

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE DE L'INTERACTION ENTRE
L'UBIQUITINE E3 LIGASE RNF167 ET DES ENZYMES CONJUGATRICES DE
L'UBIQUITINE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

KIM GHILARDUCCI

FÉVRIER 2019

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

DÉDICACE

J'aimerais dédier ce travail à mes amis,
ma famille, mon amoureux et tous
ceux qui m'ont aidé à la réalisation de ce projet.

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Marc Lussier, de m'avoir acceptée dans son laboratoire. Merci de m'avoir donné le bon soutien académique pour la réalisation de mon projet.

J'aimerais remercier Steve Bourgault pour son expertise en SPR et pour m'avoir donné des conseils pour cette étape de mon projet. Merci également de m'avoir laissé utiliser le FPLC dans son laboratoire.

J'aimerais également remercier mes amis et collègues de travail, Hou et Camille, qui ont rendu le travail en laboratoire amusant et plaisant. Je remercie aussi Billel de m'avoir aidé au début de mon projet.

J'aimerais remercier mon amoureux, Jean-Philippe, de m'avoir soutenu pendant ces années d'études. Ensuite, je remercie mes parents, Johanne et Sam, de m'avoir encouragé à continuer mes études. J'ai été capable de me rendre aussi loin grâce aux efforts que vous avez mis. Finalement, je remercie ma sœur, Line, et mes frères, Carl et Simon, qui sont, pour moi, des exemples à suivre.

TABLES DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
RÉSUMÉ	xiv
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	1
1.1 Modifications post-traductionnelles.....	1
1.1.1 Importance des modifications post-traductionnelle.....	1
1.1.2 Ubiquitination et voie de signalisation des protéines Ubiquitine-like	3
1.2 Ubiquitine et les protéines Ubiquitine-like	5
1.2.1 Ubiquitine	5
1.2.2 Protéines Ubiquitine-like	7
1.3 Ubiquitination du substrat	8
1.4 Enzymes de l'ubiquitination	10
1.4.1 UBE1	10
1.4.2 UBE2	11
1.4.3 UBE3	12
1.5 UBE3 à domaine RING transmembranaire.....	15

1.5.1 Particularités	15
1.5.2 RNF167	17
1.6 Interaction UBE2-UBE3 à domaine RING	18
1.7 Contexte de l'étude	19
1.8 Problématique et objectifs.....	21
CHAPITRE II MATÉRIELS ET MÉTHODES	22
2.1 Anticorps.....	22
2.2 Constructions plasmidiques	23
2.3 Purification.....	23
2.3.1 Transformation bactérienne.....	23
2.3.2 Amplification d'ADN plasmidique (Midi Prep)	24
2.3.3 Optimisation expression des protéines dans les bactéries	24
2.3.4 Expression des protéines et extraction.....	26
2.3.5 Chromatographie d'affinité	27
2.3.6 Dialyse, quantification et préservation	28
2.3.7 Clivage de la GST et purification avec les billes Glutathione Sepharse.....	29
2.3.8 Purification de RNF167-HA.....	29
2.3.9 Électrophorèse sur gel SDS-PAGE	30
2.4 Immunobuvardage.....	30
2.5 Essai ubiquitination in vitro	30
2.6 Culture cellulaire et transfection	31
2.7 Lyse des cellules HEK293T/17.....	31

2.8	Essai GST pull-down	32
2.9	Essai Résonance des Plasmon de Surface	32
2.10	Immunofluorescence	33
2.11	Souris	34
2.12	Fractionnement synaptoneurosome.....	34
2.13	Fractionnement subcellulaire	34
CHAPITRE III RÉSULTATS		36
3.1	La première stratégie de purification n'est pas optimale	36
3.2	La seconde stratégie de purification permet d'obtenir une protéine recombinante plus pure.....	39
3.3	Le domaine RING de RNF167 peut interagir fonctionnellement avec une dizaine d'UBE2.....	42
3.4	RNF167 et UBE2N interagissent selon des essais in vitro	43
3.5	Caractérisation de la cinétique de liaison entre RNF167 et UBE2N	45
3.6	RNF167 et UBE2N co-localisent en cellule	48
3.7	Localisation de RNF167, UBE2N, UBE2V1 et UBE2V2 dans un cortex de souris.....	49
3.7.1	Synaptoneurosome.....	49
3.7.2	Fractionnement subcellulaire.....	52
CHAPITRE IV DISCUSSION		54
CHAPITRE V CONCLUSION ET PERSPECTIVES		67
ANNEXE A		69
ANNEXE B.....		70
ANNEXE C.....		71

ANNEXE D	72
ANNEXE E.....	73
ANNEXE F	74
ANNEXE G	75
ANNEXE H	76
RÉFÉRENCES.....	77

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1. Voie de signalisation de l'ubiquitination.	5
1.2. Structure de la protéine Ub.	6
1.3. Modification du substrat par l'ubiquitination.	8
1.4. Les trois types de domaine RING	14
1.5. Activation du complexe UBE2-Ub par une UBE3 à domaine RING.....	15
3.1. Première stratégie pour la purification de RNF167.	38
3.2. Deuxième stratégie de purification	40
3.3. Détermination des enzymes de conjugaison pouvant se lier de façon fonctionnelle avec RNF167	43
3.4. Essai d'interaction in vitro par GST pull-down entre RNF167 et UBE2N	45
3.5. Cinétique de liaison entre RNF167 et UBE2N	47
3.6. Co-localisation de RNF167 et UBE2N chez les cellules HEK293	49
3.7. Localisation de RNF167, UBE2N, UBE2V1 et UBE2V2 dans un cortex de souris après isolation du synaptoneurosome.....	51
3.8. Localisation de RNF167, UBE2N, UBE2V1 et UBE2V2 dans un cortex de souris par fractionnement subcellulaire	53
S1. Cartographie de pGEX-4T-1 et séquence de RNF167-HA	69
S2. Cartographie de pET-52b(+) et séquence HA-RNF167-6xHis	70

S3.	Cartographie de pET-17b et séquence de 6xHis-UBE2N.....	71
S4.	Cartographie et séquence des sites des enzymes de restriction du vecteur pEGFP-C1	72
S5.	Séquence d'ADN d'UBE2N insérée dans le vecteur pGEX-4T-1 et dans le vecteur pEGFP-C1	73
S6.	Séquence d'ADN de HA-RNF167-6xHis insérée dans le vecteur pGEX-4T-1.....	74
S7.	Construction des protéines recombinantes de RNF167 et leurs étiquettes	75
S8.	Construction des protéines recombinantes d'UBE2N et leurs étiquettes	76

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1. Description des anticorps utilisés lors des essais d'immunobuvardage et d'immunofluorescence	22
3.1. Valeur de la constante de dissociation suite à l'essai SPR entre RNF167 et les différents analytes.....	48

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMP	Adénoside monophosphate
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
AMPAR	récepteur AMPA
APC	<i>Anaphase promoting complex</i>
ATP	Adénosine triphosphate
Cyt	Fraction cytosolique
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
GDP	Guanoside diphosphate
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GluA	Sous-unité du récepteur AMPA
GluN	Sous-unité du récepteur NMDA
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Guanoside triphosphate
H	Homogénat
H ₁₀₀	Homogénat après filtration 100 μ m

H ₅	Homogénat après filtration 5 µm
HECT	<i>Homologous to E6-AP C-terminus</i>
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
K _D	Constante de Dissociation
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LDP	Dépolarisation à long terme
LP1	<i>Lysate pellet 1</i>
LS1	<i>Lysate supernatant 1</i>
LTP	Potentiation à long terme
NEDD8	<i>Neural precursor cell Expressed Developmentally Downregulated protein 8</i>
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartate</i>
NMDAR	Récepteur NMDA
P2	<i>Pellet 2</i>
PSD	Densité post-synaptique
RBR	RING-IBR-RING
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RNF167	<i>RING finger protein 167</i>
RU	Unité de réponse

S1	Surnageant 1
SN	Synaptoneurosome
SPR	Résonnance des plasmons de surface
SPSD	Fraction synaptosomale soluble
SUMO	<i>Small Ubiquitin-related Modifier</i>
Ub	Ubiquitine
Ub-like	Ubiquitine-like
UBC	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 catalytic</i>
UBE1	<i>Ubiquitin activating enzyme E1</i>
UBE2	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2</i>
UBE3	<i>Ubiquitin ligase E3</i>

RÉSUMÉ

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle médiée par une cascade enzymatique impliquant une enzyme activatrice de l'ubiquitine (UBE1), une enzyme conjugatrice de l'ubiquitine (UBE2) et une enzyme ligase (UBE3). Cette modification permet, par l'ajout d'une ou de plusieurs ubiquitines sur un substrat, de moduler l'activité ou le niveau d'expression des protéines dans la cellule. Dans le cadre de ce projet de recherche, l'étude porte sur RNF167, une UBE3 membranaire à domaine RING (domaine de liaison aux UBE2s). Cette enzyme, au niveau des neurones, joue un rôle dans la régulation négative de l'expression de récepteur du glutamate, les récepteurs AMPAs (AMPA), jouant un rôle au niveau de l'apprentissage et de la mémoire. L'ubiquitination de ceux-ci lors de leur endocytose, mène à leur dégradation au niveau des lysosomes. Le but de cette recherche est de caractériser l'interaction entre l'UBE3 ligase RNF167 et les enzymes conjugatrice de l'ubiquitine. Pour se faire, la purification d'une forme recombinante de RNF167 a été développée. Cette purification de la protéine a été possible lorsqu'une étiquette HA a été fusionnée à l'extrémité N-terminale de RNF167 et une étiquette 6xHis fusionnée à l'extrémité C-terminale. Une fois que la protéine ait été purifiée, un essai d'ubiquitination *in vitro* a permis de déterminer que RNF167 peut se lier de façon fonctionnelle avec une dizaine d'UBE2. Parmi les UBE2s qui ont réagi de façon fonctionnelle avec RNF167, seul UBE2N, aidée de ses cofacteurs, UBE2V1 ou UBE2V2, peut former une chaîne d'ubiquitine K63. Ce type de chaîne représente la forme d'ubiquitination des AMPARs. C'est pour cette raison que l'étude s'est concentrée sur l'interaction entre RNF167 et UBE2N. Des essais d'interaction *in vitro* par GST pull-down ont confirmé l'interaction entre les deux protéines. Des essais biophysique de résonance des plasmons de surface Spratt et al. (2014) montrent que l'association et la dissociation du complexe est très rapide, ce qui représente une interaction transitoire et qui est conforme à une interaction entre une UBE2 et une UBE3 en milieu physiologique. Des essais d'immunofluorescence chez les cellules HEK293 montrent que les deux protéines se retrouvent dans le même espace cellulaire. Finalement, des fractionnements cellulaires d'un cortex de souris indiquent que RNF167, UBE2N, UBE2V1 et UBE2V2 se retrouvent dans les mêmes compartiments cellulaires. En conclusion, cette étude a permis de démontrer l'interaction entre RNF167 et UBE2N et rend intéressante l'étude d'UBE2N pour l'ubiquitination des AMPARs.

Mots clés : purification de protéines, interaction protéine-protéine, ubiquitination, RNF167, UBE2

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Modifications post-traductionnelles

1.1.1 Importance des modifications post-traductionnelle

Les protéines exprimées au niveau de la cellule définissent son type cellulaire (cellule épithéliale, neuronale, rénale, etc.) (Chagastelles et Nardi, 2011). Pour maintenir le bien-être de la cellule, l'activité, ainsi que le niveau d'expression des protéines doivent être contrôlés. Des dérèglements au niveau de l'expression de protéines et de leur activité peuvent engendrer des maladies comme le cancer (Arjonen et al., 2014). Les protéines, une fois exprimées, peuvent subir des modifications post-traductionnelles afin de réguler leur activité. Les modifications post-traductionnelles peuvent ainsi favoriser des interactions protéines-protéines, déterminer la localisation subcellulaire des protéines, protéger une protéine de sa dégradation, étiqueter une protéine pour dégradation ou encore inhiber l'activité des protéines en lui conférant un changement de configuration (Seo et Lee, 2004). Par exemple, la phosphorylation, définie par un ajout d'un groupement phosphate sur une sérine, une tyrosine ou une thréonine, est une des modifications les plus courantes au niveau des protéines. Cette modification est médiée par une kinase et le processus peut être réversible par l'action d'une phosphatase (Ardito et al., 2017). Cette modification est impliquée dans plusieurs processus physiologiques de la cellule tels que la prolifération, l'apoptose ou encore le trafic subcellulaire (Pawson, 2002). Une des voies de signalisation impliquant la

phosphorylation qui a beaucoup été étudiée est celle de la cascade enzymatique des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) qui requiert l'activation de kinases par une cascade de phosphorylation (une kinase qui phosphoryle une autre kinase pour l'activer) (Ardito et al., 2017). La protéine p53, un facteur de transcription permettant de réguler le cycle cellulaire, l'apoptose et l'autophagie, est une protéine se faisant phosphoryler par la voie des MAPK, ce qui permet l'activation de celle-ci (Wu, 2004). Certaines modifications post-traductionnelles peuvent être antagonistes, c'est-à-dire que deux modifications peuvent agir sur le même site de la protéine et ainsi bloquer le site pour l'autre modification. Il y a également la possibilité qu'une modification sur un site de la protéine empêche l'autre modification de se produire sur un autre site à cause d'un changement de conformation ou d'un encombrement. Ces modifications permettent de moduler différentes fonctions antagonistes dans la cellule (Seo et Lee, 2004). Par exemple, l'acétylation du site K27 de l'histone 3 (H3K27) permet le déroulement de l'ADN et la disponibilité du gène pour permettre son expression. Par contre, la déacétylation par le complexe NURD (nucleosome remodeling deacetylase) permet le recrutement du complexe PRC2 (polycomb repressive complex 2) qui induit la triméthylation de H3K27, ce qui empêche l'expression d'un gène (Reynolds et al., 2012). D'autres modifications post-traductionnelles peuvent être nécessaires pour induire une autre modification post-traductionnelle (Seo et Lee, 2004). Par exemple, la phosphorylation du récepteur EGF (epidermal growth factor) (EGFR) induit son ubiquitination (Nguyen et al., 2013), une modification post-traductionnelle induite par l'action d'une cascade enzymatique impliquant une UBE1 (Ubiquitin activating enzyme E1), une UBE2 (Ubiquitin-conjugating enzyme E2) et une UBE3 (Ubiquitin ligase E3) qui permet l'ajout d'une ou plusieurs protéines ubiquitine sur un substrat (Stewart et al., 2016). En effet, la liaison du ligand d'EGFR entraîne son activation et son autophosphorylation. Cette modification permet le recrutement de la famille d'UBE3 ligase Cbl qui possède un domaine de reconnaissance des résidus tyrosines phosphorylées dans la portion N-terminale de la protéine. Ce recrutement induit l'ubiquitination du récepteur et son endocytose (Nguyen et al., 2013).

1.1.2 Ubiquitination et voie de signalisation des protéines Ubiquitine-like

L'ubiquitination a été découverte dans les années 1970 par son rôle dans la dégradation des protéines au protéasome (Varshavsky, 2006). Depuis, d'autres voies de signalisation faisant appel à l'ajout de protéine Ub-like (ubiquitine-like) (protéines ayant des homologies de séquence avec l'Ub) ont été découvertes (SUMOylation et NEDDylation). Ces voies sont toutes médiées par une cascade enzymatique impliquant des enzymes E1, E2 et E3 (Kerscher et al., 2006).

Lors de la SUMOylation, il y a attachement d'une ou plusieurs protéines SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) sur une ou plusieurs lysines d'un substrat. La formation de la protéine mature SUMO est médiée par des protéases de type Ulp (Ub-like specific protease) et SENPs (sentrin-specific protease). Ces protéases permettent d'obtenir la forme mature de SUMO pour avoir deux glycines dans la portion C-terminale permettant l'attachement de SUMO sur une enzyme de la cascade enzymatique ou un substrat. Ensuite, l'activation de SUMO est possible grâce à l'action d'un complexe enzymatique composé de SAE1 (SUMO-activating subunit 1) et d'UBA2 (ubiquitin-like activation enzyme subunit 2) permettant l'adénylation de SUMO de manière ATP-dépendante. Suite à l'activation de SUMO, celle-ci est transférée sur une cystéine active de la sous-unité UBA2. Il y a ensuite transfert de SUMO sur une cystéine active de l'enzyme conjugatrice E2. Le transfert de SUMO sur un substrat peut être médié de manière E3-indépendante ou de manière E3-dépendante. Dans le dernier cas, l'E3 permet de positionner le complexe E2-SUMO soit en interagissant qu'avec le complexe (sans interaction avec le substrat) ou en interagissant avec le complexe E2-SUMO et avec le substrat en même temps. Les protéases Ulp et SENPs peuvent renverser la SUMOylation sur un substrat, ce qui permet de recycler la protéine SUMO (Gareau et Lima, 2010).

La NEDDylation est caractérisée par l'ajout d'une ou plusieurs protéines NEDD8 (neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 8) sur une ou

plusieurs lysines d'un substrat. Similaire à la protéine SUMO, la portion C-terminale de NEDD8 doit tout d'abord être clivée par des enzymes hydrolases C-terminales afin d'obtenir le motif Gly-Gly (Rabut et Peter, 2008). Ensuite, l'activation ATP-dépendante de NEDD8 est possible par l'action d'une enzyme E1, un hétérodimère composé des protéines UBA3 (ubiquitin-like modifier activating enzyme 3) et APPBP1 (APP binding protein 1) (Huang et al., 2004; Rabut et Peter, 2008). NEDD8 se lie sur la cystéine active d'UBA3 (Rabut et Peter, 2008). Il y a ensuite transfert de NEDD8 sur une cystéine active de l'enzyme conjugatrice, E2 (Huang et al., 2007; Rabut et Peter, 2008). L'E3 ligase interagit avec le complexe E2-NEDD8 et permet la spécificité du substrat en agissant en tant que pont de liaison entre l'E2 et le substrat. Des enzymes NEDD8 isopeptidases permettent de renverser le NEDDylation sur un substrat et permettent le recyclage de NEDD8 (Rabut et Peter, 2008).

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle caractérisée par l'ajout d'une ou plusieurs Ub sur un substrat. Dans un premier temps, une UBE1, l'enzyme activatrice de l'ubiquitine, se lie à la partie C-terminale de l'Ub via une cystéine active dans son domaine Cys. Cette réaction requiert la consommation d'ATP (Olsen et Lima, 2013). Ensuite, l'UBE1 transfère l'Ub sur une cystéine active dans le domaine UBC de l'UBE2, l'enzyme conjugatrice de l'Ub (Stewart et al., 2016). Finalement, l'UBE3, une enzyme Ub ligase, permet le transfert de l'Ub sur le substrat. Dans le cas des UBE3s à domaine HECT, l'UBE2 transfère l'Ub sur la cystéine active du domaine HECT. Dans le cas des UBE3s à domaine RING, cette dernière ne contient pas de cystéine active dans son domaine actif et agit en tant que pont de liaison entre l'UBE2 et le substrat (Metzger et al., 2012) (fig. 1.1). Étant donné le caractère réversible de l'ubiquitination, une protéine Ub peut être recyclée suite à sa déubiquitination par des protéines déubiquitinases (DUB) (Komander, 2009). Cette déubiquitination permet également de renverser l'ubiquitination des protéines. Les DUBs participent également dans la maturation des protéines ubiquitine qui sera discutée dans la prochaine section.

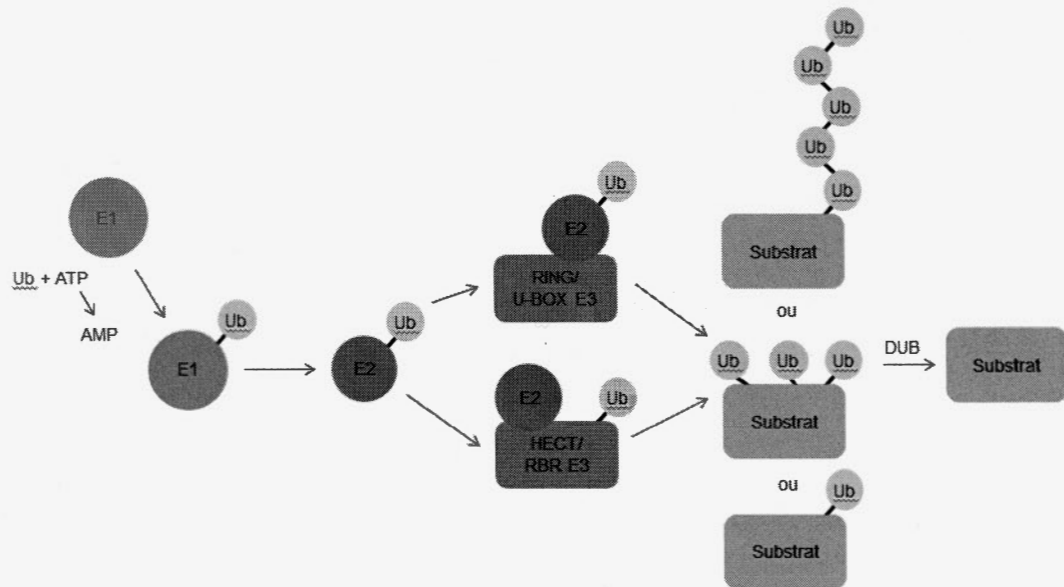


Figure 1.1. Voie de signalisation de l'ubiquitination. L'UBE1 utilise de l'ATP pour activer l'ubiquitine (Takamori et al.) qui se lie sur la E1 (1). L'Ub est ensuite transférée sur l'UBE2 (2). L'UBE3 ligase catalyse la dernière étape de la cascade de signalisation (3). Après liaison d'une seule Ub sur le substrat, d'autres molécules d'Ub peuvent se lier sur la première et former une chaîne de plusieurs Ub. La réaction est réversible par l'action d'une DUB.

1.2 Ubiquitine et les protéines Ubiquitine-like

1.2.1 Ubiquitine

Le génome humain code pour quatre formes de la protéine Ub qui seront libérées par des enzymes DUBs. Les gènes *UBA52* et *UBA80* codent pour une protéine d'ubiquitine qui sera attachée à la portion N-terminal de deux protéines ribosomales L40 et S27a respectivement. Les gènes *UBB* et *UBC* codent pour plusieurs copies de la protéine en chaîne linéaire (Komander et al., 2009). L'Ub est une petite protéine de 76 acides aminés (fig. 1.2). Elle est composée de cinq feuillets β avec sept tours renversés, d'une hélice α et d'une petite hélice. La protéine contient seize acides aminés hydrophobes. Les ponts hydrogènes intracellulaires permettent de stabiliser la structure et la rendent

résistante à la chaleur. Lorsque la protéine se lie à un substrat, il y a un changement de conformation médié par la leucine 8 située dans la première boucle de la protéine. Ce changement de conformation est important pour l'interaction Ub-protéine. L'Ub a deux surfaces qui sont importantes pour l'interaction avec les autres protéines. La première, composée des acides aminés L8, I44, V70 et H68 permet l'interaction avec le protéasome. La seconde, composée de Q2, F4 et T12 permet la liaison à d'autres protéines et au protéasome. Les deux résidus en C-terminal (G75-G76) sont très flexibles et permettent l'attachement de l'Ub sur une enzyme de la machinerie d'ubiquitination, un substrat ou sur une autre Ub (Callis, 2014).

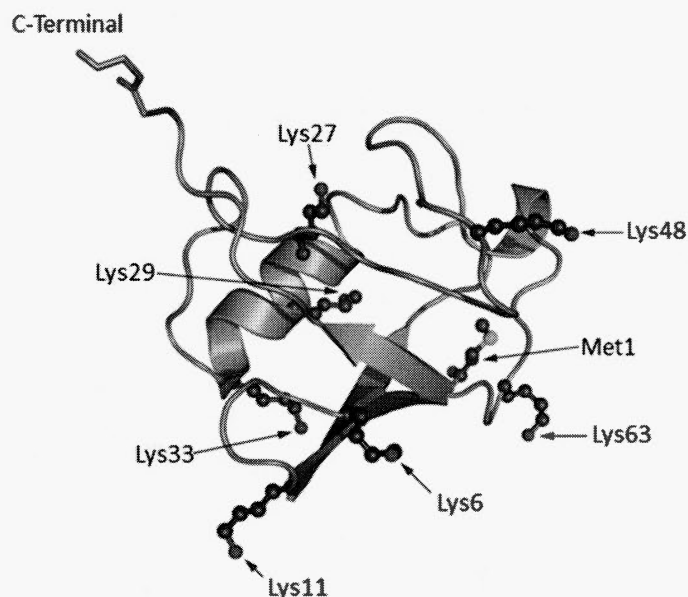


Figure 1.2. Structure de la protéine Ub. L'Ub est une petite protéine de 76 acides aminés ayant une structure globulaire. Elle possède un motif Gly-Gly en C-terminal, permettant son interaction avec les enzymes de l'Ub et le substrat. L'Ub peut se lier en chaîne via ses multiples lysines et la Met1. Figure adaptée de Komander (2009).

La liaison de l'Ub sur la lysine du substrat se fait via la glycine (G76) située à l'extrémité C-terminale de l'Ub. Lors de la poly-Ub, la G76 s'attache sur une des sept lysines positionnées au sein d'une autre molécule d'Ub. C'est de cette façon qu'il est possible d'obtenir des chaînes d'Ub (Callis, 2014). Les Ubs peuvent également

s'attacher via leur portion N-terminale (M1), ce qui forme une chaîne linéaire. La chaîne d'Ub peut également être formée à l'aide de plusieurs lysines sur des molécules différentes d'Ub (chaîne hétérogène). Il est également possible d'avoir des branchements, c'est-à-dire que sur une même molécule d'Ub, plus d'un site de lysine se lie avec une autre Ub (Komander, 2009).

1.2.2 Protéines Ubiquitine-like

Les protéines ubiquitine-like sont des protéines ayant une homologie de séquence avec l'Ub. Il existe plusieurs protéines de ce type qui sont codées par le génome humain. Parmi ces protéines, les deux plus connues sont SUMO et NEDD8. Ces deux protéines ont une structure similaire à l'Ub et possèdent les deux acides aminés Gly-Gly en C-terminal conférant une flexibilité de la queue et permettant leur attachement sur une autre protéine. Ces deux protéines possèdent également une structure globulaire (Kerscher et al., 2006). NEDD8 est la protéine ubiquitine-like ayant la plus grande homologie de séquence avec l'Ub à environ 76% (Whitby et al., 1998). SUMO possède environ 18% d'homologie de séquence avec l'ubiquitine (Wilson et Heaton, 2008). Comme l'Ub, ces deux protéines peuvent se lier en chaîne via leurs multiples lysines, bien que les fonctions associées à la formation des chaînes de ces deux protéines ne soient pas bien connues (Gareau et Lima, 2010; Rabut et Peter, 2008). Bien que ces deux protéines aient des similarités avec l'Ub, les enzymes impliquées dans les deux voies de signalisations ont des spécificités pour l'interaction avec chacune de ces protéines. En effet, la spécificité des enzymes impliqués dans la SUMOylation est dépendante du motif SIM (SUMO interaction motif) (Gareau et Lima, 2010). L'interaction des enzymes de NEDDylation avec NEDD8 est déterminée par le résidu Ala72 chez NEDD8 qui n'interfère pas avec un résidu basique d'UBA3, alors que l'interaction Ub-UBA3 est empêchée par la présence d'un résidu Arg72 chez l'Ub qui est bloqué par ce même résidu basique chez UBA3 (Souphron et al., 2008). De plus, l'interaction entre l'E1 et l'E2 UBE2M, enzyme de la NEDDylation, est possible par une extension unique de la portion N-terminale de la protéine (Huang et al., 2004).

