Cos-7 et les extraits cellulaires ont été immunoprécipités avec soit

l'anticorps anti-Flag (haut) ou anti-p97 (bas) suivi d'un immunoblot (IB) avec les anticorps anti-Flag ou anti-p97 tel qu'indiqué (Figure 5B). Les résultats révèlent que toutes les constructions, excepté Flag- Δ p97, peuvent interagir avec p97, d'où la régulation de cette interaction par le domaine en C-terminal de l'AMFR. Nous voulions ensuite déterminer si ces constructions pouvaient interagir avec les substrats ubiquitinés. L'activité ubiquitine ligase a d'abord été déterminée pour chacune des constructions de l'AMFR afin d'identifier les domaines régulant cette activité. Flag-AMFR et ses mutants ont été co-transfectés avec une ubiquitine fusionnée au polypeptide HA (HA-Ub) dans les cellules Cos-7. Les cellules ont été lysées et les lysats cellulaires ont été assujettis à un immunobuvardage suivi d'un immunoblot avec l'anticorps anti-HA afin de révéler la quantité totale d'HA-Ub (Figure 5C). La densité du marquage HA a été quantifiée. Les résultats révèlent que les mutants RING et Cue induisent une réduction de la quantité totale d'HA-Ub (Figure 5C [lignes 3 et 4]) comparativement à Flag-AMFR (Figure 5C [ligne 1]). Les mêmes extraits cellulaires ont ensuite été utilisés pour immunoprécipiter HA-Ub suivi d'un immunoblot avec les anticorps anti-HA, -Flag et -p97 (Figure 5D). Les résultats montrent que Flag-AMFR co-immunoprécipite avec HA-Ub indiquant sa capacité de lier ses substrats (Figure 5D [ligne 1]). Le mutant RING peut aussi interagir avec les protéines ubiquitinées malgré l'inhibition de son activité ubiquitine ligase (Figure 5D [ligne 3]). Par contre, le domaine Cue ne peut lier les substrats ubiquitinés, indiquant que ce domaine est critique pour l'interaction avec l'ubiquitine (Figure 5D [ligne 4]). p97 est recrutée aux

substrats ubiquitinés indépendamment de l'interaction de ces derniers avec l'AMFR. Ensuite, nous voulions déterminer si l'AMFR générait de la mono- ou polyubiquitination. Nous avons utilisé un mutant HA-Ub muté sur les lysines 29, 48 et 63, inhibant ainsi l'extension de la chaîne polyubiquitine et permettant uniquement la monoubiquitination (HA-Ub mono). Les cellules ont été co-transfectées avec HA-Ub ou HA-Ub mono en combinaison avec Flag-AMFR ou Flag- Δ p97. Les cellules ont été lysées et les lysats cellulaires ont été soumis à un immunobuvardage suivi d'un IB avec l'anticorps anti-HA. Flag-AMFR co-transfecté avec HA-Ub mono induit une réduction marquante de l'ubiquitination lorsque l'élongation de la chaîne est inhibée, indiquant que l'expression de Flag-AMFR promouvoit principalement la polyubiquitination (Figure 5E [lignes 1 et 2]). Des résultats similaires ont été observés avec Flag- Δ p97 (Figure 5E [lignes 3 et 4]). Dans les cellules contrôle transfectées avec le vecteur pcDNA, l'inhibition du protéasome avec MG132 est associée à une accumulation de protéines ubiquitinées lorsque co-transfectées avec HA-Ub relativement à HA-Ub mono (Figure 5E [lignes 5-8]).

2.3 Interaction entre l'AMFR, p97 et les substrats associés à ce dernier

Les résultats obtenus précédemment révèlent que FLAG-AMFR interagit avec p97 et les substrats ubiquitinés. Afin de confirmer l'interaction entre ces protéines, nous avons immunoprécipité p97 puis révélé avec les anticorps anti-HA, -Flag, -3F3A et -p97. De plus, nous voulions déterminer si l'AMFR et p97 liaient préférentiellement les substrats mono- ou

polyubiquitinés. Flag-AMFR et ses mutants ont été co-transfectés avec HA-Ub ou HA-Ub mono dans les cellules Cos-7. Les cellules ont été lysées et les extraits cellulaires ont été assujettis à une immunoprécipitation anti-p97 suivi d'un IB avec les anticorps tels qu'indiqués. Les résultats révèlent que l'expression de Flag-AMFR et des mutants RING et Cue interagissent préférentiellement avec les protéines polyubiquitinées associées à p97. Une réduction marquante de la quantité de Flag et 3F3A en présence d'HA-Ub mono relativement à HA-Ub a été observée (Figure 6 [lignes 1-2, 5-6 et 7-8]) et quantifiée par analyse densitométrique. Flag- Δ p97 n'a pas été co-immunoprécipité avec p97 et ses substrats associés puisque son domaine de liaison sur l'AMFR a été supprimé (Figure 6 [lignes 3 et 4]).

2.4 Colocalisation de Flag-AMFR et ses mutants avec l'AMFR, la calnexine et p97

Les résultats obtenus précédemment indiquent que Flag-AMFR ainsi que les mutants RING et Cue interagissent avec p97, alors qu'une délétion du domaine de liaison à p97 (Flag- Δ p97) empêche son interaction avec ce dernier. Nous voulions ensuite observer par immunofluorescence la colocalisation de Flag-AMFR et ses mutants avec p97, ainsi que leur distribution dans le domaine du RE. Les cellules Cos-7 ont d'abord été transfectées avec les différentes constructions d'AMFR suivi d'un marquage avec les anticorps Flag/AMFR/Calnexine (CN) ou Flag/AMFR/p97. L'expression de toutes les constructions de Flag-AMFR induit une réduction dans le degré de

colocalisation avec les domaines du RE définies par le marquage de l'AMFR ou de la calnexine, lorsque comparé avec le contrôle des cellules non-transfectées (NT) (Figure 7 1^{er} graphique). Nous avons aussi observé que dans tous les cas, la distribution de l'AMFR se trouve localisée en périphérie du RE, alors que le marquage de la calnexine est plutôt concentré dans la région périnucléaire distincte de celle de l'AMFR (Figure 7 [A, F, K et P]). Flag-AMFR, Flag- Δ p97 et le mutant Cue sont localisés en périphérie du RE marquée par l'AMFR (Figure 7 [B, G et Q]), alors que le mutant RING est concentré autour du noyau colocalisant avec la calnexine (Figure 7 [M]). Distribué en périphérie du RE, Flag-AMFR et le mutant Cue colocalisent avec p97 dans cette région (Figure 7 [D, E, S et T]), alors que le mutant RING colocalise avec p97 dans la région périnucléaire (Figure 7 [N et O]). Par contre, Flag- Δ p97 montre une diminution de l'association de p97 avec les marquages de l'AMFR et de Flag (Figure 7 [I et J]). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'immunoprécipitation où toutes les constructions co-immunoprécipitent avec p97 excepté Flag- Δ p97.

Figure 4. Interaction entre l'AMFR et p97.

Les cellules Cos-7 et NIH-3T3 ont été fixées avec le méthanol/acétone puis double marquées avec les anticorps primaires 3F3A mAb (A, D) et anti-p97 (B, E) suivi du marquage avec les anticorps secondaires appropriés, Alexa 488 ou Rhodamine red-X. Les images au confocal montrant la double colocalisation présentent l'AMFR en rouge et p97 en vert (C, F). Les flèches indiquent des régions de colocalisation entre les tubules d'AMFR et p97 (C, F).
Barre = 10 μm . (3x)*

* Nombre de fois que l'expérience a été réalisée.

Figure 4

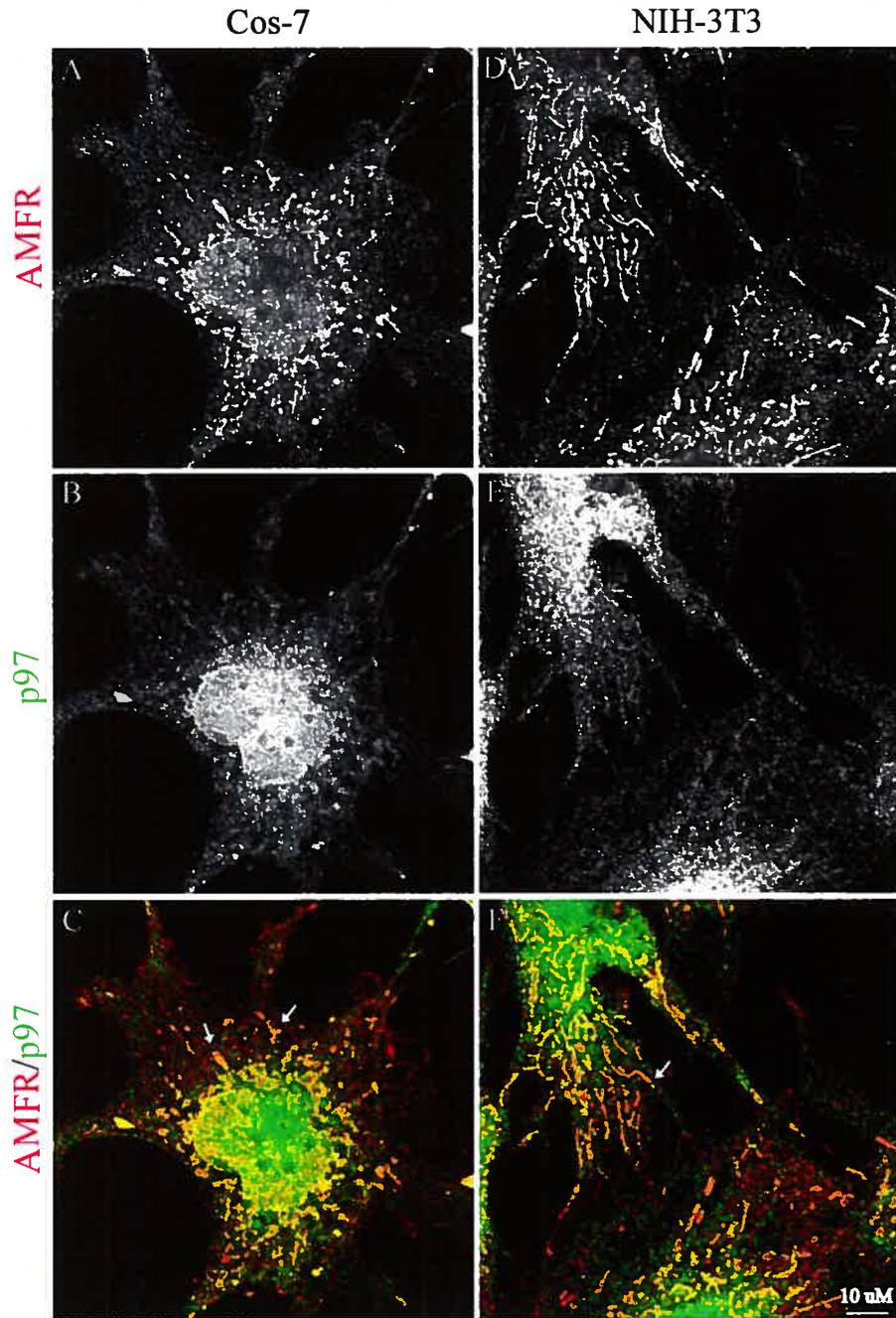


Figure 5. Interaction entre l'AMFR, p97 et les substrats ubiquitinés.

