



**HAL**  
open science

# Caractérisation d'un nouveau mécanisme de régulation de la E3 ubiquitine ligase WWP1 impliquée dans la tumorigenèse

Tiphaine Perron

► **To cite this version:**

Tiphaine Perron. Caractérisation d'un nouveau mécanisme de régulation de la E3 ubiquitine ligase WWP1 impliquée dans la tumorigenèse. Biochimie, Biologie Moléculaire. Sorbonne Université, 2024. Français. NNT : 2024SORUS250 . tel-04795823

**HAL Id: tel-04795823**

**<https://theses.hal.science/tel-04795823v1>**

Submitted on 21 Nov 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Thèse de doctorat de Sorbonne Université

École doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique (ED394)

Présentée par

**Tiphaine PERRON**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR EN SCIENCES DE SORBONNE UNIVERSITÉ**

**SPECIALITÉ BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE**

## **Caractérisation d'un nouveau mécanisme de régulation de la E3 ubiquitine ligase WWP1 impliquée dans la tumorigenèse**

Dirigée par le Dr. Céline PRUNIER et le Dr. Laurence LEVY

*Laboratoire : Signalisation TGF- $\beta$ , Plasticité Cellulaire et Cancer UMRS\_938,*

*Centre de Recherche Saint-Antoine*

Présentée et soutenue publiquement le 04 octobre 2024

Devant un jury composé de :

Pr. Chahrazade EL AMRI	Professeure des universités	Présidente du jury
Dr. Marie-Odile FAUVARQUE	Directrice de recherche	Rapporteur
Dr. François LALLEMAND	Chargé de recherche	Rapporteur
Dr. Sébastien LEON	Directeur de recherche	Examineur
Pr. Ivan BIECHE	Professeur des universités	Examineur
	Praticien hospitalier	
Dr. Céline PRUNIER	Chargée de recherche	Co-directrice de thèse
Dr. Laurence LEVY	Chargée de recherche	Co-directrice de thèse

*À ma maman,  
Mon phare qui est toujours là pour m'aider à me guider dans ma vie.*

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier chaleureusement le Pr. Chahrazade EL AMRI pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je remercie également le Dr. Marie-Odile FAUVARQUE, le Dr. François LALLEMAND, le Dr. Sébastien LEON ainsi que le Pr. Ivan BIECHE pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie la Ligue Nationale Contre le Cancer qui a financé ma quatrième année de thèse.

Toutes mes premières pensées sont pour cette merveilleuse équipe TGF- $\beta$ .

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, le Dr. Céline PRUNIER. Céline, je te remercie sincèrement pour m'avoir accueilli dans ton équipe et surtout pour avoir encadré mon stage de M2 ainsi que mes trois années de thèse. Je te remercie profondément pour ton engagement dans le projet, pour ta disponibilité au quotidien, pour ton soutien et pour ta bienveillance à mon égard. Tu savais me rassurer et me remonter le moral quand les résultats n'étaient pas forcément au rendez-vous et cela m'a vraiment permis de travailler en toute sérénité. Je te remercie aussi tout particulièrement pour ta confiance. Notamment, je te remercie beaucoup pour m'avoir laissé la liberté de m'engager dans les missions d'enseignement et dans la vie du centre *via* le club des jeunes chercheurs. Deux activités qui ont grandement participé à mon épanouissement durant ma thèse. Je te remercie aussi pour m'avoir motivé à me donner à fond au quotidien, je pense avoir appris beaucoup de choses à tes côtés et ça a été un réel plaisir de travailler avec toi.

Mes remerciements les plus sincères et les plus respectueux sont pour le Dr. Laurence LEVY. Merci mille fois d'avoir été là. Merci mille fois d'avoir encadré ma quatrième année de thèse. J'imagine combien il a pu être difficile et stressant de t'approprier ce nouveau projet pour le finaliser et je trouve qu'on s'en est super bien sorti. J'ai beaucoup aimé travailler avec toi, j'ai surtout été très impressionnée par ta rigueur scientifique, ta logique et par ta capacité à formuler des phrases hyper claires ! J'espère garder de ta méthode pour la suite de ma carrière en me demandant « qu'aurait conclu Laurence ? ».

Je souhaite remercier les autres chercheurs de l'équipe TGF- $\beta$ . Notamment le Dr. Mathieu Boissan. Merci beaucoup Mathieu d'avoir soutenu le projet et d'avoir initié la collaboration avec Ivan Bièche et Laura Courtois. J'ai beaucoup apprécié toutes nos discussions, sur le monde de la recherche mais pas uniquement. Je remercie également les autres chercheurs du laboratoire, le Pr. Joëlle Sobczak-Thépôt, le Dr. Anthi Karaiskou et le Dr. Isabelle Petit. Merci pour nos échanges, les déjeuners animés, votre bienveillance et vos conseils.

J'en profite aussi pour remercier certains enseignants qui ont su me transmettre leur passion pour la biologie et pour l'enseignement. Qui ont grandement participé à l'élaboration de mes projets étudiants et professionnels et qui m'ont donné envie de faire le même métier qu'eux. Je remercie sincèrement François Morin, le Dr. Christine Le Péron et le Dr. Marco Da Costa. Merci pour l'inspiration que vous m'avez apportée.

Evidemment, je remercie sincèrement tous les autres membres du laboratoire. Je pense d'abord aux plus anciens, Nawel, Robin, Sadek et Sabrina. Vous m'avez accueillie à bras ouverts au labo et vous m'avez tout de suite fait me sentir bien dans ce nouvel environnement. Merci Nawel d'avoir eu la patience de répondre à toutes mes questions durant mes premiers mois au labo du genre « il est rangé où l'anti-protéases ? ». Merci Sabrina d'être toujours la première à répondre présente pour aller courir ou pour aller boire une bière ! ;- ) Merci aussi à ceux qui nous ont rejoint ensuite, Juliane, Henry, Clément, Savinien et Tom. C'était vraiment un plaisir d'être avec vous au quotidien et de partager tous ces moments. Bon courage à toi Juliane pour ces derniers mois de thèse, tu seras la prochaine à passer et tu vas forcément cartonner ! Clément, Savinien et Tom, je ne peux que vous conseiller de profiter à fond de cette belle expérience qu'est un doctorat au sein de cette équipe !

Merci à toute la team du CRSApérooo ! Surtout à Hugo, Toky, Lara, Allan, Mathias, et Pierre. Tous ces verres partagés à Mon Café ou ailleurs ont vraiment représenté une soupape de décompression. Merci pour votre bonne humeur, merci pour vos rires. Vous avez énormément contribué à mon épanouissement durant ma thèse.

Merci à mes amis qui ont été là pour m'accompagner pendant cette thèse, ceux qui sont là depuis plus longtemps et ceux rencontrés à Paris. Je pense surtout à Lola et à Vincent qui ont toujours répondu présents, que cela soit pour partager des moments cool mais aussi pour me soutenir dans les moments plus difficiles. Je pense aussi à Nathalie et à Pierrick qui m'ont vu grandir, qui m'ont soutenu dans chaque étape de mon parcours et qui ont toujours été de bons conseils.

Enfin, je finirai par remercier le plus profondément possible ma famille. Merci à mon frère, Riwan, pour tous les rires qu'il déclenche à la maison. Merci à ma couz' Alice pour les entraînements triathlon et les restos partagés. Merci du fond du cœur à mes parents pour m'avoir permis de réaliser les études que je voulais, où je voulais et dans les meilleures conditions possibles. Merci infiniment pour votre soutien et vos encouragements. Tout ça c'est grâce à vous et c'est aussi pour vous.

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	DeoxyriboNucleic Acid
AIP5	Atropin-Interacting Protein 5
ANK	Ankyrin-repeat
ANKRD13	ANKYrin-Repeat Domain-containing 13
APC/C	Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
ATG	Autophagy-related proteins
ATP	Adenosine TriPhosphate
BARD1	BRCA1-associated RING domain protein 1
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein
CBL	Casitas B-Lineage lymphoma proto-oncogene
CMA	Chaperone-Mediated Autophagy
CMH	Major Histocompatibility Complex
CP	Catalytic Core Particule
CRL	Cullin-RING ubiquitin Ligases
CXCL12	C-X-C motif chemokine Ligand 12
CXCR4	C-X-C chemokine Receptor type 4
CYYR1	CYsteine and tYrosine-Rich protein 1
DUB	DeUBiquitinase
E6-AP	E6-Associated Protein
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERAD	Endoplamic Reticulum Associated Degradation
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FGF	Fibroblast Growth Factor
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
HECT	Homologous to E6-associated protein C-Terminus
HERC	HECT and RLD domain-Containing
I3C	Indole-3-Carbinol
IBR	In-between-RING

IGF	Insulin Growth Factor
IKK	Inhibitor of NF- $\kappa$ B Kinase
IL1-R	Interleukine-1 $\beta$ Receptor
IL-1 $\beta$	Interleukine-1 $\beta$
ILV	IntraLuminal Vesicles
KLF5	Krueppel-like factor 5
LAMP2A	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2A
LATS1	Large Tumor Suppressor 1
LUBAC	Linear Ubiquitin chain Assembly Complex
MARCH	Membrane-associated RING-CH protein
MVB	MultiVesicular Bodies
NDFIP1/2	NEDD4-Family-Interacting Protein 1/2
NEDD4	Neural precursor cell-Expressed Developmentally Downregulated 4
NEDD8	Neural precursor cell-Expressed Developmentally Downregulated 8
NEDL1/2	NEDD4-Like 1/2
NEMO	NF- $\kappa$ B Essential MOdulator
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor $\kappa$ enhancer Binding protein
PTEN	tumor suppressor Phosphatase and TENsin homolog
PY	PPxY or LPxY motif
RBR	RING-Between-RING
RCR	RING-Cys-Relay
RING	Really Interesting New Gene
RLD	Regulator of Chromatin Condensation 1 (RCC1)-Like Domain
RNF	RING Finger protein
RP	Regulatory Particule
SMURF1/2	SMad Ubiquitination Regulatory Factor 1/2
STING	STimulator of INterferon Genes protein
STMC6	Single-TransMembrane proteins with conserved 6 Cysteines
SUMO	Small Ubiquitin-related MOdifier
TEM	Epithelial Mesenchymal Transition
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor Beta
TIUL1	TGIF-Interacting Ubiquitin Ligase 1
TNFR	Tumor-Necrosis Factor $\alpha$ Receptor

TNF- $\alpha$	Tumor-Necrosis Factor $\alpha$
TRAF6	TNF Receptor-Associated Factor 6
Ub	Ubiquitine
UBA1	UBiquitin-like modifier Activating enzyme 1
UBA6	UBiquitin-like modifier Activating enzyme 6
UBC	UBiquitin-Conjugating Core
UBD	Ubiquitin Binding Domains
UBL	UBiquitin-Like
UFD	Ubiquitin-Fold Domain
UFL1	UFM1-specific Ligase 1
UIM	Ubiquitin-Interacting Motif
WW2L	WW domain 2 and Linker region
WWP1/2	WW domain-containing Protein 1/2
YAP	Yes-Associated Protein



# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>1</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b> .....	<b>4</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>6</b>
<i>I. L'ubiquitination</i> .....	<i>6</i>
A. Découverte de la molécule d'ubiquitine .....	6
B. La molécule d'ubiquitine et les <i>ubiquitin-like</i> .....	7
C. Rôle de l'ubiquitination .....	8
D. Le principe de l'ubiquitination .....	8
E. Les modifications de l'ubiquitine .....	9
F. Le code d'ubiquitine .....	11
1. La monoubiquitination .....	11
2. La polyubiquitination non-dégradative .....	14
3. La polyubiquitination dégradative par le protéasome .....	15
4. La polyubiquitination dégradative par le lysosome et l'autophagie .....	16
G. Les domaines d'interaction à l'ubiquitine et décodage du code d'ubiquitine .....	23
<i>II. Les enzymes impliquées dans le mécanisme d'ubiquitination</i> .....	<i>25</i>
A. Les E1 d'activation .....	25
B. Les E2 de conjugaison .....	27
C. Les E3 ubiquitine ligases .....	27
1. Les E3 RING .....	29
2. Les E3 HECT .....	30
3. Les E3 RBR .....	33
4. Les autres E3 ubiquitine ligases .....	34
<i>III. Les E3 ubiquitine ligases de la famille NEDD4</i> .....	<i>35</i>
A. Structure des E3 ligases de la famille NEDD4 .....	36
1. Le domaine C2 .....	36
2. Le domaine WW .....	37
3. Le domaine HECT .....	38
B. Les membres de la famille NEDD4 .....	38
1. Les E3 ligases NEDD4-1 et NEDD4-2 .....	39
2. Les E3 ligases NEDL1 et NEDL2 .....	40
3. Les E3 ligases SMURF1 et SMURF2 .....	41
4. La E3 ubiquitine ligase ITCH .....	42
5. La E3 ubiquitine ligase WWP2 .....	42
<i>IV. La E3 ubiquitine ligase WWP1</i> .....	<i>43</i>
A. Le gène <i>WWP1</i> .....	43
B. La protéine <i>WWP1</i> .....	44

C.	Les partenaires de WWP1 .....	44
1.	Implication de WWP1 dans les maladies neurologiques .....	47
2.	Implication de WWP1 dans les maladies infectieuses .....	48
3.	Implication de WWP1 dans d'autres pathologies .....	48
V.	<i>L'implication de WWP1 dans la tumorigenèse</i> .....	49
A.	Modification de la régulation génétique de WWP1 dans les cancers.....	49
B.	Amplification génique de WWP1 dans les cancers et marqueur de pronostic .....	50
C.	Mutations activatrices de WWP1 dans les cancers .....	52
D.	Les mécanismes d'action de WWP1 impliqués dans la tumorigenèse .....	53
1.	Les effets pro-tumoraux de WWP1 dans le modèle du cancer mammaire.....	53
2.	Les effets pro-tumoraux de WWP1 dans d'autres types de cancers.....	55
3.	Les effets anti-métastatiques de WWP1 .....	56
E.	Les modèles <i>in vivo</i> de WWP1 pour la cancérologie .....	57
VI.	<i>Les mécanismes de régulation de l'activité E3 ligase des NEDD4</i> .....	58
A.	Les interactions intramoléculaires inhibitrices .....	58
1.	Interaction C2/HECT.....	59
2.	Interaction WW/HECT .....	59
B.	Les modifications post-traductionnelles.....	60
C.	Les interactions intermoléculaires avec des protéines adaptatrices.....	63
1.	Les NDFIP.....	63
2.	Les arrestines .....	64
3.	Les autres adaptateurs.....	65
VII.	<i>La protéine CYYR1</i> .....	66
A.	Les membres de la famille STMC6.....	66
B.	Le gène <i>CYYR1</i> et son expression .....	67
C.	La protéine CYYR1 .....	68
1.	La structure de CYYR1 .....	68
2.	Le rôle de CYYR1 .....	68
VIII.	<i>La protéine ANKRD13A</i> .....	69
A.	Structure des membres de la famille ANKRD13 .....	69
B.	La fonction cellulaire des ANKRD13A/B/D .....	70
	<b>ETAT DE LA QUESTION .....</b>	<b>72</b>
	<b>RESULTATS .....</b>	<b>74</b>
	ARTICLE 1: CYYR1 PROMOTES THE DEGRADATION OF THE E3 UBIQUITIN LIGASE WWP1 AND IS ASSOCIATED WITH FAVORABLE PROGNOSIS IN BREAST CANCER .....	74
	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>76</b>
I.	<i>CYYR1 peut-elle réguler d'autres E3 ubiquitine ligases ? Comment se fait la spécificité d'interaction ? .....</i>	76
II.	<i>Quel est le rôle de l'ubiquitination de CYYR1 ? .....</i>	77

A.	Régulation de la stabilité protéique de CYYR1 ?.....	78
B.	Une possible ubiquitination non-dégradative de CYYR1 ? .....	79
III.	<i>Investigation des conséquences de la régulation de WWP1 induite par CYYR1 sur la voie de signalisation TGF-β</i> .....	80
IV.	<i>CYYR1 peut-elle être un adaptateur pour WWP1 ?</i> .....	82
A.	ANKRD13A comme substrat ubiquitiné par WWP1 .....	82
B.	MAGI3 et MAGI1 comme substrats potentiels de WWP1 .....	84
V.	<i>L'expression et le rôle de CYYR1 dans la tumorigenèse</i> .....	84
<b>ANNEXE</b> .....		<b>86</b>
	ARTICLE 2 : QUANTITATIVE UBIQUITYLOME ANALYSIS REVEALS THE SPECIFICITY OF RNF111/ARKADIA E3 UBIQUITIN LIGASE FOR ITS DEGRADATIVE SUBSTRATES SKI AND SKIL/SNON IN TGF-B SIGNALING PATHWAY .....	86
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....		<b>88</b>

## TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation de la structure secondaire de l'ubiquitine et de certaines ubiquitin-like.....	7
Figure 2 : Représentation des différents types d'ubiquitination.....	8
Figure 3 : Schéma représentant la réaction d'ubiquitination .....	9
Figure 4 : Représentation structurale de la molécule d'ubiquitine liée à un substrat. Les 8 sites d'ubiquitination sont mis en évidence. ....	10
Figure 5 : Représentation développée des différents types d'ubiquitination.....	10
Figure 6 : Tableau résumant les fonctions cellulaires des différents types de chaînes d'ubiquitines. ...	13
Figure 7 : Représentation schématique du protéasome 26S .....	15
Figure 8 : Résumé graphique des différentes voies de dégradation lysosomale dans les cellules animales. ....	17
Figure 9 : Schéma représentatif du rôle des chaînes d'ubiquitine K63 dans le trafic intracellulaire .....	22
Figure 10 : Localisation et séquence du motif UIM présent sur des protéines aux fonctions variées...	24
Figure 11 : Représentation de la structure du tandem UIM de la protéine Rap80 interagissant avec un dimère d'ubiquitines lié en chaîne K63 .....	25
Figure 12 : Tableau résumant les couples d'enzymes E1-E2 impliqués dans les modifications par les protéines UBiquitin-Likes (UBL).....	26
Figure 13: Schéma représentant les modes de transfert de l'ubiquitine des différentes familles de E3 ligases RING, HECT et RBR. ....	28
Figure 14 : Représentation de la séquence et de l'organisation en doigt de zinc d'un domaine RING..	29
Figure 15 : Représentation schématique de onze protéines eucaryotes partageant le domaine d'activité catalytique E3 ligase « HECT » .....	30
Figure 16 : (A) Structure du domaine HECT de WWP1. (B) Représentation schématique du transfert d'une molécule d'ubiquitine depuis une E2 activée à une E3 de type HECT. ....	31
Figure 17 : Représentation schématique des différentes E3 ligases humaines de la famille HECT .....	32
Figure 18 : Représentation schématique de quelques E3 ubiquitine ligases RBR humaines .....	34
Figure 19 : Domaine C2 de la PKC $\alpha$ lié à une phosphatidylsérine par l'intermédiaire de deux ions $Ca^{2+}$ .....	36
Figure 20 : Représentation de la structure du domaine WW de la protéine PIN1.....	38
Figure 21 : Représentation schématique des différents membres de la sous-famille NEDD4 .....	39
Figure 22 : Tableau présentant les principaux substrats ubiquitinés par WWP1 .....	46
Figure 23 : Tableau récapitulatif des dérégulations de l'expression de WWP1 dans les cancers ainsi que le pronostic associée .....	51
Figure 24 : Représentation schématique des interactions intramoléculaires inhibitrices des E3 ubiquitine ligases de la sous-famille NEDD4.....	58

Figure 25 : Représentation schématique de l'activation d'une E3 ubiquitine ligase NEDD4 par phosphorylation de la région WW2L. ....	61
Figure 26 : Schéma représentatif de la régulation de la stabilité protéique des E3 ubiquitine ligases NEDD4. ....	62
Figure 27 : Représentation schématique de la régulation de l'activité et de la stabilité des E3 ubiquitine ligases NEDD4 par des protéines adaptatrices. ....	63
Figure 28 : Structure communes des protéines membres de la famille STMC6 .....	66
Figure 29 : Schéma représentatif de la structure de CYYR1. ....	68
Figure 30 : Représentation schématique de la structure des membres de la famille ANKRD13 .....	70
Figure 31 : Flag-WWP1 et Flag-WWP2 induisent une dégradation dépendante du protéasome de HA-CYYR1 via leur activité catalytique.....	78
Figure 32 : CYYR1 favorise la phosphorylation de SMAD2, effecteur de la voie de signalisation TGF- $\beta$ . ....	81
Figure 33 : CYYR1 semble favoriser la monoubiquitination de ANKRD13A induite par WWP1.....	83
Figure 34 : CYYR1 et WWP1/2 pourraient être des régulateurs de MAGI1.....	84

# INTRODUCTION

## I. L'ubiquitination

Le développement de tout organisme ainsi que son bon fonctionnement nécessitent une homéostasie cellulaire parfaitement maintenue par de fines régulations moléculaires. Au cœur de ces régulations se trouvent les protéines, les acteurs clés des voies de signalisation cellulaire. Au-delà de la modulation de l'expression des différents gènes, les protéines obtenues sont elles aussi régulées par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation ou encore la glycosylation. Toutes ces modifications permettent de moduler le devenir de la protéine modifiée : sa localisation, sa conformation, sa stabilité ou encore sa capacité à interagir avec d'autres protéines. Dans le cadre de ces travaux de thèse nous allons nous concentrer sur l'ubiquitination qui est une des modifications post-traductionnelles les plus étudiées.

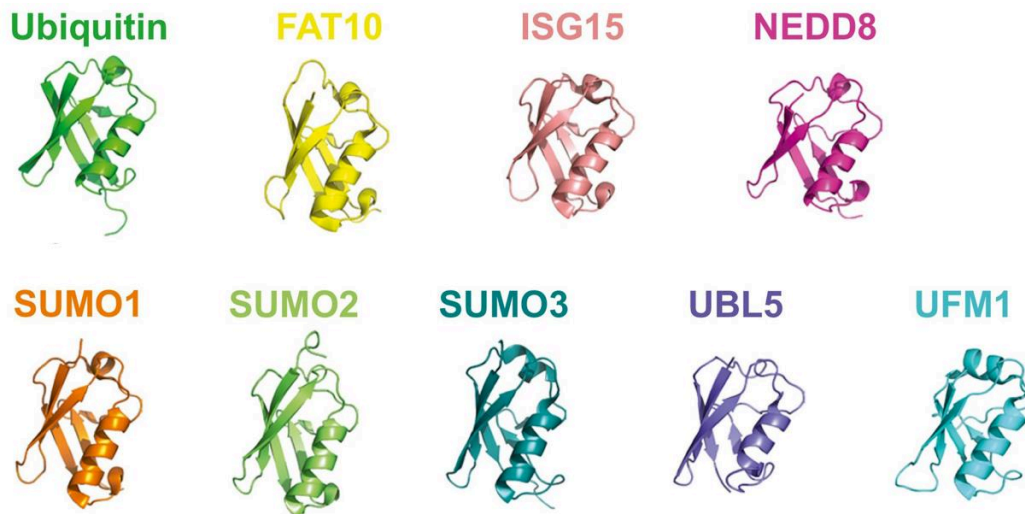
### A. Découverte de la molécule d'ubiquitine

La molécule d'ubiquitine a été isolée la première fois par Gideon Goldstein et son équipe en 1975 et porte son nom du fait qu'elle soit retrouvée de manière ubiquitaire entre les cellules animales, les plantes ou encore les levures (Goldstein et al., 1975). C'est ensuite en 1977 que Ira Goldknopf et Harris Busch décrivent la modification des protéines par ubiquitination en observant que des histones présentant « deux extrémités N-terminales » étaient en fait liés à l'ubiquitine (Goldknopf and Busch, 1977). Ensuite, c'est au cours des années 80 qu'Avram Hershko, Aaron Ciechanover et Irwin Rose progressent dans la compréhension du mécanisme d'ubiquitination et sur ses conséquences sur la protéolyse (Hershko, 1988; Hershko and Ciechanover, 1998) ce qui leur valut le prix Nobel de chimie en 2004. Aujourd'hui encore, l'étude des mécanismes moléculaires régulant l'ubiquitination des protéines est une thématique de recherches porteuse qui ouvre la voie au développement de nouvelles thérapies.

## B. La molécule d'ubiquitine et les ubiquitin-like

L'ubiquitine est une petite protéine d'environ 8,5 kDa qui est composée de 76 acides aminés présentant à son extrémité C-terminale deux résidus Gly-Gly impliqués dans sa liaison au substrat. Chez l'Homme, l'ubiquitine est codée par quatre gènes différents : UBB, UBC, UBA52 et RPS27A. A noter que UBA52 et RPS27A codent pour une molécule d'ubiquitine tandis que UBB et UBC codent pour une chaîne de plusieurs ubiquitines qui est par la suite clivée par une protéase spécifique et qui permet ainsi la production de monomères d'ubiquitine (Salas-Lloret and González-Prieto, 2022).

En outre, l'ubiquitine n'est pas la seule molécule à faire partie du « code d'ubiquitine ». En effet, il existe d'autres molécules de la famille des UBL « UBiquitin-Like » qui présentent une structure similaire à l'ubiquitine (**Figure 1**) et qui peuvent être fixées de façon covalente à une protéine (Hwang et al., 2022). Parmi ces UBL, les plus décrites sont SUMO « Small Ubiquitin-related MOdifier » et NEDD8 « Neural precursor cell expressed Developmentally Downregulated protein 8 » ; on parle alors respectivement de sumoylation (Sahin et al., 2022) et de neddylation (Enchev et al., 2015). Toutes deux sont également impliquées dans de nombreux processus cellulaires en régulant la stabilité des protéines cibles, leur localisation cellulaire ou encore leurs interactions avec d'autres protéines.



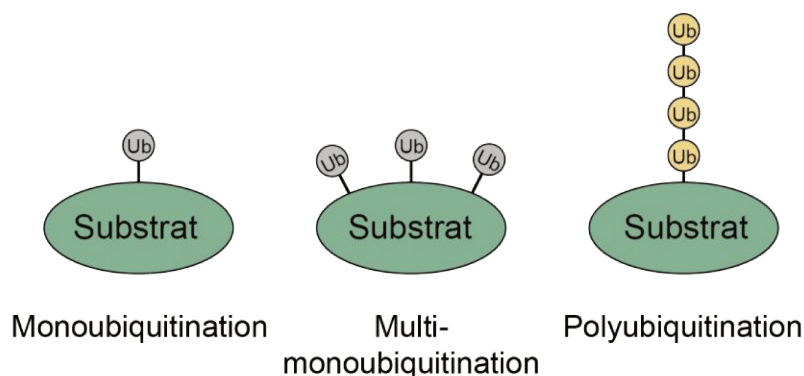
*Figure 1 : Représentation de la structure secondaire de l'ubiquitine et de certaines ubiquitin-like. Adapté de Vaughan et al., 2021*

### C. Rôle de l'ubiquitination

Au-delà de son rôle majeur dans la régulation de la protéolyse, l'ubiquitination joue un rôle essentiel dans de nombreux processus cellulaires tels que le contrôle du cycle cellulaire, la réponse aux dommages de l'ADN, le trafic cellulaire, la réponse immunitaire, l'autophagie ou encore dans les régulations épigénétiques (Akutsu et al., 2016 et Swatek and Komander, 2016). Cette diversité de fonctionnalités s'explique par le fait que la conséquence de l'ubiquitination dépend de la cible protéique ubiquitinée mais également du type d'ubiquitination et/ou du type de chaîne d'ubiquitines formé qui seront détaillés plus tard, dans le paragraphe I.F.

### D. Le principe de l'ubiquitination

L'ubiquitination consiste en l'attachement covalent d'une ou plusieurs molécule(s) d'ubiquitine(s) au résidu lysine d'une protéine cible. Dans de plus rares cas, l'ubiquitination peut également se produire sur d'autres résidus tels que la méthionine, la sérine ou la thréonine. Si une seule molécule d'ubiquitine est attachée à un substrat, on parle de monoubiquitination. Si plusieurs molécules d'ubiquitines sont individuellement liées à un substrat, on parle de multi-monoubiquitination. Enfin, nous le détaillerons par la suite, l'ubiquitine peut aussi être liée sous forme de chaînes à un substrat, on parle alors de polyubiquitination (**Figure 2**). C'est, entre autres, cette diversité au sein de l'attachement de la molécule d'ubiquitine qui confère toute sa complexité à l'ubiquitination.

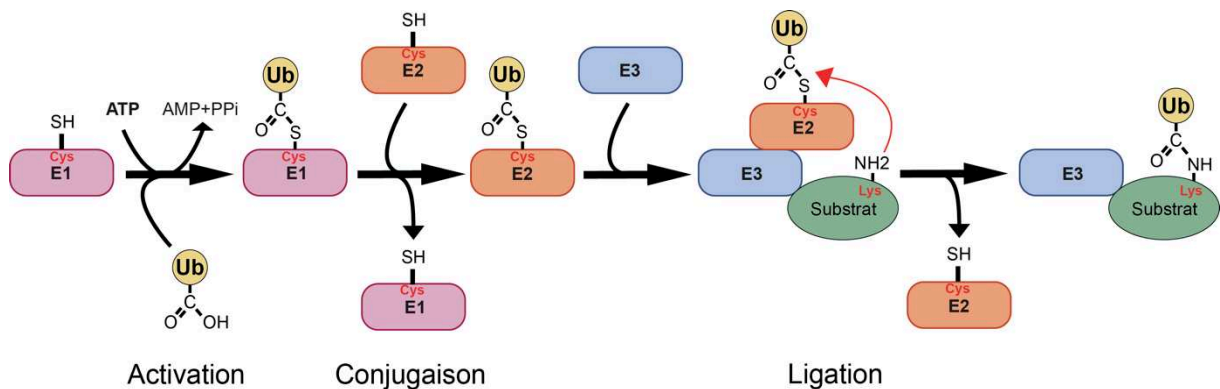


*Figure 2 : Représentation des différents types d'ubiquitination. Adapté de French et al., 2021.*

La réaction d'ubiquitination est réalisée par l'action séquentielle de trois enzymes : une E1 d'activation, une E2 de conjugaison et enfin une E3 ubiquitine ligase qui va permettre de lier la molécule d'ubiquitine au substrat.



L'ubiquitine est tout d'abord activée par la E1 lors d'une réaction ATP-dépendante permettant la formation d'une liaison thioester entre l'extrémité carboxyl-terminale de la molécule d'ubiquitine et le groupe sulfhydryle d'un résidu cystéine de la E1. Lors de l'étape de conjugaison, cette liaison thioester liant la molécule d'ubiquitine est ensuite transférée à un résidu cystéine de l'enzyme E2. Enfin, la E3 ubiquitine ligase va permettre le rapprochement entre la E2 liée à l'ubiquitine et le substrat à ubiquitiner permettant ainsi une attaque nucléophile du groupement amine de la lysine du substrat vers la liaison thioester E2-Ub. Une liaison isopeptidique va donc se former entre l'extrémité carboxyl-terminale de la molécule d'ubiquitine et le groupe amine de la lysine de la protéine cible. Le substrat est maintenant lié de façon covalente à une molécule d'ubiquitine (Pickart, 2001) (**Figure 3**).



*Figure 3 : Schéma représentant la réaction d'ubiquitination*

#### E. Les modifications de l'ubiquitine

La molécule d'ubiquitine étant avant tout une protéine, elle peut, elle-même, être la cible de modifications post-traductionnelles comme par exemple la phosphorylation ou l'acétylation. La phosphorylation de l'ubiquitine peut intervenir sur certains de ses résidus sérine, thréonine et tyrosine et est particulièrement importante dans le processus de mitophagie (Ordureau et al., 2014). L'acétylation de l'ubiquitine, quant à elle, peut intervenir sur certains de ses résidus lysine et impacter sa signalisation (Ohtake et al., 2015).

L'ubiquitine portant 7 résidus lysine (K) en position K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63, peut elle-même être ubiquitinée par une autre molécule d'ubiquitine, qui à son tour peut également être ubiquitinée et ainsi de suite pour former une chaîne d'ubiquitines. Cela s'appelle

la polyubiquitination. A noter qu'en plus de ses 7 résidus lysines, l'ubiquitine peut également lier une autre ubiquitine via la méthionine initiatrice (M1) de son extrémité N-terminale. Cela laisse donc la possibilité de former 8 types de chaînes d'ubiquitines différents (Swatek and Komander, 2016) (**Figure 4**).

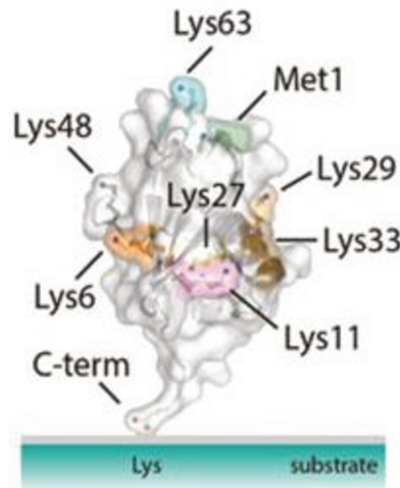


Figure 4 : Représentation structurale de la molécule d'ubiquitine liée à un substrat. Les 8 sites d'ubiquitination sont mis en évidence. D'après Swatek and Komander, 2016.

De plus, si la chaîne d'ubiquitine n'est formée que d'un seul type de liaison on parle de polyubiquitination homotypique, cependant une chaîne d'ubiquitine peut être formée de plusieurs types de chaînes, on parle alors de polyubiquitination hétérotypique mixte. Enfin, une chaîne d'ubiquitine peut elle aussi être liée à une autre chaîne d'ubiquitine, on parle dans ce cas de polyubiquitination hétérotypique branchée (**Figure 5**).

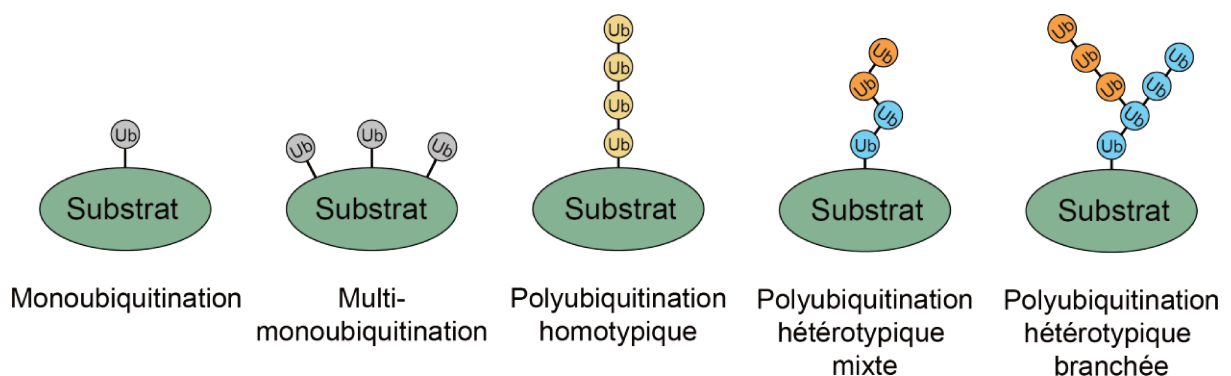


Figure 5 : Représentation développée des différents types d'ubiquitination. Adapté de French et al., 2021.

Nous venons de le voir, une partie de la complexité de l'ubiquitination réside dans la diversité des possibilités de liaison de l'ubiquitine à un substrat, de ses modifications ainsi que du type de chaîne formé et de son architecture. En fonction de tous ces paramètres, l'ubiquitination constitue un code qui, une fois décrypté par la cellule, permet de définir le devenir du substrat. Nous allons à présent discuter des conséquences les plus représentatives du code d'ubiquitine sur les voies de signalisation cellulaire.

## F. Le code d'ubiquitine

### 1. *La monoubiquitination*

Dans les cellules, la monoubiquitination est largement plus abondante que la polyubiquitination (Kaiser et al., 2011). Elle est particulièrement retrouvée dans le noyau, au niveau des histones où elle participe au remodelage de la chromatine et donc à la régulation de l'expression génétique. Notamment, l'histone H2A est une cible d'ubiquitination du complexe Polycomb PRC1 et cette modification favorise la compaction de la chromatine et la répression de l'expression génique en servant de plateforme de recrutement pour le complexe répresseur Polycomb PRC2. A l'inverse, la monoubiquitination de l'histone H2B par le complexe de E3 ubiquitine ligases RNF20/RNF40 favorise l'ouverture de la chromatine et la transcription des gènes (Wang et al., 2004; Pavri et al., 2006).

Dans ce même compartiment, la monoubiquitination est aussi actrice de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. La voie de signalisation de l'anémie de Fanconi est un exemple important du rôle de la monoubiquitination dans la réparation de l'ADN. En effet, la monoubiquitination des protéines FANCD2/FANCI est le point central du mécanisme de réparation des *crosslinks* inter-brins de l'ADN car elle permet la signalisation des dommages à l'ADN ainsi que le recrutement de la machinerie de réparation (Ulrich and Walden, 2010).

Au-delà du noyau, la monoubiquitination est également impliquée dans des mécanismes moléculaires cytoplasmiques, notamment dans la régulation de l'endocytose et du trafic cellulaire ou encore dans la régulation de l'activité de certaines protéines (Chen et al., 2022). Par exemple, il a été observé que le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) est multi-monoubiquitiné par la E3 ligase CBL suite à la liaison de son ligand et que cette multiple

monoubiquitination est un signal suffisant pour déclencher son internalisation au sein de structures nommées endosomes précoces (Haglund et al., 2003).

Les chaînes de polyubiquitines impactent elles aussi de nombreux processus cellulaires. Le tableau présenté en **Figure 6** récapitule de façon générale les conséquences des différents types de chaînes d'ubiquitines même s'il faut garder en tête que le code d'ubiquitine présente en réalité encore plus de complexité.

Type de chaîne d'ubiquitines	Fonction cellulaire	Exemples de références
<b>M1</b>	Signalisation NF-κB	(Otten et al., 2021; Tokunaga, 2013)
<b>K6</b>	Réplication et réparation des dommages à l'ADN	(Morris and Solomon, 2004; Wu et al., 2007)
	Mitophagie	(Durcan et al., 2014; Ordureau et al., 2014)
	Régulation de protéines ribosomales	(Oltion et al., 2023)
<b>K11</b>	Contrôle du cycle cellulaire (Peut être branchée avec de la K48)	(Jin et al., 2008; Meyer and Rape, 2014; Yau et al., 2017)
	Réponse immunitaire	(Jin et al., 2016; Qin et al., 2014)
	Dégradation Associée au Réticulum Endoplasmique (ERAD)	(Lopata et al., 2020)
<b>K27</b>	Réparation des dommages à l'ADN	(Gatti et al., 2015)
	Inflammation et réponse immunitaire	(Q. Wang et al., 2014)
<b>K29</b>	Agrégation de protéines et maladies neurodégénératives	(Fiorillo et al., 2021; Zucchelli et al., 2010)
	Voie Wnt/β-caténine	(Fei et al., 2013)
	Dégradation protéique	(Dong et al., 2024; Xu et al., 2023)
<b>K33</b>	Réponse immunitaire	(Liu et al., 2018)
	Trafic cellulaire	(Yuan et al., 2014)
	Autophagie	(Sun et al., 2024)
<b>K48</b>	Dégradation protéasomale	(Chau et al., 1989; Kim et al., 2011; P. Xu et al., 2009)
	Dégradation Associée au Réticulum Endoplasmique (ERAD)	(Lopata et al., 2020)
<b>K63</b>	Dégradation Lysosomale/Autophagie	(Ferreira et al., 2015; Harper et al., 2018a; Komander and Rape, 2012; Kuchitsu and Taguchi, 2023)
	Endocytose et trafic cellulaire	(Mukhopadhyay and Riezman, 2007; Lauwers et al., 2009)
	Signalisation NF-κB	(Gautheron and Courtois, 2010; Chen, 2012)
	Réparation de l'ADN	(Panier and Durocher, 2009)

Figure 6 : Tableau résumant les fonctions cellulaires des différents types de chaînes d'ubiquitines.

De façon générale, nous pouvons classer les conséquences de la polyubiquitination en deux grandes catégories : la polyubiquitination non-dégradative et la polyubiquitination dégradative, que nous allons développer dans les sections suivantes.

## 2. *La polyubiquitination non-dégradative*

Les modifications post-traductionnelles des protéines, telle que l'ubiquitination, modifient la surface des protéines ce qui a pour conséquence de réguler leur interaction avec de nouveaux partenaires, leur localisation subcellulaire, leur fonction et/ou leur activité.

Ainsi, la polyubiquitination peut par exemple réguler la réponse immunitaire et l'inflammation, notamment via les chaînes d'ubiquitine M1 et K63 qui permettent la reconnaissance et l'élimination de pathogènes (Deretic et al., 2013; Otten et al., 2021) et servent de signal de transduction dans l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Gautheron and Courtois, 2010; Chen, 2012; Tokunaga, 2013). Par exemple, il est bien décrit que la liaison du Tumor-Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) à son récepteur TNFR induit le recrutement de nombreuses protéines dont les kinases RIP1 et TAK1, mais également des E3 ubiquitine ligases TRAF2 et cIAP ainsi que du complexe ubiquitine ligase LUBAC « Linear UBiquitin chain Assembly Complex ». L'ubiquitination de RIP1 et l'auto-ubiquitination de cIAP permettent le recrutement et l'ubiquitination linéaire de la protéine NEMO « NF- $\kappa$ B Essential MOdulator », la sous-unité régulatrice du complexe kinase IKK, effecteur de la signalisation NF- $\kappa$ B. L'ubiquitination de NEMO conduit à l'activation par la phosphorylation du complexe IKK par la kinase TAK1 qui permet de lever l'inhibition du facteur de transcription NF- $\kappa$ B favorisant ainsi l'expression des gènes cibles anti-apoptotiques et pro-inflammatoires. La voie de signalisation NF- $\kappa$ B peut également être activée par une autre cytokine pro-inflammatoire, l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Dans ce cas, la liaison de l'IL-1 $\beta$  à son récepteur IL1-R induit le recrutement et l'activation de la E3 ubiquitine ligase TRAF6 qui va s'auto-ubiquitiner en chaînes K63. Cette auto-ubiquitination de TRAF6 permet le recrutement et l'ubiquitination en chaîne K63 de NEMO, ce qui, ici aussi, conduit à l'activation du complexe IKK par phosphorylation et donc à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Gautheron and Courtois, 2010; Chen, 2012; Tokunaga, 2013).

Comme c'est le cas pour la monoubiquitination, la polyubiquitination est également impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN. À titre d'exemple, en réponse aux dommages à l'ADN double-brin

, les E3 ubiquitine ligases RNF8 et RNF168 synthétisent des chaînes de polyubiquitines K63 sur les sites de dommages, notamment sur les histones H1 et H2A, qui servent de plateformes de recrutement au complexe E3 ubiquitine ligase BRCA1-BARD1. À son tour, le complexe BRCA1-BARD1 forme des chaînes K6, K48 ou K63 sur de nombreux substrats impliqués dans le signalement ou dans la réparation des dommages à l'ADN (Thorslund et al., 2015; Lee et al., 2017).

### 3. *La polyubiquitination dégradative par le protéasome*

Le type de chaîne le plus décrit pour induire une dégradation du substrat est la polyubiquitination en chaîne K48 qui conduit à une dégradation par le protéasome. Le protéasome, étudié depuis plus de 30 ans, est le site de dégradation de nombreuses protéines cytosoliques et nucléaires polyubiquitinées. Aussi appelé protéasome 26S, il forme un cylindre composé d'une sous-unité catalytique nommée « Catalytic Core Particule (CP) » 20S ainsi que de deux sous-unités régulatrices nommées « Regulatory Particule (RP) » 19S (Murata et al., 2009) (**Figure 7**). Les protéines polyubiquitinées sont directement reconnues par les protéines de la sous-unité 19S du protéasome telles que Rpn1, Rpn10 et Rpn13. De plus, certaines protéines qui possèdent une forte affinité de liaison pour les chaînes d'ubiquitines K48, telles que la protéine Rad23, sont associées à la sous-unité 19S du protéasome et permettent le recrutement spécifique des substrats polyubiquitinés en K48 au protéasome pour assurer leur dégradation (Grice and Nathan, 2016).

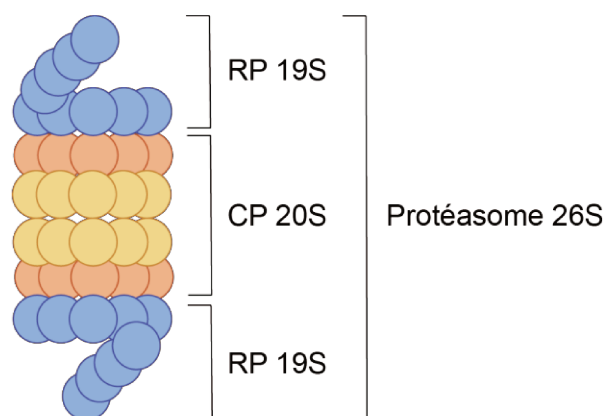


Figure 7 : Représentation schématique du protéasome 26S

La polyubiquitination K48 est le type de chaîne le plus représenté parmi la polyubiquitination (Kaiser et al., 2011). De plus, celle-ci est retrouvée particulièrement accumulée dans des conditions d'inhibition du protéasome, ce qui confirme son implication dans la dégradation protéasomale des substrats polyubiquitinés (P. Xu et al., 2009). Cependant, les chaînes K48 ne sont pas les seules à conduire à la dégradation protéasomale ; en effet, tous les types de chaînes, excepté la chaîne K63, sont accumulés en condition d'inhibition du protéasome (P. Xu et al., 2009). Cette accumulation est particulièrement observée pour les chaînes K11, impliquées dans la dégradation des régulateurs du cycle cellulaire (Jin et al., 2008; Min et al., 2015) et pour les chaînes K29. A noter que les chaînes K11 et K29 sont fréquemment retrouvées sous formes hétérotypiques, associées avec des chaînes K48, ce qui pourrait ainsi expliquer leur implication dans la dégradation par le protéasome (Meyer and Rape, 2014; Ohtake and Tsuchiya, 2017).

#### 4. *La polyubiquitination dégradative par le lysosome et l'autophagie*

Le protéasome n'est pas le seul compartiment cellulaire à être acteur de la dégradation des protéines. En effet, les protéines membranaires, les organites, mais également certaines protéines cytosoliques sont dégradées par un autre compartiment appelé lysosome. Les lysosomes sont des organites membranaires, présents chez les cellules animales, qui contiennent de nombreuses hydrolases nécessaires à la dégradation de divers composants cellulaires tels que les protéines, les lipides, les glucides ou encore les acides nucléiques (Kuchitsu and Taguchi, 2023). Pour permettre l'activité de ces hydrolases, le pH intraluminal des lysosomes doit être maintenu entre 4.5 et 5.5 grâce à de nombreuses pompes à protons de type ATPase-V (Yang and Wang, 2021).

Dans les cellules animales, il existe plusieurs voies qui conduisent un substrat à sa dégradation par les lysosomes (**Figure 8**) que nous allons maintenant passer en revue.



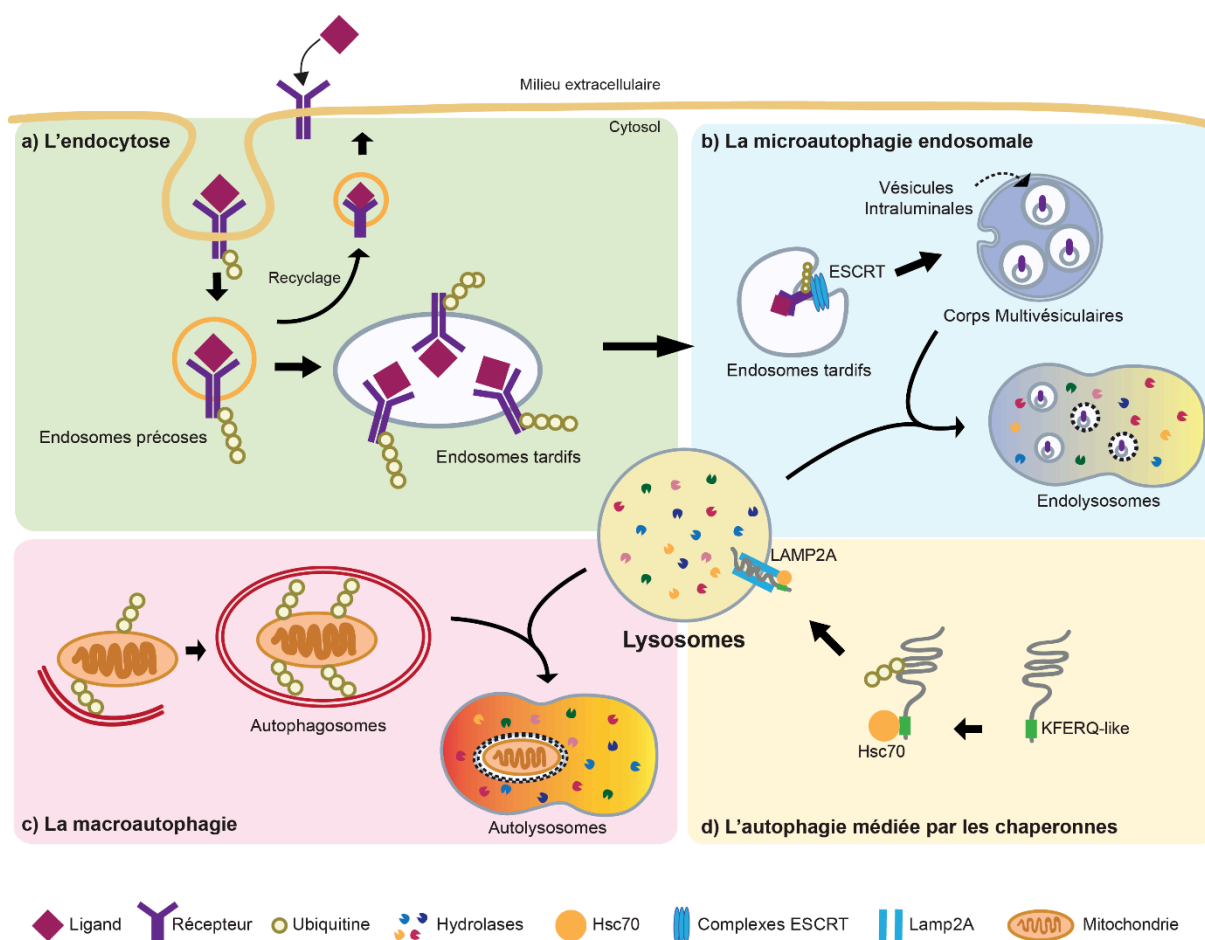


Figure 8 : Résumé graphique des différentes voies de dégradation lysosomale dans les cellules animales.

### a) L'endocytose et le recyclage à la membrane

Les substrats extracellulaires et les protéines membranaires (dont font partie les récepteurs cellulaires) sont internalisés à l'intérieur de la cellule par endocytose. Cela permet notamment la régulation de nombreuses voies de signalisation, de l'adhésion et de la migration cellulaire. Il existe plusieurs types d'endocytoses qui diffèrent par le substrat à internaliser et par les protéines impliquées dans la reconnaissance et le bourgeonnement de la membrane. L'endocytose des récepteurs à activité tyrosine kinase, tel que le récepteur à l'EGF, est particulièrement étudiée et décrite. Dans ce cas, la liaison de l'EGF à son récepteur induit l'ubiquitination du récepteur par les E3 ligases CBL ce qui, comme vu précédemment, sera un signal déclencheur de son internalisation dans des endosomes précoces. Ces endosomes précoces vont soit être recyclés à la membrane, ce qui permet le renouvellement du récepteur à la membrane, soit subir une maturation en endosomes tardifs puis en corps multivésiculaires « MultiVesicular Bodies (MVB) » qui vont ensuite fusionner aux lysosomes pour permettre la dégradation des protéines endocytées (Duncan et al., 2006; Sigismund et al., 2008; Haglund

and Dikic, 2012; Banushi et al., 2023). Ce tri des vésicules endosomales est accompli par les protéines ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) qui forment des complexes multiprotéiques (0, I, II et III) responsables du remodelage membranaire, dont plusieurs membres portent des domaines d'interaction avec l'ubiquitine (Clague and Urbé, 2017; Giraldo et al., 2020). C'est le cas, par exemple, des protéines ESCRT Hrs et Tsg101 des complexes ESCRT-0 et ESCRT-I respectivement, qui peuvent interagir avec l'ubiquitine (Henne et al., 2011).

Le niveau d'ubiquitination des protéines cargos tel que le récepteur à l'EGF, régulent le routage des protéines endocytées vers le recyclage à la membrane ou vers la dégradation lysosomale. Plusieurs déubiquitinases (DUB), qui sont des protéases spécifiques qui retirent l'ubiquitine des protéines (Mevisse and Komander, 2017) ont été identifiées comme pouvant moduler le recyclage de l'EGFR. Notamment, Sylvie Urbé et ses collègues ont pu observer que la DUB nommée AMSH est capable de cliver les chaînes d'ubiquitines de l'EGFR au niveau des endosomes précoces, favorisant ainsi le recyclage du récepteur à la membrane plasmique (McCullough et al., 2004). Cezanne-1, une autre DUB, a également été bien caractérisée pour favoriser la déubiquitination de l'EGFR avantagant également son recyclage à la membrane et la signalisation EGF (Pareja et al., 2012).

#### *b) La microautophagie endosomale*

Des portions d'endosomes peuvent également être conduites à une dégradation par les lysosomes grâce à un mécanisme nommé microautophagie endosomale ou voie endolysosomale. Dans ce cas, la portion de l'endosome concernée va bourgeonner puis se détacher par l'action des complexes ESCRT liés aux protéines ubiquitinées présentes à la surface de l'endosome, ce qui permettra la formation de vésicules intraluminales « IntraLuminal Vesicles (ILV) » qui seront regroupées dans des corps multivésiculaires (Falguières et al., 2008; Hurley, 2008; Sahu et al., 2011; Kuchitsu et al., 2023). Les MVB vont ensuite fusionner avec les lysosomes pour former des endolysosomes et ainsi permettre la dégradation de leur contenu (Kuchitsu and Taguchi, 2023).

#### *c) La macroautophagie et la dégradation par l'autophagosome*

Les substrats cellulaires ou les protéines membranaires ne sont pas les seuls à pouvoir être dégradés par les lysosomes. En effet, en réponse à un stress métabolique ou en cas d'altération de l'homéostasie cellulaire, des protéines cytosoliques voire même des organites entiers

peuvent aussi être la cible de la voie de dégradation lysosomale par un processus nommé autophagie. L'autophagie consiste en la formation d'une enveloppe à double-membrane nommée autophagosome autour du substrat à dégrader ; l'autophagosome fusionnera ensuite avec des lysosomes créant ainsi les autolysosomes qui permettront la dégradation des substrats endommagés. La formation des autophagosomes nécessite l'action séquentielle des protéines ATG (Autophagy-related proteins) qui permettent l'initiation, l'élongation puis la maturation de la double-membrane de l'autophagosome (Yu et al., 2018). L'autophagosome peut, lors de sa formation, englober des composants cellulaires de manière non-spécifique : on parle alors d'autophagie non-sélective. Cependant, le signalement d'un substrat destiné à sa dégradation par autophagie passe le plus souvent par sa polyubiquitination : on parle alors d'autophagie sélective. Cette polyubiquitination, suivie de la dégradation par l'autolysosome peut concerner divers substrats intracellulaires comme les mitochondries (on parle alors de mitophagie), le réticulum endoplasmique (ER-phagie), des agrégats cellulaires (agrégophagie) ou encore des pathogènes (xénophagie) (Shaid et al., 2013; Fleming et al., 2022). Le rôle de l'ubiquitination dans la mitophagie a été particulièrement décrit. En effet, en cas de dommages d'une mitochondrie, la E3 ubiquitine ligase Parkin est recrutée et activée à sa surface pour induire sa polyubiquitination et ainsi initier la formation de l'autophagosome autour de la mitochondrie endommagée (Harper et al., 2018b).

#### *d) L'autophagie médiée par les chaperonnes*

Comme nous l'avons vu avec la microautophagie endosomale, toutes les voies de l'autophagie ne passent pas nécessairement par la formation membranaire de l'autophagosome. Un autre exemple est l'autophagie médiée par les chaperonnes « Chaperone-Mediated Autophagy (CMA) » qui permet la dégradation sélective de protéines cytosoliques. Dans ce cas, une séquence protéique de type « KFERQ-like » est présente sur la protéine et est reconnue par les chaperonnes Hsc70. Par l'intermédiaire de Hsc70, la protéine cible va être dirigée vers les lysosomes où LAMP2A facilitera sa translocation vers la lumière lysosomale (Kuchitsu and Taguchi, 2023). Cependant, près de la moitié du protéome présente au moins une séquence de type KFERQ-like (Kirchner et al., 2019), or toutes ces protéines ne sont pas dégradées par la voie CMA, ce qui laisse supposer que le mécanisme conduisant à la reconnaissance du substrat n'est pas encore totalement connu. Dans ce but, les chercheurs s'intéressent à l'importance de la polyubiquitination dans la voie CMA. Il a par exemple été observé que la formation de chaînes d'ubiquitines K63 est nécessaire pour la dégradation du facteur de transcription HIF1A par la voie CMA (Ferreira et al., 2015).

A noter que la CMA peut partager des points communs avec la microautophagie endosomale. En effet, dans certains cas, un substrat portant une séquence KFERQ-like peut être reconnu par Hsc70 et ce complexe ne sera pas dirigé vers LAMP2A mais plutôt invaginé dans des endosomes tardifs et/ou des corps multivésiculaires qui fusionneront plus tard avec les lysosomes (Sahu et al., 2011).

*e) Rôle des chaînes K63 dans la dégradation lysosomale*

Au début de l'étude du code d'ubiquitine, celui-ci était simplifié en deux branches : la voie protéolytique médiée par les chaînes K48 et la voie non-protéolytique médiée par les chaînes K63. Or depuis le début des années 2000, les chaînes d'ubiquitines K63 sont au cœur de nombreux travaux de recherches et se sont révélées être plus complexes qu'elles n'y semblaient. Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée aux conséquences de ce type de chaîne d'ubiquitines ainsi qu'à la dégradation protéique dépendante du lysosome.

Les chaînes K63 sont le deuxième type de chaîne le plus représenté dans les cellules animales après les chaînes K48 (Kaiser et al., 2011) ce qui laisse supposer leur rôle clé au sein de nombreuses voies de signalisation cellulaire.

Parce que ces chaînes ne sont pas retrouvées accumulées dans des conditions d'inhibition du protéasome leur rôle potentiel dans la dégradation protéasomale a été exclu (P. Xu et al., 2009). Pourtant, les chaînes d'ubiquitines K63 sont bel et bien capable de lier le protéasome 26S purifié (Saeki et al., 2009) mais présentent cependant une très faible affinité pour le récepteur Rad23 par rapport aux chaînes K48 (Raasi et al., 2004). De plus, certaines protéines cytoplasmiques telles que les membres des complexes ESCRT présentent une forte affinité pour les chaînes K63 et empêchent ainsi leur liaison au protéasome 26S cellulaire (Nathan et al., 2013). Enfin, il a été observé que les chaînes d'ubiquitines en K63 sont plus rapidement désassemblées que les chaînes K48 ce qui pourrait limiter leur interaction avec le protéasome 26S (Cooper et al., 2009).

Sur le modèle de levures mutantes K63R pour la molécule d'ubiquitine, où la lysine 63 est remplacée par une arginine non-ubiquitinable, l'équipe de Rosine Haguenaer-Tsapi à l'Institut Jacques Monod a observé que des protéines de la membrane plasmique des levures sont sujettes à la polyubiquitination. En utilisant le modèle de l'uracile perméase, une protéine membranaire chez la levure, Rosine Haguenaer-Tsapi et ses collègues ont démontré que cette protéine est

polyubiquitinée en chaîne K63 et que cette modification est nécessaire pour son internalisation (Galan and Haguenauer-Tsapis, 1997). Ainsi, ces travaux proposaient que la polyubiquitination en chaîne K63 joue un rôle en tant que signal de l'endocytose.

Le rôle de la polyubiquitination K63 dans l'endocytose a par la suite été largement observé et confirmé dans les cellules animales. En effet, les recherches ont, par exemple, clairement établi que l'internalisation du récepteur à l'EGF (Huang et al., 2006), du récepteur au facteur de croissance TrkA (Geetha et al., 2005) et des molécules du CMH de classe I (Duncan et al., 2006) dépendent des chaînes d'ubiquitine liées en K63 respectivement induites par les E3 ubiquitine ligases CBL, TRAF6 et MARCH.