1.3 Ubiquitination du substrat

Il existe plusieurs possibilités d'ubiquitination du substrat. Ces possibilités permettent d'engendrer différentes réponses dans la cellule. Il peut y avoir une mono-ubiquitination, une poly-ubiquitination (chaîne ou embranchement) ou encore une poly-monoubiquitination. Les possibilités de chaînes homotypiques sont: M1, K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63. Un branchement est lorsque plus qu'un site de lysine d'une molécule d'Ub est occupé par une autre Ub (Swatek et Komander, 2016) (fig. 1.3).

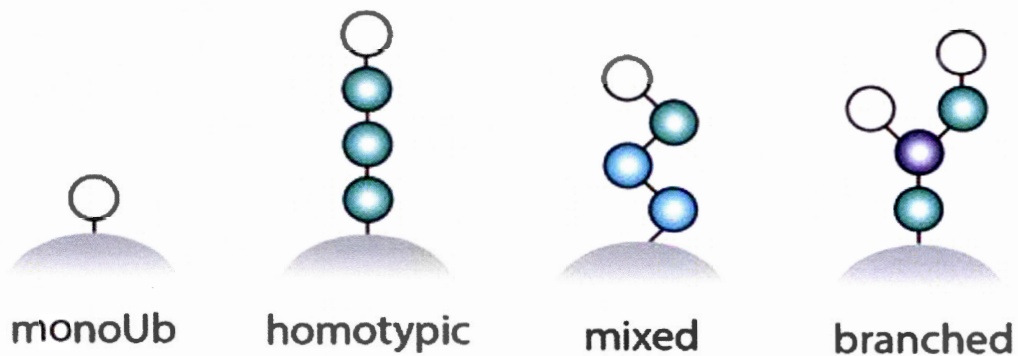


Figure 1.3. Modification du substrat par l'ubiquitination. Sur une lysine du substrat, il peut y avoir ajout d'une seule protéine Ub, nommé mono-ubiquitination ou ajout d'une chaîne d'Ub, nommé poly-ubiquitination, qui peut être homotypique, mixte ou embranché. Une chaîne homotypique indique que les ubiquitines sont enchaînées par l'intermédiaire d'une seule lysine. Une chaîne mixte indique que plus qu'une seule lysine permet de former la chaîne. Un embranchement est lorsqu'il y a formation d'une chaîne sur plus d'une lysine d'une même protéine ubiquitine. Figure adaptée de Swatek et Komander (2016).

La première fonction découverte de la voie d'ubiquitination est la dégradation au protéasome. La chaîne K48 est la plus répandue dans la cellule et elle est la première qui a été découverte comme étiquette pour la dégradation. La chaîne K11 joue un rôle dans la régulation du cycle cellulaire par le complexe APC/C (Anaphase promoting complexe/cyclosome) via l'UBE2 UBE2S (Wickliffe et al., 2011b). Par contre, la chaîne K11 seule n'est pas un bon substrat pour le protéasome, alors il a été démontré

que cette chaîne doit être couplée avec la chaîne K48 pour faire cette fonction. Finalement, la chaîne K29 médiée par la UBE3 ligase à domaine HECT KIAA10/UBE3C permet une association avec le protéasome 26S (Swatek et Komander, 2016).

Depuis, d'autres fonctions ont été associées avec les différentes chaînes d'Ub. L'endocytose, médiée par la mono-ubiquitination et les chaînes K63, est un exemple (Haglund et Dikic, 2005). En effet, l'UBE3 ligase Cbl fait une multi-ubiquitination du récepteur tyrosine kinase (RTK) une fois activée pour induire son endocytose et sa dégradation au protéasome (Haglund et al., 2003). La réparation de l'ADN est également contrôlée par la mono-ubiquitination et l'ubiquitination par chaîne K63 (Haglund et Dikic, 2005). Par exemple, la protéine FANCD2 (Fanconi anemia protein of subtype 2) ubiquitinée interagit avec la protéine suppresseuse de tumeur BRCA1 (breast cancer 1) pour permettre la réparation de l'ADN (Vandenberg et al., 2003). De plus, il a également été démontré que la protéine PCNA (proliferating cell nuclear antigen) est poly-ubiquitinée en chaîne K63 pour induire la réparation de l'ADN (Hoege et al., 2002). Dans le cas de la chaîne K33, celle-ci joue un rôle dans le routage des protéines par le réseau trans-Golgien (Swatek et Komander, 2016). Par exemple, la poly-ubiquitination de la protéine Crn7 (Coronin7) par l'UBE3 ligase Cullin-3 permet le recrutement de Crn7 dans le réseau trans-Golgien (Yuan et al., 2014). Les chaînes M1 et K63 jouent un rôle dans l'activation de NF- κ B (Swatek et Komander, 2016). Par exemple, le domaine UBAN (ubiquitin binding in ABIN and NEMO) de la protéine NEMO, qui fait partie du complexe IKK (inhibitor-of- κ B kinase), reconnaît la chaîne linéaire d'ubiquitine M1 sur NF- κ B pour activer NF- κ B (Rahighi et al., 2009). La même protéine peut également être ubiquitinée en chaîne K63 et en chaîne mixte M1/K63. Les chaînes K6 et K63 jouent un rôle dans la mitophagie médiée par Parkin. En effet, PINK1, une kinase, est accumulée lorsqu'il y a un dérèglement de la mitochondrie. Cette protéine phosphoryle l'Ub, permettant le recrutement de Parkin à la mitochondrie. Il y a ensuite phosphorylation de Parkin pour permettre son activation.

Parkin activée ubiquitine USP30 permettant le recrutement de NDP52 et d'OPTN pour induire la mitophagie. Les chaînes K6 et K33 jouent un rôle dans la réponse au stress causé par les rayons UV sur l'ADN (Swatek et Komander, 2016). Par exemple, le complexe UBE3 ligase BRCA1/BARD1 fait les deux types de chaînes suite à ce stress génotypique (Morris et Solomon, 2004). Finalement, la chaîne K27 permet le recrutement de protéines. En effet, l'ubiquitination de l'histone H2A et H2A.X par UBE3 ligase à domaine RING RNF168 permet le recrutement de la protéine 53BP1 (p53 binding protein 1) à l'ADN endommagé pour induire la réparation de l'ADN (Gatti et al., 2015).

1.4 Enzymes de l'ubiquitination

1.4.1 UBE1

L'UBE1 est la première enzyme de la cascade enzymatique de l'ubiquitination et elle est appelée l'enzyme activatrice de l'Ub. En cellule, cette enzyme coexiste dans un complexe UBE1-ATP-Ub. Le mécanisme d'interaction entre l'UBE1 et l'Ub est, dans un premier temps, une adénylation suivie d'une liaison thioester entre le résidu C-terminal de l'Ub et un résidu cystéine de l'UBE1. En premier lieu, l'UBE1 se lie à l'ATP, qui sera hydrolysée en AMP par l'UBE1, ce qui permet la liaison de l'UBE1 à la portion C-terminale de l'Ub (Callis, 2014). Ceci forme une Ub adénylée qui se lie de façon non covalente au domaine pseudo-dimérique d'adénylation de l'UBE1. Cette liaison provoque une rotation de 130° du domaine Cys pour positionner ce domaine à proximité de la portion C-terminale de l'Ub. Le domaine Cys est l'endroit où est situé la cystéine active permettant la liaison covalente à l'Ub par un lien thioester. C'est à ce moment qu'il y a formation du lien thioester entre l'Ub et l'UBE1. Après, l'UBE1 retourne à sa conformation initiale pour faire une autre adénylation. Le domaine Ub-fold (UFD) permet le recrutement de l'UBE2 pour que l'UBE1 puisse transférer l'Ub à l'UBE2 par un mécanisme de transthiolation. Lorsque les deux sites, d'adénylation

et de thioester sont occupés, il y a un meilleur recrutement de l'UBE2 (Olsen et Lima, 2013).

1.4.2 UBE2

L'UBE2 est la seconde enzyme impliquée dans la voie de signalisation de l'ubiquitination et elle est aussi appelée l'enzyme conjugatrice de l'Ub. Dans le génome humain, il existe environ une quarantaine d'UBE2 impliquée dans cette voie ou encore dans d'autres voies de signalisation faisant appel à des protéines Ub-like (ex.: SUMO, NEDD8). Ces enzymes UBE2 n'ont qu'un seul domaine catalytique, UBC, qui permet de faire une transthiolation, soit le transfert de l'Ub de UBE1 à UBE2, et le transfert de l'Ub de UBE2 à l'UBE3 à domaine HECT. Ce même domaine permet aussi le transfert de l'Ub sur le substrat par un processus de transthiolation appelé aminolyse. Ce domaine UBC, d'environ 150 acides aminés, est composé de quatre hélices α et de quatre feuillets β (Stewart et al., 2016).

Il existe plusieurs types d'UBE2 qui diffèrent par leurs caractéristiques. Par exemple, l'UBE2L3 transfère l'Ub sur une cystéine au lieu d'une lysine, indiquant que cette enzyme ne peut qu'interagir de façon fonctionnelle avec une UBE3 à domaine HECT ou une UBE3 de type RBR tel que Parkin et HHARI (Wenzel et al., 2011a). L'étude de Wang et al. (2007) a démontré qu'UBE2J2 effectue le transfert d'Ub sur un groupement hydroxyle (sérine ou thréonine) du complexe majeur d'histocompatibilité à l'aide de l'UBE3 ligase virale à domaine RING, murine K3. L'UBE2W est particulière, car elle ne peut que transférer l'Ub sur la portion N-terminale désordonnée d'un substrat. En effet, Scaglione et al. (2013) ont démontré qu'UBE2W permet l'ubiquitination d'ataxin-3 même lorsque toutes les lysines du substrat sont mutées par une arginine. La raison de cette spécificité est que la portion C-terminale de son domaine UBC est désordonnée et dynamique. Étant donné que la portion N-terminale de l'Ub est ordonnée, UBE2W ne peut que faire une mono-ubiquitination. La mono-ubiquitination peut être exploitée par d'autres UBE2s permettant la formation d'une

chaîne d'Ub sur la première Ub ajoutée par UBE2W (Christensen et al., 2007). Les UBE2s qui peuvent former des chaînes d'Ub vont utiliser des mécanismes propres à chacune des enzymes (Stewart et al., 2016). Par exemple, l'étude de cristallographie d'Eddins et al. (2006) a démontré qu'UBE2N, une enzyme spécifique à la formation de chaîne K63, utilise l'aide d'un de ses cofacteurs, UBE2V1 ou UBE2V2 qui positionne l'Ub sur le substrat pour rendre disponible la K63 au sein de la molécule d'Ub. De plus, une étude cristallographique par Middleton et Day (2015) indique qu'UBE2K, une enzyme spécifique à la formation d'une chaîne K48, utilise les acides aminés proches du site actif de l'UBE2 qui interagissent avec une tyrosine à proximité de la K48 de l'Ub sur le substrat pour faire l'élongation de la chaîne. Un autre exemple est l'UBE2S qui utilise des résidus acides dans la dernière hélice de son domaine UBC afin de former une chaîne K11 (Wickliffe et al., 2011a). La famille des UBE2D est très réactive et peut former n'importe quel type de chaîne. Les enzymes UBE2N, UBE2S et UBE2R1 ne sont pas capables de lier directement une Ub sur le substrat. Elles ont besoin d'une autre UBE2 qui installe la première Ub (Stewart et al., 2016). En effet, des études ont fait un essai d'ubiquitination *in vitro* avec les UBE3s BRCA1 (Christensen et al., 2007), CHIP et TRAF6 (Windheim et al., 2008) et les UBE2s, UBE2N et UBE2V1. Celles-ci ont démontré que ces UBE2s ne pouvaient lier une chaîne d'Ub lorsqu'elles interagissaient seules avec l'UBE3 (Christensen et al., 2007; Windheim et al., 2008).

1.4.3 UBE3

L'UBE3 est la dernière enzyme impliquée dans la voie de signalisation de l'ubiquitination et elle est appelée l'enzyme ligase. À ce jour, quatre classes d'UBE3 ont été caractérisées: HECT, RING, RING-IBR-RING (RBR) (Zheng et Shabek, 2017) et U-BOX (Hatakeyama et al., 2001).

Il existe environ une trentaine d'UBE3 à domaine HECT (Homologous to E6-AP C-Terminus) codée par le génome humain (Rotin et Kumar, 2009). Le domaine HECT,

constitué d'environ 350 acides aminés est situé dans la portion C-terminale de l'enzyme. Ce domaine est séparé en deux sous-unités. La sous-unité N-terminale permet l'interaction avec l'UBE2. La portion C-terminale du domaine est l'endroit où il y a le site actif contenant la cystéine permettant de former le lien thioester avec l'Ub (Huang et al., 1999). Lors de l'interaction avec l'UBE2, la partie C-terminale du domaine HECT se rapproche pour permettre le transfert de l'Ub (Ogunjimi et al., 2005). Le type de chaîne d'Ub formé par cette UBE3 est dépendant des soixante derniers acides aminés de la portion C-terminale du domaine HECT (Kim et Huibregtse, 2009). La portion N-terminale de la protéine permet de cibler les substrats.

Les UBE3 à domaine RING (Really Interesting New Gene) sont les plus abondantes du génome humain avec environ 600 enzymes. Ce domaine a un motif à doigt de zinc nécessite la liaison de deux ions de zinc pour permettre la stabilité de la structure. La coordination du zinc se fait avec des résidus cystéines et histidines espacés pour former une structure en forme de croix (Metzger et al., 2012). Le domaine RING est classé en trois sous-groupes selon la position des histidines et des cystéines permettant la coordination du zinc. Le sous-groupe RING-H2 possède deux histidines à la position trois et quatre dans le domaine alors que le sous-groupe RING-HC possède une histidine à la position trois et une cystéine à la position quatre et le sous-groupe RING-CH contient une cystéine à la position trois et une histidine à la position quatre (fig. 1.4) (Nakamura, 2011). La liaison au domaine UBC de l'UBE2 par le domaine RING est possible grâce à l'hélice α centrale de l'UBE3. Il existe des UBE3s à domaine RING qui se lient à l'UBE2 par l'intermédiaire d'un autre domaine de liaison à UBC (Metzger et al., 2014).

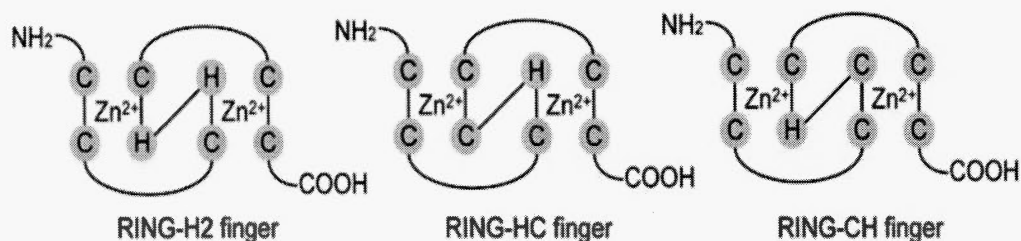


Figure 1.4. Les trois types de domaine RING. Le domaine RING est classé en trois sous-groupes selon la position des histidines et des cystéines permettant la coordination du zinc. Le sous-groupe RING-H2 possède deux histidines à la position trois et quatre dans le domaine alors que le sous-groupe RING-HC possède une histidine à la position trois et une cystéine à la position quatre et le sous-groupe RING-CH contient une cystéine à la position trois et une histidine à la position quatre. Figure adaptée de Nakamura (2011).

Les UBE3s à domaine RING peuvent fonctionner en monomère, en dimère ou encore en complexe. Lors de la dimérisation, il peut y avoir une homodimérisation ou une hétérodimérisation. Lors de l'hétérodimérisation, une des deux enzymes n'est pas active et va plutôt permettre de stabiliser l'interaction avec l'UBE2 (Metzger et al., 2012). Par exemple, dans l'hétéromère formé par BRCA1-BARD1, l'UBE3 qui interagit avec l'UBE2 et celui qui est actif est BRCA1 alors que BARD1 permet la stabilisation du complexe BRCA1-UBE2 *in vivo* (Joukov et al., 2001). Dans l'hétéromère Mdm2-MdmX, l'UBE3 Mdm2 est active et peut faire sa fonction d'UBE3 ligase seule ou en homodimère *in vitro*. MdmX est inactive et ne peut fonctionner en homodimère, mais elle permet la stabilisation de la liaison du complexe Mdm2-MdmX à l'UBE2 et au substrat (Uldrijan et al., 2007). Lors de l'homodimérisation, les deux UBE3s peuvent se lier aux UBE2s. Des exemples d'homodimères sont RNF4, BIRC7 et CHIP (protéine ayant un domaine U-BOX). Comme les UBE3s à domaine RING, les UBE3s ayant un domaine U-BOX interagissent avec le complexe UBE2-Ub et agit en tant que pont de liaison entre l'UBE2 et le substrat. Le domaine U-BOX de ces UBE3s ne coordonne pas d'ion de zinc, ce qui différencie ces enzymes des UBE3s à domaine RING. Par contre la structure tertiaire du domaine est similaire au domaine RING pour l'interaction avec l'UBE2 (Metzger et al., 2014). Une étude d'Hatakeyama et al. (2001) indique qu'une

UBE3s à domaine U-BOX, UFD2a, peut également interagir avec une protéine Ub sur un substrat permettant de faciliter l'élongation d'une chaîne d'Ub.

La classe d'UBE3 la plus récente, la RBR (RING-IBR-RING), est un hybride des UBE3s à domaine RING et HECT (Wenzel et al., 2011a). Jusqu'à ce jour, il existe environ une dizaine de ce type d'UBE3 (Spratt et al., 2014) dont Parkin qui est l'un des membres les plus connus (Wenzel et al., 2011a). Cette enzyme comporte deux domaines RING, RING1 et RING2 et un autre segment entre les deux RING qui coordonne des ions de zinc (Zheng et al., 2000). Le domaine RING1 est le domaine de liaison à l'UBE2 alors que le domaine RING2 est celui où il y a la cystéine active pour permettre la liaison à l'Ub. La régulation de l'activité ligase de la protéine se fait via la portion C ou N-terminale, dépendamment de l'enzyme. Le type de chaîne que formera l'enzyme est caractérisé par le domaine catalytique, RING2. L'hélice α de la région C-terminale du domaine RING2 dirige l'orientation de l'Ub sur le substrat (Zheng et Shabek, 2017).

1.5 UBE3 à domaine RING transmembranaire

1.5.1 Particularités

Jusqu'à ce jour, il existe 49 UBE3 à domaine RING connues qui contiennent un domaine transmembranaire. Il existe trois grandes familles d'UBE3s transmembranaires à domaine RING dont la famille TRIM (tripartite motif-containing), la famille PA-TM-RING et la famille MARCH (membrane-associated RING-CH). La structure de la famille TRIM est caractérisée par la présence d'un domaine RING-HC, d'un ou de plusieurs domaines B-BOX et une région super-hélice. Le domaine B-BOX a des similarités de structure avec le domaine RING par la coordination de deux ions de zinc. Le domaine super hélice est important pour la localisation subcellulaire de l'enzyme et permet la formation d'oligomère de celle-ci. La structure de la famille PA-TM-RING est composée d'un domaine PA (association aux protéases), d'un domaine transmembranaire (Westmark et al.) et d'un domaine

RING-H2. La plupart des protéines dans cette famille possèdent un signal peptide dans la portion N-terminale de la protéine. Le domaine PA est localisé dans le compartiment extracellulaire ou dans le lumen et est impliqué dans les interactions protéines-protéines. Par exemple, il a été démontré par Su et al. (2009) que le domaine PA de l'UBE3 GRAIL (Gene Related to Anergy In Lymphocytes) permet de reconnaître et d'interagir avec son substrat CD83. La structure de la famille MARCH est composée de domaines transmembranaires et d'un domaine RING-CH. Certaines UBE3s de cette famille, tel que MARCH4, MARCH9 et MARCH11 possèdent une séquence C-terminal riche en proline, impliqué dans les interactions protéine-protéine (Nakamura, 2011).

Les UBE3s RING à domaine transmembranaire sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires, tels que la dégradation des protéines dans le réticulum endoplasmique (ER), la prolifération cellulaire et la différenciation, l'apoptose et l'endocytose des protéines membranaires (Nakamura, 2011). Par exemple, l'UBE3 ligase RNF170 permet la régulation de la signalisation du calcium via l'induction de la dégradation d'IP₃R (récepteur inositol triphosphate) pour cibler le récepteur dans la voie ERAD (ER-associated degradation) (Lu et al., 2011). Ensuite, l'enzyme RNF13 est impliquée dans la différenciation cellulaire en contribuant à la myogenèse en régulant de manière négative la prolifération cellulaire (Bocock et al., 2009). Joo et al. (2011) ont démontré que l'UBE3 RFP2 permet l'induction de l'apoptose induite par les rayons UV chez les cellules HEK293 en induisant l'ubiquitination de protéines anti-apoptotiques, la kinase Akt et l'UBE3 Mdm2, entraînant leur dégradation. L'ubiquitination de Mdm2 stabilise p53 et l'ubiquitination d'Akt inhibe la signalisation anti-apoptotique. Les enzymes MARCH4 et MARCH9 sont impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire par la régulation négative des protéines MHC I, CD4, ICAM-1 et Mult1 (Nakamura, 2011). L'activité de MARCH4 induit l'ubiquitination en chaîne K63 de CD4, entraînant une dégradation au niveau des

lysosomes (Barriere et al., 2007). L'activité de MARCH8 induit la dégradation lysosomale des protéines CD44 et CD98 (Eyster et al., 2011).

1.5.2 RNF167

RNF167 est une UBE3 à domaine RING-H2 faisant partie de la famille PA-TM-RING. Le domaine RING est situé dans la portion C-terminale de la protéine. Cette enzyme fait partie d'une des 49 UBE3s ligase à domaine RING ayant un domaine transmembranaire au sein du génome et une des 5 UBE3s qui sont localisées aux endosomes. Elle contient également un signal peptide pour permettre son acheminement à la membrane plasmique (Lussier et al., 2012). La protéine aurait également un domaine de liaison aux protéases (PA-domain) impliqué dans les interactions protéine-protéine. van Dijk et al. (2014) ont identifié une mutation au niveau de ce domaine pouvant être la cause de tumeur, ce qui suggère un rôle de suppresseur de tumeur pour RNF167. De plus, cette même étude a déterminé que le domaine PA joue un rôle dans la localisation de la protéine aux endosomes (van Dijk et al., 2014). RNF167 possède deux sites de glycosylation situés dans le PA-domain, N33 et N79, qui pourraient empêcher la dégradation de la protéine dans les lysosomes. RNF167 joue un rôle dans la dégradation des AMPARs via leur endocytose et leur dégradation dans les lysosomes (Lussier et al., 2012). De plus, il a été démontré que RNF167 peut également entraîner l'ubiquitination de la protéine SNARE Vamp3, ce qui empêcherait la fusion des endosomes à la membrane plasmique (Yamazaki et al., 2013). RNF167 joue également un rôle dans l'ubiquitination d'une protéine suppresseuse de tumeur, TSSC5 (Yamada et Gorbisky, 2006). Finalement, RNF167 est impliquée dans la distribution subcellulaire des endosomes en contrôlant l'abondance de la protéine Arl8B. Arl8B lie la kinésine KIF5B (plus-end motor kinesin-1) pour réguler le transport antérograde (Deshar et al., 2016), qui est le mouvement des lysosomes vers la portion positive des microtubules (Pu et al., 2016).

1.6 Interaction UBE2-UBE3 à domaine RING

L'interaction entre ces deux protéines a une faible affinité, de l'ordre des μM (Buetow et al., 2015), ce qui rend difficile la co-purification (Stewart et al., 2016). Au niveau du domaine UBC de l'UBE2, la liaison avec l'UBE3 s'effectue via les résidus dans l'hélice α 1 et les boucles 4 et 7. L'interaction se fait lorsque l'UBE2 est couplée avec l'Ub. Sans l'UBE3, le complexe UBE2-Ub est en conformation ouverte. Lorsque l'UBE2 se lie au domaine RING de l'UBE3, le complexe subit un changement de conformation pour être en conformation fermée. Ceci implique que l'Ub se rapproche de l'UBE2 par des interactions avec la pochette hydrophobe proche du résidu I44 de l'Ub et les résidus dans l'hélice α au-dessus des feuillets β dans le domaine UBC de l'UBE2. L'état fermé est l'état actif pour produire une aminolyse (Stewart et al., 2016). Ceci est possible grâce à un résidu arginine en dehors du domaine RING de l'UBE3 permettant la liaison UBE2-UBE3-Ub et donnant la conformation fermé du complexe UBE2-Ub. Ce mécanisme a tout d'abord été caractérisé avec une UBE3 en forme d'homodimère, RNF4 (Zheng et Shabek, 2017) et le même mécanisme a été démontré chez une UBE3 interagissant en monomère, CBL-B (Dou et al., 2013). Un résidu conservé, soit une arginine, une lysine ou une asparagine, dans le domaine RING des UBE3s forme un lien hydrogène avec un groupement carbonyle de la boucle 7 de l'Ub et à d'autres groupements dans la queue de l'Ub. Ceci permet le positionnement de la queue C-terminale de l'Ub pour une attaque nucléophile de la lysine cible sur le substrat (fig. 1.5) (Stewart et al., 2016). La faible affinité d'interaction entre l'UBE3 et l'UBE2 est un mécanisme employé pour faire des élongations de chaîne d'ubiquitine, par exemple, en alternant la liaison de plusieurs UBE2s avec le domaine RING de l'UBE3 (Zheng et Shabek, 2017).

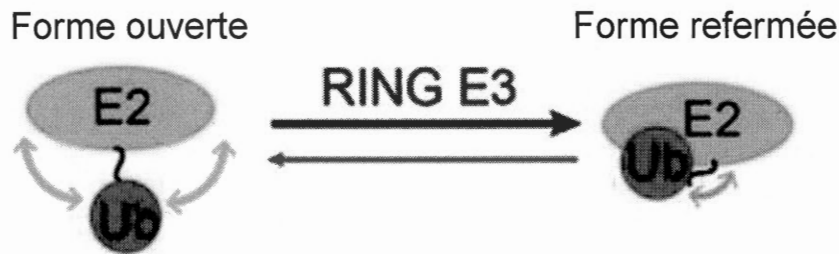


Figure 1.5. Activation du complexe UBE2-Ub par une UBE3 à domaine RING. Sans l'UBE3 à domaine RING, le complexe UBE2-Ub est sous la forme ouverte, qui est la forme inactive pour l'ubiquitination du substrat. L'UBE3 à domaine RING permet d'activer le complexe en stabilisant une forme refermée du complexe UBE2-Ub. Figure adaptée de Stewart et al. (2012).