A. Schéma de représentation de Flag-AMFR et ses mutants comprenant 7 domaines transmembranaires ainsi que les domaines cytoplasmiques RING, Cue et de liaison à p97. Flag-AMFR a été fusionné au polypeptide Flag en N-terminal. Une mutation ponctuelle (C356S) a été effectuée dans le motif RING de l'AMFR et 3 mutations ponctuelles (M467F, F468S, P469S) ont été effectuées dans le motif MFP du domaine Cue de l'AMFR.

B. L'expression des différentes constructions de l'AMFR. Flag-AMFR et les mutants RING, Cue et Δ p97 ont été transfectés de façon transitoire pendant 24 heures dans les cellules Cos-7 et les protéines extraites ont été immunoprécipitées avec soit l'anticorps anti-Flag (haut) ou anti-p97 (bas). Les protéines ont ensuite été révélées avec les anticorps anti-Flag et anti-p97 tels qu'indiqués. Seul le mutant Δ p97 est incapable de lier p97. (3x)*

C. L'activité ubiquitine ligase de l'AMFR. Flag-AMFR et les mutants RING, Cue et Δ p97 ont été co-transfectés de façon transitoire avec HA-Ub pendant 24 heures dans les cellules Cos-7. Les cellules ont été lysées et les lysats cellulaires ont été assujettis à un immunobuvardage suivi d'un immunoblot avec l'anticorps anti-HA. La quantification de la densité du marquage d'HA relativement à celui de β -actine a été effectuée sur 3 expériences indépendantes (* $p < 0.05$). Les mutations dans les domaines RING et Cue inhibent l'activité ubiquitine ligase de l'AMFR. (3x)*

D. Interaction entre l'AMFR, p97 et les substrats ubiquitinés. Flag-AMFR et les mutants ont été co-transfectés avec HA-Ub pendant 24 heures et les protéines extraites de ces cellules ont été immunoprécipitées avec l'anticorps anti-HA, puis révélées avec les anticorps anti-HA, -Flag et -p97. Les résultats révèlent d'une part, que p97 est recrutée aux substrats ubiquitinés indépendamment de leur interaction avec l'AMFR et d'autre part, le domaine Cue de l'AMFR régule l'interaction de ce dernier aux protéines ubiquitinées. (3x)*

E. L'AMFR promouvoit principalement la polyubiquitination. Les co-transfections de Flag-AMFR et du mutant $\Delta p97$ avec HA-Ub mono, une ubiquitine mutée empêchant l'élongation de la chaîne d'ubiquitines, prévient l'accumulation des substrats ubiquitinés indiquant que l'AMFR génère des substrats polyubiquitinés. (3x)*

* Nombre de fois que l'expérience a été réalisée.

Figure 5

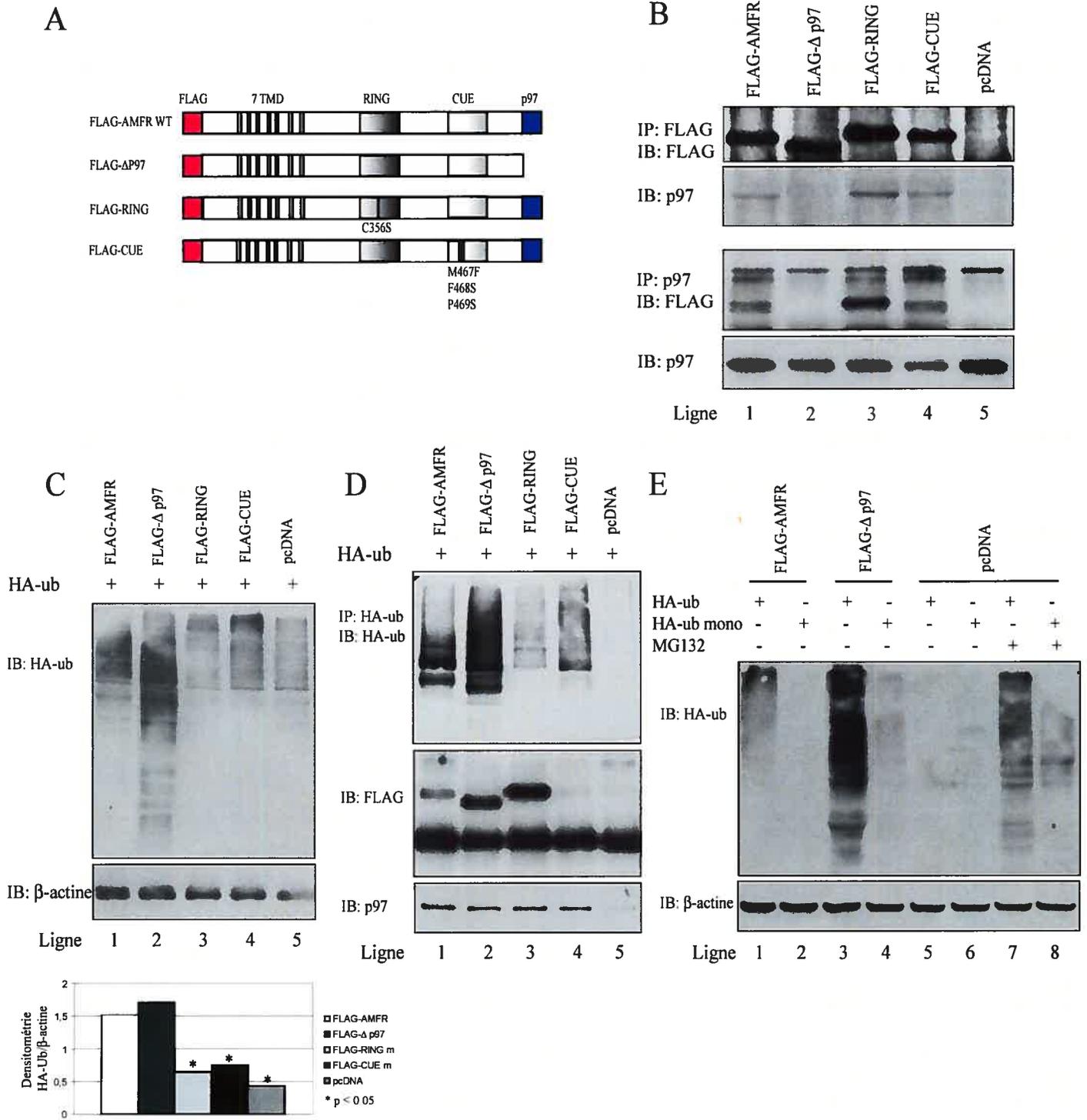


Figure 6. Interaction entre l'AMFR, p97 et les substrats associés à ce dernier.

Flag-AMFR, les mutants RING, Cue et $\Delta p97$ ont été co-transfectés avec HA-Ub ou HA-Ub mono pendant 24 heures dans les cellules Cos-7. Les cellules ont ensuite été lysées et les lysats cellulaires ont été assujettis à une immunoprécipitation anti-p97 suivi d'un immunoblot avec les anticorps anti-HA, -Flag, -3F3A et -p97 tels qu'indiqués. La quantification de la densité du marquage d'HA, de Flag et de 3F3A a été effectuée sur 2 expériences indépendantes. La présence d'HA-Ub mono, une ubiquitine empêchant la polyubiquitination, réduit l'interaction de l'AMFR aux substrats ubiquitinés associés à p97. (2x)*