Par la suite, de nombreux travaux de recherche ont étudié le rôle des chaînes K63 dans le tri des cargos ubiquitinés puis dans leur dégradation par les lysosomes. Les chaînes K63 ont clairement été montrées comme étant responsables de l'adressage de nombreuses protéines vers les MVB (Erpapazoglou et al., 2014). Pour exemples, des études ont démontré l'importance des chaînes K63 dans l'adressage de la perméase Gap1 (Lauwers et al., 2009), de la protéine membranaire mélanosomale MART-1 (Erpapazoglou et al., 2012) mais aussi de l'homologue à la cavéoline CAV-1 (Sato et al., 2014) vers la lumière des MVB. Cela s'explique par le fait que les complexes ESCRT, et plus particulièrement les protéines Hrs et Tsg101 pour les complexes ESCRT-0 et ESCRT-I respectivement, présentent une plus forte affinité de liaison pour les chaînes d'ubiquitine K63 que pour les autres types de chaînes d'ubiquitines (Ren and Hurley, 2010; Erpapazoglou et al., 2012; Strickland et al., 2022) (**Figure 9**). Par exemple, il a récemment été observé que la protéine STING subit une polyubiquitination en chaîne K63, qui est reconnue par la protéine Tsg101, membre du complexe ESCRT-I, *via* son domaine de liaison à l'ubiquitine. Cette interaction entraîne le recrutement des autres protéines ESCRT et conduit à la dégradation lysosomale de STING par microautophagie endosomale (Kuchitsu et al., 2023).

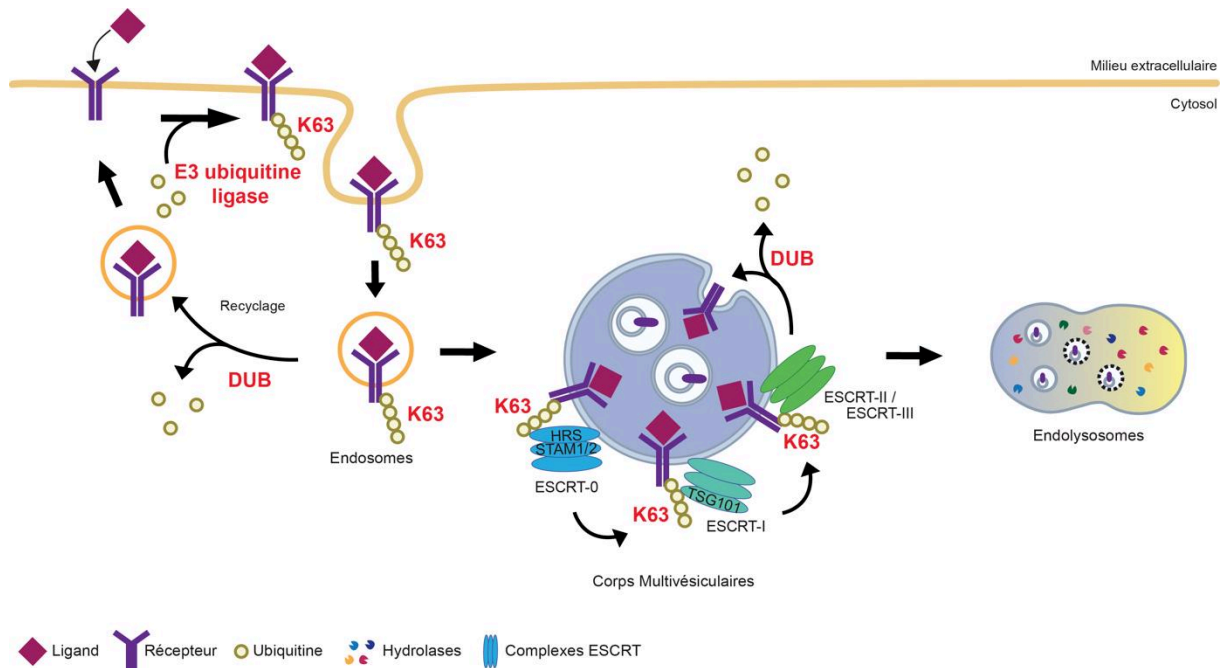


Figure 9 : Schéma simplifié représentant le rôle des chaînes d'ubiquitines K63 dans le trafic intracellulaire.

Les déubiquitinases spécifiques des chaînes K63 sont également impliquées dans la dégradation lysosomale. En effet, pour renouveler le stock d'ubiquitine libre et pour faciliter la dégradation de la protéine cible polyubiquitinée, celle-ci se voit retirer son ubiquitine par des DUB spécifiques. Sylvie Urbé et ses collègues ont pu, par exemple, préciser le rôle de l'AMSH dans la régulation de la dégradation du récepteur à l'EGF. En effet, nous avons pu voir précédemment que l'AMSH, en interaction avec le complexe ESCRT-0, va favoriser le recyclage de l'EGFR à la membrane plasmique. Cependant, l'équipe de chercheurs a également pu observer que cette même DUB peut favoriser la dégradation du récepteur lorsqu'elle est en interaction avec le complexe ESCRT-III en retirant spécifiquement les chaînes d'ubiquitines K63 de l'EGFR afin de faciliter sa dégradation lysosomale (McCullough et al., 2006).

Enfin, l'étude de la dégradation des protéines cytosoliques relocalisées dans les voies endosomales a permis d'identifier le rôle des chaînes d'ubiquitine en K63 dans la dégradation lysosomale d'autres protéines que les récepteurs membranaires. En effet, Alfred Goldberg et son équipe ont dans un premier temps observé que l' $\alpha$ -synuclein est ubiquitinée en chaîne K63 et que cette ubiquitination est responsable de sa dégradation par les lysosomes (Tofaris et al., 2011). Depuis, de nombreux travaux de recherches ont confirmé le rôle des chaînes K63 dans l'induction de la dégradation lysosomale de diverses protéines. Parmi celles-ci, nous pouvons

citer de récents exemples tels que la DUB UCH-L1 impliquée dans des maladies neurodégénératives (McKeon et al., 2015), la protéine virale M2 responsable de la réplication du virus de la grippe A (Liu et al., 2021), ou encore du facteur de transcription NFAT5 impliqué dans le maintien de l'homéostasie osmotique et la réponse immunitaire (Y. Li et al., 2023).

Pour compléter leur rôle dans l'induction de la dégradation lysosomale, les chaînes de polyubiquitines en K63 ont été montrées comme étant impliquées dans l'autophagie (Erpapazoglou et al., 2014) et plus particulièrement dans la mitophagie. En effet, il a été observé que l'expression du mutant K63R de la molécule d'ubiquitine réduit plus fortement le niveau de mitophagie cellulaire comparé à l'expression d'autres mutants de l'ubiquitine (Ordureau et al., 2015). De plus, l'ubiquitination en chaîne K63 induite par la E3 ubiquitine ligase Parkin a été montrée comme étant un facteur clé dans le ciblage de la mitochondrie endommagée ainsi que dans le recrutement et l'activation des acteurs de la mitophagie (Geisler et al., 2010; Okatsu et al., 2010).

#### G. Les domaines d'interaction à l'ubiquitine et décodage du code d'ubiquitine

Une fois le substrat ubiquitiné, le code complexe de l'ubiquitine est décrypté grâce à des protéines portant des domaines spécialisés de liaison à l'ubiquitine « Ubiquitin Binding Domains (UBD) ». Les UBD se lient de façon non-covalente aux acides aminés Leu8/Ile44/Val70 qui forment une surface hydrophobe sur la molécule d'ubiquitine. A ce jour, plus de 20 familles de domaines de liaison à l'ubiquitine ont été identifiées et classées selon leur structure ainsi que leur mode d'interaction avec l'ubiquitine (Husnjak and Dikic, 2012).

Dans le cadre de mes travaux de thèse, je me suis particulièrement intéressée aux motifs d'interaction à l'ubiquitine « Ubiquitin-Interacting Motif (UIM) », une famille d'UBD caractérisée par une vingtaine d'acides aminés hautement conservés et organisés en hélice  $\alpha$  (Husnjak and Dikic, 2012).

Ce motif UIM a été décrit pour la première fois sur la sous-unité Rpn10/S5a du protéasome 19S sous forme de tandem capable de lier des protéines polyubiquitinées (Deveraux et al., 1994). Depuis, les motifs UIM ont été observés sur de nombreuses autres protéines et notamment sur des protéines impliquées dans l'endocytose, le trafic vésiculaire ainsi que dans la formation des MVB telles que l'epsin1, Eps15 ou encore Vps27 (Hofmann and Falquet, 2001; Raiborg et al.,

2002; Swanson et al., 2003) (**Figure 10**). Par exemple, il a été démontré que les deux motifs UIM de Vps27 sont nécessaires à l'interaction de Vps27 avec des récepteurs polyubiquitinés, les dirigeant ainsi vers les corps multivésiculaires et entraînant leur dégradation par la voie endolysosomale (Shih et al., 2002).

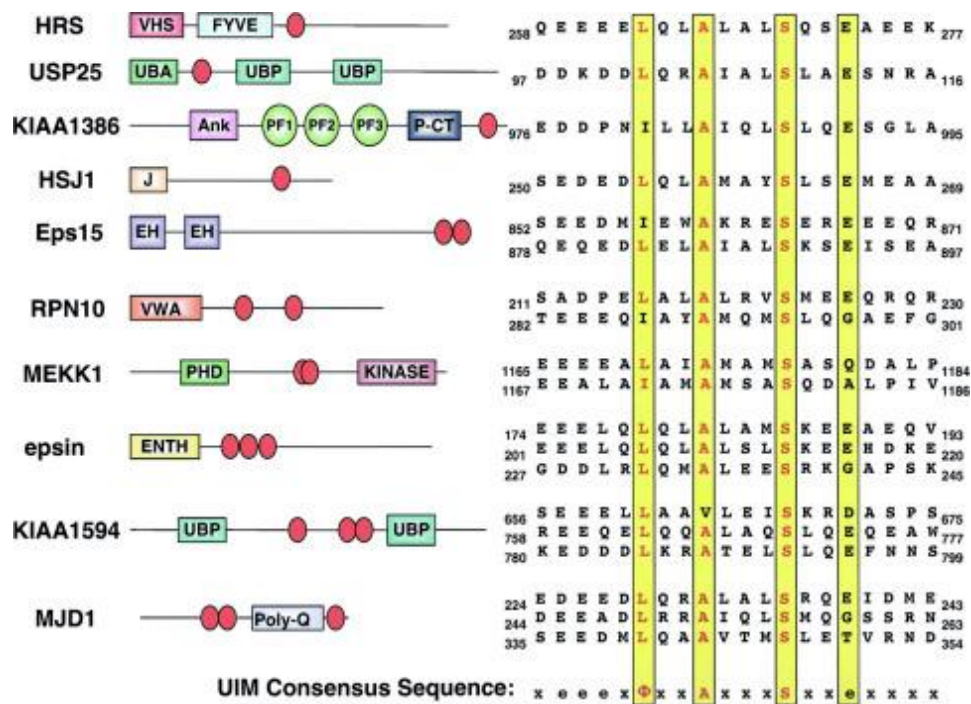
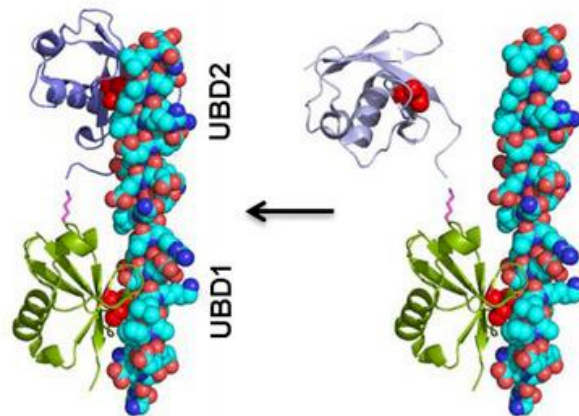


Figure 10 : Localisation et séquence du motif UIM présent sur des protéines aux fonctions variées. Le motif UIM est schématisé en ovale rouge et les acides aminés hautement conservés sont écrits en rouge et surlignés en jaune. La séquence consensus est indiquée. D'après Miller et al., 2004.

Étonnamment, il a aussi été observé que la mutation des motifs UIM de la protéine Eps15 empêchait sa monoubiquitination (Polo et al., 2002). De ce fait, les motifs UIM pourraient être à la fois impliqués dans la reconnaissance de l'ubiquitine mais aussi dans l'induction de l'ubiquitination du porteur du motif.





tandem UIMs (Rap80) – Lys63-Ub<sub>2</sub>

*Figure 11 : Représentation de la structure du tandem UIM de la protéine Rap80 interagissant avec un dimère d'ubiquitines lié en chaîne K63. La surface d'interaction (Ile44) est représentée en rouge sur l'ubiquitine. D'après Scott et al., 2015.*

Enfin, nous pouvons noter que les motifs UIM peuvent présenter une légère spécificité pour la liaison de chaînes d'ubiquitines en K63. Il a par exemple été observé que la protéine Rap80, membre du complexe de réparation des dommages à l'ADN, BRCA1, lie spécifiquement les chaînes K63 sur les sites de cassure de l'ADN double-brin (Sobhian et al., 2007; Sato et al., 2009) (**Figure 11**) permettant ainsi le recrutement du complexe BRCA1-BARD1 et l'induction de la cascade de signalisation par l'ubiquitination qui en découle. De la même manière, il a aussi été observé que certaines protéines à domaine UIM impliquées dans la voie endolysosomale telles que STAM, membre du complexe ESCRT-0, et Epsin1 présentent une spécificité pour les chaînes K63 lors du tri des cargos polyubiquitinés (Nathan et al., 2013).

## II. Les enzymes impliquées dans le mécanisme d'ubiquitination

### A. Les E1 d'activation

Il existe huit enzymes E1 d'activation, exprimées dans le génome humain, qui sont impliquées dans le transfert des différentes molécules d'UBL. Elles sont classées en deux catégories : les enzymes E1 canoniques, impliquées dans le transfert de la molécule d'ubiquitine et des molécules SUMO, NEDD8, FAT10 et ISG15, et les enzymes E1 non-canoniques impliquées

dans l'activation d'autres molécules UBL telles que UFM1 (Schulman and Wade Harper, 2009) (Figure 12).

E1	Complex Formation	UBL	Cellular Process	E2
Uba1	Monomer	Ub	Ubiquitination	38
Uba6	Monomer			
Uba6	Monomer	FAT10	FAT10ylation	USE1
Uba7	Monomer	ISG15	ISGylation	Ubch8
Sae1/Uba2	Heterodimer	SUMO	SUMOylation	Ubc9
Nae1/Uba3	Heterodimer	NEDD8	NEDDylation	Uba12
Uba4/Mocs3	Homodimer	URM1	URMylation	Unknown
Uba5	Homodimer	UFM1	UFMylation	Ufc1
Atg7	Homodimer	ATG8/ATG12	Autophagy	ATG3/ATG10

Figure 12 : Tableau résumant les couples d'enzymes E1-E2 impliqués dans les modifications par les protéines UBiquitin-Likes (UBL). Les enzymes canoniques sont surlignées en vert tandis que les enzymes non-canoniques sont surlignées en rouge. Adapté de Salas-Lloret and González-Prieto, 2022.

Parmi les huit enzymes E1 d'activation, seulement deux sont impliquées dans la liaison de la molécule d'ubiquitine : UBA1 (UBiquitin-like modifier Activating enzyme 1) et UBA6 (UBiquitin-like modifier Activating enzyme 6) (Schulman and Wade Harper, 2009). Cependant, UBA1 est la E1 majoritairement responsable de la conjugaison de l'ubiquitine dans la cellule. De plus, UBA1 est exprimée sous deux isoformes : UBA1A, majoritairement nucléaire et UBA1B, majoritairement cytoplasmique (Salas-Lloret and González-Prieto, 2022).

Les enzymes E1 canoniques comportent toutes trois domaines particulièrement importants pour l'activation de la molécule d'UBL : un domaine adénylation qui lie l'ATP, un domaine catalytique portant la cystéine qui se lie à la molécule d'UBL ainsi qu'un troisième domaine C-terminal UFD (Ubiquitin-Fold Domain) qui recrute l'enzyme de conjugaison E2. Les E1 non-canoniques quant à elles, présentent certains domaines qui leurs sont spécifiques (Schulman and Wade Harper, 2009; Groen and Gillingwater, 2015).

La complexité du mécanisme d'ubiquitination commence réellement lors de l'assemblage du couple E1-E2. En effet, les enzymes E1 spécifiques de l'ubiquitine ont le potentiel d'interagir avec un plus grand nombre d'enzymes de conjugaison E2.

## B. Les E2 de conjugaison

La deuxième étape du mécanisme d'ubiquitination consiste à transférer la molécule d'ubiquitine depuis la E1 vers la cystéine active de la E2 par transthiolation. Il existe une quarantaine d'enzymes de conjugaison E2 dans les cellules humaines et qui sont, comme pour les E1, divisées en deux catégories : les E2 canoniques et les E2 non-canoniques. Les E2 canoniques sont impliquées dans le transfert de la molécule d'ubiquitine mais également des molécules SUMO, NEDD8, ISG15 et FAT10. Elles partagent un domaine catalytique commun nommé UBC core (UBiquitin-Conjugating Core) qui porte la cystéine qui sera liée à la molécule UBL. Les enzymes E2 non-canoniques, impliquées dans le transfert d'autres molécules UBL telles que UFM1, présentent quelques variations structurales dans leur extrémité C-terminale (Cappadocia and Lima, 2018).

Le tableau présenté en **Figure 12** résume les couples enzymatiques E1-E2 impliqués dans le transfert des différentes molécules UBL. Nous pouvons noter que les enzymes E2 canoniques reçoivent l'UBL activée d'une E1 canonique, tandis que les E2 non-canoniques la reçoivent d'une E1 non-canonique (Cappadocia and Lima, 2018).

## C. Les E3 ubiquitine ligases

Enfin, la spécificité du mécanisme d'ubiquitination est gouvernée par la E3 ubiquitine ligase qui est responsable du transfert de l'ubiquitine sur le substrat. Les E3 ubiquitine ligases lient l'enzyme E2 conjuguée à l'ubiquitine et le substrat pour faciliter la formation d'une liaison isopeptidique entre l'ubiquitine et la lysine de la protéine cible.

En 2022, le nombre de E3 ubiquitine ligases exprimées par le génome humain est estimé à environ 700 (Salas-Lloret and González-Prieto, 2022). Parmi elles, plus de 600 E3 ligases sont impliquées dans le transfert de la molécule d'ubiquitine tandis que peu d'E3 ligases sont connues pour transférer les autres UBL telles que SUMO, NEDD8 ou encore ATG8 et ATG12 (Cappadocia and Lima, 2018). Les E3 ubiquitine ligases ciblent leur substrat de différentes manières : certaines contiennent des domaines ou des motifs impliqués dans des interactions protéine-protéine leur permettant un contact direct avec leur substrat, d'autres nécessitent la formation d'un complexe protéique *via* une protéine adaptatrice pour cibler le transfert de l'ubiquitine (Buetow and Huang, 2016).

Les E3 ubiquitine ligases sont classifiées sur la base de leur structure ainsi que leur mode de transfert de la molécule d'ubiquitine en trois familles majeures : les E3 à domaine RING (Really Interesting New Gene), les E3 à domaine HECT (Homologous to E6-associated protein C-Terminus) et les E3 à domaine RBR (RING-Between-RING) (Salas-Lloret and González-Prieto, 2022).

Alors que les E3 ubiquitine ligases de la famille RING agissent comme des « adaptateurs » permettant le rapprochement de la E2 conjuguée à l'ubiquitine et du substrat (Deshaies and Joazeiro, 2009), les E3 ligases de la famille HECT contiennent, comme les E1 et les E2, une cystéine catalytique qui forme une liaison thioester avec la molécule d'ubiquitine (Huang et al., 1999). Enfin, Les E3 RBR forment une famille « hybride » en présentant une structure RING et une cystéine catalytique caractéristique des HECT (Spratt et al., 2014) (**Figure 13**).

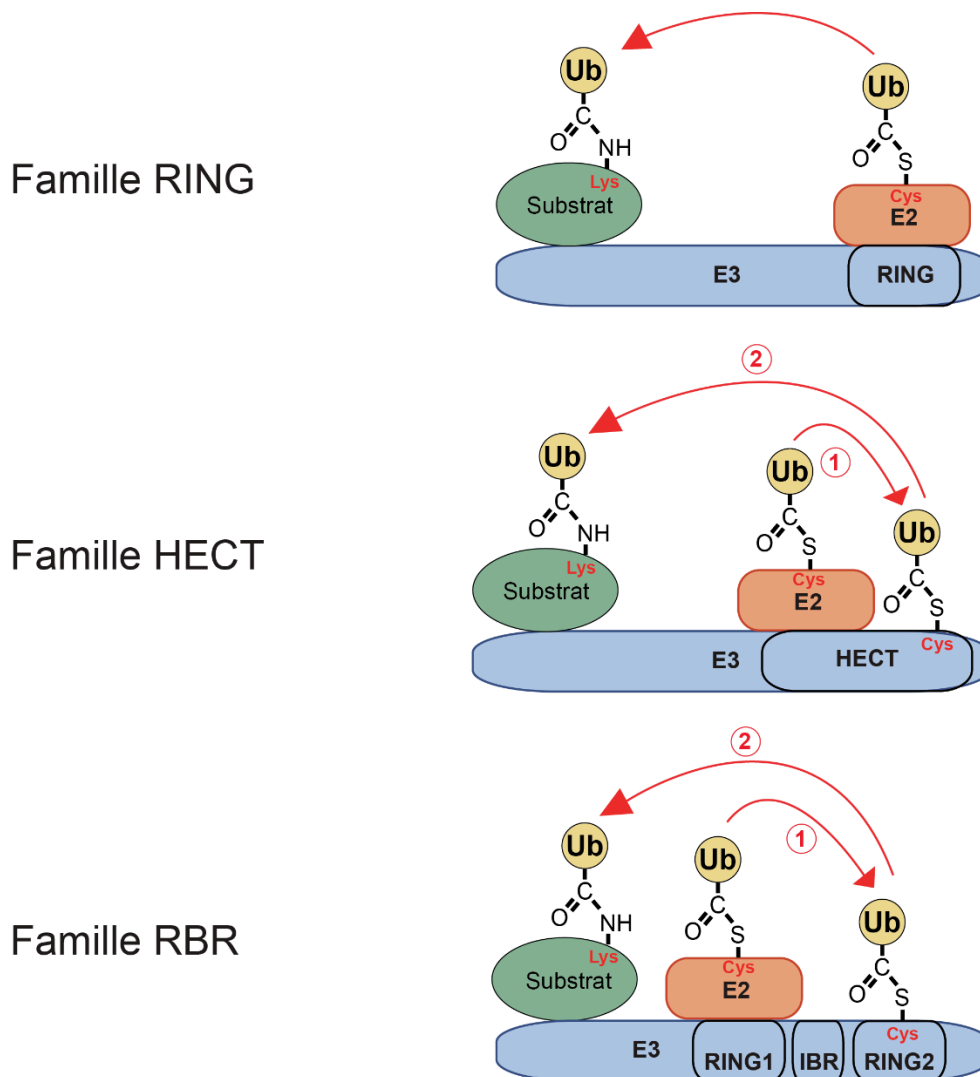


Figure 13: Schéma représentant les modes de transfert de l'ubiquitine des différentes familles de E3 ligases RING, HECT et RBR.

## 1. Les E3 RING

Avec plus de 600 membres, les E3 ubiquitine ligases de type RING représentent la plus grande famille de ligases (W. Li et al., 2008). Ces E3 sont caractérisées par leur domaine catalytique RING constitué de huit cystéines et histidines qui forment deux motifs en doigt de zinc (Lorick et al., 1999) (**Figure 14**).

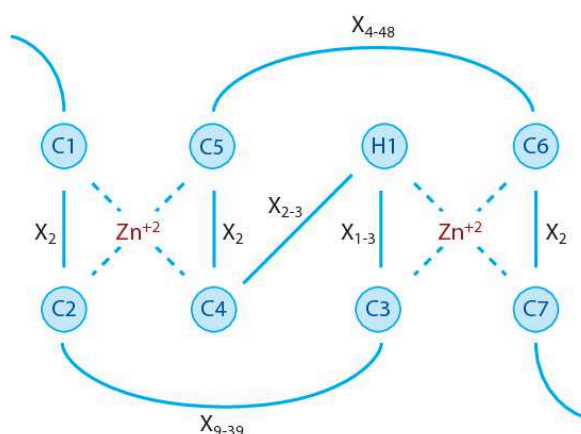


Figure 14 : Représentation de la séquence et de l'organisation en doigt de zinc d'un domaine RING. D'après Deshaies and Joazeiro, 2009.

C'est ce domaine RING qui facilite le transfert direct de l'ubiquitine depuis la E2 conjuguée vers le substrat. Certaines E3 ligases de cette famille ne portent pas de réel domaine RING mais un domaine U-box qui adopte une conformation similaire aux domaines RING à la différence que les deux motifs en doigt de zinc sont remplacés par deux chaînes latérales structurées par des liaisons hydrogènes (Ohi et al., 2003). Enfin, dans cette famille de E3 ligases se trouvent aussi des enzymes « hybrides » nommées SP-RING. Ces E3 portent un domaine d'activité à mi-chemin entre le RING et le U-box dans la mesure où elles ont un motif en doigt de zinc et un motif stabilisé par des chaînes latérales de liaisons hydrogènes (Yunus and Lima, 2009).

Les E3 RING peuvent fonctionner soit sous forme de monomères, soit sous formes de dimères, que cela soit des homo- ou des hétérodimères. Le complexe E3 ligase impliqué dans la signalisation des dommages à l'ADN BRCA1/BARD1 est un exemple d'hétérodimère composé de deux E3 ubiquitine ligases RING (Brzovic et al., 2001).

De plus, certaines E3 ubiquitines ligases RING se présentent sous forme de complexes multiprotéiques. C'est par exemple le cas des Cullin-RING ubiquitin Ligases (CRL), des complexes comportant une E3 ligase de type RING (RBX1/2) et des protéines nommées cullines qui

servent de protéines d'échafaudage pour joindre le domaine RING de la E3 et la E2 au substrat à ubiquitiner grâce à l'interaction avec des protéines adaptatrices (Lydeard et al., 2013).

Un autre exemple de complexe E3 est le complexe APC/C, responsable de la régulation du cycle cellulaire, qui est composé d'une douzaine de protéines dont une E3 ligase RING (Apc11), une protéine cullin-like (Apc2) et des plusieurs protéines adaptatrices permettant le recrutement du substrat (Schreiber et al., 2011).

## 2. Les E3 HECT

À la différence des E3 RING, les E3 ubiquitine ligases HECT forment une liaison thioester intermédiaire avec la molécule d'ubiquitine avant de la transférer sur le substrat (**Figure 13**). Les E3 HECT sont caractérisées par un domaine catalytique HECT d'environ 350 acides aminés toujours localisé dans la partie C-terminale de l'enzyme (**Figure 15**). Ce domaine comprenant la cystéine catalytique est conservé au sein des cellules eucaryotes, entre les plantes, les levures et les animaux (Huibregtse et al., 1995; Wang and Spoel, 2022).

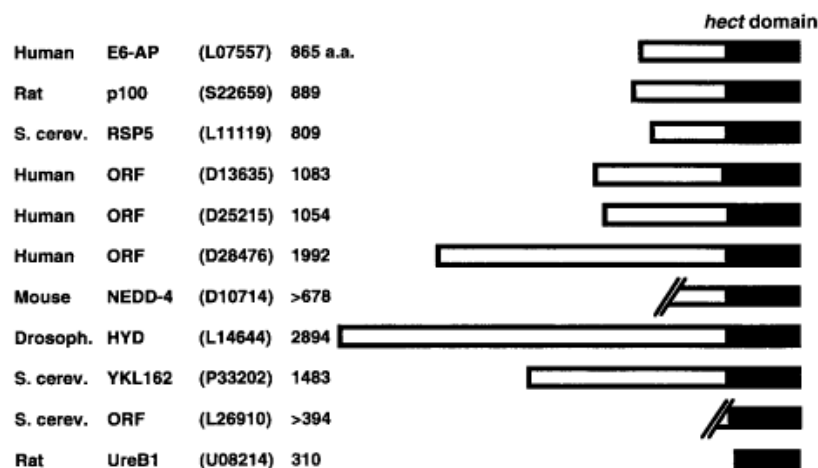


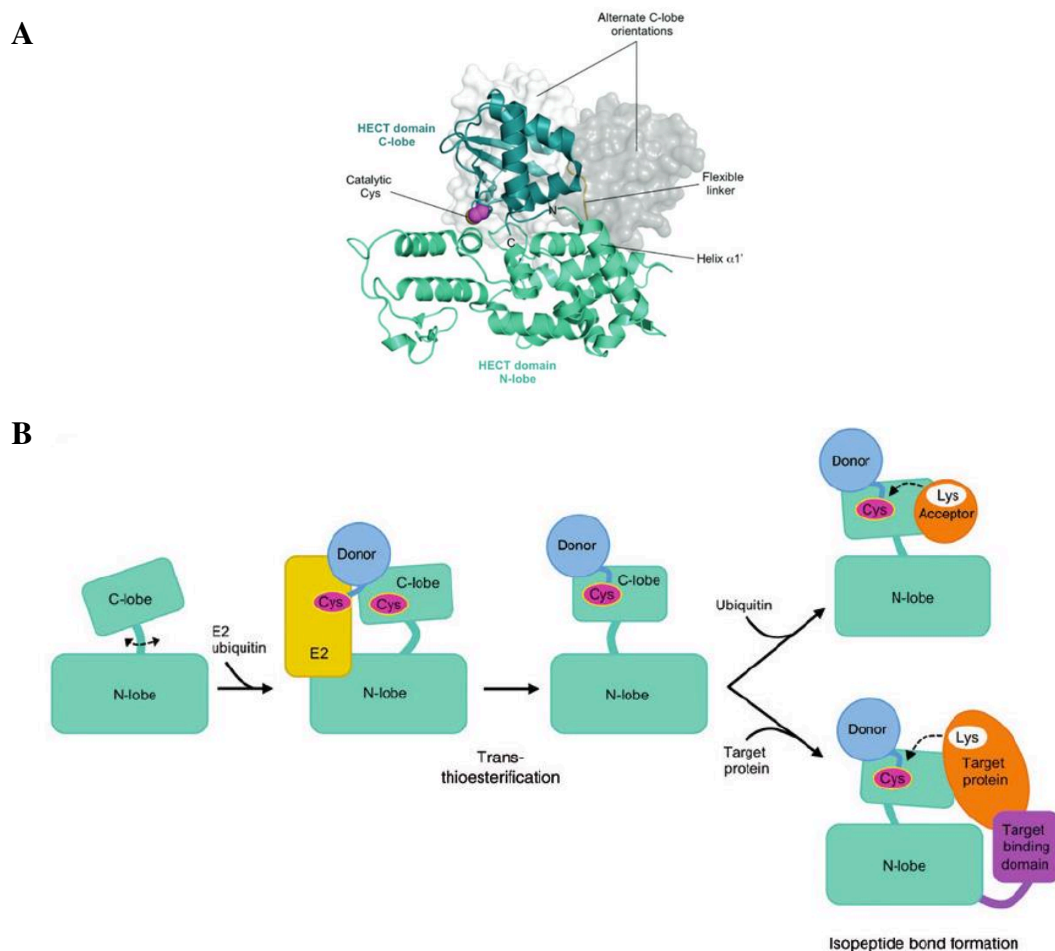
Figure 15 : Représentation schématique de onze protéines eucaryotes partageant le domaine d'activité catalytique E3 ligase « HECT ». D'après Huibregtse et al., 1995.

### a) Le domaine HECT

La première caractérisation d'une protéine à domaine HECT a été réalisée en 1993 par Peter Howley et ses collègues. Ils ont étudié le mécanisme permettant à la protéine E6 des papillomavirus humains oncogéniques de types 16 et 18 de cibler le suppresseur de tumeur p53 et d'en induire sa dégradation par la voie protéolytique. La protéine associée à E6 « E6-Associated Protein (E6-AP) » s'est avérée être un élément clé dans la formation du complexe E6/p53 et joue le rôle de E3 ubiquitine ligase dans la protéolyse de p53 (Scheffner et al., 1993).

Par la suite, la comparaison de séquences protéiques a permis d'identifier des similarités du domaine C-terminal de E6-AP chez d'autres protéines eucaryotes à activité E3 ligase, définissant ainsi le domaine catalytique HECT pour Homologous to the E6-AP C-Terminus (Huibregtse et al., 1995) (**Figure 15**).

Le domaine HECT est composé de deux lobes : un lobe N-terminal structuré en hélice  $\alpha$ -hélicoïdale qui interagit avec la E2 conjuguée, et un lobe C-terminal mixte hélice  $\alpha$  / feuillet  $\beta$ , qui porte la cystéine catalytique qui sera liée à la molécule d'ubiquitine pendant la réaction d'ubiquitination (Huang et al., 1999). Ces deux lobes sont reliés par une région linker flexible qui permet de rapprocher la E2, uniquement lorsque celle-ci est chargée, de la cystéine catalytique de la E3 (Verdecia et al., 2003; Lorenz et al., 2013) (**Figure 16**).



*Figure 16 : (A) Structure du domaine HECT de WWP1. Le lobe N-terminal (N-lobe) est représenté en vert clair, la région linker (Flexible linker) est représentée en jaune, le lobe C-terminal (C-lobe) est représenté en vert foncé et la cystéine catalytique est représentée en sphères violettes. (B) Représentation schématique du transfert d'une molécule d'ubiquitine*

depuis une E2 activée à une E3 de type HECT. Les lobes N- et C-terminal sont représentés en vert. La E2 activée est représentée en jaune. Les cystéines catalytiques sont représentées en rose. L'ubiquitine est représentée en bleu. Le substrat est représenté en orange et le domaine d'interaction au substrat est représenté en violet. D'après Lorenz, 2018.

Les E3 ubiquitine ligases de la famille HECT, qui sont au nombre de 28 dans les cellules humaines, vont différer de par leur partie N-terminale. C'est, en effet, en fonction des domaines présents dans cette région que les E3 HECT sont classées en trois sous-familles : la famille NEDD4 (NEDD4 E3s), la famille HERC (HERC E3s) et enfin les « autres » E3 HECT (Other-HECT E3s) (**Figure 17**). Les E3 ubiquitine ligases de la famille NEDD4 seront détaillées dans le chapitre suivant (Chapitre III). Nous allons donc nous intéresser dans cette partie uniquement aux deux autres types de E3 à domaine HECT.

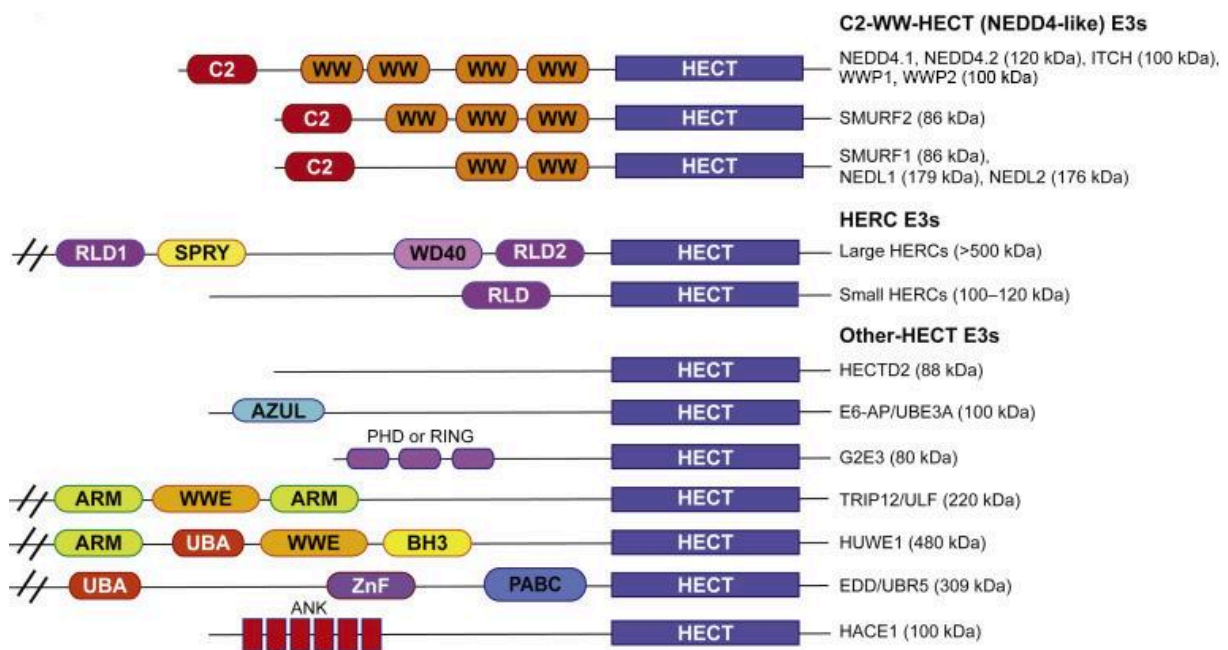


Figure 17 : Représentation schématique des différentes E3 ligases humaines de la famille HECT. D'après Bernassola et al., 2019.

### b) La sous-famille HERC

La sous-famille HERC (HECT and RLD domain-Containing) comprend six membres qui sont répartis dans deux groupes en fonction de leur taille et des domaines qu'ils présentent en plus du domaine HECT : les grandes HERC (Large HERCs) que sont HERC1 et HERC2 et les petites HERC (Small HERCs) que sont HERC3 à HERC6 (Sánchez-Tena et al., 2016; Weber et al., 2019).



Les HERC sont caractérisées par la présence d'au moins un domaine RLD pour « Regulator of Chromatin Condensation 1 (RCC1)-Like Domain ». Ce domaine RLD sert d'une part à la liaison de la E3 à son substrat, et d'autre part de facteur d'échange nucléotidique « Guanine nucleotide Exchange Factor (GEF) » pour des petites GTPases impliquées dans le trafic membranaire (García-Cano et al., 2019; Weber et al., 2019).

### c) *Les autres E3 ubiquitine ligases HECT*

Les autres E3 ligases de la familles HECT présentent toutes le domaine d'activité HECT mais ne partagent pas d'autres domaines communs avec les autres E3, elles sont donc regroupées dans la sous-famille nommée « Autres HECT (Other HECTs) ». Toutefois, ces enzymes portent d'autres types de domaines protéiques qui leur permettent de reconnaître et d'interagir avec leur substrat (Bernassola et al., 2019).

### 3. *Les E3 RBR*

La famille des E3 ubiquitine ligases de type RBR comprend quatorze E3 dans les cellules humaines (Toma-Fukai and Shimizu, 2021). Toutes les E3 de type RBR présentent un domaine catalytique constitué d'un enchainement de 3 domaines RING1-IBR-RING2 (**Figure 18**). Le domaine RING1 adopte une conformation en doigt de zinc typique d'un domaine RING (11.A.1) qui lie la E2 activée liée à l'ubiquitine de la même manière que les E3 RING. Le domaine RING2, quant à lui, n'adopte pas la conformation d'un domaine RING classique. Il porte la cystéine catalytique impliquée dans la réaction de transthiolation qui permet à l'enzyme de lier la molécule d'ubiquitine à la façon d'une E3 HECT (Cotton and Lechtenberg, 2020). Le domaine intermédiaire appelé « in-between-RING (IBR) » et les régions linkers entre les domaines servent de région flexible qui permettent le réarrangement conformationnel nécessaire au transfert de l'ubiquitine depuis la E2 chargée, fixée sur le domaine RING1, vers la cystéine active du domaine RING2 de la E3, et enfin vers le substrat (Lechtenberg et al., 2016; Cotton and Lechtenberg, 2020). Les E3 de type RBR présentent donc un mécanisme d'ubiquitination hybride entre une E3 de type RING et de type HECT.

Parmi les E3 ubiquitine ligases de type RBR, les plus connues et étudiées sont sûrement Parkin, HOIL1 et HOIP. Parkin, vue précédemment, est une E3 ubiquitine ligase impliquée dans la mitophagie et dont le dysfonctionnement est associé au développement de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson (Clausen et al., 2024). HOIL1 et HOIP

sont des E3 ligases membres du complexe LUBAC « Linear Ubiquitin Assembly Complex », qui, comme son nom l'indique, est responsable de la formation de chaînes linéaires d'ubiquitines liées en M1 (Sasaki and Iwai, 2023).

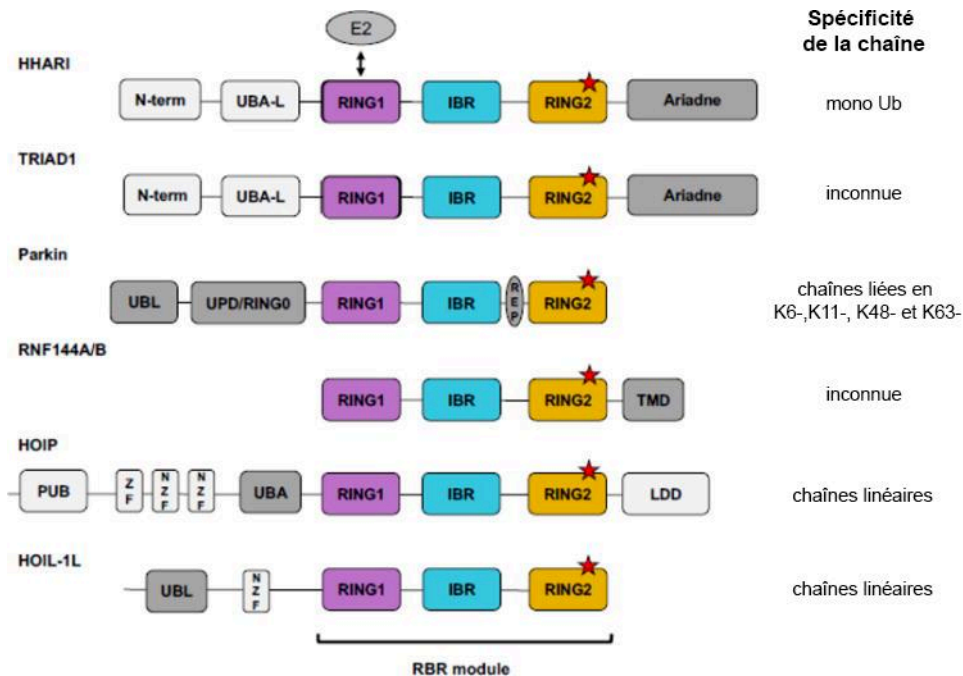


Figure 18 : Représentation schématique de quelques E3 ubiquitine ligases RBR humaines. Le domaine RING2 porte la cystéine active représentée par une étoile rouge. Lorsqu'il est connu, le type de chaîne d'ubiquitines formé est précisées. D'après Dove and Klevit, 2017.

#### 4. Les autres E3 ubiquitine ligases

Même si l'immense majorité des E3 ubiquitine ligases peut être classée dans une de ces trois familles, certaines E3, souvent spécifiques des UBL autre que l'ubiquitine, ne présentent ni de domaines RING ni de domaine HECT et sont dites atypiques.

C'est par exemple le cas de la protéine RanBP2, qui est une SUMO E3 ligase dont le domaine d'activité défini est IR1-M. Cette protéine porte tout de même une cystéine dans son domaine catalytique IR1 mais celle-ci ne semble pas indispensable à l'activité SUMO ligase de RanBP2 (Pichler et al., 2004).

L'enzyme UFL1 « UFM1-specific Ligase 1 », impliquée dans la ligation d'UFM1 est aussi une E3 ligase qui ne partage pas d'homologie de séquence avec les autres E3 connues. Sa conformation structurale ainsi que ses mécanismes moléculaires de transfert d'UFM1 doivent être encore identifiés (Toma-Fukai and Shimizu, 2021).

Enfin, de nouvelles catégories de E3 ubiquitine ligases sont en train d'être définies grâce aux avancées de la recherche. Récemment, deux nouveaux types de E3 ligases ont été caractérisés : les E3 ubiquitine ligases à domaine PCAF\_N dont font partie les acétyltransférases GCN5 et PCAF (Toma-Fukai and Shimizu, 2021) et les E3 ubiquitine ligases RCR « RING-Cys-Relay ».

*a) Les E3 ligases à domaine PCAF\_N*

Les deux enzymes GCN5 et PCAF ne présentent pas d'homologie de séquence qui leur permettent d'être classées parmi les E3 RING, HECT ou RBR (Benkirane et al., 2010; Toma-Fukai et al., 2020). Cependant, il a été observé qu'en plus de son activité d'histone-acétyltransférase, PCAF est capable d'induire l'ubiquitination en K48 et la dégradation dépendante du protéasome du transactivateur de classe II (CIITA) (Morgan and Greer, 2017). De plus, l'équipe française de Moncef Benkirane a pu observer que cette enzyme PCAF est aussi capable d'induire l'ubiquitination et la dégradation de la E3 Hdm2 (Linares et al., 2007). De son côté, Toshiyuki Shimizu et ses collègues ont pu observer que GCN5, une autre acétyltransférase à domaine PCAF\_N, est capable de s'auto-ubiquitiner, cependant, à ce jour aucun substrat de GCN5 n'a été identifié (Toma-Fukai et al., 2020).

*b) Les E3 ubiquitine ligases RCR*

Enfin, un nouveau type de E3 ubiquitine ligase a récemment été caractérisé : les E3 RCR « RING-Cys-Relay » qui ne comptent qu'un seul membre : MYCBP2. MYCBP2 était déjà connue pour avoir une activité E3 ubiquitine ligase mais son mécanisme original de transfert de l'ubiquitine a été décrit pour la première fois en 2018. La E3 MYCBP2 RCR possède un domaine RING qui lui permet de lier la E2 activée ainsi que deux cystéines catalytiques qui vont, à l'image d'un relais, se passer la molécule d'ubiquitine par transthiolation intramoléculaire. La seconde cystéine va ensuite transférer l'ubiquitine sur le substrat par estérification avec une sélectivité originale pour un résidu thréonine (Pao et al., 2018; Mabbitt et al., 2020).

### III. Les E3 ubiquitine ligases de la famille NEDD4

La plus grande sous-famille de E3 ubiquitine ligases HECT est la sous-famille NEDD4 (Neural precursor cell-Expressed Developmentally Downregulated 4) (**Figure 17**).

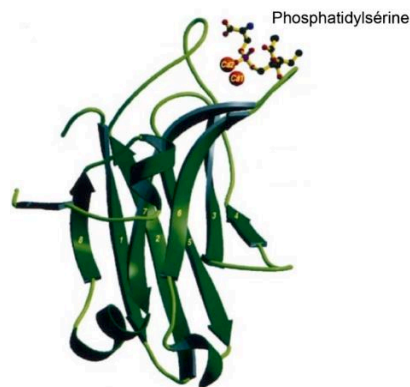
## A. Structure des E3 ligases de la famille NEDD4

Les E3 ubiquitine ligases membres de la sous-famille NEDD4 partagent toutes une structure commune caractérisée par la présence de trois types de domaines conservés chez les mammifères : un domaine C2 N-terminal, deux à quatre domaines WW et enfin un domaine catalytique HECT en C-terminal (Haouari et al., 2022).

### 1. *Le domaine C2*

Le domaine C2 a initialement été décrit lors de l'étude des isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  de la protéine kinase C (PKC) dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces isoformes dites « classiques » de la PKC ne peuvent se lier aux phospholipides qu'en présence de calcium. En revanche, des isoformes de la PKC dites « atypiques » qui sont dépourvues de leur deuxième domaine protéique, ne présentent pas cette dépendance au  $\text{Ca}^{2+}$ . Il a donc été suggéré que ce domaine C2 joue un rôle crucial dans la liaison aux phospholipides de la PKC en réponse à une stimulation par le calcium (Coussens et al., 1986; Ono et al., 1989).

Le domaine C2 est composé d'environ 130 acides aminés qui forment huit brins repliés en un feuillet  $\beta$  anti-parallèle qui peut lier au moins deux ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Nalefski and Falke, 1996) (**Figure 19**).



*Figure 19 : Domaine C2 de la PKC  $\alpha$  lié à une phosphatidylsérine par l'intermédiaire de deux ions  $\text{Ca}^{2+}$  (en rouge). Adapté de Verdaguer et al., 1999.*

Par la suite, ce domaine a été retrouvé dans d'autres protéines, y compris les E3 ubiquitine ligases de la famille NEDD4 (Nalefski and Falke, 1996).

Concernant les E3 ligases, il a été montré que ce domaine C2 permet de réguler la localisation cellulaire de l'enzyme, notamment vers la membrane plasmique, les endosomes ou les corps

multivésiculaires. Par exemple, Pamela Plant et ses collègues ont observé que, *via* son domaine C2, NEDD4-1 se relocalise en s'associant aux phospholipides membranaires en réponse à une élévation de la concentration intracellulaire en  $Ca^{2+}$  (Plant et al., 1997). De plus, le domaine C2 de l'homologue de NEDD4-1 chez la levure, Rsp5, a également été montré comme modulant la localisation de Rsp5 aux membranes endosomales, condition nécessaire pour le tri des cargos et la formation des corps multivésiculaires dépendants de l'ubiquitination (Dunn et al., 2004). Enfin, le domaine C2 des E3 ubiquitine ligases de la famille NEDD4 peut également leur permettre de reconnaître des substrats à ubiquitiner. Il a par exemple été observé que le domaine C2 de NEDD4-1 lui permet d'interagir avec le récepteur 1 au facteur de croissance des fibroblastes (FGFR1) (Persaud et al., 2011).

## 2. *Le domaine WW*

Les domaines WW sont composés d'une petite quarantaine d'acides aminés et présentent deux résidus tryptophane (W) conservés qui sont espacés de 20 à 22 acides aminés (Fajner et al., 2017). Un domaine WW adopte une conformation compactée en un feuillet  $\beta$  anti-parallèle à trois brins (Macias et al., 1996) (**Figure 20**). Ce domaine est le plus souvent présent en plusieurs copies dans la protéine (Fajner et al., 2017). Les domaines WW sont répartis en quatre classes en fonction des motifs de séquence qu'ils reconnaissent (Sudol and Hunter, 2000) :

- Les domaines du groupe I reconnaissent le motif PPxY ou LPxY (PY) où P désigne une proline, L une leucine, x n'importe quel acide aminé et Y une tyrosine.
- Les domaines du groupe II reconnaissent les motifs PPLP
- Les domaines du groupe III reconnaissent les séquences riches en proline (P) avec des résidus arginine (R), [R]-R/K/x-PP ou PP-R/x-[R]
- Enfin, les domaines du groupe IV reconnaissent une sérine (S) ou une thréonine (T) phosphorylées suivie d'une proline, pS/pT-P

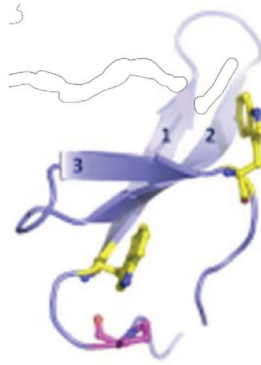


Figure 20 : Représentation de la structure du domaine WW de la protéine PIN1. Les trois feuillet  $\beta$  sont indiqués. Les résidus tryptophane conservés sont représentés en jaune. Adapté de Salah et al., 2012.

Les domaines WW sont retrouvés sur de nombreuses protéines autres que les E3 de la famille NEDD4 et permettent aux protéines qui les contiennent d'interagir avec leur partenaire. Concernant les E3 ligases de la famille NEDD4, celles-ci présentent toutes deux à quatre domaines WW de type I qui reconnaissent le motif L/PPxY (PY). Ces domaines sont cruciaux pour la reconnaissance des substrats à ubiquitiner et peuvent présenter des spécificités de liaison différentes selon les substrats (Fajner et al., 2017).

### 3. Le domaine HECT

Enfin, comme toutes les E3 ubiquitine ligases de la famille HECT, les E3 de la famille NEDD4 portent un domaine d'activité catalytique HECT responsable de l'activité ubiquitine ligase qui a été décrit en paragraphe I.A.2.

#### B. Les membres de la famille NEDD4

La sous-famille de E3 ubiquitine ligase NEDD4 comporte neuf membres, NEDD4-1 et NEDD4-2, NEDL1 et NEDL2 (NEDD4-Like 1 et 2), SMURF1 et SMURF2 (SMad Ubiquitination Regulatory Factor 1 et 2), WWP1 et WWP2 (WW domain-containing Protein 1 et 2) et enfin ITCH (**Figure 21**).

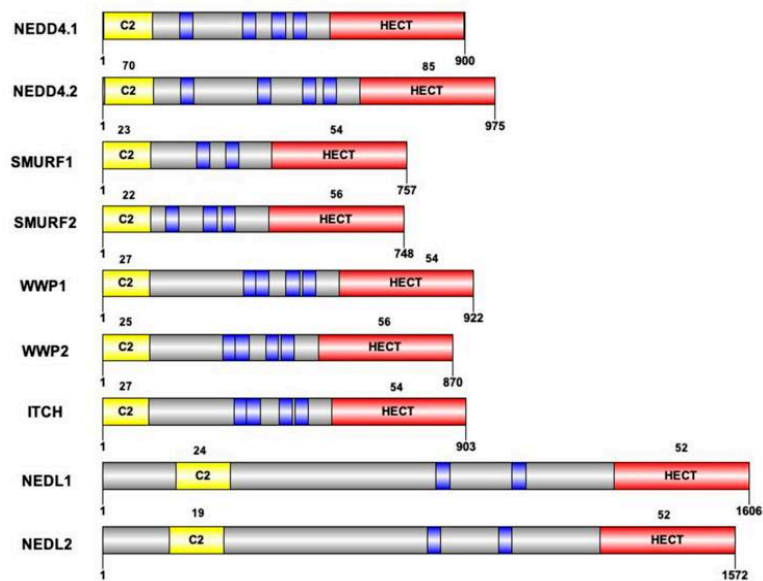


Figure 21 : Représentation schématique des différents membres de la sous-famille NEDD4. Les domaines WW sont représentés en bleu. D'après Haouari et al., 2022.

Ces neuf membres de la sous-famille NEDD4 lient et modulent l'activité protéique de nombreux substrats et sont donc impliqués dans la régulation de nombreux processus cellulaires physiologiques, mais aussi physiopathologiques.

### 1. Les E3 ligases NEDD4-1 et NEDD4-2

Malgré leurs similarités de séquences, NEDD4-1 et NEDD4-2 ne ciblent pas les mêmes substrats à ubiquitiner. En effet, il a été observé que NEDD4-1 régule principalement des protéines impliquées dans la croissance cellulaire et la prolifération, tandis que NEDD4-2 régule essentiellement des transporteurs membranaires et des canaux ioniques impliqués dans le contrôle de l'homéostasie ionique des cellules (Sicari et al., 2022; Rotin and Prag, 2024).

NEDD4-1 a été décrit comme interagissant et régulant l'ubiquitination et la stabilité protéique de certains récepteurs membranaires, c'est notamment le cas pour le récepteur à l'insuline (IGF-1R) (Vecchione et al., 2003) et du FGFR1 (Persaud et al., 2011). De plus, même si NEDD4-1 n'ubiquitine pas directement le récepteur à l'EGF, cette E3 ligase est impliquée dans la régulation de son endocytose en ubiquitinant certains de ses régulateurs tels que Eps15/Eps15R, Epsin et Hrs (Polo et al., 2002; Woelk et al., 2006). NEDD4-1 serait aussi impliquée dans la régulation de l'activité du suppresseur de tumeur PTEN. En effet, NEDD4-1 semblerait induire la polyubiquitination de PTEN conduisant à sa dégradation protéasomale (Wang et al., 2007).

Cependant ces résultats n'ont pas été confirmés dans une étude réalisée dans un contexte non-tumoral (Fouladkou et al., 2008).

NEDD4-2, quant à elle, interagit avec des transporteurs membranaires et des canaux ioniques, notamment le canal épithélial aux ions sodium Na<sup>+</sup> (ENaC) *via* son motif PY cytoplasmique. NEDD4-2 régule ainsi l'homéostasie ionique des cellules en induisant l'ubiquitination de l'ENaC conduisant à son endocytose puis à sa dégradation lysosomale. Par ailleurs, un dysfonctionnement du mécanisme ubiquitination et/ou d'endocytose de l'ENaC est responsable du syndrome de Liddle (Lu et al., 2007; Rotin and Prag, 2024).

## 2. Les E3 ligases NEDL1 et NEDL2

Les E3 ubiquitine ligases NEDL1 et NEDL2 (aussi connues sous les noms HECW1 et HECW2) ne sont pas les mieux caractérisées parmi la famille NEDD4.

Concernant NEDL1, il a été observé que cette E3 ubiquitine ligase est impliquée dans la régulation de la signalisation Wnt/  $\beta$ -caténine en ciblant la protéine dishevelled-1 (Dvl1) pour en induire sa polyubiquitination ainsi que sa dégradation (Miyazaki et al., 2004). Par ailleurs, l'ubiquitination suivi de la dégradation de Dvl1 induite par NEDL1 a très récemment été confirmée sur le modèle du cancer du col de l'utérus et il a aussi été observé que ce mécanisme de régulation inhibe la prolifération des cellules cancéreuses (Xu et al., 2024).

NEDL1 semblerait également être impliquée dans le développement de certaines maladies neurodégénératives, notamment de la sclérose latérale amyotrophique (SLA). D'une part, en induisant l'ubiquitination et l'agrégation du mutant mal-replié de la protéine SOD1, retrouvé dans presque 20% des cas de SLA (Miyazaki et al., 2004) ; d'autre part, selon une observation récente, NEDL1 induit la localisation cytoplasmique de la protéine TDP-43, ce qui est une caractéristique majeure de la SLA (Haouari et al., 2023).

De son côté, NEDL2 induit l'ubiquitination d'AMOLT1, une protéine impliquée dans la stabilisation des jonctions cellule-cellule, mais, étonnamment, cette ubiquitination de type K63 a pour conséquence de stabiliser le niveau protéique d'AMOLT1 permettant ainsi un meilleur maintien des jonctions cellule-cellule (Choi et al., 2016).

Plus récemment, deux équipes ont identifié la lamine B1 comme étant une cible de l'ubiquitination par NEDL2. Cette ubiquitination de la lamine B1 conduit à sa dégradation



dépendante du protéasome ce qui régule à la hausse la signalisation AKT/mTOR en faveur de la prolifération cellulaire (Krishnamoorthy et al., 2018; F. Li et al., 2023).

### 3. Les E3 ligases SMURF1 et SMURF2

Les E3 ubiquitine ligases SMURF ont initialement été décrites comme étant des régulateurs négatifs des voies de signalisation BMP et du TGF- $\beta$ . Ces voies de signalisation sont fortement impliquées dans l'embryogénèse et l'homéostasie tissulaire, de ce fait, leur dérégulation peut conduire au développement de nombreuses pathologies.

SMURF1 a premièrement été décrite comme pouvant lier, ubiquitiner et induire la dégradation des protéines SMAD5 et SMAD1, les effecteurs de la voie BMP (Zhu et al., 1999). Par la suite, il a été montré que SMURF1, en association avec la protéine SMAD7 qui possède un effet inhibiteur sur les voies BMP et TGF- $\beta$ , est capable de lier les récepteurs au BMP et au TGF- $\beta$  pour en induire leur ubiquitination et leur dégradation (Ebisawa et al., 2001; Suzuki et al., 2002). Dans ce même mécanisme, SMURF1 induit aussi l'ubiquitination et la dégradation de SMAD7.

SMURF2, quant à elle, a d'abord été décrite comme pouvant ubiquitiner et induire la dégradation dépendante du protéasome de SMAD2, un effecteur clé de la signalisation du TGF- $\beta$  (Lin et al., 2000). De même que SMURF1, SMURF2 a aussi été décrite comme pouvant lier le récepteur au TGF- $\beta$  *via* l'adaptateur SMAD7 pour induire son ubiquitination et sa dégradation (Kavsak et al., 2000).

Ainsi les E3 ubiquitine ligases SMURF1 et SMURF2 constituent des régulateurs négatifs importants de la voie TGF- $\beta$ . Toutefois, SMURF1 et SMURF2 sont également impliquées dans la régulation de nombreuses protéines en dehors de la signalisation TGF- $\beta$ /BMP. En effet, SMURF2 a par exemple été montrée comme modulant la stabilité protéique de certaines molécules impliquées dans la progression tumorale telles que HSP27 (Sun et al., 2011) ou KLF5 (Du et al., 2011) qui sont respectivement impliquées dans l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et dans la carcinogénèse et la résistance aux traitements anti-tumoraux.

Enfin, SMURF2 a aussi été montrée comme favorisant la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine en induisant la dégradation de ses deux régulateurs négatifs : GSK3 $\beta$  (Wu et al., 2009) et l'axine (Kim and Jho, 2010).

#### 4. *La E3 ubiquitine ligase ITCH*

La E3 ubiquitine ligase ITCH est particulièrement impliquée dans la régulation des voies de signalisation liée à l'inflammation et aux réactions immunitaires (Moser and Oliver, 2019). Si de nombreux substrats déjà connus de ITCH sont impliqués dans ces processus tels que le récepteur TCR ainsi que ses effecteurs PKC $\theta$  et PLC $\gamma$  ou encore les facteurs de transcription c-Jun et Jun-B, le rôle de cette E3 ubiquitine ligase ne se limite pas au système immunitaire. En effet, ITCH aurait par exemple un effet pro-tumoral en induisant une régulation négative des protéines p63 et p73, membres de la superfamille de suppresseurs de tumeurs p53 (Rossi et al., 2006, 2005). Récemment, le rôle pro-tumoral de ITCH a été corroboré par des chercheurs qui ont observé que cette E3 ubiquitine ligase induit l'ubiquitination puis la dégradation par le lysosome de la connexine 43. La connexine 43 étant une protéine « canal » impliquée dans la communication cellulaire *via* les jonctions serrées, un processus nécessaire au maintien de l'homéostasie tissulaire (Totland et al., 2024).