1.7 Contexte de l'étude

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle qui joue un rôle important dans le cerveau pour réguler l'expression de protéines. Entre autres, cette modification permet le développement des synapses, le contrôle du relâchement des neurotransmetteurs et la plasticité neuronale par le changement d'expression de récepteurs dans le PSD (post-synaptic density) (Jiang et al., 2006). Par exemple, la protéine PSD-95, qui permet la stabilisation des récepteurs du glutamate, NMDAR (N-méthyl-D-aspartate) et AMPAR (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionic acid) (Chen et al., 2011), est ubiquitinée. Cette ubiquitination a pour effet de diminuer l'expression de ces récepteurs au PSD (Jiang et al., 2006). L'ubiquitination des AMPARs permet la régulation de la mémoire par le processus de plasticité neuronale (Mabb et Ehlers, 2010). Les récepteurs ionotropiques du glutamate, AMPA et NMDA jouent un rôle au niveau de l'apparition de nouvelles mémoires. En effet, lorsqu'il y a une LTP (long term potentiation), il y a une augmentation de l'expression des AMPARs à un certain nombre de synapses. L'activation des AMPARs médie l'influx d'ions sodium qui permet une dépolarisation de la membrane et l'activation des NMDARs permettant l'influx de calcium. La dépolarisation du neurone et la stimulation des NMDARs permettent la formation de nouvelles mémoires.

L'influx des ions calcium active la CaMKII qui phosphoryle la sous-unité GluA1 du récepteur AMPA. Cela augmente la conductance et la probabilité d'ouverture de la sous-unité. La phosphorylation de GluA1 par la PKC est aussi importante pour l'induction de la LTP. Les synapses qui ne contiennent pas d'AMPARs sont dites silencieuses (Chater et Goda, 2014)

Les AMPARs sont formés de quatre sous-unités homologues soient GluA1 à GluA4. (Traynelis et al., 2010). Une étude de Widagdo et al. (2015) a démontré que les AMPARs sont ubiquitinés en chaîne K63 au niveau des endosomes. De plus, cette même étude a établi que les sous-unités GluA1 à GluA4 peuvent se faire ubiquitiner (Widagdo et al., 2015).

Il existe quatre UBE3s connues comme ayant un rôle dans l'ubiquitination des AMPARs. La Nedd4-1 est une UBE3 ligase à domaine HECT (Homologous to E6-AP C-Terminus). L'enzyme Nedd4-1 localise aux synapses suite à l'activation des AMPARs. Il faut que le domaine C2 de l'enzyme soit fonctionnel, ce qui va permettre la liaison calcium-dépendante aux phospholipides. La Nedd4-2, une autre UBE3 ligase à domaine HECT, a besoin d'être liée à la protéine adaptative 14-3-3ε afin d'ubiquitiner la sous-unité GluA1 (Widagdo et al., 2017). RNF167 est une UBE3 à domaine RING (Really Interesting New Gene) qui est localisée au niveau de la membrane plasmique, des endosomes et des lysosomes. Il a été démontré qu'une perte de la fonction de cette enzyme augmente significativement le niveau d'expression membranaire de la sous-unité GluA2 (Lussier et al., 2012; Widagdo et al., 2017). L'UBE3 ligase à domaine RING, APC11 associé à la sous-unité catalytique du complexe promoteur d'anaphase APC^{Cdh1} est la quatrième UBE3 impliquée dans l'ubiquitination des AMPARs. La Cdh1 est l'activateur du complexe. La Cdh1 se lie, via son domaine WS40 au motif Dbox du domaine N-terminal de GluA1, ce qui permet l'ubiquitination de la sous-unité. Par contre, lorsqu'il y a une diminution de l'expression du complexe APC, il n'y a pas de changement de l'expression du récepteur. Conséquemment, l'hypothèse est plutôt que

APC^{Cdh1} serait impliqué dans l'ubiquitination d'autres protéines impliquées dans le recyclage des AMPARs, ce qui entraînerait leur dégradation (Widagdo et al., 2017).

1.8 Problématique et objectifs

La voie de l'ubiquitination au niveau de la portion pré et post-synaptique d'un neurone joue un rôle important dans la plasticité neuronale, définie par un changement dans l'expression de récepteurs à la membrane post-synaptique. Le récepteur AMPA est un exemple de récepteur dont l'expression est régulée par l'ubiquitination. RNF167 est une des UBE3s responsables de l'ubiquitination des AMPARs suite à l'endocytose du récepteur, ce qui mène à sa dégradation au niveau des lysosomes. Étant donné que RNF167 est une UBE3 à domaine RING, ce n'est pas cette enzyme qui est responsable de l'ajout de l'ubiquitine sur le substrat. En effet, RNF167 agit en tant que pont de liaison entre l'UBE2 et le récepteur. Jusqu'à présent, l'UBE2, interagissant avec RNF167 et permettant l'ubiquitination des AMPARs, n'est pas connue.

Le but principal de cette étude est de caractériser l'interaction entre RNF167 et les UBE2s pour tenter de trouver l'UBE2 responsable de l'ubiquitination des AMPARs. Pour ce faire, les sous-objectifs suivants ont été réalisés :

- Purification d'une forme recombinante de RNF167,
- Détermination des UBE2s qui interagissent de façon fonctionnelle avec RNF167,
- Caractérisation de l'interaction entre RNF167 et UBE2N :
 - Confirmation de leur interaction par des essais in vitro,
 - Détermination de la cinétique de liaison entre ces deux protéines,
 - Caractérisation de la localisation par immunofluorescence et par fractionnement subcellulaire d'un cortex de souris.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Anticorps

La description des anticorps utilisés est indiquée dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1. Description des anticorps utilisés lors des essais d'immunobuvardage et d'immunofluorescence.

Anticorps	Compagnie	Clone	Numéro de catalogue	Animal	Dilution
anti-HA.11	Biologend	16B12	901502	Souris	1/1000
anti-GFP	Life Technologies		A6455	Lapin	1/1000
anti-RNF167	Voir Lussier et al., 2012			Lapin	1/500
anti-UBC13	BioRad	polyclonal	VPA00090KT	Lapin	1/1000
anti-Uev1a	BioRad	polyclonal	VPA00598KT	Lapin	1/1000
anti-UBE2V2	BioRad	polyclonal	VPA00672KT	Lapin	1/1000
anti-PSD95	Cell Signaling Technology	D27E11	3450	Lapin	1/1000
anti-GluN1	Cell Signaling Technology	D65B7	5704	Lapin	1/1000
anti-synaptophysin	Cell Signaling Technology	D35E4	5461	Lapin	1/1000
anti-GFAP	Santa Cruz	polyclonal	Sc-6170	Chèvre	1/1000
anti-Histone H3	Cell Signaling Technology	D1H2	4499	Lapin	1/1000
anti-mouse Alexa Fluor 568	Life Technologies	polyclonal	A11019	Chèvre	1/1000
anti-mouse HRP-linked	Cell Signaling Technology	polyclonal	7074	Cheval	1/10000
anti-rabbit HRP-linked	Cell Signaling Technology	polyclonal	7076	Chèvre	1/10000
anti-goat HRP-linked	-	polyclonal	-	Souris	1/10000

2.2 Constructions plasmidiques

L'ADN codant pour RNF167-HA (a.a.195-350) a été optimisé pour expression dans les bactéries, synthétisé à GenScript puis cloné dans pGEX-4T-1 (Annexe A). L'ADN codant pour HA-RNF167-6xHis (a.a. 195-350) a été synthétisé puis cloné dans le plasmide pET-52B(+) (GenScript) (Annexe B). L'ADN codant pour 6xHis-UBE2N a été synthétisé puis cloné dans le plasmide pET-17b (GenScript) (Annexe C). L'ADN codant pour UBE2N a été excisé du plasmide pET-17b-6xHis-UBE2N (avec BamHI et EcoRI) et inséré dans les plasmides pGEX-4T-1 (GE Healthcare) (Annexe A) par les sites BamHI et EcoRI (Annexe E) et pEGFP-C1 (Clontech) (Annexe D) par les sites BglII et EcoRI (Annexe E). L'ADN codant pour HA-RNF167-6xHis a été excisé du plasmide pET-52b(+) (avec BamHI et Sall) et inséré dans le plasmide pGEX-4T-1 (GE Healthcare) (Annexe A) par les sites BamHI et Sall (Annexe F).

2.3 Purification

2.3.1 Transformation bactérienne

Les bactéries *E. coli* BL21 (DE3) gold (Agilent technologies) ont été utilisées pour l'expression de protéines. Les bactéries *E. coli* DH5 α (Invitrogen) ont été utilisées pour l'extraction des plasmides. 10 μ L de bactéries compétentes ont été incubés sur glace avec 1 μ L d'ADN plasmidique pendant 30 minutes, suivi de 45 secondes à 42°C et d'une incubation de 2 minutes sur glace. 200 μ L de milieu LB (10 g/L NaCl, 10 g/L peptone et 5 g/L extrait de levure) ont été ajoutés en condition stérile et les bactéries ont été incubées à 37°C avec légère agitation pendant 30 minutes. Selon le plasmide, 50 μ L et 150 μ L ont été mis sur un pétri LB-Agar-Amp (10 g/L NaCl, 10 g/L peptone, 5 g/L extrait de levure, 15 g/L Agar et 100 μ g/mL ampicilline) ou LB-Agar-Kan (10 g/L NaCl, 10 g/L peptone, 5 g/L extrait de levure, 15 g/L Agar et 50 μ g/mL kanamycine) en condition stérile. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 16h, utilisées immédiatement ou scellées et rangées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

2.3.2 Amplification d'ADN plasmidique (Midi Prep)

Une colonie de bactéries *E. coli* DH5 α (Invitrogen) transformées a été prélevée et cultivée dans 100 mL de milieu de culture LB-Amp (10 g/L NaCl, 10 g/L peptone, 5 g/L extrait de levure et 100 μ g/mL ampicilline) ou LB-Kan (10 g/L NaCl, 10 g/L peptone, 5 g/L extrait de levure, et 50 μ g/mL kanamycine) pendant 16h à 200 rpm et 37°C. Le Genopure Plasmid Midi Kit (Roche) a été utilisé pour l'extraction et la purification des plasmides. Les culots ont été séchés pendant 16h avant d'être solubilisés dans 20 à 50 μ L tampon TE (10 mM Tris/HCl pH 8.0 et 1 mM EDTA). La quantification des plasmides a été faite à l'aide du NanoDrop (Thermo Scientific).

2.3.3 Optimisation expression des protéines dans les bactéries

Une colonie de bactéries a été inoculée dans 20 mL de milieu LB-Amp. La croissance s'est effectuée pendant 16h à 200 rpm à 37°C. La culture a été transférée dans 200 mL LB-Amp et les bactéries ont poussé jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm équivalente à 0.6. 5 mL de bactérie a été utilisée pour faire les tests d'induction. Pour l'optimisation de l'expression de **GST-RNF167-HA**, la condition de référence était une induction de 2h, 0.1 mM IPTG, 30°C et 1 μ M ZnCl₂. Le temps (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4h), la température (23, 30 et 37°C), la concentration d'IPTG (0, 0.03, 0.1, 0.3, 1 mM à 23 et 30°C) et la concentration en ZnCl₂ (0, 0.03, 0.1, 0.3 et 1 μ M) ont été testés. Les bactéries ont été culotées en centrifugeant à 3000 x g pendant 20 minutes à 4°C. Les culots de bactéries ont été lysés dans un volume équivalent à 1/10 du volume de culture dans du tampon de lyse GST (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM DTT et 1mM PMSF). Le lysat a été agité 20 minutes, 4°C, 15 tours/minutes. Le lysat total de protéines a été récupéré dans le surnageant à la suite d'une centrifugation de 30 minutes, 16000 x g à 4°C. La résine d'affinité Glutathione Sepharose (GE Healthcare) a été équilibrée à 5 reprises avec du tampon de lyse GST et culotée en centrifugeant pendant 1 minute, 376 x g à 4°C. Les lysats de protéines ont été incubés avec la résine pré-équilibrée pendant 1 heure à 4°C, 15 tours/minutes.

La résine a été lavée à 5 reprises avec du tampon de lyse GST et culotées en centrifugeant pendant 1 minute, 376 g à 4°C. Un volume équivalent au volume de résine de tampon GST a été ajouté. Les protéines purifiées et immobilisées sur la résine ont été éluées avec un volume équivalent au volume de liquide avec du tampon de chargement Laemmli 2x (100 mM Tris/HCl pH 6.8, 20% glycérol, 2% SDS, 0.2% bleu de bromophénol et 10% β -mercaptoéthanol). 20 μ L de l'élué a été chargé sur un gel SDS-PAGE 10%. Après la migration, les gels ont été lavés 3x 5 minutes avec de l'eau nanopure et les protéines ont été révélées avec le colorant Gel Code Blue (ThermoScientific) pendant 16h. La décoloration du gel a été effectuée 3x 5 minutes avec de l'eau nanopure. La photo a été prise avec l'appareil ChemiDoc MP (BioRad).

Pour l'optimisation de l'expression de **HA-RNF167-6xHis**, les bactéries ont été mises en culture comme décrit plus haut. Les paramètres d'induction de références étaient d'utiliser une concentration d'IPTG à 0.5 mM avec une concentration de ZnCl₂ de 1 μ M pendant 2h à 30°C. Le temps (1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4h), la température (23, 30 et 37°C), la concentration d'IPTG (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1 et 2 mM) et la concentration en ZnCl₂ (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1 et 2 μ M) a été testé. Les bactéries exprimant la protéine d'intérêt ont été recueillies par centrifugation à 3000 x g pendant 20 minutes à 4°C. Les culots de bactéries ont été lysés dans 1/10 du volume de culture avec un tampon de lyse (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.5 mM DTT et 1mM PMSF). Le lysat a été incubé pendant 20 minutes, 4°C, 15 tours/minute. Le lysat total de protéines a été obtenu dans le surnageant suivant une centrifugation pendant 30 minutes, 16000 x g à 4°C. La concentration en protéine a été déterminée à l'aide du PierceTMBCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, #23227). Une courbe standard de BSA de 0 à 2000 μ g/mL a été réalisée. La microplaque a été incubée à 37°C pendant 30 minutes suivi de 5 minutes à température pièce. La microplaque a été lue à l'aide du lecteur à microplaque (Molecular Devices) à 562 nm. 5 μ g de protéines totales a été chargé sur un gel SDS-PAGE 12% et un immunobuvardage anti-HA a été réalisé. Les protéines

HA-RNF167-6xHis ont été révélées à l'aide du Clarity Western ECL Substrate (BioRad) et à l'aide du ChemiDoc MP (BioRad).

2.3.4 Expression des protéines et extraction

Une colonie de bactéries transformées par le vecteur pGEX-4T-1 RNF167-HA a été prélevée pour inoculer 200 mL de milieu LB-Amp (10 g/L NaCl, 10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract et 100 µg/mL ampicilline) et incubée 16h, 200 rpm, 37°C. La pré-culture a été transférée dans 1500 mL LB-Amp et les bactéries ont poussé jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm équivalente à 0.6. L'expression de la protéine **GST-RNF167-HA** a été induite à 30°C, 2h, avec 0.1 mM IPTG et 1 µM ZnCl₂. Les bactéries ont été culotées en centrifugeant à 3000 x g pendant 20 minutes à 4°C. Les culots de bactéries ont été lysés dans 1/25 du volume de culture avec du tampon de lyse GST (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM DTT et 1mM PMSF) puis incubé pendant 20 minutes, 4°C, 15 tours/min. Le lysat total de protéines solubles a été obtenu en centrifugeant pendant 30 minutes, 16000 x g à 4°C.

Un protocole similaire a été utilisé pour l'expression et l'extraction de **GST-HA-RNF167-6xHis**. Ici, la protéine a été induite à 30°C, 2h, avec 0.5 mM IPTG et 1 µM ZnCl₂ dans du milieu LB-Amp-glucose (10 g/L NaCl, 10 g/L peptone et 5 g/L extrait de levure, 100 µg/mL ampicilline, 1% glucose). Les culots de bactéries ont été lysés dans du tampon de lyse GST.

L'expression de **HA-RNF167-6xHis** a été induite à 30°C, 2h, avec 1 mM IPTG et 1 µM ZnCl₂. Le tampon de lyse His-tag (20 mM tampon phosphate pH 7.4, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 0.5% Triton X-100, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF) a été utilisé pour l'extraction de la protéine.

Pour l'expression et l'extraction de **GST-UBE2N**, la protéine a été induite à 30°C, 2h, avec 0.5 mM IPTG dans du milieu TB-Amp-glucose (47.6 g/L Terrific Broth

(BioBasic, #SD7035), 0.4% glycérol, 100 µg/mL ampicilline, 1% glucose). Les culots de bactéries ont été lysés dans du tampon de lyse GST.

Les conditions suivantes ont été utilisées pour l'expression et l'extraction de **6xHis-UBE2N**. La protéine a été induite à 30°C, 2h, avec 1 mM IPTG. Le tampon de lyse His-tag (20 mM tampon phosphate pH 7.4, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 0.5% Triton X-100, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF) a été utilisé. La colonie a été incubée dans du milieu TB-Amp (47.6 g/L Terrific Broth (BioBasic, #SD7035), 0.4% glycérol, 100 µg/mL ampicilline).

2.3.5 Chromatographie d'affinité

Le FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) AKTA pure (GE Healthcare) a été utilisé pour l'ensemble des chromatographies d'affinité à grande échelle (≥ 500 mL de culture). Toutes les solutions utilisées ont été filtrées avec un filtre de 0.45 µm puis dégazées. Les colonnes GStrap HP de 5mL et GStrap 4B de 1 mL (GE Healthcare) ont été utilisées pour la purification des protéines avec l'étiquette GST. Ces colonnes ont été nettoyées avec 5 volumes de colonne (CV) d'eau nanopure puis équilibrée avec 5 CV de PBS (137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) à une vitesse de 2.5 mL/minute pour les colonnes de 5 mL et 1 mL/minute pour les colonnes de 1 mL. Le lysat total a été dilué avec 2x l'équivalent du volume de lysat en PBS puis injecté sur la colonne à une vitesse de 1 mL/minute pour les colonnes de 5 mL et une vitesse de 0.75 mL/minute pour les colonnes de 1 mL. Un échantillon du lysat total et le «flow through» ont été récoltés pour analyse sur SDS-PAGE. La colonne a été lavée avec 5 à 10 CV de PBS à un débit de 2.5 mL/minute pour les colonnes de 5 mL et de 1 mL/minute pour les colonnes de 1 mL. L'éluion de la protéine recombinante a été faite avec 50 mM Tris/HCl, pH 8.0 avec 10 mM glutathione réduite au même débit que décrit précédemment. Les éluions ont été récoltées en fraction de 0.5 mL dans des tubes de verre à l'aide du collecteur à fraction F9-R (GE Healthcare). Les échantillons récoltés ainsi que les éluions ont été analysés sur gel SDS-PAGE.

Les colonnes HisTrap FF crude de 1 mL (GE Healthcare) ont été utilisées pour la purification des protéines ayant l'étiquette 6xHis. La colonne a été nettoyée avec 5 CV d'eau nanopure puis équilibrée avec 5 CV de tampon d'équilibration His-tag (20 mM tampon phosphate, pH 7.4, 500 mM NaCl et 20 mM imidazole) sous un débit de 1 mL/minute. Le lysat total a été mélangé avec 2x l'équivalent du volume de lysat avec du tampon d'équilibration His-Tag puis injecté sur la colonne à une vitesse de 0.75 mL/minute. Un échantillon du lysat total et le «flow through» ont été récoltés pour analyse sur SDS-PAGE. La colonne a été lavée avec 5 CV de tampon d'équilibration His-tag, suivit de 5 CV du tampon de lavage #1 (20 mM tampon phosphate, pH 7.4, 500 mM NaCl et 60 mM imidazole) et de 5 CV du tampon de lavage #2 (20 mM tampon phosphate, pH 7.4, 500 mM NaCl et 120 mM imidazole) à un débit de 1 mL/minute. Les lavages ont été recueillis et un échantillon de chaque lavage a été déposé sur gel SDS-PAGE pour analyse. L'élution de la protéine recombinante a été effectuée avec le tampon d'élution His-tag (20 mM tampon phosphate, pH 7.4, 500 mM NaCl et 500 mM imidazole) à un débit de 1 mL/minute. Les éluions ont été récoltées en fraction de 0.5 mL dans des tubes de verre à l'aide du collecteur à fraction F9-R (GE Healthcare). Les échantillons récoltés, ainsi que les éluions ont été analysés sur gel SDS-PAGE.

2.3.6 Dialyse, quantification et préservation

Les fractions dans lesquelles il y avait le plus de protéines recueillies ont été assemblées et dialysée dans du tampon PBS pour les protéines recombinantes HA-RNF167-6xHis, GST-RNF167-HA et GST-HA-RNF167-6xHis et dans le tampon 20 mM Tris/HCl, pH 8.0 et 50 mM NaCl pour les protéines recombinantes 6xHis-UBE2N, GST-UBE2N et GST. Pour les essais SPR, les protéines recombinantes 6xHis-UBE2N et GST ont été dialysées dans du tampon d'essai SPR (25 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl et 0.025% Tween-20). Une cassette de dialyse Slide-A-Lyzer (0.5, 2, 3 ou 15 mL, ThermoScientific) a été utilisée. Les échantillons ont été incubés dans le tampon de dialyse pendant 16h. Ensuite, les tampons ont été changés une première fois, suivis d'une incubation de 2h. Finalement, les tampons ont été changés une dernière fois et

les échantillons ont été recueillis et quantifiés après 2h d'incubation. La quantification des échantillons a été faite à l'aide du PierceTMBCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, #23227). Les courbes standard allant de 0 à 2000 µg/mL de BSA ont été fraîchement réalisées pour chaque quantification. Un R² de minimalement 0.98 a été jugé comme acceptable pour la quantification des protéines. Les échantillons ont été entreposés à -80°C. Les protéines GST-UBE2N, 6xHis-UBE2N et GST ont été préservées dans du tampon 20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 10% glycérol et 2 mM DTT.

2.3.7 Clivage de la GST et purification avec les billes Glutathione Sepharose

L'étiquette GST de la protéine recombinante GST-RNF167-HA a été clivée dans du PBS à l'aide de la Thrombine (10 U/1.5 mL de solution) (GE Healthcare). La réaction a été faite à température pièce pendant 24h. La solution de réaction a été incubée avec de la résine Glutathion Sepharose (GE Healthcare) pré-équilibrées dans du PBS pendant 1h. Le tout a été centrifugé pendant 3 minutes à 800 x g à 4°C. Le surnageant, contenant la protéine clivée, a été recueilli. Un échantillon de la protéine avant clivage, de la solution après clivage, de la résine contenant la GSH après incubation et du surnageant a été chargé sur gel SDS-PAGE.

2.3.8 Purification de RNF167-HA

La protéine recombinante RNF167-HA obtenue après clivage avec la Thrombine a été purifiée en incubant la protéine avec de la résine anti-HA (Biotool) pré-équilibrée dans du PBS pendant 1h, 4°C, 15 tours/minute. La résine a été lavée 5x avec 5 CV de tampon PBS. La protéine a été éluée avec 5x 2 CV de billes avec une solution de 2 mg/mL de peptide HA dans du tampon PBS. La résine a été centrifugée entre chaque lavage et élution pendant 1 minute, 376 g à 4°C. La résine a été brassée manuellement pendant 5 minutes à température pièce lors de chacune des éluions avant de centrifuger. Les échantillons de chacune des étapes de purification et des éluions ont été chargés sur un gel SDS-PAGE pour analyse.

2.3.9 Électrophorèse sur gel SDS-PAGE

Des gels SDS-PAGE 10%-12% ont été utilisés pour la purification des protéines recombinantes étiquetées GST de RNF167-HA et des protéines recombinantes étiquetées 6xHis. L'ajout de 0.5% 2,2,2-trichloroéthanol dans le gel de séparation (SDS-PAGE) permet la visualisation des protéines suite à une exposition aux rayons UV. La migration des protéines s'est faite à courant constant de 30 mA/gel pour une épaisseur de 1 mm ou 40 mA/gel pour une épaisseur de 1.5 mm pendant 30-45 minutes. La visualisation des protéines sur gel a été faite à l'aide du ChemiDoc MP (BioRad) et du logiciel Image Lab (BioRad).

2.4 Immunobuvardage

Les protéines sur gel SDS-PAGE ont été transférées sur une membrane PVDF à l'aide du Trans-Blot Turbo (BioRad) selon les exigences du manufacturier. Le transfert a été fait à 2.5 A avec un maximum de 25 V pendant 7 minutes pour les gels de 1 mm et 10 minutes pour les gels de 1.5 mm. Le transfert des protéines sur la membrane a été vérifié par fluorescence du 2,2,2-trichloroéthanol à l'aide du ChemiDoc MP (BioRad). Les membranes ont été bloquées dans une solution 5% de lait dans du TBS-T (20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 140 mM NaCl et 0.3% Tween 20) pendant 1h à température pièce avant d'être incubées pendant 1h à température pièce avec l'anticorps primaire dilué dans du TBS-T contenant 0.5% NaN₃. Tous les lavages entre le blocage et chaque anticorps ont été faits 3x 5 min à température pièce dans du TBS-T. Les membranes ont ensuite été incubées pendant 1h à température pièce avec l'anticorps secondaire dilué dans du TBS-T. La révélation des protéines a été faite à l'aide du Clarity Western ECL Substrate (BioRad) et à l'aide du ChemiDoc MP (BioRad).

2.5 Essai ubiquitination in vitro

L'utilisation du E2 Screening Kit (UBPBio, #J1100) a permis la réalisation de cet essai. L'essai a été réalisé avec un mélange de 100 nM UBE1, 50 µM ubiquitine, 2 mM ATP,

2 μM UBE2 et 1 μg (2.57 μM) HA-RNF167-6xHis. La réaction a eu lieu 1h à 30°C. Après la réaction, il y a eu ajout de Laemmli 2x. Un volume équivalent à 0.25 μg de RNF167 sur gel a été déposé sur SDS-PAGE pour analyse via immunobuvardage contre l'étiquette HA de RNF167.

2.6 Culture cellulaire et transfection

Les cellules HEK293T/17 ont été cultivées dans du milieu DMEM (+4.5 g/L glucose, +L-glutamine et sodium pyruvate) (Multicell) et 10% FBS selon les méthodes traditionnelles. De la poly-D-lysine hydrobromide (Sigma) à 0.1 mg/mL a été utilisé pour traiter des plaques de 6 puits (Eppendorf) pendant 30 minutes à température pièce. La poly-D-lysine a ensuite été enlevée et les puits ont été lavés deux fois avec de l'eau nanopure stérile et asséchée à température pièce en zone stérile. 250 μL d'Opti-Mem (+HEPES, +2.4 g/L Sodium Bicarbonate, +L-Glutamine) (Life Technologies) a été déposé dans chaque puit suivi de 1 μg d'ADN total. 2 μL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) et 250 μL d'Opti-Mem ont d'abord été incubés 5 minutes à température pièce puis ajoutés dans chaque puit. Le mélange ADN plasmidique et Lipofectamine 2000 a été incubé pendant 25 minutes à température pièce. 800 000 cellules dans 1.5 mL ont été ajoutées dans chaque puit et incubées pendant 24h à 37°C dans une atmosphère humidifiée et contenant 5% CO_2 .