* Nombre de fois que l'expérience a été réalisée

Figure 6

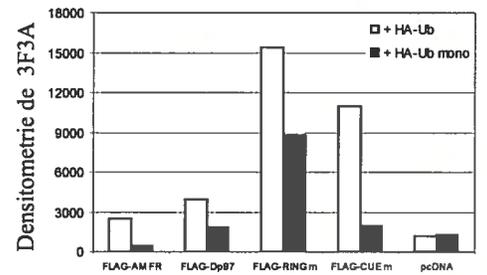
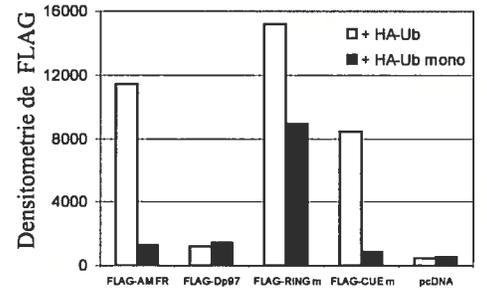
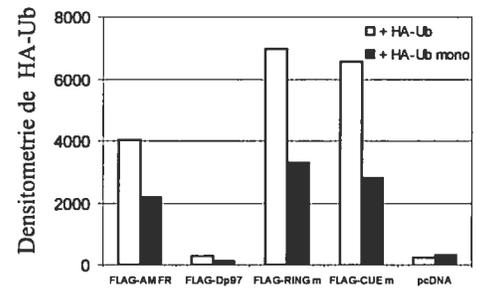
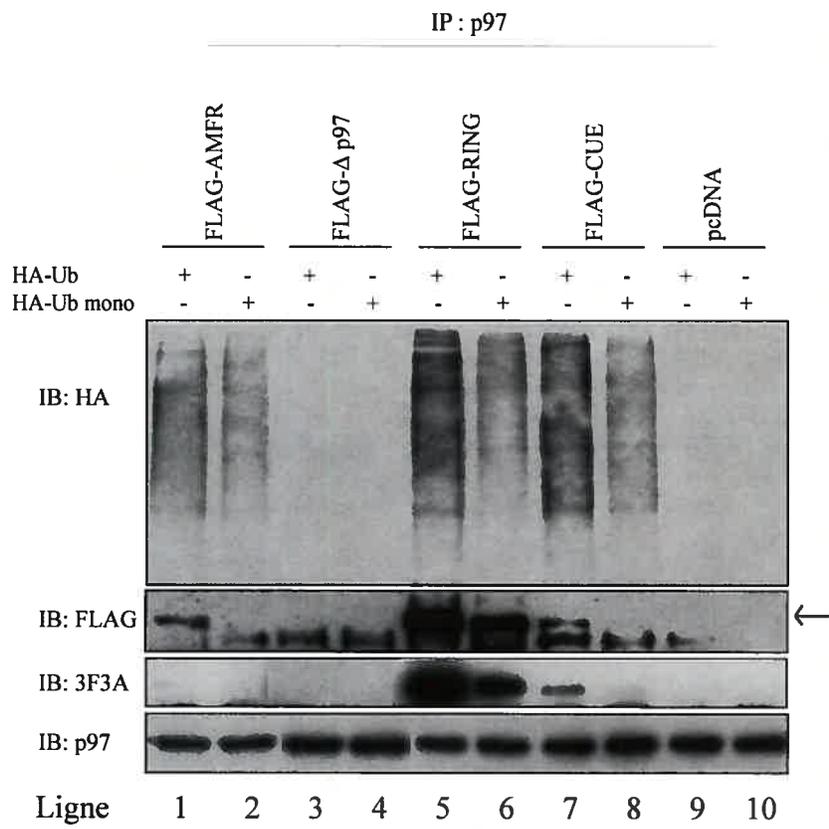


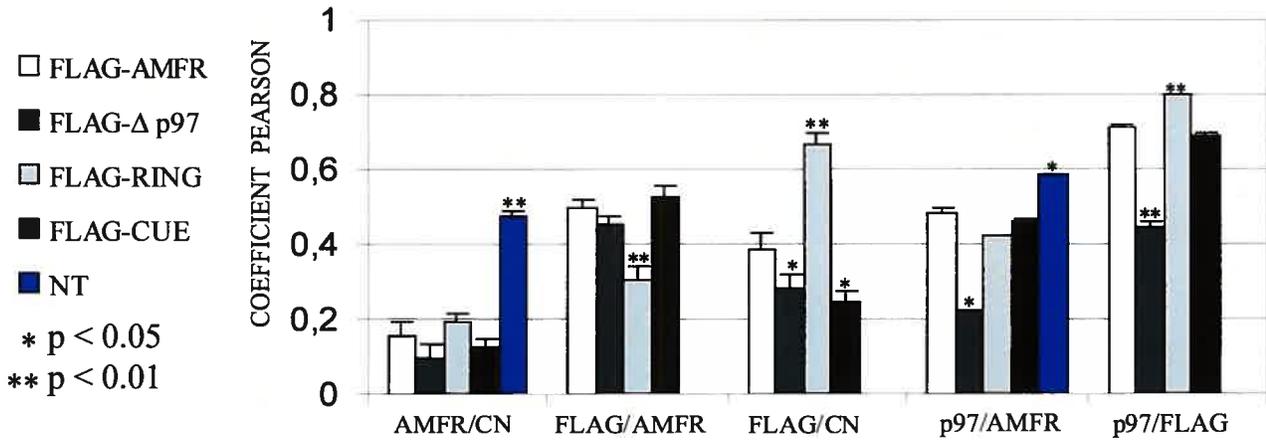
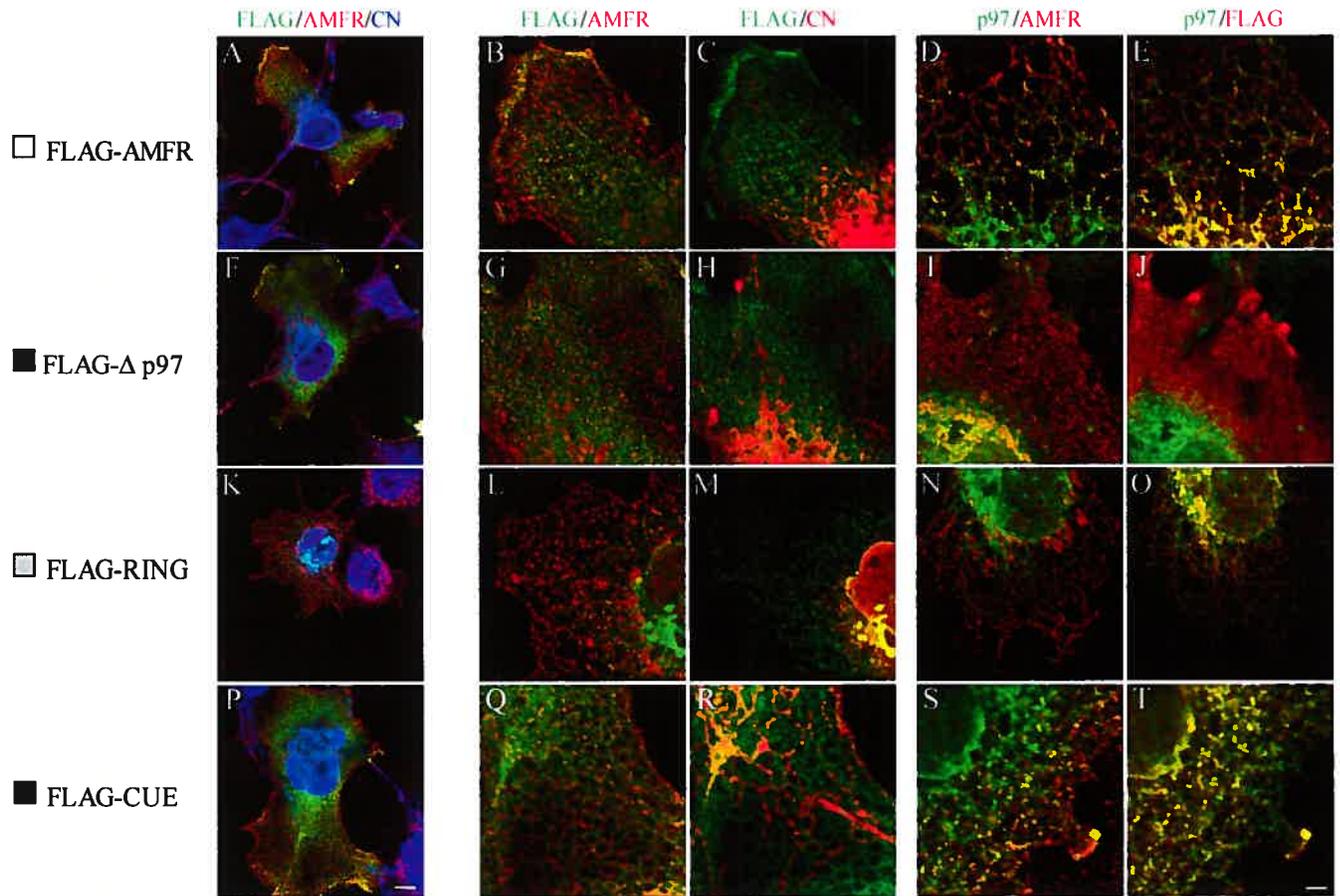
Figure 7. Colocalisation de Flag-AMFR et ses mutants avec l'AMFR, la calnexine et p97.

Les cellules Cos-7 ont d'abord été transfectées avec FLAG-AMFR, les mutants RING, Cue et $\Delta p97$ de façon transitoire pendant 24 heures puis fixées avec le méthanol/acétone. Les cellules ont été marquées soit pour Flag/AMFR/calnexine (CN) ou pour Flag/AMFR/p97 suivi du marquage avec les anticorps secondaires appropriés, Rhodamine red-X, Alexa-488 ou -647. Un graphique montrant les coefficients Pearson, calculés par le degré de colocalisation entre les différents marqueurs, est présenté en dessous des images de fluorescence.