#### 5. *La E3 ubiquitine ligase WWP2*

A ce jour, de nombreux substrats de WWP2 ont déjà été identifiés (You et al., 2024). Du fait de ses cibles variées, la E3 ubiquitine ligase WWP2 est impliquée dans de nombreux processus cellulaires physiologiques, mais aussi physiopathologiques tels que la régulation de l'expression génique, la réparation de l'ADN, la prolifération et la migration cellulaire, l'apoptose ou encore la différenciation des cellules souches pluripotentes (You et al., 2024).

Parmi les substrats les plus pertinents de WWP2 nous pouvons citer le suppresseur de tumeur PTEN. En effet, il a été observé que WWP2 peut induire la polyubiquitination et la dégradation de PTEN, régulant ainsi à la hausse la signalisation PI3K/ATK qui inhibe l'apoptose des cellules cancéreuses et stimule leur prolifération (Maddika et al., 2011; Li et al., 2018), ce qui suggère un rôle pro-tumoral pour cette E3 ubiquitine ligase.

Plus récemment, il a été montré que WWP2 ubiquitine et induit la dégradation de la kinase suppresseur de tumeur LATS1 (Zou et al., 2023). La protéine LATS1 étant un régulateur négatif clé de la signalisation Hippo, une voie de signalisation cellulaire connue pour limiter la

prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses, ceci corrobore le rôle pro-tumoral de WWP2.

Par ailleurs, la E3 WWP2 a aussi été décrite comme étant capable de polyubiquitiner et dégrader les facteurs de transcription Oct4 et Sox2 essentiels au maintien de la pluripotence des cellules souches (Xu et al., 2004; H. Xu et al., 2009; Fang et al., 2014; Mahlokozera et al., 2021). Ceci suggère une implication de WWP2 dans l'induction de la différenciation des cellules souches pluripotentes.

Enfin, parmi les membres de la sous-famille NEDD4, mes travaux de thèse se sont concentrés sur l'étude de la E3 ubiquitine ligase WWP1 que nous allons maintenant présenter.

## IV. La E3 ubiquitine ligase WWP1

La E3 ubiquitine ligase WWP1, aussi appelée AIP5 « Atropin-Interacting Protein 5 » ou encore TIUL1 « TGIF-Interacting Ubiquitin Ligase 1 », a été isolée pour la première fois en 1997 dans un crible cherchant à identifier de nouvelles protéines à domaine WW en utilisant des protéines à motif PPxY comme appât (Pirozzi et al., 1997).

Depuis, WWP1 s'est avérée être une E3 ubiquitine ligase pour de nombreux substrats impliqués dans des voies de signalisation très variées, ce qui en fait un acteur important du contrôle de l'homéostasie cellulaire.

### A. Le gène *WWP1*

Le gène *WWP1* est localisé sur le chromosome 8, sur la région 8q21 et génère au moins six transcrits (Flasza et al., 2002). *WWP1* est un gène relativement bien conservé chez les animaux. Par exemple, la protéine WWP1 de l'Homme partage près de 50% d'homologie de séquence avec la protéine WWP1 exprimée chez le ver *Caenorhabditis elegans* tandis que WWP1 est conservé à plus de 90% chez les mammifères (Behera and Reddy, 2023). A noter que les domaines les plus conservés au travers des espèces sont les domaines WW et le domaine catalytique HECT (Huang et al., 2000).

Chez l'Homme, *WWP1* est exprimé de manière ubiquitaire dans de multiples tissus et particulièrement exprimé dans le foie, le cœur et dans les muscles squelettiques (Mosser et al., 1998; Komuro et al., 2004 et [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)). Aussi, nous pouvons noter que *WWP1* est légèrement moins exprimé dans le tissu mammaire et prostatique (Chen et al., 2005). Nous verrons plus tard qu'une surexpression de *WWP1* dans ces tissus est facteur d'un mauvais pronostic.

## B. La protéine WWP1

Parmi les six transcrits, l'isoforme majoritairement produite de *WWP1* est une protéine de 922 acide-aminés et d'une masse d'environ 110 kDa qui porte un domaine C2 N-terminal, quatre domaines WW et enfin un domaine catalytique HECT en C-terminal (Behera and Reddy, 2023) (*Figure 21*). La protéine *WWP1* est majoritairement cytoplasmique mais peut aussi être localisée sur des structures membranaires telles que la membrane plasmique, ou encore dans le noyau en fonction du contexte cellulaire et de ses partenaires moléculaires (Nguyen Huu et al., 2008; Imamura et al., 2016; Hwang et al., 2021).

## C. Les partenaires de WWP1

Depuis l'identification de *WWP1*, de nombreuses protéines ont été décrites comme étant ciblées par son activité ubiquitine ligase, révélant ainsi l'étendue de l'effet de *WWP1* au sein de nombreuses voies de signalisation cellulaire. Beaucoup de ces substrats interagissent avec *WWP1* via ses domaines WW grâce à la présence de motif PY sur leur séquence protéique. Le tableau ci-dessous présente les principaux substrats ubiquitinés par *WWP1*, ainsi que le mécanisme d'ubiquitination et le rôle de cette modification post-traductionnelle sur la fonction cellulaire associée au substrat (*Figure 22*).

<b>Substrat</b>	<b>Mécanisme d'action</b>	<b>Rôle cellulaire</b>	<b>Référence(s)</b>
<b>TBRI</b> (Adaptateur : SMAD7)	Polyubiquitination dégradative	Régulation négative de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ – Inhibe l'effet anti-prolifératif du TGF- $\beta$	(Komuro et al., 2004; Seo et al., 2004; Courivaud et al., 2015)
<b>Smad2</b> (Adaptateur : TGIF)	Polyubiquitination et dégradation par le protéasome	Régulation négative de la voie de signalisation du TGF- $\beta$	(Seo et al., 2004)
<b>PTEN</b>	Polyubiquitination non-dégradative K27	Inhibe la formation du dimère actif PTEN – Favorise la prolifération et inhibe l'apoptose via l'activation de la signalisation AKT	(Lee et al., 2019)
<b>P53</b>	Polyubiquitination non-dégradative	Retient p53 dans le cytoplasme – Inhibe l'activité suppresseur de tumeur de p53	(Laine and Ronai, 2007)
<b><math>\Delta</math>Np63<math>\alpha</math></b>	Polyubiquitination et dégradation par le protéasome	Inhibe la survie cellulaire en réponse à la doxorubicine – Favorise la prolifération et la migration	(Y. Li et al., 2008; Wang et al., 2019)
<b>TAp63<math>\alpha</math></b>	Polyubiquitination et dégradation par le protéasome	Inhibe l'apoptose – Favorise la viabilité cellulaire en réponse à la doxorubicine et au cisplatine	(Y. Li et al., 2008)
<b><math>\Delta</math>Np73</b>	Polyubiquitination K48 et dégradation uniquement induites par l'hétérodimère WWP1/WWP2	Favorise l'apoptose médiée par p73 et inhibée par $\Delta$ Np73	(Chaudhary and Maddika, 2014)
<b>LATS1</b>	Polyubiquitination et dégradation par le protéasome	Favorise la prolifération	(Yeung et al., 2013)
<b>AMOLT2</b>	Monoubiquitination	Favorise la phosphorylation de YAP	(Hwang et al., 2021)
<b>KLF5</b>	Polyubiquitination et dégradation par le protéasome	Limite la transcription des gènes cibles de KLF5 – Limite la prolifération, la survie, la migration et l'invasion	(Chen et al., 2005; Jia et al., 2021)
<b>NDFIP1</b>	Polyubiquitination et dégradation par le protéasome	Favorise la prolifération, la migration et l'invasion	(Li et al., 2022)
<b>CK2<math>\beta</math></b>	Polyubiquitination et dégradation par le protéasome	Permet l'activation de CK2 et favorise l'EMT induite par le TGF- $\beta$	(Kim et al., 2018)

<b>CXCR4</b> (Adaptateur : OPAL1)	Polyubiquitination et dégradation par le lysosome	Limite la voie CXCR12/CXCR4 – Limite les métastases osseuses des cellules cancéreuses mammaires	(Subik et al., 2012; Borna et al., 2020)
<b>JunB</b>	Polyubiquitination et dégradation par le protéasome	Inhibe la différenciation des ostéoblastes lors de l'exposition au TNF	(Zhao et al., 2011; Shu et al., 2013)
<b>RUNX2</b>	Polyubiquitination et dégradation par le protéasome	Inhibe la migration et la différenciation des ostéoblastes	(Shu et al., 2013)
<b>EGFR</b>	Polyubiquitination non-dégradative	Stabilise l'EGFR actif – Favorise la prolifération, la croissance et l'invasion des cellules cancéreuses	(Yu et al., 2020)
<b>ErbB4</b>	Polyubiquitination et dégradation par le protéasome	Diminue l'expression de BRCA1, un gène cible de ErbB4	(Li et al., 2009)
<b>Ezrin</b>	Polyubiquitination non-dégradative	Favorise la migration des cellules induite par la voie HGF/Met	(Zaarour et al., 2012)
<b>p27</b>	Polyubiquitination K48 et dégradation par le protéasome	Inhibe la sénescence induite par p27 <sup>Kip1</sup>	(Cao et al., 2011; Sanarico et al., 2018)
<b>RNF11</b>	Polyubiquitination non-dégradative	Inhibe la dégradation de ErbB2 et de l'EGFR médiée par RNF11 – Favorise la prolifération	(Chen et al., 2008)
<b>Htt-polyQ</b>	Polyubiquitination K63 non-dégradative	Inhibe la dégradation des agrégats de la protéine Htt-polyQ	(Lin et al., 2016)
<b>SPG20/ Spartin</b>	Ubiquitination dégradative	Pourrait influencer l'homéostasie des gouttelettes lipidiques	(Eastman et al., 2009)
<b>DVL2</b>	Polyubiquitination K27 non-dégradative	Stabilise DVL2 et active la voie de signalisation Wnt non-canonique – Risque d'hypertrophie cardiaque	(Zhao et al., 2021)
<b>Cx43</b>	Polyubiquitination dégradative	Induit une perte des jonctions communicantes du myocarde – Risque d'arythmie ventriculaire	(Basheer et al., 2015)
<b>HTLV-1</b>	Polyubiquitination non-dégradative	Favorise le bourgeonnement des particules virales	(Heidecker et al., 2004)
<b>eVP40</b>	Polyubiquitination non-dégradative	Favorise le bourgeonnement des particules virales	(Han et al., 2017)
<b>Spike</b>	Polyubiquitination non-dégradative	Favorise la dissémination des particules virales	(Novelli et al., 2021)

Figure 22 : Tableau présentant les principaux substrats ubiquitinés par WWP1. Lorsqu'ils sont connus, le mode d'ubiquitination ainsi que les conséquences fonctionnelles de cette modification post-traductionnelle sur la fonction cellulaire associée sont précisés.

Du fait de cette diversité de substrats, la E3 ubiquitine ligase WWP1 est impliquée dans de nombreux processus cellulaires physiologiques et pathologiques. Nous allons maintenant passer en revue comment WWP1, *via* ses différents substrats, est impliquée dans diverses pathologies telles que les maladies neurologiques ou les maladies infectieuses et nous terminerons en détaillant l'implication de WWP1 dans le développement des cancers, qui est le modèle d'étude de mes travaux de thèse.

### *1. Implication de WWP1 dans les maladies neurologiques*

Alors que le contrôle de la qualité protéique et le renouvellement des protéines endommagées sont nécessaires au maintien de l'homéostasie cellulaire, cela est d'autant plus vrai lorsque nous nous intéressons au système nerveux central. En effet, l'accumulation de protéines mal-repliées et/ou non-fonctionnelles sous forme d'agrégats conduit au vieillissement prématuré du système nerveux ainsi qu'au développement de maladies neurodégénératives telles que l'accumulation de  $\beta$ -amyloïde et de la protéine Tau dans la maladie d'Alzheimer, de l' $\alpha$ -synucleïne dans la maladie de Parkinson ou encore de la Huntingtine-polyQ dans la maladie de Huntington (Haouari et al., 2022). La dérégulation du système ubiquitine-protéasome peut aggraver les maladies neurodégénératives en provoquant l'accumulation de ces agrégats de protéines mal-repliées et/ou en empêchant leur dégradation.

Par exemple, une potentielle implication de la E3 ubiquitine ligase WWP1 dans le développement de la maladie de Huntington a été mise en évidence. Pour rappel, la maladie de Huntington est causée par une amplification du codon CAG, qui code pour la glutamine, dans le gène de la huntingtine. Cela entraîne la production d'une protéine Huntingtine (Htt) mutée qui contient une séquence polyQ qui favorise la formation d'agrégats protéiques toxiques pour la cellule. Alors que ces agrégats protéiques sont normalement polyubiquitinés en chaîne K48 pour être conduits à une dégradation protéasomale, WWP1 a été observée comme induisant une ubiquitination en chaîne K63 des agrégats Htt ce qui, de façon surprenante, augmente leur stabilité en bloquant leur dégradation protéasomale. De plus, les chercheurs ont aussi observé que l'accumulation de protéines Htt mutée augmente l'expression de WWP1 dans les cellules neurales. Ensemble, ces résultats suggèrent que WWP1 favorise le développement de la maladie de Huntington (Lin et al., 2016).

## 2. *Implication de WWP1 dans les maladies infectieuses*

L'ubiquitination est un mécanisme qui est également impliqué dans le bourgeonnement des particules virales. Concernant WWP1, il a été observé que cette E3 ubiquitine ligase favorise l'expulsion par bourgeonnement de particules virales issues de plusieurs virus tels que le virus Ebola (Han et al., 2017) ou le virus T-lymphotropique humain HTLV-1 (Heidecker et al., 2004).

Plus récemment, il a été montré que la E3 ubiquitine ligase WWP1 est capable d'interagir et d'ubiquitiner la protéine spike du virus SARS-CoV-2 responsable de la pandémie de la Covid-19. De plus, les chercheurs ayant mené cette étude ont observé que les patients positifs à la Covid-19 avec des symptômes respiratoires sévères présentent une augmentation très significative du niveau d'expression de *WWP1* dans des prélèvements nasopharyngés par rapport aux sujets négatifs au SARS-Cov-2. Ces résultats ont été confirmés au niveau protéique sur un modèle de souris infectées, ou non, au SARS-Cov-2 et sur des tissus pulmonaires de patients décédés et positifs au SARS-Cov-2 comparés à des tissus pulmonaires sains. Enfin, les chercheurs ont aussi observé que l'inhibiteur des E3 ubiquitine ligases de la sous-famille NEDD4, l'Indole-3-carbinol (I3C), diminue la quantité de particules virales produites en cultures par les cellules Vero E6 infectées par le SARS-Cov-2. Cette étude propose donc un nouveau rôle pour WWP1, favorisant la dissémination et la pathogénicité du virus SARS-Cov-2 *via* l'ubiquitination de la protéine Spike. Ceci suggère que le ciblage de WWP1 pourrait présenter un intérêt thérapeutique pour limiter la propagation du virus (Novelli et al., 2021).

## 3. *Implication de WWP1 dans d'autres pathologies*

WWP1 est aussi impliquée dans le développement d'autres pathologies, notamment dans les maladies osseuses où elle cible et induit la dégradation des facteurs de transcription JunB et RUNX2 qui sont impliqués dans la différenciation ostéoblastique (Zhao et al., 2011; Shu et al., 2013). WWP1 est également impliquée dans le développement de maladies cardiaques. Par exemple, il a été montré que WWP1, *via* son activité d'ubiquitine ligase, cible la connexine 43 (Cx43) pour en induire la dégradation. La connexine 43 étant un constituant principal des jonctions communicantes du myocarde, sa dégradation induite par WWP1 peut conduire à la perte de ces jonctions et au développement de l'arythmie ventriculaire (Basheer et al., 2015). Dans une autre étude il a été montré que WWP1 ubiquitine la protéine DVL2 en chaîne K27 ce qui augmente sa stabilité protéique conduisant ainsi à une activation de la voie Wnt non-



canonique et une augmentation de l'expression des gènes cibles impliqués dans l'hypertrophie cardiaque. Réciproquement, cette étude a prouvé que l'extinction de *WWP1* protège les souris d'une hypertrophie cardiaque induite (Zhao et al., 2021).

Au-delà de ces exemples, l'effet de l'activité E3 ubiquitine ligase de *WWP1* a particulièrement été étudié et décrit dans la tumorigenèse. Mes travaux de thèse ayant porté sur l'implication de *WWP1* dans cette pathologie, nous allons détailler le rôle de *WWP1* dans le cancer et plus particulièrement son rôle dans le cancer mammaire.

## V. L'implication de *WWP1* dans la tumorigenèse

Comme vu dans le paragraphe IV.C et en Figure 22, *WWP1* est impliquée dans la régulation de nombreuses protéines et son activité E3 ubiquitine ligase influence donc des processus cellulaires cruciaux tels que la prolifération, la survie ou encore l'apoptose. Ainsi, une dérégulation de l'expression de *WWP1* ou de son activité E3 ligase peut conduire à la tumorigenèse.

Dans cette partie, nous détaillerons l'implication de *WWP1* dans le développement des cancers, de la modulation de son expression génétique, de ses mutations, de ses substrats ainsi que de son intérêt comme marqueur de pronostic et comme cible thérapeutique.

### A. Modification de la régulation génétique de *WWP1* dans les cancers

Plusieurs mécanismes de régulation de l'expression de *WWP1* dans les cancers ont été décrits.

L'expression de *WWP1* a premièrement été décrite comme étant induite en réponse au TGF- $\beta$  dans certaines lignées cancéreuses (Chen and Matesic, 2007). *WWP1* étant un régulateur négatif de la voie du TGF- $\beta$ , cela pourrait constituer une boucle de rétro-contrôle négatif de cette voie de signalisation.

Par ailleurs, deux études indépendantes ont observé qu'en réponse à des dommages à l'ADN causés par les agents chimiothérapeutiques doxorubicin et cisplatine, l'expression de *WWP1* est induite de façon dépendante de la protéine p53 (J. Chen et al., 2017; Y. Li et al., 2008).

Plus récemment, c'est l'oncogène MYC qui a été montré comme pouvant induire l'expression de *WWP1* et que cette régulation est en partie responsable de l'activation de la voie AKT via l'inhibition de son régulateur négatif, le suppresseur de tumeur PTEN (Lee et al., 2019).

Enfin, au niveau post-transcriptionnel, l'expression de *WWP1* a été montrée comme étant régulée par de nombreux miRNA tels que miR-584-5p ou miR-452 (Behera and Reddy, 2023). Pour rappel, les miRNA sont de petits ARN simple-brin et non-codants qui, en s'hybridant à une séquence d'ARNm complémentaire, induisent l'arrêt de la traduction de l'ARNm et/ou sa dégradation conduisant à l'inhibition de l'expression du gène cible.

### B. Amplification génique de *WWP1* dans les cancers et marqueur de pronostic

La majorité des études sur l'expression de *WWP1* réalisée dans de nombreux types de cancers a conduit à l'identification d'une surexpression de *WWP1*, permettant de catégoriser cette E3 ubiquitine ligase en tant qu'oncogène (Hu et al., 2021). Le tableau présenté en **Figure 23** passe en revue les dérégulations de l'expression de *WWP1* dans les cancers ainsi que le pronostic associé à cette expression.

Type de cancer	Expression de <i>WWP1</i>	Pronostic	Référence(s)
Cancer mammaire	Augmentée (Amplification)	Mauvais pronostic – Survie diminuée Risque de rechute	(Chen et al., 2005; Ceshi Chen et al., 2007) (Nguyen Huu et al., 2008) (Nourashrafeddin et al., 2015) (Choschzick et al., 2010)
Cancer prostatique	Augmentée (Amplification)	Mauvais pronostic – Présence de métastases	(Chen et al., 2005; C. Chen et al., 2007; Z. Wang et al., 2014; Goto et al., 2016)
Cancer colorectal	Augmentée	Mauvais pronostic – Survie diminuée, volume de la tumeur augmenté, présence de métastases, classification TNM défavorable	(Chen and Zhang, 2018)

Cancer gastrique	Augmentée	Mauvais pronostic – Survie diminuée, profondeur d’invasion plus importante, présence de métastases ganglionnaires, classification TNM défavorable	(L. Zhang et al., 2015)
Cancer pulmonaire	Augmentée	Mauvais pronostic – Survie diminuée	(Yu et al., 2020)
Gliome	Diminuée	Non-déterminé	(Zhao et al., 2019)
Cholangiocarcinome	Augmentée	Mauvais pronostic – Survie diminuée Risque de rechute	(Li et al., 2022)
Carcinome hépatocellulaire	Augmentée	Mauvais pronostic – Survie diminuée, dégradation rapide, volume de la tumeur, classification TNM défavorable, invasion vasculaire	(Cheng et al., 2014; X.-F. Zhang et al., 2015)
Mélanome	Diminuée	Mauvais pronostic – Survie diminuée	(Jia et al., 2021)
Ostéosarcome	Augmentée	Non-déterminé	(Wu et al., 2015)
Carcinome épidermoïde cutané	Augmentée	Mauvais pronostic – Profondeur d’invasion, métastases ganglionnaires, haut grade histologique	(Xia et al., 2018)
Cancer buccal	Augmentée (Amplification)	–	(Lin et al., 2013)
AML	Augmentée	Non-déterminé	(Sanarico et al., 2018)

*Figure 23 : Tableau récapitulatif des dérégulations de l'expression de WWPI dans les cancers ainsi que le pronostic associé. D'après Behera and Reddy, 2023.*

Dans les cellules cancéreuses mammaires, la surexpression de *WWPI* a particulièrement été constatée. En effet, Ceshi Chen et ses collègues ont publié deux études montrant que *WWPI* est surexprimé dans les lignées cancéreuses mammaires ainsi que dans des échantillons de patients atteints de cancer du sein par rapport aux cellules saines (Ceshi Chen et al., 2007; Chen et al., 2005). Ils ont notamment observé que le gène codant pour *WWPI* est amplifié d'au moins deux

copies dans 18 des 35 lignées cellulaires testées (51%). Cette amplification du gène codant pour WWP1 est corrélée à sa surexpression : sur 33 lignées cellulaires mammaires testées, 19 d'entre-elles (58%) présentent un niveau d'augmentation de l'ARNm de *WWP1* d'au moins un facteur deux par rapport à des lignées non-cancéreuses (Ceshi Chen et al., 2007). Enfin, cette amplification génique est accompagnée d'une augmentation de la quantité protéique de WWP1 dans les lignées cellulaires cancéreuses.

L'amplification de l'expression de *WWP1* dans les lignées cellulaires de cancers mammaires a également été observée par un autre laboratoire (Nguyen Huu et al., 2008). Dans cette étude, les chercheurs confirment également, par hybridation *in situ*, l'augmentation du niveau d'expression de *WWP1* sur des sections de tumeurs mammaires comparé au tissu mammaire sain.

De plus, une quatrième étude un peu plus récente a également confirmé l'augmentation du niveau d'ARNm de *WWP1* entre des tissus mammaires sains et des échantillons de patients atteints de cancers du sein (Nourashrafeddin et al., 2015). Cette étude présente aussi les résultats de l'analyse de la base de données KM-Plotter, réunissant 4 142 échantillons de cancers mammaires, où l'augmentation du niveau d'expression de *WWP1* (Affymetrix ID : 212637\_s\_at) est significativement corrélée à un haut risque de rechute. En accord avec ces observations, analyse de l'actuelle base de données KM-Plotter indique que sur 1 879 échantillons de cancers mammaires, l'expression élevée de *WWP1* est également corrélée à une survie totale diminuée (<https://kmplot.com/analysis/>).

Enfin, l'amplification de la région chromosomique 8q21, qui porte le gène *WWP1*, a également été observée dans des échantillons de cancers mammaires par l'équipe de Ronald Simon. De plus, cette étude a pu corréler l'amplification de la région 8q21 à un mauvais pronostic évalué à partir du taux de survie des patients (Choschzick et al., 2010).

### C. Mutations activatrices de WWP1 dans les cancers

Au-delà de l'augmentation de son expression, WWP1 peut aussi être suractivée dans certains cancers par des mutations qui activent sa fonction E3 ubiquitine ligase. La mutation E798V de WWP1, ainsi qu'une autre mutation, T241S, ont initialement été identifiées par Ceshi Chen et ses collègues dans des xénogreffes de cancers de la prostate (C. Chen et al., 2007). Bien que

ces mutations soient rares, notre laboratoire a démontré l'effet activateur de la mutation E798V située dans le domaine HECT de WWP1. En effet, cette mutation entraîne l'hyperactivation de WWP1, ce qui conduit à une dégradation excessive du récepteur au TGF- $\beta$ , atténuant ainsi l'effet cytostatique de cette voie de signalisation (Courivaud et al., 2015).

De plus, l'analyse de la base de données COSMIC par Zhen Wang et ses collègues a permis d'identifier 159 mutations somatiques de WWP1 dans les cancers. Sur ces 159 mutations, 5 (H517Y, W549A, F617E, P651A et E697K) ont été montrées comme augmentant l'activité d'ubiquitination du substrat témoin  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , et comme favorisant les effets pro-tumoraux de WWP1, mesurés *via* l'efficacité de prolifération et de migration des cellules mammaires MCF-10A (Wang et al., 2019).

Enfin, en analysant la base de données TCGA sur 33 types de cancers, l'équipe de Pier Paolo Pandolfi a également mis en évidence deux mutations localisées dans le domaine HECT de WWP1 : K740N et N745S qui sont retrouvées dans 22 types de cancers. Ces variants de WWP1 présentent une hyperactivité E3 ubiquitine ligase pour le substrat PTEN conduisant à son inactivation et donc favorisant les propriétés pro-tumorales de la voie de signalisation AKT. Par conséquent, sur un modèle de xénogreffes de cellules de cancer du côlon, les tumeurs exprimant ces variants de WWP1 sont plus larges et plus massives que celles exprimant la forme sauvage de WWP1 (Lee et al., 2020).

Toutefois, nous pouvons souligner le fait que ces résultats n'ont pas été confirmés dans une étude *in vitro* publiée par Philip Cole montrant que les variants K740N et N745S présentent la même activité ubiquitine ligase que la forme sauvage de WWP1 (Jiang et al., 2021).

#### D. Les mécanismes d'action de WWP1 impliqués dans la tumorigenèse

De nombreuses études réalisées sur le modèle du cancer du sein ont confirmé l'effet pro-tumoral de la E3 ubiquitine ligase WWP1 dans la tumorigenèse mammaire. L'effet pro-tumoral de WWP1 s'explique en grande partie par son implication dans l'inactivation ou la dégradation de substrats possédant des propriétés suppresseur de tumeur répertoriés dans la **Figure 22**.

##### 1. *Les effets pro-tumoraux de WWP1 dans le modèle du cancer mammaire*

Trois études récentes portées par l'équipe de Pier Paolo Pandolfi ont démontré que WWP1 est capable d'induire la polyubiquitination en chaîne K27 du suppresseur de tumeur PTEN bloquant ainsi sa dimérisation et son recrutement à la membrane plasmique nécessaires à son activation. Par cette ubiquitination inhibitrice de PTEN, WWP1 amplifie la voie de signalisation PI3K/AKT et stimule la survie et la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses mammaires. De plus, dans leur dernière étude, le groupe de Pier Paolo Pandolfi a mis en évidence l'intérêt de cibler l'activité E3 ligase de WWP1 en complément des agents inhibiteurs de la voie de la signalisation PI3K/AKT. En effet, ils ont découvert que l'indole-3-carbinol (I3C), un composé de certains légumes crucifères, est un inhibiteur naturel de WWP1 ; et qu'une thérapie combinée à l'I3C augmente significativement l'efficacité des inhibiteurs de la voie PI3K/AKT et limite aussi l'apparition d'hyperglycémie et d'hyperinsulinémie, des effets secondaires souvent observés avec ce traitement (Lee et al., 2019, 2020; Kishikawa et al., 2021).

WWP1 peut également cibler des protéines membres de la superfamille p53. En effet, il a été montré que WWP1 interagit avec les protéines  $\Delta Np63\alpha$  et  $TAp63\alpha$  de façon PY/WW-dépendante pour en induire leur polyubiquitination et leur dégradation protéasomale. Concernant  $\Delta Np63\alpha$ , il a été observé que sa dégradation induite par WWP1 favorise la prolifération cellulaire et la migration des cellules mammaires MCF-10A (Wang et al., 2019). La dégradation de  $TAp63\alpha$  induite par la E3 ligase WWP1 inhibe, quant à elle, l'apoptose et favorise la survie cellulaire en réponse à la doxorubicine et au cisplatine, deux molécules utilisées en chimiothérapie (Y. Li et al., 2008). Ces deux études mettent en évidence l'effet pro-prolifératif et pro-survie de la E3 ubiquitine ligase WWP1.

Il a également été montré que WWP1 induit la polyubiquitination et la dégradation dépendante du protéasome du suppresseur de tumeur LATS1, impliqué dans la voie de signalisation Hippo, *via* une interaction de type PY/WW. La voie de signalisation Hippo est un mécanisme de régulation essentiel au contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaire. Dans cette voie, la kinase LATS1 inhibe les facteurs de transcription YAP et TAZ par phosphorylation. Cette modification empêche YAP et TAZ de se transloquer dans le noyau, où ils activent la transcription de gènes favorisant la survie et la prolifération des cellules. En induisant la dégradation de LATS1, la E3 ligase WWP1 favorise la translocation nucléaire de YAP et de TAZ, permettant ainsi la transcription de leurs gènes cibles. Ce mécanisme d'action participerait donc à l'activation de la prolifération cellulaire induite par WWP1 dans les cellules de cancer mammaire (Yeung et al., 2013).

L'effet pro-prolifératif et pro-survie de WWP1 peut aussi s'expliquer par l'interaction PY/WW-dépendante de WWP1 avec une autre E3 ubiquitine ligase de type RING, RNF11. En effet, une étude publiée par Ceshi Chen et ses collègues a montré que l'expression de WWP1 induit une stabilisation des récepteurs actifs ErbB2 et EGFR à la membrane plasmique des cellules mammaires MCF-10A et MDA-MB-231 et que cette régulation est corrélée à une augmentation de la survie et de la prolifération cellulaire des lignées mammaires. Par ailleurs, cette étude a démontré que cette stabilisation d'ErbB2 et EGFR n'est pas directement dépendante de l'activité ubiquitine ligase de WWP1 mais fait intervenir RNF11, une E3 connue pour induire l'ubiquitination et la dégradation du récepteur EGFR activé. En effet, Ceshi Chen et ses collègues ont observé que WWP1 est capable d'interagir avec RNF11, et d'induire son ubiquitination non-dégradative, ce qui inhibe l'activité E3 ligase de RNF11 et donc la dégradation de ErbB2 et de l'EGFR induite par RNF11. De cette manière, WWP1 favorise la prolifération et la survie des cellules mammaires en régulant positivement les signalisations cellulaires ErbB2 et EGFR *via* l'inhibition de la E3 ubiquitine ligase RNF11 (Chen et al., 2008).

## 2. *Les effets pro-tumoraux de WWP1 dans d'autres types de cancers*

Deux études ont aussi mis en évidence l'effet inhibiteur de WWP1 sur la voie de signalisation du TGF- $\beta$  sur le modèle du cancer de la prostate. En effet, il a été démontré que WWP1, *via* ses domaines WW et par l'intermédiaire de la protéine à motif PY SMAD7, est capable d'induire la polyubiquitination et la dégradation du récepteur au TGF- $\beta$  de type I actif (Komuro et al., 2004; Seo et al., 2004; Courivaud et al., 2015), et que ce mécanisme de régulation permet à WWP1 d'inhiber la réponse transcriptionnelle de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  et donc son effet anti-prolifératif (Courivaud et al., 2015).

Sur le modèle du cholangiocarcinome intrahépatique, WWP1 a récemment été montré comme ciblant la protéine NDFIP1 grâce à une interaction PY/WW, pour en induire sa polyubiquitination et sa dégradation dépendante du protéasome. Les auteurs de cette étude ont de plus montré que c'est *via* ce mécanisme de régulation que WWP1 favorise la prolifération, la migration et l'invasion des cellules de cholangiocarcinome HuCCT1 (Li et al., 2022).

Sur le modèle du cancer pulmonaire, une étude plus récente que celle de Ceshi Chen parue dans Nature Communications en 2020 démontre, elle, que WWP1 est directement capable de réguler

la stabilité protéique de l'EGFR. En effet, Jiao-Jiao Yu et ses collègues ont pu démontrer qu'en présence de la pseudokinase TRIB3 le récepteur à l'EGF activé est phosphorylé par la kinase PKC $\alpha$  et que cette phosphorylation permet à WWP1 d'induire la polyubiquitination de l'EGFR. Cette polyubiquitination, qui se produit dans les endosomes précoces, est non-dégradative et favorise le recyclage de l'EGFR à la membrane plasmique ce qui augmente sa stabilité protéique ainsi que la signalisation cellulaire qui en découle. Enfin, ils démontrent que ce mécanisme de régulation est impliqué dans l'induction de la prolifération, de la migration et de la croissance tumorale des cellules NCI-H157 induits par la protéine TRIB3 (Yu et al., 2020).

Enfin, sur ce même modèle de cancer pulmonaire, une étude a aussi observé que WWP1 favorise la migration des cellules de cancer pulmonaire LLC-PK1 en induisant la polyubiquitination non-dégradative d'Ezrin. Ezrin étant une protéine qui lie le cytosquelette d'actine au récepteur Met ; lorsque le facteur de croissance des hépatocytes lie Met, son récepteur cible, la voie de signalisation enclenchée stimule la motilité cellulaire par l'intermédiaire de l'ubiquitination d'Ezrin. Ici encore, l'interaction de WWP1 avec Ezrin est de type PY/WW-dépendante (Zaarour et al., 2012).

### 3. *Les effets anti-métastatiques de WWP1*

Bien que l'activité de WWP1 semble clairement favoriser le développement tumoral, certaines études ont, à contrario, mis en évidence un rôle anti-métastatique pour WWP1.

Un rôle protecteur de WWP1 dans la colonisation osseuse des métastases du cancer du sein a été mis en évidence dans une étude publiée en 2012 par Kristina Subik et ses collègues. Alors que les cancers mammaires avancés ont une forte tendance à métastaser vers les os, cette étude a observé que les souris injectées avec des cellules de cancer mammaire MDA-MB-231 où l'expression de *WWP1* est éteinte par ARN interférence présentent plus de lésions ostéolytiques (destruction de tissus osseux) et plus de colonisation de la moelle épinière que les souris injectées avec les cellules contrôles MDA-MB-231. Les chercheurs expliquent cet effet par le fait que WWP1 induit la polyubiquitination suivie de la dégradation lysosomale du récepteur CXCR4 en présence de ligand CXCL12, la voie CXCL12-CXCR4 étant nécessaire à la colonisation des métastases mammaires et d'autres types de cancers vers les os (Subik et al., 2012).



De plus, sur le modèle du mélanome, une récente étude a aussi démontré que l'inhibition de la dégradation de KLF5 médiée par WWP1 favorise la migration et l'invasion des cellules WM2664, suggérant que WWP1 joue un rôle de régulateur négatif de la migration et de l'invasion tumorale (Jia et al., 2021).

Par ailleurs, bien que l'expression de *WWP1* soit le plus souvent augmentée dans les cancers mammaires et est associée à un mauvais pronostic, il a également été observé que la perte totale de l'expression de *WWP1* représente le plus mauvais pronostic (Nguyen Huu et al., 2008).

Toutefois, nous pouvons relever le fait qu'une étude publiée par l'équipe de Kunhong Kim suggère, quant à elle, un effet pro-invasif pour WWP1. Cette étude a montré que le TGF- $\beta$  induit la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) par l'activation du récepteur de type I au TGF- $\beta$  et par l'intermédiaire de la kinase CK2. La TEM, qui consiste en un changement d'identité des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses, représente un point clé de la progression tumorale car elle permet aux cellules d'acquies des caractéristiques propices à la migration et l'invasion. Cette étude a observé que la E3 ubiquitine ligase WWP1 induit la polyubiquitination et la dégradation de la sous-unité régulatrice CK2 $\beta$  permettant l'activité de la kinase CK2 en faveur de la TEM, suggérant que WWP1 participe à l'induction la transition épithélio-mésenchymateuse induite par le TGF- $\beta$  et médiée par CK2 (Kim et al., 2018).

#### E. Les modèles *in vivo* de WWP1 pour la cancérologie

Pour mieux comprendre les effets fonctionnels de WWP1, des modèles murins *knockout* de *WWP1* ont été générés par Lydia E. Matesic et ses collègues. Ces souris n'exprimant pas de WWP1 fonctionnelle sont viables et fertiles (Zhao et al., 2011).

Ce modèle de souris a tout d'abord permis d'identifier une implication de WWP1 dans l'inhibition de la différenciation des ostéoblastes induite par le TNF $\alpha$  (Zhao et al., 2011). Par la suite ce modèle de souris *knockout* de *WWP1* a été utilisé pour étudier l'implication de cette E3 ubiquitine ligase dans les pathologies cardiaques (Snyder et al., 2021) ainsi que dans l'étude du groupe de Pier Paolo Pandolfi démontrant l'intérêt de cibler WWP1 pour limiter les effets secondaires des traitements aux inhibiteurs de la voie PI3K/AKT (Kishikawa et al., 2021).

## VI. Les mécanismes de régulation de l'activité E3 ligase des NEDD4

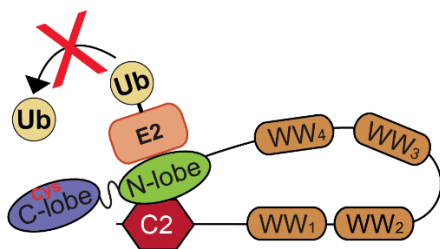
Les E3 ubiquitine ligases sont, comme toutes les protéines, sujettes à différents mécanismes de régulation, que cela soit par des interactions protéiques ou par des modifications post-traductionnelles. Dans ce chapitre, nous allons passer en revue les différents mécanismes de régulation de l'activité et de la stabilité des E3 ubiquitine ligases de la sous-famille NEDD4.

### A. Les interactions intramoléculaires inhibitrices

Il est maintenant clairement établi que les E3 ligases de la sous-famille NEDD4 se présentent sous deux types de conformations : une conformation dite « fermée », inactive mais stable et une conformation dite « ouverte », catalytiquement active mais dont la stabilité protéique est nettement diminuée. Le repliement de la E3 ubiquitine ligase en conformation « fermée » est fondamental pour éviter une ubiquitination excessive des substrats ou une auto-ubiquitination incontrôlée, provoquant une forte instabilité de la E3 (Fajner et al., 2017). De nombreuses études ont maintenant clairement démontré que le repliement de la conformation fermée s'effectue via une interaction intramoléculaire entre le domaine HECT C-terminal et, soit le domaine C2, soit les domaines WW N-terminaux (**Figure 24**).

#### 1) Repliement C2/HECT

ex: SMURF1/2, NEDD4-1/2



#### 2) Repliement WW/HECT

ex: WWP1/2, Itch

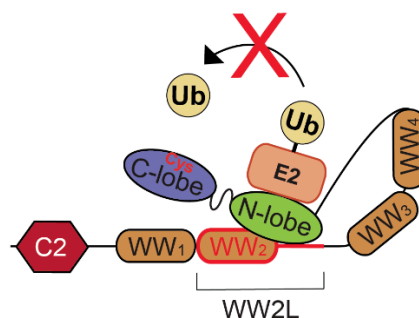


Figure 24 : Représentation schématique des interactions intramoléculaires inhibitrices des E3 ubiquitine ligases de la sous-famille NEDD4.

## 1. *Interaction C2/HECT*

En 2007, Silke Wiesner et ses collègues publient une étude dans le journal *Cell* qui propose pour la première fois un mécanisme intramoléculaire permettant de réguler l'activité de la E3 ubiquitine ligase SMURF2. En utilisant une analyse par résonance magnétique nucléaire, ils observent que le domaine C2 de SMURF2 interagit avec le domaine HECT de cette même E3, et ce, à proximité de sa cystéine catalytique, et que cette interaction inhibe la réaction de transthiolation entre l'ubiquitine liée à la E2 et la E3 ubiquitine ligase. De plus, *in cellulo*, Silke Wiesner et ses collègues démontrent que cette interaction inhibitrice entre le domaine C2 et le domaine HECT de SMURF2 limite le niveau d'auto-ubiquitination de SMURF2 et protège la E3 ligase de sa dégradation protéique. Enfin, ils observent aussi que la liaison de la protéine SMAD7, *via* son motif PY, aux domaines WW de SMURF2 bloque l'interaction inhibitrice C2/HECT. Ensemble, ces résultats montraient pour la première fois un mécanisme de régulation intramoléculaire inhibiteur permettant de limiter l'activité ubiquitine ligase d'une E3 HECT et donc de limiter son niveau d'auto-ubiquitination et de dégradation (Wiesner et al., 2007).

Ce mécanisme de régulation sera par la suite confirmé et étendu à d'autres E3 ubiquitine ligases de la sous-famille NEDD4 dans une étude menée par Silke Wiesner et Simona Polo qui montre que, comme SMURF2, NEDD4-1 et WWP2 sont aussi régulées négativement en conditions basales par cette interaction intramoléculaire entre leurs domaines C2 et HECT. Plus particulièrement, cette étude montre que le domaine C2 interagit principalement avec la partie N-lobe du domaine HECT des E3 ligases (**Figure 24-1**). Ici aussi, les chercheurs comprennent que ce repliement sert à protéger les E3 ligases elles-mêmes, ainsi que leurs substrats, d'une ubiquitination et d'une dégradation excessive (Wiesner et al., 2007; Mari et al., 2014).

## 2. *Interaction WW/HECT*

Mais le domaine C2 n'est pas le seul à être impliqué dans ces interactions intramoléculaires inhibitrices. En effet, en 2008, le groupe de Daniela Rotin observe qu'un motif PY est présent dans le domaine HECT de NEDD4-2 et que ce motif permet une interaction du domaine HECT avec les domaines WW de la même E3 ubiquitine ligase pour limiter le niveau d'auto-ubiquitination et de dégradation protéique de NEDD4-2 (Bruce et al., 2008).

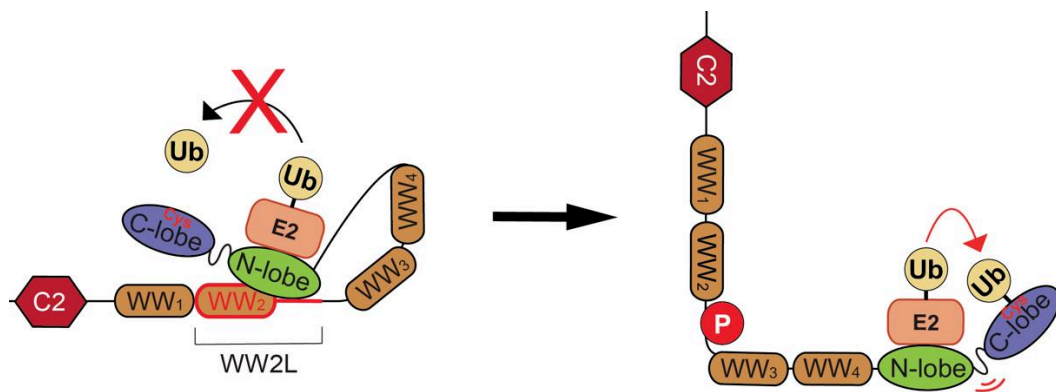
Plus tard, dans une étude visant à mieux comprendre ces interactions inhibitrices sur le modèle de la E3 ubiquitine ligase ITCH, Christopher Riling et ses collègues démontreront que le motif PY présent dans le domaine HECT de ITCH n'est pas suffisant pour induire son auto-inhibition. Cependant, ils confirment l'importance des deuxième et troisième domaines WW (domaines WW2 et WW3) dans cette interaction inhibitrice avec le domaine HECT et précisent que ce repliement de ITCH n'empêche pas son interaction avec la E2 activée mais bloque la réaction de transthiolation de la molécule d'ubiquitine vers la cystéine catalytique de la E3 ubiquitine ligase (Riling et al., 2015).

Des études de cristallographie ont ensuite permis d'apporter encore plus de précisions sur l'implication des domaines WW dans le repliement des ligases de la famille NEDD4. En effet, une étude menée sur WWP2 en 2017 par le groupe de Philip A. Cole identifie précisément le domaine WW2 ainsi que la région linker présente entre les domaines WW2 et WW3 comme étant les éléments clés de ce mécanisme d'auto-inhibition. Cette région sera identifiée sous le terme WW2L et est présentée en **Figure 24-2**. L'analyse de la structure du cristal WW2-Linker-HECT a permis d'observer que ce sont particulièrement les 6 résidus positionnés en C-ter du domaine WW2 ainsi que les 26 résidus organisés en hélice  $\alpha$  de la région linker qui interagissent avec le domaine HECT et qui stabilisent les lobes dans une conformation inactive « T-shape » bloquant ainsi la réaction de transthiolation de l'ubiquitine. Cette étude observe aussi que des mutations de WWP2 retrouvées dans certains cancers et étant localisées dans l'une de ces régions d'interaction entraînent une hyperactivation de l'activité ubiquitine ligase de WWP2 (Z. Chen et al., 2017). Ces résultats seront très rapidement confirmés par d'autres études qui démontrent l'importance de la région WW2L dans le repliement auto-inhibiteur des E3 ubiquitine ligases ITCH et WWP1 (Zhu et al., 2017; Wang et al., 2019). Enfin, de façon intéressante, WWP1, WWP2 et ITCH présentent un haut degré de conservation protéique de la région du domaine HECT qui interagit avec la région WW2L tandis que les E3 ubiquitine ligases SMURF1 et NEDD4-1/2 présentent une plus grande conservation de la séquence du domaine C2 impliquée dans sa liaison au domaine HECT (Zhu et al., 2017)

## B. Les modifications post-traductionnelles

Dans la cellule, il existe de nombreux moyens de moduler la conformation des E3 ubiquitine ligases et donc leur activité catalytique. Les E3 étant avant tout des protéines, elles peuvent être la cible de modifications post-traductionnelles permettant un remodelage de leur conformation.

La phosphorylation est une modification qui a été décrite comme levant le repliement inhibiteur des E3 ubiquitine ligases de la famille NEDD4 dans plusieurs études. En effet, une étude menée par Simona Polo et Daniela Rotin en 2014 a démontré qu'en réponse à un traitement à l'EGF ou au FGF, la E3 ubiquitine ligase NEDD4-1 est phosphorylée, ce qui lève son auto-inhibition et conduit à son auto-ubiquitination ainsi qu'à l'ubiquitination de ses substrats cibles tels que le récepteur au FGF. Ce moyen de régulation de la E3 NEDD4-1 représente une boucle de rétro-contrôle négatif de la voie FGF (Persaud et al., 2014). Depuis, d'autres exemples de phosphorylations activatrices ont été rapportés. Notamment, le groupe de Philip A. Cole a aussi rapporté que la région WW2L possède deux sites de phosphorylation et que leur mutation avec des résidus phospho-mimétiques induit une augmentation de l'activité ubiquitine ligase de WWP2 caractérisée par une augmentation de son activité d'auto-ubiquitination (Z. Chen et al., 2017) (**Figure 25**). De la même manière, Kang Zhu et ses collègues ont également observé qu'une phosphorylation de ITCH par la kinase JNK1 permet d'activer cette E3 ubiquitine ligase (Zhu et al., 2017).



*Figure 25 : Représentation schématique de l'activation d'une E3 ubiquitine ligase NEDD4 par phosphorylation de la région WW2L.*

Au-delà de la phosphorylation, d'autres modifications post-traductionnelles ont aussi été montrées comme stimulant l'activité ubiquitine ligase des E3. C'est notamment le cas de la neddylation. En effet, des études ont observé que les E3 ubiquitine ligases SMURF1 et NEDD4-2 sont activées par neddylation (Xie et al., 2014; Tu et al., 2020).

Un exemple de sumoylation activatrice a également été rapporté pour la E3 ubiquitine ligase SMURF2. En effet, une étude a démontré que la E3 SUMO ligase PIAS3 cible SMURF2 pour en induire sa sumoylation et que cette modification augmente la capacité de SMURF2 à induire la polyubiquitination et la dégradation du récepteur au TGF- $\beta$  (Chandhoke et al., 2016).

Enfin, comme vu précédemment, les E3 ubiquitine ligases en conformation ouverte ont une activité ubiquitine ligase hyperactive caractérisée par une polyubiquitination auto-générée. Cette auto-ubiquitination constitue une boucle de rétro-contrôle négatif de l'activité des E3 ligases car les enzymes polyubiquitinées sont moins stables et vont être dirigées vers les voies de dégradation protéiques. En effet, dès les premières études présentant la régulation des E3 par les interactions intramoléculaires, les chercheurs ont décrit que les enzymes ouvertes présentent une stabilité protéique fortement réduite causée par leur auto-polyubiquitination (Wiesner et al., 2007; Bruce et al., 2008; Riling et al., 2015; Z. Chen et al., 2017). Le groupe de Philip A. Cole précise de plus que le mutant de WWP2, délété de sa région *linker* et ne pouvant pas adopter son repliement inhibiteur, présente un changement de localisation vers les lysosomes, supposant l'induction d'une dégradation lysosomale pour la E3 hyperactivée (Z. Chen et al., 2017).

En conclusion, la communauté scientifique s'accorde pour dire que les E3 ubiquitine ligases de la sous-famille NEDD4 sont régulées par un repliement inhibiteur intramoléculaire évitant une hyperactivité ubiquitine ligase qui conduit à une ubiquitination et une dégradation excessive à la fois des substrats mais aussi des E3 ubiquitine ligases elles-mêmes (**Figure 26**).

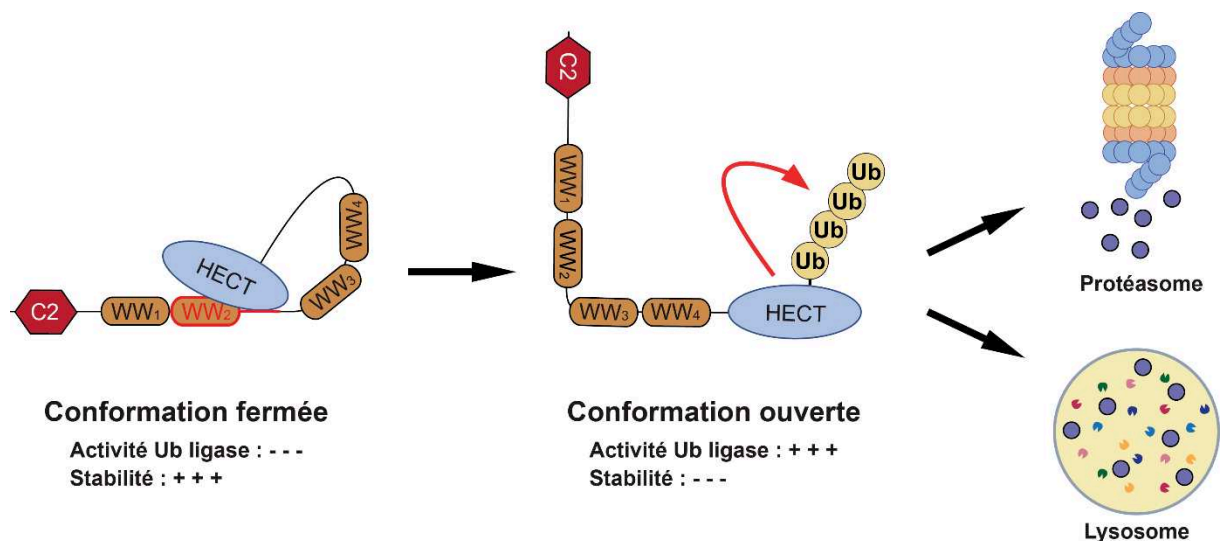


Figure 26 : Schéma représentatif de la régulation de la stabilité protéique des E3 ubiquitine ligases NEDD4.

### C. Les interactions intermoléculaires avec des protéines adaptatrices

En plus des modifications post-traductionnelles, l'interaction avec des protéines adaptatrices peut également réguler le repliement des E3 ubiquitine ligases de la sous-famille NEDD4. Ces protéines adaptatrices, qui présentent pour la plupart au moins un motif PY qui leur permettent une interaction directe avec la E3, régulent ces E3 ubiquitine ligases à plusieurs niveaux. D'une part elles peuvent permettre l'interaction avec des substrats qui ne présentent pas de motifs PY, d'autre part, elles peuvent également induire un changement de sa localisation subcellulaire (Shah and Kumar, 2021). Ces protéines adaptatrices permettent également de maintenir les E3 en conformation ouverte pour ubiquitiner leur substrat, et/ou activer leur autoubiquitination et diminuer leur stabilité protéique (Courivaud et al., 2015; Riling et al., 2015; Zhu et al., 2017) (Figure 27).

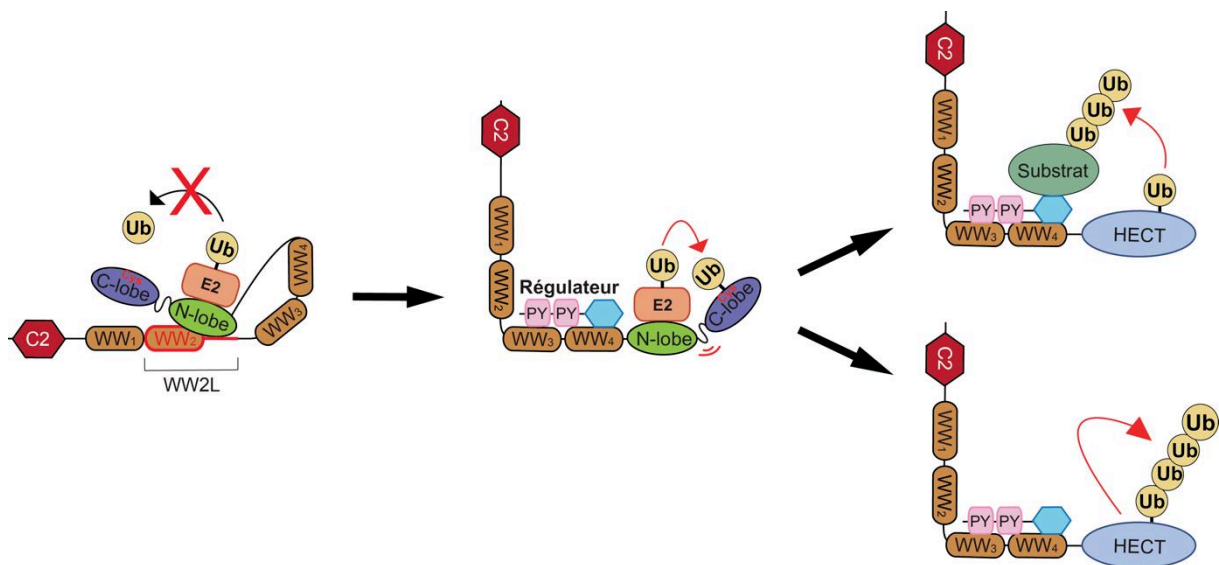


Figure 27 : Représentation schématique de la régulation de l'activité et de la stabilité des E3 ubiquitine ligases NEDD4 par des protéines adaptatrices.

Dans les cellules de mammifères, deux groupes de protéines adaptatrices ont été décrites pour réguler les E3 ubiquitine ligases NEDD4 : les NDFIP et les arrestines (Shah and Kumar, 2021).

#### 1. Les NDFIP

Les protéines NDFIP (NEDD4-Family-Interacting Protein) sont au nombre de deux dans les cellules de mammifères : NDFIP1 et NDFIP2, de 25 et 36 kDa respectivement. NDFIP1 et

NDFIP2 présentent trois domaines transmembranaires ainsi que trois motifs PY et sont localisées au niveau de structures membranaires telles que l'appareil de Golgi, les endosomes et des corps multivésiculaires (Shearwin-Whyatt et al., 2004; Putz et al., 2008; Gorla et al., 2019).

NDFIP1 et NDFIP2 ont été montrées comme jouant le rôle d'adaptateur pour de nombreux substrats protéiques des E3 ubiquitine ligases NEDD4. Nous pouvons citer l'exemple du transporteur DMT1 ciblée par WWP2 (Foot et al., 2008), du suppresseur de tumeur PTEN ciblé par les E3 NEDD4-1 et ITCH (Mund and Pelham, 2010) ou encore, plus récemment identifié, du récepteur Robo1, impliqué dans la guidance des axones, qui est capturé par les NDFIP au niveau des endosomes tardifs marqués par Rab7 et ciblé pour l'ubiquitination par les E3 ligases NEDD4 (Gorla et al., 2019).

Les deux protéines régulatrices NDFIP1 et NDFIP2 ont également été montrées comme levant le repliement inhibiteur de ITCH et comme induisant une augmentation du niveau d'auto-polyubiquitination de cette E3 ligase conduisant à sa dégradation protéique (Mund and Pelham, 2009; Riling et al., 2015; Zhu et al., 2017) suggérant que ces protéines adaptatrices peuvent aussi jouer le rôle de régulateurs négatifs des E3 ubiquitine ligases NEDD4.

## 2. *Les arrestines*

Le génome humain code pour six  $\alpha$ -arrestines (TXNIP et ARRDC1-5) et pour quatre  $\beta$ -arrestines ( $\beta$ -arrestine 1/2, Arrestine 1 et Arrestine 4). Alors que TXNIP et les ARRDC1 à ARRDC4 présentent deux motifs PY à leur extrémité C-terminale, ARRDC5 et les  $\beta$ -arrestines en sont dépourvues. Les arrestines sont souvent retrouvées organisées en hétérodimères pour jouer leur rôle d'adaptateur entre le substrat et les E3 ubiquitine ligases (Kahlhofer et al., 2021; Shah and Kumar, 2021). Les  $\alpha$ -arrestines sont connues pour jouer un rôle d'adaptateur des E3 NEDD4 pour l'ubiquitination de protéines membranaires, ce qui conduit à la régulation de l'endocytose, du trafic et de la dégradation de ces protéines (Kahlhofer et al., 2021). Par exemple, plusieurs études ont rapporté qu'en coordination avec la  $\beta$ -arrestine 2, ARRDC3 est impliquée dans le recyclage du récepteur  $\beta$ 2-adrenergique en recrutant et en activant la E3 ubiquitine ligase NEDD4-1 (Nabhan et al., 2010; Han et al., 2013). Pour autre exemple, il a aussi été observé qu'en association avec la  $\beta$ -arrestine 1, ARRDC1 permet l'ubiquitination et la dégradation du récepteur Notch par ITCH (Puca et al., 2013). Plus récemment, ARRDC1 et ARRDC3 ont également été montrées comme facilitant l'ubiquitination et la dégradation de la



protéine YAP induite par ITCH, ce qui limite l'effet pro-tumoral de ce facteur de transcription (Xiao et al., 2018).

### 3. *Les autres adaptateurs*

Un autre groupe de protéines adaptatrices a aussi été identifié dans les cellules, mais celui-ci n'est que très peu décrit. Les protéines PRRG (proline-rich  $\gamma$ -carboxyglutamic acid) sont au nombre de quatre et présentent un domaine transmembranaire ainsi que deux motifs PY qui leur permettraient d'interagir avec les E3 ubiquitine ligases NEDD4 (Shah and Kumar, 2021). Récemment, une étude a démontré que PRRG4 recrute NEDD4-1 pour induire l'ubiquitination et la dégradation du suppresseur de tumeur Robo1. Ce mécanisme d'action suggère un rôle pro-tumoral pour PRRG4 en accord avec l'augmentation de son expression observée sur le modèle du cancer du sein, ainsi que sa capacité à stimuler la migration et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB 231 et HCC1954 (Zhang et al., 2020).

Au-delà de ces groupes, d'autres protéines régulatrices des E3 ligases NEDD4 sont observées dans les cellules humaines. Un exemple particulièrement décrit est celui de l'inhibiteur de la signalisation TGF- $\beta$ , la protéine SMAD7. En effet, de nombreuses études ont pu rapporter que SMAD7, *via* son motif PY, permet aux E3 ubiquitine ligases SMURF1, SMURF2, WWP1 et NEDD4-2 d'induire l'ubiquitination et la dégradation du récepteur I au TGF- $\beta$  (T $\beta$ RI) ainsi que de certaines protéines SMAD effectrices de la voie du TGF- $\beta$  telles que SMAD2, SMAD3 et SMAD4 (Kavsak et al., 2000; Ebisawa et al., 2001; Zhang et al., 2001; Seo et al., 2004; Kuratomi et al., 2005; Courivaud et al., 2015).

Enfin, une nouvelle famille de protéines pourrait faire sa place parmi les protéines régulatrices des E3 ubiquitines ligases NEDD4 : les membres de la famille STMC6 dont fait partie CYYR1 (CYsteine and tYrosine-Rich protein 1), une petite protéine qui sera au cœur de mes travaux de thèse.