2.7 Lyse des cellules HEK293T/17

Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS à température pièce. Du tampon de lyse cellulaire (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 20 mM NEM (N-ethylmaléimide, Sigma), 1x cocktail inhibiteur de protéase (EDTA-free, Bimake) à 4°C a été ajouté aux cellules suivit d'une incubation de 5 minutes sur glace. Les cellules ont ensuite été grattées puis mises dans un tube et incubées pendant 20 minutes, 4°C, 15 tours/minutes. Le lysat total de protéines a été récupéré dans le surnageant en centrifugeant pendant 15 minutes, à vitesse maximale à 4°C. La

concentration en protéines a été déterminée à l'aide du Pierce™BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, #23227) selon les mêmes exigences décrites plus haut.

2.8 Essai GST pull-down

10 µg de protéines étiquetées GST ont été mélangés avec de la résine Gluthatione Sepharose (GE Healthcare) préalablement équilibrée avec du tampon de réaction (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl et 1% Triton X-100) pendant 1h à 4°C. Ensuite, la résine a été culotée à 800 x g pendant 3 minutes à 4°C et le surnageant a été jeté. Ensuite, 10 µg de protéines purifiées étiquetées 6xHis ou 200 µg de lysat cellulaire de protéines ont été incubés 1h, 4°C avec la résine couplée à la protéine de fusion étiquetée GST. À la fin de l'essai, la résine a été lavée 5 fois avec 5 CV de tampon de réaction et culotée en centrifugeant pendant 1 minute, 376 x g à 4°C.

2.9 Essai Résonance des Plasmon de Surface (Spratt et al.)

L'instrument Biacore T200 (GE Healthcare) a été utilisé. La protéine purifiée HA-RNF167-6xHis a été immobilisée de façon covalente par couplage amine sur une puce CM5 de dextran carboxyméthylée (GE Healthcare). Pour se faire, un mélange 1:1 de N-hydroxysuccinimide (NHS) à 0.1 M et de 3-(N-diméthylamino)-propyl-N-éthylcarbonimide (EDC) à 0.4 M a été injecté avec un débit de 30 µL/minute pendant 420 secondes. Ensuite, une solution de protéines purifiées de 10 µg/mL dans 10 mM acétate de sodium pH 4.5 a été injectée dans le canal d'essai pour obtenir 300 RU (unités de réponse). Les sites libres des deux canaux (références et essai) ont été bloqués avec l'injection d'une solution d'Éthanolamine 1 M pendant 420 secondes à un débit de 30 µL/minute. Les essais cinétiques ont été réalisés en injectant des concentrations croissantes de 0 à 2 µM de protéines purifiées 6xHis-UBE2N et de 0, 2 et 10 µM de protéines GST diluées dans du tampon d'essai SPR (25 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.025% Tween-20) pendant 180 secondes à un débit de 30 µL/minute. La dissociation du complexe a été observée en injectant du tampon d'essai

SPR pendant 300 secondes à un débit de 30 $\mu\text{L}/\text{minutes}$. La régénération de la puce a été effectuée avec 50 mM NaOH à un débit de 30 $\mu\text{L}/\text{minute}$ pendant 20 secondes. L'analyse des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel d'évaluation BIA (GE Healthcare) en utilisant un paramètre d'interaction 1 site pour 1 site de liaison.

2.10 Immunofluorescence

Les cellules HEK293T/17 transfectées ont été cultivées sur des lamelles de verre (18 mm, 170 μm d'épaisseur, UltiDent) prétraitées avec 0.1 mg/mL Poly-D-Lysine et déposées dans des plaques de 12 puits (320 000 cellules/puits). Toutes les étapes suivantes ont été réalisées à température pièce et à la noirceur sauf pendant les lavages. Les cellules ont été lavées délicatement trois fois avec du PBS (+Ca²⁺, +Mg²⁺). Les cellules ont été fixées pendant 15 minutes dans 4% paraformaldéhyde, 4% sucrose dans du PBS suivi d'un lavage au PBS. Les cellules ont été perméabilisées avec 0.25% Triton X-100 dans du PBS pendant 15 minutes avant un blocage avec 10% sérum de chèvre dans du PBS pendant 1h. Les cellules ont été incubées avec de l'anticorps primaire anti-HA (Souris, Biolegend) 1/1000 dilué dans 3% sérum de chèvre dans du PBS pendant 1h suivi de trois lavages au PBS. Les cellules ont ensuite été incubées avec l'anticorps secondaire Alexa Fluor 568 (anti-souris, Life Technologies) 1/1000 dans 3% sérum de chèvre dans du PBS pendant 1h. Les cellules ont été lavées une fois avec du PBS et incubées avec une solution de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DAPI (Life Technologies) dans du PBS pendant 5 minutes et lavées une dernière fois avant de monter les lamelles sur des lames à l'aide du tampon de montage ProLong Diamond Antifade (Life Technologies) préchauffé à 37°C. L'acquisition des images a été faite à l'aide d'un microscope confocal A1R (Nikon) avec un objectif CFI plan APO Lambda 60x (Nikon). L'acquisition des images a été faite avec des tranches en Z de 0.15 μm d'épaisseur, une résolution de 512x512, une calibration de 0.21 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ et une grosseur du Pinhole de 33.21 μm .

2.11 Souris

Des souris FVB mâles âgées de 8-10 semaines ont été obtenues et manipulées conformément aux règles institutionnelles d'éthique en matière d'utilisation d'animaux. Ces animaux étaient destinés pour euthanasie. Brièvement, suite à l'anesthésie par inhalation d'isoflurane, après décapitation, le cerveau a été rapidement prélevé puis congelé sur glace sèche. L'entreposage à -80°C a été effectué jusqu'à utilisation pour extraction protéique.

2.12 Fractionnement synaptoneurosome

L'expérience a été réalisée telle que décrite dans Johnson et al. (1997). Brièvement, le cortex de souris mâle a été homogénéisé avec du tampon Synaptoneurosome (25 mM HEPES pH 7.4, 140 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1.8 mM CaCl_2 , 1.2 mM Na_2HPO_4 , 50 mM KCl, 10 mM Dextrose, 1x cocktail inhibiteur protéase (EDTA-free, Bimake) et 20 mM NEM (Sigma)) à l'aide d'un Potter (1 mL). L'homogénat (H) a été filtré avec deux couches de filtres de 100 μm en nylon humectés de la solution d'homogénéisation (H_{100}). Le filtrat a ensuite été appliqué sur une couche de filtre de 5 μm de nylon imprégné de la solution d'homogénéisation (H_5). Le dernier filtra a été centrifugé pendant 15 minutes à 1000 x g à 4°C pour séparer l'échantillon en synaptoneurosome (SN, culot) et en fraction cytosolique (Cyt, surnageant). Le culot a été resuspendu dans du tampon Synaptoneurosome. Un aliquot de chacune des fractions a été gardé pour quantification à l'aide du PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, #23227) selon les mêmes exigences décrites plus haut. Un maximum de 10 μg de protéines a été chargé et séparé sur gel SDS-PAGE avant d'effectuer un immunobuvardage contre des protéines spécifiques.

2.13 Fractionnement subcellulaire

Un cortex de souris mâle a été homogénéisé dans 10 mL/g de tampon TEVP (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 20 mM NEM, 1x cocktail inhibiteur, pH 7.5) + 320 mM

sucrose. L'homogénat (H) a été centrifugée à 800 x g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant 1 (S1) a été centrifugé à 9200 x g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot a été nettoyé dans le tampon TEVP + 320 mM sucrose et centrifugé à 10000 x g pendant 20 minutes à 4°C. Le culot obtenu (P2) a été resuspendu dans du tampon TEVP + 35.6 mM sucrose et centrifugé à 31129 x g (rotor TLA-55, Beckman) pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant (LS1) a été conservé sur glace et le culot (LP1) a été rincé avec du tampon TEVP + 35.6 mM sucrose, resuspendu dans du tampon TEVP + 35.6 mM sucrose + 1% Triton X-100 et centrifugé à 55341 x g (rotor TLA-55, Beckman) pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant (SPSD) contient les membranes synaptosomales solubles dans du Triton X-100 et le culot (PSD) contient les membranes non solubles. Le culot a été resuspendu dans du tampon TEVP + 35.6 mM sucrose. Un aliquot de chacune des fractions (H, S1, P2, LS1, LP1, PSD et PSD) a été quantifié à l'aide du PierceTMBCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, #23227) selon les mêmes exigences décrites plus haut. Un maximum de 10 µg de protéines a été chargé puis séparé sur gel SDS-PAGE avant d'effectuer un immunobuvardage contre des protéines spécifiques.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 La première stratégie de purification n'est pas optimale

Pour être en mesure de caractériser l'UBE3 ligase RNF167 par des essais *in vitro*, il faut tout d'abord la purifier. La figure 3.1 représente la première stratégie de purification de la protéine. Pour ce faire, la portion N-terminale a été tronquée pour enlever le domaine transmembranaire de la protéine afin de rendre la protéine cytosolique, ce qui facilite sa purification, et le domaine RING, qui est le domaine de liaison aux UBE2s, a été gardé afin d'étudier l'interaction RNF167-UBE2. Sur la protéine recombinante, une étiquette GST fusionnée à l'extrémité N-terminale et une étiquette HA en C-terminale, pour faire une double purification par chromatographie de la protéine, ont été ajoutées (fig. 3.1 A). L'utilisation de l'étiquette GST pour la purification de protéines recombinantes amène plusieurs avantages tels qu'une meilleure solubilisation et la formation d'une grande quantité de protéines de fusion (Kimple et al., 2013). L'ADN_C a été inséré dans le vecteur pGEX-4T-1 (Annexe A) pour permettre l'expression de la protéine recombinante chez les bactéries. Dans un premier temps, l'expression de la protéine a été effectuée chez les bactéries *E. coli* BL21 (DE3) gold. Les bactéries ont été cultivées dans du milieu LB et plusieurs paramètres d'expression comme le temps, la température, la concentration d'IPTG et la concentration de zinc ont été optimisés. L'expression de la protéine s'effectue sous le contrôle de l'opéron Lac afin de contrôler la toxicité qu'une protéine étrangère à l'hôte pourrait provoquer. L'IPTG agit en tant qu'analogue non métabolisable du

lactose pour activer la transcription via l'opéron Lac. Puisque le domaine RING de la protéine nécessite le zinc pour la stabilisation de sa structure, il a donc été important de tester ce paramètre afin de maximiser la stabilité structurale de la protéine lors de sa purification. Lors des tests d'induction, les paramètres de référence ont été une induction à 30°C pendant 2h avec 1 mM IPTG et 1 μ M ZnCl₂. Les bactéries ont été culotées et lysées. Les lysats totaux ont été incubés avec la résine Glutathione Sepharose 4B et l'élution dénaturante avec le tampon d'échantillon Laemmli 2x a été chargée sur un gel SDS-PAGE (fig. 3.1 B). Les résultats démontrent qu'il y a une augmentation de l'expression de la protéine avec une augmentation de la concentration en IPTG. À 23°C, il n'y a pas d'expression avec une concentration de 0 mM d'IPTG. Par contre, à 30°C, pour la même concentration, il y a une faible expression de la protéine. L'expression de la protéine commence à saturer après une concentration de 0.1 mM d'IPTG à 30°C, alors que l'expression reste croissante jusqu'à 1 mM d'IPTG à 23°C. L'expression de la protéine recombinante est optimale à 30°C. L'expression de la protéine est croissante jusqu'à 2h d'induction où il y a saturation d'expression. Lorsqu'il n'y a pas de temps d'induction, il n'y a pas d'expression de la protéine. L'expression de la protéine est croissante jusqu'à l'ajout de 1 μ M de ZnCl₂. Les résultats démontrent que les paramètres optimaux d'expression sont les mêmes que les paramètres de base.

Une fois que les paramètres d'expression ont été déterminés, une plus grande quantité de protéine a été exprimée chez les bactéries transformées E. coli BL21 (DE3) gold et la protéine a été purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne GSTrap à l'aide d'un FPLC AKTA pure. Puisqu'il y avait clivage protéolytique lors de l'expression de la protéine recombinante, la stratégie employée de purification a été de tronquer l'étiquette GST à l'aide de la thrombine afin d'obtenir une protéine RNF167-HA dépourvue de l'étiquette GST (fig. 3.1 C). La GST clivée a été éliminée en incubant la solution de protéines recombinantes avec la résine GSTrap et en mettant de côté ce qui s'était lié à la matrice.

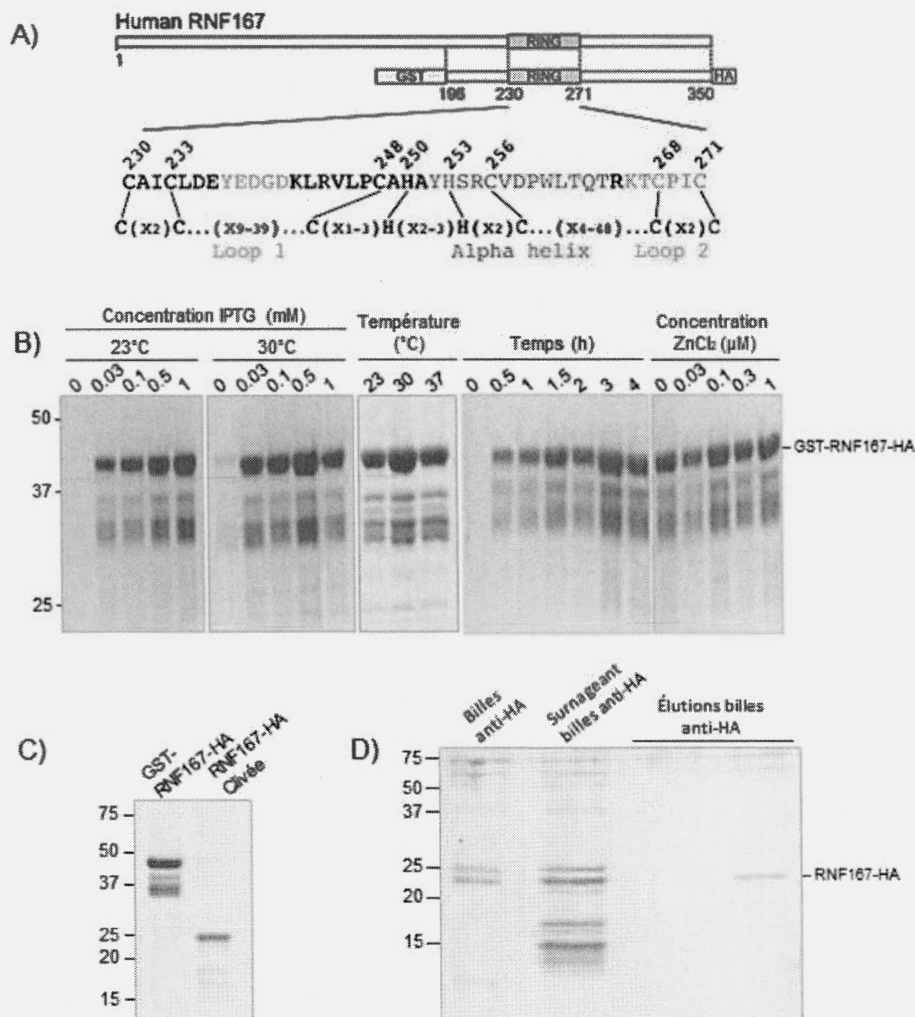


Figure 3.1. Première stratégie pour la purification de RNF167. A) Structure de la protéine recombinante GST-RNF167-HA dont la portion C-terminale de la protéine a été gardée et le domaine transmembranaire enlevé. B) Gel SDS-PAGE de l'optimisation de l'induction de la protéine recombinante GST-RNF167-HA. Différents paramètres d'induction ont été testés. La protéine recombinante a été isolée par chromatographie d'affinité avec la résine Glutathion Sepharose. Les gels ont été colorés avec le colorant Gel Code Blue. C) Gel SDS-PAGE du clivage de l'étiquette GST de la protéine recombinante GST-RNF167-HA après purification à l'aide du FPLC. L'étiquette GST a été clivée avec de la Thrombine pendant 24h. L'étiquette GST a été isolée par chromatographie d'affinité à l'aide de la résine Glutathion Sepharose. D) Gel SDS-PAGE de la purification de la protéine recombinante RNF167-HA. La solution contenant la protéine a été incubée avec la résine anti-HA afin de tenter d'isoler RNF167-HA. La protéine a été éluée à l'aide du peptide HA. L'acquisition des images a été faite à l'aide du ChemiDoc MP.

Il est possible d'observer sur le gel que l'étiquette GST a bien été clivée après la réaction avec la thrombine par la diminution du poids moléculaire de la protéine recombinante après clivage comparativement à la protéine avant le clivage. Comme il

restait encore des impuretés sur le gel après le clivage, il a fallu purifier la protéine RNF167-HA à l'aide de la résine anti-HA (fig. 3.1 D). L'élution de la protéine se faisait avec un peptide HA. Il est possible de remarquer que le rendement de purification n'était pas très efficace. De plus, il restait encore de la protéine sur la matrice et il restait encore de la protéine recombinante dans le surnageant qui ne s'était pas liée sur la résine.

3.2 La seconde stratégie de purification permet d'obtenir une protéine recombinante plus pure

Comme la première stratégie de purification n'était pas efficace, il a été nécessaire d'avoir recours à une autre stratégie pour faciliter la purification en une seule étape. Pour se faire, il a été question de changer les étiquettes sur la protéine recombinante. Le plasmide utilisé a été le pET-52 b(+) dans lequel il y avait une étiquette StreptagII qui était déjà incluse. L'ADN_C de la nouvelle protéine recombinante optimisée pour expression en bactéries a été synthétisé chez GenScript puis insérée dans le plasmide en ajoutant une étiquette HA fusionnée à l'extrémité N-terminale et une étiquette 6xHis fusionnée à l'extrémité C-terminal (fig. 3.2 A et annexe B). L'étiquette 6xHis fusionnée à l'extrémité C-terminal a été insérée dans but d'obtenir une protéine complète après la purification par chromatographie d'affinité sur une colonne de nickel. De plus, cette étiquette de petite taille est idéale pour les études d'interaction protéine-protéine puisqu'il y a moins de risque d'encombrement et il n'est pas nécessaire de la cliver (Kimple et al., 2013). Comme pour la construction précédente (fig. 3.1 B), il fallait d'abord optimiser l'expression de la protéine recombinante chez les bactéries. Les bactéries transformées ont été incubées dans du milieu LB et différents paramètres d'induction ont été testés. Les paramètres d'induction de référence étaient d'utiliser une concentration d'IPTG à 0.5 mM avec une concentration de ZnCl₂ de 1 µM pendant 2h à 30°C. Comme précédemment, le temps d'induction, la température, la concentration d'IPTG et la concentration de zinc ont été optimisés (fig. 3.2 B). Les

culots de bactéries ont été lysés et le lysat de protéines a été quantifié afin de charger une même quantité de protéines totales sur un gel SDS-PAGE.

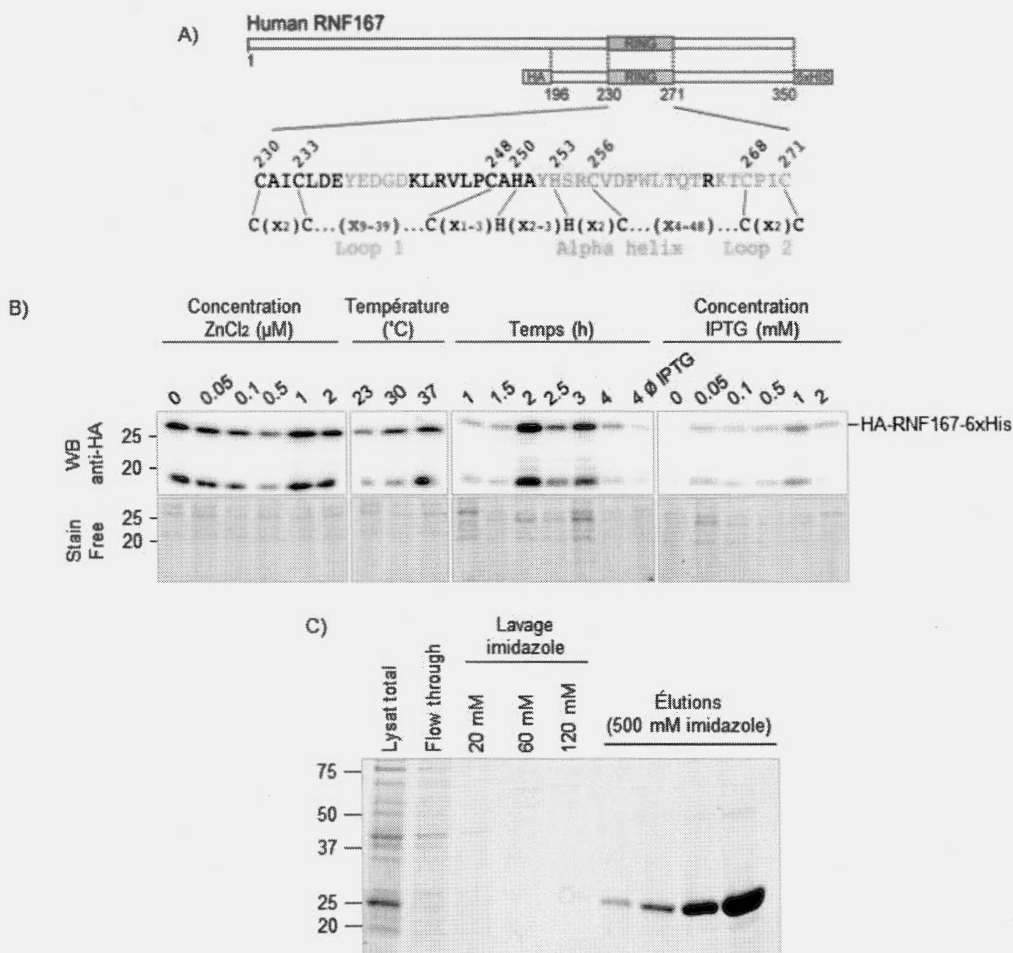


Figure 3.2. Deuxième stratégie de purification. A) Structure de la protéine recombinante HA-RNF167-6xHis dont la portion C-terminale de la protéine a été gardée et le domaine transmembranaire enlevé. B) Optimisation de l'induction de la protéine recombinante HA-RNF167-6xHis. Les différents paramètres d'induction ont été testés. 5 μg a été chargé sur un gel SDS-PAGE pour ensuite faire un immunobuvardage anti-HA afin d'observer le niveau d'expression de la protéine. WB=immunobuvardage. C) Gel SDS-PAGE de la purification de la protéine recombinante HA-RNF167-6xHis. Le lysat de protéine a été injecté dans une colonne de Nickel HisTrap FF crude à l'aide d'un FPLC AKTA pure. Des concentrations croissantes d'imidazole (20, 60 et 120 mM) ont été utilisées pour le lavage de la colonne après injection de la protéine. Une concentration de 500 mM d'imidazole a permis l'élution de la protéine. Les protéines ont été observées par UV visible grâce à la présence de TCE (acide 2,2,2-trichloroéthanol) dans les gels. La révélation des protéines après immunobuvardage a été faite à l'aide du Clarity Western ECL Substrate. L'acquisition des images a été faite à l'aide du ChemiDoc MP.

Un immunobuvardage contre l'étiquette HA de la protéine recombinante HA-RNF167-6xHis a permis de déterminer les paramètres optimaux d'induction. Selon les résultats obtenus, il y a une augmentation croissante de l'expression de la protéine lorsqu'il y a une augmentation de la concentration en zinc, jusqu'à apparition d'un plateau à partir de 1 μ M. De plus, il y a une augmentation de l'expression de la protéine lorsque la température augmente sans qu'il y ait de différence importante entre une température d'induction à 30 ou 37°C. Il y a une augmentation de l'expression de RNF167 entre 1h et 2h d'expression, ainsi qu'une diminution d'expression après 2h d'induction. De plus, il semble y avoir une faible expression de la protéine lorsqu'il n'y a pas d'ajout de l'inducteur, l'IPTG. Finalement, il y a une augmentation de l'expression de la protéine avec l'augmentation de la concentration en IPTG jusqu'à 1 mM et un plateau après cette concentration d'IPTG. Les résultats démontrent que les paramètres d'induction choisis de base sont optimaux avec comme seul changement la concentration de l'IPTG, qui passe de 0.5 mM à 1 mM. Une fois que l'expression de la protéine a été optimisée, il est maintenant possible de faire la purification en grande quantité. Pour se faire, une plus grande culture de bactéries transformées E. coli BL21 (DE3) gold a été utilisée et la purification de la protéine s'est faite par chromatographie d'affinité sur une colonne de nickel à l'aide d'un FPLC AKTA pure. Comme la colonne employée est une colonne sur laquelle il y a des ions Ni^{2+} liés dessus, il est possible d'avoir des interactions non spécifiques à l'étiquette 6xHis de d'autres protéines provenant du lysat total par affinité de charge. C'est pour cette raison que lors de l'équilibration de la colonne ainsi que dans le tampon de lyse et de lavage après l'injection du lysat total, il est recommandé d'ajouter une faible concentration d'imidazole (un analogue de l'histidine ayant plus d'affinité pour le nickel) afin d'enlever ces interactions non spécifiques. Dans un premier temps, la concentration d'imidazole dans le tampon de lavage a été optimisée afin d'obtenir une protéine d'excellente pureté suite à l'élution à forte concentration d'imidazole (résultat non montré). Afin d'obtenir une protéine de bonne pureté, il a été déterminé que l'utilisation de trois tampons de lavage avec des concentrations croissantes de 20, 60 et 120 mM d'imidazole permettait d'obtenir une

protéine d'excellente pureté sans entraîner l'élution de la protéine recombinante d'intérêt. La figure 3.2 C démontre que la méthode de purification a bien fonctionné et qu'il a été possible d'obtenir une protéine de grande pureté de HA-RNF167-6xHis. Alors, la seconde stratégie de construction et de purification de la protéine a bien fonctionné.