Une triple colocalisation à zoom 2x a été effectuée au microscope confocal présentant le FLAG en vert, l'AMFR en rouge et la calnexine en bleu (A, F, K, P). Barre = 10 μm . À plus haut zoom (6x), la double colocalisation entre Flag et l'AMFR (B, G, L, Q) ou Flag et CN (C, H, M, R) est présentée en vert et en rouge respectivement. Barre = 2 μm . Le mutant RING est principalement localisé dans le domaine de la calnexine (M), alors que Flag-AMFR, les mutants Cue et $\Delta p97$ sont plutôt localisés dans le domaine du RE marqué par l'AMFR (B, G, Q). Une double colocalisation a aussi été effectuée entre p97 et l'AMFR (D, I, N, S) ou p97 et Flag (E, J, O, T) présentée en vert et en rouge respectivement. Barre = 2 μm . Une réduction de l'association de p97 avec l'AMFR et Flag a été observée avec le mutant $\Delta p97$ (I, J). (3x)*

* Nombre de fois que l'expérience a été réalisée

Figure 7



□ FLAG-AMFR
 ■ FLAG-Δ p97
 □ FLAG-RING
 ■ FLAG-CUE
 ■ NT
 * p < 0.05
 ** p < 0.01

DISCUSSION

Partie I Caractérisation du domaine cytoplasmique de l'AMFR

L'AMFR est une enzyme ligase (E3) catalysant l'activité d'ubiquitination d'un grand nombre de protéines, telles que CD3 δ et l'apolipoprotéine B, afin de les cibler pour la dégradation. Ce processus catalytique dépend de l'intégrité du motif RING de l'AMFR (Fang, Ferrone et al. 2001). Un domaine supplémentaire important dans le processus d'ubiquitination de l'AMFR est le domaine Cue qui s'associe à l'ubiquitine (Zhong, Shen et al. 2004) et est situé en aval du motif RING de la région C-terminale recrutant l'enzyme MmUbc7 (E2) (Fang, Ferrone et al. 2001). Ces deux domaines, reflétant son activité ligase, sont localisés dans la partie cytosolique de l'AMFR. Dans cette étude, nous avons isolé son domaine cytoplasmique puis fusionné à un GFP (DC-GFP) afin d'en faire une caractérisation de son expression. Les cellules Cos-7 ont été choisies comme modèle cellulaire dans notre étude pour son niveau d'expression protéique transitoire élevé. De plus, l'activité transducteur du signal cytokine de l'AMFR ainsi que son trafic intracellulaire complexe impliquent un rôle important des adaptateurs cytosoliques dans la régulation de son activité. Afin d'identifier les protéines partenaires, nous avons utilisé le domaine cytosolique pour cribler

une librairie par double-hybride en levure qui a été réalisé par la compagnie Dualsystems Biotech.

L'AMFR est une protéine localisée dans la membrane du RE lisse interagissant avec les mitochondries pour l'échange du calcium (Wang, Guay et al. 2000). Il constitue un marqueur du sous domaine lisse du RE. Nous avons démontré que l'expression transitoire du DC-GFP entraîne une dispersion du marquage de l'AMFR (Figure 1A). Nous avons observé que cette dispersion entraîne sa dissociation des mitochondries, contrairement aux cellules NT présentant une association étroite entre l'AMFR et les mitochondries. Ce résultat suggère une implication possible du domaine cytoplasmique de l'AMFR dans l'association avec les mitochondries. Étant une protéine membranaire, l'abolition des domaines transmembranaires de l'AMFR entraîne nécessairement une dispersion de la protéine dans le cytosol. Étant dispersé dans le cytoplasme, le DC pourrait ne plus être en mesure de médier l'association entre l'AMFR, localisé au niveau du RE lisse, et les mitochondries.

Nous avons observé une similarité entre le marquage ponctuel de l'AMFR, induit par l'expression exogène du DC-GFP, et celui de l'AMFR en surface. Il a été démontré que le marquage de l'AMFR en surface, effectué à 4°C avant fixation et perméabilisation des cellules, colocalisait avec la

cavéoline, une protéine spécifique des cavéoles en surface de la cellule (Benlimame, Le et al. 1998). Par microscopie électronique, il a été démontré que l'AMFR était principalement localisé dans le REL et que seulement une faible partie était distribuée au niveau des cavéoles (Benlimame, Le et al. 1998). En accord avec les résultats démontrant que l'AMFR est principalement localisé dans le REL, le marquage de l'AMFR après fixation chez les cellules NT correspond aux tubules d'AMFR localisés dans le REL ne colocalisant pas avec la cavéoline. Par contre, le marquage de l'AMFR après fixation chez les cellules transfectées avec le DC-GFP révèlent une redistribution partielle de l'AMFR du REL vers la surface cellulaire où il est partiellement associé à la cavéoline (Figure 1B). Ceci suggère une implication du DC-GFP dans la relocalisation de l'AMFR vers la surface de la cellule.

Le DC-GFP est reconnu par l'anti-GFP migrant à un poids moléculaire attendu de ~70 kDa (Figure 2A). Toutefois, cette construction n'est pas reconnue par l'anticorps 3F3A mAb (Figure 2A) qui reconnaît seulement la partie extracellulaire de l'AMFR. Ainsi, la délétion des domaines transmembranaires et extracellulaire de l'AMFR empêcherait probablement sa reconnaissance par l'anticorps 3F3A mAb. D'ailleurs, par immunofluorescence, le DC-GFP localisé principalement dans la région périnucléaire n'est pas reconnu par l'anticorps 3F3A mAb (Figure 2C).

Le DC de l'AMFR possède un motif RING et un domaine Cue interagissant avec la machinerie d'ubiquitination. L'AMFR recrute spécifiquement une enzyme de conjugaison (E2), MmUbc7, via sa région en aval du motif RING contenant le domaine Cue (Fang, Ferrone et al. 2001). En utilisant le DC dans le criblage d'une librairie par double-hybride, plusieurs protéines impliquées dans l'ubiquitination ont été découvertes associées. Trois enzymes de conjugaison (E2) interagissent avec le DC de l'AMFR, l'Ubc7, l'Ubc4/5 et l'Ube2n. L'Ubc7 est une enzyme (E2) impliquée dans l'ERAD de plusieurs substrats de l'AMFR, tels que l'apolipoprotéine B100 (Liang, Kim et al. 2003) et CD3- δ (Fang, Ferrone et al. 2001). L'Ubc4/5 a été démontrée en interaction avec une autre ligase (E3) chez la plante, Rma1 (Matsuda, Suzuki et al. 2001). Semblable à l'AMFR, Rma1 possède un motif RING et un domaine transmembranaire en C-terminal impliqués dans la dégradation des protéines anormales (Matsuda and Nakano 1998). Rma1 peut même s'autoubiquitiner en conjonction avec les enzymes Ubc4/5 (Matsuda, Suzuki et al. 2001). Ube2n fait parti d'une autre famille d'enzymes de conjugaison (E2). Ces résultats montrent le potentiel de l'AMFR à recruter la machinerie d'ubiquitination *in vitro*.

Le DC-GFP induit une légère surexpression de l'AMFR endogène (Figure 2A) indiquant une diminution de sa dégradation. Pour être dégradé, l'AMFR recrute l'enzyme (E2) Ubc7 par l'intermédiaire de son DC pour

médier son autoubiquitination (Fang, Ferrone et al. 2001). Lorsque les cellules expriment le DC-GFP exogène, cette protéine cytosolique est encore en mesure de recruter la machinerie d'ubiquitination, puisque des protéines ubiquitinées sont associées au DC-GFP (Figure 3). Ceci entraîne probablement une diminution du réservoir d'enzymes (E2), tel que l'Ubc7, disponible pour médier l'ubiquitination de l'AMFR endogène. Une diminution de l'ubiquitination de cet AMFR implique par conséquent une augmentation de son expression. Le niveau d'expression de p97, une protéine associée à l'AMFR, reste toutefois stable avec l'expression du DC-GFP. Ceci peut s'expliquer par l'abondance de cette protéine qui constitue plus de 1 % du contenu protéique total de la cellule. Bref, ces résultats suggèrent que le DC-GFP exogène interagit avec les protéines ubiquitinées.

Partie II L'expression de Flag-AMFR promouvoit la formation d'un complexe AMFR/p97/ubiquitine

L'AMFR est une enzyme ligase de la membrane du RE qui interagit avec p97, une chaperonne recrutée à la membrane lors de la translocation des protéines ubiquitinées. L'AMFR et p97 interagissent entre eux durant le processus d'ERAD (Zhong, Shen et al. 2004). Dans cette partie de notre étude, nous avons généré des mutations dans les domaines RING et Cue de l'AMFR ainsi qu'une délétion de son domaine de liaison à p97 afin d'étudier l'interaction entre l'AMFR, p97 et les substrats ubiquitinés.

Les domaines cytoplasmiques RING et Cue de l'AMFR sont impliqués dans l'activité ubiquitine ligase de cette enzyme. Les mutations dans ces 2 domaines entraînent l'inhibition de l'activité ligase de l'AMFR (Fang, Lorick et al. 2003). Une co-transfection de Flag-AMFR avec HA-Ub résulte en la formation d'un patron de protéines ubiquitinées, alors qu'une réduction de l'accumulation de ces substrats a été observée lorsque les cellules étaient co-transfectées avec les mutants RING ou Cue (Figure 5C). De plus, l'expression de Flag-AMFR stimule la polyubiquitination, car une diminution du patron de protéines ubiquitinées a été observée lorsque les cellules étaient co-transfectées avec une ubiquitine mutée sur 3 lysines, le rendant incapable de lier d'autres ubiquitines subséquentes et inhibant ainsi la formation d'une chaîne de

polyubiquitine (Figure 5E). Comme contrôle, les cellules transfectées avec le vecteur pcDNA et traitées avec un inhibiteur du protéasome (MG132) entraînent une accumulation des protéines ubiquitinées lorsque les cellules sont co-transfectées avec HA-Ub relativement à HA-Ub mono (Figure 5E). L'immunoprécipitation des substrats liés à HA-Ub présente une augmentation similaire de l'expression d'HA-Ub lorsque co-transfecté avec Flag-AMFR ou Flag- Δ p97 (Figure 5D). Flag-AMFR co-immunoprécipite avec les protéines ubiquitinées indiquant sa capacité de lier ses substrats. Étonnamment, le mutant RING interagit aussi avec les protéines ubiquitinées malgré l'inhibition de son activité ubiquitine ligase (Figure 5D). Par contre, aucune interaction entre le mutant Cue et les substrats ubiquitinés n'a été observée, en accord avec le fait que le motif Cue est un domaine de liaison à l'ubiquitine (Donaldson, Yin et al. 2003; Shih, Prag et al. 2003) (Figure 5D). Ces résultats suggèrent que l'activité ubiquitine ligase de l'AMFR dépend de ses domaines RING et Cue et que l'expression de Flag-AMFR promouvoit principalement la polyubiquitination. De plus, les substrats ubiquitinés interagissent avec Flag-AMFR et p97 formant ainsi un complexe pour cibler éventuellement les substrats pour la dégradation.