## VII. La protéine CYR1

### A. Les membres de la famille STMC6

La définition de la famille STMC6, pour Single-TransMembrane proteins with conserved 6 Cysteines, a été proposée dans une étude publiée par Jimin Pei et Nick V. Grishin en 2012. En cherchant, par similarité de séquence, des homologues des protéines Shisa, les chercheurs ont pu décrire une vaste famille de protéines *Shisa-like* qui partagent toutes une région N-terminale portant au moins 6 cystéines dans un motif très conservé C\*C\*CC\*CC, un domaine transmembranaire unique ainsi qu'une région C-terminale riche en prolines (**Figure 28**). De plus, certains membres de la famille STMC6 présentent des motifs PY dans leur région C-ter riche en prolines (Pei and Grishin, 2012). La famille STMC6 compte une petite vingtaine de membres dans les cellules animales que sont : Shisa1-9, FAM159, KIAA1644, WBP1, VOPP1, OPAL1, TMEM92, CX, DUF2650 et enfin CYR1. Certaines protéines de la famille STMC6 ne sont pas exprimées par le génome humain, c'est notamment le cas de Shisa1 retrouvée chez les oiseaux, les amphibiens et les poissons mais aussi de CX et DUF2650 qui elles sont spécifiques des nématodes (Pei and Grishin, 2012).



*Figure 28 : Structure communes des protéines membres de la famille STMC6. D'après Pei and Grishin, 2012.*

Bien qu'encore très peu étudiées, les protéines membres de la famille STMC6 semblent être des protéines adaptatrices impliquées dans la régulation des voies de signalisation cellulaires. Les protéines Shisa sont notamment impliquées dans le développement embryonnaire du poisson-zèbre, notamment en modulant les voies Wnt et FGF (Nagano et al., 2006; Pei and Grishin, 2012; Liu et al., 2023).

La protéine VOPP1 est un des membres les plus étudiés de la famille STMC6 chez les mammifères. En effet, plusieurs études ont pu mettre en évidence l'effet pro-tumoral de VOPP1. D'une part, il a été observé que *VOPP1* est fréquemment amplifié dans de nombreux types de cancers tels que le glioblastome, le cancer du poumon, le cancer mammaire ou encore le cancer

du pancréas et du foie (Baras and Moskaluk, 2010; Bonin et al., 2018). D'autre part, l'effet prolifératif et inhibiteur de l'apoptose de VOPP1 a aussi été clairement démontré dans plusieurs études (Baras et al., 2011; Gao et al., 2015; Fang et al., 2020). Notamment, une étude menée par François Lallemand et Keltouma Driouch a démontré que VOPP1 interagit avec le suppresseur de tumeur WWOX au niveau de compartiments endo-lysosomaux de façon WW/PY-dépendante, et que cette capture de WWOX par VOPP1 inhibe les fonctions pro-apoptotiques de WWOX (Bonin et al., 2018).

OPAL1, aussi connue sous le nom de WBP1L (*WBP1-like*), est un autre membre de la famille STMC6 qui nous intéresse tout particulièrement. Une étude relativement récente a mis en évidence de rôle de OPAL1 en tant que régulateur de certaines E3 ubiquitine ligases de la sous-famille NEDD4. En effet, le groupe de Tomas Brdicka a pu observer que OPAL1, *via* ses motifs PY, est capable d'interagir avec WWP2, ITCH, WWP1 et NEDD4-2 pour induire une augmentation de leur niveau de polyubiquitination corrélée à une diminution du niveau protéique de ces E3 ligases. Les chercheurs ont aussi observé que l'expression de OPAL1 augmente l'ubiquitination et la dégradation de CXCR4, une cible bien décrite des E3 ubiquitine ligases NEDD4, et limite donc la signalisation CXCL12-CXCR4 (Borna et al., 2020).

L'identification de la protéine CYR1, appartenant à la famille STMC6, comme partenaire potentiel de la E3 ubiquitine ligase WWP1 a constitué le point de départ de mes travaux de thèse.

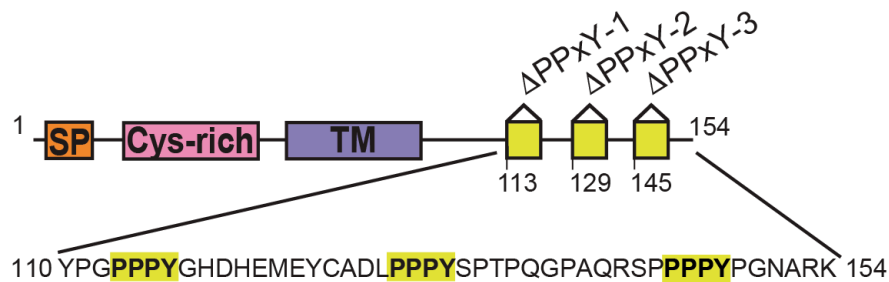
## B. Le gène *CYR1* et son expression

Dans le génome humain, le gène codant pour CYR1 est localisé sur le chromosome 21, dans la région 21q21.3, et est spécifique des vertébrés (Casadei et al., 2014). Le gène *CYR1* peut produire plusieurs variants courts d'épissage, mais c'est la forme longue de CYR1 qui est la plus majoritairement exprimée et la plus ubiquitaire dans les tissus humains sains (Casadei et al., 2014 et [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)). Raffaella Casadei et ses collaborateurs ont également mis en évidence l'existence d'un transcrit anti-sens de *CYR1* appelé *CYR1-AS1*. Ce transcrit, classifiable dans la famille des ARN longs non-codants, pourrait participer à la régulation fine de l'expression de *CYR1* puisqu'il est lui aussi exprimé dans les tissus humains sains (Casadei et al., 2014).

## C. La protéine CYZR1

### 1. *La structure de CYZR1*

La forme longue de CYZR1 est une protéine de 154 acides aminés ayant une masse moléculaire d'environ 17 kDa. Comme tous les membres de la famille STMC6, CYZR1 présente en son extrémité N-terminale un peptide signal supposé suivi d'un domaine riche en cystéines, d'un domaine transmembranaire unique et enfin, à son extrémité C-terminale, un domaine riche en prolines ayant la particularité de contenir trois motifs PY de séquence PPPY (Pei and Grishin, 2012; Casadei et al., 2014) (**Figure 29**).



*Figure 29 : Schéma représentatif de la structure de CYZR1.*

### 2. *Le rôle de CYZR1*

Bien que *CYZR1* soit identifié dans certains cribles, à ce jour, aucune étude démontrant la fonction cellulaire de *CYZR1* n'a été publiée. Cependant, le laboratoire de Flavia Frabetti, qui a caractérisé le gène de *CYZR1*, a également encadré le projet de thèse de Fabrizio Pizzetti qui visait à mieux comprendre le rôle cellulaire de la protéine *CYZR1* sur le modèle du poisson-zèbre.

Les travaux de thèse de Fabrizio Pizzetti, dont le manuscrit est disponible en accès libre sur internet, proposent une connexion entre *CYZR1* et la voie de signalisation Sonic Hedgehog (SHH). La voie SHH est une voie de signalisation fortement impliquée dans le développement embryonnaire, l'organogénèse et le maintien de l'homéostasie tissulaire. La voie de signalisation SHH peut être altérée dans plusieurs types de cancers tels que les rhabdomyosarcomes, les médulloblastomes et les ostéosarcomes (Carballo et al., 2018). Sur le modèle du poisson-zèbre *CYZR1*<sup>-/-</sup>, Fabrizio Pizzetti et ses collaborateurs ont pu observer que la perte d'expression de *CYZR1* n'est pas létale, mais conduit à un ralentissement général du

développement ainsi qu'à l'apparition d'anomalies cardiaques et à une hypertrophie du diencéphale importante. De plus, sur le modèle cellulaire de rhabdomyosarcome RH30, le groupe a pu observer que l'inhibition de la voie non-canonique SHH diminue l'expression de *CYYR1*. Enfin, Fabrizio Pizzetti a démontré que l'inhibition de la voie SHH cause de sévères perturbations du développement du poisson-zèbre et que le phénotype observé est partiellement restauré par la micro-injection de l'ARNm de *CYYR1*. Ensemble, les travaux de thèse de Fabrizio Pizzetti proposent une régulation de l'expression de *CYYR1* par la voie non-canonique SHH nécessaire au bon développement cardiaque, musculaire et cérébral des vertébrés (Fabrizio Pizzetti. Ruolo del gene umano CYYR1: dallo studio funzionale dell'ortologo in *Danio rerio* alla potenziale implicazione in processi tumorigenici, Università di Bologna, 2020).

Au cours de ma thèse, j'ai identifié la protéine ANKRD13A comme un nouvel interactant de CYYR1, et je me suis aussi particulièrement intéressée à cette protéine contenant un domaine UIM et pouvant interagir avec des protéines ubiquitinées destinées à une dégradation lysosomale.

## VIII. La protéine ANKRD13A

### A. Structure des membres de la famille ANKRD13

La famille de protéines ANKRD13 « ANKyrin-Repeat Domain-containing 13 » comporte quatre membres (ANKRD13A/B/C/D) et est structurellement définies par la présence de deux domaines ANKyrin-repeat (ANK) dans leur extrémité N-terminale (**Figure 30**). Le domaine Ankyrin, long d'une trentaine d'acides aminés, organisé en hélice-tour-hélice et le plus souvent retrouvé en tandem, sert exclusivement aux interactions protéine-protéine (Li et al., 2006).

Parmi cette famille, ANKRD13A, ANKRD13B et ANKRD13D portent aussi trois à quatre motifs d'interaction à l'ubiquitine (UIM) à leur extrémité C-terminale (**Figure 30**).

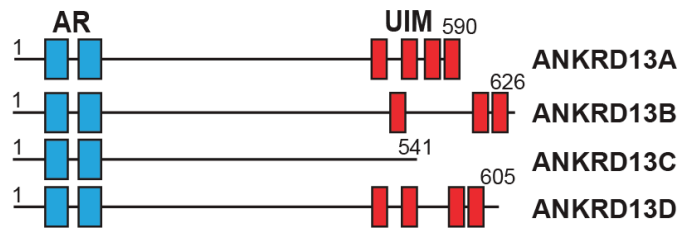


Figure 30 : Représentation schématique de la structure des membres de la famille ANKRD13. Les domaines AR sont représentés en bleu et les domaines UIM sont représentés en rouge.

## B. La fonction cellulaire des ANKRD13A/B/D

La fonction cellulaire des protéines ANKRD13 est encore peu décrite. Toutefois, Masayuki Komada et son équipe ont observé que les ANKRD13A/B/D peuvent lier, *via* leurs motifs UIM, le récepteur à l'EGF activé et polyubiquitiné en chaîne K63 avant son internalisation. De plus, les chercheurs ont observé que les ANKRD13A/B/D semblent être localisées, en plus de la membrane plasmique, au niveau des endosomes tardifs, laissant supposer qu'elles jouent un rôle dans l'internalisation et/ou le trafic des protéines ubiquitinées (Tanno et al., 2012).

En complément de leur rôle dans l'internalisation du récepteur à l'EGF (Tanno et al., 2012), les ANKRD13 seraient plus généralement impliquées dans le trafic de protéines polyubiquitinées transitant par les endosomes tardifs. En effet, l'équipe de Masayuki Komada a montré que les protéines ANKRD13A/B/D causent un élargissement des endosomes tardifs où les ANKRD13 colocalisent avec des protéines ubiquitinées, et que cet effet est dépendant de leurs motifs UIM (Burana et al., 2016). ANKRD13A, *via* ses motifs UIM, interagit avec la Cav-1 polyubiquitinée en chaîne K63 et en périphérie des endosomes tardifs élargis suggérant que la surexpression de ANKRD13A perturbe le trafic endolysosomal basal. A partir de ces observations, l'équipe de Masayuki Komada propose qu'ANKRD13A endogène est impliquée dans la formation des MVB et dans le trafic des protéines ubiquitinées vers une dégradation lysosomale et que ce rôle est dépendant de ses motifs UIM (Burana et al., 2016).

Enfin, un nouveau rôle de ANKRD13A a récemment été proposé en faveur de la survie cellulaire induite par la signalisation NF- $\kappa$ B. En effet, la protéine RIP1 joue un rôle double au sein de cette voie de signalisation. D'une part, il est acteur de la voie IKK anti-apoptotique en recrutant le complexe E3 ligases LUBAC et le complexe IKK, mais dans un second temps, RIP1 permet également la formation d'un complexe cytotoxique en recrutant les protéines FADD et caspase-8 permettant ainsi un rétrocontrôle de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B

(Micheau and Tschopp, 2003). Alors que le statut d'ubiquitination de RIP1 semble être un élément de régulation de sa fonction, l'équipe de Gang Min Hur a observé que ANKRD13A lie RIP1 ubiquitiné *via* ses motifs UIM et que cette interaction inhibe la formation du complexe cytotoxique RIP1/FADD/Caspase-8 en faveur de la signalisation IKK anti-apoptotique (Won et al., 2021).

## ETAT DE LA QUESTION

Notre laboratoire s'intéresse aux mécanismes d'action et de régulation des E3 ubiquitine ligases impliquées dans le développement des cancers. En particulier, les recherches de mon groupe portent sur WWP1, une E3 ubiquitine ligase définie comme oncogène. En effet, le gène *WWP1* est fréquemment amplifié dans de multiples cancers, notamment dans les cancers du sein et de la prostate (Hu et al., 2021). De plus, il a été montré que la surexpression de WWP1 dans les cellules cancéreuses favorise la prolifération cellulaire et inhibe l'apoptose (Hu et al., 2021). En accord avec ces observations, WWP1 a été montré comme régulant négativement plusieurs protéines impliquées dans le développement des cancers telles que PTEN (Lee et al., 2019), TBRI (Courivaud et al., 2015) ou encore LATS1 (Yeung et al., 2013). Cependant, WWP1 semble aussi pouvoir limiter la migration de métastases osseuses issues de cellules cancéreuses mammaires (Subik et al., 2012). Ces résultats suggèrent que la E3 ubiquitine ligase WWP1 joue un rôle complexe lors de la tumorigenèse qui dépend de ses interactions avec ses partenaires moléculaires.

Mon laboratoire cherche donc à identifier de nouveaux partenaires moléculaires de WWP1 afin de caractériser de nouveaux mécanismes d'action ou de régulation de cette E3 ligase pour mieux comprendre son rôle lors de la progression tumorale. Dans ce but, un crible double-hybride utilisant WWP1 comme appât, a été réalisé chez la levure, ce qui a permis d'identifier la protéine CYYR1 comme un partenaire moléculaire potentiel de WWP1. CYYR1 étant une protéine à domaine transmembranaire sans fonction cellulaire connue, mon projet de thèse visait donc (i) à confirmer et à caractériser l'interaction entre CYYR1 et la E3 ubiquitine ligase WWP1, (ii) à déterminer la fonction cellulaire du complexe CYYR1 /WWP1, (iii) et enfin à évaluer sa potentielle implication dans la tumorigenèse.





# RESULTATS

## Article 1: CYYR1 promotes the degradation of the E3 ubiquitin ligase WWP1 and is associated with favorable prognosis in breast cancer

Mes travaux de thèse ont permis de valider l'interaction entre la protéine CYYR1 (CYsteine and tYrosine-Rich protein 1), une petite protéine à domaine transmembranaire de fonction inconnue, et la E3 ubiquitine ligase WWP1. CYYR1 interagit également avec deux autres membres de la sous-famille NEDD4, notamment avec WWP2 et dans une moindre mesure avec ITCH. Nous avons caractérisé les domaines moléculaires impliqués dans l'interaction entre CYYR1 et les E3 ubiquitine ligases WWP1/2. En effet, nous avons démontré que ces E3 ligases interagissent, *via* leurs domaines WW, avec les motifs PY (PPxY#2 et PPxY#3) de CYYR1.

Dans un premier temps, nous avons observé qu'en conditions de surexpression des protéines CYYR1 et WWP1/2, cette interaction conduit à l'ubiquitination de CYYR1 sur son résidu lysine 154 et que cette ubiquitination est dépendante des activités ubiquitine ligase de WWP1/2. Cependant, à l'état endogène, nous n'avons pas pu confirmer l'ubiquitination de CYYR1 induite par WWP1/2, ni identifier de conséquences évidentes de ce mécanisme sur la protéine CYYR1, par exemple sur sa stabilité ou sur sa localisation cellulaire. De ce fait, nous avons supposé que CYYR1 constitue un régulateur, plutôt qu'un substrat, des E3 ubiquitine ligases WWP1/2.

Toujours en conditions de surexpression de CYYR1, nous avons ensuite observé que la liaison de CYYR1 à WWP1/2 induit l'auto-ubiquitination de ces E3 ubiquitine ligases *via* leur propre activité catalytique, et que cette ubiquitination est corrélée à une diminution de leur niveau protéique. Nous avons de plus démontré que cet effet est dépendant des motifs PPxY de CYYR1. A l'état endogène, nous avons constaté que CYYR1 régule préférentiellement le niveau protéique de WWP1 en comparaison avec WWP2. En effet, l'extinction de CYYR1 par siRNA dans la lignée de cellules de cancer mammaire MDA-MB-468 qui exprime CYYR1 de façon endogène, conduit à l'accumulation protéique de WWP1 mais pas de WWP2. De plus, nous avons constaté que la protéine CYYR1 induit l'auto-polyubiquitination en chaîne K63 de WWP1, et qu'elle se localise au niveau des endosomes tardifs marqués Rab7 où elle capture WWP1. En accord avec ces observations, nous avons montré que l'inhibition des lysosomes par un traitement des cellules à la chloroquine et à la bafilomycine A1 induit une accumulation des formes polyubiquitinées de WWP1 et limite la diminution du niveau protéique de la E3 ligase observée en réponse à l'expression de CYYR1. L'ensemble de ces résultats nous permet

de proposer un modèle de régulation du niveau protéique de WWP1 par CYR1 dans lequel CYR1 recrute la E3 WWP1 au niveau des endosomes tardifs et conduit à sa dégradation par la voie endolysosomale *via* l'activation de son auto-ubiquitination en chaîne K63.

De plus, l'analyse de l'interactome de CYR1 nous a également permis d'identifier la protéine ANKRD13A comme un partenaire moléculaire de CYR1. Nous avons observé que ANKRD13A forme un complexe avec CYR1 et la forme polyubiquitinée de WWP1 et qu'elle participe au mécanisme de dégradation de WWP1 induit par CYR1.

Afin de déterminer le rôle fonctionnel de CYR1, nous avons généré un modèle inductible pour l'expression de CYR1 dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 dépourvue de CYR1 endogène. Nous avons observé que l'expression de CYR1 dans cette lignée limite la croissance cellulaire dépendante et indépendante de l'ancrage dans des expériences de formation de colonies, et que cet effet est dépendant des motifs PPxY de CYR1. WWP1 étant connue pour présenter un effet inverse sur la croissance cellulaire dans cette lignée, nos résultats suggèrent que l'effet de CYR1 passe par son interaction avec WWP1 et sa capacité à diminuer le taux de WWP1.

Enfin, en collaboration avec Mathieu Boissan au sein du laboratoire, et avec Ivan Bièche et Laura Courtois du département de génétique de l'institut Curie, nous avons analysé le niveau d'expression de *CYR1* dans une cohorte de 505 patients atteints de cancer mammaire. Cette analyse nous a permis d'observer que l'expression de *CYR1* est diminuée dans les échantillons tumoraux comparé au tissu mammaire sain. Par ailleurs, dans cette même cohorte, ce faible niveau d'expression de *CYR1* est associé à un mauvais pronostic caractérisé par un plus haut risque de développer des métastases. Ces observations ont été confirmées par une analyse de la base de données KM Plotter qui rapporte que l'expression de *CYR1* est bien diminuée dans les cancers mammaires et que cette diminution est corrélée à un plus haut risque de rechute, de développement de métastases et à un plus faible taux de survie. Alors que l'expression de *WWP1* est fréquemment augmentée dans les cancers mammaires et associée à un mauvais pronostic, nous supposons que la diminution de l'expression de *CYR1* favorise l'effet pro-tumoral de WWP1.

En conclusion, l'ensemble de mes travaux de thèse ont permis d'identifier que la protéine CYR1 constitue un nouveau régulateur de la E3 ubiquitine ligase WWP1 induisant l'auto-polyubiquitination de WWP1 ainsi que sa dégradation lysosomale, ce qui pourrait avoir comme fonction de limiter l'effet pro-tumoral de WWP1 dans la tumorigenèse mammaire.

## TITLE

**CYYR1 promotes the degradation of the E3 ubiquitin ligase WWP1 and is associated with favorable prognosis in breast cancer**

## AUTHORS

Tiphaine Perron<sup>1</sup>, Mathieu Boissan<sup>1,2</sup>, Ivan Bièche<sup>3</sup>, Laura Courtois<sup>3</sup>, Florent Dingli<sup>4</sup>, Damarys Loew<sup>4</sup>, Mouna Chouchène<sup>1</sup>, Sabrina Colasse<sup>1</sup>, Laurence Levy<sup>1\*#</sup>, Céline Prunier<sup>1\*#</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne Université, INSERM UMR\_S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, Paris, France

<sup>2</sup> APHP, Hôpitaux Universitaires Pitié-Salpêtrière-Charles Foix, Laboratoire de Biochimie Endocrinienne et Oncologique, Oncobiologie Cellulaire et Moléculaire, Paris, France

<sup>3</sup> Department of Genetics, Institut Curie, Université Paris Cité, Paris, France

<sup>4</sup> CurieCoreTech Mass Spectrometry Proteomics, Institut Curie, PSL Research University, Paris, France.

# co-authors

\*Corresponding authors :

Laurence Levy ; Phone : +33 149 284 611 ; E-mail : laurence.levy@inserm.fr

Céline Prunier ; Phone : +33 149 286 690 ; E-mail : celine.prunier@inserm.fr

**Running Title:** CYYR1 regulates WWP1

**Keywords:** E3 ubiquitin ligase, WWP1, CYYR1, ubiquitination, breast cancer



## **ABSTRACT**

Ubiquitination plays a crucial role in cellular homeostasis by regulating the degradation, localization, and activity of proteins, ensuring proper cell function and balance. Among E3 ubiquitin ligases, WWP1 is implicated in cell proliferation, survival and apoptosis. Notably *WWP1* is frequently amplified in breast cancer and associated with poor prognosis. Here we identify the protein *CYYR1* that had previously no assigned function, as a regulator of WWP1 activity and stability. We show that *CYYR1* binds to the WW domains of the E3 ubiquitin ligase WWP1 through its PPxY motifs. This interaction triggers K63-linked auto-ubiquitination and subsequent degradation of WWP1. We furthermore demonstrate that *CYYR1* localizes to late endosomal vesicles and directs poly-ubiquitinated WWP1 toward lysosomal degradation through binding to ANKRD13A. Moreover, we found that *CYYR1* expression attenuates breast cancer cell growth in anchorage-dependent and independent colony formation assays in a PPxY-dependent manner. Finally, we highlight that *CYYR1* expression is significantly decreased in breast cancer and is associated with beneficial clinical outcome. Taken together our study suggests tumor suppressor properties for *CYYR1* through regulation of WWP1 auto-ubiquitination and lysosomal degradation.

## INTRODUCTION

Post-translational modification of proteins through ubiquitination plays an important role in various essential biological processes (1). Ubiquitination consists of the fixation of one molecule (monoubiquitination) or a chain of ubiquitins (poly-ubiquitination) on a lysine residue of the targeted protein. Poly-ubiquitination occurs by multiple rounds of ubiquitination on the seven lysine residues (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63), or the N-terminal methionine (M1) residue of ubiquitin. Ubiquitination creates additional interacting surfaces that lead to various outcome for the targeted protein depending of the linkage. The most dramatic outcome of ubiquitination is to direct the targeted protein toward degradation, either through the proteasome via K48- or K11-linked poly-ubiquitination, or through the endolysosomal compartment via K63-linked poly-ubiquitination (2). Ubiquitination is a highly regulated process that involves the coordinated activity of a ubiquitin activating E1, a conjugating E2, and a ligating E3 enzymes. Among these enzymes, E3s are crucial in ensuring the specificity of the ubiquitination process, as they are responsible for recognizing specific substrate proteins and facilitating the transfer of ubiquitin molecules to precise lysine residues on those substrates. There are more than 600 E3 ligases in humans that are divided in three main types according to their ubiquitination domain: the HECT (Homologous to E6AP C-Terminus) domain, the RING (Really Interesting New Gene) domain, and the RBR (RING-Between-RING) domain E3 ligases (3). With 28 members, the HECT E3 ubiquitin ligases constitutes a small family of highly conserved enzymes involved in a wide range of pathophysiological processes (4). Among these HECT enzymes, the NEDD4 (Neural precursor cell-Expressed Developmentally Downregulated 4) subfamily is the best characterized. It includes 9 members, WWP1 and WWP2 (WW Domain-containing Protein 1 and 2), NEDD4-1 and NEDD4-2, Smurf1 and Smurf2

(Smad ubiquitination regulatory factor 1 and 2), ITCH, and NEDL1 and NEDL2 (NEDD4-like 1 and 2) that share common structural features (5). All members contain an N-terminal C2 domain responsible for membrane localization, two to four WW domains that mediates protein-protein interaction through PPxY motifs, and a C-terminal catalytic HECT domain (5).

Here we investigate the regulation of WWP1, a versatile E3 that ubiquitinates and regulates the stability, activity or cellular localization of several proteins crucial for cancer progression such as TGF- $\beta$  type I receptor (6, 7), PTEN (8–10), LATS1 (11), KLF5 (12) or the members of the p53 superfamily proteins DNp63a, TAp63a, and DNp73 (13). Most of these substrates are implicated in cell proliferation, cell survival and apoptosis, attributing a role to WWP1 in these processes (11, 13–15). Moreover, WWP1 dysregulation is associated with tumor progression. *WWP1* expression is significantly increased in breast cancer and various other types of cancer, as evidenced by its gene amplification or mRNA overexpression, and high expression of *WWP1* predicts poor prognosis (14, 16–19). Therefore, a tight regulation of WWP1 E3 ubiquitin activity is required to maintain cellular homeostasis. A well-described regulatory mechanism of WWP1, shared with all the members of the NEDD4 family, is driven by auto-inhibitory intra-molecular interactions. Members of the NEDD4 family adopt a closed inactive conformation by interaction of its HECT domain with the C2 domain, WW domains and/or a linker region between the WW domains, thereby blocking access to the HECT catalytic site (20–22). These auto-inhibitory interactions can be relieved by phosphorylation or through the binding of proteins containing PPxY motifs that bind to the WW domains, resulting in enhanced catalytic E3 ligase (23–25). Several PPxY containing proteins such as NDFIPs (Nedd4 family-interacting proteins) and ARDCs (Arrestin-Domain Containing Proteins) have been shown to interact with



the WW domains of NEDD4 E3s and to act either as direct targets, regulators or adaptors for substrates. In the case of WWP1, Smad7 has been reported to act as an adaptor by enhancing the binding of WWP1 to T<sub>b</sub>RI (TGF- $\beta$  type I receptor), thereby inducing T<sub>b</sub>RI and degradation leading to a global inhibition of the TGF- $\beta$  signaling pathway (6, 7).

In this study, we identified the putative membrane protein CYR1 (CYsteine and tYrosine-Rich protein 1) of unknown function (26) as a novel PPxY-containing protein that binds to WWP1 and to the related NEDD4 family E3s WWP2 and ITCH. We show that CYR1 localizes to Rab7-labelled late endosomes and interacts with WWP1 in a PPxY-WW dependent manner to induce WWP1 K63-linked auto-ubiquitination. CYR1 overexpression decrease WWP1 protein level, and this effect is abolished by PPxY deletion or lysosome inhibition, indicating that CYR1 triggers lysosomal degradation of WWP1. Moreover, by analyzing CYR1 interactome we identified ANKRD13A as a partner of CYR1. We show that ANKRD13A forms a complex with CYR1 and poly-ubiquitinated WWP1 and is required for CYR1-induced degradation of WWP1. Finally, we found that CYR1 attenuates anchorage-dependent and independent colony formation of breast cancer cells. Moreover, the expression of *CYR1* is decreased in breast cancer samples and low *CYR1* expression is associated with poor prognosis. Taken together, our results unprecedentedly highlights a potential protective role of CYR1 in breast cancer tumorigenesis that could be attributed to its ability to promote WWP1 auto-ubiquitination and degradation.

## RESULTS

### CYYR1 interacts with WWP1 and WWP2 E3 ubiquitin ligases

To search for regulators of WWP1, we performed a yeast two-hybrid screen using WWP1 as bait and identified CYYR1 as a positive hit. CYYR1 is a putative membrane protein that only had evidence of existence at transcriptional level (27, 28). The presence of three PPxY motifs at the putative C-terminal cytoplasmic tail of the protein sequence suggested a possible function as a regulator of WWP1. To test the specificity of this interaction we performed Flag co-immunoprecipitation experiments in HEK293 cells co-transfected with HA-tagged CYYR1 and Flag-tagged catalytically inactive (CA) mutants E3s of the NEDD4 family (Flag-WWP1-CA, Flag-WWP2-CA, Flag-ITCH-CA, Flag-SMURF1-CA, Flag-SMURF2-CA) (**Figure 1A**). We observed that CYYR1 indeed interacts with WWP1, but also with WWP2 and to a lesser extent with ITCH, which are both the most closely related members of WWP1 in the NEDD4 family. No interaction with SMURF1 or SMURF2 was detected, suggesting a specificity of interaction of CYYR1 with WWP1, WWP2 and ITCH.

Because the endogenous CYYR1 protein has not been observed previously, we next sought to validate this interaction in mammalian cells. Since WWP1 is frequently overexpressed in breast cancer we searched for breast cancer cell lines that express CYYR1 mRNA in the databases (<https://www.proteinatlas.org>). While we noticed that very few breast cancer cell lines express CYYR1 mRNA, we were able to confirm its expression in MDA-MB-468 cell lysates by western-blotting using a commercially available CYYR1 antibody that we validated by depleting the cells of CYYR1 with two independent siRNAs (**Figure S1A**). We immunoprecipitated endogenous CYYR1 from MDA-MB-468 cell lysates and detected in the immunoprecipitates endogenous WWP1 (**Figure 1B**) and WWP2 (**Figure S1B**). Moreover, we performed proximity ligation

assays (PLA) using antibodies targeting CYYR1 and WWP1 in MDA-MB-468 cells that enabled the detection of a proximity between endogenous CYYR1 and WWP1, as visualized by the fluorescent dots observed only in presence of both antibodies (**Figure 1C**). We also observed proximity of CYYR1 and WWP2 in similar experiments using CYYR1 and WWP2 antibodies (**Figure S1C**).

We characterized the interaction of CYYR1 with WWP1 and WWP2 by expressing HA-CYYR1 and Flag-tagged constructs containing the different domains of WWP1 and WWP2 in HEK293 cells, and immunoprecipitating the complex with the Flag antibody. As predicted, we observed that the WW domains of WWP1 and WWP2 are sufficient for CYYR1 binding (**Figure 1D** and **Figure S1D**). Because CYYR1 presents three PPxY motifs we investigated more precisely which PPxY motif of CYYR1 is involved in this binding by generating HA-tagged CYYR1 mutants lacking one or two PPxY motifs (HA-CYYR1- $\Delta$ PPxY). Co-immunoprecipitation experiments of these mutants with Flag-WWP1-CA indicated that while deletion of one PPxY has barely any effect, pairwise PPxY deletions (mainly  $\Delta$ PPxY-2+3) drastically abolished the binding between CYYR1 and WWP1 and WWP2 (**Figure 1E** and **Figure S1E**). Altogether these results demonstrate that CYYR1 is a novel protein that interacts with the WW domains of WWP1 and WWP2 through multiple PPxY motifs.

### **CYYR1 is ubiquitinated by WWP1 and WWP2 E3 ubiquitin ligases**

To investigate the possibility that CYYR1 is a substrate for WWP1 and WWP2 E3 ubiquitin ligases, we immunoprecipitated ubiquitinated proteins from lysates of HEK293 cells transfected with HA-CYYR1 and Flag-WWP1 or WWP2 using the ubiquitin pan Selector affinity resin, and observed poly-ubiquitination of HA-CYYR1 in presence of Flag-WWP1-WT or Flag-WWP2-WT, but not in presence of their

catalytically inactive mutant (**Figure 2A**). To identify which lysine residue of CYYR1 was the target of WWP1- or WWP2-mediated ubiquitination, we generated lysine-to-arginine substitution mutants of CYYR1 for each of the five lysines presents on the CYYR1 protein (K16R, K33-36R, K89R, K154R). A dramatic decrease of CYYR1 poly-ubiquitination induced by WWP1 or WWP2 was observed with the CYYR1-K154R mutant (**Figure S2 and Figure 2B**) although this mutant has retained its ability to bind both E3s (**Figure 2C**). These results indicate that WWP1 and WWP2 mediate CYYR1 poly-ubiquitination on lysine 154. To evaluate the effect of WWP1 and WWP2 on CYYR1 protein level, we next depleted WWP1 or/and WWP2 in MDA-MB-468 cells, but could not detect any effect on CYYR1 stability at endogenous level (**Figure 2D**). This could be explained either by the fact that WWP1/2 does not ubiquitinate CYYR1 under these endogenous conditions, or because WWP1/2 induces non-degradative ubiquitination of CYYR1. Since CYYR1 does not exhibit known function, we could not conclude on the consequences of WWP1/2-mediated ubiquitination on CYYR1. We therefore next investigated whether CYYR1 could function as a novel regulator for WWP1/2.

### **CYYR1 regulates WWP1 auto-ubiquitination and protein level**

Since HECT E3 ligases from the NEDD4 family are known to interact with PPxY-containing proteins to relieve their auto-inhibitory conformation, we investigated whether CYYR1 might have a similar regulatory effect on WWP1 auto-ubiquitination. We co-expressed different mutants of HA-CYYR1 and Flag-WWP1 in HEK293 cells and purified ubiquitinated proteins with the ubiquitin pan Selector resin to evaluate the ubiquitination level of WWP1 (**Figure 3A**). We observed that CYYR1-WT increases the poly-ubiquitination of WWP1-WT, but not of WWP1-CA that is catalytically inactive,

indicating that CYYR1 induces WWP1 poly-ubiquitination through its intrinsic E3 ligase activity and does not involve another endogenous E3. This ubiquitination was slightly enhanced in the presence of CYYR1-K154R, presumably due to the absence of concomitant CYYR1 ubiquitination of this mutant but was not observed with CYYR1- $\Delta$ PPxY<sub>2+3</sub> (renamed CYYR1- $\Delta$ PPxY throughout this study) that could not interact with WWP1. Auto-ubiquitination of WWP1 and WWP2 has been reported to be associated with protein instability (6, 21, 29). We therefore assessed the effect of CYYR1 on WWP1 protein level. First, we noticed that HA-CYYR1 reduces the protein level of Flag-WWP1-WT but not of Flag-WWP1-CA co-expressed in HEK293 cells (**Figure 3B**). Moreover, the HA-CYYR1-K154R mutant which lacks ubiquitination site, enhanced this reduction, whereas the HA-CYYR1- $\Delta$ PPxY mutant showed no effect, which was consistent with their respective effects on WWP1 ubiquitination (see **Figure 3A**).

We then evaluated the effect of CYYR1 depletion on WWP1 protein level in the MDA-MB-468 cell line that expresses endogenous CYYR1. SiRNA targeting of CYYR1 in this cell line induced an increase of WWP1 protein level (**Figure 3C**) and we confirmed by RT-qPCR that this increase was not due to transcriptional upregulation of WWP1 (**Figure S3A**). Conversely, we sought to stably express CYYR1 in MDA-MB-231, a breast cancer cell line that does not express CYYR1. We generated two Doxycycline (Dox)-inducible MDA-MB-231 cell lines that express untagged CYYR1 protein after Dox treatment. We compared the protein level of WWP1 in MDA-MB-231 expressing the empty Dox-inducible vector (TO-Ctrl) and two MDA-MB-231 clones that express Dox-inducible CYYR1-WT (clones TO-CYYR1-WT#1 and TO-CYYR1-WT#2) or CYYR1- $\Delta$ PPxY (clones TO-CYYR1- $\Delta$ PPxY#1 and TO-CYYR1- $\Delta$ PPxY#2). Corroborating our findings, the endogenous WWP1 protein was significantly decreased after induction of CYYR1-WT expression in both clones whereas

expression of CYR1- $\Delta$ PPxY had no impact on WWP1 protein level (**Figure 3D**). Interestingly, we noticed that due to the leakiness of the Tet-Operator inducible system (as shown by the high exposure of CYR1 western-blot), WWP1 protein level is already reduced in absence of Dox treatment, indicating a CYR1 dose response for WWP1 regulation. As previously, we confirmed by RT-qPCR that this diminution is not due to a reduction of WWP1 mRNA (**Figure S3B**).

Altogether, these results indicate that endogenous CYR1 regulates WWP1 ubiquitination and protein level. We performed the equivalent experiments with WWP2 and noticed that overexpression of CYR1 also induced WWP2 ubiquitination and protein level decrease (**Figure S4A, B and C**). Intriguingly CYR1 depletion in MDA-MB-468 had no effect on WWP2 protein level (**Figure S4D**). We conclude that endogenous CYR1 protein preferentially regulates WWP1 stability in MDA-MB-468 cells.

### **CYR1 induces a lysosome-mediated WWP1 degradation**

To investigate the mechanism by which CYR1 regulates WWP1 protein level, we sought to determine which poly-ubiquitination linkage of WWP1 is induced by CYR1. Using ubiquitin Selector affinity resins that recognize either the K48 linkage or the K63 linkage, we found that CYR1 clearly induces selective K63-linked auto-ubiquitination of WWP1 in a PPxY-dependent manner (**Figure 4A**), indicating that CYR1 might induce lysosomal degradation of WWP1. Importantly, we also observed increased poly-ubiquitination of endogenous WWP1 in response to CYR1 expression in the MDA-MB-231 clones, which is concomitant with WWP1 degradation (**Figure 4B**, left panel). Moreover, lysosome inhibition with Bafilomycin A1 (BAF) and Chloroquine (CQ) treatment attenuates CYR1-mediated WWP1 degradation in the MDA-MB-231

clones (**Figure 4B**, right panel and **Figure S5**) and leads to accumulation of endogenous poly-ubiquitinated WWP1 (**Figure 4B**, right panel).

Since CYYR1 is a novel protein that harbors a transmembrane domain, we therefore set out to determine its cellular localization by immunofluorescence experiments. We evaluated the colocalization of untagged CYYR1 co-expressed with different GFP-tagged membrane trafficking protein markers (data not shown) and discovered that CYYR1 colocalizes with GFP-tagged Rab7A, a marker of late endosomes (30) (**Figure 4C**). We then analyzed the colocalization of Flag-WWP1-CA with CYYR1-WT or the CYYR1- $\Delta$ PPxY mutant. Consistently, we observed colocalization of Flag-WWP1-CA with CYYR1-WT, whereas colocalization is significantly reduced with CYYR1- $\Delta$ PPxY mutant that lacks the PPxY interaction motifs for WWP1 binding (**Figure 4D and 4E**). Moreover, while Flag-WWP1-CA is distributed throughout the cell in absence of CYYR1 or in presence of CYYR1- $\Delta$ PPxY, its coexpression with CYYR1-WT leads to a significant accumulation of WWP1 at late endosomes marked with GFP-Rab7A. These observations suggest that CYYR1 recruits cytoplasmic WWP1 at the surface of late endosome. Since late endosomes are known to fuse to lysosomes (31, 32), this recruitments might contribute to WWP1 trafficking toward lysosomal degradation.

### **ANKRD13A is involved in CYYR1-mediated WWP1 degradation**

To get further insight into the mechanism of action of CYYR1-mediated WWP1 degradation, we analyzed the interactome of CYYR1. We performed GFP-Trap affinity purification of GFP-CYYR1 or GFP individually expressed in HEK293 cells followed by quantitative label-free mass spectrometry, and compared the interactomes of GFP-CYYR1 to GFP (**Figure 5A and Table S1**). WWP1, WWP2 and ITCH were among the

most robust hits, which confirmed that CYYR1 specifically regulates WWP1 and the related E3 WWP2 and ITCH. Interestingly, we also detected the protein ANKRD13A, a protein known to interact with K63-linked ubiquitinated proteins to regulate their endolysosomal trafficking toward lysosomal degradation (33, 34).

We confirmed ANKRD13A binding to CYYR1 by western-blot analysis of the GFP co-purified proteins lysates (**Figure 5B**), using a commercially available ANKRD13A antibody that we had previously validated by siRNA targeting (**Figure S6A**). We further identified CYYR1 and ANKRD13A interaction at endogenous level by detecting co-immunoprecipitation of ANKRD13A with CYYR1 in MDA-MB-468 cells (**Figure S6B**). We then evaluated WWP1 binding to the CYYR1-ANKRD13A complex by co-ANKRD13A immunoprecipitation experiments in HEK293 cells transfected with Flag-ANKRD13A and different mutants of WWP1 and CYYR1 (**Figure 5C**). We found that ANKRD13A co-immunoprecipitates higher molecular weight forms of Flag-WWP1-WT in presence of HA-CYYR1-WT but not in presence of HA-CYYR1- $\Delta$ PPxY, and does not co-immunoprecipitate Flag-WWP1-CA in presence of HA-CYYR1-WT. These observations indicate that ANKRD13A interacts with WWP1 specifically under conditions where WWP1 undergoes auto-ubiquitination in presence of CYYR1. Interestingly, endogenous ANKRD13A is known to interact with K63-linked ubiquitinated protein via multiple Ubiquitin-Interacting Motifs (UIM) localized in its C-terminal region (33, 34). We therefore evaluated their involvement in ANKRD13A-WWP1 binding by generating the ANKRD13A- $\Delta$ UIM mutant as well as the ANKRD13A- $\Delta$ AR mutant deleted of the N-terminal Ankyrin-Repeat (AR) domain (**Figure 5D**). GFP-Trap purification of GFP-WWP1 indicated that WWP1 binds ANKRD13A-WT or the ANKRD13A- $\Delta$ AR mutant in presence of CYYR1 but not the ANKRD13A- $\Delta$ UIM mutant, demonstrating that poly-ubiquitinated WWP1 binds to ANKRD13A through the UIM



motifs (**Figure 5D**). The ANKRD13 family contains 3 other members ANKRD13B, C and D. Noteworthy, ANKRD13C does not exhibit any UIMs and we found that WWP1 redundantly binds each member of the ANKRD13 family except ANKRD13C (**Figure 5E**). Finally, we observed that the depletion of ANKRD13A by two independent siRNA significantly attenuates the degradation of WWP1 induced by CYYR1 expression upon doxycycline treatment in MDA-MB-231 TO-CYYR1- WT clones (**Figure 5F**). Altogether, these results indicate that ANKRD13A interacts with K63-poly-ubiquitinated WWP1 bound to CYYR1 and is involved in CYYR1-mediated targeting of WWP1 toward lysosomal degradation.

#### **CYYR1 expression limits anchorage-dependent and independent colony formation of MDA-MB-231 breast cancer cells**

WWP1 is overexpressed in cancer and has been shown to increase cell proliferation and cell survival (35). Having established a role of CYYR1 in WWP1 degradation, we then set out to explore the role of this novel protein in these cellular processes related to cancer progression. While we couldn't detect a significant role of CYYR1 in cell proliferation (data not shown), we provide evidence that CYYR1 limits cell growth in anchorage-dependent and independent colony formation, while WWP1 has been shown to promote cell growth in similar assays (8, 11, 14, 36). First, we found that MDA-MB-231 expressing CYYR1-WT failed to grow into colonies on solid surface, whereas cells expressing CYYR1- $\Delta$ PPxY showed the same ability as the control cells expressing the empty-vector (**Figure 6A**). Moreover, we performed colony formation assay in soft-agar by using the two MDA-MB-231 TO-CYYR1-WT clones, and found that expression of CYYR1 inhibits anchorage-independent cell growth as evidenced by the significant decrease of the number of colonies compared to control cells

expressing the empty-vector (**Figure 6B**). This effect was independent of the addition of doxycycline, indicating that the leakiness of *CYYR1* expression in absence of doxycycline observed by western-blot (**Figure 3D**) is sufficient to induce this effect. Importantly, we did not observe any significant decrease of colony formation in soft agar assay performed on the two MDA-MB-231 TO-*CYYR1*- $\Delta$ PPxY clones expressing *CYYR1*- $\Delta$ PPxY. Altogether, these results indicate that *CYYR1* expression limits anchorage-dependent and independent colony formation of MDA-MB-231 breast cancer cell and that this effect is dependent on its PPxY motifs.

### ***CYYR1* expression is decreased in breast tumors and is associated with beneficial clinical outcome**

Based on our novel findings, we predicted that *CYYR1* expression might be downregulated in human breast tumors in comparison to normal breast tissue. We first determined mRNA levels of *CYYR1* in a large cohort of 505 human breast tumors from patients with well-documented follow-up by RT-qPCR. Strikingly, *CYYR1* mRNA levels were strongly decreased in breast tumors, irrespective of the molecular subtype, in comparison to normal breast tissue (**Figure 7A**). Then, we evaluated in the same cohort the prognostic value of *CYYR1* on patient metastasis-free survival stratifying patient samples into groups of low and high expression of *CYYR1*. This revealed that patients with low expression of *CYYR1* had the poorest prognosis (**Figure 7B**). Finally, we observed similar results on *CYYR1* by interrogating the publicly available human cancer KM Plotter database that contains gene expression data and survival information. Indeed, *CYYR1* mRNA levels were decreased in breast primary tumors and even more when the primary tumor has metastasized (**Figure 7C**). In addition, a low expression of *CYYR1* was associated with poor prognosis when considering

overall survival, relapse-free survival or distant metastasis-free survival (**Figure 7D**). Taken together, these data unambiguously show that *CYYR1* is associated with beneficial clinical outcome in breast tumors.

## **DISCUSSION**

In this study we report a new mechanism of regulation for the E3 ubiquitin ligase WWP1 that involves the novel protein CYYR1. We showed that CYYR1 localizes at late endosomes where it binds to WWP1 in a PPxY/WW dependent manner. This interaction leads to K63-linked auto-poly-ubiquitination of WWP1 that subsequently allows binding of ANKRD13A in a Ubiquitin/UIM dependent manner. These interactions drive WWP1 toward lysosomal degradation resulting in a decrease of WWP1 protein level (**Figure 8**).

Among the 9 members of the Nedd4 E3 ligases family that all contains WW domains, we found that CYYR1 preferentially interacts with WWP1, WWP2 and ITCH. This specificity is supported by the exclusive identification of these three E3s in the CYYR1 interactome that corroborates the lack of interaction observed between CYYR1 and Smurf1/2 in immunoprecipitation experiments. Interestingly, WWP1, WWP2, and ITCH share a common architectural structure of their WW domains, consisting of four consecutive WW domains and a crucial linker region positioned between the second and third WW domains (20, 21). Additional work is needed to understand how this distinctive structural feature of the WW domains drives specificity of interaction with the multiple PPxY motifs of CYYR1. The binding preference of CYYR1 suggests that its ability to induce degradation of WWP1 might also extend to WWP2 and ITCH. However, while CYYR1 overexpression can also induce WWP2 auto-ubiquitination and degradation, we could not observe any significant effect of CYYR1 depletion on

WWP2 protein level in MDA-MB-468 cells. In light of this observation, we propose that CYYR1 may preferentially regulate the stability of WWP1 depending of its expression level in the cell.

We demonstrate that CYYR1 interaction with WWP1 leads to auto-ubiquitination of WWP1 but also to ubiquitination of CYYR1 on lysine 154. Which suggests that CYYR1 acts as a regulator but could also constitute a novel substrate of WWP1. Since we could not provide evidence of an increased stability of endogenous CYYR1 in WWP1/2-depleted MDA-MB-468 cells, the consequences of WWP1/2-mediated ubiquitination on CYYR1 remains to be clarified. One possibility could be that non-degradative ubiquitination of CYYR1 is required to induce WWP1 lysosomal degradation. However, we found that the K154R mutant can still induce the ubiquitination (**Figure 3A**) and degradation (**Figure 3B**) of WWP1, indicating that it is not the case. Whether WWP1-ubiquitination of CYYR1 mediated by WWP1 could regulate unknown CYYR1 functions need to be investigated in a future study.

CYYR1 contains an N-terminal peptide signal, a central cysteine-rich domain followed by a transmembrane protein and a C-terminal region containing three successive PPxY motifs (26). We found that CYYR1 localizes at late endosomes labelled by Rab7A and interacts with the WW domains of WWP1 through its PPxY motifs. It is therefore likely that CYYR1 localizes at the membrane of the late endosome and catches cytoplasmic WWP1 at the surface of the late endosome through its PPxY-containing C-terminal tail. Interestingly proteins of the NDFIP (NDFIP1 and 2) and the ARRDC (ARRDC1 to 5) families that also contain PPxY motifs and localize at the endolysosomal compartment have been shown to recruit NEDD4-1/2, ITCH and WWP2, and to a less extent WWP1, in order to ubiquitinate and induce lysosomal degradation of cargo proteins such the receptor CXCR4 (37), Robo1 (24) and GPCR

(38). Here we demonstrate that WWP1 is also recruited to late endosomes by the CYYR1 protein that belongs to the STMC6 family. This family of proteins that includes four other members in mammals, WBP1, VOPP1, WBP1L/OPAL and TMEM92, also contains a transmembrane domain and multiple PPxY motifs (26). Interestingly WBP1L/ OPAL1 has been shown to act as an adaptor of WWP1, WWP2, ITCH, and NEDD4L at the plasma membrane for CXCR4 ubiquitination and degradation (39). In light of these studies and our finding, it is therefore likely that the STMC6 proteins might also constitute an important family of proteins that regulates NEDD4-like E3s, and more particularly WWP1.

NDFIP1/2, ARRDC1-5, and other PPxY containing proteins that bind to the WW domains of the NEDD4 family E3s, have been shown to act as adaptors for substrates or as direct substrates (25). Since their binding alleviates the autoinhibitory intramolecular interaction within the E3, these adaptors have also been shown to induce additional auto-ubiquitination of the E3 (20, 39). Moreover mutations in the WW-linker or the HECT domain of WWP1/2 that also lead to an open conformation have been shown to promote uncontrolled auto-ubiquitination (21, 22). In this study, we have demonstrated that CYYR1 acts as a direct regulator of WWP1 that induces WWP1 K63 auto-ubiquitination and lysosomal degradation. Whether CYYR1 induces a change in the targeted lysine(s) ubiquitinated on WWP1 that could help its recruitment to lysosomes needs to be clarified in future study.

However, we could not exclude that CYYR1 could also act as an adaptor for the recruitment of unknown substrates for WWP1-mediated ubiquitination at the endosomal surface, prior to drive WWP1 lysosomal degradation. Such substrates might be found within the list of our candidates identified in the CYYR1 interactome and future work will be required to explore this possibility. Nonetheless, our analysis of

the top-ten candidates of the CYYR1 interactome, led us to identify the protein ANKRD13A as part of the CYYR1-WWP1 complex. ANKRD13A has been shown to localize on the endolysosomal compartment and to trigger lysosomal degradation of K63-ubiquitinated caveolin 1 or EGF receptor in a UIM-dependent manner (33, 34). Our study reveals that it is also required for CYYR1-mediated lysosomal degradation of K63-ubiquitinated WWP1, which strengthens the role of ANKRD13A in the endolysosomal trafficking of K63-ubiquitinated specific targets. Since we found that WWP1 can also bind ANKRD13B and ANKRD13D, two other ANKRD13-family members that contain UIM motifs, it would be interesting in the future to evaluate the functional redundancy or specificity of these different ANKRD13 proteins in CYYR1-mediated WWP1 degradation.

Because WWP1 has been associated with breast and prostate cancer progression, we sought to investigate the role of CYYR1 in cancer. We found that CYYR1 impairs cell growth in anchorage-dependent and independent colony formation assays. Deletion of the PPxY motifs abolishes this effect, indicating that CYYR1-WWP1 interaction might be required. Since WWP1 depletion has been shown to decrease cell growth of breast and prostate cancer cells in similar assays (8, 11, 14, 36), we speculate that the effect of CYYR1 on cell growth may be mediated by WWP1 degradation. Alternatively, since we found that WWP1 ubiquitinates CYYR1 on its lysine 154 in a PPxY dependent manner, another possibility could be that CYYR1 ubiquitination triggers its function through a yet uncharacterized mechanism. Moreover, we could not exclude the possibility that upon particular cellular condition, WWP1-mediated ubiquitination of CYYR1 could induce CYYR1 degradation. The relevance of CYYR1 ubiquitination at lysine K154 in its cellular function will need to be addressed in future work.

Most importantly, our study identified a potential protective role in cancer for *CYYR1*. Indeed, analysis of *CYYR1* expression in our breast cancer cohort and in the KM plotter database, both reveal that *CYYR1* expression is significantly decreased in breast cancer samples compared to normal breast tissue. Moreover, low *CYYR1* expression correlates with a poor prognosis with a higher risk of relapse or to develop distant metastasis. Conversely, increase of *WWP1* expression in breast cancer has been associated with poor prognosis (18, 19, 40). Collectively, these observations suggest that *CYYR1* downregulation in breast cancer could favor tumor progression by increasing *WWP1* protein.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### **Yeast two-hybrid screen**

The yeast two-hybrid screen was performed by Hybrigenics, S.A., Paris. cDNA encoding for human full-length *WWP1* was cloned into pB27 as a C-terminal fusion to LexA (N-LexA-*WWP1*-C fusion). The resulting plasmid was used as bait in yeast two-hybrid screens of a placental cDNA library. By screening  $10 \times 10^6$  colonies of a human placental cDNA library, we obtained 13 different cDNA species, one of which encodes *CYYR1*.

### **Cell Culture, cells transfections and establishment of stables cells lines**

MDA-MB-468 cells were grown at 37°C in 100% air, in Leibovitz's L-15 Medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), glutamine 2 mM and antibiotics (100 U/ml penicillin and streptomycin). MDA-MB-231, HEK293 and HeLa cells were grown at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in DMEM GlutaMAX supplemented with 10% fetal bovine serum

(FBS) and antibiotics (100 U/ml penicillin and streptomycin). Transient transfections of plasmids were performed using X-tremeGENE HP (Sigma) according to manufacturer's instructions and cells were incubated for 24h in complete media. Doxycycline-inducible stable cell lines (Tet-Rex system, Thermo Fischer Scientific) were generated by a first round of selection of MDA-MB-231 cells transfected with pCDNA6-TR (Thermo Fischer Scientific) using Blasticidin (15 µg/mL). The Clone with the most efficient expression of the Tet Repressor was subsequently selected with Hygromycin B (100 µg/mL) after transfection with pCDNA5-TO (Thermo Fischer Scientific) or the different pCDNA5-TO-CYYR1 constructs described in the plasmids section. The control MDA-MB-231 TO-Ctrl cells were selected as a pool, while the MDA-MB-231 TO-CYYR1-WT and MDA-MB-231 TO-CYYR1-ΔPPxY were selected as clones by anti-CYYR1 western-blotting and two clones for each condition were used for further experiments (clones #1 and #2). Stables cell lines were grown at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in DMEM GlutaMAX supplemented with 10% "Tet-System Approved" fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (100 U/ml penicillin and streptomycin). Doxycycline induction were performed at 10 ng/mL for 24h. siRNA transfections were performed using 50 nM of siRNA and Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) in complete media according to manufacturer's instructions. Cells lysates were harvested 72h post-transfection. SiRNA targeting CYYR1(#1: SI04152981, #2: SI04283825), WWP1(#1: SI04287689, #2: SI04293030), WWP2 (#1: SI03095344, #2: SI04952626) and ANKRD13A (#1: SI04139800, #2: SI04320218), and the non-targeting siRNA control siNT (1027281) were purchased from Qiagen.



## Plasmids and Constructions

The following plasmids were previously described: pCMV10-Flag-WWP1-WT, pCMV10-Flag-WWP1-C890A, pCMV10-Flag-WWP1-C2, pCMV10-Flag-WWP1-WW, pCMV10-Flag-WWP1-HECT, pCMV-His-Ub, pCMV7.1-Flag-SMURF1, Flag-WWP2-WT (6, 41). Flag-tagged catalytically inactive mutants pCMV5B-Flag-SMURF2-CA (C716A) was a gift from Jeff Wrana (Addgene plasmid # 11747) (42); pCMV7.1-Flag-ITCH-CA (C803A) was described previously (43); Flag-SMURF1-CA (C699A) and Flag-WWP2-CA (C838A), were generated by site-directed mutagenesis using QuickChange Lightning kit (Agilent Technologies, #210519). pEGFP-WWP1 was generated by PCR subcloning of pCMV10-Flag-WWP1-WT in pEGFP. Flag-WWP2 domain constructs (C2, WW, HECT) were generated by PCR subcloning into pCMV10. GFP-Rab7A was a gift from Gia Voeltz (Addgene plasmid # 61803) (44). HA-CYYR1 expression vector was generated by PCR using the CYYR1\_pCSdest plasmid (a gift from Roger Reeves, Addgene plasmid # 53794) (45) as a template and subcloning at BamHI/KpnI in HAHA-pCMV5. HA-CYYR1 mutants (K16R, K33-36R, K89R and K154R) and deletions (individually or by pair) of its PPxY motifs ( $\Delta$ PPxY-1 (aa113-116),  $\Delta$ PPxY-2 (aa129-132) and  $\Delta$ PPxY-3 (aa145-148)) were generated by site-directed mutagenesis. GFP-CYYR1 expression vectors GFP-CYYR1-WT and GFP-CYYR1-K154R were generated by using HA-CYYR1 WT or HA-CYYR1-K154R as template and subcloning at BamHI/KpnI in pEGFP-C1. Untagged CYYR1 expression vectors pMEP4-CYYR1-WT and pMEP4-CYYR1- $\Delta$ PPxY-2+3 were generated by PCR using respectively HA-CYYR1 WT and  $\Delta$ PPxY-2+3 as template and subcloned at BamHI/KpnI into pMEP4 (Invitrogen). For generation of Dox-inducible cell lines, pCDNA5-TO-CYYR1-WT and pCDNA5-TO-CYYR1- $\Delta$ PPxY#2+3 were generated by PCR using pMEP4-CYYR1 WT or pMEP4-CYYR1- $\Delta$ PPxY#2+3 as template and

subcloning at BamHI/KpnI into pCDNA5-TO. Flag-Tagged ANKRD13 family cDNAs cloned in the pcDNA3.1 plasmid (pCDNA3.1+/C-(K)-DYK-ANKRD13) were purchased from GenScript: ANKRD13A (OHu13104); ANKRD13B (OHu06736), ANKRD13C (OHu13704) and ANKRD13D (OHu11812). Flag-ANKRD13A depleted mutants ( $\Delta$ AR (aa40-103) and  $\Delta$ UIM (aa484-590)) were generated by site-directed mutagenesis. All constructs were verified by sequencing.

### **Reagents and Antibodies**

For proteasome inhibition: MG-132 10  $\mu$ M (474790, Sigma), for lysosome inhibition: Chloroquine 50  $\mu$ M (C6628, Sigma) and Bafilomycin A1 100 nM (201550, ChemCruz). The following antibodies were used for either western-blotting, immunoprecipitation or immunofluorescence as indicated: anti-HA (3F10, Roche; 0.1  $\mu$ g/IP), anti-Flag (M2, Sigma; 1  $\mu$ g/IP), anti-GFP (6663, Abcam), anti-GAPDH-HRP (47724, Santa Cruz), anti-CYYR1 (HPA067685, Sigma; 1  $\mu$ g/IP), anti-WWP1 (H00011059-M01, Abnova), anti-WWP2 (12197-1-AP, Proteintech), anti-ITCH (D20,11890, Santa Cruz), anti-Ubiquitin (P4D1, 8017, Santa Cruz), anti-ANKRD13A (23998-1-AP, Proteintech; 1  $\mu$ g/IP), anti-rabbit-Alexa-Fluor-647 (A21244, Invitrogen).

### **Cellular Lysis, immunoprecipitation and Western blotting**

For preparation of cellular lysates, cells were harvested after transfection and/or stimulation, and lysed at 4°C in TNMG buffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP-40, 10% Glycerol) supplemented with 100 mM NaF, 100 mM  $\beta$ -glycerophosphate EDTA-free proteases Inhibitor (54925800, Roche) for 15 min, centrifuged at 15 000 rpm for 13 min and supernatants were retained. Protein estimation was performed with BCA protein quantification assay kit (Pierce).

For immunoprecipitation, cells lysates containing 500 µg to 1 mg protein were subjected to immunoprecipitation with the appropriate antibody overnight at 4°C followed by adsorption to Sepharose-coupled protein G for 1 hour at 4°C. Immunoprecipitates were washed 3 times with TNMG buffer. Proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting using a standard procedure with the indicated antibodies. Western-blots were acquired on a ChemiDoc XRS+ (Biorad) and quantification was performed by measuring the adjusted intensity using ImageLab (Biorad).

### **Ubiquitination Assay**

For immunoprecipitation of ubiquitinated proteins, cells were treated or not with 10 µM MG132 for 4 h before lysis in RIPA buffer supplemented with 100 mM NaF, 100 mM β-glycerophosphate EDTA-free proteases Inhibitor (Roche) and 10 mM N-Ethylmaleimide (NEM). The sonicated (10 sec ON, 10 sec OFF 3 times) and cleared lysates were immunoprecipitated with 20 µl of pan, K48 or K63 ubiquitin Selector affinity resins (Nanotag Biotechnologies, #N2510, #N1810 or #N1910) for 1 h and washed 3 times with RIPA buffer.