3.3 Le domaine RING de RNF167 peut interagir fonctionnellement avec une dizaine d'UBE2

Une fois que la protéine recombinante HA-RNF167-6xHis a été purifiée, un essai d'auto-ubiquitination *in vitro* a été établi pour déterminer quelles étaient les UBE2s pouvant se lier de façon fonctionnelle avec l'UBE3 (fig. 3.3). Pour ce faire, un essai permettant de tester l'interaction avec 29 UBE2s différentes a été utilisé. Dans chaque tube, tous les éléments permettant de recréer la voie de signalisation de l'ubiquitination, incluant une UBE1, de l'ATP, l'ubiquitine, l'UBE3 d'intérêt RNF167 et une des 29 UBE2s, ont été mélangés. Le contrôle négatif ne contient pas d'UBE2 dans la solution. La réaction a été chargée sur gel SDS-PAGE puis un immunobuvardage contre l'étiquette HA de RNF167 a permis la détection de la protéine. Pour éviter de saturer le signal de RNF167 lors de l'immunobuvardage, une titration de la protéine avec l'anticorps anti-HA a permis de déterminer que la quantité de protéine à charger sur gel est de 0.25 µg puisqu'il y a saturation à partir de 0.5 µg (fig. 3.3 A). L'augmentation du poids moléculaire de la protéine indique qu'il y a fixation de l'ubiquitine sur RNF167, donc qu'il y a eu interaction fonctionnelle entre RNF167 et l'UBE2. Puisque RNF167 est une UBE3 à domaine RING et qu'il n'y a pas de substrat présent dans la réaction, les différentes UBE2s ajoutent des molécules d'Ub sur une ou plusieurs lysines de RNF167. Tel que présenté à la fig. 3.3 B, il y a une augmentation du poids moléculaire lorsque RNF167 est mis en solution avec UBE2A, UBE2B, UBE2C, UBE2D1-UBE2D4, UBE2E1, UBE2E3, UBE2G2, UBE2K, UBE2N/UBE2V1, UBE2R1, UBE2T, UBE2N/UBE2V2 et UBE2W. Conséquemment, il y a eu interaction fonctionnelle entre RNF167 et ces UBE2s.

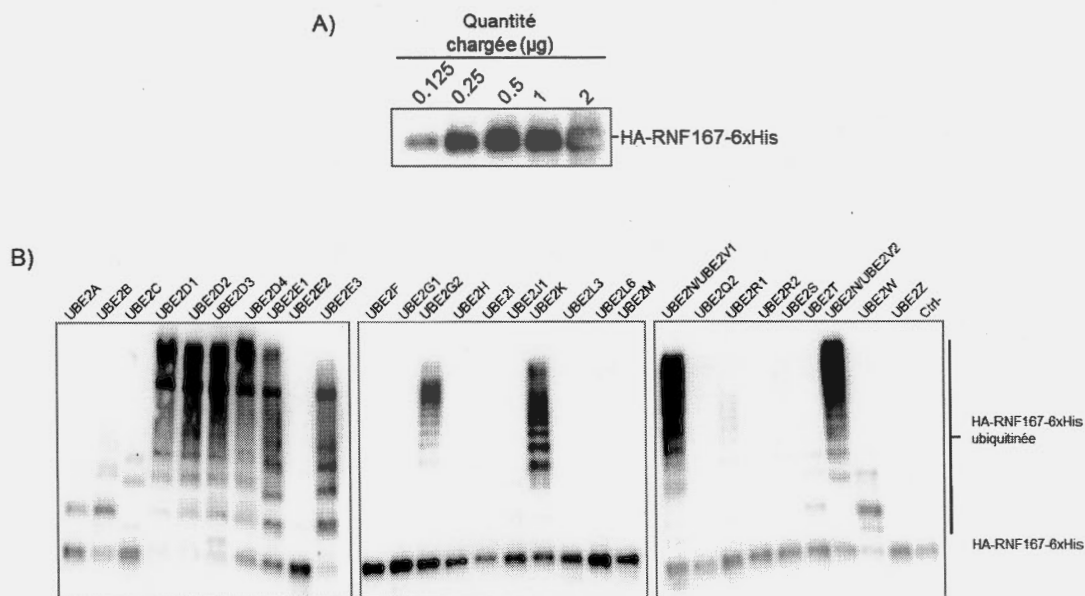


Figure 3.3. Détermination des enzymes de conjugaison pouvant se lier de façon fonctionnelle avec RNF167. A) Immunobuvardage anti-HA de la protéine recombinante HA-RNF167-6xHis purifiée afin de déterminer le niveau de saturation du signal de l'anticorps. B) Essai Ubiquitination *in vitro*. La réaction est composée de l'UBE1, de l'ATP, de l'ubiquitine, de la protéine recombinante RNF167 et une des 29 UBE2s. Il n'y a pas d'UBE2 dans le contrôle négatif. L'équivalent de 0.25 µg de HA-RNF167-6xHis a été chargé sur un gel SDS-PAGE et un immunobuvardage anti-HA a permis la détection de la protéine. La révélation des protéines après immunobuvardage a été faite à l'aide du Clarity Western ECL Substrate. L'acquisition des images a été faite à l'aide du ChemiDoc MP.

3.4 RNF167 et UBE2N interagissent selon des essais *in vitro*

RNF167 est connu comme ayant un rôle associé au cancer (van Dijk et al., 2014; Yamada et Gorbsky, 2006) et à la régulation de la neurotransmission. À cet effet, Lussier et al. (2012) a démontré que RNF167 joue un rôle dans l'ubiquitination des récepteurs AMPA. Une étude subséquente (Widagdo et al., 2015) démontre que ces récepteurs sont ubiquitinés en chaîne de type K63. Parmi les UBE2s qui ont interagi de façon fonctionnelle avec RNF167 (fig. 3.3 B), seul UBE2N permet de former une chaîne de type K63 (Eddins et al., 2006; Stewart et al., 2016). Donc, l'étude s'est concentrée plus sur la caractérisation de l'interaction entre RNF167 et UBE2N. Pour être en mesure d'étudier le complexe RNF167-UBE2N, il faut procéder à la purification d'UBE2N. La séquence codante de la protéine complète a été optimisée

pour l'expression chez les bactéries puis elle a été insérée dans un vecteur pGEX-4T-1 pour avoir une étiquette GST fusionnée à l'extrémité N-terminale. Après expression dans des bactéries *E. coli* BL21 (DE3) gold, la protéine recombinante GST-UBE2N a été purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne GSTrap à l'aide d'un FPLC AKTA pure (résultat non montré). Pour s'assurer de l'interaction entre les deux protéines, des essais de liaison *in vitro* GST ont été faits (fig. 3.4 A et B). Dans un premier temps, l'essai a été fait avec les deux protéines purifiées, GST-UBE2N et HA-RNF167-6xHis. La protéine purifiée HA-RNF167-6xHis a été incubée avec la résine Glutathione Sepharose 4B sur laquelle les protéines GST, GST-UBE2N ou aucune protéine étaient immobilisées (fig. 3.4 A). Après incubation puis lavage, il y a eu élution dénaturante du complexe avec le tampon d'échantillon Laemmli et les éluats ont été chargés sur gel SDS-PAGE. Après séparation, un immunobuvardage contre l'étiquette HA de RNF167 a été réalisé. Les résultats démontrent qu'il y a détection de la protéine HA-RNF167-6xHis lorsque GST-UBE2N est immobilisé sur la résine et que ce n'est pas le cas lorsque la protéine GST est immobilisée sur la résine ou lorsqu'il n'y a aucune protéine immobilisée sur la matrice. Pour le deuxième essai GST pull down, celui-ci a été fait avec des lysats de cellules transfectées. Pour se faire, il a d'abord été question d'insérer la protéine recombinante HA-RNF167-6xHis dans un vecteur pGEX-4T-1 pour ajouter l'étiquette GST fusionnée à l'extrémité N-terminale et elle a été purifiée en utilisant la même méthode de purification que GST-UBE2N. La séquence d'ADN de la protéine UBE2N a été insérée dans un vecteur pEGFP-C1 pour son expression dans des lignées cellulaires. Les cellules HEK293T ont été transfectées du vecteur pEGFP-C1-UBE2N. Le lysat cellulaire a été incubé avec la résine Glutathione Sepharose 4B sur lesquelles il y avait de la GST, de la GST-HA-RNF167-6xHis ou rien de capturé (fig. 3.4 B). L'élution dénaturante, effectuée avec le tampon d'échantillon Laemmli a été chargée sur un gel SDS-PAGE et un immunobuvardage contre l'étiquette GFP de la protéine recombinante UBE2N-GFP a été fait afin de déterminer s'il y a eu interaction ou non. Les résultats démontrent qu'il y a apparition de la bande GFP-UBE2N seulement lorsque la protéine GST-HA-

RNF167-6xHis est immobilisée sur la matrice par affinité. La protéine recombinante UBE2N ne se lie pas à la résine vierge ou à la GST. Ces résultats confirment qu'il y a interaction entre RNF167 et UBE2N.

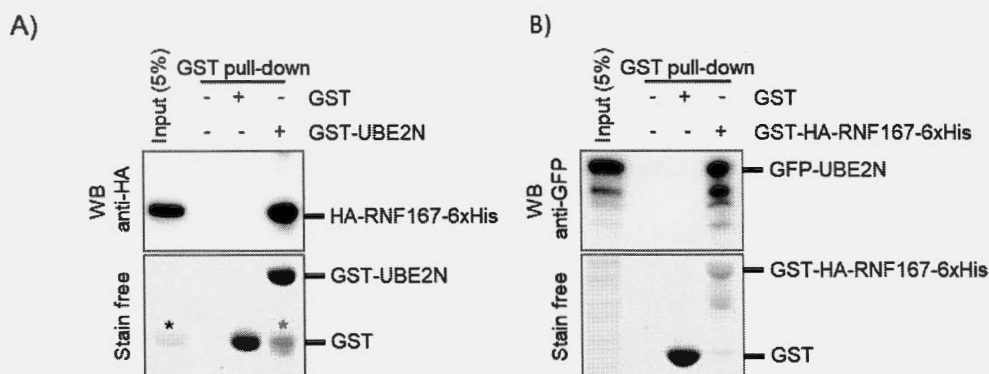


Figure 3.4. Essai d'interaction in vitro par GST pull-down entre RNF167 et UBE2N. A) Les protéines GST-UBE2N ou GST ont été liés sur de la résine Glutathion Sepharose. La protéine recombinante HA-RNF167-6xHis a été incubée avec la résine sur lesquelles il y avait de la GST, de la GST-UBE2N ou rien. Les éluats ont été chargés sur un gel SDS-PAGE et un immunobuvardage anti-HA a permis la détection de HA-RNF167-6xHis. * représente la protéine HA-RNF167-6xHis. B) Des cellules HEK293 ont été transfectées du plasmide pEGFP-C1-UBE2N pendant 24h. Le lysat cellulaire a été incubé avec de la résine Glutathion Sepharose sur lesquelles il y avait de la protéine GST ou GST-HA-RNF167-6xHis ou rien. Les éluats ont été chargés sur un gel SDS-PAGE et un immunobuvardage anti-GFP a permis la détection de GFP-UBE2N. Les gels ont été observés par UV visible grâce à l'ajout de TCE (acide 2,2,2-trichloroéthanol) dans ceux-ci. La révélation des protéines après immunobuvardage a été faite à l'aide du Clarity Western ECL Substrate. L'acquisition des images a été faite à l'aide du ChemiDoc MP.

3.5 Caractérisation de la cinétique de liaison entre RNF167 et UBE2N

Une fois que l'interaction entre les deux protéines a été démontrée in vitro, il est intéressant de caractériser la cinétique de liaison du complexe RNF167-UBE2N. Avant de faire cette cinétique, il faut faire la purification d'une protéine recombinante UBE2N sans l'étiquette GST. En effet, cette étiquette est une protéine d'environ 25 kDa. Bien que l'ajout de la GST amène des avantages au niveau de la purification de protéines recombinantes par l'augmentation de la stabilité de ces protéines (Kimple et al., 2013), il représente plus de la moitié du poids moléculaire de GST-UBE2N, dont le poids moléculaire d'UBE2N seul représente 17 kDa. Lors du GST pull down, l'interaction de l'étiquette GST de la protéine recombinante GST-UBE2N avec la GSH liée sur la résine permet de bien orienter UBE2N pour son interaction avec RNF167. Par contre,

lors des essais cinétiques, la GST pourrait interférer et biaiser la valeur des paramètres cinétiques. Pour remédier à ce problème lors des essais cinétiques, une protéine recombinante 6xHis-UBE2N a été conçue dans le vecteur pET-17b. Dans ce vecteur, l'expression de la protéine ne se fait pas selon le principe de l'opéron Lac, mais plutôt en continue. Il n'y a donc pas besoin de faire de test pour l'optimisation de l'expression de la protéine. La protéine a été exprimée dans les bactéries *E. coli* BL21 (DE3) gold et le lysat total de protéines a été chargé sur une colonne de nickel à l'aide d'un FPLC AKTA pure pour permettre la purification de la protéine par chromatographie d'affinité (fig. 3.5 A). Les résultats démontrent une grande quantité d'expression de la protéine recombinante dans le lysat total, indiquant que la protéine s'est bien exprimée. Ce résultat est également confirmé par la grande quantité de protéine qui se retrouve dans les fractions d'élution. Donc, la méthode de purification pour 6xHis-UBE2N a bien fonctionné et permet d'obtenir une protéine d'excellente pureté.

Une fois que la protéine recombinante 6xHis-UBE2N a été purifiée, il est maintenant possible de faire des essais de cinétique d'interaction avec la forme recombinante HA-RNF167-6xHis de l'UBE3. Pour se faire, il y a eu recours à une méthode biophysique, la Résonance des Plasmons de Surface (Spratt et al.) à l'aide du Biacore T200. Lors de l'essai cinétique, la protéine HA-RNF167-6xHis a été immobilisée par liaisons covalentes via un couplage amine sur la couche de dextran carboxyméthylé d'une puce CM5. Ensuite, différentes concentrations de la protéine recombinante 6xHis-UBE2N ont été injectées sur la puce afin de déterminer la cinétique d'association du complexe (k_{on}). Après chaque injection, la cinétique de dissociation du complexe était mesurée (k_{off}) et la surface était régénérée afin de permettre l'étude de l'association et la dissociation du couple RNF167/UBE2N où une autre concentration d'UBE2N était utilisée. Une expérience permettant d'évaluer la spécificité d'interaction avec RNF167 a été réalisée avec la protéine GST seule. Les résultats obtenus par la détermination des paramètres cinétiques entre RNF167 et GST illustrent l'absence d'interaction (fig. 3.5

B). La GST a été sélectionnée comme contrôle négatif étant donné la proximité du poids moléculaire avec UBE2N.

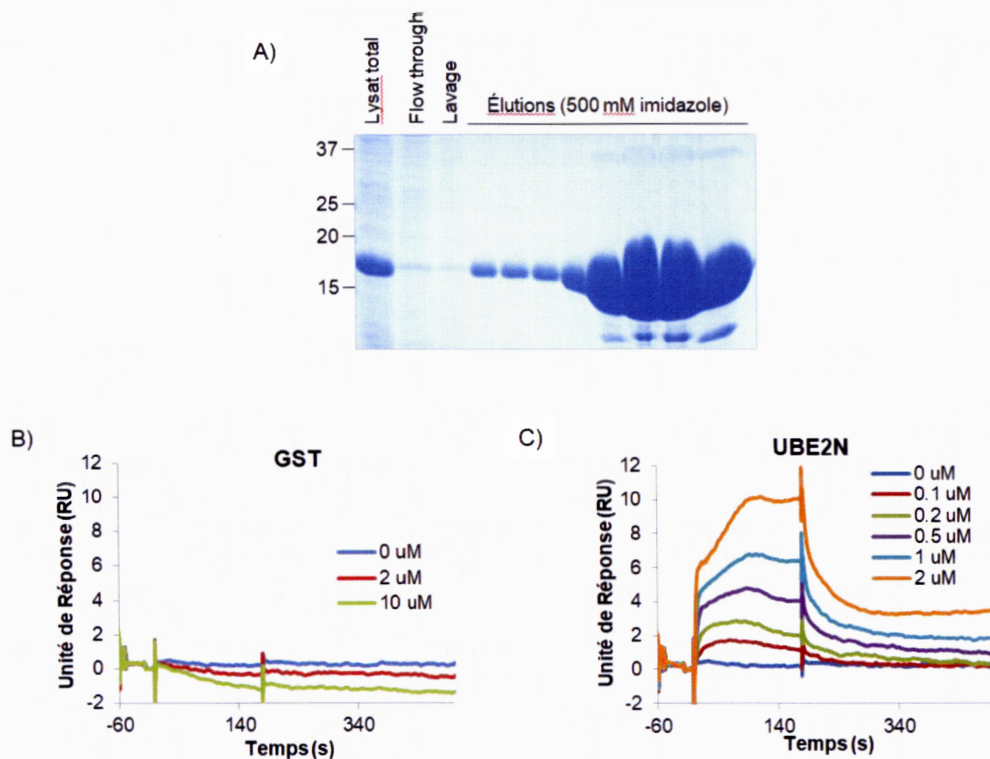


Figure 3.5. Cinétique de liaison entre RNF167 et UBE2N. A) Gel SDS-PAGE de la purification de la protéine recombinante 6xHis-UBE2N par chromatographie d'affinité sur une colonne de Nickel HisTrap FF Crude sur un FPLC AKTA Pure. Le lysat de bactérie a été injecté sur la colonne et un lavage (120 mM imidazole) a été fait. Une concentration à 500 mM imidazole a permis d'éluer la protéine. Une coloration au Gel Code Blue a permis la visualisation des protéines sur le gel. L'acquisition de l'image a été faite à l'aide du ChemiDoc. B) et C) Essai SPR pour l'analyse de la cinétique de liaison entre RNF167 et GST (B) et UBE2N (C). La protéine recombinante HA-RNF167-6xHis a été liée de façon covalente par couplage amine sur une puce CM5. Différentes concentrations de B) GST ou de C) UBE2N ont été injectés. L'appareil utilisé est le Biacore T200. Le logiciel d'évaluation BIA a permis l'analyse des courbes obtenues en utilisant un paramètre d'interaction 1 site pour 1 site de liaison.

Les résultats démontrent également que l'association et la dissociation du complexe RNF167/UBE2N sont rapides (fig. 3.5 C). La constante de dissociation calculée à partir des données de k_{on} et k_{off} et en considérant un modèle de liaison 1:1 Langmuir de l'interaction du complexe est de 1.063×10^{-6} M (tab. 3.1), ce qui est caractéristique d'une interaction de type transitoire.

Tableau 3.1. Valeur de la constante de dissociation suite à l'essai SPR entre RNF167 et les différents analytes.

Analyte	Poids Moléculaire (Da)	K_D (M)	Chi ²
UBE2N	19315	1.063×10^{-6}	0.211
GST	25499	-	-

Les valeurs ont été obtenues grâce au logiciel d'évaluation BIA en utilisant un paramètre d'interaction 1 site pour 1 site de liaison. Le Chi² est une indication de la validité du K_D calculé.

3.6 RNF167 et UBE2N co-localisent en cellule

Après avoir caractérisé la cinétique de liaison entre RNF167 et UBE2N, un essai de co-localisation a été fait dans les cellules HEK293 afin de caractériser la localisation cellulaire d'interaction (fig. 3.6). Pour ce faire, les cellules ont été co-transfectées avec les vecteurs pEGFP-C1-UBE2N et pcDNA3-RNF167-HA. Pour l'expression en cellule, l'ADN codant la protéine entière RNF167 a été inséré dans le vecteur pcDNA3. Ensuite, une immunofluorescence contre l'étiquette HA de la protéine recombinante RNF167-HA a été faite pour la détection des deux protéines en microscopie confocale. Les résultats démontrent que RNF167 et UBE2N se retrouveraient dans le même compartiment au niveau des cellules. Ce compartiment est probablement des vésicules endosomales ou lysosomales puisque l'étude de Lussier et al. (2012) a démontré que RNF167 est localisé au niveau des lysosomes. De plus, il semble qu'UBE2N soit localisé au niveau du noyau et du cytoplasme. La co-transfection du vecteur pEGFP-C1 avec pcDNA3-RNF167-HA représente le contrôle négatif. Le DAPI a été utilisé comme marqueur du noyau.

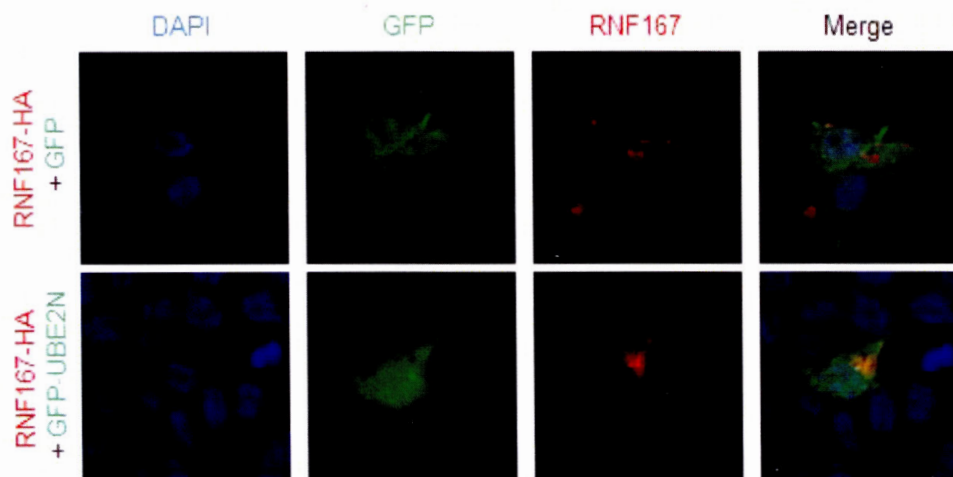


Figure 3.6. Co-localisation de RNF167 et UBE2N chez les cellules HEK293. Les cellules HEK293 ont été transfectées pendant 24h avec la combinaison des plasmides pcDNA3-HA-RNF167 et pEGFP-C1 ou pEGFP-C1-UBE2N. Une immunofluorescence contre l'étiquette HA de RNF167 a permis la détection de la protéine par fluorescence. Les lamelles ont été observées à l'aide d'un microscope confocal A1R avec un objectif CFI plan APO Lambda 60x. L'acquisition des images a été faite avec des tranches en Z de 0.15 μm d'épaisseur, une résolution de 512x512, une calibration de 0.21 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ et une grosseur du Pinhole de 33.21 μm .

3.7 Localisation de RNF167, UBE2N, UBE2V1 et UBE2V2 dans un cortex de souris

3.7.1 Synaptoneurosome

Une fois que la localisation cellulaire de RNF167 et d'UBE2N a été déterminée par microscopie à fluorescence, il est important de corroborer la localisation par une étude supplémentaire par l'utilisation d'un modèle animal. C'est pour cette raison qu'un fractionnement subcellulaire a été effectué sur un cortex de souris. Comme ce qui importe le plus dans cette étude est le lien entre la fonction de régulateur des AMPARs de RNF167 et la liaison aux UBE2s, il est donc important de déterminer si la localisation d'UBE2N est compatible avec celle de RNF167. Alors, un cortex de souris a été lysé et fractionné par filtration et centrifugation (fig. 3.7 A) pour isoler le synaptoneurosome (Johnson et al., 1997). Le synaptoneurosome représente un environnement refermé comportant la partie pré-synaptique et post-synaptique. Il peut être utilisé en recherche pour des études fonctionnelles de réponse synaptique (Westmark et al., 2011). La portion cytosolique inclut également les synaptosomes

n'ayant pas été en mesure de se refermer. Un immunobuvardage a permis la détection de protéines spécifiques dans les différentes fractions (fig. 3.7 B). Pour vérifier l'efficacité du fractionnement, différents marqueurs ont été utilisés pour analyser la qualité de chacune des fractions. La protéine PSD-95 est une protéine qui joue un rôle dans la stabilisation de récepteurs du glutamate, NMDAR et AMPAR au niveau du PSD (Chen et al., 2011). PSD-95 est donc utilisé comme marqueur du synaptosome. La GluN1 représente une sous-unité du NMDAR et est également un marqueur du synaptosome (Traynelis et al., 2010). La protéine Synaptophysine est située dans le synaptosome des neurones pré-synaptique. Cette protéine a une fonction au niveau de l'intégration des vésicules synaptiques à la membrane plasmique (Kwon et Chapman, 2011). La protéine GFAP a une fonction structurale au niveau des cellules astrocytes (Messing et Brenner, 2003), qui sont les cellules gliales les plus abondantes dans le système nerveux (Jakel et Dimou, 2017). L'histone H3 est une protéine qui joue un rôle dans l'enroulement et le déroulement de l'ADN. Elle est donc un marqueur du noyau et de l'ADN. Les résultats de l'immunobuvardage indiquent que la PSD-95 et le GluN1 se retrouvent dans toutes les fractions sauf la fraction cytosolique. La protéine Synaptophysine est exprimée dans toutes les fractions, mais est plus concentrée dans la fraction contenant les synaptoneurosmes. La GFAP est plus grandement exprimée dans les deux premières fractions et très faiblement exprimée dans les dernières fractions. Finalement, l'histone n'est exprimée que dans les deux premières fractions, ce qui veut dire qu'il n'y a pas eu de contamination par l'ADN au cours du fractionnement. Donc, maintenant qu'il a été établi que le fractionnement a été efficace, il est possible de détecter la localisation de RNF167 et d'UBE2N. Les résultats démontrent que RNF167 se retrouve dans toutes les fractions et que son expression est plus importante dans la fraction cytoplasmique et est faiblement située dans le synaptoneurosome. L'immunobuvardage de RNF167 indique qu'il y a deux bandes pour cette protéine pour les fractions H, H₁₀₀, H₅ et Cyt. L'étude de Lussier et al. (2012) a démontré que RNF167, lorsqu'exprimé à l'intérieur de la cellule, dans les lysosomes, est glycosylée. L'hypothèse est que cette glycosylation permet de protéger la protéine

de la dégradation lorsqu'elle se retrouve dans les lysosomes. La bande de plus haut poids moléculaire représente donc la forme glycosylée de RNF167. Dans la fraction SN, cette bande n'est pas présente car la protéine est exprimée à la surface de la cellule.

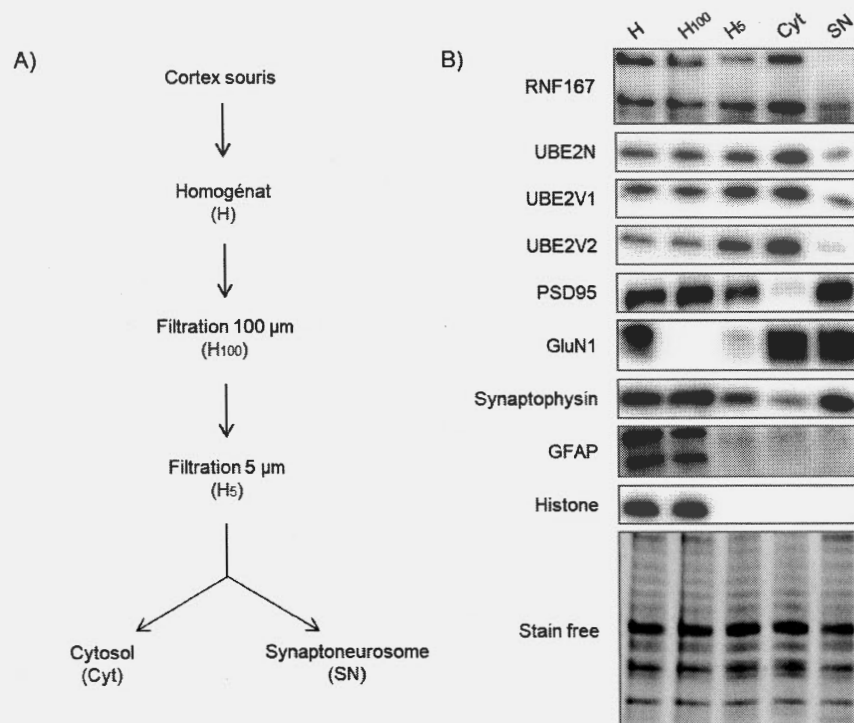


Figure 3.7. Localisation de RNF167, UBE2N, UBE2V1 et UBE2V2 dans un cortex de souris après isolation du synaptoneurosome. A) Étapes de fractionnement. Un cortex a été extrait d'une souris afin d'isoler le synaptoneurosome. B) Western Blot contre des protéines spécifiques. 5 µg (PSD-95, GluN1, Synaptophysine, GFAP et Histone H3) ou 10 µg (RNF167, UBE2N, UBE2V1 et UBE2V2) de protéines totales de chaque fraction obtenue ont été chargés sur gel SDS-PAGE. La révélation des protéines a été faite à l'aide du Clarity Western ECL Substrate et à l'acquisition des images a été effectuée à l'aide du ChemiDoc.