Afin de confirmer cette interaction protéique, une immunoprécipitation anti-p97 a été effectuée pour démontrer que l'AMFR interagit avec p97 et les substrats associés à ce dernier (Figure 6). De plus, la présence du mutant HA-Ub entraîne une réduction marquante de l'AMFR co-immunoprécipité avec les substrats associés à p97, indiquant que l'AMFR interagit préférentiellement

avec les protéines polyubiquitinées (Figure 6). Ainsi, ce complexe AMFR, p97 et les substrats polyubiquitinés liés à p97 permet possiblement le ciblage des substrats pour la dégradation par le protéasome, qui requiert la polyubiquitination de ces derniers.

Pour supporter les résultats de l'interaction entre l'AMFR et p97 décrits antérieurement, nous avons utilisé l'immunofluorescence pour déterminer la distribution des différentes constructions de l'AMFR par rapport à p97 et les domaines du RE, définis par les marquages de l'AMFR et de la calnexine. L'expression de toutes les constructions résulte en une baisse du degré de colocalisation avec les domaines du RE marqués par les anticorps 3F3A anti-AMFR ou -calnexine, comparativement aux conditions sans transfection (Figure 7). Une distribution distincte de ces 2 domaines a été observée où l'AMFR est distribué en périphérie du RE, alors que la calnexine est plutôt concentrée en périphérie du noyau (Figure 7). Ainsi, la surexpression de l'AMFR exogène altère l'organisation du RE entraînant une ségrégation des 2 domaines du RE observée par microscopie confocale (Figure 7). Flag-AMFR, les mutants Cue et Δ p97 sont localisés en périphérie du RE dont le domaine est défini par l'AMFR. À l'opposé, le mutant RING est concentré dans la région périnucléaire du RE définie la calnexine (Figure 7). Ainsi, le domaine RING semble être important pour le ciblage de l'AMFR vers la périphérie du RE.

Les résultats obtenus précédemment par immunoprécipitation révèlent que toutes les constructions de l'AMFR excepté le mutant $\Delta p97$ interagissent avec p97. Nous avons observé par immunofluorescence que Flag-AMFR et le mutant Cue colocalisent avec p97 dans la région périphérique du RE et que le mutant RING colocalise avec p97 dans la région périnucléaire (Figure 7). Un faible degré d'association de p97 avec le mutant $\Delta p97$ a été observé, en accord avec le fait que la région de liaison à p97 est supprimée, empêchant ainsi la formation de la liaison entre ces 2 protéines (Figure 7). Pour supporter les résultats de la formation d'un complexe AMFR/p97/ubiquitine, il serait aussi intéressant d'observer par immunofluorescence la distribution d'HA-Ub par rapport à Flag-AMFR et ses mutants.

Les résultats de cette partie du projet suggèrent que l'AMFR interagit avec les substrats ubiquitinés et que cette interaction dépend du domaine Cue de l'AMFR. L'activité ubiquitine ligase de l'AMFR dépend des domaines RING et Cue de l'AMFR qui promouvoit surtout la polyubiquitination, ce qui est en accord avec son rôle dans l'ERAD. L'AMFR interagit aussi avec p97, via son domaine de liaison à p97 situé en C-terminal. Une colocalisation entre ces 2 protéines a été observée en immunofluorescence. Les évidences suggèrent donc la formation d'un complexe AMFR/p97/ubiquitine constituant probablement une étape intermédiaire précédant le ciblage des protéines ubiquitinées vers le protéasome.

CONCLUSION

Le récepteur du facteur autocrine de motilité (AMFR) est associé à l'augmentation de la motilité cellulaire et les métastases. L'AMFR est principalement localisé dans un sous domaine lisse du RE (REL) qui interagit avec les mitochondries. Une faible partie de l'AMFR est localisé à la membrane plasmique au niveau des cavéoles. L'AMFR au niveau du REL est impliqué dans la dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD). Il a été établi que l'AMFR était une enzyme ligase (E3) dont l'activité d'ubiquitination des substrats de l'ERAD dépend de son motif RING. Outre ce motif, l'AMFR possède aussi dans son domaine cytoplasmique un domaine Cue qui interagit avec l'ubiquitine et un domaine de liaison à p97 qui est une composante essentielle de l'ERAD.

Nous avons d'abord caractérisé le domaine cytoplasmique de l'AMFR. La construction du DC de l'AMFR fusionné à une protéine fluorescente verte (DC-GFP) n'est pas reconnue par l'anticorps 3F3A mAb. Par microscopie confocale, l'expression du DC-GFP perturbe la distribution du REL marqué par l'AMFR et induit une dissociation entre l'AMFR et les mitochondries dans les cellules Cos-7. De plus, l'expression du DC-GFP induit une surexpression de l'AMFR endogène et peut-être une redistribution de l'AMFR du REL vers la surface de la cellule. Ces résultats suggèrent l'implication possible du DC de l'AMFR dans l'association entre le REL et les mitochondries, la relocalisation

de l'AMFR vers la surface cellulaire et l'inhibition de la dégradation de l'AMFR endogène. Le DC de l'AMFR est associé à certaines enzymes de conjugaison (E2) qui permet l'ubiquitination des substrats associés au DC.

L'AMFR interagit avec les substrats ubiquitinés et cette interaction dépend du domaine Cue de l'AMFR. Les domaines RING et Cue sont critiques pour l'activité ubiquitine ligase de l'AMFR qui promouvoit principalement la polyubiquitination. L'AMFR interagit aussi avec p97 où cette interaction a été observée par immunoprécipitation et une colocalisation entre ces 2 protéines a été observée en immunofluorescence. Les évidences suggèrent donc la formation d'un complexe AMFR/p97/ubiquitine constituant probablement une étape intermédiaire précédant le ciblage des protéines ubiquitinées vers le protéasome.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Anticorps et produits chimiques

L'anticorps monoclonal 3F3A IgM de rat contre l'AMFR provient d'un surnageant d'hybridomes (Nabi and Raz 1987). L'anticorps anti-HSP70 mitochondriale de souris provient de chez Affinity Bioreagents, Inc. L'anticorps anti-p97 de souris provient de chez Abccam. L'anticorps anti-cavéoline de lapin provient de chez BD Biosciences. L'anticorps anti-GFP de lapin provient de chez Chemicon. L'anticorps anti-HA de lapin provient de chez NeoMarkers. Les anticorps anti-FLAG de souris, anti- β actine de souris et anti-calnexine de lapin proviennent de chez Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Les anticorps secondaires conjugués à l'Alexa-488, -568 et -647 proviennent de chez Molecular Probes (Eugene, OR). Les anticorps secondaires conjugués à l'HRP et l'anticorps Rhodamine red-X anti-rat IgM proviennent de chez Jackson Immunoresearch Laboratories (West Grove, PA). Les billes fusionnées à la protéine HA proviennent de chez Sigma-Aldrich et les billes de protéine G, de chez Invitrogen.

Constructions

La séquence d'AMFR, fourni par Avraham Raz (Karmanos Cancer Institute, Detroit), insérée dans le vecteur pcDNA 3.1 puis fusionnée à une protéine FLAG en N-terminal (FLAG-AMFR) a été préalablement préparée par

l'équipe de laboratoire (Registre, Goetz et al. 2004). La séquence de l'AMFR insérée dans le plasmide pEGFP-N1 (Clontech) (AMFR-GFP) a aussi été préparée par l'équipe de laboratoire (Registre, Goetz et al. 2004). Pour générer le domaine cytoplasmique de l'AMFR fusionné au GFP en C-terminal (CD-GFP), la séquence d'acides aminés 304-643 de l'AMFR a été amplifiée par PCR. Ensuite, le produit de PCR a été digéré avec les enzymes de restriction *EcoRI* (site généré artificiellement dans l'oligonucléotide en 5'-3') et *BamHI* (site généré artificiellement dans l'oligonucléotide en 3'-5') puis cloné dans le plasmide pEGFP-N1. La mutation ponctuelle C356S dans le motif RING-H2 de la séquence de l'AMFR insérée dans le vecteur pcDNA 3.1 a été préparée par Pascal St-Pierre. Les mutations ponctuelles M467A, F468S et P469S dans le motif MFP du domaine Cue de la séquence de l'AMFR insérée dans le vecteur pcDNA 3.1 ont aussi été préparées par Pascal St-Pierre. Une délétion des 49 acides aminés en C-terminal de l'AMFR correspondant au domaine de liaison à p97 a aussi été préparée avec l'aide de Pascal St-Pierre. Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage. L'ubiquitine fusionnée à la protéine HA (HA-Ub) et l'ubiquitine mutée sur les Lys 29, 48 et 63 fusionnée à HA ont été fournis par Tony Morielli.

Culture cellulaire et transfection

Les cellules Cos-7 ont été cultivées dans un milieu Eagle modifié Dulbecco (DMEM) enrichi avec 10 % de sérum bovin fœtal (Immunocorp,

Laval, QC), 1 % de vitamine, 1 % d'acides aminés non essentiels, 1 % de glutamine et 1 % du mélange d'antibiotiques pénicilline-streptomycine (Gibco, Burlington, ON). Les cellules ont été cultivées dans un incubateur à 37°C maintenu à 5 % CO₂ avec une humidité constante. Les transfections ont été effectuées pendant 24 heures avec l'Effectene (Quiagen) ou Polyfect (Quiagen) selon les procédures du manufacturier.

Préparation des lysats cellulaires et immunobuvardage

Les cellules Cos-7 ont d'abord été transfectées pendant 24 heures avec les plasmides appropriés selon chaque expérience. Les cellules ont ensuite été lavées avec du tampon PBS froid puis récupérées dans un tampon de lyse contenant 75 mM KAc, 25 mM Hepes à pH 7.4, 8 % de glycérol, 5 mM MgCl₂, 0.5 % Triton X100, 5 mM EDTA et une tablette d'inhibiteur des protéases Complete-Mini (Roche Diagnostics). Les cellules ont été lysées pendant 20 minutes sur glace, puis centrifugées pendant 10 minutes à 8000 rpm afin de récupérer le surnageant pour une quantification de la concentration des protéines par un test de BCA (Pierce, Rockford, IL). Les échantillons ont été préparés avec 30 µg de protéines avec l'addition du tampon Laemmli contenant du β-mercaptoéthanol. Les échantillons ont ensuite été chauffés pendant 5 minutes à 100°C. Les protéines ont été séparées sur un gel SDS-PAGE de 8 % et transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Biosciences) pendant 90 minutes en utilisant l'appareil Mini-Protean (Bio-Rad Labs,

Mississauga, ON). Les membranes ont été bloquées avec 2 % de lait en poudre dans du TBS puis incubées avec les anticorps primaires et secondaires conjugués à la peroxydase horseradish (HRP). Enfin, les bandes ont été révélées par chemiluminescence avec des films Kodak X-Omat pré exposés. Le marqueur de poids moléculaire provient de chez Fermentas.