### **Mass spectrometry**

For GFP-immunoprecipitation (GFP-Trap, ChromoTek Cat# gta-20), HEK293 cells were plated in P100 culture plates and transfected by GFP or GFP-CYYR1. 24 hours post-transfections, cells were lysed in IP150 buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 10% Glycerol) supplemented with 10 mM NaF, 10 mM β-glycerophosphate EDTA-free proteases Inhibitor (Roche), cleared and supernatants were retained. 3.5 mg of proteins were incubated on 25 µL of GFP-Trap ChromoTek

slurry overnight at 4°C, followed by 3 washes with IP150 buffer, 1 wash with IP150 Buffer 0,1% NP-40, 3 washes with Ammonium Bicarbonate (ABC) 50 mM buffer. Beads were resuspended in 100 µL of ABC buffer and proteins digested by adding 0.2µg of trypsin-LysC (Promega) for 1 h at 37°C. Samples were then loaded into custom-made C18 StageTips packed by stacking three AttractSPE® disk (#SPE-Disks-Bio-C18-100.47.20 Affinisep) into a 200 µL micropipette tip for desalting. Peptides were eluted using a ratio of 40:60 CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O + 0.1% formic acid and vacuum concentrated to dryness with a SpeedVac apparatus. Peptides were reconstituted in 10µl of injection buffer in 0.3% trifluoroacetic acid (TFA) before liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis.

LC-MS/MS Analysis: Online chromatography was performed with an RSLCnano system (Ultimate 3000, Thermo Scientific) coupled to a Q Exactive HF-X with a Nanospray Flex ion source (Thermo Scientific). Peptides were first trapped on a C18 column (75 µm inner diameter × 2 cm; nanoViper Acclaim PepMap™ 100, Thermo Scientific) with buffer A (2/98 MeCN/H<sub>2</sub>O in 0.1% formic acid) at a flow rate of 2.5 µL/min over 4 min. Separation was then performed on a 50 cm x 75 µm C18 column (nanoViper Acclaim PepMap™ RSLC, 2 µm, 100Å, Thermo Scientific) regulated to a temperature of 50°C with a linear gradient of 2% to 30% buffer B (100% MeCN in 0.1% formic acid) at a flow rate of 300 nL/min over 91 min. MS full scans were performed in the ultrahigh-field Orbitrap mass analyzer in ranges m/z 375–1500 with a resolution of 120 000 at m/z 200. The top 20 intense ions were isolated and subjected to further fragmentation via high energy collision dissociation (HCD) activation by a resolution of 15 000 with the AGC target set to 1e5 ions. We selected ions with charge state from 2+ to 6+ for screening. Normalized collision energy (NCE) was set at 27 and the dynamic exclusion of 40s.

Data processing protocol: For identification, the data were searched against the Homo Sapiens (UP000005640) UniProt database using Sequest HT through proteome discoverer (version 2.4). Enzyme specificity was set to trypsin and a maximum of two miss cleavages sites were allowed. Oxidized methionine, Met-loss, Met-loss-Acetyl and N-terminal acetylation were set as variable modifications. Maximum allowed mass deviation was set to 10 ppm for monoisotopic precursor ions and 0.02 Da for MS/MS peaks. The resulting files were further processed using myProMS v3.10.0 (46) (<https://github.com/bioinfo-pf-curie/myproms>). FDR calculation used Percolator and was set to 1% at the peptide level for the whole study. The label free quantification was performed by peptide Extracted Ion Chromatograms (XICs), re-extracted peptides across the 5 replicates together from each condition and computed with MassChroQ version 2.2.21(47). For protein quantification, XICs from proteotypic peptides shared between compared conditions (TopN matching) and missed cleavages were allowed. Median and scale normalization was applied on the total signal to correct the XICs for each biological replicate (N=5 in each conditions). To estimate the significance of the change in protein abundance, a linear model (adjusted on peptides and biological replicates) was performed, and p-values were adjusted using the Benjamini–Hochberg FDR procedure.

The mass spectrometry proteomics raw data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (48) partner repository with the dataset identifier PXD050895.

### **Immunofluorescence**

HeLa cells plated on coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde and blocked and permeabilized with 0,3% Triton X-100 3% BSA in PBS for 1h à RT. Cells were

incubated overnight at 4°C with the indicating antibody or for 1 hour at room temperature when using Alexa Fluor-conjugated antibodies and secondary antibodies. Washings were performed in PBS-0,1% Triton X-100 and DNA staining were performed with Dapi. Coverslips were then mounted in Prolong diamond antifade reagent (Life Technologies) and visualized on confocal Olympus Fluoview 300 inverted microscope. Image analysis were performed using the Fiji software.

### **Proximity Ligation Assay**

Proximity Ligation Assay (PLA) was performed using the DUOLINK In Situ PLA Kit (Sigma-Aldrich). MDA-MB-468 cells were plated on coverslips and fixed as described above for immunofluorescence assays. Coverslips were incubated with anti-CYYR1 and anti-WWP1 or WWP2 antibodies for 45 min at room temperature, washed with PBS and incubated with secondary antibodies coupled with DNA probes (Duolink In Situ PLA Anti-Mouse Plus and Anti-Rabbit Minus antibodies, Sigma-Aldrich) for 1h. This was followed by incubation with the Duolink In Situ Detection Reagents Orange (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions for DNA probes hybridization and circularization, PCR amplification, and fluorescent staining of the amplified DNA. PCR amplification only occurs when both antibodies are in close proximity (<40 nm) and protein proximity is visualized as florescent dots. Control coverslips were treated with only one primary antibody to estimate background staining in each experiment. Coverslips were stained with Dapi, mounted in Prolong diamond antifade reagent and analyzed on a Leica DM4B microscope.

### **Anchorage-dependent and independent colony formation assays**

For anchorage-dependent colony formation assay, MDA-MB-231 were seeded in P60 plates at 80 000 cells/mL. After 24 hours cells were transfected by 4 µg of pMEP4-CYYR1 WT or mutants or the empty pMEP4 plasmid as control. 24 hours post-transfection, transfected cells were selected by 100 µg/mL Hygromycin during two weeks. On the last day, all of the plates were fixed in 10% acetic acid and 10% methanol, stained with crystal violet 0,4% and 20% ethanol and counted.

Anchorage-independent colony formation assay (Soft Agar Growth assay) was performed in a 12-wells plates on a base layer of 0,6% agar mixed with 5% “Tet-system Approved” FBS growth medium. MDA-MB-231 TO-Ctrl and TO-CYYR1 clones were seeded at 300 cells/well in 0,3% agar mixed with 5% “Tet-system Approved” FBS growth medium in presence or absence of 100 ng/mL doxycycline. Plates were then incubated under standard culture conditions for three weeks allowing for colonies formation. Colonies were colored by addition of 0,5 mg/mL Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide and counted.

### **Statistical analysis**

All experiments were realized at least as 3 independent biological replicates ( $n \geq 3$ ) and quantified when indicated. The means $\pm$ -SD were calculated and statistical analyses were performed as indicated, either with paired t-test or with one-way ANOVA followed by Dunnett's or Sidak's test using GraphPad Prism software (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , ns: not significant).

## Breast cancer cohort analysis

Primary breast tumors were obtained from 505 women treated at Institut Curie - Hôpital René Huguenin (Saint-Cloud, France) between 1978 and 2008. Clinical data of the patients and characteristics of the tumors are reported in **Table S2**. All patients have given their approval for the potential use of their tumor samples for scientific purpose. This study was approved by the local ethics committee (Breast Group of Institut Curie - René Huguenin Hospital) and complies with the principles of the Declaration of Helsinki. The samples were immediately stored in liquid nitrogen until RNA extraction. A tumor sample was considered suitable for this study if the proportion of tumor cells exceeded 70%. All patients (mean age 60.9 years, range 29 – 91 years) met the following criteria: primary unilateral non-metastatic breast carcinoma for which complete clinicopathological data and follow-up were available; no radiotherapy or chemotherapy before surgery; and full follow-up at Institut Curie - Hôpital René Huguenin. Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (ERBB2) statuses were determined at the protein level by biochemical methods (Dextran-coated charcoal method, enzyme immunoassay or immunohistochemistry) and confirmed by real-time quantitative RT-PCR. The population was divided into four groups according to HR (ER and PR) and ERBB2 statuses as follows: two luminal subtypes [HR+ (ER $\alpha$ + or PR+)/ERBB2+ (n=53)] and [HR+ (ER $\alpha$ + or PR+)/ERBB2- (n=288)]; an ERBB2+ subtype [HR- (ER $\alpha$ - and PR-)/ERBB2+ (n=68)] and a triple-negative subtype [HR- (ER $\alpha$ - and PR-)/ERBB2- (n=96)]. During a median follow-up of 8.9 years (range 1 months to 33.2 years), 203 patients developed metastasis. Thirteen samples of adjacent normal breast tissue from breast cancer patients and normal breast tissue from women undergoing cosmetic breast surgery were used as sources of normal RNA.



For RT-qPCR on the samples of the breast cancer cohort, total RNA extraction, cDNA synthesis and RT-qPCR reaction have been described elsewhere (49). Quantitative values were obtained from the cycle number (Ct value) using QuantStudio 7 Flex real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA). Data from each sample were normalized on the basis of its content in *TBP* transcripts. *TBP* encoding the TATA box-binding protein (a component of the DNA-binding protein complex TFIID) was selected as an endogenous control due to the moderate level of its transcripts and the absence of known *TBP* retro-pseudogenes (retro-pseudogenes lead to co-amplification of contaminating genomic DNA and thus interfere with RT-PCR transcripts, despite the use of primers in separate exons). Results, expressed as N-fold differences in *CYYR1* gene expression relative to the *TBP* gene and termed “ $N_{CYYR1}$ ”, were determined as  $N_{CYYR1} = 2^{\Delta Ct_{sample}}$ , where the  $\Delta Ct$  value of the sample was determined by subtracting the average Ct value of *CYYR1* gene from the average Ct value of *TBP* gene. Primers for *CYYR1* (upper primer, 5'- CGTCTCCTCCTATCCTGGACCAC-3'; lower primer, 5'- GGAGGAGGCAAGTCTGCACAGT-3') and *TBP* (upper primer, 5'- TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'; lower primer, 5'-CACATCACAGTCCCCACCA-3'), were selected with Oligo 6.0 program (National Biosciences, Plymouth, MN).

Relationships between mRNA *CYYR1* levels and breast tumor subtypes, were identified by using the non-parametric test, namely the Kruskal-Wallis H test (relationship between one quantitative parameter and two or more qualitative parameters). Differences were considered significant at confidence levels greater than 95% ( $P < 0.05$ ).

To visualize the efficacy of a molecular marker to discriminate between two populations (patients that developed/did not develop metastases) in the absence of an arbitrary cut-off value, data were summarized in a ROC (receiver operating characteristic) curve

(50). The AUC (area under curve) was calculated as a single measure to discriminate efficacy.

Metastasis-free survival (MFS) was determined as the interval between initial diagnosis and detection of the first metastasis. Survival distributions were estimated by the Kaplan-Meier method, and the significance of differences between survival rates were ascertained with the log-rank test.

### **KM plotter database analyses**

Data of *CYYR1* mRNA expression from normal breast tissue and breast tumors were extracted from the KM plotter database (<https://kmplot.com/analysis/>). Analysis of Kaplan-Meier curves evaluating the prognosis value of *CYYR1* mRNA expression was performed with the dataset Affymetrix ID 228665\_at with auto-selection of the best cut off.

## **ABBREVIATIONS**

ANKRD13A/B/C/D : ANKyrin Repeat Domain-containing protein 13 A/B/C/D

ARRDC1/2/3/4/5 : ARRestin Domain-Containing protein 1 to 5

BAF : BAFilomycin A1

CQ : ChloroQuine

CYYR1 : CYsteine and tYrosine-Rich Protein 1

Dox: Doxycycline

HECT : Homologous to E6AP Carboxyl-Terminus

NDFIP1/2 : NEDD4 Family-Interacting Protein 1/2

NEDD4-1/2 : Neural precursor cell-Expressed Developmentally Downregulated 4 1/2

NEDL1/2 : NEDD4-Like 1/2

SMURF1/2 : SMad Ubiquitination Regulatory Factor 1/2

STMC6 : Single-TransMembrane protein with conserved 6 Cysteines

TCL : Total Cell Lysate

WWP1/2 : WW domain-containing Protein 1/2

## **DATA AVAILABILITY**

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository identified with the data set identifier PXD050895.

## **SUPPORTING INFORMATION**

This article contains supporting information.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Romain Morichon from the Cytometrie Imagerie Saint-Antoine platform for assistance and technical support on confocal microscopy. We thank members of the laboratory for helpful discussion.

## **FUNDING AND ADDITIONAL INFORMATION**

T.P. was funded by a PhD fellowship from Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche and by a 4<sup>th</sup> year PhD fellowship from Ligue Nationale Contre le Cancer (IP/SC-178135). C.P. has received funding from La Ligue Contre le Cancer (Comité de Paris - grant R18059DD) and Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer (GEFLUC - grant R18115DD) for this project. The Cytometrie Imagerie Saint-Antoine platform received financial support from Sorbonne Université and from ITMO Cancer of Aviesan and INCa on funds administrated by Inserm.

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## REFERENCES

1. Swatek, K. N., and Komander, D. (2016) Ubiquitin modifications. *Cell Res.* **26**, 399–422
2. Clague, M. J., and Urbé, S. (2010) Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell.* **143**, 682–685
3. Buetow, L., and Huang, D. T. (2016) Structural insights into the catalysis and regulation of E3 ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **17**, 626–642
4. Wang, Y., Argiles-Castillo, D., Kane, E. I., Zhou, A., and Spratt, D. E. (2020) HECT E3 ubiquitin ligases – emerging insights into their biological roles and disease relevance. *Journal of Cell Science.* **133**, jcs228072
5. Ingham, R. J., Gish, G., and Pawson, T. (2004) The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene.* **23**, 1972–1984
6. Courivaud, T., Ferrand, N., Elkhattouti, A., Kumar, S., Levy, L., Ferrigno, O., Atfi, A., and Prunier, C. (2015) Functional Characterization of a WWP1/Tiul1 Tumor-derived Mutant Reveals a Paradigm of Its Constitutive Activation in Human Cancer. *J. Biol. Chem.* **290**, 21007–21018
7. Komuro, A., Imamura, T., Saitoh, M., Yoshida, Y., Yamori, T., Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2004) Negative regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by WW domain-containing protein 1 (WWP1). *Oncogene.* **23**, 6914–6923
8. Lee, Y.-R., Chen, M., Lee, J. D., Zhang, J., Lin, S.-Y., Fu, T.-M., Chen, H., Ishikawa, T., Chiang, S.-Y., Katon, J., Zhang, Y., Shulga, Y. V., Bester, A. C., Fung, J., Monteleone, E., Wan, L., Shen, C., Hsu, C.-H., Papa, A., Clohessy, J. G., Teruya-Feldstein, J., Jain, S., Wu, H., Matesic, L., Chen, R.-H., Wei, W., and Pandolfi, P. P. (2019) Reactivation of PTEN tumor suppressor for cancer treatment through inhibition of a MYC-WWP1 inhibitory pathway. *Science.* **364**, eaau0159
9. Lee, Y.-R., Yehia, L., Kishikawa, T., Ni, Y., Leach, B., Zhang, J., Panch, N., Liu, J., Wei, W., Eng, C., and Pandolfi, P. P. (2020) WWP1 Gain-of-Function Inactivation of PTEN in Cancer Predisposition. *N Engl J Med.* **382**, 2103–2116
10. Zhang, L., Wu, Z., Ma, Z., Liu, H., Wu, Y., and Zhang, Q. (2015) WWP1 as a potential tumor oncogene regulates PTEN-Akt signaling pathway in human gastric carcinoma. *Tumor Biol.* **36**, 787–798
11. Yeung, B., Ho, K.-C., and Yang, X. (2013) WWP1 E3 Ligase Targets LATS1 for Ubiquitin-Mediated Degradation in Breast Cancer Cells. *PLOS ONE.* **8**, e61027
12. Chen, C., Sun, X., Guo, P., Dong, X.-Y., Sethi, P., Cheng, X., Zhou, J., Ling, J., Simons, J. W., Lingrel, J. B., and Dong, J.-T. (2005) Human Kruppel-like Factor 5 Is a Target of the E3 Ubiquitin Ligase WWP1 for Proteolysis in Epithelial Cells\*. *Journal of Biological Chemistry.* **280**, 41553–41561
13. Li, Y., Zhou, Z., and Chen, C. (2008) WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1 targets p63 transcription factor for ubiquitin-mediated proteasomal degradation and regulates apoptosis. *Cell Death Differ.* **15**, 1941–1951
14. Chen, C., Sun, X., Guo, P., Dong, X.-Y., Sethi, P., Zhou, W., Zhou, Z., Petros, J., Frierson, H. F., Vessella, R. L., Atfi, A., and Dong, J.-T. (2007) Ubiquitin E3 ligase WWP1 as an oncogenic factor in human prostate cancer. *Oncogene.* **26**, 2386–2394
15. Behera, A., and Reddy, A. B. M. (2023) WWP1 E3 ligase at the crossroads of health and disease. *Cell Death Dis.* **14**, 853
16. Chen, C., Zhou, Z., Ross, J. S., Zhou, W., and Dong, J.-T. (2007) The amplified WWP1 gene is a potential molecular target in breast cancer. *International*

*Journal of Cancer.* **121**, 80–87

17. Nguyen Huu, N., Ryder, W., Zeps, N., Flaszka, M., Chiu, M., Hanby, A., Poulson, R., Clarke, R., and Baron, M. (2008) Tumour-promoting activity of altered WWP1 expression in breast cancer and its utility as a prognostic indicator. *The Journal of Pathology.* **216**, 93–102
18. Chen, J.-J., and Zhang, W. (2018) High expression of WWP1 predicts poor prognosis and associates with tumor progression in human colorectal cancer. *Am J Cancer Res.* **8**, 256–265
19. Li, Y., Cheng, Q., Gao, J., Chen, Z., Guo, J., Li, Z., Tian, L., Zhang, C., Li, Y., Zheng, J., Li, Z., and Zhu, J. (2022) WWP1 upregulation predicts poor prognosis and promotes tumor progression by regulating ubiquitination of NDFIP1 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cell Death Discov.* **8**, 1–13
20. Zhu, K., Shan, Z., Chen, X., Cai, Y., Cui, L., Yao, W., Wang, Z., Shi, P., Tian, C., Lou, J., Xie, Y., and Wen, W. (2017) Allosteric auto-inhibition and activation of the Nedd4 family E3 ligase Itch. *EMBO Rep.* **18**, 1618–1630
21. Chen, Z., Jiang, H., Xu, W., Li, X., Dempsey, D. R., Zhang, X., Devreotes, P., Wolberger, C., Amzel, L. M., Gabelli, S. B., and Cole, P. A. (2017) A Tunable Brake for HECT Ubiquitin Ligases. *Molecular Cell.* **66**, 345-357.e6
22. Wang, Z., Liu, Z., Chen, X., Li, J., Yao, W., Huang, S., Gu, A., Lei, Q.-Y., Mao, Y., and Wen, W. (2019) A multi-lock inhibitory mechanism for fine-tuning enzyme activities of the HECT family E3 ligases. *Nat Commun.* **10**, 3162
23. Mund, T., and Pelham, H. R. B. (2009) Control of the activity of WW-HECT domain E3 ubiquitin ligases by NDFIP proteins. *EMBO Rep.* **10**, 501–507
24. Gorla, M., Santiago, C., Chaudhari, K., Layman, A. A. K., Oliver, P. M., and Bashaw, G. J. (2019) Ndfip Proteins Target Robo Receptors for Degradation and Allow Commissural Axons to Cross the Midline in the Developing Spinal Cord. *Cell Rep.* **26**, 3298-3312.e4
25. Shah, S. S., and Kumar, S. (2021) Adaptors as the regulators of HECT ubiquitin ligases. *Cell Death Differ.* **28**, 455–472
26. Pei, J., and Grishin, N. V. (2012) Unexpected diversity in Shisa-like proteins suggests the importance of their roles as transmembrane adaptors. *Cell Signal.* **24**, 758–769
27. Casadei, R., Pelleri, M. C., Vitale, L., Facchin, F., Canaider, S., Strippoli, P., Vian, M., Piovesan, A., Bianconi, E., Mariani, E., Piva, F., and Frabetti, F. (2014) Characterization of human gene locus CYYR1: a complex multi-transcript system. *Mol Biol Rep.* **41**, 6025–6038
28. Vitale, L., Casadei, R., Canaider, S., Lenzi, L., Strippoli, P., D'Addabbo, P., Giannone, S., Carinci, P., and Zannotti, M. (2002) Cysteine and tyrosine-rich 1 (CYYR1), a novel unpredicted gene on human chromosome 21 (21q21.2), encodes a cysteine and tyrosine-rich protein and defines a new family of highly conserved vertebrate-specific genes. *Gene.* **290**, 141–151
29. Chen, C., and Matesic, L. E. (2007) The Nedd4-like family of E3 ubiquitin ligases and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 587–604
30. Chavrier, P., Parton, R. G., Hauri, H. P., Simons, K., and Zerial, M. (1990) Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell.* **62**, 317–329
31. Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J., and van Deurs, B. (2000) Rab7: A Key to Lysosome Biogenesis. *MBoC.* **11**, 467–480
32. Luzio, J. P., Rous, B. A., Bright, N. A., Pryor, P. R., Mullock, B. M., and Piper, R. C. (2000) Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *Journal of Cell*

*Science*. **113**, 1515–1524

33. Burana, D., Yoshihara, H., Tanno, H., Yamamoto, A., Saeki, Y., Tanaka, K., and Komada, M. (2016) The Ankrd13 Family of Ubiquitin-interacting Motif-bearing Proteins Regulates Valosin-containing Protein/p97 Protein-mediated Lysosomal Trafficking of Caveolin 1. *J Biol Chem*. **291**, 6218–6231
34. Tanno, H., Yamaguchi, T., Goto, E., Ishido, S., and Komada, M. (2012) The Ankrd 13 family of UIM-bearing proteins regulates EGF receptor endocytosis from the plasma membrane. *MBoC*. **23**, 1343–1353
35. Hu, X., Yu, J., Lin, Z., Feng, R., Wang, Z., and Chen, G. (2021) The emerging role of WWP1 in cancer development and progression. *Cell Death Discov*. **7**, 1–8
36. Kishikawa, T., Higuchi, H., Wang, L., Panch, N., Maymi, V., Best, S., Lee, S., Notoya, G., Toker, A., Matesic, L. E., Wulf, G. M., Wei, W., Otsuka, M., Koike, K., Clohessy, J. G., Lee, Y.-R., and Pandolfi, P. P. (2021) WWP1 inactivation enhances efficacy of PI3K inhibitors while suppressing their toxicities in breast cancer models. *J Clin Invest*. **131**, e140436
37. Bhandari, D., Trejo, J., Benovic, J. L., and Marchese, A. (2007) Arrestin-2 interacts with the ubiquitin-protein isopeptide ligase atrophin-interacting protein 4 and mediates endosomal sorting of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem*. **282**, 36971–36979
38. Dores, M. R., Lin, H., Grimsey, N. J., Mendez, F., and Trejo, J. (2015) The  $\alpha$ -arrestin ARRDC3 mediates ALIX ubiquitination and G protein-coupled receptor lysosomal sorting. *MBoC*. **26**, 4660–4673
39. Borna, S., Drobek, A., Kralova, J., Glatzova, D., Splichalova, I., Fabisik, M., Pokorna, J., Skopcova, T., Angelisova, P., Kanderova, V., Starkova, J., Stanek, P., Matveichuk, O. V., Pavliuchenko, N., Kwiatkowska, K., Protty, M. B., Tomlinson, M. G., Alberich-Jorda, M., Korinek, V., and Brdicka, T. (2020) Transmembrane adaptor protein WBP1L regulates CXCR4 signalling and murine haematopoiesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. **24**, 1980–1992
40. Zhang, X.-F., Chao, J., Pan, Q.-Z., Pan, K., Weng, D.-S., Wang, Q.-J., Zhao, J.-J., He, J., Liu, Q., Jiang, S.-S., Chen, C.-L., Zhang, H.-X., and Xia, J.-C. (2015) Overexpression of WWP1 promotes tumorigenesis and predicts unfavorable prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. **6**, 40920–40933
41. Seo, S. R., Lallemand, F., Ferrand, N., Pessah, M., L'Hoste, S., Camonis, J., and Atfi, A. (2004) The novel E3 ubiquitin ligase Tiul1 associates with TGIF to target Smad2 for degradation. *EMBO J*. **23**, 3780–3792
42. Kavsak, P., Rasmussen, R. K., Causing, C. G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G. H., and Wrana, J. L. (2000) Smad7 Binds to Smurf2 to Form an E3 Ubiquitin Ligase that Targets the TGF $\beta$  Receptor for Degradation. *Molecular Cell*. **6**, 1365–1375
43. Lallemand, F., Seo, S. R., Ferrand, N., Pessah, M., L'Hoste, S., Rawadi, G., Roman-Roman, S., Camonis, J., and Atfi, A. (2005) AIP4 Restricts Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling through a Ubiquitination-independent Mechanism\*. *Journal of Biological Chemistry*. **280**, 27645–27653
44. Rowland, A. A., Chitwood, P. J., Phillips, M. J., and Voeltz, G. K. (2014) ER contact sites define the position and timing of endosome fission. *Cell*. **159**, 1027–1041
45. Edie, S., Zaghloul, N. A., Leitch, C. C., Klinedinst, D. K., Lebron, J., Thole, J. F., McCallion, A. S., Katsanis, N., and Reeves, R. H. (2018) Survey of Human Chromosome 21 Gene Expression Effects on Early Development in *Danio rerio*. *G3 (Bethesda)*. **8**, 2215–2223

46. Pouillet, P., Carpentier, S., and Barillot, E. (2007) myProMS, a web server for management and validation of mass spectrometry-based proteomic data. *PROTEOMICS*. **7**, 2553–2556
47. Valot, B., Langella, O., Nano, E., and Zivy, M. (2011) MassChroQ: a versatile tool for mass spectrometry quantification. *Proteomics*. **11**, 3572–3577
48. Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D. J., Inuganti, A., Griss, J., Mayer, G., Eisenacher, M., Pérez, E., Uszkoreit, J., Pfeuffer, J., Sachsenberg, T., Yilmaz, S., Tiwary, S., Cox, J., Audain, E., Walzer, M., Jarnuczak, A. F., Ternent, T., Brazma, A., and Vizcaíno, J. A. (2019) The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* **47**, D442–D450
49. Bièche, I., Parfait, B., Laurendeau, I., Girault, I., Vidaud, M., and Lidereau, R. (2001) Quantification of estrogen receptor alpha and beta expression in sporadic breast cancer. *Oncogene*. **20**, 8109–8115
50. Hanley, J. A., and McNeil, B. J. (1982) The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*. **143**, 29–36

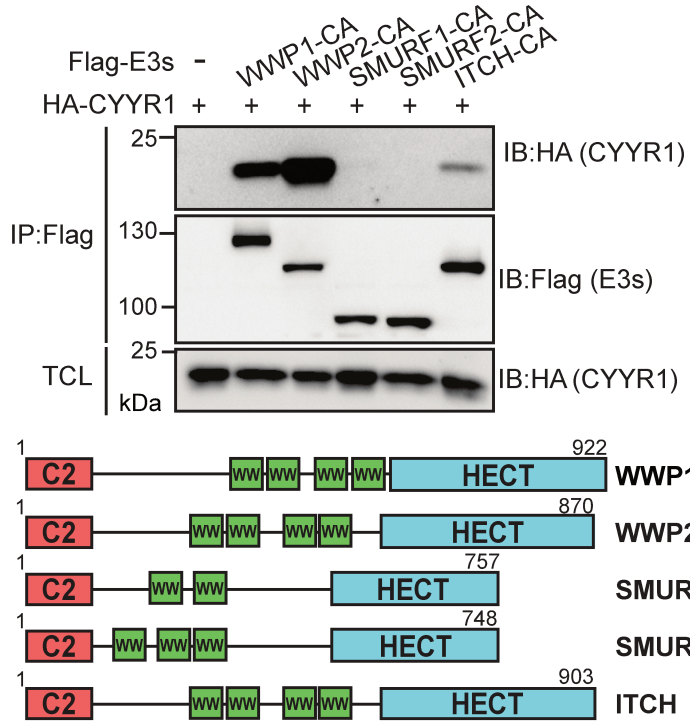


## FIGURES

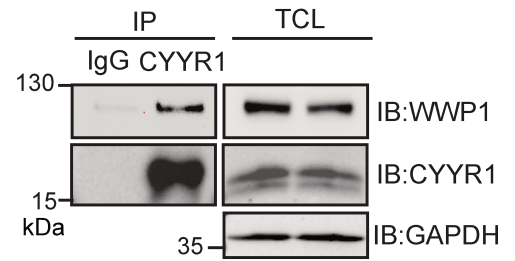
### Figure 1: CYYR1 interacts with WWP1 E3 ubiquitin ligases

**(A)** Association of CYYR1 with NEDD4 family E3s. HEK293 cells were transfected with HA-CYYR1 either alone or with Flag-tagged catalytically inactive E3s as indicated. Cell lysates immunoprecipitated with anti-Flag antibody and total cell lysates (TCL) were analyzed by western-blotting with the indicated antibodies. A schematic representation of the NEDD4 family E3s showing the C2, WW and HECT domain. **(B)** Association between endogenous CYYR1 and WWP1. MDA-MB-468 total cell lysate immunoprecipitated or not with anti-CYYR1 or IgG antibody were analyzed by western-blotting as indicated **(C)** Proximity of CYYR1 and WWP1. Proximity Ligation Assay (PLA) experiments were performed in MDA-MB-468 cells in presence of the indicated antibodies. Antibodies alone conditions are used as a negative control. Dapi staining is shown in the lower panel. Bar: 10  $\mu$ m. Statistical analysis of the number of dots/cell was performed on 50 cells of one representative experiment using one-way ANOVA followed by Sidak's test. **(D)** Schematic representation of the WWP1 constructs showing the C2, WW and HECT domains. Lower panel: WWP1 binding domain to CYYR1. HEK293 cells were transfected with HA-CYYR1 either alone or with full length or domains of Flag-WWP1, as indicated. Cell lysates immunoprecipitated with anti-Flag antibody were analyzed as in A. **(E)** Schematic representation of the CYYR1 constructs. PS (peptide signal), CYS-Rich (Cystein-rich domain), TM (transmembrane domain) and PPxY motifs 1-3 are represented. Lower panel: CYYR1 binding domain to WWP1. HEK293 cells were transfected with Flag-WWP1-CA either alone or with HA-CYYR1- $\Delta$ PPxY mutants, as indicated. Cell lysates immunoprecipitated with anti-HA antibody were analyzed as described.

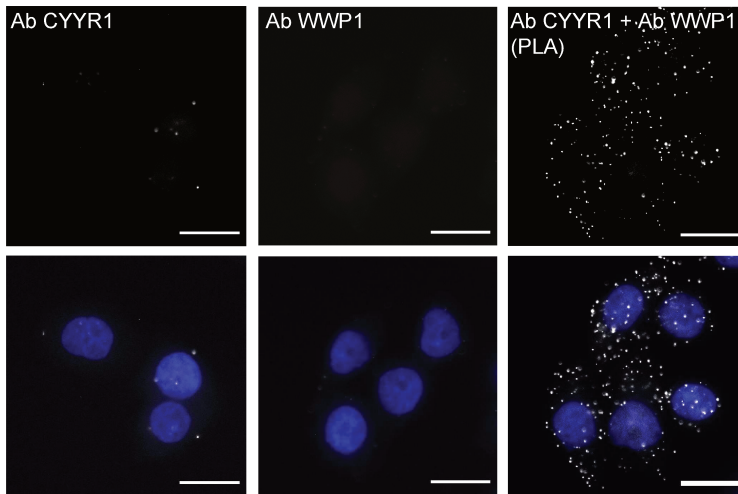
A



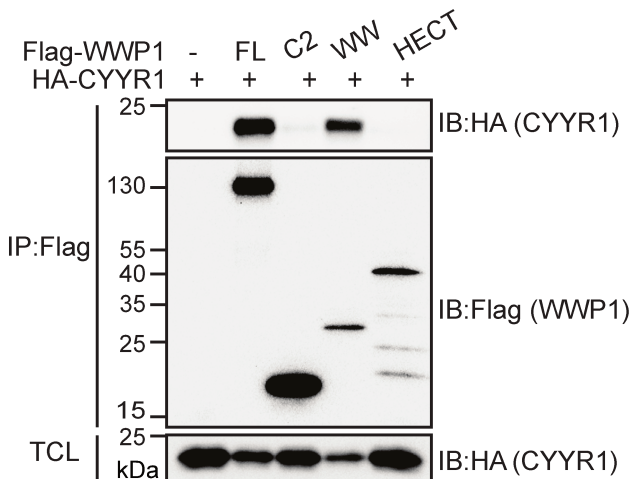
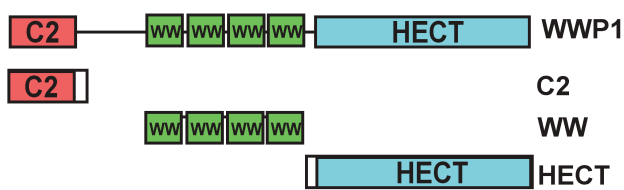
B



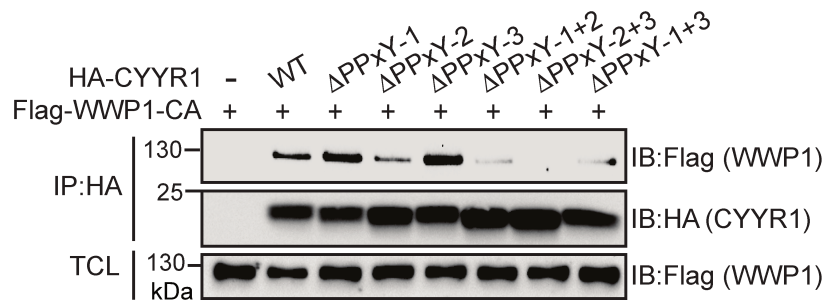
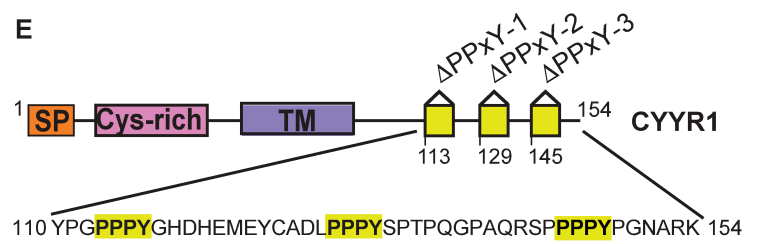
C



D



E



**Figure 2: CYYR1 is ubiquitinated by WWP1 and WWP2 at lysine K154**

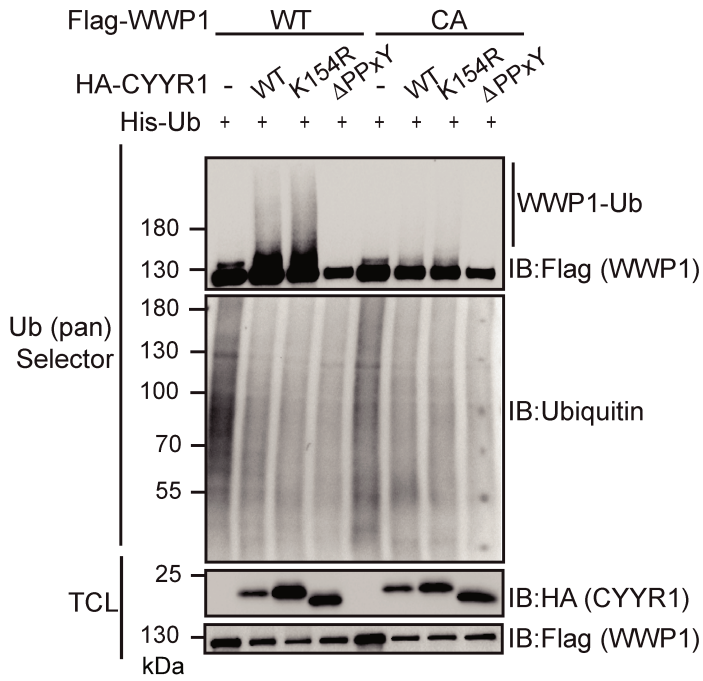
**(A and B)** CYYR1 is ubiquitinated by WWP1 and WWP2 at lysine K154. HEK293 cells were transfected with HA-CYYR1-WT or HA-CYYR1-K154R either alone or with His-Ubiquitin (His-Ub) and Flag-tagged WWP1 or WWP2 (WT) or their catalytically inactive mutants (CA) and treated with MG132 for 4h before lysis. Cell lysates were pulled-down with the ubiquitin pan Selector affinity resin and analyzed by western-blotting with the indicated antibodies. Western-blotting on TCL are shown as a transfection control **(C)** CYYR1-K154R binds to WWP1 and WWP2. Cell lysates from HEK293 cells transfected with GFP-CYYR1 or GFP-CYYR1-K154R were immunoprecipitated with the GFP-trap affinity resin and analyzed by western-blotting as indicated. **(D)** MDA-MB-468 cells were transfected with a non-targeted siRNA control (siNT) or two independent siRNA (#1 and #2) targeting WWP1 or WWP2. 72h post-transfection, cell lysates were analyzed by western-blotting. Quantifications of the CYYR1 intensity relative to GAPDH intensity in each condition normalized to the siNT control condition and p-values were calculated using one-way ANOVA followed by Dunnett's test (n=3).  
\* on anti-WWP2 western-blot indicates non-specific band.



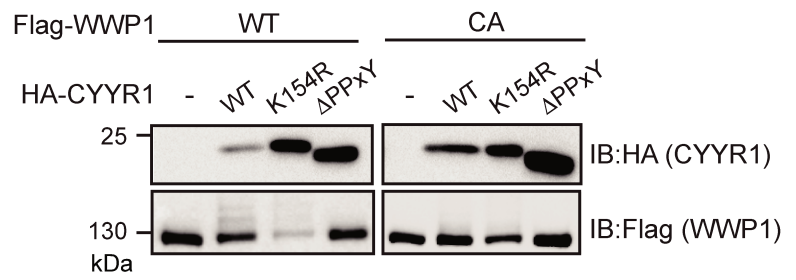
### **Figure 3: CYYR1 regulates WWP1 autoubiquitination and protein level**

**(A)** CYYR1 increases WWP1 auto-ubiquitination. HEK293 cells transfected with His-Ub and Flag-WWP1-WT or Flag-WWP1-CA either alone or with different HA-CYYR1 constructs as indicated. Protein cell lysates were pulled-down with the ubiquitin pan Selector affinity resin and analyzed by western-blotting. **(B)** CYYR1 decreases WWP1 protein level. Cell lysates from HEK293 cells transfected with Flag-WWP1-WT or Flag-WWP1-CA either alone or with different constructs for HA-CYYR1 were analyzed by western-blotting. **(C)** CYYR1 depletion increases WWP1 protein level. Cell lysates from MDA-MB-468 cells transfected with a non-targeting siRNA control (siNT) or two independent siRNA (#1 or #2) targeting CYYR1 were analyzed by western-blotting using the indicated antibodies. Quantifications of the WWP1 intensity relative to GAPDH in each condition were normalized to the siNT control condition and p-values were calculated with a one-way ANOVA followed by Dunnett's test (n=5). **(D)** CYYR1 decreases endogenous WWP1 protein level. MDA-MB-231 cells expressing doxycycline (Dox)-inducible CYYR1-WT or CYYR1- $\Delta$ PPxY (TO-CYYR1-WT or TO-CYYR1- $\Delta$ PPxY clones #1 and #2) were treated with DOX for 24h before analysis of the cell lysates by western-blotting. Low and high exposure of the anti-CYYR1 western-blot are shown to highlight CYYR1 expression leakiness in absence of Dox. Quantifications of the WWP1 intensity relative to GAPDH in each condition were normalized to the Ctrl condition and p-values were calculated with one-way ANOVA followed by Dunnett's test (n=3).

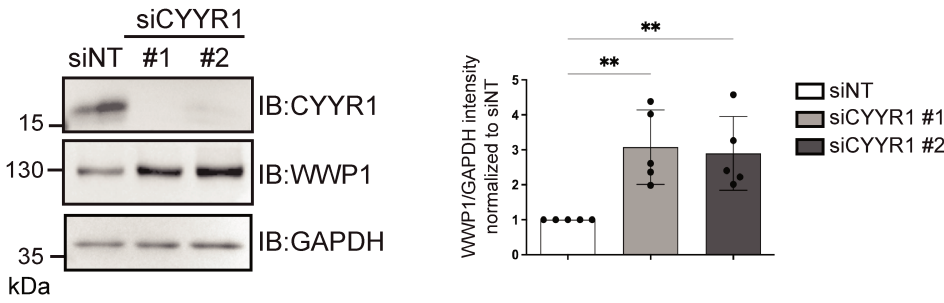
A



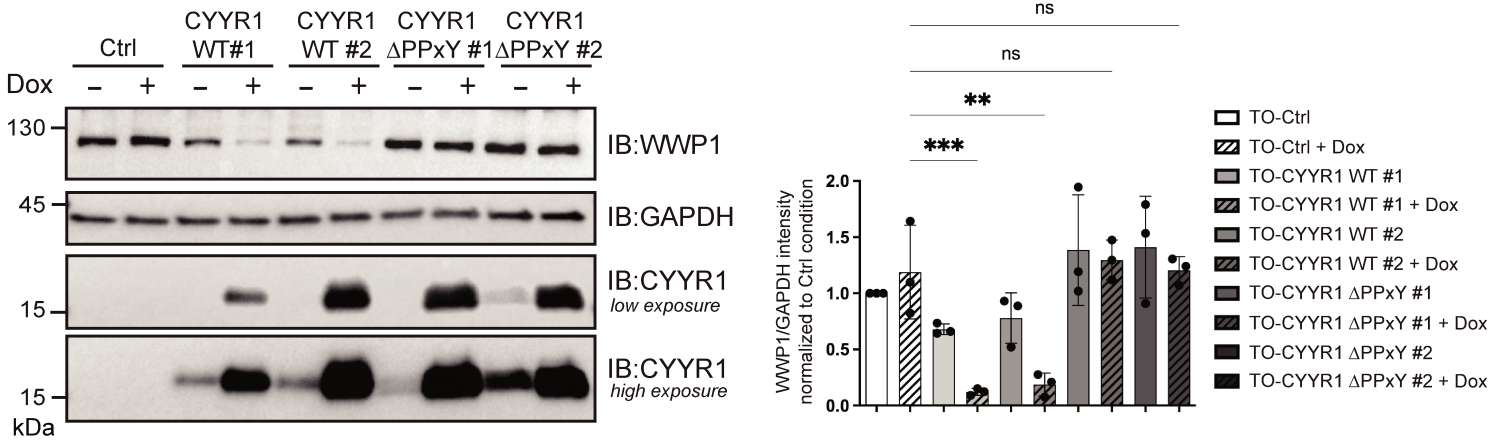
B



C



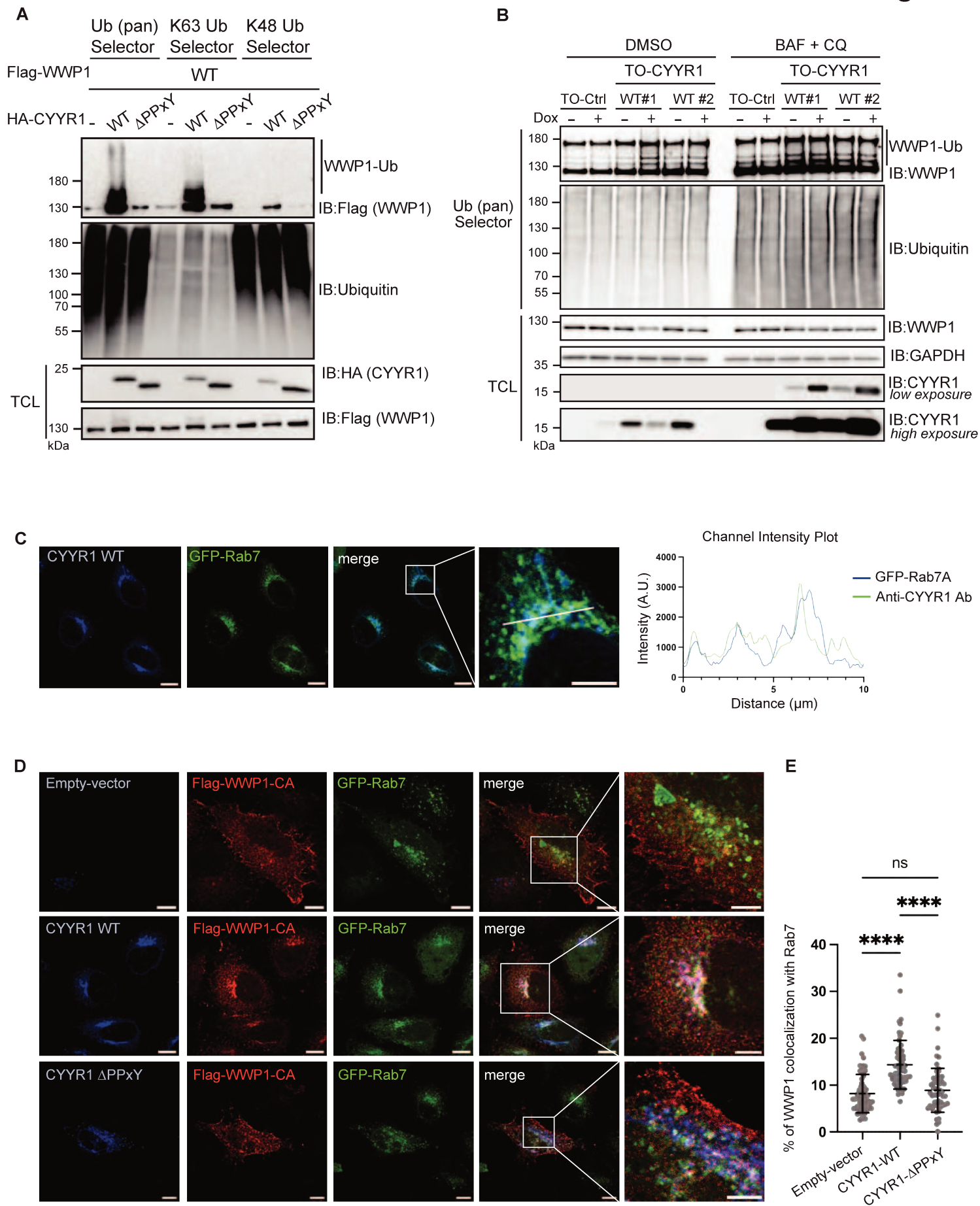
D



#### **Figure 4: CYYR1 induces lysosome-dependent degradation of WWP1**

**(A)** CYYR1 induces K63-linked polyubiquitination of WWP1. HEK293 cells were transfected with Flag-WWP1-WT either alone or with different constructs for HA-CYYR1 as indicated. Cell lysates were pulled-down with the ubiquitin pan, the ubiquitin K63 or the ubiquitin K48 Selector affinity resins and analyzed by western-blotting using the indicated antibodies. **(B)** CYYR1 induces polyubiquitination of endogenous WWP1. MDA-MB-231 TO-Ctrl or TO-CYYR1-WT clones #1 and #2 were treated with Dox 10 ng/mL and with Bafilomycin A1 (BAF) 100 nM and Chloroquine (CQ) 50  $\mu$ M or DMSO for 24h before lysis. Cell lysates were pulled-down with the ubiquitin pan Selector affinity resins and analyzed by western-blotting using the indicated antibodies. **(C)** CYYR1 colocalizes with GFP-Rab7A. HeLa cells transfected with untagged CYYR1 and GFP-Rab7A (green) were stained by immunofluorescence with anti-CYYR1 antibody (blue). Channel intensity plots along a 10  $\mu$ m line is shown. **(D)** WWP1 colocalizes with CYYR1 at GFP-Rab7A-tagged late endosomes. HeLa cells transfected with Flag-WWP1-CA and GFP-Rab7A (green) in presence or in absence of untagged CYYR1-WT or CYYR1- $\Delta$ PPxY, were subjected to immunofluorescence with anti-CYYR1 (blue) and anti-Flag (red). **(E)** CYYR1 targets WWP1 to GFP-Rab7A-tagged late endosomes. The % of colocalization of Flag-WWP1-CA with GFP-Rab7A was measured in each condition on 20 cells in 3 independent experiments. This percentage was determined by measuring the intensity of anti-Flag staining within the perinuclear GFP-Rab7-stained area relative to the overall anti-Flag staining intensity of each cell. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA followed by Sidak's test. The scale bar in each image represents 10  $\mu$ m. The scale bar in the enlarged image represents 5  $\mu$ m.

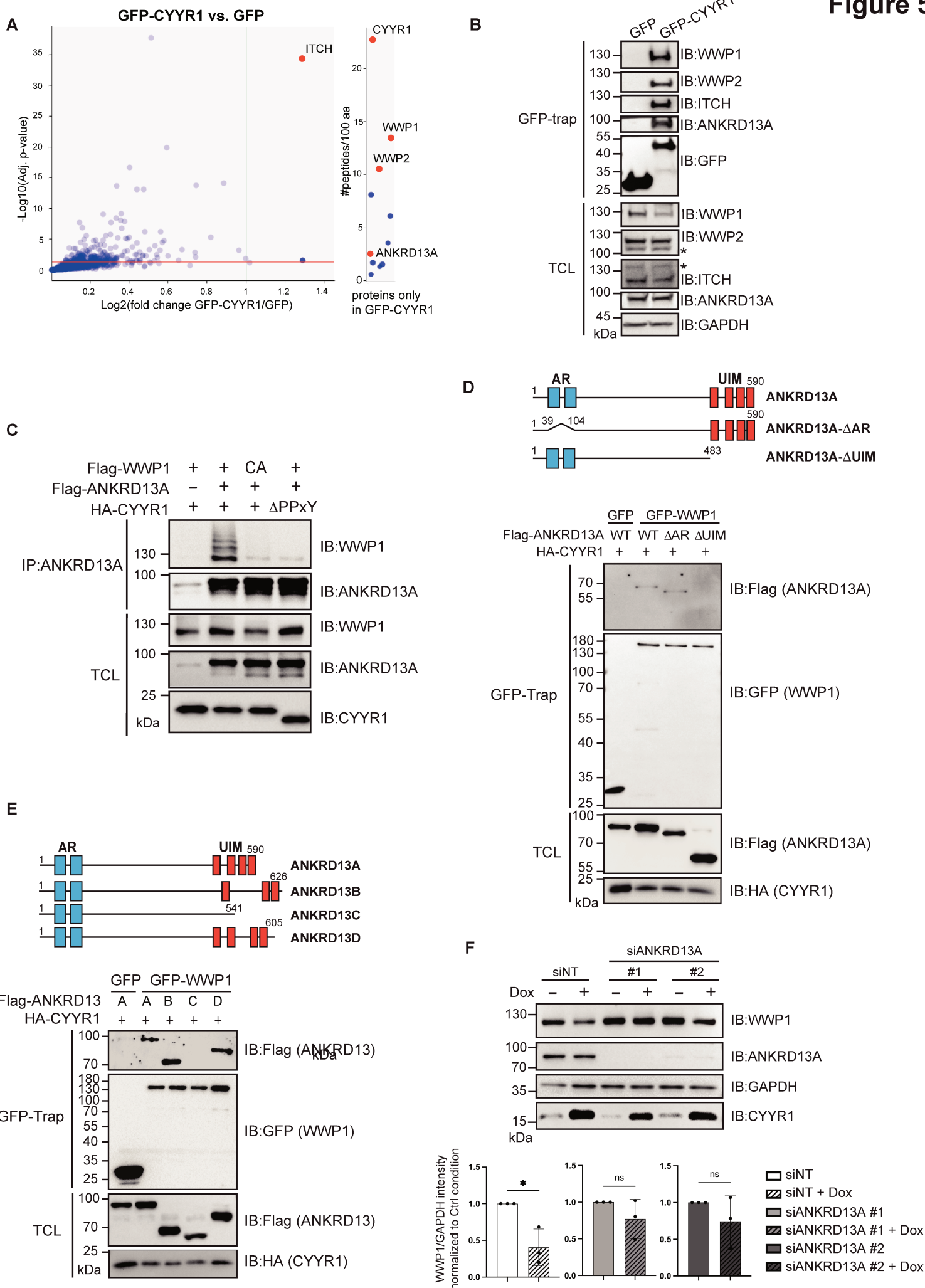
**Figure 4**





### **Figure 5: ANKRD13A is involved in CYYR1-induced WWP1 degradation**

**(A)** CYYR1-interactome. Cell lysates from HEK293 cells transfected with GFP or GFP-CYYR1 were purified on GFP-Trap affinity resin and analyzed by quantitative label-free mass spectrometry. Volcano plot showing differentially expressed proteins significantly enriched in GFP-CYYR1 compared to GFP (green line correspond to fold change  $\geq 2$ , and red line to p-value  $\leq 0.05$ , n=5) that display at least 3 peptides in each of the 5 replicate experiments. Proteins that display no common peptides in the GFP condition (infinite ratio) are represented on the left of the graph with their distribution based on the number of peptides identified/100aa. **(B)** CYYR1 interacts with ANKRD13A. Cell lysates from HEK293 cells transfected with GFP or GFP-CYYR1 were purified with GFP-Trap affinity resin and analyzed by western-blotting with the indicated antibodies. **(C)** WWP1 interacts with ANKRD13A in presence of CYYR1. HEK293 cells were transfected with Flag-WWP1 or Flag-WWP1-CA and HA-CYYR1-WT or HA-CYYR1- $\Delta$ PPxY with or without Flag-ANKRD13A. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-ANKRD13A antibody and immunoblotted with the indicated antibodies. **(D)** Schematic representation of the ANKRD13A constructs. AR and UIM domains are shown. Lower panel: ANKRD13A binds WWP1 through its UIM domains. HEK293 cells were transfected with HA-CYYR1, Flag-ANKRD13A-WT or deletion mutants and GFP or GFP-WWP1-WT as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with the GFP-trap affinity resin and immunoblotted with the corresponding antibodies. **(E)** Schematic representation of the ANKRD13A, B, C and D. Lower panel: WWP1 binds all members of the ANKRD13 family except ANKRD13C. Cell lysates from HEK293 cells were transfected with HA-CYYR1 and Flag-tagged ANKRD13 family proteins, and GFP or GFP-WWP1-WT were immunoprecipitated with the GFP-trap affinity resin and analyzed by western-blotting with the indicated



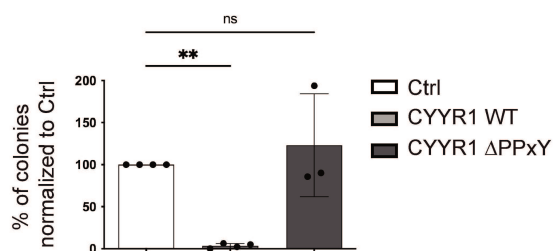
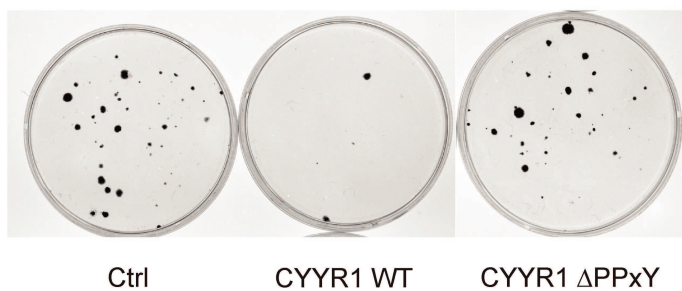
antibodies. **(F)** ANKRD13A depletion attenuates the degradation of WWP1 induced by CYYR1. MDA-MB-231 TO-CYYR1-WT clone #1 were transfected with control siRNA (siNT) or two independent siRNA targeting ANKRD13A. 72h post-transfection, cells were treated with 500 pg/mL Dox for 24h before lysis and western-blotting analysis with the indicated antibodies. Quantifications of the WWP1 intensity relative to GAPDH in each +Dox condition were normalized to the -Dox condition and p-values were calculated by performing a paired t-test, \*p < 0.05 (n=3).

**Figure 6: CYYR1 expression limits anchorage-dependent and independent colony formation of MDA-MB-231 breast cancer cells**

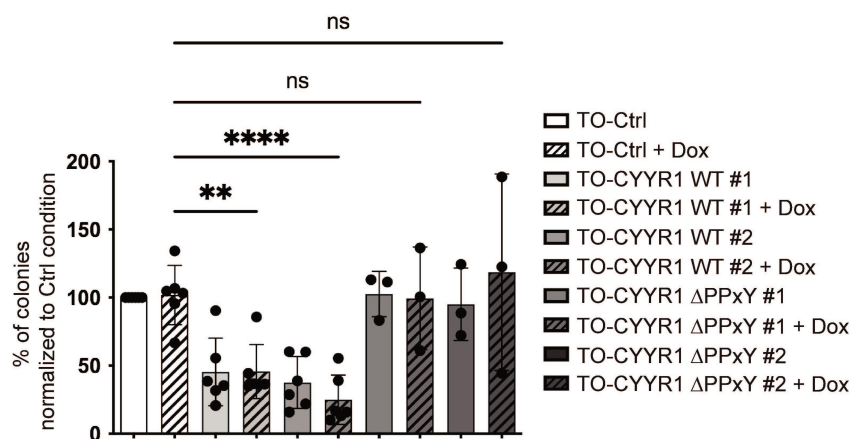
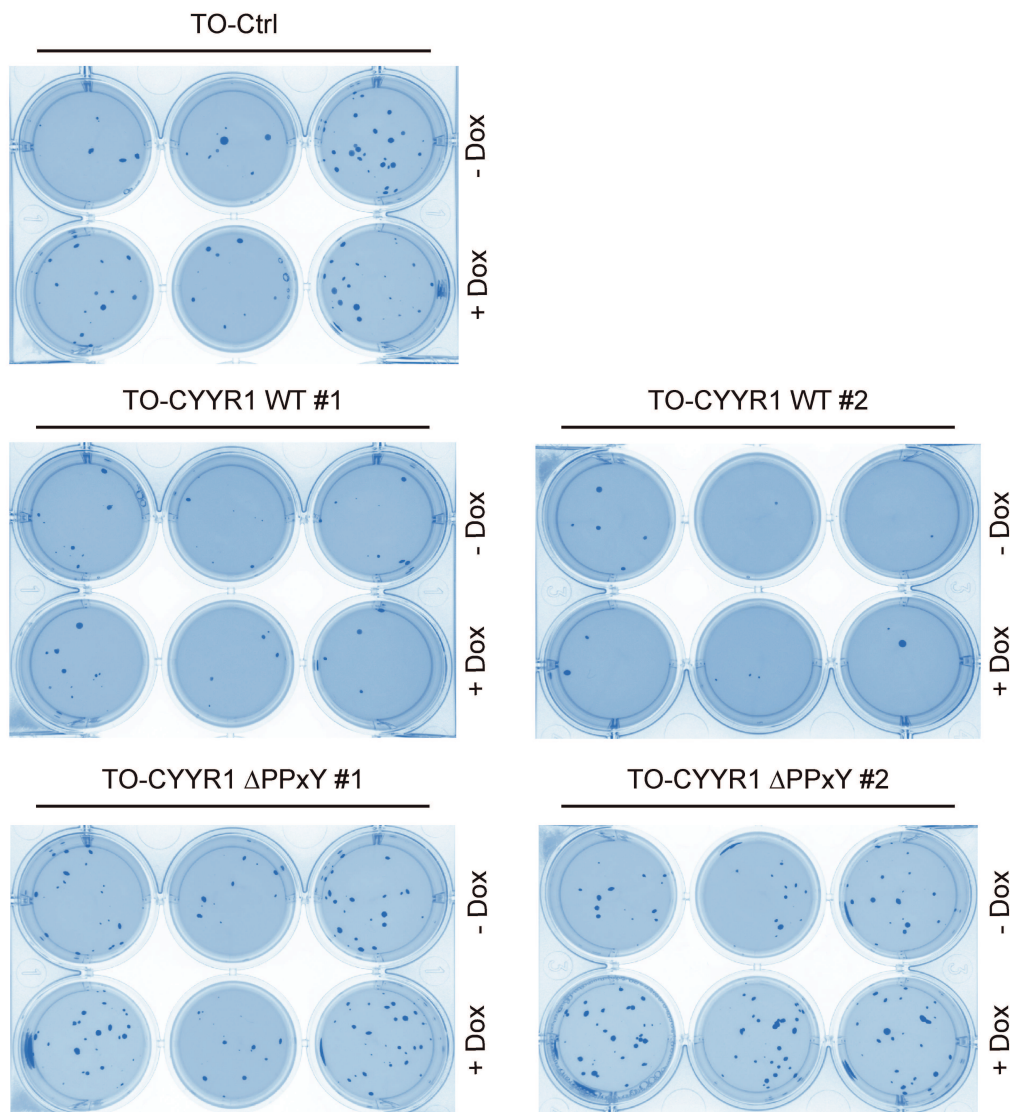
**(A)** MDA-MB-231 cells were transfected with pMEP4-CYYR1-WT or pMEP4-CYYR1- $\Delta$ PPxY before selection with Hygromycin B. Colonies were stained with crystal violet and counted. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA followed by Dunnett's test (Ctrl vs. CYYR1-WT, n=4 ; Ctrl vs. CYYR1- $\Delta$ PPxY, n=3) **(B)** MDA-MB-231 TO-Ctrl, TO-CYYR1-WT or - $\Delta$ PPxY clones were plated for soft agar growth assay in presence or absence of doxycycline. Colonies were stained with Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide coloration and counted. The % of colonies obtained in each condition relative to the TO-Ctrl condition are represented (Ctrl vs. CYYR1-WT, n=6 independent experiments; Ctrl vs. CYYR1- $\Delta$ PPxY, n=3). Statistical analysis was performed with one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

Figure 6

A



B

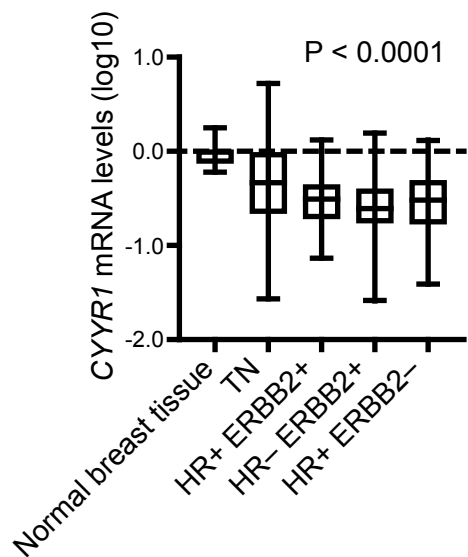


**Figure 7: CYYR1 expression is decreased in breast cancer and associated with beneficial clinical outcome**

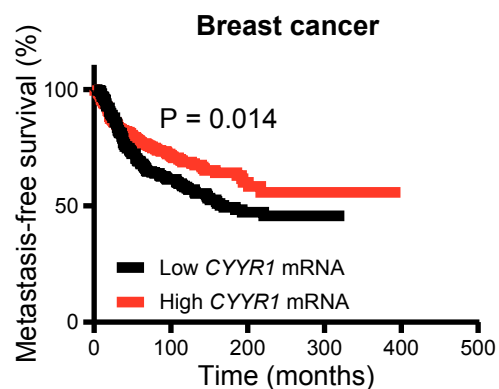
**(A)** Analysis of the mRNA level of *CYYR1* by RT-qPCR on normal breast tissue and four different human breast tumor subtypes, triple-negative breast cancer (TN; HR-ERBB2-), hormone receptor positive/HER2 positive (HR+ ERBB2+), hormone receptor negative/HER2 positive (HR- ERBB2+) and hormone receptor positive/HER2 negative (HR+ ERBB2-) in a cohort of 505 breast cancer patients. P-value was calculated using the Kruskal-Wallis H test **(B)** Kaplan-Meier analysis of metastasis-free survival rates of patients with tumors expressing high (red line) vs. low (black line) levels of *CYYR1* mRNA expression in the same cohort of 505 breast cancer patients. **(C)** mRNA level of *CYYR1* from the KM plotter database in normal breast tissues, breast tumor tissues and metastatic breast tumor tissues. **(D)** Kaplan-Meier analyses of overall survival, relapse-free survival or distant metastasis-free survival according to *CYYR1* mRNA expression in KM plotter database of breast cancer.