La protéine UBE2N est une UBE2 particulière qui a besoin de l'aide d'un cofacteur, soit UBE2V1 ou UBE2V2, pour permettre la formation d'une chaîne K63. Ces deux cofacteurs se lient à l'ubiquitine qui est déjà liée sur la lysine du substrat pour permettre de rendre disponible la lysine 63 de l'ubiquitine sur le substrat afin de former la chaîne (Eddins et al., 2006). Les résultats démontrent un même profil de fractionnement pour UBE2N, d'UBE2V1 et d'UBE2V2 et qui correspond au profil de RNF167. Ceci

fractionnement pour UBE2N, d'UBE2V1 et d'UBE2V2 et qui correspond au profil de RNF167. Ceci indique que les UBE2s et RNF167 sont exprimées au niveau du synaptosome dans un cortex de souris.

3.7.2 Fractionnement subcellulaire

Il a été démontré à la figure 3.7 B par la localisation de RNF167 et des UBE2N que leur interaction est biologiquement possible. Il est maintenant crucial de déterminer, avec un fractionnement plus précis, la localisation subcellulaire exacte au niveau des synaptosomes des protéines d'intérêt. Pour se faire, un fractionnement subcellulaire d'un cortex de souris a été fait, puis les portions solubles (SPSD) et non solubles (PSD) des membranes synaptosomales ont été séparées par solubilisation dans le triton X-100 (fig. 3.8 A). La portion non soluble dans le détergent représente la région très dense en protéine où sont situés les récepteurs. La portion soluble dans le détergent représente la portion des membranes peu dense en protéines des synaptosomes. Encore une fois, un immunobuvardage a permis la détection de protéines spécifiques dans les différentes fractions. Les mêmes marqueurs utilisés dans la figure 3.7 B ont été utilisés pour la vérification de l'efficacité du fractionnement. Dans ce fractionnement, GluN1 et PSD-95 sont des marqueurs du PSD, alors que Synaptophysine est un marqueur du SPSD, GFAP un marqueur des cellules astrocytes et l'histone H3 est un marqueur de l'ADN et du noyau. Selon les résultats obtenus, PSD-95 est fortement enrichi au niveau du PSD et du LP1 et très faiblement détecté dans le LS1 et le SPSD. GluN1 est fortement enrichi au niveau du PSD et du LP1 et aucunement détecté dans le LS1 et le SPSD. Synaptophysine est faiblement exprimée dans le PSD et le LS1 et fortement détectée dans le LP1 et le SPSD. GFAP est présent dans le LP1 et le PSD et faiblement exprimé dans le LS1 et aucunement détecté dans le SPSD. Finalement, l'histone se retrouve seulement dans l'homogénat, ce qui veut dire qu'il n'y a pas eu de contamination par l'ADN après la première centrifugation.

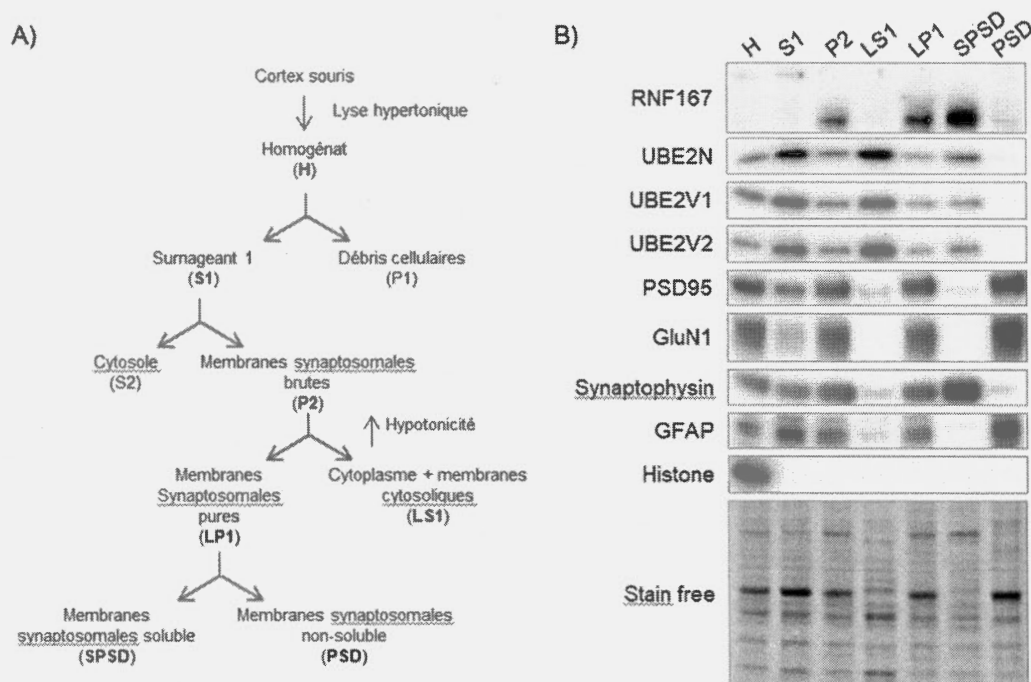


Figure 3.8. Localisation de RNF167, UBE2N, UBE2V1 et UBE2V2 dans un cortex de souris par fractionnement subcellulaire. A) Étapes de fractionnement. Un cortex a été extrait d'une souris afin d'isoler le synaptosome. Une dernière extraction dans du Triton X-100 a permis d'isoler le SPSD du PSD. B) Western Blot contre des protéines spécifiques. 5 μ g (PSD-95, GluN1, Synaptophysine, GFAP et Histone) ou 10 μ g (RNF167, UBE2N, UBE2V1 et UBE2V2) de protéines totales de chaque fraction obtenue ont été chargés sur gel SDS-PAGE. La révélation des protéines a été faite à l'aide du Clarity Western ECL Substrate et l'acquisition des images a été faite à l'aide du ChemiDoc.

Les résultats indiquent donc que le fractionnement subcellulaire a été efficace et qu'il permet de comparer la localisation de RNF167 et d'UBE2N. Selon les résultats, RNF167 est exprimé en grande partie dans le LP1 et le PSD et un peu dans le SPSD. RNF167 n'est aucunement détecté au niveau du LS1. Les protéines UBE2N, UBE2V1 et UBE2V2 sont toutes exprimées au niveau du LS1, LP1 et SPSD avec la plus forte expression au niveau du LS1. Ces protéines ne sont pas détectées au niveau du PSD. Alors, il y aurait une corrélation au niveau de la localisation dans le SPSD entre RNF167 et UBE2N. Ces résultats indiquent que RNF167 et les UBE2s se retrouvent dans le même compartiment subcellulaire au niveau du synaptosome, qui est le SPSD. De plus, ce compartiment correspond à l'endroit où il y aura endocytose du récepteur AMPA (Jaskolski et al., 2007).

CHAPITRE IV

DISCUSSION

L'ubiquitination est une voie de signalisation qui a tout d'abord été décrite comme jouant un rôle dans la dégradation des protéines. Depuis, plusieurs études ont démontré que cette voie pouvait jouer plusieurs rôles au niveau cellulaire. En effet, l'ubiquitination peut, en plus, avoir des rôles au niveau de la réparation à l'ADN, l'endocytose et la réponse au stress par exemple (Mabb et Ehlers, 2010).

La voie de l'ubiquitination joue un rôle important dans la régulation de protéines au niveau du pré et du post-synaptique. Cela permet de moduler, entre autres, la plasticité neuronale, définie par un changement dans l'expression de récepteurs au niveau du PSD des neurones post-synaptiques (Jiang et al., 2006). Un de ces récepteurs, dont l'ubiquitination a été étudiée, est le récepteur AMPA. Celui-ci est un récepteur du glutamate et joue un rôle au niveau de l'apprentissage et de la mémoire. Des études ont démontré que l'ubiquitination de ce récepteur peut être médié par quatre différentes UBE3s (Nedd4-1, Nedd4-2, RNF167 et APC^{cdh1}). Parmi ces UBE3s, Nedd4-1 et Nedd4-2 sont des UBE3s à domaine HECT et sont directement responsables de l'ubiquitination du récepteur. RNF167 et APC^{cdh1} sont des UBE3s à domaine RING et agissent plutôt en tant qu'intermédiaire entre l'UBE2 et le substrat (Widagdo et al., 2017). Par contre, aucune étude ne s'est intéressée aux UBE2s permettant l'ajout de l'ubiquitine sur le récepteur.

L'étude se concentre sur la caractérisation de l'interaction entre l'UBE3 ligase, RNF167, et des enzymes conjugatrice de l'ubiquitine afin de trouver une UBE2

potentielle pouvant ubiquitiner les récepteurs AMPAs. Pour faire cette caractérisation, le but premier de l'étude était la purification d'une forme recombinante de la protéine d'intérêt RNF167. La première protéine purifiée avait une étiquette GST fusionnée à l'extrémité N-terminale et une étiquette HA fusionnée à l'extrémité C-terminale. Utiliser une étiquette GST permet une augmentation de la solubilité de la protéine recombinante et celle-ci peut se faire produire en grande quantité chez les bactéries. Par contre, étant donné que l'étiquette GST a un haut poids moléculaire (environ 26 kDa), elle peut changer les propriétés de la protéine recombinante (Kimple et al., 2013). C'est pour cette raison qu'il a fallu cliver cette étiquette de la protéine. Comme l'indique la figure 3.1, la purification de la protéine clivée n'a pas été efficace et le rendement était très faible. Par contre, la purification n'a été faite qu'avec la chromatographie d'affinité. Après le clivage, il aurait été possible d'isoler la protéine d'intérêt, RNF167-HA en utilisant la chromatographie d'exclusion de taille. Par contre, puisque la taille des fragments de clivage était proche de la taille de la protéine complète, il aurait été difficile de bien les séparer et d'avoir une protéine pure (fig. 3.1 C). Donc, produire une nouvelle construction de la protéine recombinante a été la formule privilégiée pour la purification de la protéine. Pour cette nouvelle construction, l'étiquette 6xHis a été fusionnée à l'extrémité C-terminale et l'étiquette HA a été fusionnée à l'extrémité N-terminale (fig. 3.2). Remplacer l'étiquette GST par l'étiquette 6xHis a eu l'avantage d'obtenir une protéine recombinante en une seule étape de purification et il n'y avait pas le besoin de cliver l'étiquette 6xHis puisque celle-ci était petite et peu encombrante. De plus, l'étiquette 6xHis ne change généralement pas la fonction de la protéine (Kimple et al., 2013). Donc, c'est ainsi qu'il a été possible d'obtenir une protéine recombinante de haute pureté.

Bien que la protéine RNF167 ait été purifiée, cela ne veut pas nécessairement dire qu'elle est fonctionnelle. Une façon d'estimer si la protéine est bien repliée est de déterminer si elle est active par un essai *in vitro* d'activité de la protéine. L'essai d'ubiquitination *in vitro* (fig 3.3 B) a donc été une méthode de choix afin d'évaluer la

fonctionnalité de la protéine. De plus, pour être en mesure de caractériser l'interaction entre RNF167 et les UBE2s, il faut d'abord trouver quelles sont les UBE2s qui peuvent interagir de façon fonctionnelle avec l'UBE3. Cet essai d'ubiquitination *in vitro* est une bonne méthode permettant de trouver des UBE2s interagissant avec les UBE3s et en plus, de déterminer que la protéine purifiée est fonctionnelle. van Wijk et al. (2009) avaient fait des essais de double hybride chez la levure afin de caractériser les interactions UBE3-UBE2. Les résultats qui ont été obtenus dans la présente étude concordent avec ce qui avait déjà été démontré lors de l'essai double hybride de van Wijk et al. (2009) pour la plupart des UBE2s. Par contre, lors de l'essai d'ubiquitination *in vitro* qui a été réalisé pour cette étude, il y a des incohérences selon les résultats obtenus. En effet, il y a de nouvelles UBE2s qui semblent interagir par rapport à l'essai double hybride. Donc, l'interaction entre RNF167 et UBE2A, UBE2B, UBE2C, UBE2K, UBE2R1 et UBE2T représentent de nouvelles interactions par rapport à ce qui a été démontré par l'étude de van Wijk et al. (2009). Ces différences peuvent être expliquées par l'approche utilisée par van Wijk et al. (2009) qui diffère de celle qui a été utilisée lors de cette étude. En effet, lors de cette présente étude la méthode d'ubiquitination *in vitro* a été employée. Lors d'un essai *in vitro*, les deux protéines sont disponibles en grande quantité, ce qui favorise l'interaction entre RNF167 et l'UBE2. Lors d'un essai double hybride, l'interaction des deux protéines recombinantes chez la levure est dépendante de leur niveau d'expression. De plus, il est connu que l'utilisation de cette méthode a la possibilité de ne pas détecter certains interacteurs (faux négatifs) (Bruckner et al., 2009).

Il a été démontré par Haldeman et al. (1997) qu'UBE2K est très réactive et que cette enzyme n'a pas besoin d'interagir avec une UBE3 pour former une chaîne d'ubiquitines. Il est possible que lors de l'essai d'ubiquitination *in vitro*, UBE2K ait interagi de façon indépendante de l'activité et de l'interaction avec le domaine RING de RNF167, ce qui pourrait expliquer la raison pour laquelle l'interaction entre ces deux protéines n'ait pas été détectée lors de l'essai double hybride. Lors de l'essai

double hybride de van Wijk et al. (2009) et celui in vitro de la présente étude, RNF167 n'a pas interagi avec UBE2F, UBE2I et UBE2M. Ces trois enzymes ne sont pas des E2s faisant partie de la voie de l'ubiquitination. Ainsi, l'absence d'interaction entre UBE2F, UBE2I et UBE2M et RNF167 indique que RNF167 est une enzyme UBE3 faisant partie de la voie de l'ubiquitination. En effet, UBE2F et UBE2M sont des E2s faisant partie de la voie de la NEDDylation. NEDD8 est une E2s qui interagit avec ces protéines et elle fait partie des protéines ayant une homologie de séquence avec l'ubiquitine menant à d'autres fonctions dans la cellule (Enchev et al., 2015). UBE2I est une E2 impliquée dans la voie de la SUMOylation et elle interagit avec la SUMO, qui est une autre protéine ayant une homologie de séquence avec l'ubiquitine et ayant d'autres fonctions dans la cellule (Stewart et al., 2016).

Les interactions in vitro entre RNF167 et les UBE2s indiquent que RNF167 pourrait être impliqué dans plusieurs rôles au niveau cellulaire. La particularité des UBE3s à domaine RING est que ces protéines peuvent mener à plusieurs types de chaînes d'ubiquitine sur le substrat par une interaction avec différentes UBE2s. En effet, c'est l'UBE2 qui fait l'ubiquitination du substrat, ce qui détermine le type de réponse au niveau de la cellule (Wenzel et al., 2011b). De plus, lors de l'essai d'ubiquitination in vitro, il est possible de remarquer que certaines UBE2s permettent de former une mono-ubiquitination et d'autres forment des chaînes d'ubiquitine. Ceci peut être observé en comparant l'augmentation du poids moléculaire de RNF167 avec ou sans l'ajout de l'ubiquitine sur la protéine. Par exemple, UBE2A est une UBE2 qui préconise la formation d'une mono-ubiquitination (Kim et al., 2005), ce qui est observé lors de l'essai in vitro (fig. 3.3 B). UBE2T préfère la formation d'une mono-ubiquitination, mais peut former n'importe quel type de chaîne in vitro (David et al., 2010). UBE2W ne peut qu'ajouter une molécule d'ubiquitine sur la portion N-terminale d'une protéine (Tatham et al., 2013), ce qui est aussi observé (fig. 3.3 B). Les autres UBE2s qui ont interagi avec RNF167 peuvent toutes former des chaînes d'ubiquitine in vitro (David et al., 2010). UBE2N ne peut que former une chaîne en K63 lorsqu'elle est aidée de

ces cofacteurs, UBEV1 ou UBE2V2 (Eddins et al., 2006). En effet, il est possible de remarquer que le poids moléculaire de RNF167 ubiquitiné est beaucoup plus élevé que l'ajout de 8.5 kDa du poids moléculaire d'une molécule d'ubiquitine (Callis, 2014), signifiant ainsi qu'il y a eu ajout d'une chaîne d'ubiquitine sur la protéine RNF167 (fig. 3.3 B).

Plusieurs études ont démontré la localisation de RNF167 au niveau de la membrane plasmique, des endosomes et des lysosomes (Deshar et al., 2016; Lussier et al., 2012; van Dijk et al., 2014; Yamazaki et al., 2013). De plus, cette enzyme est une protéine transmembranaire, donc il est impossible que RNF167 se retrouve dans le noyau sous sa forme complète. Le résultat d'immunofluorescence en cellule HEK293 confirme que RNF167 n'est pas localisé au noyau puisqu'il n'y a aucune colocalisation avec le DAPI, un marqueur de l'ADN et du noyau (fig. 3.6). Donc, les enzymes qui sont connues comme ayant un rôle exclusif dans le noyau, tel que UBE2B (Kim et al., 2005; Koken et al., 1991), UBE2C (Jin et al., 2008; Rape et Kirschner, 2004; Williamson et al., 2009), UBE2R1 (Butz et al., 2005; Sadowski et al., 2007) et UBE2T (Alpi et al., 2008; Longerich et al., 2009) ne représentent pas une priorité au niveau de l'étude de leur interaction avec RNF167. Par contre, les UBE2s localisées au niveau du cytoplasme ou de la membrane plasmique deviennent des cibles d'interaction intéressantes à étudier.

Un rôle connu de RNF167 au niveau des synapses de neurones est la régulation négative des récepteurs AMPAs, un récepteur du glutamate impliqué dans l'apprentissage et la mémoire (Chater et Goda, 2014). L'intérêt de l'étude est au niveau de l'interaction entre RNF167 et une UBE2 qui serait responsable de l'ubiquitination de ces récepteurs. Il est connu dans la littérature que le type d'ubiquitination sur les récepteurs AMPAs est par une chaîne K63 (Widagdo et al., 2015). Parmi les UBE2s qui se sont liés de façon fonctionnelle avec RNF167, seul UBE2N peut permettre de faire une chaîne K63 *in vivo* (Eddins et al., 2006). Pour s'assurer de l'interaction entre ces deux protéines, des essais d'interaction *in vitro* ont été faits (fig. 3.4 et 3.5). Les

essais de GST pull down qui ont été utilisés indiquent qu'il y a interaction spécifique entre RNF167 et UBE2N. Les essais de GST pull down sont couramment utilisés pour déterminer des interactions spécifiques entre des protéines (Ghosh et al., 2018; van Wijk et al., 2009). Dans un premier temps, l'essai d'interaction a été fait avec deux protéines purifiées (fig. 3.4 A). La protéine GST a été utilisée pour s'assurer de la spécificité de l'interaction. Par contre, la GST n'est pas une protéine faisant partie de la voie de l'ubiquitination ni n'est une protéine dont son ubiquitination a été démontrée dans la littérature. L'utilisation d'une UBE2 n'ayant pas interagi avec RNF167 lors de l'essai d'ubiquitination in vitro aurait été un meilleur contrôle pour assurer la spécificité d'interaction. Dans un deuxième temps, l'essai a été fait avec une protéine purifiée liée sur la résine Glutathione Sepharose et un lysat de cellules transfectées (fig. 3.4 B). Ces résultats ont permis de valider l'interaction entre RNF167 et UBE2N lorsque ces deux protéines étaient purifiées (fig. 3.4 A). L'interaction in vitro entre RNF167 et UBE2N valide les résultats de double hybride déjà démontré par l'étude de van Wijk et al. (2009). De plus, les résultats supportent l'interaction fonctionnelle observée lors de l'essai in vitro d'ubiquitination (fig. 3.3 B). L'utilisation d'un mutant du domaine RING de RNF167 aurait aussi permis de montrer que l'interaction physique et fonctionnelle de ces deux protéines passe par cette région.

L'interaction entre RNF167 et UBE2N en cellule n'a pas été démontrée jusqu'à présent. Comme ce que l'essai biophysique a démontré (fig. 3.5 C), l'interaction entre RNF167 et UBE2N est transitoire, étant donné que la constante de dissociation obtenue est de 1.063 μM (tab. 3.1). Ces résultats représentent une interaction entre une UBE2 et une UBE3 dans un système physiologique. La faible affinité du complexe diminue les chances de copurifier le complexe RNF167-UBE2N en cellule par une méthode biochimique d'interaction comme les immunoprécipitations (Wenzel et al., 2011b). Par contre, des méthodes existent pour observer une telle interaction et elles pourraient être utilisées pour démontrer qu'il y a bel et bien une interaction en cellule. En effet, il y a la possibilité d'utiliser un agent de liaison qui génère une liaison covalente entre deux

protéines qui interagissent au sein d'un mélange de protéines confiné dans une cellule. Pour ce faire, des cellules doivent exprimer les deux protéines d'intérêts et les cellules intactes doivent être mises en contact avec un agent de liaison bifonctionnel tel que le DSS, le DSG ou le DSP qui permettra la formation d'un lien amide covalent entre les deux protéines qui interagissent. Afin d'effectuer l'expérience, les cellules doivent ensuite être lysées et une immunoprécipitation peut être faite afin de confirmer l'interaction (Tang et Bruce, 2009). Une autre méthode qui aurait pu également être utilisée est celle de l'AlphaLISA®. Cette méthode utilise deux types de billes, une bille donneuse spécifique à une première protéine par l'entremise d'un anticorps lié sur la bille et une seconde bille accepteuse qui elle est spécifique à la deuxième protéine d'intérêt par l'entremise d'un autre anticorps. Lorsqu'il y a excitation de la bille donneuse, celle-ci génère des radicaux d'oxygène qui permettent l'excitation et l'émission de la fluorescence par la bille accepteuse. Pour qu'il y ait transfert de l'oxygène à la bille accepteuse, il faut que les deux billes soient proches, donc que les deux protéines interagissent entre elles. Cette méthode a comme avantage de pouvoir être utilisée à faible concentration en protéine et la méthode est simple d'utilisation et rapide (Beaudet et al., 2008). La méthode de BioID (proximity dependant biotin labelling) aurait également pu être utilisée afin de confirmer l'interaction entre RNF167 et UBE2N. Cette méthode a été utilisée pour déterminer l'interaction entre RNF167 et Arl8B en cellule (Deshar et al., 2016). Lors de l'étude de Deshar et al. (2016), la biotine ligase BirA a été fusionnée sur la portion C-terminale de RNF167. Ils ont produit une Ub modifiée sur lequel il y a eu ajout d'un peptide accepteur de biotine. Lorsque l'UBE2 ou le substrat, couplé à l'Ub modifiée, interagit avec RNF167, il y a transfert de la biotine sur une lysine du peptide accepteur. La détection de l'interaction peut se faire par colocalisation entre la biotine et RNF167 ou par immunoprécipitation de la protéine interagissant avec RNF167. Pour l'application de cette méthode dans la présente étude, la détection de la biotine dans l'immunoprécipitation indiquerait qu'il y a interaction entre RNF167 et UBE2N. Par contre, pour détecter l'Ub biotinée sur UBE2N, il faudrait utiliser un mutant d'UBE2N permettant l'attachement covalent de

l'Ub sur l'enzyme, en remplaçant la cystéine active de l'UBE2 par une sérine ou une lysine, par exemple.

Après avoir déterminé qu'il y a interaction entre RNF167 et UBE2N, la caractérisation de la cinétique de liaison du complexe a été faite (fig. 3.5). Pour ce faire, la méthode qui a été utilisée est celle du SPR, qui représente une méthode de choix pour l'étude d'interaction de macromolécules. En effet, cette méthode est adaptée pour permettre l'étude d'interaction de plusieurs analytes, comme les protéines (Kim et al., 2006), l'ADN (Teh et al., 2007), les sucres (Beccati et al., 2005) et les lipides (Erb et al., 2000). Il y a également possibilité de faire des études en immobilisant des membranes sur la puce. De plus, il n'y a pas besoin d'utiliser des protéines ayant une étiquette pour faire l'étude (Nguyen et al., 2015). Pour faire l'essai cinétique, la protéine purifiée HA-RNF167-6xHis a été liée de façon covalente sur une puce CM5 par liaison amide. Les résultats obtenus lors de l'étude de l'association et la dissociation du complexe RNF167-UBE2N par SPR indiquent que le K_D est de $1.063 \mu\text{M}$ (tab. 3.1), ce qui représente une interaction de type transitoire. Ces résultats sont conformes avec l'étude de Buetow et al. (2015) qui avaient utilisé la méthode de SPR pour déterminer l'affinité d'interaction entre différentes UBE3s ligase et des enzymes conjugatrice de l'ubiquitine couplées ou non avec l'ubiquitine. Par exemple, l'affinité entre le domaine RING de RNF38 et UBE2D3 non couplé à l'ubiquitine est de $89 \mu\text{M}$. La différence d'affinité entre l'étude présente et celle de Buetow et al. (2015) peut s'expliquer par la différence entre les formes recombinantes de leur UBE3 et celle de RNF167 purifiée dans la présente étude. En effet, lors de l'étude de Buetow et al. (2015), seul le domaine RING de l'UBE3 avait été purifié alors que toute la portion C-terminale de RNF167 a été purifiée. De plus, le domaine RING de RNF38 purifié par Buetow et al. (2015) a une étiquette GST, qui peut encombrer et affecter l'interaction UBE2D3-RNF38. Contrairement, la protéine RNF167 purifiée dans cette présente étude, contient deux étiquettes aux extrémités N-terminales et C-terminales de petite taille, diminuant les chances d'affecter l'interaction RNF167-UBE2N. Lors des essais cinétiques de l'étude,

la GST a été utilisée comme contrôle négatif vu la similarité du poids moléculaire de la protéine avec celui d'UBE2N. Cela indique que les signaux obtenus sont réellement spécifiques à l'interaction entre RNF167 et UBE2N. Lors de l'essai, il n'a été possible que d'obtenir un signal maximal de 12 RU, bien que ce signal a permis de mesurer un K_D avec une bonne fiabilité ($\text{Chi}^2=0.211$). Ce faible signal obtenu peut être expliqué par la méthode de couplage utilisée ne permettant pas de contrôler l'orientation de HA-RNF167-6xHis immobilisée. En effet, lors du couplage amide, tout groupement amine peut se lier de façon covalente avec le dextran carboxyméthylé sur la puce et il y a possibilité que la liaison covalente se produise dans le domaine RING, le domaine de liaison à l'UBE2, réduisant la possibilité d'interagir avec UBE2N. Pour remédier à cet inconvénient, un anticorps spécifique à une des deux protéines d'intérêt aurait pu être couplé sur la puce afin de capturer la première protéine et par la suite analyser plusieurs concentrations de la seconde protéine. Cette méthode aurait l'avantage d'orienter le domaine de liaison de RNF167 à UBE2N. Par contre, l'augmentation de la distance entre la puce et le complexe de protéines peut diminuer le signal maximal pouvant être mesuré en RU.