Immunoprécipitation anti-p97

Les lysats cellulaires ont été réalisés selon le protocole décrit ci-dessus. Ensuite, 300 ug de protéines ont été incubées avec l'anticorps anti-p97 (1/200) par rotation pendant 2 heures à 4°C. Par la suite, ce complexe immunitaire a été incubé avec 40 ul de billes de protéine G par rotation pendant 2 heures à 4°C. Ces billes ont préalablement été lavées 5 fois avec le même tampon de lyse qu'utilisé pour les extraits cellulaires suivi d'une incubation de 2 heures par rotation à 4°C. Les billes ont été précipitées par centrifugation pendant 30 secondes à 6000 rpm puis lavées 3 fois avec toujours le même tampon de lyse. Pour séparer le complexe immunitaire des billes de protéine G, du tampon Laemmli a été ajouté à l'échantillon puis chauffé pendant 5 minutes à 100°C. Enfin, la séparation des protéines sur un gel SDS-PAGE de 8 % et l'immunoblot ont été procédés de la même façon que dans l'immunobuvardage.

Immunoprécipitation anti-GFP

Les extraits cellulaires ont été préparés selon la même procédure que décrite dans l'immunobuvardage. Ensuite, 300 ug de protéines ont été incubées avec l'anticorps anti-GFP (1/100) par rotation pendant 2 heures à 4°C. Par la suite, ce complexe immun a été incubé avec 40 ul de billes de protéine G par rotation pendant 2 heures à 4°C. Ces billes ont préalablement été lavées 5 fois avec le même tampon de lyse qu'utilisé pour les extraits cellulaires suivi d'une incubation de 2 heures par rotation à 4°C. Les billes ont été précipitées par centrifugation pendant 30 secondes à 6000 rpm puis lavées 3 fois avec toujours le même tampon de lyse. Pour séparer le complexe immun des billes de protéine G, du tampon Laemmli a été ajouté à l'échantillon puis chauffé pendant 5 minutes à 100°C. Enfin, la séparation des protéines sur un gel SDS-PAGE de 8 % et l'immunoblot ont été procédés de la même façon que dans l'immunobuvardage.

Immunoprécipitation anti-HA

Les extraits cellulaires ont été préparés selon la même procédure que décrite dans l'immunobuvardage. Les billes HA ont d'abord été lavées 2 fois avec le même tampon de lyse que décrit précédemment et bloquées avec 0.1 % de BSA par rotation pendant 1 heure à 4°C. Ensuite, 40 ul de billes HA ont été ajoutées à 300 ug de protéines avec l'ajout de 0.1 % de BSA dont le mélange a été incubé par rotation pendant 3 heures à 4°C. Les billes HA ont été précipitées

par centrifugation pendant 30 secondes à 6000 rpm et lavées 3 fois avec toujours le même tampon de lyse. Enfin, la séparation des protéines sur un gel SDS-PAGE de 8 % et l'immunoblot ont été procédés de la même façon que dans l'immunobuvardage.

Marquage en immunofluorescence

Les cellules Cos-7 ont été fixées pendant 15 minutes à -20°C avec du méthanol/acétone (80 %/ 20 %) préalablement refroidi à -80°C . Puis, les cellules ont été rincées avec du PBS (pH 7.4) contenant 0.1 mM de Ca^{2+} et 1 mM de Mg^{2+} (PBS/CM) et incubées pendant 10 minutes avec du PBS/CM contenant 1 % BSA (PBS/CM/BSA) à la température de la pièce. Les cellules ont ensuite été marquées avec les anticorps primaires 3F3A mAb de rat (1/200) pour l'AMFR, anti-HSP70 de souris (1/150) pour les mitochondries, anti-calnexine de lapin (1/200) pour le RE rugueux, anti-cavéoline de lapin (1/200), anti-p97 de souris (1/250) et anti-FLAG de souris (1/1000) pendant 30 minutes à la température de la pièce. Les anticorps primaires ont été révélés avec les anticorps secondaires appropriés conjugués à l'Alexa-350, -488, -568, -647 et Rhodamine red-X pendant 30 minutes à la température de la pièce, mais à l'abri de la lumière. Tous les lavages et les incubations avec les anticorps primaires et secondaires ont été effectués dans du PBS/CM/BSA. Enfin, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS/CM puis les lamelles ont été montées sur des lames à l'aide du gelvatol (Air Products and Chemicals, Allentown, PA). Les cellules

marquées en immunofluorescence ont été visualisées avec l'aide du microscope confocal Olympus FV1000 en utilisant un objectif planapochromat de 63 × ou 100 ×.

Quantification de la valeur de la densité intégrale

La quantification de la densité des marquages des anticorps a été effectuée avec l'appareil Multimage Light Cabinet Modèle AlphaImager EC et le programme AlphaImager.

Quantification du coefficient Pearson

Le coefficient Pearson correspond au degré de colocalisation entre 2 marquages et a été calculé avec le logiciel Image-Pro provenant de la compagnie Carsen.

Double-hybride

Le criblage d'une librairie par double-hybride en levure pour l'identification des protéines interagissant avec le domaine cytoplasmique a été réalisé par la compagnie Dualsystems Biotech AG (Suisse). Le produit de PCR du domaine cytoplasmique de l'AMFR leur a été fourni. La librairie sélectionnée pour le criblage provient du cerveau de souris.

RÉFÉRENCES

- Acharya, U., R. Jacobs, et al. (1995). "The formation of Golgi stacks from vesiculated Golgi membranes requires two distinct fusion events." Cell **82**(6): 895-904.
- Adams, J. (2003). "The proteasome: structure, function, and role in the cell." Cancer Treat Rev **29 Suppl 1**: 3-9.
- Alzayady, K. J., M. M. Panning, et al. (2005). "Involvement of the p97-Ufd1-Npl4 complex in the regulated endoplasmic reticulum-associated degradation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors." J Biol Chem.
- Aravind, L. and E. V. Koonin (2000). "The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination." Curr Biol **10**(4): R132-4.
- Bays, N. W., R. G. Gardner, et al. (2001). "Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation." Nat Cell Biol **3**(1): 24-9.
- Bays, N. W., S. K. Wilhovsky, et al. (2001). "HRD4/NPL4 is required for the proteasomal processing of ubiquitinated ER proteins." Mol Biol Cell **12**(12): 4114-28.
- Bazirgan, O. A. and R. Y. Hampton (2005). "Cdc48-Ufd2-Rad23: the road less ubiquitinated?" Nat Cell Biol **7**: 207-9.
- Benlimame, N., P. U. Le, et al. (1998). "Localization of autocrine motility factor receptor to caveolae and clathrin-independent internalization of its ligand to smooth endoplasmic reticulum." Mol Biol Cell **9**(7): 1773-86.
- Benlimame, N., D. Simard, et al. (1995). "Autocrine motility factor receptor is a marker for a distinct membranous tubular organelle." J Cell Biol **129**(2): 459-71.
- Bertolaet, B. L., D. J. Clarke, et al. (2001). "UBA domains of DNA damage-inducible proteins interact with ubiquitin." Nat Struct Biol **8**(5): 417-22.
- Biederer, T., C. Volkwein, et al. (1997). "Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface." Science **278**(5344): 1806-9.

- Bordallo, J., R. K. Plemper, et al. (1998). "Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal and integral membrane proteins." Mol Biol Cell **9**(1): 209-22.
- Braun, S., K. Matuschewski, et al. (2002). "Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4) chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates." Embo J **21**(4): 615-21.
- Chau, V., J. W. Tobias, et al. (1989). "A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein." Science **243**(4898): 1576-83.
- Dai, R. M., E. Chen, et al. (1998). "Involvement of valosin-containing protein, an ATPase Co-purified with IkappaBalpha and 26 S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha." J Biol Chem **273**(6): 3562-73.
- Dai, R. M. and C. C. Li (2001). "Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation." Nat Cell Biol **3**(8): 740-4.
- Deak, P. M. and D. H. Wolf (2001). "Membrane topology and function of Der3/Hrd1p as a ubiquitin-protein ligase (E3) involved in endoplasmic reticulum degradation." J Biol Chem **276**(14): 10663-9.
- DeLaBarre, B. and A. T. Brunger (2003). "Complete structure of p97/valosin-containing protein reveals communication between nucleotide domains." Nat Struct Biol **10**(10): 856-63.
- Deveraux, Q., V. Ustrell, et al. (1994). "A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates." J Biol Chem **269**(10): 7059-61.
- Di Fiore, P. P., S. Polo, et al. (2003). "When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(6): 491-7.
- Donaldson, K. M., H. Yin, et al. (2003). "Ubiquitin signals protein trafficking via interaction with a novel ubiquitin binding domain in the membrane fusion regulator, Vps9p." Curr Biol **13**(3): 258-62.
- Dutaud, D., L. Aubry, et al. (2002). "Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma." J Immunol Methods **260**(1-2): 183-93.