Figure 7

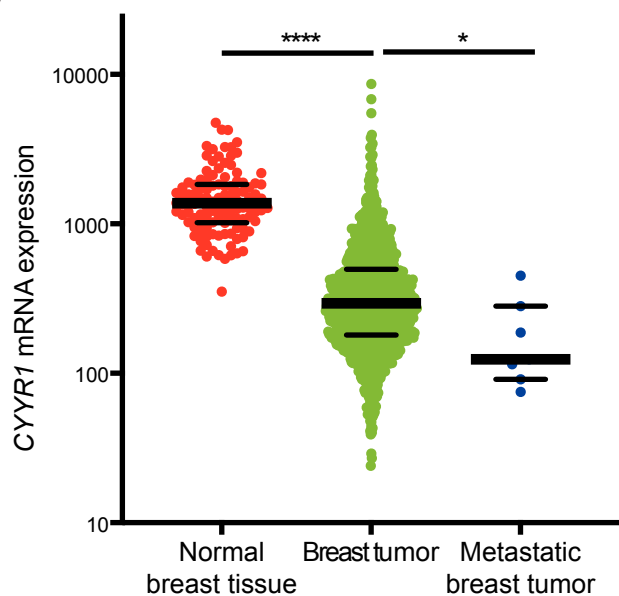
A



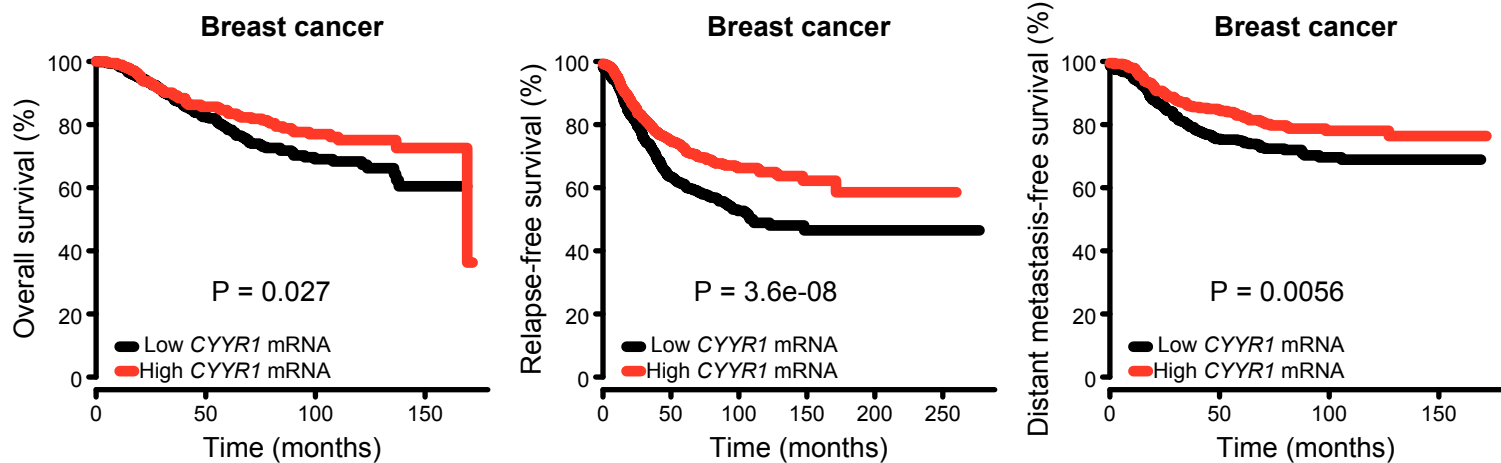
B



C



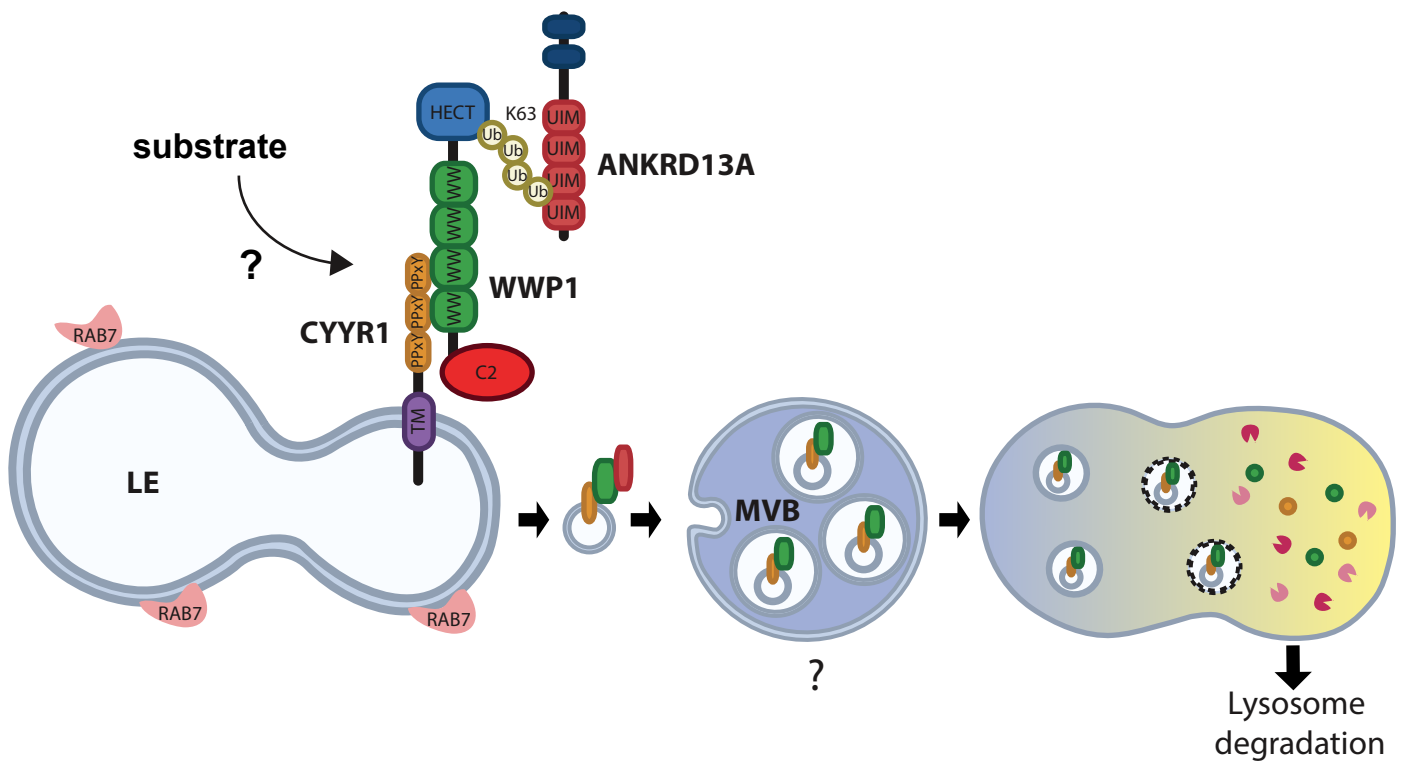
D



**Figure 8: model for lysosome degradation of WWP1 mediated by CYZR1**

CYZR1 localizes at late endosomes where it recruits WWP1 in a PPxY/WW dependent manner. This interaction triggers K63-linked auto-ubiquitination of WWP1 that allows subsequent binding of ANKRD13A in a Ubiquitin/UIM dependent manner. These interactions targets WWP1 toward lysosomal degradation resulting in an overall decrease of WWP1 protein level.

Figure 8





## **SUPPORTING INFORMATIONS**

### **CYYR1 promotes the degradation of the E3 ubiquitin ligase WWP1 and is associated with favorable prognosis in breast cancer**

Tiphaine Perron, Mathieu Boissan, Ivan Bièche, Laura Courtois, Florent Dingli, Damarys Loew, Mouna Chouchène, Sabrina Colasse, Laurence Levy, Céline Prunier

**Figure S1:** CYYR1 interacts with WWP2

**Figure S2:** CYYR1 is ubiquitinated by WWP1 and WWP2 at lysine K154

**Figure S3:** CYYR1 does not affect WWP1 mRNA level

**Figure S4:** CYYR1 regulates WWP2 auto-ubiquitination and protein level

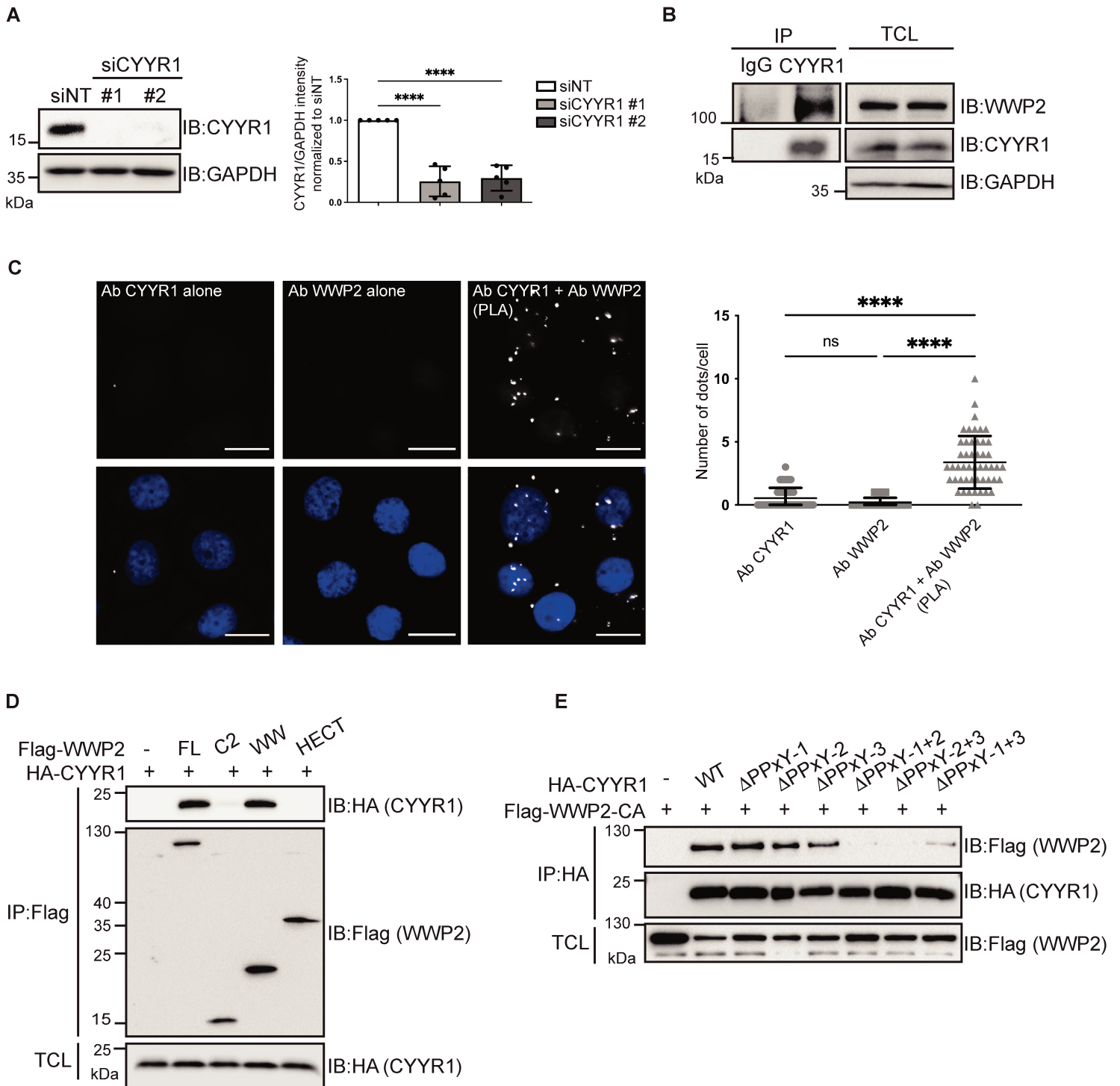
**Figure S5:** Lysosome inhibition attenuates WWP1 degradation induced by CYYR1

**Figure S6:** CYYR1 interacts with ANKRD13A at endogenous level

**Table S1:** List of the differentially enriched proteins in GFP-CYYR1 compared to GFP.

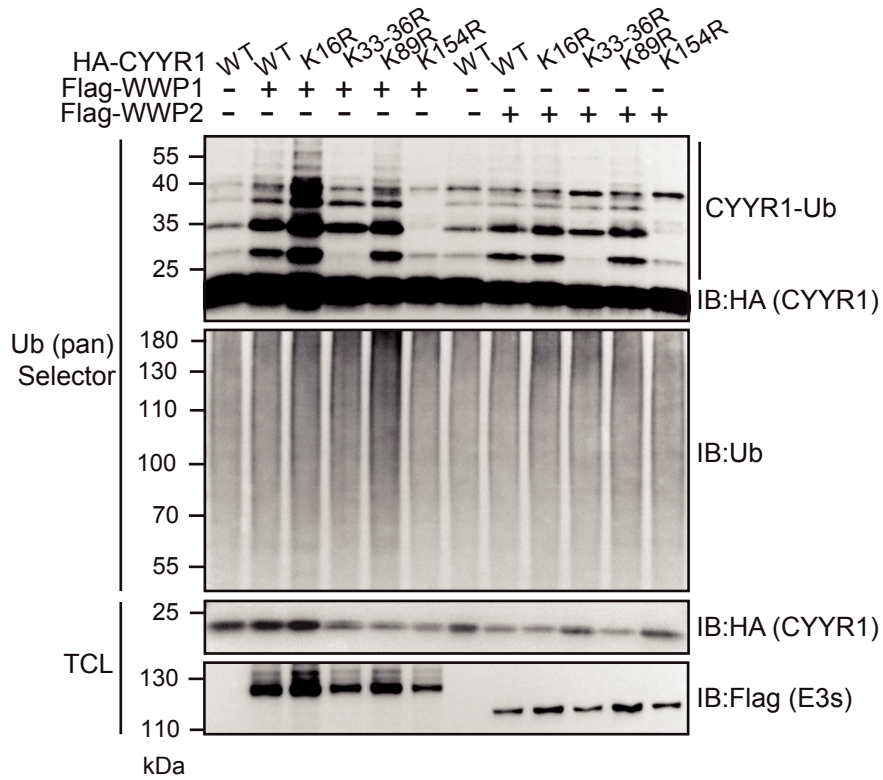
**Table S2:** Histopathological and clinical characteristics of 505 breast cancer patients

# Supplementary Figure Perron et al



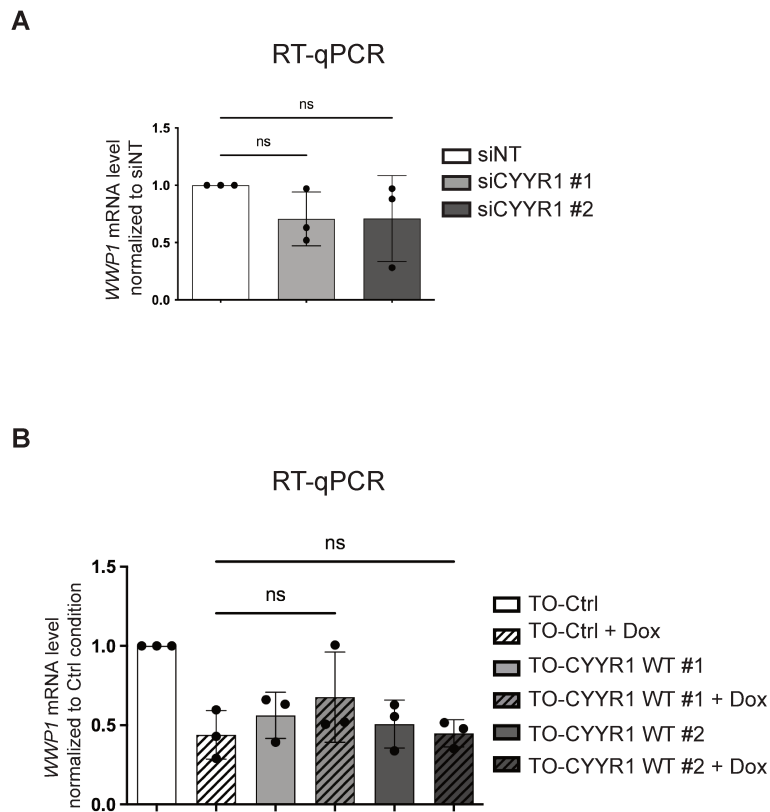
## Figure S1: CYR1 interacts with WWP2

**(A)** CYR1 antibody validation. Protein lysates from MDA-MB-468 cells transfected with a non-target siRNA (siNT) or two independent siRNA targeting CYR1 were analyzed by western-blot with CYR1 antibody and GAPDH as a loading control. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA followed by Dunnett's test on 5 independent experiments. **(B)** CYR1 interacts with WWP2. MDA-MB-468 cell lysate immunoprecipitated with anti-CYR1 or IgG antibody were analyzed by western-blotting as indicated. Western-blotting on total cell lysates (TCL) is shown as a loading control. **(C)** Proximity of CYR1 and WWP2. Proximity Ligation Assay (PLA) experiments were performed in MDA-MB-468 cells in presence of the indicated antibodies. Dapi staining is shown in the lower panel. Bar: 10  $\mu$ m. Statistical analysis of the number of dots/cell was performed on 50 cells of one representative experiment using one-way ANOVA followed by Sidak's test. **(D)** WWP2 Binding domain to CYR1. HEK293 cells were transfected with HA-CYR1 either alone or with full length or domains of Flag-WWP2, as indicated. Cell lysates immunoprecipitated with anti-Flag antibody were analyzed by western-blotting using anti-Flag or anti-HA antibody. Western-blotting on TCL with anti-HA antibody is shown as a transfection control. **(E)** CYR1 binding domain to WWP1. HEK293 cells were transfected with Flag-WWP2-CA either alone or with HA-CYR1- $\Delta$ PPxY mutants, as indicated. Cell lysates immunoprecipitated with anti-HA antibody and TCL were analyzed by western-blotting as indicated.



**Figure S2: CYYR1 is ubiquitinated by WWP1/2 at lysine K154**

HEK293 cells were transfected with HA-CYYR1 wild-type (WT) or HA-CYYR1 KR mutants as indicated, either alone or with Flag-WWP1 or Flag-WWP2. Cell lysates were pulled-down with ubiquitin pan Selector affinity resin and analyzed by western-blotting.

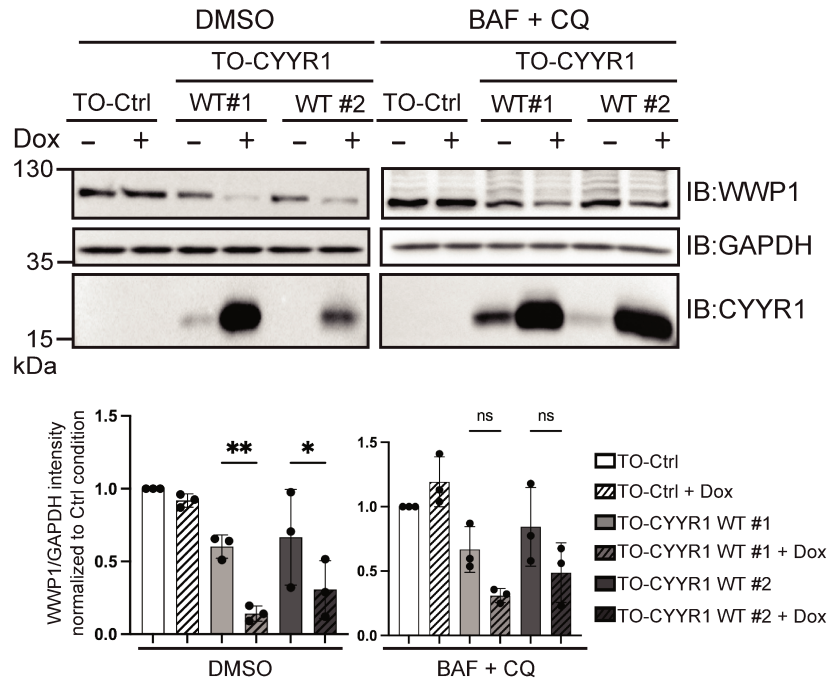


**Figure S3: CYR1 does not affect WWP1 mRNA level**

**(A)** RT-qPCR analysis of *WWP1* mRNA level in MDA-MB-468 transfected with the non-targeting control siRNA (siNT) or two independent siRNA targeting *CYR1* (siCYR1#1 and #2). cDNA were synthesized using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) from RNA extracted with Trizol (Invitrogen). qPCR was performed in triplicate on *WWP1* (primers WWP1-F TGGCATAGCACAACTGGTG, WWP1-R GTCCTTGCTGAAGGCTCTCC) and *GAPDH* (primers GAPDH-F TGCACCACCAACTGCTTAGC, GAPDH-R GGCATGGACTGTGGTCATGAG), using SYBR Green qPCR master mix (Biotools) according to manufacturer's protocol in Quant Studio thermocycler (Fisher Scientific). Expression of *WWP1* was calculated by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method using *GAPDH* as control. All data represent mean  $\pm$  SD for at least three independent experiments, and p-value were calculated with one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

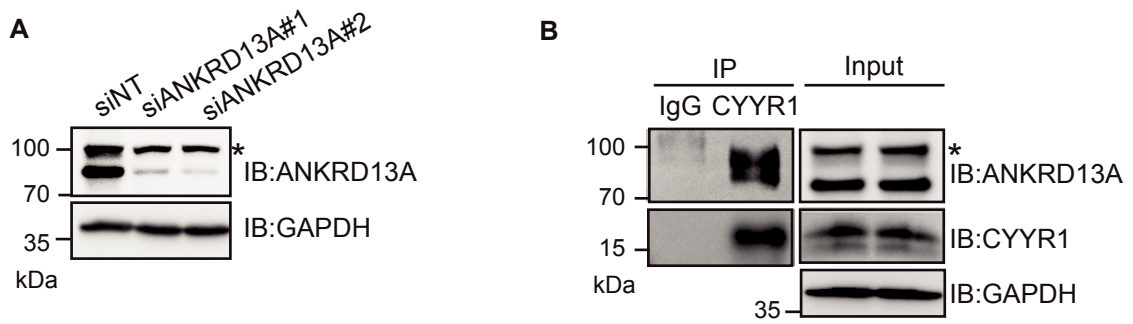
**(B)** RT-qPCR analysis for *WWP1* mRNA level in the MDA-MB-231 control cells (TO-Ctrl) and the two MDA-MB-231 TO-CYR1-WT clones #1 and #2, after 24h treatment or not with 10 ng/mL doxycycline. RT-qPCR analysis was performed as described in A.





**Figure S5: Lysosome inhibition attenuates WWP1 degradation induced by CYR1**

MDA-MB-231 TO-Ctrl or TO-CYR1-WT clones #1 and #2 were treated with Dox and with Bafilomycin A1 (BAF) 100 nM and Chloroquine (CQ) 50  $\mu$ M or DMSO for 24h before lysis and western-blotting with the indicated antibodies. Quantifications of the WWP1 intensity relative to GAPDH in each condition were normalized to the TO-Ctrl-Dox condition and p-values were calculated with one-way ANOVA followed by Sidak's test (n=3).



**Figure S6: CYR1 interacts with ANKRD13A**

**(A)** ANKRD13A antibody validation. Protein lysates from MDA-MB-231 cells transfected with two independent siRNA targeting ANKRD13A were analyzed by western-blotting with ANKRD13A antibody and GAPDH antibody as a loading control. **(B)** CYR1 interacts with ANKRD13A. MDA-MB-468 cell lysate immunoprecipitated with anti-CYR1 or IgG antibody were analyzed by western-blotting using the indicated antibodies. \* indicates a non-specific band.

**Table S1. List of the differentially enriched proteins in GFP-CYYR1 compared to GFP**

13/5039 proteins	Gene & Synonyms	GFP-CYYR1/GFP								Total peptides in set	MW (kDa)	Description	Species
		Ratio	Log2 (Ratio)	Adj. p-value	CV %	Dist. pept. used	Pept. used	Pep. filter	Distrib. pep. in replic.				
O00308	<b>WWP2</b>	1000	1000			19	92	17	17, 17, 20, 19, 19/0, 0, 0, 0, 0	92	98,9	NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase WWP2	Homo sapiens
P13646	KRT13	1000	1000			10	28	3	12, 3, 3, 4, 6/0, 0, 0, 0, 0	28	49,6	Keratin, type I cytoskeletal 13	Homo sapiens
P46379	BAG6,BAT3,G3	1000	1000			3	15	3	3, 3, 3, 3, 3/0, 0, 0, 0, 0	15	119,4	Large proline-rich protein BAG6	Homo sapiens
Q6KB66	KRT80,KB20	1000	1000			4	16	3	3, 3, 3, 3, 4/0, 0, 0, 0, 0	16	50,5	Keratin, type II cytoskeletal 80	Homo sapiens
Q6ZN17	LIN28B,CSDD2	2,44459	1,28959	0,02844	31,536	3	39	4	4, 4, 4, 4, 4/4, 3, 4, 4, 4	40	27,1	Protein lin-28 homolog B	Homo sapiens
Q6ZRV2	FAM83H	1000	1000			4	20	3	3, 3, 3, 3, 3/1, 1, 1, 1, 1	20	127,1	Protein FAM83H	Homo sapiens
Q8IZ07	<b>ANKRD13A,ANKRD13</b>	1000	1000			3	15	3	3, 3, 3, 3, 3/0, 0, 0, 0, 0	15	67,6	Ankyrin repeat domain-containing protein 13A	Homo sapiens
Q8TEP8	CEP192,KIAA1569,PP8407	1000	1000			3	15	3	3, 3, 3, 3, 3/0, 0, 0, 0, 0	15	279,1	Centrosomal protein of 192 kDa	Homo sapiens
Q96HA7	TONSL,IKBR,NFKBIL2	1000	1000			5	21	4	4, 5, 4, 4, 4/0, 0, 0, 0, 0	21	150,9	Tonsoku-like protein	Homo sapiens
Q96J02	<b>ITCH</b>	2,43865	1,28608	4,3E-35	4,8199	12	115	10	12, 13, 13, 10, 12/11, 10, 9, 13, 12	129	102,8	E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog	Homo sapiens
Q96J86	<b>CYYR1,C21orf95</b>	1000	1000			4	35	7	7, 7, 7, 7, 7/0, 0, 0, 0, 0	35	16,6	Cysteine and tyrosine-rich protein 1	Homo sapiens
Q9H0M0	<b>WWP1</b>	1000	1000			23	124	23	23, 23, 25, 26, 27/0, 0, 0, 0, 0	124	105,2	NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase WWP1	Homo sapiens
Q9UI43	MRM2,FJH1,FTSJ2	1000	1000			4	20	3	3, 3, 3, 3, 3/1, 1, 1, 1, 1	20	27,4	rRNA methyltransferase 2, mitochondrial	Homo sapiens

Proteins with a fold change  $\geq 2$ , p-value  $\leq 0.05$  that display at least 3 peptides in each of the 5 replicate experiments have been selected.

Proteins that display no common peptides in the GFP condition (infinite ratio) are indicated with an arbitrary ratio value of 1000.



**Table S2. Histopathological and clinical characteristics of 505 breast cancer patients**

	Number of patients (%)	Number with metastases (%)	p-value <sup>a</sup>
<i>Total</i>	505 (100)	203 (40.2)	
<i>Age</i>			
≤50	119 (23.6)	52 (43.7)	0.49 (NS)
>50	386 (76.4)	151 (39.1)	
<i>SBR histological grade</i> <sup>b, c</sup>			
I	59 (12.0)	12 (20.3)	<b>0.0012</b>
II	230 (46.7)	97 (42.2)	
III	203 (41.3)	91 (44.8)	
<i>Lymph node status</i> <sup>d</sup>			
0	150 (29.9)	47 (31.3)	<b>&lt;0.0001</b>
1-3	243 (48.5)	85 (35.0)	
>3	108 (21.6)	69 (63.9)	
<i>Macroscopic tumor size</i> <sup>e</sup>			
<25mm	239 (48.3)	74 (31.0)	<b>&lt;0.0001</b>
>25mm	256 (51.7)	128 (50.0)	
<i>ERα status</i>			
Negative	171 (33.9)	73 (42.7)	0.14 (NS)
Positive	334 (66.1)	130 (38.9)	
<i>PR status</i>			
Negative	243 (48.1)	105 (43.2)	0.049
Positive	262 (51.9)	98 (37.4)	
<i>ERBB2 status</i>			
Negative	384 (76.0)	151 (39.3)	0.46 (NS)
Positive	121 (24.0)	52 (43.0)	
<i>Molecular subtypes</i>			
HR- ERBB2-	96 (19.0)	37 (38.5)	0.085 (NS)
HR- ERBB2+	68 (13.5)	34 (50.0)	
HR+ ERBB2-	288 (57.0)	114 (39.6)	
HR+ ERBB2+	53 (10.5)	18 (34.0)	
<i>PIK3CA mutation status</i> <sup>f</sup>			
wild type	341 (67.8)	142 (41.6)	0.18 (NS)
Mutated	162 (32.2)	60 (37.0)	

a Log-rank test (500 samples with MFS>6 months). NS: not significant

b Scarff Bloom Richardson

c Information available for 492 patients

d Information available for 501 patients

e Information available for 495 patients

f Information available for 503 patients

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

WWP1 est une E3 ubiquitine ligase régulièrement surexprimée dans de nombreux types de cancers qui régule la fonction et/ou la dégradation de protéines aux propriétés anti-tumorales. Au cours de ma thèse j'ai identifié la protéine CYYR1, qui n'avait jusqu'à maintenant aucune fonction cellulaire connue, comme un nouveau régulateur négatif de WWP1. En effet, j'ai montré que CYYR1 lie WWP1 et induit sa polyubiquitination et sa dégradation lysosomale. De plus, en analysant l'interactome de CYYR1, j'ai identifié que la protéine ANKRD13A est impliquée dans ce processus de dégradation. Bien que mon travail de thèse ait permis d'assigner une fonction à CYYR1 dans la régulation de WWP1, plusieurs questions restent encore en suspens. Notamment, il serait intéressant de comprendre au niveau moléculaire ce qui détermine la spécificité de CYYR1 pour WWP1/2. Un autre point important qui reste à élucider est le rôle joué par l'ubiquitination de la lysine 154 de CYYR1 induite par WWP1/2 que nous avons identifiée. Par ailleurs, notre laboratoire a démontré que WWP1 est un régulateur négatif de la voie de signalisation TGF- $\beta$  en induisant la polyubiquitination et la dégradation du récepteur de type I au TGF- $\beta$  (Courivaud et al., 2015). Il serait donc intéressant d'évaluer les conséquences de la dégradation de WWP1 induite par CYYR1 sur la signalisation TGF- $\beta$ . Enfin, les protéines adaptatrices sont le plus souvent impliquées dans le recrutement des E3 ubiquitine ligases de la famille NEDD4 vers le substrat à ubiquitiner. CYYR1 pourrait donc permettre le ciblage et l'ubiquitination d'un nouveau substrat de WWP1. Nous avons entrepris plusieurs études préliminaires visant à répondre à ces questions qui seront détaillées dans cette partie de discussion des résultats.

### I. CYYR1 peut-elle réguler d'autres E3 ubiquitine ligases ? Comment se fait la spécificité d'interaction ?

Nos premiers résultats nous ont permis de confirmer l'interaction entre CYYR1 et WWP1 dans les cellules de mammifères et d'ouvrir la spécificité de cette interaction à la E3 ubiquitine ligase WWP2 et, dans une moindre mesure, à la E3 ITCH (**Figure 1A article**). Cependant, CYYR1 ne semble pas interagir avec les autres membres de la famille NEDD4 car ils ne sont pas détectés ni dans les expériences d'immunoprécipitation, ni dans l'interactome de CYYR1. Alors que

tous les membres de la famille NEDD4 portent au moins deux domaines WW, nous pouvons nous demander ce qui gouverne cette préférence de CYYR1 pour WWP1/2 et ITCH. Le nombre de domaines WW portés par les E3 ligases pourrait être une explication car WWP1/2 et ITCH portent quatre domaines tandis que SMURF1 et SMURF2 en portent respectivement deux et trois. La délétion individuelle de chaque domaine WW des E3 n'ayant pas été testée, nous pourrions supposer que CYYR1 nécessite la présence des quatre domaines WW pour pouvoir interagir avec la E3. Il faudrait donc également tester l'interaction de CYYR1 avec les E3 NEDD4-1/2 qui portent aussi quatre domaines WW et que nous n'avons pas testées dans nos expériences d'immunoprécipitation. Toutefois, celles-ci n'ont pas été identifiées dans l'interactome de CYYR1, suggérant qu'elles ne présentent pas une interaction aussi forte que WWP1/2. Si le nombre de domaines WW n'est pas la raison de la spécificité d'interaction avec CYYR1, une autre explication à cette spécificité pourrait résider dans le type de repliement auto-inhibiteur que présente la E3 ubiquitine ligase. En effet, plusieurs études ont rapporté que les E3 ubiquitine ligases WWP1/2 et ITCH sont sujettes à un repliement auto-inhibiteur de type WW/HECT tandis que les E3 SMURF1/2 et NEDD4-1 présentent un repliement de type C2/HECT (Mari et al., 2014; Z. Chen et al., 2017; Zhu et al., 2017). Il est donc possible d'envisager que l'accès de CYYR1 aux domaines WW puisse être favorisé dans le contexte structural d'un repliement de type WW/HECT. Une analyse cristallographique de l'interaction entre CYYR1 et WWP1 pourrait permettre de mieux appréhender la compréhension de leur spécificité d'interaction.

## II. Quel est le rôle de l'ubiquitination de CYYR1 ?

Lors de notre étude, nous avons supposé que CYYR1 puisse constituer une nouvelle cible d'ubiquitination pour WWP1/2. Nous avons donc, dans un premier temps, analysé le niveau d'ubiquitination de CYYR1 en présence de WWP1 ou de WWP2 sauvage ou de leur forme mutante catalytiquement inactive. Nos résultats nous ont clairement permis d'observer que WWP1 et WWP2 sont capables d'induire la polyubiquitination en K154 de CYYR1 *via* leur propre activité ubiquitine ligase (**Figure 2A et Figure 2B article**). Nous avons réalisé différentes expériences afin de comprendre la/les conséquence(s) de l'ubiquitination de CYYR1 induite par WWP1/2. Du fait de la discordance entre nos résultats obtenus sur les protéines endogènes et ceux obtenus sur les protéines surexprimées, ces expériences (non

publiées) ne nous ont pas permis d'apporter de conclusions évidentes et vont maintenant être discutées.

#### A. Régulation de la stabilité protéique de CYR1 ?

En conditions de surexpression de HA-CYR1 et des E3 ubiquitine ligases Flag-WWP1 et Flag-WWP2 (F-WWP1 et F-WWP2) dans les cellules HEK293, nous avons clairement pu observer que WWP1 et WWP2 induisent une diminution de la quantité protéique de CYR1 et que cet effet n'est pas observé en présence des formes catalytiquement inactives de WWP1/2 (**Figure 31A**). De plus, nous avons pu confirmer que cet effet est dû à une diminution de la stabilité protéique de CYR1. En effet, le mutant non-ubiquitable K154R de CYR1 présente une stabilité augmentée par rapport à la forme sauvage comme en témoignent nos expériences d'analyse de la demi-vie protéique après inhibition de la traduction causée par un traitement à la cycloheximide (CHX) (**Figure 31B**). Enfin, nous avons aussi observé que l'inhibition du protéasome induite par un traitement des cellules au MG132 bloque la dégradation de HA-CYR1 médiée par Flag-WWP1/2. Cet effet n'est pas observé dans le cas de l'inhibition du lysosome induite par un traitement des cellules à la chloroquine (**Figure 31C**).

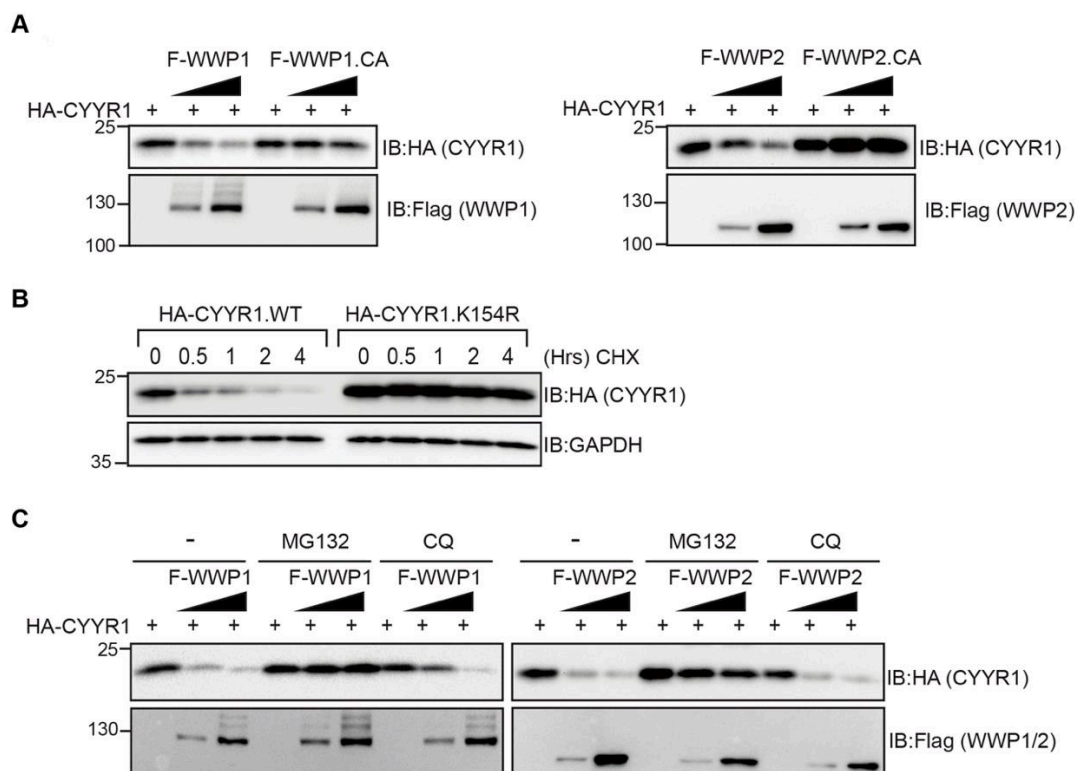


Figure 31 : Flag-WWP1 et Flag-WWP2 induisent une dégradation dépendante du protéasome de HA-CYR1 via leur activité catalytique.

Cependant, nous n'avons pas pu confirmer cet effet de WWP1/2 sur la stabilité de CYYR1 au niveau endogène. En effet, l'extinction des E3 ubiquitine ligases WWP1 et/ou WWP2 par siRNA dans les cellules MDA-MB-468 n'a aucun effet sur le niveau protéique de CYYR1 (**Figure 2D article**). Deux hypothèses peuvent expliquer cette observation. La première serait qu'il nous manque un stimulus qui puisse induire ce mécanisme de régulation de CYYR1 au niveau endogène. Nous avons donc testé différents stimulus, tel que le traitement par le TGF- $\beta$ , l'EGF, l'insuline, des inducteurs de stress du réticulum endoplasmique ou encore des inducteurs de l'autophagie, mais aucun ne nous a permis d'observer une dégradation protéique de CYYR1 endogène médiée par WWP1/2. Une deuxième explication serait que WWP1 et WWP2 ne sont pas capables d'induire l'ubiquitination de CYYR1 endogène dans les cellules MDA-MB-468. Du fait de l'absence de validation d'une possible régulation de la stabilité de CYYR1 par WWP1 au niveau endogène, nous avons décidé de ne pas publier les résultats obtenus en surexpression montrant la régulation de la stabilité protéique de CYYR1 par WWP1/2. Il faudrait, dans le futur, tenter d'identifier de nouvelles lignées exprimant CYYR1 endogène afin de tester à nouveau cette possibilité dans un autre contexte cellulaire.

#### B. Une possible ubiquitination non-dégradative de CYYR1 ?

En admettant que WWP1 et WWP2 sont bien capables d'induire l'ubiquitination de CYYR1 endogène, celle-ci pourrait aussi être non-dégradative. Nous l'avons vu en paragraphe II.A.2, la polyubiquitination non-dégradative permet de réguler la fonction de certaines protéines. Cependant, CYYR1 n'avait jusqu'à ce jour aucune fonction cellulaire connue. Par conséquent, il nous est donc impossible d'étudier l'effet de cette ubiquitination sur la fonction cellulaire de CYYR1. Mes travaux de thèse ont permis d'identifier CYYR1 comme régulateur négatif de WWP1. L'ubiquitination de CYYR1 pourrait alors être impliquée dans ce processus. Cependant, nous avons observé que le mutant non-ubiquitinable K154R de CYYR1 est toujours capable d'induire la polyubiquitination (**Figure 3A article**) et la dégradation (**Figure 3B article**) de WWP1 suggérant que l'ubiquitination de CYYR1 n'est pas nécessaire à la régulation de la stabilité protéique de WWP1. De ce fait, le rôle potentiel de l'ubiquitination de CYYR1 sur une autre fonction cellulaire inconnue reste encore à éclaircir.

### III. Investigation des conséquences de la régulation de WWP1 induite par CYYR1 sur la voie de signalisation TGF- $\beta$

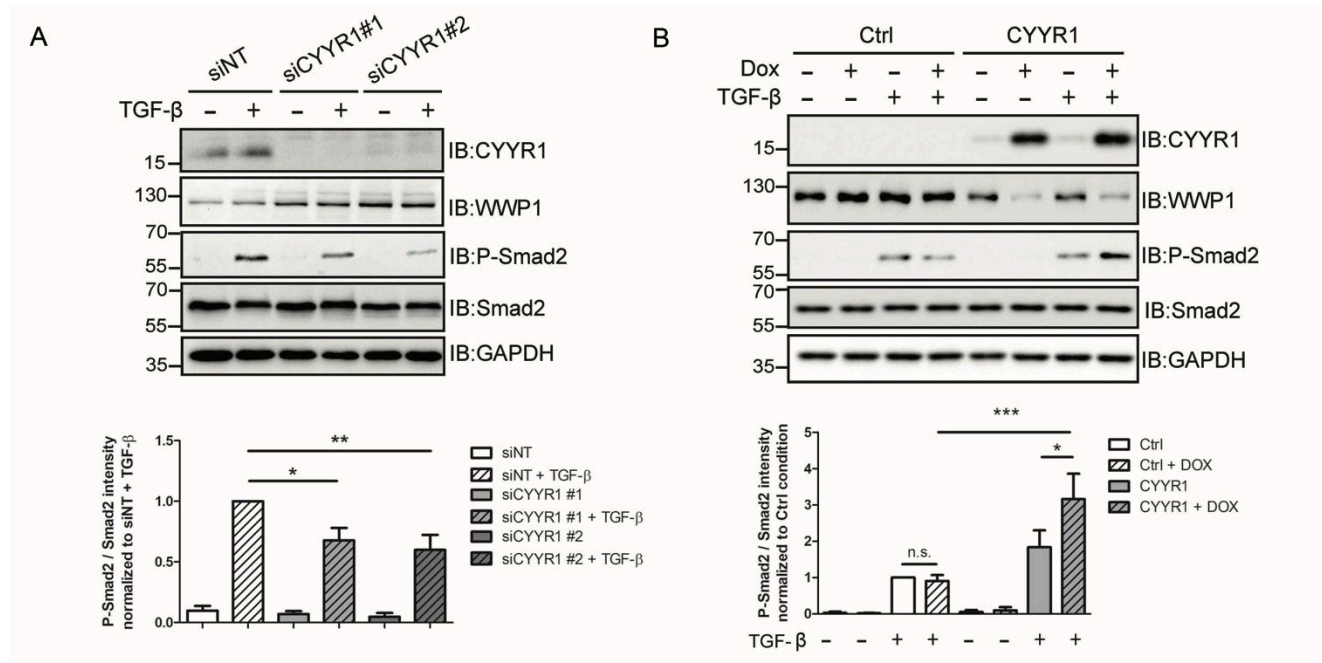
Notre laboratoire s'intéresse depuis longtemps à la voie de signalisation TGF- $\beta$ . A partir d'un crible double hybride réalisé chez la levure utilisant SMAD7 comme appât, notre laboratoire a notamment démontré que WWP1 agit comme un régulateur négatif de voie du TGF- $\beta$  en dégradant le récepteur T $\beta$ RI *via* son association avec l'adaptateur SMAD7 (Seo et al., 2004; Courivaud et al., 2015). Nous avons donc cherché à déterminer si CYYR1, *via* sa capacité à réguler WWP1, pouvait également impacter la régulation de la voie TGF- $\beta$ .

La voie de signalisation du TGF- $\beta$  joue un rôle crucial dans le développement embryonnaire et dans le maintien de l'homéostasie tissulaire en modulant l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, l'apoptose, la migration et l'invasion cellulaire mais aussi dans la réponse immunitaire. De ce fait, la dérégulation de la voie TGF- $\beta$  peut être impliquée dans la tumorigenèse (Massagué, 2008).

La voie de signalisation canonique du TGF- $\beta$  débute par la liaison de la cytokine TGF- $\beta$  à ses deux récepteurs cellulaires à activité kinase T $\beta$ RI et T $\beta$ RII, ce qui conduit à la phosphorylation du récepteur T $\beta$ RI qui va alors phosphoryler les protéines Smad2 et Smad3. Une fois phosphorylées, Smad2/3 s'associent à la protéine Smad4 pour former un complexe de transcription hétéro-trimérique qui est transloqué dans le noyau où il régule l'expression des gènes cibles du TGF- $\beta$ . La capacité du complexe Smad2/3-Smad4 à réguler la transcription d'un gène en réponse au TGF- $\beta$  dépend de son interaction avec des coactivateurs transcriptionnels tels que BCP/p300 ou bien des corépresseurs tels que SnoN/Ski (Massagué, 2008).

Dans un premier temps nous avons testé l'effet de la déplétion de CYYR1 par siRNA dans les cellules MDA-MB-468 sur la phosphorylation de Smad2 (P-Smad2) après 1h de stimulation des cellules au TGF- $\beta$ . Nous avons observé qu'en parallèle de l'augmentation du niveau protéique de WWP1, la déplétion de CYYR1 induit une diminution de la quantité de Smad2 phosphorylée en réponse au TGF- $\beta$  (**Figure 32A**). Réciproquement, dans les cellules inductibles MDA-MB-231 TO-CYYR1-WT#1, l'expression de CYYR1 induite par un traitement à la doxycycline, augmente le niveau de Smad2 phosphorylée en réponse à un traitement des cellules au TGF- $\beta$ . Ceci, également corrélé à une diminution protéique de la E3

WWP1 (**Figure 32B**). Cet effet a pu être observé dans les deux clones MDA-MB-231 TO-CYYR1-WT (données non montrées). Ensemble, ces résultats suggèrent que CYYR1, *via* l'induction de la dégradation de WWP1, favorise la signalisation TGF- $\beta$  en augmentant la phosphorylation de l'effecteur Smad2.



*Figure 32 : CYYR1 favorise la phosphorylation de SMAD2, effecteur de la voie de signalisation TGF- $\beta$ .*

Cependant, ces résultats n'ont pas pu être confirmés à l'échelle transcriptionnelle. En effet, ni le système CAGA-Luciférase, qui permet d'étudier la réponse transcriptionnelle des cellules à une stimulation au TGF- $\beta$ , ni l'étude par RT-qPCR des gènes cibles du TGF- $\beta$ , ne nous a pas permis de confirmer l'effet inhibiteur de WWP1 sur la voie de signalisation du TGF- $\beta$ . Nous ne pouvions donc pas étudier les conséquences de l'expression de CYYR1 sur l'inhibition de la voie TGF- $\beta$  médiée par WWP1. Une mise au point approfondie des conditions expérimentales sera nécessaire pour permettre de confirmer l'effet de CYYR1 sur la E3 ubiquitine ligase WWP1 dans la voie de signalisation du TGF- $\beta$ .

Par ailleurs, il serait également intéressant d'étudier le niveau d'ubiquitination du T $\beta$ RI activé en présence, ou non, de CYYR1. Ceci nous permettrait de confirmer que la dégradation protéique de WWP1 induite par CYYR1 conduit bien à une diminution de l'ubiquitination du récepteur et donc à une augmentation de sa stabilité protéique justifiant l'augmentation de la phosphorylation de Smad2 observée en présence de CYYR1.

## IV. CYR1 peut-elle être un adaptateur pour WWP1 ?

Les protéines adaptatrices qui stimulent l'activité ubiquitine ligase des E3 de la famille NEDD4 sont le plus souvent connues pour permettre le recrutement et l'ubiquitination d'un substrat (voir introduction paragraphe VI.C). Nous avons donc cherché à savoir si, avant d'induire la dégradation de WWP1, CYR1 pouvait également permettre l'ubiquitination de nouveaux substrats de WWP1.

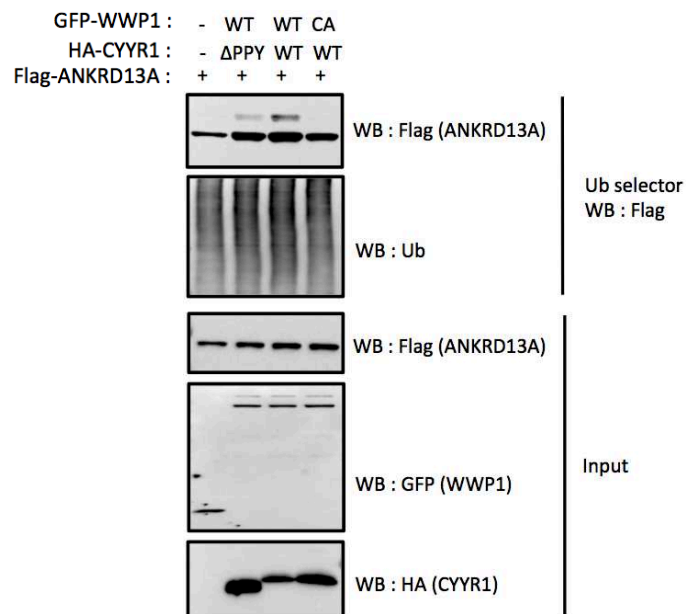
Pour rechercher ces substrats potentiels, nous avons réalisé l'interactome de CYR1 en réalisant une purification GFP-Trap des constructions GFP et GFP-CYR1 dans les cellules HEK293 suivie d'une analyse par spectrométrie de masse (**Figure 5A article**). La comparaison des deux interactomes obtenus nous a permis d'identifier des partenaires moléculaires potentiels de CYR1 qui pourraient être des cibles de l'activité ubiquitine ligase de WWP1. Parmi les partenaires spécifiques de GFP-CYR1 identifiés, nous nous sommes particulièrement intéressés aux protéines ANKRD13 et à MAGI1/3.

### A. ANKRD13A comme substrat ubiquitiné par WWP1

Comme vu en paragraphe VIII.A, ANKRD13A est une protéine à domaines UIM qui est localisée au niveau des endosomes tardifs où elle peut lier l'EGFR ainsi que la CAV-1 polyubiquitinés en chaîne K63 pour médier leur routage vers la voie endolysosomale. Nous avons montré que ANKRD13A lie le complexe CYR1/WWP1 *via* son domaine UIM, et que cette interaction est impliquée dans le mécanisme de dégradation de WWP1 (**Figure 5 article**). Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que ANKRD13A puisse également constituer un substrat de l'activité ubiquitine ligase de WWP1 en présence de CYR1. En effet, une étude réalisée par Simona Polo et ses collègues a démontré que des protéines endocytiques à domaine UIM telles que Eps15 et Epsin1 sont monoubiquitinées et que cette ubiquitination est dépendante des domaines UIM. Plus précisément, c'est la E3 ubiquitine ligase NEDD4-1 qui, une fois ubiquitinée, se lie aux domaines UIM des protéines adaptatrices pour induire leur monoubiquitination (Polo et al., 2002; Woelk et al., 2006). De plus, les travaux menés par Masayuki Komada visant à définir la fonction cellulaire de ANKRD13A ont aussi observé que cette protéine à domaine UIM est monoubiquitinée de façon dépendante de son motif



d'interaction à l'ubiquitine, et que cette monoubiquitination module la fonction de ANKRD13A (Tanno et al., 2012). Nous nous sommes donc demandés si WWP1, par l'intermédiaire de CYYR1, ne pouvait pas être une E3 ubiquitine ligase pour la monoubiquitination de ANKRD13A. Pour tester cette hypothèse, nous avons analysé le niveau d'ubiquitination de ANKRD13A en présence, ou non, de différentes constructions de CYYR1 et de WWP1. Nous avons observé que WWP1 semble bien capable d'induire la monoubiquitination de ANKRD13A *via* sa propre activité catalytique et que cette ubiquitination semble être augmentée en présence de CYYR1 WT (**Figure 33**). Nous pourrions donc émettre l'hypothèse que CYYR1, *via* l'induction de la polyubiquitination de WWP1, permet le recrutement de ANKRD13A par ses domaines UIM pour en induire sa monoubiquitination et ainsi réguler sa fonction cellulaire. Toutefois, nous n'avons pas pu confirmer la monoubiquitination de ANKRD13A induite par WWP1 et dépendante de CYYR1 à l'état endogène dans les cellules MDA-MB-468 ni démontrer les conséquences de cette modification sur la fonction cellulaire de ANKRD13A. De futures investigations sont donc nécessaires pour décrypter ce potentiel mécanisme de régulation de la protéine ANKRD13A.



*Figure 33 : CYYR1 semble favoriser la monoubiquitination de ANKRD13A induite par WWP1.*

## B. MAGI3 et MAGI1 comme substrats potentiels de WWP1

L'analyse de l'interactome de CYYR1 nous a également permis d'identifier un autre interactant intéressant de GFP-CYYR1, la protéine MAGI1 (ainsi que MAGI3, données non-montrées). MAGI1 et MAGI3 étant des protéines d'échafaudage impliquées dans le maintien des jonctions cellule-cellule. Nous avons observé que MAGI1 lie le complexe CYYR1/WWP1 de façon dépendante des motifs PY de CYYR1 et de façon indépendante de l'activité ubiquitine ligase de WWP1 (**Figure 34A**). Ceci suppose l'existence d'un complexe CYYR1/WWP1/MAGI1. La même observation a été faite avec WWP2 (données non-montrées). Nous avons également constaté que l'extinction de CYYR1 (**Figure 34B**), de WWP1 ou de WWP2 (**Figure 34C**) par siRNA dans les cellules MDA-MB-468 peut induire une augmentation du niveau protéique de MAGI1. D'après ces observations nous pourrions émettre l'hypothèse que CYYR1 sert d'adaptateur pour l'ubiquitination et la dégradation protéique de MAGI1. Cependant, l'absence de preuve d'ubiquitination de MAGI1 ainsi que des difficultés à reproduire l'accumulation protéique de MAGI1 dans des conditions extinction de CYYR1 et/ou de WWP1/2 ne nous a pas permis de définir avec confiance un nouveau mécanisme de régulation de MAGI1 par le complexe WWP1/CYYR1.

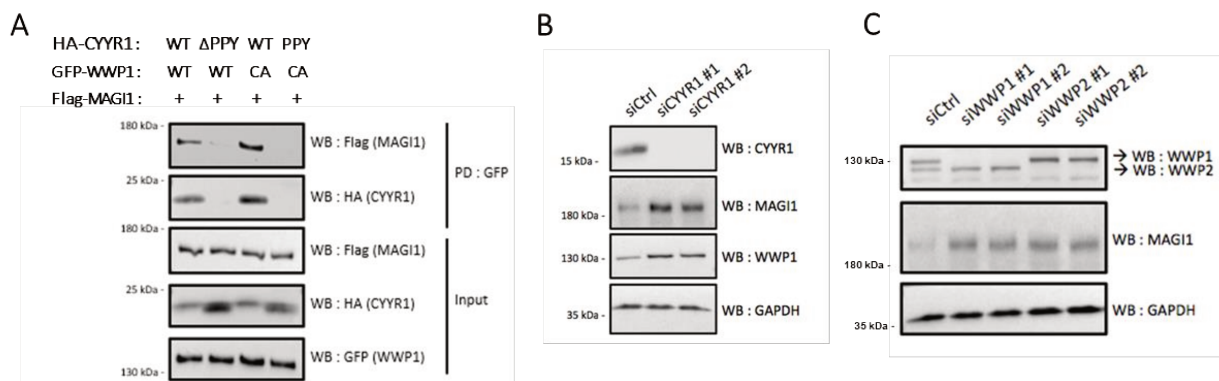


Figure 34 : CYYR1 et WWP1/2 pourraient être des régulateurs de MAGI1.

## V. L'expression et le rôle de CYYR1 dans la tumorigenèse

L'étude du niveau d'ARNm de *CYYR1* dans les cancers mammaires nous a permis de mettre en évidence une diminution significative de l'expression de *CYYR1* dans les cancers mammaires, quel que soit le sous-type de la tumeur, comparé au tissu mammaire sain. Cette diminution de l'expression de *CYYR1* est corrélée à un mauvais pronostic défini par un plus haut risque de

rechute, de développement de métastases ainsi qu'une diminution du taux de survie (**Figure 7 article**). Dans l'éventualité de cibler la perte d'expression de *CYYR1* dans le traitement des cancers mammaires il serait intéressant de décrire le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) conduisant à cette diminution d'expression lors de la tumorigenèse. La recherche du promoteur de *CYYR1* ainsi que l'identification des facteurs de transcription et des co-facteurs mis en jeu dans la régulation de l'expression de *CYYR1* pourraient révéler des informations cruciales dans la compréhension de ce(s) mécanisme(s).

Également, il serait intéressant de poursuivre l'étude de l'effet de CYYR1 sur la croissance cellulaire et de vérifier si cet effet de CYYR1, qui est dépendant de ses motifs PY, passe uniquement par la régulation du niveau protéique de WWP1 ou si CYYR1 agit par un/des autre(s) mécanisme(s) cellulaire(s) qui n'est/ne sont pas encore décrit(s).

A terme, la compréhension complète de la fonction cellulaire de CYYR1 ainsi que des mécanismes permettant la régulation de son expression nous permettront de mieux comprendre le rôle physiologique de CYYR1 dans la cellule ainsi que d'ouvrir de nouvelles possibilités thérapeutiques, notamment *via* le ciblage de la E3 ubiquitine ligase WWP1 lors de la tumorigenèse mammaire.