Bien que la méthode de SPR soit un essai bien reconnu dans la littérature, d'autres méthodes auraient également pu être utilisées, en plus du SPR, pour vérifier les résultats de K_D obtenus. Par exemple, l'ITC (titrage calorimétrique isothermique) utilise une cellule dans laquelle il y a une quantité de la première protéine. Ensuite, il y a injection graduelle de la seconde protéine dans la cellule. Cet essai permet de calculer le K_D d'après la chaleur dégagée qui est proportionnelle au niveau d'interaction entre les deux protéines. Cette méthode est simple et rapide et peut se faire en une seule étape (Liang, 2008). Par contre cette méthode requiert beaucoup d'analytes pour permettre d'obtenir de la chaleur permettant de mesurer l'affinité (Du et al., 2016). L'autre méthode qui aurait pu être utilisée est celle de l'AlphaScreen® qui utilise le même principe que la méthode d'AlphaLisa® décrite plus haut. L'AlphaScreen® se fait avec des protéines purifiées et le principe de titration est

produit en utilisant une seule concentration de la première protéine et différentes concentrations de la seconde protéine sur une microplaque. Comme pour l'AlphaLisa®, cette méthode est simple, rapide et les concentrations utilisées sont faibles.

Une fois que la cinétique d'interaction a été caractérisée, il est important d'observer la localisation cellulaire de l'interaction. Dans un premier temps, des cellules HEK293 ont été cotransfectées avec des protéines recombinantes GFP-UBE2N et RNF167-HA. Une immunofluorescence contre l'étiquette HA de RNF167 a permis de détecter la protéine en microscopie confocale (fig. 3.6). Selon les résultats obtenus, UBE2N est localisé au niveau du noyau et au niveau du cytoplasme. Ceci est en accord avec une étude qui démontre le rôle d'UBE2N au niveau de la réparation de l'ADN (Hofmann et Pickart, 1999). De plus, des études ont démontré qu'UBE2N est aussi localisé au niveau du cytoplasme par son interaction avec Parkin (Lim et al., 2013) et son rôle dans la signalisation de NF- κ B (Hodge et al., 2016). Par contre, la localisation de GFP peut changer la localisation de la protéine à cause de la taille de l'étiquette. De plus, selon les résultats de l'immunofluorescence avec la GFP seule, il est possible d'observer que celle-ci se retrouve partout dans la cellule, ce qui est la même localisation qu'UBE2N. Cependant, les résultats de fractionnement du cortex de souris supportent les résultats obtenus lors de l'immunofluorescence quant à la localisation et à l'expression d'UBE2N au niveau du cytoplasme (fig 3.8 B). Pour éviter cet inconvénient, il aurait été possible d'utiliser une protéine recombinante d'UBE2N avec une étiquette plus petite comme Flag ou Myc et faire une immunofluorescence contre cette étiquette ou encore d'utiliser un anticorps contre la protéine endogène. Par contre, puisque l'immunofluorescence contre l'étiquette HA de RNF167 a été faite, il faut faire attention de choisir un anticorps primaire provenant d'une autre espèce que celui de HA pour s'assurer que le signal est spécifique à UBE2N. De plus, il faut choisir un anticorps secondaire fluorescent qui sera excité à une autre longueur d'onde afin de pouvoir différencier les deux protéines. Pour ce qui est de RNF167, la localisation de

la protéine semble être au niveau du cytosol. Plusieurs études ont démontré que cette protéine joue un rôle au niveau des lysosomes et que la localisation de cette protéine est dans ce compartiment (Deshar et al., 2016; Lussier et al., 2012; van Dijk et al., 2014; Yamazaki et al., 2013). Donc, il est possible de déterminer que RNF167 est localisée aux lysosomes. Pour être certain de cette localisation, il aurait fallu utiliser un marqueur de lysosome comme Lamp-1 ou Lamp-2 par exemple. Donc, la colocalisation des deux protéines est au niveau du cytoplasme et plus précisément au niveau des lysosomes. Par contre, il a été démontré que l'utilisation d'un microscope confocal et de la méthode d'immunofluorescence ne fait qu'indiquer que les deux protéines se retrouvent dans le même espace cellulaire et donc cela ne montre pas réellement qu'il y a interaction entre RNF167 et UBE2N (Dunn et al., 2011). Par contre, l'interaction entre ces protéines a été démontrée par les essais in vitro présentés aux figures 3.3 B, 3.4 et 3.5 C. De plus, le modèle cellulaire utilisé n'est pas un modèle idéal en neuroscience. Des travaux futurs utilisant des neurones en culture permettront de démontrer l'expression de RNF167 et UBE2N dans le même compartiment par la méthode d'immunofluorescence.

Une autre méthode qui aurait pu être utilisée afin de déterminer spécifiquement qu'il y a interaction entre les deux protéines et qui utilise la microscopie est le FRET (transfert d'énergie de fluorescence par résonance). Cette méthode permet de déterminer s'il y a une interaction entre les deux protéines en cotransfectant RNF167 et UBE2N étiquetées par des protéines fluorescentes pouvant se coupler. Par exemple, la CFP peut être couplée avec la YFP et lorsque la CFP est excitée, il peut y avoir un transfert d'énergie sur la YFP qui sera excitée et qui émettra dans le jaune. Pour avoir l'émission dans le jaune, il faut que la CFP et la YFP soient très près l'une de l'autre, donc il faut que les deux protéines RNF167 et UBE2N interagissent ensemble. S'il n'y a pas d'interaction, il y aura émission exclusivement dans le bleu (Selvin, 2000).

L'utilisation de l'immunofluorescence a permis d'obtenir un résultat indiquant la possibilité d'une colocalisation en cellule entre RNF167 et UBE2N. Pour déterminer

la localisation des deux protéines au niveau des neurones, deux types de fractionnements d'un cortex de souris ont été faits (fig. 3.7 et 3.8). Le premier fractionnement permettait d'isoler les synaptoneurosomes (fig. 3.7 A) qui représentent un environnement refermé composé de la partie pré-synaptique et post-synaptique (Westmark et al., 2011). Dans la fraction cytosolique, il peut y avoir présence des membranes synaptiques non refermées. La localisation de l'expression de RNF167, UBE2N, UBE2V1 et UBE2V2 a été déterminée par l'utilisation d'anticorps spécifiques à ces protéines par immunobuvardage. UBE2V1 et UBE2V2 sont des cofacteurs d'UBE2N permettant la formation des chaînes d'ubiquitines en K63 (Widagdo et al., 2015). Il a été démontré par Lussier et al. (2012) que RNF167 est une protéine qui est exprimée au niveau des membranes synaptiques, des endosomes et des lysosomes, ce qui explique son expression au niveau du synaptosome. De plus, les études de Ma et al. (2017) et de Yin et al. (2015) ont démontré qu'UBE2N est exprimé au niveau du synaptosome. Ainsi, puisque UBE2N a besoin de ses cofacteurs, il est normal que la localisation de l'expression d'UBE2V1 et d'UBE2V2 soit la même.

Un second fractionnement a permis d'étudier plus en détail les membranes du synaptosome afin de les séparer en membranes denses en protéines (PSD) et en membranes moins denses. Ces dernières représentent les membranes latérales du synaptosome et sont solubles dans le triton X-100 (SPSD) (fig 3.8 A). La localisation de RNF167 dans le PSD est en accord avec la localisation de la protéine au niveau des endosomes et des lysosomes. Cette localisation est en lien avec le rôle de RNF167 dans l'ubiquitination des récepteurs AMPAs qui va se produire lorsque le récepteur va se déplacer vers les membranes latérales (Lussier et al., 2012). La localisation de RNF167, bien que l'expression soit en faible quantité, au niveau du PSD semble ne pas convenir avec le rôle de la protéine. Une étude qui a isolé le PSD a utilisé un gradient de sucrose après avoir fait l'extraction au triton X-100 afin de bien isoler le PSD (Therien et Mushynski, 1976). De plus, le culot obtenu contenant la fraction PSD n'a pas été lavé, pouvant expliquer une contamination par la fraction PSD. Alors, les

résultats obtenus peuvent être un décalage de la limitation du protocole de fractionnement qui a été utilisé. Par contre, étant donné que le PSD est composé de plusieurs protéines, il se peut que RNF167 interagisse avec une des protéines du PSD, ce qui peut expliquer sa localisation. Pour ce qui est de la localisation d'UBE2N et de ces cofacteurs, celle-ci ne semble pas concorder avec l'étude de Ma et al. (2017). En effet, cette étude a démontré qu'UBE2N et UBE2V1 sont localisés au niveau du PSD, alors que le fractionnement obtenu (fig. 3.8 B) ne montre aucune localisation d'UBE2V1 ou UBE2V2 au PSD et qu'il semble y avoir une faible expression d'UBE2N au PSD. Encore une fois, la localisation d'UBE2N au PSD peut être due aux mêmes raisons qui expliquent la localisation de RNF167 dans ce compartiment. L'expression des UBE2s dans le LS1 confirme la présence dans le cytosol lors de l'immunofluorescence en cellule HEK293 de UBE2N (fig. 3.6). La localisation des UBE2s au niveau du SPSD indique que ces protéines vont interagir avec une protéine membranaire puisqu'elles n'ont pas de domaine transmembranaire. Comme l'interaction de RNF167 et UBE2N a été démontrée *in vitro* (fig. 3.3 B, 3.4 B et 3.5 C), il est possible de supposer que l'interaction en neurone se ferait au niveau du SPSD, ce qui rend encore plus intéressante l'étude d'interaction entre RNF167 et UBE2N et leur implication au niveau de la régulation des récepteurs AMPAs.

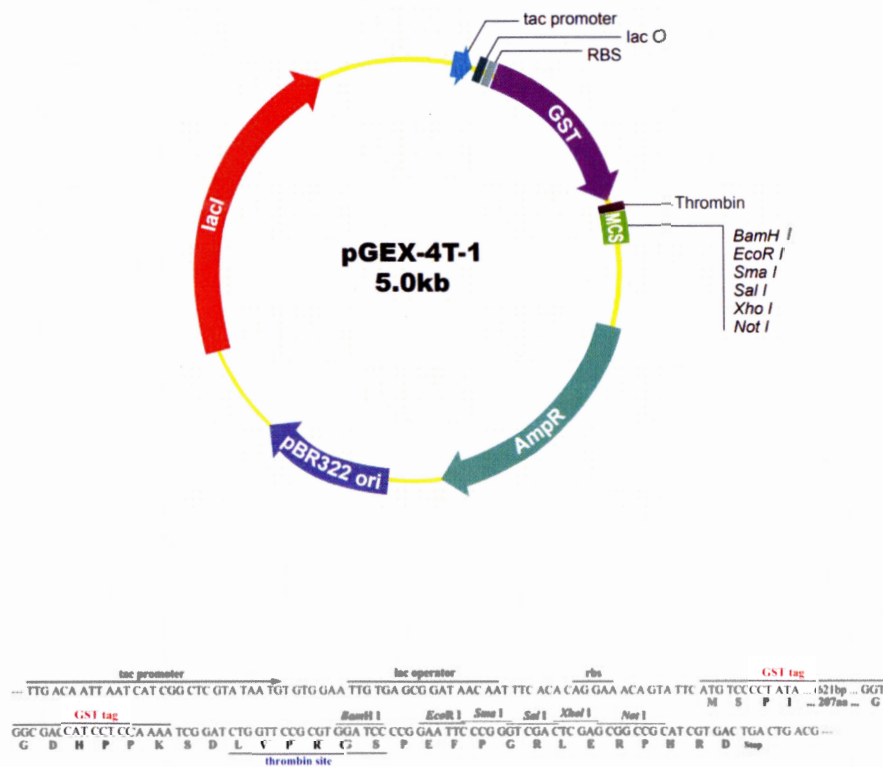
CHAPITRE V

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude a permis la caractérisation de l'interaction entre RNF167 et les UBE2s. Dans un premier temps, il a été possible de purifier une forme recombinante de RNF167 après des étapes d'optimisation en ajoutant une étiquette HA a été fusionnée à l'extrémité N-terminale et une étiquette 6xHis a été fusionnée C-terminale. Cette protéine était dépourvue du domaine transmembranaire en N-terminale de la protéine pour ne garder que la partie C-terminale de RNF167 qui contient le domaine RING permettant la liaison aux UBE2s. Ensuite, un essai d'ubiquitination in vitro a permis d'identifier les UBE2s qui peuvent se lier de façon fonctionnelle avec l'UBE3 ligase RNF167. Parmi ces UBE2, l'étude de l'interaction entre RNF167 et UBE2N a été faite puisqu'il s'agit de la seule UBE2 permettant de former des chaînes K63, qui est le même type d'ubiquitination des récepteurs AMPAs, un des substrats connus de RNF167. Des essais in vitro ont démontré qu'il y a bel et bien une interaction entre ces deux protéines et la cinétique de liaison montre qu'il s'agit d'une interaction transitoire. La localisation au niveau des cellules HEK293 montre que RNF167 et UBE2N peuvent être situées dans le même espace cellulaire au niveau du cytoplasme et que cette localisation pourrait être au niveau des lysosomes puisque RNF167 est connu comme étant localisé dans ce compartiment. Finalement, RNF167 et UBE2N, ainsi que ses cofacteurs, UBE2V1 et UBE2V2, sont localisées au niveau des neurones dans le compartiment du SPSD. Ces résultats permettent de supposer qu'UBE2N pourrait être un bon candidat pour l'ubiquitination des récepteurs AMPAs.

Pour être certain de ces résultats, il faut faire des essais *in vitro* et en cellule afin de faire le lien entre l'ubiquitination des récepteurs AMPAs et le couple RNF167/UBE2N, sans oublier les cofacteurs d'UBE2N qui permettent la formation de la chaîne. Pour ce faire, des études d'interaction entre UBE2N et des sous-unités du récepteur pourraient être faites. Ensuite, le niveau d'expression du récepteur pourrait être comparé lorsqu'il y a surexpression ou délétion de l'expression d'UBE2N. Finalement, il serait intéressant de déterminer quelle est l'UBE2 qui permet l'ajout de la première ubiquitine sur le récepteur étant donné qu'UBE2N ne peut ajouter d'ubiquitine sur les substrats *in vivo* (Christensen et al., 2007; Windheim et al., 2008). Selon les UBE2s qui ont interagi de façon fonctionnelle avec RNF167, il y a possibilité qu'il s'agisse d'une des enzymes de la famille des UBE2Ds.

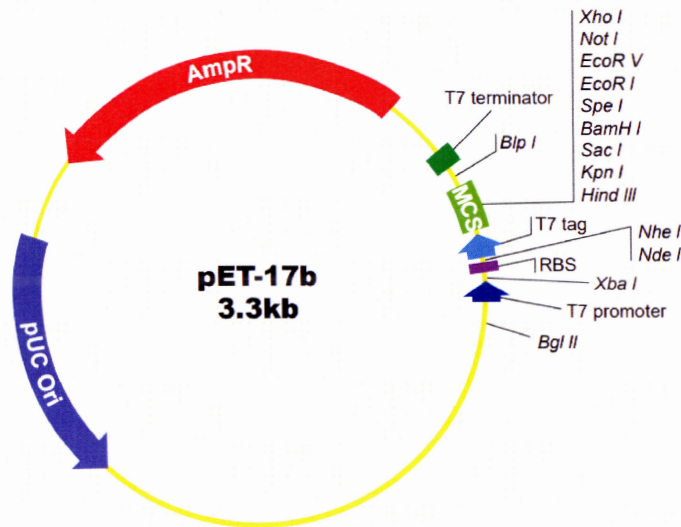
ANNEXE A



GGATCCTGCATCCAGCACCGCAAACGCCTGCAACGCAACCGCCTGACCAAGGAGCAACTGAAACAG
 ATTCCGACCCACGATTACCAAAAGGGCGACCAGTACGATGTGTGCGCGATCTGCCTGGACGAATATG
 AGGACGGTGATAAACTGCGTGTCTGCCGTGCCGCGCATGCGTACCACAGCCGTTGCGTTGATCCGTG
 GCTGACCCAGACCCGTAAGACCTGCCCGATTTGCAAAACAACCGGTTACCGTGGTCCGGGCGACGA
 AGATCAGGAAGAGGAAACCCAGGGTCAAGAAGAGGGTGATGAAGGTGAACCGCGTGATCACCCGG
 CGAGCGAACGTACCCCGCTGCTGGGTAGCAGCCCGACCCTGCCGACCAGCTTCGGCAGCCTGGCGCC
 GGC GCC GCT GGT GTT TCC GGG CCG GAG C ACC G ACC G C T G A G C C C G C C G A G C A G C C C G T T A T T
 CTGGTGTACCCGTATGATGTGCCGGACTATGCGT**AAAGTCGAC**

Figure S1. Cartographie de pGEX-4T-1 et séquence de RNF167-HA. La séquence d'ADN (a.a. 195-350) a été insérée aux sites BamHI et SalI par GenScript. Vert: séquence ADN de l'étiquette HA. Rouge: Le site de BamHI. Orange: Site de SalI.

ANNEXE C



```

Bgl II          T7 promoter          Xba I          rbs
--- A GAT CTC GAT CCC GCG AAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA CCA CAA CGG TTT CCC TCT AGA AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT
Nde I   Nhe I   T7 tag          Hind III   Kpn I   Sac I   BamH I   Spe I          EcoR I
ATA CAT ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT TCA ACC TTG GTA CCG AGC TCG GAT CCA CTA GTA ACG GCC GCC AGT GTG CTG GAA TTC
M A S M T G G Q Q M G R D S S L V P S S S D P L V T A A S V L E F
EcoR V          Not I          Xho I          Bsp I
TGC AGA TAT CCA TCA CAC TGG CGG CCG CTC GAG CAG ATC CCG CTG CTA ACA AAG CCC GAA AGG AAG CTG AGT TGG CTG CTG CCA CCG CTG AGC AAT
C R Y P S H W R P L E Q I R L L T K P E R K L S W L L P P L S N
T7 terminator
AAC TAG CAT AAC CCC TTG GGG CCT CTA AAC GGG TCT TGA GGG GTT TTT TG ---

```

GCTAGCCATCATCACCAACCACCATGGATCCATGGCGGGCCTGCCGCGTCGCATTATCAAGGAAACCCA
 ACGTCTGCTGGCGGAGCCGGTGCCGGGTATCAAAGCGGAGCCGGACGAGAGCAACGCGCGTTACTTTC
 ACGTGGTTATTGCGGGTCCGCAAGACAGCCCGTTTGAGGGTGGCACCTTTAAGCTGGAACGTTCCTG
 CCGGAGGAATACCCGATGGCGGCGCCGAAAGTGCGTTTTATGACCAAAATTTATCACCCGAACGTTGA
 TAAACTGGGCCGTATCTGCCTGGACATCTCTGAAGGATAAATGGAGCCC GGCGCTGCAGATCCGTACCG
 TGCTGCTGAGCATTCAAGCGCTGCTGAGCGCGCCGAACCCGGATGATCCGCTGGCGAACGACGTTGCG
 GAGCAATGGAAGACCAACGAAGCGCAAGCGATTGAGACCGCGCTGCGTGGACCCGCGCTGTATGCGAT
 GAACAACATTTAAG**TCGACGAATTC**

Figure S3. Cartographie de pET-17b et séquence de 6xHis-UBE2N. La séquence d'ADN a été insérée aux sites NheI et EcoRI par GenScript. Vert: séquence ADN de l'étiquette 6xHis. Bleu : Le site de NheI. Orange: Site de BamHI. Mauve: Le site de Sall. Rouge: Le site d'EcoRI.

ANNEXE D

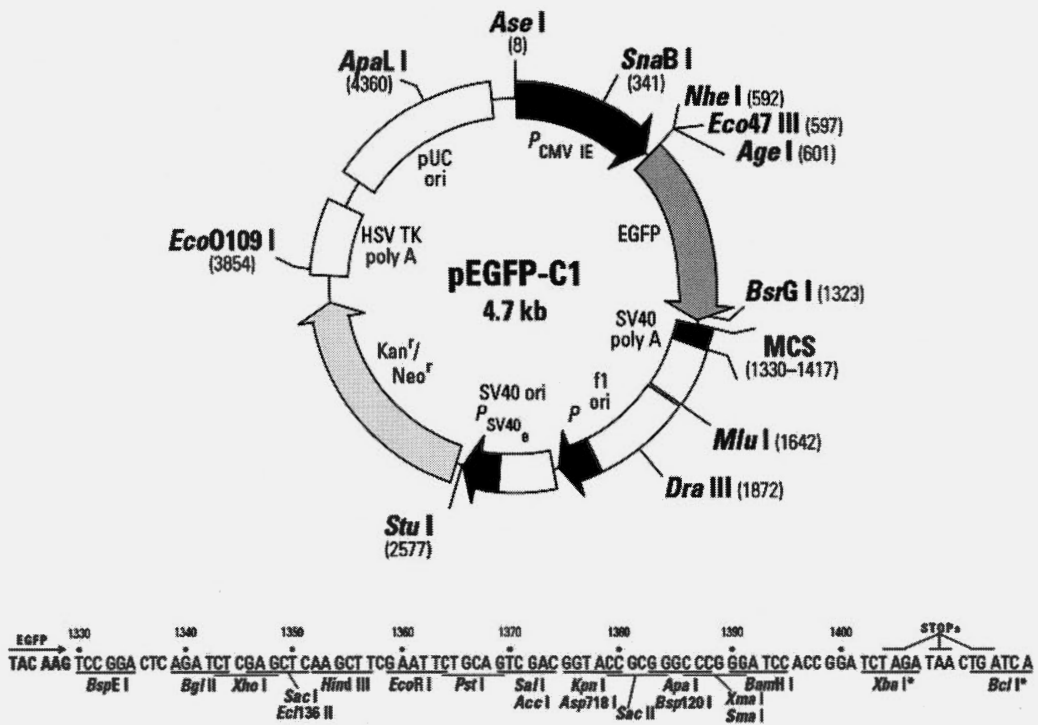


Figure S4. Cartographie et séquence des sites des enzymes de restriction du vecteur pEGFP-C1.

ANNEXE E

GGATCCATGGCGGGCCTGCCGCGTCGCATTATCAAGGAAACCCAACGTCTGCTGGCGGAGCCGGTGCC
GGGTATCAAAGCGGAGCCGGACGAGAGCAACGCGCGTTACTTTCACGTGGTTATTGCGGGTCCGCAAG
ACAGCCCGTTTGAGGGTGGCACCTTTAAGCTGGAAGTTCCTGCCGGAGGAATACCCGATGGCGGCG
CCGAAAGTGCCTTTCATGACCAAAATTTATCACCCGAACGTTGATAAACTGGGCCGTATCTGCCTGGA
CATTCTGAAGGATAAATGGAGCCCGGCGCTGCAGATCCGTACCGTGCTGCTGAGCATTCAAGCGCTGC
TGAGCGCGCCGAACCCGGATGATCCGCTGGCGAACGACGTTGCCGGAGCAATGGAAGACCAACGAAGCG
CAAGCGATTGAGACCGCGCTGCGTGGACCCGCTGTATGCGATGAACAACATTTAA^{GTCGACGAATT}
C

Figure S5. Séquence d'ADN d'UBE2N insérée dans le vecteur pGEX-4T-1 et dans le vecteur pEGFP-C1. La séquence d'ADN d'UBE2N a été coupée aux sites BamHI et EcoRI du vecteur pET-17b-6xHis-UBE2N. Le vecteur pEGFP-C1 a été coupé aux sites BglII et EcoRI tandis que le vecteur pGEX-4T-1 a été coupé aux sites BamHI et EcoRI. Orange: Site de BamHI. Mauve: Le site de Sall. Rouge: Le site d'EcoRI.

ANNEXE F

GGATCCTACCCGTATGATGTGCCGGACTATGCGTGCATCCAGCACCGCAAACGCCTGCAACGCAACCG
CCTGACCAAGGAGCAACTGAAACAGATTCCGACCCACGATTACCAAAAGGGCGACCAGTACGATGTGT
GCGCGATCTGCCTGGACGAATATGAGGACGGTGATAAACTGCGTGTCTGCCGTGCGCGCATGCGTAC
CACAGCCGTTGCGTTGATCCGTGGCTGACCCAGACCCGTAAGACCTGCCCGATTGCAAACAACCGGT
TCACCGTGGTCCGGGCGACGAAGATCAGGAAGAGGAAACCCAGGGTCAAGAAGAGGGTGATGAAGGTG
AACCGCGTGATCACCCGGCGAGCGAACGTACCCCGCTGCTGGGTAGCAGCCCGACCCTGCCGACCAGC
TTCGGCAGCCTGGCGCCGGCGCCGCTGGTGTTCGCGGCGGAGCACCGACCCGCGGCTGAGCCCGCC
GAGCAGCCCGGTTATTCTGGTGCATCATCACCACCACCATTAAGTCGAC

Figure S6. Séquence d'ADN de HA-RNF167-6xHis insérée dans le vecteur pGEX-4T-1. La séquence d'ADN de HA-RNF167-6xHis a été coupée dans le vecteur pET-52b(+)-HA-RNF167-6xHis aux sites BamHI et Sall. Le vecteur pGEX-4T-1 a été coupé aux sites BamHI et Sall. Vert: séquence ADN de l'étiquette 6xHis. Rouge: séquence ADN de l'étiquette HA. Orange: Site de BamHI. Mauve: Le site de Sall.