- Egerton, M. and L. E. Samelson (1994). "Biochemical characterization of valosin-containing protein, a protein tyrosine kinase substrate in hematopoietic cells." J Biol Chem **269**(15): 11435-41.
- Ellgaard, L. and A. Helenius (2003). "Quality control in the endoplasmic reticulum." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(3): 181-91.
- Elsasser, S., D. Chandler-Militello, et al. (2004). "Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome." J Biol Chem **279**(26): 26817-22.
- Elsasser, S., R. R. Gali, et al. (2002). "Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains." Nat Cell Biol **4**(9): 725-30.
- Fang, S., M. Ferrone, et al. (2001). "The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14422-7.
- Fang, S., K. L. Lorick, et al. (2003). "RING finger ubiquitin protein ligases: implications for tumorigenesis, metastasis and for molecular targets in cancer." Semin Cancer Biol **13**(1): 5-14.
- Fewell, S. W., K. J. Travers, et al. (2001). "The action of molecular chaperones in the early secretory pathway." Annu Rev Genet **35**: 149-91.
- Frohlich, K. U., H. W. Fries, et al. (1991). "Yeast cell cycle protein CDC48p shows full-length homology to the mammalian protein VCP and is a member of a protein family involved in secretion, peroxisome formation, and gene expression." J Cell Biol **114**(3): 443-53.
- Fukuchi, M., Y. Fukai, et al. (2002). "High-level expression of the Smad ubiquitin ligase Smurf2 correlates with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma." Cancer Res **62**(24): 7162-5.
- Gerards, W. L., W. W. de Jong, et al. (1998). "Structure and assembly of the 20S proteasome." Cell Mol Life Sci **54**(3): 253-62.
- Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction." Physiol Rev **82**(2): 373-428.
- Glickman, M. H. and V. Maytal (2002). "Regulating the 26S proteasome." Curr Top Microbiol Immunol **268**: 43-72.

- Glickman, M. H., D. M. Rubin, et al. (1998). "A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3." Cell **94**(5): 615-23.
- Goebel, M. G., J. Yochem, et al. (1988). "The yeast cell cycle gene CDC34 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme." Science **241**(4871): 1331-5.
- Goldberg, A. L. (2003). "Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins." Nature **426**(6968): 895-9.
- Groll, M. and R. Huber (2003). "Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle." Int J Biochem Cell Biol **35**(5): 606-16.
- Hampton, R. Y., R. G. Gardner, et al. (1996). "Role of 26S proteasome and HRD genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein." Mol Biol Cell **7**(12): 2029-44.
- Hatakeyama, S. and K. I. Nakayama (2003). "U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases." Biochem Biophys Res Commun **302**(4): 635-45.
- Hatakeyama, S., M. Yada, et al. (2001). "U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases." J Biol Chem **276**(35): 33111-20.
- Helenius, A. and M. Aebi (2004). "Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum." Annu Rev Biochem **73**: 1019-49.
- Herscovics, A. (2001). "Structure and function of Class I alpha 1,2-mannosidases involved in glycoprotein synthesis and endoplasmic reticulum quality control." Biochimie **83**(8): 757-62.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-79.
- Hicke, L. (1999). "Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels." Trends Cell Biol **9**(3): 107-12.
- Hicke, L. and R. Dunn (2003). "Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 141-72.
- Hiller, M. M., A. Finger, et al. (1996). "ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway." Science **273**(5282): 1725-8.

- Hirono, Y., S. Fushida, et al. (1996). "Expression of autocrine motility factor receptor correlates with disease progression in human gastric cancer." Br J Cancer **74**(12): 2003-7.
- Hitchcock, A. L., H. Krebber, et al. (2001). "The conserved npl4 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation." Mol Biol Cell **12**(10): 3226-41.
- Hiyama, H., M. Yokoi, et al. (1999). "Interaction of hHR23 with S5a. The ubiquitin-like domain of hHR23 mediates interaction with S5a subunit of 26 S proteasome." J Biol Chem **274**(39): 28019-25.
- Hochstrasser, M. (1996). "Ubiquitin-dependent protein degradation." Annu Rev Genet **30**: 405-39.
- Hochstrasser, M. (1998). "There's the rub: a novel ubiquitin-like modification linked to cell cycle regulation." Genes Dev **12**(7): 901-7.
- Hochstrasser, M. (2000). "Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems." Nat Cell Biol **2**(8): E153-7.
- Hofmann, K. and P. Bucher (1996). "The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway." Trends Biochem Sci **21**(5): 172-3.
- Hofmann, K. and L. Falquet (2001). "A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems." Trends Biochem Sci **26**(6): 347-50.
- Hofmann, R. M. and C. M. Pickart (1999). "Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair." Cell **96**(5): 645-53.
- Huyer, G., W. F. Piluek, et al. (2004). "Distinct machinery is required in *Saccharomyces cerevisiae* for the endoplasmic reticulum-associated degradation of a multispanning membrane protein and a soluble luminal protein." J Biol Chem **279**(37): 38369-78.
- Jarosch, E., C. Taxis, et al. (2002). "Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48." Nat Cell Biol **4**(2): 134-9.
- Joazeiro, C. A., S. S. Wing, et al. (1999). "The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase." Science **286**(5438): 309-12.

- Kaneko, C., S. Hatakeyama, et al. (2003). "Characterization of the mouse gene for the U-box-type ubiquitin ligase UFD2a." Biochem Biophys Res Commun **300**(2): 297-304.
- Kang, R. S., C. M. Daniels, et al. (2003). "Solution structure of a CUE-ubiquitin complex reveals a conserved mode of ubiquitin binding." Cell **113**(5): 621-30.
- Kara, M., Y. Ohta, et al. (2001). "Autocrine motility factor receptor expression in patients with stage I non-small cell lung cancer." Ann Thorac Surg **71**(3): 944-8.
- Kim, I., K. Mi, et al. (2004). "Multiple interactions of rad23 suggest a mechanism for ubiquitylated substrate delivery important in proteolysis." Mol Biol Cell **15**(7): 3357-65.
- Klapisz, E., I. Sorokina, et al. (2002). "A ubiquitin-interacting motif (UIM) is essential for Eps15 and Eps15R ubiquitination." J Biol Chem **277**(34): 30746-53.
- Knop, M., A. Finger, et al. (1996). "Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast." Embo J **15**(4): 753-63.
- Koegl, M., T. Hoppe, et al. (1999). "A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly." Cell **96**(5): 635-44.
- Kondo, H., C. Rabouille, et al. (1997). "p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion." Nature **388**(6637): 75-8.
- Latterich, M., K. U. Frohlich, et al. (1995). "Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes." Cell **82**(6): 885-93.
- Le, P. U., N. Benlimame, et al. (2000). "Clathrin-mediated endocytosis and recycling of autocrine motility factor receptor to fibronectin fibrils is a limiting factor for NIH-3T3 cell motility." J Cell Sci **113** (Pt 18): 3227-40.
- Levkowitz, G., H. Waterman, et al. (1999). "Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1." Mol Cell **4**(6): 1029-40.
- Liang, J. S., T. Kim, et al. (2003). "Overexpression of the tumor autocrine motility factor receptor Gp78, a ubiquitin protein ligase, results in

- increased ubiquitinylation and decreased secretion of apolipoprotein B100 in HepG2 cells." J Biol Chem **278**(26): 23984-8.
- Lorick, K. L., J. P. Jensen, et al. (1999). "RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11364-9.
- Maruyama, K., H. Watanabe, et al. (1995). "Expression of autocrine motility factor receptor in human esophageal squamous cell carcinoma." Int J Cancer **64**(5): 316-21.
- Matsuda, N. and A. Nakano (1998). "RMA1, an Arabidopsis thaliana gene whose cDNA suppresses the yeast sec15 mutation, encodes a novel protein with a RING finger motif and a membrane anchor." Plant Cell Physiol **39**(5): 545-54.
- Maurizi, M. R. and C. C. Li (2001). "AAA proteins: in search of a common molecular basis. International Meeting on Cellular Functions of AAA Proteins." EMBO Rep **2**(11): 980-5.
- McGrath, J. P., S. Jentsch, et al. (1991). "UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme." Embo J **10**(1): 227-36.
- Meyer, H. H., J. G. Shorter, et al. (2000). "A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways." Embo J **19**(10): 2181-92.
- Molinari, M., V. Calanca, et al. (2003). "Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle." Science **299**(5611): 1397-400.
- Morre, D. M. (1991). "Role of the Golgi apparatus in cellular pathology." J Electron Microsc Tech **17**(2): 200-11.
- Nabi, I. R. and A. Raz (1987). "Cell shape modulation alters glycosylation of a metastatic melanoma cell-surface antigen." Int J Cancer **40**(3): 396-402.
- Nabi, I. R., H. Watanabe, et al. (1990). "Identification of B16-F1 melanoma autocrine motility-like factor receptor." Cancer Res **50**(2): 409-14.
- Nabi, I. R., H. Watanabe, et al. (1991). "Tumor cell autocrine motility factor receptor." Exs **59**: 163-77.
- Nalepa, G. and J. Wade Harper (2003). "Therapeutic anti-cancer targets upstream of the proteasome." Cancer Treat Rev **29 Suppl 1**: 49-57.

- Neuwald, A. F., L. Aravind, et al. (1999). "AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes." Genome Res **9**(1): 27-43.
- Ogura, T. and A. J. Wilkinson (2001). "AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function." Genes Cells **6**(7): 575-97.
- Okamoto, Y., T. Ozaki, et al. (2003). "UbcH10 is the cancer-related E2 ubiquitin-conjugating enzyme." Cancer Res **63**(14): 4167-73.
- Oldham, C. E., R. P. Mohny, et al. (2002). "The ubiquitin-interacting motifs target the endocytic adaptor protein epsin for ubiquitination." Curr Biol **12**(13): 1112-6.
- Onishi, Y., K. Tsukada, et al. (2003). "Overexpression of autocrine motility factor receptor (AMFR) in NIH3T3 fibroblasts induces cell transformation." Clin Exp Metastasis **20**(1): 51-8.
- Ortolan, T. G., P. Tongaonkar, et al. (2000). "The DNA repair protein rad23 is a negative regulator of multi-ubiquitin chain assembly." Nat Cell Biol **2**(9): 601-8.
- Otto, T., W. Birchmeier, et al. (1994). "Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinomas." Cancer Res **54**(12): 3120-3.
- Pamnani, V., T. Tamura, et al. (1997). "Cloning, sequencing and expression of VAT, a CDC48/p97 ATPase homologue from the archaeon *Thermoplasma acidophilum*." FEBS Lett **404**(2-3): 263-8.
- Park, S., R. Isaacson, et al. (2005). "Ufd1 exhibits the AAA-ATPase fold with two distinct ubiquitin interaction sites." Structure (Camb) **13**(7): 995-1005.
- Peters, J. M., J. R. Harris, et al. (1992). "Ubiquitous soluble Mg(2+)-ATPase complex. A structural study." J Mol Biol **223**(2): 557-71.
- Peters, J. M., M. J. Walsh, et al. (1990). "An abundant and ubiquitous homo-oligomeric ring-shaped ATPase particle related to the putative vesicle fusion proteins Sec18p and NSF." Embo J **9**(6): 1757-67.
- Pickart, C. M. (2001). "Mechanisms underlying ubiquitination." Annu Rev Biochem **70**: 503-33.

- Polo, S., S. Sigismund, et al. (2002). "A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins." Nature **416**(6879): 451-5.
- Pray, T. R., F. Parlati, et al. (2002). "Cell cycle regulatory E3 ubiquitin ligases as anticancer targets." Drug Resist Updat **5**(6): 249-58.
- Raasi, S., I. Orlov, et al. (2004). "Binding of polyubiquitin chains to ubiquitin-associated (UBA) domains of HHR23A." J Mol Biol **341**(5): 1367-79.
- Raasi, S. and C. M. Pickart (2003). "Rad23 ubiquitin-associated domains (UBA) inhibit 26 S proteasome-catalyzed proteolysis by sequestering lysine 48-linked polyubiquitin chains." J Biol Chem **278**(11): 8951-9.
- Rabinovich, E., A. Kerem, et al. (2002). "AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation." Mol Cell Biol **22**(2): 626-34.
- Rabouille, C., H. Kondo, et al. (1998). "Syntaxin 5 is a common component of the NSF- and p97-mediated reassembly pathways of Golgi cisternae from mitotic Golgi fragments in vitro." Cell **92**(5): 603-10.
- Rabouille, C., T. P. Levine, et al. (1995). "An NSF-like ATPase, p97, and NSF mediate cisternal regrowth from mitotic Golgi fragments." Cell **82**(6): 905-14.
- Rape, M., T. Hoppe, et al. (2001). "Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone." Cell **107**(5): 667-77.
- Registre, M., J. G. Goetz, et al. (2004). "The gene product of the gp78/AMFR ubiquitin E3 ligase cDNA is selectively recognized by the 3F3A antibody within a subdomain of the endoplasmic reticulum." Biochem Biophys Res Commun **320**(4): 1316-22.
- Richly, H., M. Rape, et al. (2005). "A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting." Cell **120**(1): 73-84.
- Romisch, K. (2004). "A cure for traffic jams: small molecule chaperones in the endoplasmic reticulum." Traffic **5**(11): 815-20.
- Rothman, J. E. and G. Warren (1994). "Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics." Curr Biol **4**(3): 220-33.

- Rouiller, I., V. M. Butel, et al. (2000). "A major conformational change in p97 AAA ATPase upon ATP binding." Mol Cell **6**(6): 1485-90.
- Sakata, E., Y. Yamaguchi, et al. (2003). "Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain." EMBO Rep **4**(3): 301-6.
- Schauber, C., L. Chen, et al. (1998). "Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway." Nature **391**(6668): 715-8.
- Scheffner, M., U. Nuber, et al. (1995). "Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade." Nature **373**(6509): 81-3.
- Scheffner, M., B. A. Werness, et al. (1990). "The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53." Cell **63**(6): 1129-36.
- Schubert, U., L. C. Anton, et al. (2000). "Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes." Nature **404**(6779): 770-4.
- Shamu, C. E., D. Flierman, et al. (2001). "Polyubiquitination is required for US11-dependent movement of MHC class I heavy chain from endoplasmic reticulum into cytosol." Mol Biol Cell **12**(8): 2546-55.
- Shamu, C. E., C. M. Story, et al. (1999). "The pathway of US11-dependent degradation of MHC class I heavy chains involves a ubiquitin-conjugated intermediate." J Cell Biol **147**(1): 45-58.
- Shih, S. C., G. Prag, et al. (2003). "A ubiquitin-binding motif required for intramolecular monoubiquitylation, the CUE domain." Embo J **22**(6): 1273-81.
- Shimizu, K., M. Tani, et al. (1999). "The autocrine motility factor receptor gene encodes a novel type of seven transmembrane protein." FEBS Lett **456**(2): 295-300.
- Shore, G. C. and J. R. Tata (1977). "Two fractions of rough endoplasmic reticulum from rat liver. II. Cytoplasmic messenger RNA's which code for albumin and mitochondrial proteins are distributed differently between the two fractions." J Cell Biol **72**(3): 726-43.
- Silletti, S., S. Paku, et al. (1996). "Tumor autocrine motility factor responses are mediated through cell contact and focal adhesion rearrangement in the

absence of new tyrosine phosphorylation in metastatic cells." Am J Pathol **148**(5): 1649-60.

Silletti, S., H. Watanabe, et al. (1991). "Purification of B16-F1 melanoma autocrine motility factor and its receptor." Cancer Res **51**(13): 3507-11.

Song, C., Q. Wang, et al. (2003). "ATPase activity of p97-valosin-containing protein (VCP). D2 mediates the major enzyme activity, and D1 contributes to the heat-induced activity." J Biol Chem **278**(6): 3648-55.

Strous, G. J., P. van Kerkhof, et al. (1996). "The ubiquitin conjugation system is required for ligand-induced endocytosis and degradation of the growth hormone receptor." Embo J **15**(15): 3806-12.

Swanson, R., M. Locher, et al. (2001). "A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation." Genes Dev **15**(20): 2660-74.

Takizawa, P. A. and V. Malhotra (1993). "Coatomers and SNAREs in promoting membrane traffic." Cell **75**(4): 593-6.

Taxis, C., R. Hitt, et al. (2003). "Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD." J Biol Chem **278**(38): 35903-13.

Thoms, S. (2002). "Cdc48 can distinguish between native and non-native proteins in the absence of cofactors." FEBS Lett **520**(1-3): 107-10.

Timar, J., E. Raso, et al. (2002). "Expression and function of the AMF receptor by human melanoma in experimental and clinical systems." Clin Exp Metastasis **19**(3): 225-32.

Timar, J., M. Trikha, et al. (1996). "Autocrine motility factor signals integrin-mediated metastatic melanoma cell adhesion and invasion." Cancer Res **56**(8): 1902-8.

Trombetta, E. S. and A. J. Parodi (2003). "Quality control and protein folding in the secretory pathway." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 649-76.

Tyers, M. and P. Jorgensen (2000). "Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy." Curr Opin Genet Dev **10**(1): 54-64.

- Uchiyama, K., E. Jokitalo, et al. (2002). "VCIP135, a novel essential factor for p97/p47-mediated membrane fusion, is required for Golgi and ER assembly in vivo." J Cell Biol **159**(5): 855-66.
- Vale, R. D. (2000). "AAA proteins. Lords of the ring." J Cell Biol **150**(1): F13-9.
- Vashist, S. and D. T. Ng (2004). "Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control." J Cell Biol **165**(1): 41-52.
- Wang, H. J., N. Benlimame, et al. (1997). "The AMF-R tubule is a smooth ilimaquinone-sensitive subdomain of the endoplasmic reticulum." J Cell Sci **110 (Pt 24)**: 3043-53.
- Wang, H. J., G. Guay, et al. (2000). "Calcium regulates the association between mitochondria and a smooth subdomain of the endoplasmic reticulum." J Cell Biol **150**(6): 1489-98.
- Wang, Q., C. Song, et al. (2003). "Hexamerization of p97-VCP is promoted by ATP binding to the D1 domain and required for ATPase and biological activities." Biochem Biophys Res Commun **300**(2): 253-60.
- Wang, Q., C. Song, et al. (2003). "D1 ring is stable and nucleotide-independent, whereas D2 ring undergoes major conformational changes during the ATPase cycle of p97-VCP." J Biol Chem **278**(35): 32784-93.
- Wang, Y., A. Satoh, et al. (2004). "VCIP135 acts as a deubiquitinating enzyme during p97-p47-mediated reassembly of mitotic Golgi fragments." J Cell Biol **164**(7): 973-8.
- Wilkinson, C. R., M. Seeger, et al. (2001). "Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains." Nat Cell Biol **3**(10): 939-43.
- Ye, Y., H. H. Meyer, et al. (2001). "The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol." Nature **414**(6864): 652-6.
- Ye, Y., H. H. Meyer, et al. (2003). "Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains." J Cell Biol **162**(1): 71-84.

- Zacksenhaus, E. and R. Sheinin (1990). "Molecular cloning, primary structure and expression of the human X linked A1S9 gene cDNA which complements the ts A1S9 mouse L cell defect in DNA replication." Embo J **9**(9): 2923-9.
- Zhang, L., C. L. Ashendel, et al. (1994). "Isolation and characterization of the principal ATPase associated with transitional endoplasmic reticulum of rat liver." J Cell Biol **127**(6 Pt 2): 1871-83.
- Zhang, X., A. Shaw, et al. (2000). "Structure of the AAA ATPase p97." Mol Cell **6**(6): 1473-84.
- Zhang, Y., G. Nijbroek, et al. (2001). "Hsp70 molecular chaperone facilitates endoplasmic reticulum-associated protein degradation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in yeast." Mol Biol Cell **12**(5): 1303-14.
- Zhong, X., Y. Shen, et al. (2004). "AAA ATPase p97/valosin-containing protein interacts with gp78, a ubiquitin ligase for endoplasmic reticulum-associated degradation." J Biol Chem **279**(44): 45676-84.
- Zwickl, P. and W. Baumeister (1999). "AAA-ATPases at the crossroads of protein life and death." Nat Cell Biol **1**(4): E97-8.