ANNEXE G

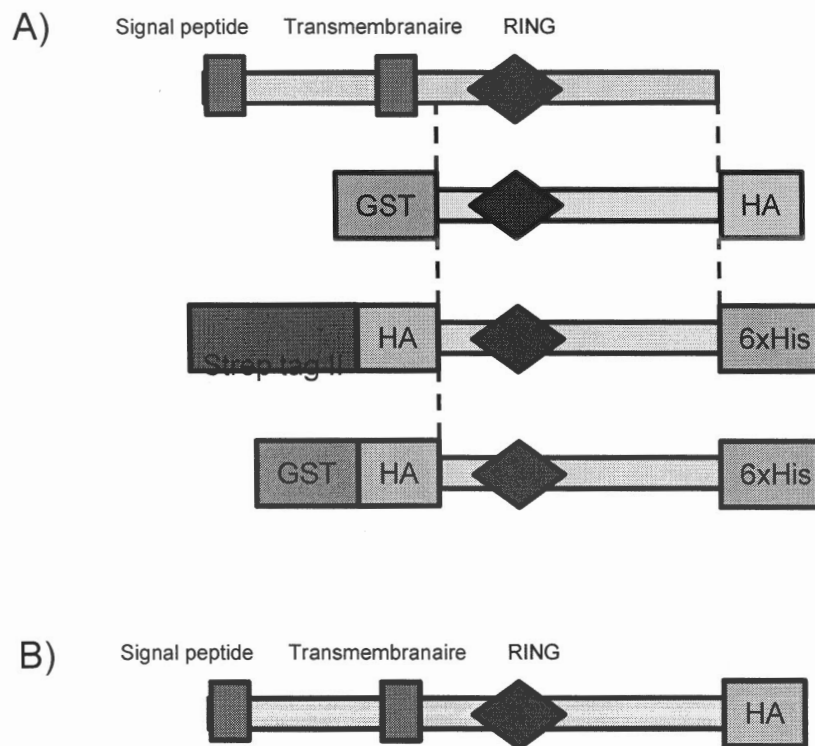


Figure S7. Construction des protéines recombinantes de RNF167 et leurs étiquettes. A) La portion C-terminale de la protéine RNF167 (a.a. 195-350) contenant le domaine RING (domaine de liaison aux UBE2s) a été gardée et des étiquettes ont été ajoutées pour la purification par chromatographie d'affinité et pour la détection de la protéine. B) La protéine entière a été exprimée chez les cellules et une étiquette en HA en N-terminale a été ajoutée pour la détection de la protéine.

ANNEXE H

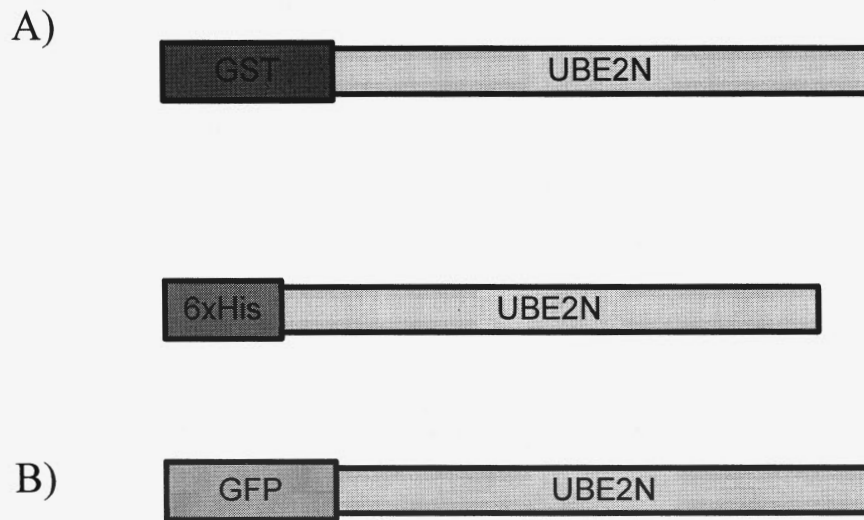


Figure S8. Construction des protéines recombinantes d'UBE2N et leurs étiquettes. A) L'ensemble de la protéine UBE2N a été gardé et une étiquette a été ajoutée en N-terminale pour la purification de la protéine par chromatographie d'affinité. B) Une étiquette GFP en N-terminale a été ajoutée sur la protéine entière pour la détection de UBE2N en cellule par microscopie fluorescence.

RÉFÉRENCES

- Alpi, A.F., P.E. Pace, M.M. Babu, and K.J. Patel. 2008. Mechanistic insight into site-restricted monoubiquitination of FANCD2 by Ube2t, FANCL, and FANCI. *Molecular cell*. 32:767-777.
- Ardito, F., M. Giuliani, D. Perrone, G. Troiano, and L. Lo Muzio. 2017. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *International journal of molecular medicine*. 40:271-280.
- Arjonen, A., R. Kaukonen, E. Mattila, P. Rouhi, G. Hognas, H. Sihto, B.W. Miller, J.P. Morton, E. Bucher, P. Taimen, R. Virtakoivu, Y. Cao, O.J. Sansom, H. Joensuu, and J. Ivaska. 2014. Mutant p53-associated myosin-X upregulation promotes breast cancer invasion and metastasis. *The Journal of clinical investigation*. 124:1069-1082.
- Barriere, H., C. Nemes, K. Du, and G.L. Lukacs. 2007. Plasticity of polyubiquitin recognition as lysosomal targeting signals by the endosomal sorting machinery. *Molecular biology of the cell*. 18:3952-3965.
- Beaudet, L., R. Rodriguez-Suarez, M.-H. Venne, M. Caron, J. Bédard, V. Brechler, S. Parent, and M. Bielefeld-Sévigny. 2008. AlphaLISA immunoassays: the no-wash alternative to ELISAs for research and drug discovery. *Nature methods*. 5:A10.
- Beccati, D., K.M. Halkes, G.D. Batema, G. Guillena, A. Carvalho de Souza, G. van Koten, and J.P. Kamerling. 2005. SPR studies of carbohydrate-protein interactions: signal enhancement of low-molecular-mass analytes by organoplatinum(II)-labeling. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. 6:1196-1203.
- Bocock, J.P., S. Carmicle, S. Chhotani, M.R. Ruffolo, H. Chu, and A.H. Erickson. 2009. The PA-TM-RING protein RING finger protein 13 is an endosomal integral membrane E3 ubiquitin ligase whose RING finger domain is released to the cytoplasm by proteolysis. *The FEBS journal*. 276:1860-1877.
- Bruckner, A., C. Polge, N. Lentze, D. Auerbach, and U. Schlattner. 2009. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International journal of molecular sciences*. 10:2763-2788.
- Buetow, L., M. Gabrielsen, N.G. Anthony, H. Dou, A. Patel, H. Aitkenhead, G.J. Sibbet, B.O. Smith, and D.T. Huang. 2015. Activation of a primed RING E3-E2-ubiquitin complex by non-covalent ubiquitin. *Molecular cell*. 58:297-310.

- Butz, N., S. Ruetz, F. Natt, J. Hall, J. Weiler, J. Mestan, M. Ducarre, R. Grossenbacher, P. Hauser, D. Kempf, and F. Hofmann. 2005. The human ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 controls cellular proliferation through regulation of p27Kip1 protein levels. *Experimental cell research*. 303:482-493.
- Callis, J. 2014. The ubiquitination machinery of the ubiquitin system. *The arabidopsis book*. 12:e0174.
- Chagastelles, P.C., and N.B. Nardi. 2011. Biology of stem cells: an overview. *Kidney international supplements*. 1:63-67.
- Chater, T.E., and Y. Goda. 2014. The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Frontiers in cellular neuroscience*. 8:401.
- Chen, X., C.D. Nelson, X. Li, C.A. Winters, R. Azzam, A.A. Sousa, R.D. Leapman, H. Gainer, M. Sheng, and T.S. Reese. 2011. PSD-95 is required to sustain the molecular organization of the postsynaptic density. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 31:6329-6338.
- Christensen, D.E., P.S. Brzovic, and R.E. Klevit. 2007. E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages. *Nature structural & molecular biology*. 14:941-948.
- David, Y., T. Ziv, A. Admon, and A. Navon. 2010. The E2 ubiquitin-conjugating enzymes direct polyubiquitination to preferred lysines. *The Journal of biological chemistry*. 285:8595-8604.
- Deshar, R., S. Moon, W. Yoo, E.B. Cho, S.K. Yoon, and J.B. Yoon. 2016. RNF167 targets Arl8B for degradation to regulate lysosome positioning and endocytic trafficking. *The FEBS journal*. 283:4583-4599.
- Dou, H., L. Buetow, G.J. Sibbet, K. Cameron, and D.T. Huang. 2013. Essentiality of a non-RING element in priming donor ubiquitin for catalysis by a monomeric E3. *Nature structural & molecular biology*. 20:982-986.
- Du, X., Y. Li, Y.L. Xia, S.M. Ai, J. Liang, P. Sang, X.L. Ji, and S.Q. Liu. 2016. Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *International journal of molecular sciences*. 17.
- Dunn, K.W., M.M. Kamocka, and J.H. McDonald. 2011. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American journal of physiology. Cell physiology*. 300:C723-742.
- Eddins, M.J., C.M. Carlile, K.M. Gomez, C.M. Pickart, and C. Wolberger. 2006. Mms2-Ubc13 covalently bound to ubiquitin reveals the structural basis of linkage-specific polyubiquitin chain formation. *Nature structural & molecular biology*. 13:915-920.
- Enchev, R.I., B.A. Schulman, and M. Peter. 2015. Protein neddylation: beyond cullin-RING ligases. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 16:30-44.
- Erb, E.M., X. Chen, S. Allen, C.J. Roberts, S.J. Tendler, M.C. Davies, and S. Forsen. 2000. Characterization of the surfaces generated by liposome binding to the modified dextran matrix of a surface plasmon resonance sensor chip. *Analytical biochemistry*. 280:29-35.

- Eyster, C.A., N.B. Cole, S. Petersen, K. Viswanathan, K. Fruh, and J.G. Donaldson. 2011. MARCH ubiquitin ligases alter the itinerary of clathrin-independent cargo from recycling to degradation. *Molecular biology of the cell*. 22:3218-3230.
- Gareau, J.R., and C.D. Lima. 2010. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 11:861-871.
- Gatti, M., S. Pinato, A. Maiolica, F. Rocchio, M.G. Prato, R. Aebersold, and L. Penengo. 2015. RNF168 promotes noncanonical K27 ubiquitination to signal DNA damage. *Cell reports*. 10:226-238.
- Ghosh, S., L.A. Leaton, L. Farr, A. Barfield, and S. Moonah. 2018. Interaction between parasite-encoded JAB1/CSN5 and macrophage migration inhibitory factor proteins attenuates its proinflammatory function. *Scientific reports*. 8:10241.
- Haglund, K., and I. Dikic. 2005. Ubiquitylation and cell signaling. *The EMBO journal*. 24:3353-3359.
- Haglund, K., S. Sigismund, S. Polo, I. Szymkiewicz, P.P. Di Fiore, and I. Dikic. 2003. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nature cell biology*. 5:461-466.
- Haldeman, M.T., G. Xia, E.M. Kasperek, and C.M. Pickart. 1997. Structure and function of ubiquitin conjugating enzyme E2-25K: the tail is a core-dependent activity element. *Biochemistry*. 36:10526-10537.
- Hatakeyama, S., M. Yada, M. Matsumoto, N. Ishida, and K.I. Nakayama. 2001. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *The Journal of biological chemistry*. 276:33111-33120.
- Hodge, C.D., L. Spyrapoulos, and J.N. Glover. 2016. Ubc13: the Lys63 ubiquitin chain building machine. *Oncotarget*. 7:64471-64504.
- Hoegel, C., B. Pfander, G.L. Moldovan, G. Pyrowolakis, and S. Jentsch. 2002. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*. 419:135-141.
- 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*. 96:645-653.
- Huang, D.T., H.W. Hunt, M. Zhuang, M.D. Ohi, J.M. Holton, and B.A. Schulman. 2007. Basis for a ubiquitin-like protein thioester switch toggling E1-E2 affinity. *Nature*. 445:394-398.
- Huang, D.T., H. Walden, D. Duda, and B.A. Schulman. 2004. Ubiquitin-like protein activation. *Oncogene*. 23:1958-1971.
- Huang, L., E. Kinnucan, G. Wang, S. Beaudenon, P.M. Howley, J.M. Huibregtse, and N.P. Pavletich. 1999. Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science*. 286:1321-1326.
- Jakel, S., and L. Dimou. 2017. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Frontiers in cellular neuroscience*. 11:24.

- Jiang, J., V. Suppiramaniam, and M.W. Wooten. 2006. Posttranslational modifications and receptor-associated proteins in AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Neuro-Signals*. 15:266-282.
- Jin, L., A. Williamson, S. Banerjee, I. Philipp, and M. Rape. 2008. Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell*. 133:653-665.
- Johnson, M.W., J.K. Chotiner, and J.B. Watson. 1997. Isolation and characterization of synaptoneurosomes from single rat hippocampal slices. *Journal of neuroscience methods*. 77:151-156.
- Joo, H.M., J.Y. Kim, J.B. Jeong, K.M. Seong, S.Y. Nam, K.H. Yang, C.S. Kim, H.S. Kim, M. Jeong, S. An, and Y.W. Jin. 2011. Ret finger protein 2 enhances ionizing radiation-induced apoptosis via degradation of AKT and MDM2. *European journal of cell biology*. 90:420-431.
- Joukov, V., J. Chen, E.A. Fox, J.B. Green, and D.M. Livingston. 2001. Functional communication between endogenous BRCA1 and its partner, BARD1, during *Xenopus laevis* development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:12078-12083.
- Kerscher, O., R. Felberbaum, and M. Hochstrasser. 2006. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annual review of cell and developmental biology*. 22:159-180.
- Kim, H.C., and J.M. Huibregtse. 2009. Polyubiquitination by HECT E3s and the determinants of chain type specificity. *Molecular and cellular biology*. 29:3307-3318.
- Kim, J., S.B. Hake, and R.G. Roeder. 2005. The human homolog of yeast BRE1 functions as a transcriptional coactivator through direct activator interactions. *Molecular cell*. 20:759-770.
- Kim, M., K. Park, E.J. Jeong, Y.B. Shin, and B.H. Chung. 2006. Surface plasmon resonance imaging analysis of protein-protein interactions using on-chip-expressed capture protein. *Analytical biochemistry*. 351:298-304.
- Kimple, M.E., A.L. Brill, and R.L. Pasker. 2013. Overview of affinity tags for protein purification. *Current protocols in protein science*. 73:Unit 9 9.
- Koken, M.H., P. Reynolds, I. Jaspers-Dekker, L. Prakash, S. Prakash, D. Bootsma, and J.H. Hoeijmakers. 1991. Structural and functional conservation of two human homologs of the yeast DNA repair gene RAD6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88:8865-8869.
- Komander, D. 2009. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society transactions*. 37:937-953.
- Komander, D., M.J. Clague, and S. Urbe. 2009. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10:550-563.
- Kwon, S.E., and E.R. Chapman. 2011. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. *Neuron*. 70:847-854.

- Liang, Y. 2008. Applications of isothermal titration calorimetry in protein science. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 40:565-576.
- Lim, G.G., K.C. Chew, X.H. Ng, A. Henry-Basil, R.W. Sim, J.M. Tan, C. Chai, and K.L. Lim. 2013. Proteasome inhibition promotes Parkin-Ubc13 interaction and lysine 63-linked ubiquitination. *PLoS one*. 8:e73235.
- Longerich, S., J. San Filippo, D. Liu, and P. Sung. 2009. FANCI binds branched DNA and is monoubiquitinated by UBE2T-FANCL. *The Journal of biological chemistry*. 284:23182-23186.
- Lu, J.P., Y. Wang, D.A. Sliter, M.M. Pearce, and R.J. Wojcikiewicz. 2011. RNF170 protein, an endoplasmic reticulum membrane ubiquitin ligase, mediates inositol 1,4,5-trisphosphate receptor ubiquitination and degradation. *The Journal of biological chemistry*. 286:24426-24433.
- Lussier, M.P., B.E. Herring, Y. Nasu-Nishimura, A. Neutzner, M. Karbowski, R.J. Youle, R.A. Nicoll, and K.W. Roche. 2012. Ubiquitin ligase RNF167 regulates AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:19426-19431.
- Ma, Q., H. Ruan, L. Peng, M. Zhang, M.U. Gack, and W.D. Yao. 2017. Proteasome-independent polyubiquitin linkage regulates synapse scaffolding, efficacy, and plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 114:E8760-E8769.
- Mabb, A.M., and M.D. Ehlers. 2010. Ubiquitination in postsynaptic function and plasticity. *Annual review of cell and developmental biology*. 26:179-210.
- Messing, A., and M. Brenner. 2003. GFAP: functional implications gleaned from studies of genetically engineered mice. *Glia*. 43:87-90.
- Metzger, M.B., V.A. Hristova, and A.M. Weissman. 2012. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *Journal of cell science*. 125:531-537.
- Metzger, M.B., J.N. Pruneda, R.E. Klevit, and A.M. Weissman. 2014. RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination. *Biochimica et biophysica acta*. 1843:47-60.
- Middleton, A.J., and C.L. Day. 2015. The molecular basis of lysine 48 ubiquitin chain synthesis by Ube2K. *Scientific reports*. 5:16793.
- Morris, J.R., and E. Solomon. 2004. BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Human molecular genetics*. 13:807-817.
- Nakamura, N. 2011. The Role of the Transmembrane RING Finger Proteins in Cellular and Organelle Function. *Membranes*. 1:354-393.
- Nguyen, H.H., J. Park, S. Kang, and M. Kim. 2015. Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications. *Sensors (Basel)*. 15:10481-10510.
- Nguyen, L.K., W. Kolch, and B.N. Kholodenko. 2013. When ubiquitination meets phosphorylation: a systems biology perspective of EGFR/MAPK signalling. *Cell communication and signaling : CCS*. 11:52.

- Ogunjimi, A.A., D.J. Briant, N. Pece-Barbara, C. Le Roy, G.M. Di Guglielmo, P. Kavsak, R.K. Rasmussen, B.T. Seet, F. Sicheri, and J.L. Wrana. 2005. Regulation of Smurf2 ubiquitin ligase activity by anchoring the E2 to the HECT domain. *Molecular cell*. 19:297-308.
- Olsen, S.K., and C.D. Lima. 2013. Structure of a ubiquitin E1-E2 complex: insights to E1-E2 thioester transfer. *Molecular cell*. 49:884-896.
- Pawson, T. 2002. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer*. 38 Suppl 5:S3-10.
- Pu, J., C.M. Guardia, T. Keren-Kaplan, and J.S. Bonifacino. 2016. Mechanisms and functions of lysosome positioning. *Journal of cell science*. 129:4329-4339.
- Rabut, G., and M. Peter. 2008. Function and regulation of protein neddylation. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO reports*. 9:969-976.
- Rahighi, S., F. Ikeda, M. Kawasaki, M. Akutsu, N. Suzuki, R. Kato, T. Kensche, T. Uejima, S. Bloor, D. Komander, F. Randow, S. Wakatsuki, and I. Dikic. 2009. Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation. *Cell*. 136:1098-1109.
- Rape, M., and M.W. Kirschner. 2004. Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. *Nature*. 432:588-595.
- Reynolds, N., M. Salmon-Divon, H. Dvinge, A. Hynes-Allen, G. Balasooriya, D. Leaford, A. Behrens, P. Bertone, and B. Hendrich. 2012. NuRD-mediated deacetylation of H3K27 facilitates recruitment of Polycomb Repressive Complex 2 to direct gene repression. *The EMBO journal*. 31:593-605.
- Rotin, D., and S. Kumar. 2009. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10:398-409.
- Sadowski, M., A. Mawson, R. Baker, and B. Sarcevic. 2007. Cdc34 C-terminal tail phosphorylation regulates Skp1/cullin/F-box (SCF)-mediated ubiquitination and cell cycle progression. *The Biochemical journal*. 405:569-581.
- Scaglione, K.M., V. Basrur, N.S. Ashraf, J.R. Konen, K.S. Elenitoba-Johnson, S.V. Todi, and H.L. Paulson. 2013. The ubiquitin-conjugating enzyme (E2) Ube2w ubiquitinates the N terminus of substrates. *The Journal of biological chemistry*. 288:18784-18788.
- Selvin, P.R. 2000. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nature structural biology*. 7:730-734.
- Seo, J., and K.J. Lee. 2004. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *Journal of biochemistry and molecular biology*. 37:35-44.
- Souphron, J., M.B. Waddell, A. Paydar, Z. Tokgoz-Gromley, M.F. Roussel, and B.A. Schulman. 2008. Structural dissection of a gating mechanism preventing misactivation of ubiquitin by NEDD8's E1. *Biochemistry*. 47:8961-8969.
- Spratt, D.E., H. Walden, and G.S. Shaw. 2014. RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions. *The Biochemical journal*. 458:421-437.

- Stewart, M.D., T. Ritterhoff, R.E. Klevit, and P.S. Brzovic. 2016. E2 enzymes: more than just middle men. *Cell research*. 26:423-440.
- Su, L.L., H. Iwai, J.T. Lin, and C.G. Fathman. 2009. The transmembrane E3 ligase GRAIL ubiquitinates and degrades CD83 on CD4 T cells. *J Immunol*. 183:438-444.
- Swatek, K.N., and D. Komander. 2016. Ubiquitin modifications. *Cell research*. 26:399-422.
- Takamori, S., M. Holt, K. Stenius, E.A. Lemke, M. Gronborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brugger, P. Ringler, S.A. Muller, B. Rammner, F. Grater, J.S. Hub, B.L. De Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmuller, J. Heuser, F. Wieland, and R. Jahn. 2006. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*. 127:831-846.
- Tang, X., and J.E. Bruce. 2009. Chemical cross-linking for protein-protein interaction studies. *Methods Mol Biol*. 492:283-293.
- Tatham, M.H., A. Plechanovova, E.G. Jaffray, H. Salmen, and R.T. Hay. 2013. Ube2W conjugates ubiquitin to alpha-amino groups of protein N-termini. *The Biochemical journal*. 453:137-145.
- Teh, H.F., W.Y. Peh, X. Su, and J.S. Thomsen. 2007. Characterization of protein--DNA interactions using surface plasmon resonance spectroscopy with various assay schemes. *Biochemistry*. 46:2127-2135.
- Therien, H.M., and W.E. Mushynski. 1976. Isolation of synaptic junctional complexes of high structural integrity from rat brain. *The Journal of cell biology*. 71:807-822.
- Traynelis, S.F., L.P. Wollmuth, C.J. McBain, F.S. Menniti, K.M. Vance, K.K. Ogden, K.B. Hansen, H. Yuan, S.J. Myers, and R. Dingledine. 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*. 62:405-496.
- Uldrijan, S., W.J. Pannekoek, and K.H. Vousden. 2007. An essential function of the extreme C-terminus of MDM2 can be provided by MDMX. *The EMBO journal*. 26:102-112.
- van Dijk, J.R., Y. Yamazaki, and R.H. Palmer. 2014. Tumour-associated mutations of PA-TM-RING ubiquitin ligases RNF167/RNF13 identify the PA domain as a determinant for endosomal localization. *The Biochemical journal*. 459:27-36.
- van Wijk, S.J., S.J. de Vries, P. Kemmeren, A. Huang, R. Boelens, A.M. Bonvin, and H.T. Timmers. 2009. A comprehensive framework of E2-RING E3 interactions of the human ubiquitin-proteasome system. *Molecular systems biology*. 5:295.
- Vandenberg, C.J., F. Gergely, C.Y. Ong, P. Pace, D.L. Mallery, K. Hiom, and K.J. Patel. 2003. BRCA1-independent ubiquitination of FANCD2. *Molecular cell*. 12:247-254.
- Varshavsky, A. 2006. The early history of the ubiquitin field. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 15:647-654.
- Wang, X., R.A. Herr, W.J. Chua, L. Lybarger, E.J. Wiertz, and T.H. Hansen. 2007. Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail

- can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. *The Journal of cell biology*. 177:613-624.
- Wenzel, D.M., A. Lissounov, P.S. Brzovic, and R.E. Klevit. 2011a. UBC7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids. *Nature*. 474:105-108.
- Wenzel, D.M., K.E. Stoll, and R.E. Klevit. 2011b. E2s: structurally economical and functionally replete. *The Biochemical journal*. 433:31-42.
- Westmark, P.R., C.J. Westmark, A. Jeevananthan, and J.S. Malter. 2011. Preparation of synaptoneurosomes from mouse cortex using a discontinuous percoll-sucrose density gradient. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Whitby, F.G., G. Xia, C.M. Pickart, and C.P. Hill. 1998. Crystal structure of the human ubiquitin-like protein NEDD8 and interactions with ubiquitin pathway enzymes. *The Journal of biological chemistry*. 273:34983-34991.
- Wickliffe, K.E., S. Lorenz, D.E. Wemmer, J. Kuriyan, and M. Rape. 2011a. The mechanism of linkage-specific ubiquitin chain elongation by a single-subunit E2. *Cell*. 144:769-781.
- Wickliffe, K.E., A. Williamson, H.J. Meyer, A. Kelly, and M. Rape. 2011b. K11-linked ubiquitin chains as novel regulators of cell division. *Trends in cell biology*. 21:656-663.
- Widagdo, J., Y.J. Chai, M.C. Ridder, Y.Q. Chau, R.C. Johnson, P. Sah, R.L. Huganir, and V. Anggono. 2015. Activity-Dependent Ubiquitination of GluA1 and GluA2 Regulates AMPA Receptor Intracellular Sorting and Degradation. *Cell reports*.
- Widagdo, J., S. Guntupalli, S.E. Jang, and V. Anggono. 2017. Regulation of AMPA Receptor Trafficking by Protein Ubiquitination. *Frontiers in molecular neuroscience*. 10:347.
- Williamson, A., K.E. Wickliffe, B.G. Mellone, L. Song, G.H. Karpen, and M. Rape. 2009. Identification of a physiological E2 module for the human anaphase-promoting complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:18213-18218.
- Wilson, V.G., and P.R. Heaton. 2008. Ubiquitin proteolytic system: focus on SUMO. *Expert review of proteomics*. 5:121-135.
- Windheim, M., M. Peggie, and P. Cohen. 2008. Two different classes of E2 ubiquitin-conjugating enzymes are required for the mono-ubiquitination of proteins and elongation by polyubiquitin chains with a specific topology. *The Biochemical journal*. 409:723-729.
- Wu, G.S. 2004. The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer biology & therapy*. 3:156-161.
- Yamada, H.Y., and G.J. Gorbisky. 2006. Tumor suppressor candidate TSSC5 is regulated by UbcH6 and a novel ubiquitin ligase RING105. *Oncogene*. 25:1330-1339.

- Yamazaki, Y., C. Schonherr, G.K. Varshney, M. Dogru, B. Hallberg, and R.H. Palmer. 2013. Goliath family E3 ligases regulate the recycling endosome pathway via VAMP3 ubiquitylation. *The EMBO journal*. 32:524-537.
- Yin, P., Z. Tu, A. Yin, T. Zhao, S. Yan, X. Guo, R. Chang, L. Zhang, Y. Hong, X. Huang, J. Zhou, Y. Wang, S. Li, and X.J. Li. 2015. Aged monkey brains reveal the role of ubiquitin-conjugating enzyme UBE2N in the synaptosomal accumulation of mutant huntingtin. *Human molecular genetics*. 24:1350-1362.
- Yuan, W.C., Y.R. Lee, S.Y. Lin, L.Y. Chang, Y.P. Tan, C.C. Hung, J.C. Kuo, C.H. Liu, M.Y. Lin, M. Xu, Z.J. Chen, and R.H. Chen. 2014. K33-Linked Polyubiquitination of Coronin 7 by Cul3-KLHL20 Ubiquitin E3 Ligase Regulates Protein Trafficking. *Molecular cell*. 54:586-600.
- Zheng, N., and N. Shabek. 2017. Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annual review of biochemistry*. 86:129-157.
- Zheng, N., P. Wang, P.D. Jeffrey, and N.P. Pavletich. 2000. Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell*. 102:533-539.