## ANNEXE

### Article 2 : Quantitative Ubiquitylome Analysis Reveals the Specificity of RNF111/Arkadia E3 Ubiquitin Ligase for its Degradative Substrates SKI and SKIL/SnoN in TGF- $\beta$ Signaling Pathway

La signalisation TGF- $\beta$  est régulée par certaines E3 ubiquitine ligases de la famille NEDD4, telles que SMURF1/2 et WWP1 (voir introduction, paragraphe I.A.3 et discussion paragraphe **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). En plus de WWP1, le laboratoire s'intéresse également à une E3 ubiquitine ligase à domaine RING, RNF111/Arkadia, qui active la voie de signalisation TGF- $\beta$  en induisant l'ubiquitination et la dégradation des répresseurs transcriptionnels SnoN et Ski, permettant ainsi l'activation de la transcription des gènes cibles du TGF- $\beta$  (Levy et al., 2007). Des mutations du domaine catalytique RING d'Arkadia ont été identifiées dans plusieurs types de cancers. Certaines de ces mutations conduisent à l'expression d'une forme tronquée d'Arkadia qui est déletée de son domaine RING C-terminal conduisant donc à la perte de son activité E3 ubiquitine ligase. Dans la lignée cellulaire de cancer du poumon NCI-H460 présentant une telle mutation, Arkadia est incapable d'induire la dégradation des répresseurs SnoN/Ski en réponse au TGF- $\beta$  ce qui a pour conséquence d'inhiber la voie de signalisation TGF- $\beta$  (Levy et al., 2007; Briones-Orta et al., 2013).

En plus de mon projet de thèse principal, j'ai également participé à un projet de recherche mené par Laurence Levy au sein du laboratoire qui visait à identifier de nouveaux substrats ubiquitinés et dégradés par la E3 ubiquitine ligase RNF111/Arkadia en réponse à une stimulation au TGF- $\beta$ .

Pour cela, deux lignées CRISPR (U2OS-Arkadia-RING-KO) dérivées des cellules d'ostéosarcomes U2OS ont été générées de sorte à ce qu'elles expriment une forme mutée d'Arkadia déletée de son domaine d'activité RING qui mime les mutations de troncation d'Arkadia observées dans les cancers et qui sont donc dépourvues de l'activité E3 ubiquitine ligase d'Arkadia. Une analyse par spectrométrie de masse a été réalisée pour comparer le protéome après stimulation au TGF- $\beta$  de la lignée parentale U2OS avec ceux des deux lignées U2OS-Arkadia-RING-KO. Cette analyse a permis d'identifier 52 candidats dont le niveau protéique est significativement accumulé dans les deux lignées U2OS-Arkadia-RING-KO par rapport à la lignée parentale U2OS, et qui constituent donc des substrats dégradatifs potentiels

de l'activité E3 ubiquitine ligase d'Arkadia. Nous nous sommes intéressés à trois de ces substrats dégradatifs potentiels : GDF-15 (Growth Differentiation Factor 15), de FABP3 (Fatty Acid-Binding Protein 3) et de l'enzyme Kynu (Kinureninase).

J'ai validé par western blot que le niveau de ces trois protéines était augmenté dans les lignées U2OS-Arkadia-RING-KO par rapport à la lignée parentale U2OS. J'ai, de plus, montré que cet effet était indépendant de l'activation de la voie TGF- $\beta$ . En utilisant une approche orthogonale avec des siRNA ciblant Arkadia, j'ai montré que la déplétion d'Arkadia dans les cellules U2OS conduit également à une accumulation de la protéine GDF-15, mais n'a pas d'effet sur les niveaux protéiques de FABP3 et de Kynu. Ceci suggérait que GDF-15 pouvait constituer un nouveau substrat potentiel pour Arkadia. Pour tester cette hypothèse, j'ai réalisé des analyses par RT-qPCR afin de quantifier le niveau d'expression des gènes codant pour GDF-15, FABP3 et Kynu dans les lignées U2OS-Arkadia-RING-KO par rapport à la lignée parentale U2OS. Cette analyse a révélé que les niveaux d'ARNm de GDF-15, FABP3 et Kynu sont également augmentés dans les deux lignées U2OS-Arkadia-RING-KO. Ceci nous a conduit à conclure qu'Arkadia ne régule pas la stabilité des protéines GDF-15, FABP3 et Kynu, mais régule le niveau d'expression des gènes codant pour ces protéines. Ces résultats ont été inclus dans une publication réalisée par Laurence Levy et ses collaborateurs qui démontre qu'Arkadia présente une grande spécificité pour ses substrats SnoN et Ski dans l'ubiquitination dégradative médiée par Arkadia en réponse au TGF- $\beta$ .

# Quantitative Ubiquitylome Analysis Reveals the Specificity of RNF111/Arkadia E3 Ubiquitin Ligase for its Degradative Substrates SKI and SKIL/SnoN in TGF- $\beta$ Signaling Pathway

## Authors

Victor Laigle, Florent Dingli, Sadek Amhaz, Tiphaine Perron, Mouna Chouchène, Sabrina Colasse, Isabelle Petit, Patrick Pouillet, Damarys Loew, Céline Prunier, and Laurence Levy

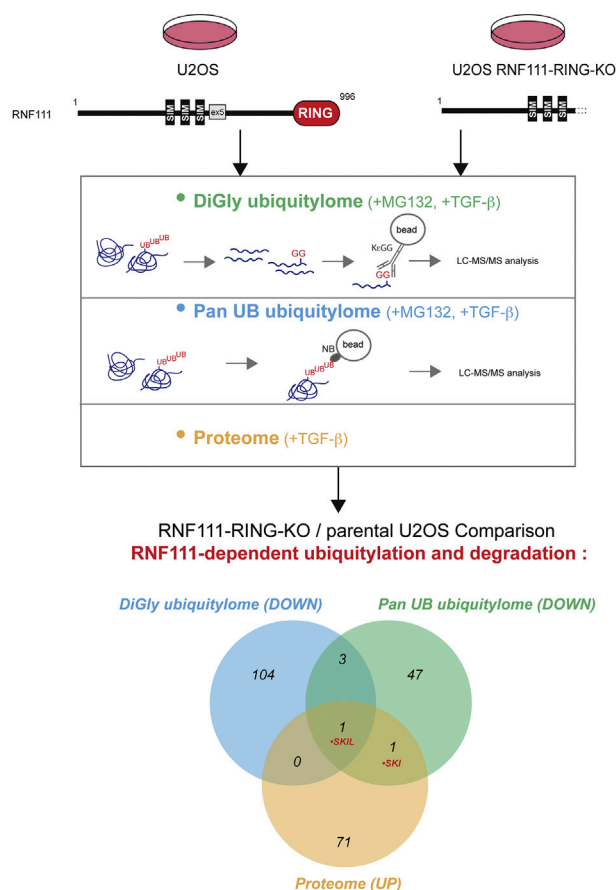
## Correspondence

[laurence.levy@inserm.fr](mailto:laurence.levy@inserm.fr)

## In Brief

In this study, we aimed to identify exhaustively the substrates of the E3 ubiquitin ligase RNF111 that activates TGF- $\beta$  signaling. We performed quantitative ubiquitylome comparison of parental U2OS cells with CRISPR modified clones that express a truncated RNF111 devoid of RING domain using two approaches based on the enrichment of ubiquitylated proteins. Integrative proteomics comparison of ubiquitylome and proteome identifies SKI and SKIL as the only targets ubiquitylated and degraded by RNF111 upon TGF- $\beta$  stimulation.

## Graphical Abstract



## Highlights

- Identification of the endogenous RNF111 ubiquitylated substrates.
- A new powerful method to profile protein ubiquitylation using pan UB nanobody.
- Lysine K343 as a target for RNF111 ubiquitylation.
- SKI and SKIL are the only identified RNF111 degradative targets in TGF- $\beta$  signaling.

# Quantitative Ubiquitylome Analysis Reveals the Specificity of RNF111/Arkadia E3 Ubiquitin Ligase for its Degradative Substrates SKI and SKIL/SnoN in TGF- $\beta$ Signaling Pathway

Victor Laigle<sup>1</sup> , Florent Dingli<sup>1</sup>, Sadek Amhaz<sup>2</sup>, Tiphaine Perron<sup>2</sup>, Mouna Chouchène<sup>2</sup>, Sabrina Colasse<sup>2</sup>, Isabelle Petit<sup>2</sup> , Patrick Poulet<sup>3</sup> , Damarys Loew<sup>1</sup> , Céline Prunier<sup>2</sup> , and Laurence Levy<sup>2,\*</sup> 

RNF111/Arkadia is an E3 ubiquitin ligase that activates the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) pathway by degrading transcriptional repressors SKIL/SnoN and SKI. Truncations of the RING C-terminal domain of RNF111 that abolish its E3 function and subsequently activate TGF- $\beta$  signaling are observed in some cancers. In the present study, we sought to perform a comprehensive analysis of RNF111 endogenous substrates upon TGF- $\beta$  signaling activation using an integrative proteomic approach. In that aim, we carried out label-free quantitative proteomics after the enrichment of ubiquitylated proteins (ubiquitylome) in parental U2OS cell line compared with U2OS CRISPR engineered clones expressing a truncated form of RNF111 devoid of its C-terminal RING domain. We compared two methods of enrichment for ubiquitylated proteins before proteomics analysis by mass spectrometry, the diGlycine (diGly) remnant peptide immunoprecipitation with a K- $\epsilon$ -GG antibody, and a novel approach using protein immunoprecipitation with a ubiquitin pan nanobody that recognizes all ubiquitin chains and monoubiquitylation. Although we detected SKIL ubiquitylation among 108 potential RNF111 substrates with the diGly method, we found that the ubiquitin pan nanobody method also constitutes a powerful approach because it enabled the detection of 52 potential RNF111 substrates including SKI, SKIL, and RNF111. Integrative comparison of the RNF111-dependent proteome and ubiquitylomes enabled the identification of SKI and SKIL as the only targets ubiquitylated and degraded by RNF111 E3 ligase function in the presence of TGF- $\beta$ . Our results indicate that lysine 343 localized in the SAND domain of SKIL constitutes a target for RNF111 ubiquitylation and demonstrate that RNF111 E3 ubiquitin ligase function specifically targets SKI and SKIL ubiquitylation and degradation upon TGF- $\beta$  pathway activation.

The ubiquitin-proteasome system plays an important role in the regulation of many cellular signaling pathways by controlling protein stability. The ubiquitin-proteasome system involves ubiquitylation of proteins by E3 ubiquitin ligases that allows covalent attachment of the ubiquitin protein to a lysine residue on specific substrates, in cooperation with an E1-activating enzyme and an E2-conjugating enzyme. Polyubiquitylation can occur by polymerization of the ubiquitin molecules *via* one of its seven lysine residues (K6, K11, K27, K29, K33, K48, and K63) or its N-terminal methionine (M1), which generates as many different polyubiquitin linkages (1). This ubiquitylation code leads to distinct biochemical outcomes for the substrate, and it is admitted that only K48 polyubiquitylation, and to a lesser extent K11 polyubiquitylation, drive substrates toward degradation by the proteasome.

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) pathway plays an important role in embryonic development and in tumor progression by inducing a large panel of target genes involved in cell cycle arrest, epithelial-mesenchymal transition, and cell migration mainly through activation of the SMAD2/3–SMAD4 transcription complex. The TGF- $\beta$  signaling pathway is highly regulated by various E3 ubiquitin ligases such as SMURF1/2, TRIM33, WWP1, and RNF111 (also named Arkadia [ring finger protein 111]) (2, 3). We and others have found that RNF111 harbors a C-terminal RING domain required for its E3 ubiquitin ligase function that activates SMAD-dependent transcription in response to TGF- $\beta$  by inducing degradation of SKI and SKIL (also named SnoN) transcriptional repressors (4–6). Although the RNF111-dependent SKI and SKIL degradation induced by TGF- $\beta$  is clearly established, the mechanism for this inducible degradation is still puzzling, in particular the ubiquitylation

From the <sup>1</sup>Institut Curie, PSL Research University, Laboratoire de Spectrométrie de Masse Protéomique, Paris, France; <sup>2</sup>Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, Paris, France; <sup>3</sup>Institut Curie, PSL Research University, INSERM U900, Paris, France  
\*For correspondence: [laurence.levy@inserm.fr](mailto:laurence.levy@inserm.fr).

events that underlie this degradation. RNF111 has also been reported to regulate the stability of SMAD7, an inhibitor of TGF- $\beta$  signaling that acts at the TGF- $\beta$  receptor level (7). Mutations that disrupt the C-terminal RING domain of RNF111 can occur in cancer (8), and we have shown that the NCI-H460 lung cancer cell line exhibits a S432\* nonsense mutation that leads to the expression of a truncated form of RNF111 lacking its C-terminal RING domain. Such truncation abolishes SKI and SKIL degradation and subsequent SMAD-dependent transcription in response to TGF- $\beta$  in this cancer cell line (9).

Although RNF111 has mainly been involved in the activation of TGF- $\beta$  signaling, its E3 ubiquitin ligase function is not restricted to this pathway. RNF111 also contains 3 small ubiquitin-like modifier interacting motifs in its N-terminal region which confer to RNF111 small ubiquitin-like modifier-targeted ubiquitin ligase function involved in promyelocytic leukemia degradation in response to arsenic treatment (10) and in xeroderma pigmentosum ubiquitylation during DNA damage repair induced by UV (11). It has also been proposed that RNF111 is involved in Histone H4 neddylation during DNA damage repair induced by ionizing radiation (12) and in endocytosis by targeting the micro2 subunit of Clathrin adapter 2 complex (13). Hence, RNF111, like most E3 ligases, might target different substrates involved in different biological processes. However, all these substrates were characterized by protein interaction approaches, which are not the most relevant considering that E3 ubiquitin ligases interaction with their substrates tend to be labile and could lead to substrate degradation. Moreover, in most studies, ubiquitylation was detected by the overexpression of RNF111 and ubiquitin, which could lead to forced ubiquitylation. To prevent such biases, in the present study, we have sought to use an endogenous approach to comprehensively identify the substrates of RNF111. Because it represents a small proportion of a protein pool in the cell, the ubiquitylated proteins can be challenging to detect at the endogenous level. However, in the past years, different methods of enrichment for ubiquitylated proteins have been developed that allow profiling of ubiquitylated proteins by mass spectrometry (ubiquitylome) (14–16). The breakthrough came with the use of K- $\epsilon$ -GG antibody that immunoprecipitates the di-glycin (diGly) remnant peptides obtained after trypsin digestion of the ubiquitin linked to its targeted lysine on a substrate (17, 18). Yet, this method requires a large amount of starting material because it only focuses on specific peptides at ubiquitylation sites and not the whole proteins. Thus, the development of alternative approaches is still needed to increase sensitivity and to simplify ubiquitylome analysis.

In order to profile the substrates of RNF111, we have generated U2OS osteosarcoma CRISPR modified cell lines that express a truncated form of RNF111 devoid of the C-terminal RING domain (RNF111-RING-KO) that mimics the truncation observed in the cancer cell line NCI-H460. To detect the

degradative substrates of RNF111, we have performed label-free quantitative proteomics to compare the proteome of the RNF111-RING-KO clones with the parental U2OS upon TGF- $\beta$  induction, which enabled the detection of SKI and SKIL among 73 candidates. Further analysis of selected candidates indicates that regulation of their protein level by RNF111 occurs at the transcriptional level. To identify more precisely the ubiquitylated substrates of RNF111, we performed label-free quantitative comparison of the ubiquitylome of RNF111-RING-KO clones to the parental U2OS upon TGF- $\beta$  induction by two means. We used diGly enrichment with the K- $\epsilon$ -GG antibody and a new approach using a commercially available pan ubiquitin nanobody (referred to as pan UB in this study) that strongly interacts with monoubiquitylated and all linkage polyubiquitylated proteins. With the diGly antibody approach, among the 3641 proteins corresponding to the ubiquitylation sites quantified, we identified 108 proteins that are potentially ubiquitylated by RNF111, including SKIL on lysine 343; whereas the pan UB nanobody approach enabled the detection of 54 potential substrates including SKI, SKIL, and RNF111 among the 8547 proteins quantified, demonstrating that this new method is very robust for substrate identification of E3 ubiquitin ligases. Moreover, comparison of the two ubiquitylomes leads to detection of SKIL as the only validated common RNF111 substrate and integrative comparison of the ubiquitylomes and proteome identified SKI and SKIL as the only proteins both ubiquitylated and degraded by RNF111 upon TGF- $\beta$  pathway activation, among the 7746 proteins quantified in the proteome analysis. Altogether, our findings indicate a strong specificity of RNF111 E3 ubiquitin ligase function for degradative ubiquitylation of SKI and SKIL in response to TGF- $\beta$ .

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

#### *Cell Lines and Plasmids*

U2OS human osteosarcoma, HEK-293 human embryonic kidney, and NCI-H460 human non-small cell lung carcinoma cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (U2OS and HEK-293) or RPMI (NCI-H460) medium containing 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. The pMLM3636 expression vector for *Streptococcus pyogenes* Cas9 sgRNA was a gift from JK Joung laboratory (Addgene plasmid # 43860). The Cas9<sup>D10A</sup> expression vector was a gift from G Church (Addgene plasmid #41816) (19), the CAGA<sub>12</sub>-Luc plasmid was described in (20), and the Renilla expression vector pRL-TK vector is from Promega. The pCMV10-3xFlag-RNF111-WT (Flag-RNF111-WT) expression vector was generated by PCR subcloning of human RNF111 cDNA (corresponding to isoform 3) from PcDNA4/TO-SFS-RNF111 (11) in pCMV10-3xFlag (Sigma). The pCMV-3xHA-SKIL-WT (HA-SKIL-WT) expression vector was generated by PCR subcloning of human SKIL cDNA from PCMV5B-HA-SnoN (21) in pCMV-3xHA. pCMV10-3xFlag-RNF111-C933A (Flag-RNF111-C933A) and pCMV-3xHA-SKIL-342/43-KR (HA-SKIL-342/43-KR) mutants were generated by site-directed mutagenesis respectively on pCMV10-3xFlag-RNF111-WT and pCMV-3xHA-SKIL-WT by using the QuickChange Lightning kit (Agilent).



### CRISPR Cell Lines

SgRNA-rev CACTGTGGAAGGTTGGCTAC and SgRNA-fw CTTA-CAAGCAATAGTACCAC targeting exon 5 of the human RNF111 gene were designed using the CRISPOR software ([crispor.org](http://crispor.org)) (22) to perform double-nicking. Double-stranded oligonucleotides with overhangs were cloned into BsmBI digested MLM3636 vector, and 0.5 million of U2OS cells were cotransfected with 2 µg of Cas9<sup>D10A</sup> expression vector and 2 µg of each SgRNA-rev and SgRNA-fw MLM3636 expressing vector, using Amaxa Nucleofector V kit (Lonza), program X-001. The single cells were individually seeded in 96 well plates and the clones were amplified and assessed by Western-blot for full-length RNF111 depletion. RNF111 exon5 targeted region was PCR amplified from clones #1 and #2 genomic DNA with primers CATCTACCTCTGAGCAGGCC and TCATGCTTTTGGT GTCAGCC, and the PCR products were subcloned into pCR2.1 vector using TOPO-TA Cloning kit (Invitrogen). For each CRISPR clones, a total of ten cloned PCR products were sequenced to determine the genomic modification on the different alleles.

### Immunoprecipitation and Western Blot

Whole-cell extracts were prepared from 6-well plates and treated or not for 1 h with TGF-β (2 ng/ml) before lysis with RIPA buffer (50 mM Tris [pH 8], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% sodium dodecyl sulfate) supplemented with EDTA-free protease inhibitor (Roche), 50 µM NaF, and 50 µM β-glycerophosphate. Cleared lysates were quantified by BCA protein assay (Pierce), and 30 µg of proteins were analyzed by Western blotting using standard procedures.

For pan UB nanobody immunoprecipitation on endogenous proteins, cells were grown to 90% confluence in 150 mm plates for each condition and treated with 10 µM MG132 for 4 h followed by 1 h TGF-β (2 ng/ml) treatment before lysis in RIPA buffer. The lysates were sonicated (10 s ON and 10 s OFF, four times) and the cleared lysates were quantified using BCA quantification. 6 mg of proteins were immunoprecipitated with 50 µl of Ubiquitin pan Selector beads slurry (Nanotag Biotechnologies, #N2510) on a rotator for 1 h at 4 °C. After three washes with RIPA buffer, the proteins were eluted in laemmli buffer before subsequent analysis by Western blotting using standard procedures.

For pan UB nanobody immunoprecipitation on transfected cells, cells grown in 6-well plates were transfected with 2 µg of the appropriate plasmids using X-tremGENE HP (Roche) and were treated 24 h later with 10 µM MG132 for 4 h followed by 1 h with 2 ng/ml TGF-β (U2OS) or 20 ng/ml activin A (HEK-293) before lysis in RIPA buffer. The sonicated and cleared lysates were immunoprecipitated with 20 µl of Ubiquitin pan Selector beads slurry (Nanotag Biotechnologies, #N2510) for 1 h and washed 3 times with RIPA buffer before analysis by Western blotting using standard procedures.

The following antibodies were used for Western blotting: anti-Flag-horseradish peroxidase (Sigma), anti-hemagglutinin (anti-HA-horseradish peroxidase; Roche), anti-RNF111 (M05, Abnova), anti-SKI (G8, Santa Cruz), anti-SKIL (19218-1-AP, Proteintech), anti-SMAD2/3 (BD), anti-UB (P4D1, Santa Cruz), anti-KYNU (E5, Santa Cruz), anti-GDF15 (G5, Santa Cruz), and anti-FABP3 (10676-1-AP, Proteintech).

### Luciferase Assay

For luciferase assay, cells grown in 24-well plates were cotransfected with 0.3 µg CAGA<sub>12</sub>-Luc and 0.2 µg pRL-TK (Promega). In the no TGF-β condition, 10 µM of TGF-β inhibitor (SB-431542, Torc1s) was added at the time of transfection to inhibit autocrine TGF-β signaling in NCI-H460 cells. 24 h post transfection, TGF-β (2 ng/ml) was added or not for 8 h before lysis in passive lysis buffer (Promega), and successive measurements of Luciferase and Renilla activity with the dual-luciferase reporter assay system (Promega) were performed. The

luciferase activities were normalized to Renilla activities in triplicate experiments.

### Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen) according to standard procedure from cells grown at 90% confluence in a 10 mm dish. cDNA were synthesized from 1.5 µg of RNA using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). Quantitative PCR (qPCR) was performed in triplicate using the 2XSYBR Green qPCR master mix (Bio-tools) according to the manufacturer's protocol in a Light Cycler 96 (Roche). The expression of each gene was calculated by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  methods using GAPDH as a control. All data represent mean ± SD for at least three independent experiments. The following primers were used: GAPDH-F TGCACCACCAACTGCTTAGC, GAPDH-R GGCATG GACTGTGGTCATGAG, GDF15-F ACTCAGCCAGAAGTGCCGG, GDF15-R AGATTCTGCCAGCAGTGGTC, FABP3-F CTTCCCCTA CCCTCAGGTG, FABP3-R CAGTGTCACAATGGACTTGACC, SKIL-F CAGCCTGATGCTCCGT GTAT, SKIL-R TGATGGTGCATCTGTCTTGA, KYNU-F TTGCGGCT GAACTCAAATGC, and KYNU-R GCTTCCC CACTTCATGACCA.

### Ubiquitylome and Proteome Sample Preparation

For proteome analysis, the cells were grown to 90% confluence in a 6-well plates and treated with 2 ng/ml TGF-β for 1 h before lysis in freshly prepared urea buffer (8 M urea, 200 mM ammonium bicarbonate, and EDTA-free protease inhibitor). After sonication, the lysates were quantified by BCA, and 300 µg of proteins were reduced with 5 mM DTT for 1 h at 37 °C and alkylated with 10 mM iodoacetamide (IAA) for 30 min at room temperature in the dark. The samples were then diluted in 200 mM ammonium bicarbonate to reach a final concentration of 1 M urea and digested overnight at 37 °C with trypsin (Worthington #LS003750) at a ratio of 1/50. 150 µg of each sample were separated with the High pH Reversed-Phase peptide fractionation kit (Pierce #84868). The peptides were eluted successively into six fractions using elution buffers containing the following percentages of acetonitrile: 10, 12.5, 15, 17.5, 20, and 50%. The eluted peptides were vacuum concentrated to dryness and resuspended in 20 µl of 0.1% formic acid (FA)/3% acetonitrile (vol/vol) before LC-MS/MS analysis.

For diGly ubiquitylome analysis, the samples were prepared according to the protocol described in (18). Briefly, for each condition, the cells were grown to 90% confluence in 8 x 150 mm plates and treated with 10 µM MG132 for 4 h after 1 h TGF-β (2 ng/ml) treatment before lysis in freshly prepared urea buffer (8M urea, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 50 µM PR-619, 1 mM chloroacetamide, and 1 mM PMSF). The cleared lysates were quantified by BCA, and 10 mg of proteins were reduced and alkylated by adding successively 5 mM DTT and 10 mM IAA respectively for 1 h and 30 min at room temperature. The protein samples were diluted 4 times with 50 mM Tris-HCl to obtain a concentration at 2 M urea. Trypsin (Worthington # LS003750) digestion was then performed overnight at 37 °C at a ratio of 1/50. After centrifugation at 3000g for 5 min, supernatant containing the digested peptides were desalted on a 500-mg tC18 SepPak cartridge, and the eluted peptides were dried by vacuum centrifugation. The peptides were resuspended in 1.4 ml IAP buffer (50 mM MOPS (pH 7.2), 10 mM sodium phosphate Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 50 mM NaCl), cleared at 20,000g for 5 min, and incubated on a rotator for 2 h at 4 °C with 50 µl of PTMScan Ubiquitin Remnant Motif (K-ε-GG) Antibody Beads slurry (Cell Signaling #5562) equilibrated in IAP buffer. After two washes in IAP buffer followed by three washes with milliQ water, two successive elutions of the K-ε-GG peptides with 55 µl of TFA 0.15% for 10 min were combined and desalted using C18 StageTips. The final peptide eluates were dried and resuspended in 8 µl 0.1% FA/3% (vol/vol) acetonitrile before LC-MS/MS analysis.

For pan UB nanobody Ubiquitylome, immunoprecipitation on the endogenous proteins was performed as described in the immunoprecipitation section, except that the three washes with RIPA buffer were followed by 2 washes with washing buffer (150 mM NaCl and 50 mM TRIS pH 7.5), and the proteins were subsequently eluted twice with 150  $\mu$ l of freshly prepared solution of 1.4% triethylamide for 5 min at room temperature under agitation. The 300  $\mu$ l triethylamide eluates were neutralized with 100  $\mu$ l of Tris 1 M pH 7.5 and dried by vacuum centrifugation. The proteins were reduced and alkylated by adding successively 5 mM DTT and 10 mM IAA, as previously described. The samples were then diluted in 400  $\mu$ l of 25 mM ammonium bicarbonate, digested at 37 °C for 2 h with 0.4  $\mu$ g of trypsin/LysC (#V5073 Promega) before overnight digestion by adding 1  $\mu$ g of trypsin/LysC. The sample was then loaded onto homemade SepPak C18 Tips packed by stacking one AttractSPE disk (#SPE-Disks-Bio-C18-100.47.20, Affiniseq) and 2 mg beads (SepPak C18 #186004521, Cartridge Waters) into a 200  $\mu$ l micropipette tip for desalting. The peptides were eluted using 40/60 acetonitrile/H<sub>2</sub>O in 0.1% FA and vacuum concentrated to dryness. The sample was resuspended in 10  $\mu$ l of TFA 0.3% before LC-MS/MS analysis

#### Ubiquitylome and Proteome Analysis by LC-MS/MS

Peptides for proteome analyses were separated by reversed phase LC on an RSLCnano system (Ultimate 3000, Thermo Scientific) coupled online to an Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometer (Thermo Scientific). The peptides were trapped on a C18 column (75  $\mu$ m inner diameter  $\times$  2 cm; nanoViper Acclaim PepMap 100, Thermo Scientific) with buffer A (2/98 acetonitrile/H<sub>2</sub>O (vol/vol) in 0.1% FA) at a flow rate of 4.0  $\mu$ l/min over 4 min. The separation was performed on a 50 cm  $\times$  75  $\mu$ m C18 column (nanoViper Acclaim PepMap RSLC, 2  $\mu$ m, 100 Å, Thermo Scientific) regulated to a temperature of 55 °C with a linear gradient of 5 to 25 % buffer B (100% acetonitrile, 0.1% FA) at a flow rate of 300 nl/min over 100 min. The peptides were ionized by a nanospray ionization ion source at 2.2 kV. Full-scan MS in the Orbitrap was set at a scan range of 400 to 1500 with a resolution at 120,000 (at 200 m/z), and the ions from each full scan were fragmented in higher-energy collisional dissociation mode and analyzed in the linear ion trap in rapid mode. The fragmentation was set in top speed mode in data-dependent analysis. We selected ions with charge state from 2+ to 6+ for screening. Normalized collision energy (NCE) was set to 30, automatic gain control (AGC) target to 20,000 ions with a dynamic exclusion of 30s.

For diGly ubiquitylome analyses, LC was performed as previously described with an RSLCnano system (same trap column, column, and buffers), coupled online to a Q Exactive HF-X mass spectrometer (Thermo Scientific). The peptides were trapped onto the C18 column with buffer A at a flow rate of 2.5  $\mu$ l/min over 4 min. Separation was performed at a temperature of 50 °C with a linear gradient of 2 to 30% buffer B at a flow rate of 300 nl/min over 91 min. The peptides were ionized by a nanospray ionization ion source (voltage was 2.2 kV). MS full scans were performed in the ultrahigh-field Orbitrap mass analyzer in ranges m/z 375 to 1500 with a resolution of 120,000 (at 200 m/z) and detected in the Orbitrap analyzer after accumulation of ion at 3E6 target value with a maximum injection time (IT) of 50 ms. For every full scan, the top 20 most intense ions were isolated (isolation width of 1.6 m/z) and fragmented (NCE of 27) by higher-energy collisional dissociation mode with an IT of 60 ms, AGC target set to 1E5, and 15,000 resolution. The charge state from <2+ and >6+ were excluded, and dynamic exclusion was set to 40s.

For pan UB ubiquitylome analyses, LC was performed as previously described with an RSLCnano system, coupled online to an Orbitrap Exploris 480 mass spectrometer (Thermo Scientific). The peptides were trapped on a C18 column with buffer A at a flow rate of 3.0  $\mu$ l/min

over 4 min. Separation was performed at a temperature of 40 °C with a linear gradient of 3% to 32% buffer B at a flow rate of 300 nl/min over 211 min. MS full scans were performed in the ultrahigh-field Orbitrap mass analyzer in ranges m/z 375 to 1500 with a resolution of 120,000 (at m/z 200), AGC target value set at 300 % and with a maximum IT of 25 ms. The top 30 most intense ions were isolated (isolation width of 1.6 m/z) and fragmented with a NCE set at 30%, a resolution of 15,000, and AGC target value set to 100%. We selected ions with charge state from 2+ to 6+ for screening and dynamic exclusion of 40s.

**Mass Spectrometry Data Analysis**—For identification, the raw MS files were searched against the *Homo sapiens* UniProt database (UP000005640, downloaded 11/2017 with 20,239 entries for the diGly ubiquitylome, 01/2018 with 20,231 entries for the proteome, and 12/2019 with 20,364 entries for the pan UB ubiquitylome), combined with common contaminants (245 sequences, downloaded from [http://www.coxdocs.org/doku.php?id=maxquant:start\\_downloads.htm](http://www.coxdocs.org/doku.php?id=maxquant:start_downloads.htm) the 27/07/2016) for the diGly ubiquitylome analyses. The proteome and pan UB ubiquitylome samples being sufficiently complex, the non human contaminants were negligible and were not added to the search. The search was conducted using SEQUEST-HT through Proteome Discoverer (version 2.1 for the diGly ubiquitylome, 2.2 for the proteome, and 2.4 for the pan UB ubiquitylome) after the Spectrum Selector node with default settings. Enzyme specificity was set to trypsin (full), and a maximum of two miscleavage sites were allowed for the proteome and pan UB ubiquitylome and three for the diGly ubiquitylome. Oxidized methionine, Carbamidomethyl cysteines, and N-terminal acetylation were set as variable modifications, and GlyGly on lysine (+114.0429) was added for the ubiquitylomes analyses. Methionine-loss and Methionine-loss + N-terminal acetylation were also added to the pan UB variable modifications. For all analyses, the maximum allowed mass deviation was set to 10 ppm for monoisotopic precursor ions. For fragment ions, it was set respectively to 0.6 Da and 0.02 Da for the proteome and the ubiquitylomes. For proteome analyses, the Top N peaks filter of Proteome Discoverer was set to the six most intense peaks every 100 Da. FDR calculation used Percolator (23) and was set to the conventional threshold of 1% at the peptide level for the whole study. The resulting files were further processed using myProMS v3.9 (24) (code available at <https://github.com/bioinfo-pf-curie/myproms>). The label-free quantification was performed using peptide Extracted Ion Chromatograms (XICs) computed with MassChroQ (25), version 2.2.21. For proteome and ubiquitylome quantifications, XICs from all proteotypic peptides shared between compared conditions (TopN matching) were used, and the missed cleavages were allowed. All peptides data, including quantification, are available from ProteomeXchange with identifier PXD025890, and the proteins and ubiquitylation sites data (identification and quantification) are available in [supplemental Tables S1–S4](#).

**Experimental Design and Statistical Rationale**—Proteome analyses were performed on three biological replicates for the parental U2OS cells, treated with TGF- $\beta$  and used as controls (n = 3), and three for each of RNF111-RING-KO clones #1 and #2 (n = 6 biological replicates in total for RNF111-RING-KO), to accommodate biological variability. Each replicate was divided into six fractions for MS analysis, and XICs were summed across the fractions for each peptide before statistical analysis. diGly ubiquitylome analyses were performed on the parental U2OS cells and on the RNF111-RING-KO clone #2, with three biological replicates each. Each sample was analyzed twice (2 technological replicates), and the obtained XICs were merged (averaged when measured twice) to improve the number of ubiquitylation sites identified and quantified. For the pan UB ubiquitylome analysis, four biological replicates for parental U2OS cell line (n = 4) were compared with four biological replicates for each of

RNF111-RING-KO clones #1 and #2 ( $n = 8$  for the RNF111-RING-KO condition).

For each experiment, statistical analysis was then performed inside myProMS v3.9 (24), after checking for normal distribution. The identified contaminants were excluded from the analysis at this point for the diGly ubiquitylome samples. Median and scale normalization was applied on the total signal to correct the XICs for each biological replicate. Outlier peptides were removed, within each condition and for each protein, with the Tukey's fences method. To estimate the significance of the change in protein abundance, a linear model (adjusted on peptides and biological replicates) was used, and  $p$ -values were adjusted with the Benjamini-Hochberg FDR procedure. In addition, proteins/sites specific to a single condition were also included in the analysis. Candidates for RNF111 ubiquitylation substrates or sites were retained under the criteria of a minimum 2-fold change between RNF111-RING-KO and the parental U2OS cells (increase in proteome, decrease in diGly and pan UB ubiquitylomes), which must be statistically significant as reported by an adjusted  $p$ -value under 0.05, and the candidates must have at least one corresponding peptide identified in three replicates of any of the two conditions.

## RESULTS

### *CRISPR Engineered U2OS RNF111-RING-KO Cell Lines are not Responsive to TGF- $\beta$*

To identify endogenous substrates of RNF111 E3 ubiquitin ligase function, we generated CRISPR engineered cell lines devoid of RNF111 RING domain by mimicking the stop mutation S432\* observed on exon 5 of the RNF111 gene in the NCI-H460 carcinoma cell line. Considering the role of RNF111 in both TGF- $\beta$  signaling and DNA repair, we set our study in the U2OS osteosarcoma cell line that exhibits an intact functional response to both TGF- $\beta$  and DNA damage. We used the CRISPR/Cas9<sup>D10A</sup> double nicking system that reduces off-target cleavage by 50 to 1500-fold in cell lines (26) to generate highly specific double strand break with paired single guide RNA (sgRNA-rev and sgRNA-fw) located on either side of the targeted region in exon 5 of RNF111 in U2OS cell line (Fig. 1A). The CRISPR single clones were selected by Western blotting with an antibody that recognizes the N-terminal region (amino acids 1–108) of RNF111 (Abnova M05). Two independent U2OS clones that express truncated forms of RNF111 with size range equivalent to the one observed in NCI-H460 cells, and no full length RNF111, were selected (referred to as RNF111-RING-KO clones #1 and #2) (Fig. 1B). Further sequencing of the genomic region of exon 5 indicates that RNF111-RING-KO clone #1 carries two alleles with a frameshift mutation at position 434 followed by 15 extra amino acids before stop mutation and 1 allele with a frameshift mutation at position 437 followed by 46 extra amino acids; whereas RNF111-RING-KO clone #2 carries the same frameshift mutation at position 426 followed by three extra amino acids on all alleles (supplemental Fig. S1).

As observed in NCI-H460 cell line (9), RNF111-RING-KO clones #1 and #2 undergo an intact SMAD2 phosphorylation upon TGF- $\beta$  signaling after 1 h treatment with TGF- $\beta$ , but the degradation of the SMAD transcriptional repressors SKI and

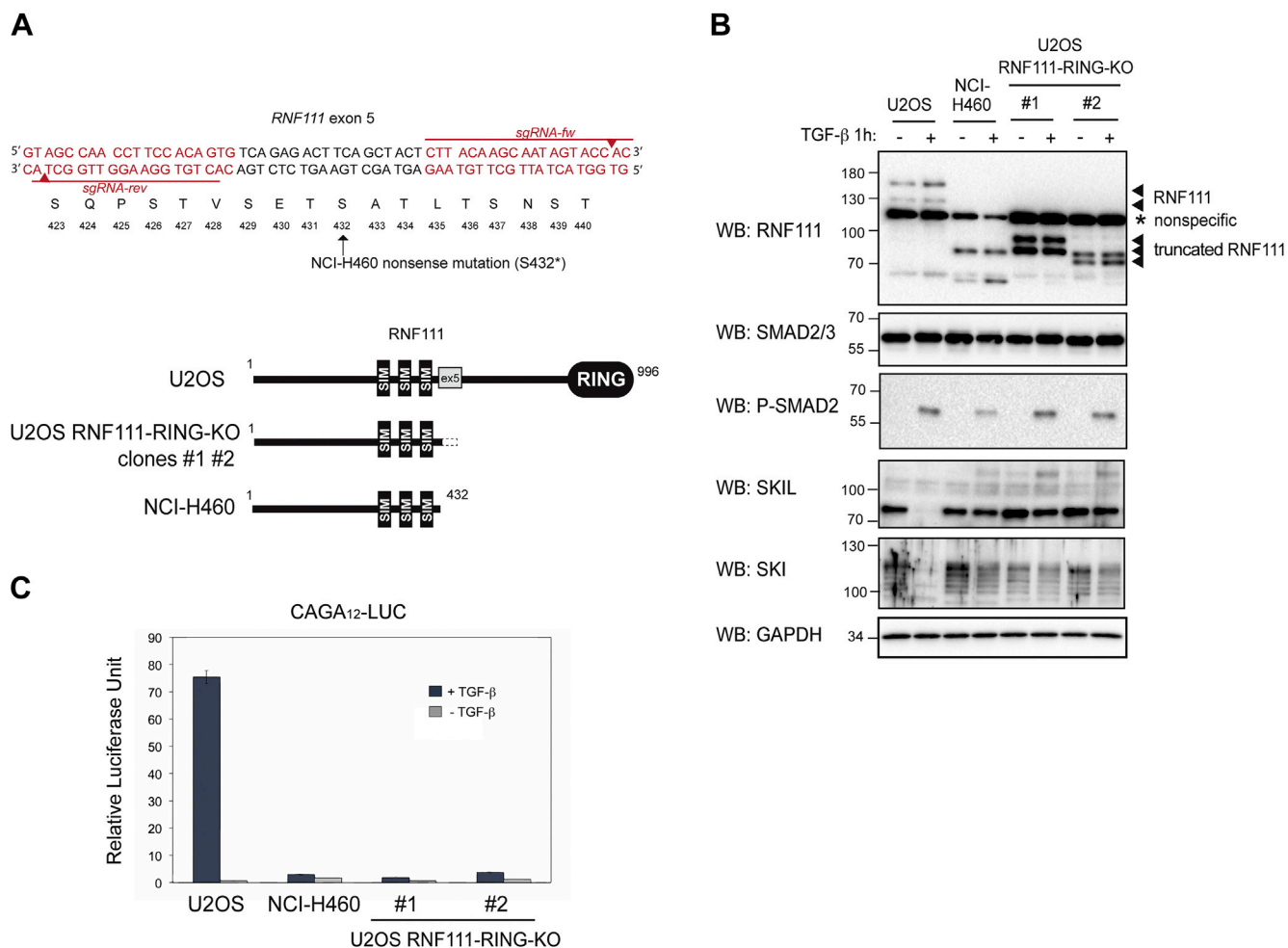
SKIL is abolished in these two clones as compared with the parental U2OS cell line (Fig. 1B). As a consequence, the SMAD-dependent transcription in response to TGF- $\beta$  assessed by luciferase assay with the CAGA<sub>12</sub>-LUC reporter is completely abolished in the two RNF111-RING-KO clones, as observed in the NCI-H460 cell line (Fig. 1C). Altogether, our results confirm that the two independent CRISPR engineered U2OS RNF111-RING-KO clones #1 and #2 have lost the E3 ubiquitin ligase function responsible for SKI and SKIL degradation upon TGF- $\beta$  and are subsequently not responsive to TGF- $\beta$ .

### *Identification of the RNF111-Dependent Proteome*

To identify proteins that are degraded by RNF111 E3 ligase function, we performed label-free quantitative proteomics on U2OS parental cells and RNF111-RING-KO clones #1 and #2 (Fig. 2A). We compared three biological replicates for each RNF111-RING-KO clones #1 and #2 (RNF111-RING-KO clones,  $n = 6$ ) to three biological replicates for U2OS parental cells (U2OS,  $n = 3$ ) to quantify RNF111-RING-KO/U2OS protein ratios. To detect RNF111-induced protein degradation that depends on active TGF- $\beta$  pathway, as for SKI and SKIL degradation, the cells were treated with TGF- $\beta$  for 1 h before lysis. This timing of TGF- $\beta$  induction allows Phospho-SMAD2 accumulation and SKI and SKIL degradation but is too early to enable detection of the TGF- $\beta$  target genes induction at the protein level. Significant increase of protein quantity in RNF111-RING-KO clones compared with parental U2OS cells (RNF111-RING-KO/U2OS fold increase  $\geq 2$ ;  $p$ -value  $\leq 0.05$ ) was detected for 73 proteins including SKI and SKIL among the 7746 proteins quantified (Fig. 2, A and B, supplemental Table S1). We further validated by Western-blot that Kynureninase (KYNU), growth differentiation factor 15 (GDF15), and fatty acid binding protein 3 (FABP3), some of the strongest candidates with commercially available antibodies, are indeed increased in both RNF111-RING-KO clones #1 and #2 as compared with parental U2OS cells, but unlike SKI and SKIL, we found that this increase is independent of TGF- $\beta$  (Fig. 2C). Q-PCR analysis of these candidates indicate that their RNA levels are also increased in RNF111-RING-KO clones #1 and #2 compared to parental U2OS cells independently of TGF- $\beta$ , whereas, as expected, SKIL RNA level is not (Fig. 2D). These results suggest that RNF111 downregulates KYNU, GDF15, and FABP3 directly or indirectly at the transcriptional level, rather than affecting their protein stability as for SKI and SKIL.

### *Identification of RNF111-Dependent Substrates by Label-Free Quantitative Comparison of diGly Ubiquitylome*

Because the RNF111-dependent proteome is crowded with proteins that are modified at the transcriptional level and considering that RNF111 might also perform non degradative ubiquitylation (11, 27), we went on to investigate directly global endogenous substrates ubiquitylated by the RING domain of RNF111. In that aim, we first performed diGly



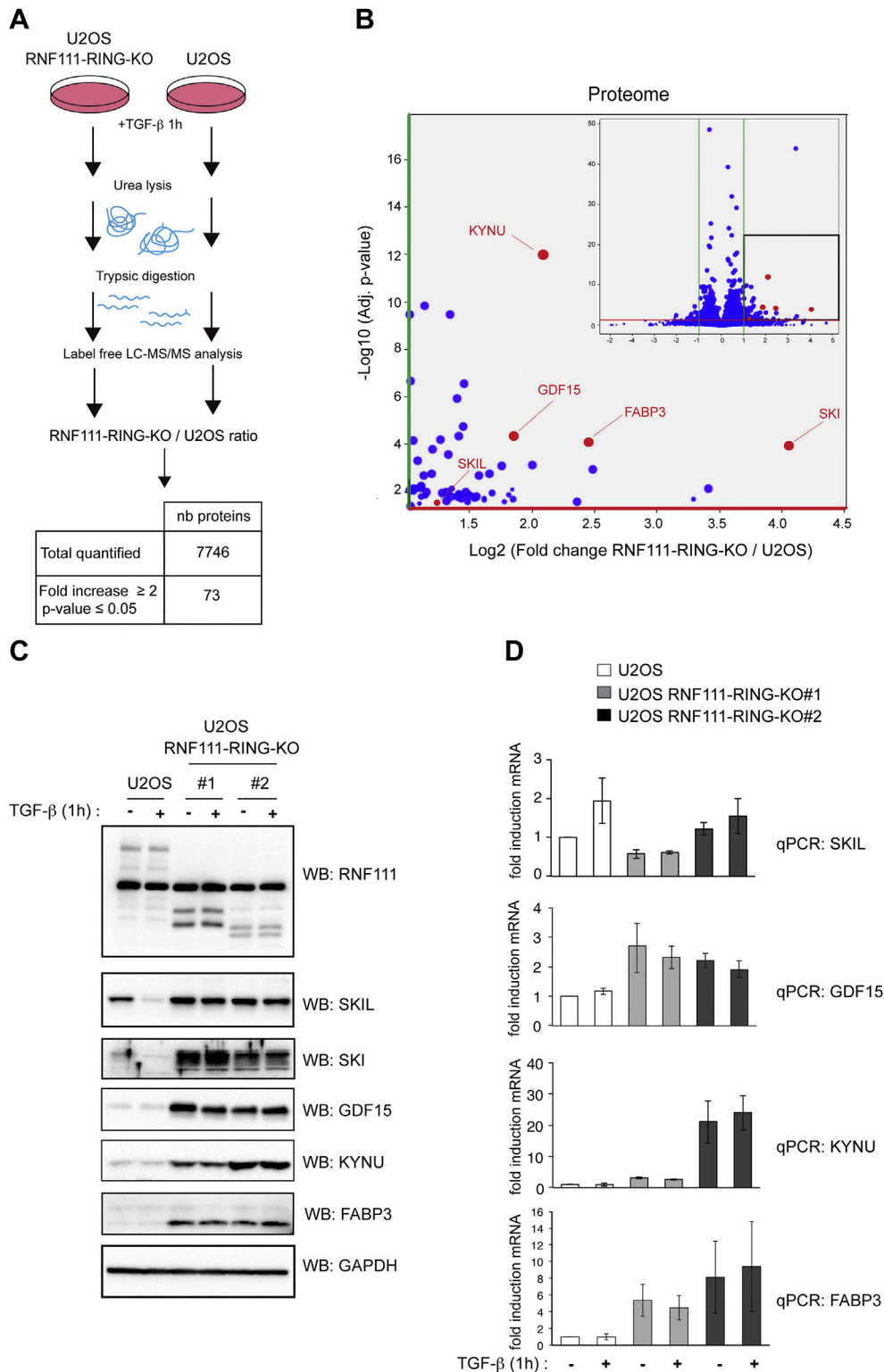
**FIG. 1. CRISPR engineered U2OS RNF111-RING-KO cell lines.** *A*, upper diagram, design of the reverse and forward sgRNA (sgRNA-rev and sgRNA-fw, in red) used to target exon 5 of RNF111 gene in U2OS cells. Red arrows indicate the breaking sites. Amino acids of the corresponding codons are annotated below; nonsense mutation on serine 432 observed in NCI-H460 cell line is indicated (S432\*). Lower diagram, schematic representation of WT RNF111 in parental U2OS cell line compared with RNF111 truncation in U2OS CRISPR engineered RNF111-RING-KO clones #1 and #2 and NCI-H460 cell line. *B*, U2OS cells, NCI-H460 cells, and RNF111-RING-KO clones #1 and #2 were treated or not with TGF-β for 1 h. The whole cell extracts were analyzed by Western blotting using antibodies against RNF111, SMAD2/3, P-SMAD2, SKIL, SKI, and GAPDH. *C*, U2OS cells, NCI-H460 cells, and RNF111-RING-KO clones #1 and #2 were cotransfected with the CAGA<sub>12</sub>-Luc and pRL-TK reporters and were treated or not with TGF-β for 8 h. The data represent means ± SD of luciferase activities normalized to Renilla in triplicate experiments. RNF111, ring finger protein 111; TGF-β, transforming growth factor-β.

peptides profiling. The lysates were digested with trypsin, and the peptides carrying diGly modified lysine remnant of ubiquitylation were immunoprecipitated with the K-ε-GG antibody (Cell Signaling) (Fig. 3A). Three biological replicate experiments were performed to compare global ubiquitylation in parental U2OS cells (n = 3) and RNF111-RING-KO clone #2 (n = 3). To identify RNF111 substrates that are dependent of an active TGF-β signaling, we treated the cells with TGF-β for 1 h before lysis, which corresponds to the peak of SKIL degradation before detection of TGF-β target genes induction at the protein level. To prevent the proteasomal degradation of ubiquitylated substrates, the cells were treated with MG132 for 4 h before TGF-β induction. We assumed that these experimental conditions enable the detection of both TGF-β

dependent and independent ubiquitylation events, as well as degradative and non degradative ubiquitylation.

Label-free quantification of ubiquitylation sites by mass spectrometry enabled the identification of 160 sites within 108 proteins, among 12,675 sites quantified within 3641 proteins, that display a significant decrease in RNF111-RING-KO clone #2 compared to the U2OS parental cells (RNF111-RING-KO/U2OS fold decrease ≥ 2; p-value ≤ 0.05; Fig. 3, A and B; supplemental Tables S2 and S3).

Among the 160 sites of ubiquitylation that significantly decrease in RNF111-RING-KO clone #2, we identified lysine 343 (K343) as an RNF111-dependent ubiquitylation target for SKIL (Fig. 3B). Interestingly, this lysine is localized in the SAND domain of SKIL (aa 258–353) that interacts with SMAD4 (28)



**FIG. 2. RNF111-dependent Proteome.** *A*, schematic representation of the proteome experiment with a summary table of the RNF111-RING-KO/U2OS protein ratio quantification results. *B*, volcano plot representation of the differential analysis with the  $\log_2$  fold change RNF111-RING-KO/U2OS versus the negative  $\log_{10}$  *p*-value. Each dot represents a protein. *Green* and *red* lines represent the cut-off applied (respectively fold increase or decrease  $\geq 2$  and *p*-value  $\leq 0.05$ ). Volcano Plot is zoomed in the fold increase  $\geq 2$  and *p*-value  $\leq 0.05$  areas. *C*, Western blot analysis of the proteome candidates. U2OS cells and RNF111-RING-KO clones #1 and #2 were treated or not with TGF- $\beta$  for 1 h. The whole cell extracts were analyzed by Western blotting using antibodies against RNF111, SKIL, SKI, GDF15 (growth differentiation factor 15), KYNU, FABP3 (fatty

and RNF111 (5) (Fig. 3C). Of note, one other ubiquitylation site was detected for SKIL on lysine 432 that does not display any significant changes between RNF111-RING-KO clone #2 and U2OS cells (supplemental Table S3). To determine if lysine 343 of SKIL is the lysine responsible for the degradation of SKIL induced by RNF111 in response to TGF- $\beta$  signaling, we have mutated lysine 343 on a HA-SKIL expression vector. Lysine 343 is adjacent to lysine 342, it is therefore likely that lysine 342 could be ubiquitylated by RNF111 in the absence of lysine 343. To overcome this possibility, we performed lysine to arginine mutation of the two lysines 342 and 343 to generate a HA-SKIL-342/43-KR mutant. We have compared the ability of Flag-RNF111-WT or its inactive RING mutant Flag-RNF111-C933A to ubiquitylate HA-SKIL-WT or the HA-SKIL-342/43-KR mutant in the presence of TGF- $\beta$ /Activin signal in HEK-293 cells. To immunoprecipitate ubiquitylated proteins, we used the newly developed pan UB nanobody resin (Ubiquitin pan Selector, Nanotag Biotechnologies) that exhibits strong affinity for polyubiquitylated and mono-ubiquitylated proteins. As expected, because RNF111 auto-ubiquitylates, Flag-RNF111-WT was immunoprecipitated, but not its catalytic inactive mutant C933A (Fig. 3D). Moreover, RNF111-WT, but not the C933A mutant, induces ubiquitylation of HA-SKIL-WT. However, we could not detect any decrease in SKIL ubiquitylation when lysines 342/43 were mutated, indicating that RNF111 might also ubiquitylate other lysines on SKIL that were not detected in the diGly ubiquitylome.

#### Identification of RNF111-Dependent Substrates by Label-Free Quantitative Comparison of Pan UB Ubiquitylome

Because the diGly approach led to the identification of numerous putative targets, we decided to refine our analysis by employing the pan UB nanobody resin to analyze the RNF111-dependent ubiquitylome. We first assessed whether immunoprecipitation with the pan UB nanobody enables the detection of endogenous SKIL ubiquitylation. Although TGF- $\beta$ -induced SKIL degradation has been well documented (4–6, 29), no study has provided evidence of an increased ubiquitylation of SKIL upon TGF- $\beta$  signaling, presumably because of the difficulty to detect endogenous ubiquitylation and because overexpression experiments temper this inducible effect. We found that immunoprecipitation with the pan UB nanobody enables the detection of increased endogenous SKIL ubiquitylation in the parental U2OS cells after 1 h TGF- $\beta$  treatment in presence of proteasome inhibitor MG132, but not in the two RNF111-RING-KO clones despite the presence of equivalent amount of SKIL protein in the input of each condition (Fig. 4A). This result clearly demonstrates that TGF- $\beta$

induces SKIL ubiquitylation, and that RNF111 E3 ubiquitin ligase activity is required in this process. Moreover, ubiquitylated RNF111 was also immunoprecipitated in the parental cell lines but not in the two RNF111-RING-KO clones that lack RNF111 auto-ubiquitylation ability. These results highlight that the pan UB nanobody constitutes a very efficient tool for endogenous purification of ubiquitylated proteins, and we then decided to carry out label-free proteomics on pan UB immunoprecipitated parental U2OS, RNF111-RING-KO clones #1 and #2 lysates. The easy workflow and the low amount of starting material of such an approach, compared with the diGly approach, allowed us to increase the number of biological replicates. We then compared four biological replicates of each RNF111-RING-KO clones #1 and #2 (RNF111-RING-KO clones  $n = 8$ ) with 4 biological replicates of parental cells U2OS (U2OS  $n = 4$ ) in the same conditions as the diGly experiments (4 h MG132, 1 h TGF- $\beta$ ). Among the 8547 quantified proteins, differential analysis enabled the detection of 52 proteins that display a statistically significant decrease of ubiquitylation in RNF111-RING-KO clones compared to parental U2OS cells (RNF111-RING-KO/U2OS fold decrease  $\geq 2$ ;  $p$ -value  $\leq 0.05$ ; Fig. 4, B and C, supplemental Table S4). Among these 52 putative RNF111 substrates, we identified SKI, SKIL, and RNF111, which confirms that the pan UB approach is very efficient for ubiquitylome analysis. Curiously, we also identified SMAD4 among the 52 hits but were not able to further validate that RNF111 indeed increases SMAD4 ubiquitylation (data not shown).

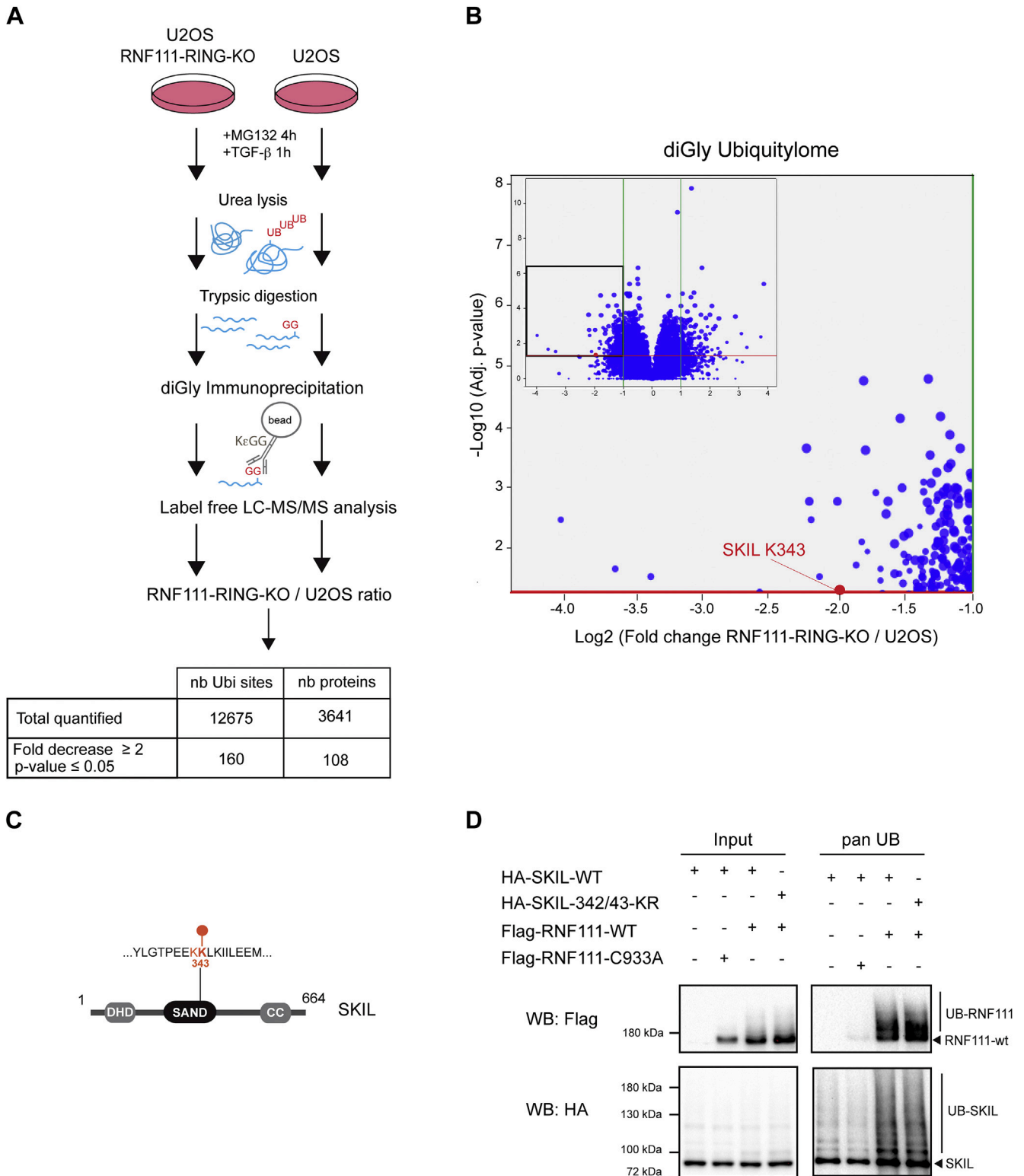
#### Integrative Comparison of RNF111-Dependent Ubiquitylomes and Proteome

To pinpoint the most robust RNF111 putative substrates, we next compared the 108 and 52 candidates obtained respectively with the diGly and pan UB ubiquitylome analyses (Fig. 5A). Strikingly, we identified only four common hits including SKIL and three other proteins PDK4, MED10, and ZFAND2A, (Fig. 5B). Because we were not able to validate these three candidates by Western-blot after pan UB immunoprecipitation neither at the endogenous level, nor after coexpression of an HA-tagged cDNA expression vector with Flag-RNF111 as for SKIL (data not shown), we concluded that SKIL constitutes the only common validated candidate for the diGly and pan UB ubiquitylome.

Finally, to identify substrates for RNF111 ubiquitin ligase function that are ubiquitylated and degraded by RNF111 in response to TGF- $\beta$ , we performed an integrative comparison of the proteome with the two RNF111-dependent ubiquitylomes (Fig. 6A, supplemental Table S5). We identified SKIL as the only candidate with both decreased ubiquitylation and

---

acid binding protein 3), and GAPDH. *D*, qPCR analysis of the proteome candidates. U2OS cells and RNF111-RING-KO clones #1 and #2 were treated or not with TGF- $\beta$  for 1 h. The levels of mRNA for SKIL, GDF15, KYNU, and FABP3 were analyzed by qPCR and normalized to GAPDH using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  methods. The data represent mean  $\pm$  SD for at least three independent experiments. KYNU, Kynureninase; RNF111, ring finger protein 111; TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ .



**FIG. 3. Identification of RNF111-dependent substrates by diGly ubiquitylome quantitative comparison.** *A*, schematic representation of the experimental design for RNF111-dependent ubiquitylome quantification with the diGly approach using immunoprecipitation of ubiquitylated trypsin remnant peptides with the K- $\epsilon$ -GG antibody. The table summarizes the results for the ubiquitylation sites quantification of the RNF111-RING-KO/U2OS ratio. *B*, volcano plot representation of the differential analysis with the log<sub>2</sub> fold change RNF111-RING-KO/U2OS versus the negative log<sub>10</sub> *p*-value. Each dot represents a ubiquitylation site. *Green* and *red* lines represent the cut-off applied (respectively fold increase or decrease  $\geq 2$  and *p*-value  $\leq 0.05$ ). Volcano Plot is zoomed in the fold decrease  $\geq 2$  and *p*-value  $\leq 0.05$  area. *C*, schematic representation of the

increased protein level in the absence of RNF111 ubiquitin ligase function when we compared the proteome with the diGly ubiquitylome, and SKI and SKIL as the only candidates when we compared the proteome with the pan UB ubiquitylome (Fig. 6B). Although it cannot be ruled out that other proteins than SKI and SKIL that were not detected can be ubiquitylated and degraded by RNF111, these results strongly argue that RNF111 specifically targets its substrates SKI and SKIL for degradative ubiquitylation in response to TGF- $\beta$ .

### DISCUSSION

#### *Lack of RNF111 E3 Ubiquitin Ligase Activity Affects Protein Expression at the Transcriptional Level*

In the present work, we performed a comprehensive analysis of RNF111 substrates by using different quantitative proteomics approaches to compare parental U2OS cells with RNF111-RING-KO clones devoid of RNF111 E3 ubiquitin ligase activity. A proteome analysis enabled the identification of 73 proteins, including SKI and SKIL, with an increased level in the absence of RNF111 RING domain, suggesting that these hits could constitute new substrates of RNF111. However, further Western-blot and qPCR analysis of selected candidates indicates that RNF111 regulates these proteins at the transcriptional level independently of TGF- $\beta$ , rather than affecting their protein stability. Although this could be an indirect effect, this finding raises the possibility that RNF111 could act as a transcriptional repressor. This would be in agreement with the study of Sun *et al.* (30), which performed transcriptomic analysis on MEF RNF111  $-/-$  and identified a panel of genes repressed by RNF111, independently of TGF- $\beta$ , that are also regulated by the Polycomb complex. Our study further indicates that RNF111 could regulate transcription in a RING dependent manner, suggesting that this effect might depend on a ubiquitylation event. However, we did not identify any components of the Polycomb complex in the ubiquitylomes or proteome that would be a target for RNF111 ubiquitylation and could explain this effect. Future investigations in this direction will be required to decipher the ability of RNF111 to directly repress transcription and to understand the relevance of its E3 ubiquitin ligase activity in this effect.

#### *Advantages and Limitations of the DiGly and Pan UB Ubiquitylome Analyses*

Development of efficient approaches to enrich ubiquitylated proteins is a prerequisite to enable the identification of endogenous substrates of E3 ubiquitin ligases. Here, we have

compared two methods of enrichment by performing immunoprecipitation with the diGly antibody and pan UB nanobody. DiGly remnant peptides enrichment followed by mass spectrometry analysis constitutes the most powerful method used to profile endogenous ubiquitylation and gives the major advantage to profile ubiquitylated lysines. However, because it involves detection of a single peptide for each ubiquitylation site, this method displays a low sensitivity that requires considerable amount of starting material and can be quite challenging to set up. In our study, we used a recently developed pan UB nanobody that empowers enrichment of ubiquitylated proteins at the endogenous level to perform ubiquitylome analysis. We found that this method is highly sensitive and much easier to implement than the diGly approach, and can therefore constitute an easy workflow alternative to investigate E3 ubiquitin ligases substrates profiling. Interestingly, the current development of nanobodies targeting the different polyubiquitin chain linkages will provide the opportunity in the future to investigate the identification of substrates for an E3 ubiquitin ligase according to the different ubiquitin linkages.

Comparison of the candidates obtained from our diGly and pan UB ubiquitylome analyses indicates that they poorly overlap, since only four common hits including SKIL have been identified and only SKIL could be validated. This suggests that ubiquitylome analyses might be significantly poised with false positive candidates due to biological noise. However, the discrepancy between the two ubiquitylomes approaches could also be explained by the difference in the two antibodies used for ubiquitin enrichment. Indeed, whereas the pan UB nanobody is specific of monoubiquitin and all polyubiquitin linkages, the K- $\epsilon$ -GG antibody used in the diGly approach is unable to distinguish between the attachment of ubiquitin and two other ubiquitin-like proteins NEDD8 and ISG15 that also leave a diGly remnant after trypsin digestion. Therefore, it is possible that some of the RNF111-dependent diGly peptides identified could correspond to a neddylation or ISGylation event. Indeed, it has been proposed that RNF111 could act as a NEDD8 E3 ligase (12, 31), and it will therefore be interesting in a future work to determine if RNF111 could neddylate some of the different candidates identified in the diGly ubiquitylome.

#### *SKI and SKIL are the Only Identified Degradative Substrates for RNF111-Ubiquitin Ligase Function in TGF- $\beta$ Signaling*

In the present work, we showed that comparison of the RNF111-dependent proteome and ubiquitylomes leads to the

---

SKIL protein with its domains DHD, SAND, and CC (coiled-coiled) and the localization of lysine 343. Lysines 342 and 343 that were subsequently mutated are indicated in red. D, HEK-293 cells were transfected with Flag-RNF111-WT or Flag-RNF111-C933A catalytic inactive mutant along with HA-SKIL-WT, HA-SKIL-342/43-KR mutant, or empty vector. After 1 h Activin/TGF- $\beta$  treatment, the whole cell extracts were immunoprecipitated with the pan UB nanobody and analyzed by Western blotting (pan UB, right panel) along with the corresponding whole cell extract (input, left panel) using HA and Flag antibodies. diGly, diglycine; RNF111, ring finger protein 111; UB, ubiquitin.



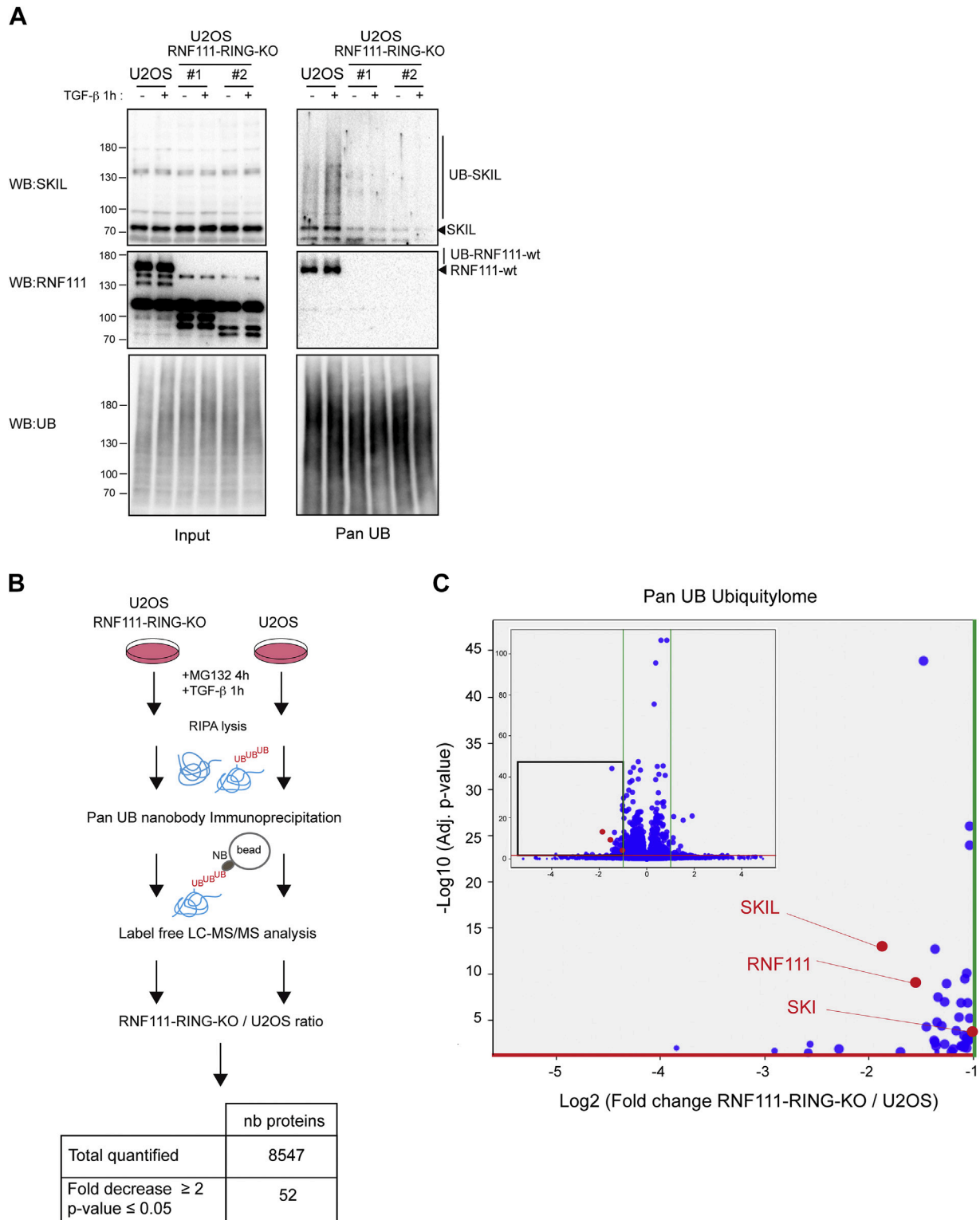


FIG. 4. Identification of RNF111-dependent substrates by pan UB ubiquitylome quantitative comparison. A, U2OS cells and RNF111-RING-KO clones #1 and #2 were treated with MG132 for 4 h before induction or not with TGF- $\beta$  for 1 h. The whole cell lysates immunoprecipitated with the pan UB nanobody were analyzed by Western blotting (pan UB, right panel) along with whole cell lysates (input, left panel) using antibodies against RNF111, SKIL, and UB. B, schematic representation of the experimental design for RNF111-dependent ubiquitylome quantification with the pan UB approach using immunoprecipitation of ubiquitylated proteins with the pan UB nanobody. The table summarizes the results of the differential quantification for the RNF111-RING-KO/U2OS ratio. C, volcano plot representation of the differential analysis with

identification of SKI and SKIL as the only substrates ubiquitinated and degraded by RNF111 upon TGF- $\beta$  signaling. Notably, we provide clear evidence for the first time that SKIL ubiquitylation is increased by TGF- $\beta$  stimulation, and that RNF111 is absolutely required for this inducible effect. We are aware that our finding is not a proof that SKI and SKIL constitute the only endogenous substrates of RNF111, because we cannot rule out that some other substrates have not been detected in our screen. However, the important representativeness of our study with more than 7700 proteins identified in the proteome and the pan UB ubiquitylome and 12,000 ubiquitylation sites identified in the diGly ubiquitylome indicates that despite the paradigm of the ability for an E3 ubiquitin ligase to target many different substrates, RNF111 ubiquitin ligase function seems to display a very stringent specificity for its degradative substrates SKI and SKIL upon TGF- $\beta$  pathway activation. On the other hand, the comparison of the RNF111-dependent ubiquitylomes to the proteome indicates that most of the putative ubiquitylated substrates of RNF111 are not associated with a significant increase in protein level, which could suggest that such proteins are non degradative ubiquitylation substrates for RNF111. The fact that RNF111 has been reported to trigger K27 and K63 non degradative ubiquitylation corroborates this possibility (11, 27). Further investigation will be required for the validation and significance of these potential non degradative ubiquitylation events. However, our comparison of the pan UB and diGly ubiquitylomes which identifies SKIL as the only common validated substrate further supports the idea that SKIL constitutes the major ubiquitylated substrate for RNF111. Importantly, our study has been performed in the presence of an active TGF- $\beta$  signaling pathway, and it is likely that RNF111 affects ubiquitylation only in a stimuli-dependent manner. To depict the ubiquitylation network of RNF111, it would be interesting to employ the same approach to identify targets of RNF111 in response to other stimuli where RNF111 has also been involved, such as response to arsenite treatment (10), UV (11) or IR irradiation (12).

### *Lysine K343 of SKIL Is a Ubiquitylation Target for RNF111*

The advantage of the diGly approach is that it enables detection of the lysines that are ubiquitylated on the substrate. We found that ubiquitylation of lysine 343 of SKIL is dependent of RNF111. However, the mutation of lysine 343 together with the adjacent lysine 342 did not result in attenuated SKIL ubiquitylation. A previous study on over-expressed SKIL lysine mutants has shown that SKIL degradation in response to TGF- $\beta$  depends on lysine 440, 446, and 449, but no ubiquitylation experiments have

confirmed this observation (29). It is, however, possible that RNF111 ubiquitylates multiple lysines on SKIL including lysine 343, and other lysines such as lysine 440, 446, and 449 that were not detected in the ubiquitylome. A more targeted approach by SKI and SKIL immunoprecipitation followed by diGly enrichment would enable to map precisely all the lysines ubiquitylated by RNF111 on SKI and SKIL. Alternatively, it is possible that lysine 343 is indeed the only endogenous ubiquitylation target for RNF111, and that overexpression of SKIL and RNF111 triggers ubiquitylation toward other lysines. Intriguingly, the lysine 343 is located in the SAND domain of SKIL known to interact with SMAD4 (28) and RNF111 (5). It has been shown recently that besides its interaction with phospho-SMAD2/3 (4), interaction of SKIL with SMAD4 is also absolutely required for SKIL degradation (32). Altogether, these findings point out that RNF111 ubiquitylation of SKIL might occur at the interface of a SKIL-SMAD4-phospho-SMAD2/3 heteromeric complex, and future investigation in this direction would be critical to unravel the molecular mechanism of RNF111-dependent SKIL degradation in response to TGF- $\beta$ .

In conclusion, by showing that SKI and SKIL constitute the main degradative substrates for RNF111 E3 ubiquitin ligase function in TGF- $\beta$  signaling, our integrative proteomics analysis indicates that RNF111 displays a strong specificity toward its substrates. This finding further suggests that drugs targeting RNF111 E3 ubiquitin ligase function would specifically enable the inactivation of TGF- $\beta$  signaling by preventing SKI and SKIL degradation.

### DATA AVAILABILITY

The mass spectrometry proteomics data, including peptide quantification, have been deposited to the ProteomeXchange Consortium *via* the PRIDE (33) partner repository identified with the dataset identifier PXD025890.

*Supplemental data*—This article contains [supplemental data](#).

*Acknowledgments*—We thank J.K. Joung lab for pMLM3636 plasmid, G.Church Lab for hCas9\_D10A plasmid, and N. Mailand for the PcDNA4/TO-SFS-RNF111 plasmid. We thank Jean-Paul Concordet for help with the CRISPR and Raphaël Margueron for help with the diGly ubiquitylome. We thank rotation students Alexandre Gournay and Sarah Hjjaji for participation to the experiments and all members of the lab for useful discussions. This work was funded by a grant from Canceropole R18056DD.

---

the log<sub>2</sub> fold change RNF111-RING-KO/U2OS *versus* the negative log<sub>10</sub> *p*-value. Each dot represents a protein. The *green* and *red* lines represent the cut-offs applied (respectively fold increase or decrease  $\geq 2$  and *p*-value  $\leq 0.05$ ). The plot is zoomed in the fold change decrease  $\geq 2$  and *p*-value  $\leq 0.05$  area. RNF111, ring finger protein 111; TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ; UB, ubiquitin.

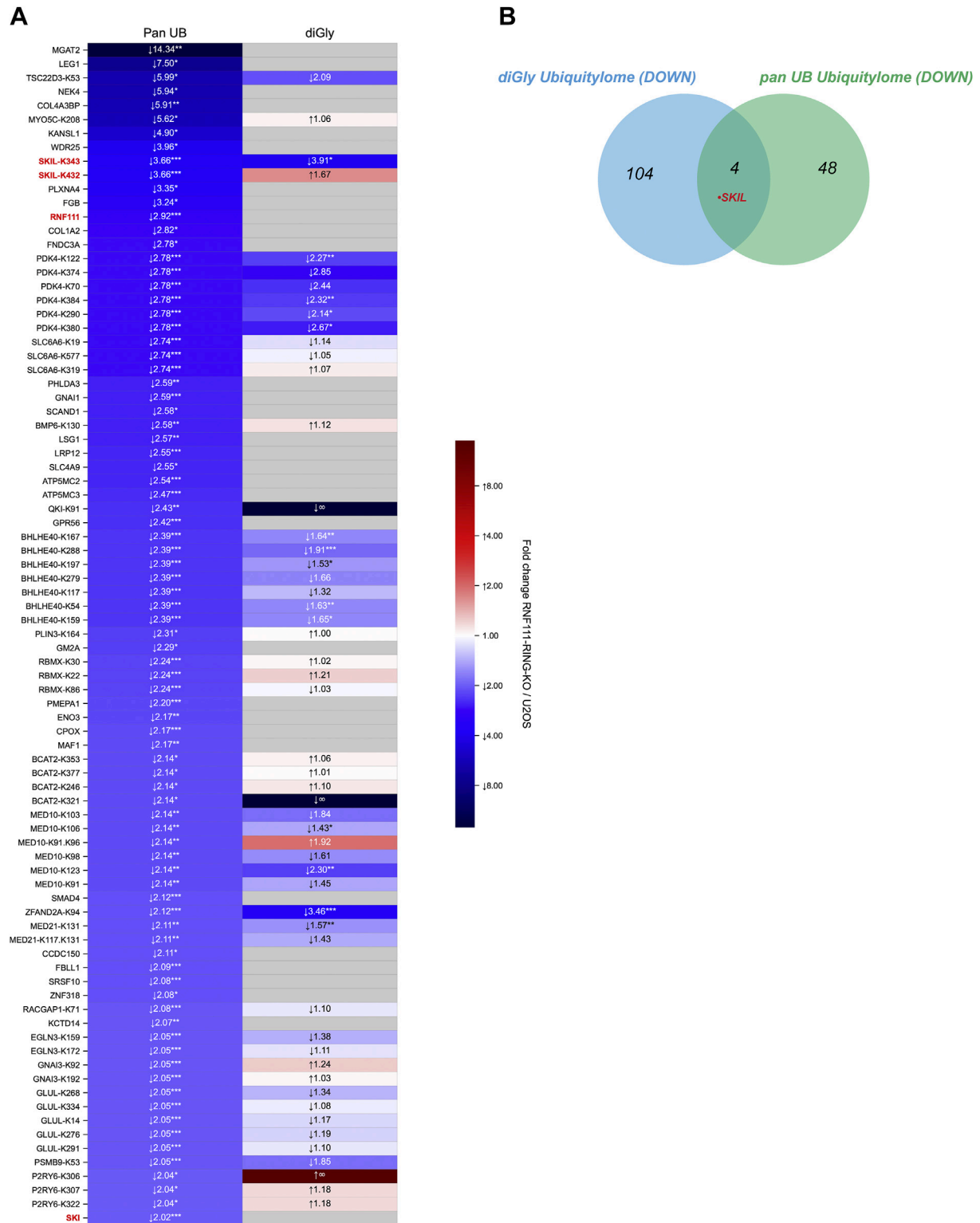
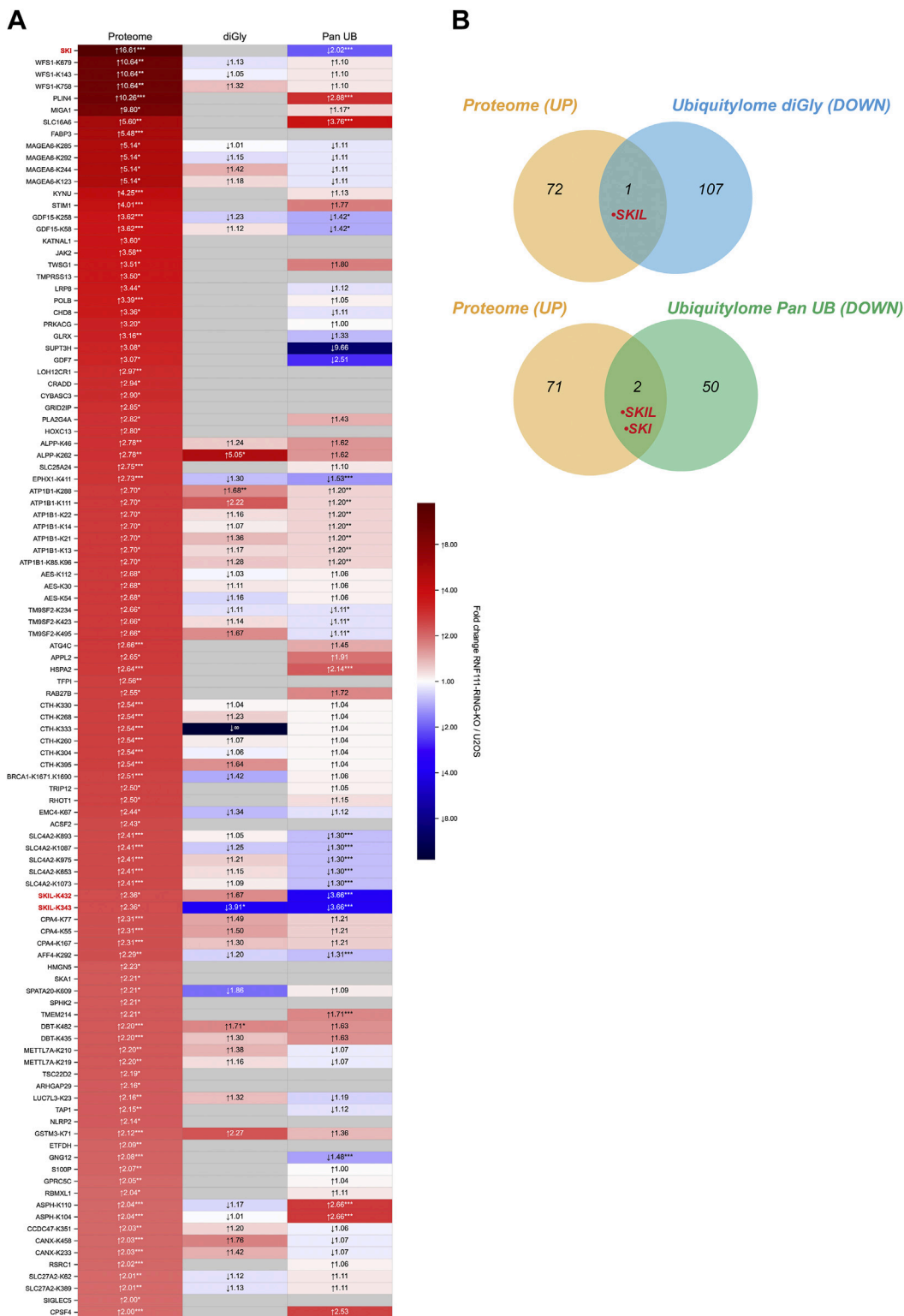


FIG. 5. Comparison of diGly and pan UB ubiquitylomes. A, the heatmap represents the ratios for the significant RNF111 substrate candidates in the pan UB ubiquitylome compared with the diGly ubiquitylome ratios. The ratios are annotated as fold increase or decrease, indicated by the arrows. Asterisks indicate their  $p$ -value: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , and \*\*\* $p \leq 0.001$ . Note that we compared whole protein quantification in the pan UB case against ubiquitylation sites quantification for diGly (protein values may then be repeated when corresponding to multiple sites). B, Venn diagram comparison shows four common hits, including SKIL, between the pan UB and diGly ubiquitylomes significant RNF111 substrate candidates. diGly, diglycine; UB, ubiquitin.



**FIG. 6. Identification of RNF111 degradative substrates by comparison of RNF111-dependent proteome to diGly and pan UB ubiquitylomes.** A, the heatmap represents the ratios for the significant RNF111 substrate candidates in the proteome, compared with pan UB and diGly ubiquitylomes ratios. The ratios are annotated as fold increase or decrease, indicated by the arrows. Asterisks indicate their *p*-value: \**p* ≤ 0.05, \*\**p* ≤ 0.01, and \*\*\**p* ≤ 0.001. Note that we compare whole protein quantification in the proteome and pan UB cases against ubiquitylation sites quantification for diGly (protein values may then be repeated when corresponding to multiple sites). B, Venn diagram shows SKI and SKIL as the only common hits between the proteome and pan UB or diGly ubiquitylomes significant candidates for RNF111 substrates. diGly, diglycine; RNF111, ring finger protein 111; UB, ubiquitin.

**Author contributions**—V. L. and L. L. formal analysis; V. L., F. D., D. L., and L. L. methodology; V. L. and P. P. software; V. L., F. D., D. L., C. P., and L. L. conceptualization; V. L., F. D., and L. L. writing—original draft; F. D., S. A., T. P., M. C., S. C., I. P., and L. L. investigation; C. P. and L. L. funding acquisition; L. L. supervision.

**Conflict of interest**—The authors declare no competing interests.

**Abbreviations**—The abbreviations used are: AGC, automatic gain control; diGly, diGlycine; FA, formic acid; FABP3, fatty acid binding protein 3; GDF15, growth differentiation factor 15; IAA, iodoacetamide; KYNU, Kynureninase; NCE, normalized collision energy; RNF111, ring finger protein 111; TGF- $\beta$ , Transforming Growth Factor- $\beta$ ; UB, Ubiquitin; XIC, extracted ion chromatograms.

Received June 14, 2021, and in revised form, October 6, 2021  
Published, MCPRO Papers in Press, November 3, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2021.100173>

#### REFERENCES

1. Yau, R., and Rape, M. (2016) The increasing complexity of the ubiquitin code. *Nat. Cell Biol.* **18**, 579–586
2. Imamura, T., Oshima, Y., and Hikita, A. (2013) Regulation of TGF- $\beta$  family signalling by ubiquitination and deubiquitination. *J. Biochem.* **154**, 481–489
3. Sinha, A., Iyengar, P. V., and ten Dijke, P. (2021) E3 ubiquitin ligases: Key regulators of TGF $\beta$  signaling in cancer progression. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 476
4. Levy, L., Howell, M., Das, D., Harkin, S., Episkopou, V., and Hill, C. S. (2007) Arkadia activates Smad3/Smad4-dependent transcription by triggering signal-induced SnoN degradation. *Mol. Cell Biol.* **27**, 6068–6083
5. Nagano, Y., Mavrikakis, K. J., Lee, K. L., Fujii, T., Koinuma, D., Sase, H., Yuki, K., Isogaya, K., Saitoh, M., Imamura, T., Episkopou, V., Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2007) Arkadia induces degradation of SnoN and c-Ski to enhance transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem.* **282**, 20492–20501
6. Le Scolan, E., Zhu, Q., Wang, L., Bandyopadhyay, A., Javelaud, D., Mauviel, A., Sun, L., and Luo, K. (2008) Transforming growth factor-beta suppresses the ability of Ski to inhibit tumor metastasis by inducing its degradation. *Cancer Res.* **68**, 3277–3285
7. Koinuma, D., Shinozaki, M., Komuro, A., Goto, K., Saitoh, M., Hanyu, A., Ebina, M., Nukiwa, T., Miyazawa, K., Imamura, T., and Miyazono, K. (2003) Arkadia amplifies TGF-beta superfamily signalling through degradation of Smad7. *EMBO J.* **22**, 6458–6470
8. Sharma, V., Antonacopoulou, A. G., Tanaka, S., Panoutsopoulos, A. A., Bravou, V., Kalofonos, H. P., and Episkopou, V. (2011) Enhancement of TGF- $\beta$  signaling responses by the E3 ubiquitin ligase Arkadia provides tumor suppression in colorectal cancer. *Cancer Res.* **71**, 6438–6449
9. Briones-Orta, M. A., Levy, L., Madsen, C. D., Das, D., Erker, Y., Sahai, E., and Hill, C. S. (2013) Arkadia regulates tumor metastasis by modulation of the TGF- $\beta$  pathway. *Cancer Res.* **73**, 1800–1810
10. Erker, Y., Neyret-Kahn, H., Seeler, J. S., Dejean, A., Atfi, A., and Levy, L. (2013) Arkadia, a novel SUMO-targeted ubiquitin ligase involved in PML degradation. *Mol. Cell Biol.* **33**, 2163–2177
11. Poulsen, S. L., Hansen, R. K., Wagner, S. A., van Cuijk, L., van Belle, G. J., Streicher, W., Wikström, M., Choudhary, C., Houtsmuller, A. B., Martijn, J. A., Bekker-Jensen, S., and Mailand, N. (2013) RNF111/Arkadia is a SUMO-targeted ubiquitin ligase that facilitates the DNA damage response. *J. Cell Biol.* **201**, 797–807
12. Ma, T., Chen, Y., Zhang, F., Yang, C.-Y., Wang, S., and Yu, X. (2013) RNF111-dependent neddylation activates DNA damage-induced ubiquitination. *Mol. Cell* **49**, 897–907
13. Mizutani, A., Saitoh, M., Imamura, T., Miyazawa, K., and Miyazono, K. (2010) Arkadia complexes with clathrin adaptor AP2 and regulates EGF signalling. *J. Biochem.* **148**, 733–741
14. Akimov, V., Barrio-Hernandez, I., Hansen, S. V. F., Hallenborg, P., Pedersen, A.-K., Bekker-Jensen, D. B., Puglia, M., Christensen, S. D. K., Vanselow, J. T., Nielsen, M. M., Kratchmarova, I., Kelstrup, C. D., Olsen, J. V., and Blagoev, B. (2018) UbiSite approach for comprehensive mapping of lysine and N-terminal ubiquitination sites. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 631–640
15. Vere, G., Kealy, R., Kessler, B. M., and Pinto-Fernandez, A. (2020) Ubiquitomics: An overview and future. *Biomolecules* **10**, 1453
16. Hu, Z., Li, H., Wang, X., Ullah, K., and Xu, G. (2021) Proteomic approaches for the profiling of ubiquitylation events and their applications in drug discovery. *J. Proteomics* **231**, 103996
17. Kim, W., Bennett, E. J., Huttlin, E. L., Guo, A. L., Li, J., Possemato, A., Sowa, M. E., Rad, R., Rush, J., Comb, M. J., Harper, J. W., and Gygi, S. P. (2011) Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol. Cell* **44**, 325–340
18. Udeshi, N. D., Mertins, P., Svinikina, T., and Carr, S. A. (2013) Large-scale identification of ubiquitination sites by mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **8**, 1950–1960
19. Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., and Church, G. M. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**, 823–826
20. Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S., and Gauthier, J. M. (1998) Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J.* **17**, 3091–3100
21. He, J., Tegen, S. B., Krawitz, A. R., Martin, G. S., and Luo, K. (2003) The transforming activity of Ski and SnoN is dependent on their ability to repress the activity of Smad proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 30540–30547
22. Concordet, J.-P., and Haeussler, M. (2018) CRISPOR: Intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res.* **46**, W242–W245
23. The, M., MacCoss, M. J., Noble, W. S., and Kääll, L. (2016) Fast and accurate protein false discovery rates on large-scale proteomics data sets with Percolator 3.0. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **27**, 1719–1727
24. Pouillet, P., Carpentier, S., and Barillot, E. (2007) myProMS, a web server for management and validation of mass spectrometry-based proteomic data. *Proteomics* **7**, 2553–2556
25. Valot, B., Langella, O., Nano, E., and Zivy, M. (2011) MassChroQ: A versatile tool for mass spectrometry quantification. *Proteomics* **11**, 3572–3577
26. Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C.-Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., Scott, D. A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., and Zhang, F. (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* **154**, 1380–1389
27. Xia, T., Lévy, L., Levillayer, F., Jia, B., Li, G., Neuveut, C., Buendia, M.-A., Lan, K., and Wei, Y. (2013) The four and a half LIM-only protein 2 (FHL2) activates transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signaling by regulating ubiquitination of the E3 ligase Arkadia. *J. Biol. Chem.* **288**, 1785–1794
28. Wu, J. W., Krawitz, A. R., Chai, J., Li, W., Zhang, F., Luo, K., and Shi, Y. (2002) Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: Insights on Ski-mediated repression of TGF-beta signaling. *Cell* **111**, 357–367
29. Stroschein, S. L., Bonni, S., Wrana, J. L., and Luo, K. (2001) Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes Dev.* **15**, 2822–2836
30. Sun, H., Liu, Y., and Hunter, T. (2014) Multiple Arkadia/RNF111 structures coordinate its Polycomb body association and transcriptional control. *Mol. Cell Biol.* **34**, 2981–2995
31. Li, C., Zhang, L., Qian, D., Cheng, M., Hu, H., Hong, Z., Cui, Y., Yu, H., Wang, Q., Zhu, J., Meng, W., Xu, J.-F., Sun, Y., Zhang, P., and Wang, C. (2021) RNF111-facilitated neddylation potentiates cGAS-mediated antiviral innate immune response. *PLoS Pathog.* **17**, e1009401
32. Gori, I., George, R., Purkiss, A. G., Strohbuecker, S., Randall, R. A., Ogrodowicz, R., Carmignac, V., Faivre, L., Joshi, D., Kjær, S., and Hill, C. S. (2021) Mutations in SKI in Shprintzen-Goldberg syndrome lead to attenuated TGF- $\beta$  responses through SKI stabilization. *eLife* **10**, e63545
33. Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D. J., Inuganti, A., Griss, J., Mayer, G., Eisenacher, M., Pérez, E., Uszkoreit, J., Pfeuffer, J., Sachsenberg, T., Yilmaz, S., et al. (2019) The PRIDE database and related tools and resources in 2019: Improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* **47**, D442–D450

## BIBLIOGRAPHIE

- Akutsu, M., Dikic, I., Bremm, A., 2016. Ubiquitin chain diversity at a glance. *J Cell Sci* 129, 875–880. <https://doi.org/10.1242/jcs.183954>
- Banushi, B., Joseph, S.R., Lum, B., Lee, J.J., Simpson, F., 2023. Endocytosis in cancer and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 23, 450–473. <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00574-6>
- Baras, A., Moskaluk, C.A., 2010. Intracellular localization of GASP/ECOP/VOPP1. *J Mol Histol* 41, 153–164. <https://doi.org/10.1007/s10735-010-9272-8>
- Baras, A.S., Solomon, A., Davidson, R., Moskaluk, C.A., 2011. Loss of VOPP1 overexpression in squamous carcinoma cells induces apoptosis through oxidative cellular injury. *Lab Invest* 91, 1170–1180. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.70>
- Basheer, W.A., Harris, B.S., Mentrup, H.L., Abreha, M., Thames, E.L., Lea, J.B., Swing, D.A., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Price, R.L., Matesic, L.E., 2015. Cardiomyocyte-Specific Overexpression of the Ubiquitin Ligase Wwp1 Contributes to Reduction in Connexin 43 and Arrhythmogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 88, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.09.004>
- Behera, A., Reddy, A.B.M., 2023. WWP1 E3 ligase at the crossroads of health and disease. *Cell Death Dis* 14, 853. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06380-0>
- Benkirane, M., Sardet, C., Coux, O., 2010. Lessons from interconnected ubiquitylation and acetylation of p53: think metastable networks. *Biochemical Society Transactions* 38, 98–103. <https://doi.org/10.1042/BST0380098>
- Bernassola, F., Chillemi, G., Melino, G., 2019a. HECT-Type E3 Ubiquitin Ligases in Cancer. *Trends in Biochemical Sciences* 44, 1057–1075. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.08.004>
- Bernassola, F., Chillemi, G., Melino, G., 2019b. HECT-Type E3 Ubiquitin Ligases in Cancer. *Trends in Biochemical Sciences* 44, 1057–1075. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.08.004>
- Bonin, F., Taouis, K., Azorin, P., Petitalot, A., Tariq, Z., Nola, S., Bouteille, N., Tury, S., Vacher, S., Bièche, I., Rais, K.A., Pierron, G., Fuhrmann, L., Vincent-Salomon, A., Formstecher, E., Camonis, J., Lidereau, R., Lallemand, F., Driouch, K., 2018. VOPP1 promotes breast tumorigenesis by interacting with the tumor suppressor WWOX. *BMC Biol* 16, 109. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0576-6>
- Borna, S., Drobek, A., Kralova, J., Glatzova, D., Splichalova, I., Fabisik, M., Pokorna, J., Skopcova, T., Angelisova, P., Kanderova, V., Starkova, J., Stanek, P., Matveichuk, O.V., Pavliuchenko, N., Kwiatkowska, K., Protty, M.B., Tomlinson, M.G., Alberich-Jorda, M., Korinek, V., Brdicka, T., 2020. Transmembrane adaptor protein WBP1L regulates CXCR4 signalling and murine haematopoiesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24, 1980–1992. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14895>
- Briones-Orta, M.A., Levy, L., Madsen, C.D., Das, D., Erker, Y., Sahai, E., Hill, C.S., 2013. Arkadia regulates tumor metastasis by modulation of the TGF- $\beta$  pathway. *Cancer Res* 73, 1800–1810. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1916>
- Bruce, M.C., Kanelis, V., Fouladkou, F., Debonneville, A., Staub, O., Rotin, D., 2008. Regulation of Nedd4-2 self-ubiquitination and stability by a PY motif located within its HECT-domain. *Biochemical Journal* 415, 155–163. <https://doi.org/10.1042/BJ20071708>
- Brzovic, P.S., Rajagopal, P., Hoyt, D.W., King, M.C., Klevit, R.E., 2001. Structure of a BRCA1-BARD1 heterodimeric RING-RING complex. *Nat Struct Biol* 8, 833–837. <https://doi.org/10.1038/nsb1001-833>

- Buetow, L., Huang, D.T., 2016. Structural insights into the catalysis and regulation of E3 ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 626–642. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.91>
- Burana, D., Yoshihara, H., Tanno, H., Yamamoto, A., Saeki, Y., Tanaka, K., Komada, M., 2016. The Ankrd13 Family of Ubiquitin-interacting Motif-bearing Proteins Regulates Valosin-containing Protein/p97 Protein-mediated Lysosomal Trafficking of Caveolin 1. *J Biol Chem* 291, 6218–6231. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.710707>
- Cao, X., Xue, L., Han, L., Ma, L., Chen, T., Tong, T., 2011. WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1 (WWP1) delays cellular senescence by promoting p27(Kip1) degradation in human diploid fibroblasts. *J Biol Chem* 286, 33447–33456. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.225565>
- Cappadocia, L., Lima, C.D., 2018. Ubiquitin-like Protein Conjugation: Structures, Chemistry, and Mechanism. *Chem Rev* 118, 889–918. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00737>
- Carballo, G.B., Honorato, J.R., de Lopes, G.P.F., Spohr, T.C.L. de S. e, 2018. A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Commun Signal* 16, 11. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0220-7>
- Casadei, R., Pelleri, M.C., Vitale, L., Facchin, F., Canaider, S., Strippoli, P., Vian, M., Piovesan, A., Bianconi, E., Mariani, E., Piva, F., Frabetti, F., 2014. Characterization of human gene locus CYYR1: a complex multi-transcript system. *Mol Biol Rep* 41, 6025–6038. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3480-3>
- Chandhoke, A.S., Karve, K., Dadakhujaev, S., Netherton, S., Deng, L., Bonni, S., 2016. The ubiquitin ligase Smurf2 suppresses TGF $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition in a sumoylation-regulated manner. *Cell Death Differ* 23, 876–888. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.152>
- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., Varshavsky, A., 1989. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243, 1576–1583. <https://doi.org/10.1126/science.2538923>
- Chaudhary, N., Maddika, S., 2014. WWP2-WWP1 ubiquitin ligase complex coordinated by PPM1G maintains the balance between cellular p73 and  $\Delta$ Np73 levels. *Mol Cell Biol* 34, 3754–3764. <https://doi.org/10.1128/MCB.00101-14>
- Chen, C., Matesic, L.E., 2007. The Nedd4-like family of E3 ubiquitin ligases and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 26, 587–604. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9091-x>
- Chen, C., Sun, X., Guo, P., Dong, X.-Y., Sethi, P., Cheng, X., Zhou, J., Ling, J., Simons, J.W., Lingrel, J.B., Dong, J.-T., 2005. Human Kruppel-like Factor 5 Is a Target of the E3 Ubiquitin Ligase WWP1 for Proteolysis in Epithelial Cells\*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 41553–41561. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506183200>
- Chen, C., Sun, X., Guo, P., Dong, X.-Y., Sethi, P., Zhou, W., Zhou, Z., Petros, J., Frierson, H.F., Vessella, R.L., Atfi, A., Dong, J.-T., 2007. Ubiquitin E3 ligase WWP1 as an oncogenic factor in human prostate cancer. *Oncogene* 26, 2386–2394. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210021>
- Chen, C., Zhou, Z., Liu, R., Li, Y., Azmi, P.B., Seth, A.K., 2008. The WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 upregulates ErbB2 and EGFR through RING finger protein 11. *Oncogene* 27, 6845–6855. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.288>
- Chen, C., Ceshi, Zhou, Z., Ross, J.S., Zhou, W., Dong, J.-T., 2007. The amplified WWP1 gene is a potential molecular target in breast cancer. *International Journal of Cancer* 121, 80–87. <https://doi.org/10.1002/ijc.22653>
- Chen, J., Shi, H., Chen, Y., Fan, S., Liu, D., Li, C., 2017. DNA damage induces expression of WWP1 to target  $\Delta$ Np63 $\alpha$  to degradation. *PLOS ONE* 12, e0176142. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176142>

- Chen, J.-J., Zhang, W., 2018. High expression of WWP1 predicts poor prognosis and associates with tumor progression in human colorectal cancer. *Am J Cancer Res* 8, 256–265.
- Chen, Y., Zhou, D., Yao, Y., Sun, Y., Yao, F., Ma, L., 2022. Monoubiquitination in Homeostasis and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 5925. <https://doi.org/10.3390/ijms23115925>
- Chen, Z., Jiang, H., Xu, W., Li, X., Dempsey, D.R., Zhang, X., Devreotes, P., Wolberger, C., Amzel, L.M., Gabelli, S.B., Cole, P.A., 2017. A Tunable Brake for HECT Ubiquitin Ligases. *Molecular Cell* 66, 345–357.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.03.020>
- Chen, Z.J., 2012. Ubiquitination in signaling to and activation of IKK. *Immunological Reviews* 246, 95–106. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01108.x>
- Cheng, Q., Cao, X., Yuan, F., Li, G., Tong, T., 2014. Knockdown of WWP1 inhibits growth and induces apoptosis in hepatoma carcinoma cells through the activation of caspase3 and p53. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 448, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.117>
- Choi, K.-S., Choi, H.-J., Lee, J.-K., Im, S., Zhang, H., Jeong, Y., Park, J.A., Lee, I.-K., Kim, Y.-M., Kwon, Y.-G., 2016. The endothelial E3 ligase HECW2 promotes endothelial cell junctions by increasing AMOTL1 protein stability via K63-linked ubiquitination. *Cellular Signalling* 28, 1642–1651. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.07.015>
- Choschzick, M., Lassen, P., Lebeau, A., Marx, A.H., Terracciano, L., Heilenkötter, U., Jaenicke, F., Bokemeyer, C., Izbicki, J., Sauter, G., Simon, R., 2010. Amplification of 8q21 in breast cancer is independent of MYC and associated with poor patient outcome. *Mod Pathol* 23, 603–610. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.5>
- Clague, M.J., Urbé, S., 2017. Integration of cellular ubiquitin and membrane traffic systems: focus on deubiquitylases. *FEBS J* 284, 1753–1766. <https://doi.org/10.1111/febs.14007>
- Clausen, L., Okarmus, J., Voutsinos, V., Meyer, M., Lindorff-Larsen, K., Hartmann-Petersen, R., 2024. PRKN-linked familial Parkinson’s disease: cellular and molecular mechanisms of disease-linked variants. *Cell Mol Life Sci* 81, 223. <https://doi.org/10.1007/s00018-024-05262-8>
- Cooper, E.M., Cutcliffe, C., Kristiansen, T.Z., Pandey, A., Pickart, C.M., Cohen, R.E., 2009. K63-specific deubiquitination by two JAMM/MPN+ complexes: BRISC-associated Brcc36 and proteasomal Poh1. *EMBO J* 28, 621–631. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.27>
- Cotton, T.R., Lechtenberg, B.C., 2020. Chain reactions: molecular mechanisms of RBR ubiquitin ligases. *Biochem Soc Trans* 48, 1737–1750. <https://doi.org/10.1042/BST20200237>
- Courivaud, T., Ferrand, N., Elkhattouti, A., Kumar, S., Levy, L., Ferrigno, O., Atfi, A., Prunier, C., 2015. Functional Characterization of a WWP1/Tiul1 Tumor-derived Mutant Reveals a Paradigm of Its Constitutive Activation in Human Cancer. *J. Biol. Chem.* 290, 21007–21018. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.642314>
- Coussens, L., Parker, P.J., Rhee, L., Yang-Feng, T.L., Chen, E., Waterfield, M.D., Francke, U., Ullrich, A., 1986. Multiple, Distinct Forms of Bovine and Human Protein Kinase C Suggest Diversity in Cellular Signaling Pathways. *Science* 233, 859–866. <https://doi.org/10.1126/science.3755548>
- Deretic, V., Saitoh, T., Akira, S., 2013. Autophagy in infection, inflammation, and immunity. *Nat Rev Immunol* 13, 722–737. <https://doi.org/10.1038/nri3532>
- Deshaies, R.J., Joazeiro, C.A.P., 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78, 399–434. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.101807.093809>
- Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C., Rechsteiner, M., 1994. A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *Journal of Biological Chemistry* 269, 7059–7061. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)37244-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)37244-7)



- Dong, B., Wang, X., Song, X., Wang, J., Liu, X., Yu, Z., Zhou, Y., Deng, J., Wu, Y., 2024. RNF20 contributes to epigenetic immunosuppression through CDK9-dependent LSD1 stabilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 121, e2307150121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2307150121>
- Dove, K.K., Klevit, R.E., 2017. RING-Between-RING E3s ligases: Emerging themes amid the variations. *J Mol Biol* 429, 3363–3375. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.08.008>
- Du, J.X., Hagos, E.G., Nandan, M.O., Bialkowska, A.B., Yu, B., Yang, V.W., 2011. The E3 ubiquitin ligase SMAD ubiquitination regulatory factor 2 negatively regulates Krüppel-like factor 5 protein. *J Biol Chem* 286, 40354–40364. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.258707>
- Duncan, L.M., Piper, S., Dodd, R.B., Saville, M.K., Sanderson, C.M., Luzio, J.P., Lehner, P.J., 2006. Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules. *The EMBO Journal* 25, 1635–1645. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601056>
- Dunn, R., Klos, D.A., Adler, A.S., Hicke, L., 2004. The C2 domain of the Rsp5 ubiquitin ligase binds membrane phosphoinositides and directs ubiquitination of endosomal cargo. *The Journal of Cell Biology* 165, 135–144. <https://doi.org/10.1083/jcb.200309026>
- Durcan, T.M., Tang, M.Y., Pérusse, J.R., Dashti, E.A., Aguilera, M.A., McLelland, G., Gros, P., Shaler, T.A., Faubert, D., Coulombe, B., Fon, E.A., 2014. USP8 regulates mitophagy by removing K6-linked ubiquitin conjugates from parkin. *The EMBO Journal* 33, 2473–2491. <https://doi.org/10.15252/emboj.201489729>
- Eastman, S.W., Yassaee, M., Bieniasz, P.D., 2009. A role for ubiquitin ligases and Spartin/SPG20 in lipid droplet turnover. *J Cell Biol* 184, 881–894. <https://doi.org/10.1083/jcb.200808041>
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., Miyazono, K., 2001. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* 276, 12477–12480. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100008200>
- Enchev, R.I., Schulman, B.A., Peter, M., 2015. Protein neddylation: beyond cullin-RING ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 30–44. <https://doi.org/10.1038/nrm3919>
- Erpapazoglou, Z., Dhaoui, M., Pantazopoulou, M., Giordano, F., Mari, M., Léon, S., Raposo, G., Reggiori, F., Haguenaer-Tsapis, R., 2012. A dual role for K63-linked ubiquitin chains in multivesicular body biogenesis and cargo sorting. *Mol Biol Cell* 23, 2170–2183. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-10-0891>
- Erpapazoglou, Z., Walker, O., Haguenaer-Tsapis, R., 2014. Versatile Roles of K63-Linked Ubiquitin Chains in Trafficking. *Cells* 3, 1027–1088. <https://doi.org/10.3390/cells3041027>
- Fajner, V., Maspero, E., Polo, S., 2017. Targeting HECT-type E3 ligases – insights from catalysis, regulation and inhibitors. *FEBS Letters* 591, 2636–2647. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12775>
- Falguières, T., Luyet, P.-P., Bissig, C., Scott, C.C., Velluz, M.-C., Gruenberg, J., 2008. In Vitro Budding of Intraluminal Vesicles into Late Endosomes Is Regulated by Alix and Tsg101. *MBoC* 19, 4942–4955. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-03-0239>
- Fang, L., Zhang, L., Wei, W., Jin, X., Wang, P., Tong, Y., Li, J., Du, J.X., Wong, J., 2014. A methylation-phosphorylation switch determines Sox2 stability and function in ESC maintenance or differentiation. *Mol Cell* 55, 537–551. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.018>
- Fang, Z., Wu, L., Dai, H., Hu, P., Wang, B., Han, Q., Xu, Y., Lv, S., Zhu, Y., Gan, M., Zhou, W., Zhang, W., 2020. The role of vesicular overexpressed in cancer pro-survival protein

- 1 in hepatocellular carcinoma proliferation. *Cancer Biomark* 28, 9–20. <https://doi.org/10.3233/CBM-190574>
- Fei, C., Li, Z., Li, C., Chen, Y., Chen, Z., He, X., Mao, L., Wang, X., Zeng, R., Li, L., 2013. Smurf1-Mediated Lys29-Linked Nonproteolytic Polyubiquitination of Axin Negatively Regulates Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *Molecular and Cellular Biology* 33, 4095–4105. <https://doi.org/10.1128/MCB.00418-13>
- Ferreira, J.V., Soares, A.R., Ramalho, J.S., Pereira, P., Girao, H., 2015. K63 linked ubiquitin chain formation is a signal for HIF1A degradation by Chaperone-Mediated Autophagy. *Sci Rep* 5, 10210. <https://doi.org/10.1038/srep10210>
- Fiorillo, A., Morea, V., Colotti, G., Ilari, A., 2021. Huntingtin Ubiquitination Mechanisms and Novel Possible Therapies to Decrease the Toxic Effects of Mutated Huntingtin. *J Pers Med* 11, 1309. <https://doi.org/10.3390/jpm11121309>
- Flasza, M., Gorman, P., Roylance, R., Canfield, A.E., Baron, M., 2002. Alternative Splicing Determines the Domain Structure of WWP1, a Nedd4 Family Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, 431–437. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6206>
- Fleming, A., Bourdenx, M., Fujimaki, M., Karabiyik, C., Krause, G.J., Lopez, A., Martín-Segura, A., Puri, C., Scrivo, A., Skidmore, J., Son, S.M., Stamatakou, E., Wrobel, L., Zhu, Y., Cuervo, A.M., Rubinsztein, D.C., 2022. The different autophagy degradation pathways and neurodegeneration. *Neuron* 110, 935–966. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.01.017>
- Foot, N.J., Dalton, H.E., Shearwin-Whyatt, L.M., Dorstyn, L., Tan, S.-S., Yang, B., Kumar, S., 2008. Regulation of the divalent metal ion transporter DMT1 and iron homeostasis by a ubiquitin-dependent mechanism involving Ndfips and WWP2. *Blood* 112, 4268–4275. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-150953>
- Fouladkou, F., Landry, T., Kawabe, H., Neeb, A., Lu, C., Brose, N., Stambolic, V., Rotin, D., 2008. The ubiquitin ligase Nedd4-1 is dispensable for the regulation of PTEN stability and localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8585–8590. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803233105>
- French, M.E., Koehler, C.F., Hunter, T., 2021. Emerging functions of branched ubiquitin chains. *Cell Discov* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00237-y>
- Galan, J.M., Haguenaer-Tsapis, R., 1997. Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J* 16, 5847–5854. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.19.5847>
- Gao, C., Pang, M., Zhou, Z., Long, S., Dong, D., Yang, J., Cao, M., Zhang, C., Han, S., Li, L., 2015. Epidermal growth factor receptor-coamplified and overexpressed protein (VOPP1) is a putative oncogene in gastric cancer. *Clin Exp Med* 15, 469–475. <https://doi.org/10.1007/s10238-014-0320-7>
- García-Cano, J., Martínez-Martínez, A., Sala-Gaston, J., Pedrazza, L., Rosa, J.L., 2019. HERCing: Structural and Functional Relevance of the Large HERC Ubiquitin Ligases. *Frontiers in Physiology* 10.
- Gatti, M., Pinato, S., Maiolica, A., Rocchio, F., Prato, M.G., Aebbersold, R., Penengo, L., 2015. RNF168 promotes noncanonical K27 ubiquitination to signal DNA damage. *Cell Rep* 10, 226–238. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.021>
- Gautheron, J., Courtois, G., 2010. “Without Ub I am nothing”: NEMO as a multifunctional player in ubiquitin-mediated control of NF- $\kappa$ B activation. *Cell Mol Life Sci* 67, 3101–3113. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0404-9>
- Geetha, T., Jiang, J., Wooten, M.W., 2005. Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol Cell* 20, 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.09.014>

- Geisler, S., Holmström, K.M., Skujat, D., Fiesel, F.C., Rothfuss, O.C., Kahle, P.J., Springer, W., 2010. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 12, 119–131. <https://doi.org/10.1038/ncb2012>
- Giraldo, M.I., Xia, H., Aguilera-Aguirre, L., Hage, A., van Tol, S., Shan, C., Xie, X., Sturdevant, G.L., Robertson, S.J., McNally, K.L., Meade-White, K., Azar, S.R., Rossi, S.L., Maury, W., Woodson, M., Ramage, H., Johnson, J.R., Krogan, N.J., Morais, M.C., Best, S.M., Shi, P.-Y., Rajsbaum, R., 2020. Envelope protein ubiquitination drives entry and pathogenesis of Zika virus. *Nature* 585, 414–419. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2457-8>
- Goldknopf, I.L., Busch, H., 1977. Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 864–868. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.3.864>
- Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D.H., Niall, H.D., Boyse, E.A., 1975. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 11–15. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.1.11>
- Gorla, M., Santiago, C., Chaudhari, K., Layman, A.A.K., Oliver, P.M., Bashaw, G.J., 2019. Ndfip Proteins Target Robo Receptors for Degradation and Allow Commissural Axons to Cross the Midline in the Developing Spinal Cord. *Cell Rep* 26, 3298-3312.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.080>
- Goto, Y., Kojima, S., Kurozumi, A., Kato, M., Okato, A., Matsushita, R., Ichikawa, T., Seki, N., 2016. Regulation of E3 ubiquitin ligase-1 (WWP1) by microRNA-452 inhibits cancer cell migration and invasion in prostate cancer. *Br J Cancer* 114, 1135–1144. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.95>
- Grice, G.L., Nathan, J.A., 2016. The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 3497–3506. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2255-5>
- Groen, E.J.N., Gillingwater, T.H., 2015. UBA1: At the Crossroads of Ubiquitin Homeostasis and Neurodegeneration. *Trends Mol Med* 21, 622–632. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.08.003>
- Haglund, K., Dikic, I., 2012. The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *Journal of Cell Science* 125, 265–275. <https://doi.org/10.1242/jcs.091280>
- Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P.P., Dikic, I., 2003. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 5, 461–466. <https://doi.org/10.1038/ncb983>
- Han, S.-O., Kommaddi, R.P., Shenoy, S.K., 2013. Distinct roles for  $\beta$ -arrestin2 and arrestin-domain-containing proteins in  $\beta$ 2 adrenergic receptor trafficking. *EMBO Rep* 14, 164–171. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.187>
- Han, Z., Sagum, C.A., Takizawa, F., Ruthel, G., Berry, C.T., Kong, J., Sunyer, J.O., Freedman, B.D., Bedford, M.T., Sidhu, S.S., Sudol, M., Harty, R.N., 2017. Ubiquitin Ligase WWP1 Interacts with Ebola Virus VP40 To Regulate Egress. *Journal of Virology* 91, 10.1128/jvi.00812-17. <https://doi.org/10.1128/jvi.00812-17>
- Haouari, S., Andres, C.R., Lanznaster, D., Marouillat, S., Brulard, C., Dangoumau, A., Ung, D., Veyrat-Durebex, C., Laumonier, F., Blasco, H., Couratier, P., Corcia, P., Vourc'h, P., 2023. Study of Ubiquitin Pathway Genes in a French Population with Amyotrophic Lateral Sclerosis: Focus on HECW1 Encoding the E3 Ligase NEDL1. *Int J Mol Sci* 24, 1268. <https://doi.org/10.3390/ijms24021268>
- Haouari, S., Vourc'h, P., Jeanne, M., Marouillat, S., Veyrat-Durebex, C., Lanznaster, D., Laumonier, F., Corcia, P., Blasco, H., Andres, C.R., 2022. The Roles of NEDD4 Subfamily of HECT E3 Ubiquitin Ligases in Neurodevelopment and Neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 23, 3882. <https://doi.org/10.3390/ijms23073882>

- Harper, J.W., Ordureau, A., Heo, J.-M., 2018a. Building and decoding ubiquitin chains for mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 93–108. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.129>
- Harper, J.W., Ordureau, A., Heo, J.-M., 2018b. Building and decoding ubiquitin chains for mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 93–108. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.129>
- Heidecker, G., Lloyd, P.A., Fox, K., Nagashima, K., Derse, D., 2004. Late assembly motifs of human T-cell leukemia virus type 1 and their relative roles in particle release. *J Virol* 78, 6636–6648. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.12.6636-6648.2004>
- Henne, W.M., Buchkovich, N.J., Emr, S.D., 2011. The ESCRT pathway. *Dev Cell* 21, 77–91. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.015>
- Hershko, A., 1988. Ubiquitin-mediated protein degradation. *Journal of Biological Chemistry* 263, 15237–15240. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)37575-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)37575-1)
- Hershko, A., Ciechanover, A., 1998. THE UBIQUITIN SYSTEM. *Annual Review of Biochemistry* 67, 425–479. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.425>
- Hofmann, K., Falquet, L., 2001. A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 347–350. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01835-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01835-7)
- Hu, X., Yu, J., Lin, Z., Feng, R., Wang, Z., Chen, G., 2021. The emerging role of WWP1 in cancer development and progression. *Cell Death Discov.* 7, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00532-x>
- Huang, F., Kirkpatrick, D., Jiang, X., Gygi, S., Sorkin, A., 2006. Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol Cell* 21, 737–748. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.02.018>
- Huang, K., Johnson, K.D., Petcherski, A.G., Vandergon, T., Mosser, E.A., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kimble, J., Bresnick, E.H., 2000. A HECT domain ubiquitin ligase closely related to the mammalian protein WWP1 is essential for *Caenorhabditis elegans* embryogenesis. *Gene* 252, 137–145. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00216-x](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00216-x)
- Huang, L., Kinnucan, E., Wang, G., Beaudenon, S., Howley, P.M., Huibregtse, J.M., Pavletich, N.P., 1999. Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science* 286, 1321–1326. <https://doi.org/10.1126/science.286.5443.1321>
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S., Howley, P.M., 1995. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2563–2567. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2563>
- Hurley, J.H., 2008. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr Opin Cell Biol* 20, 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.12.002>
- Husnjak, K., Dikic, I., 2012. Ubiquitin-Binding Proteins: Decoders of Ubiquitin-Mediated Cellular Functions. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 291–322. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051810-094654>
- Hwang, D., Kim, M., Kim, S., Kwon, M.R., Kang, Y.-S., Kim, D., Kang, H.-C., Lim, D.-S., 2021. AMOTL2 mono-ubiquitination by WWP1 promotes contact inhibition by facilitating LATS activation. *Life Sci Alliance* 4, e202000953. <https://doi.org/10.26508/lsa.202000953>
- Hwang, J.-T., Lee, A., Kho, C., 2022. Ubiquitin and Ubiquitin-like Proteins in Cancer, Neurodegenerative Disorders, and Heart Diseases. *Int J Mol Sci* 23, 5053. <https://doi.org/10.3390/ijms23095053>
- Imamura, M., Nakamura, A., Mannen, H., Takeda, S., 2016. Characterization of WWP1 protein expression in skeletal muscle of muscular dystrophy chickens. *J Biochem* 159, 171–179. <https://doi.org/10.1093/jb/mvv084>
- Jia, X., Chen, H., Ren, Y., Deji Zhuoga, Gesangyuzhen, Gao, N., Feng, H., Huang, W., Liao, Y., Yu, H., 2021. BAP1 antagonizes WWP1-mediated transcription factor KLF5

- ubiquitination and inhibits autophagy to promote melanoma progression. *Experimental Cell Research* 402, 112506. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112506>
- Jiang, H., Dempsey, D.R., Cole, P.A., 2021. Ubiquitin Ligase Activities of WWP1 Germline Variants K740N and N745S. *Biochemistry* 60, 357–364. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00869>
- Jin, L., Williamson, A., Banerjee, S., Philipp, I., Rape, M., 2008. Mechanism of Ubiquitin-Chain Formation by the human Anaphase-Promoting Complex. *Cell* 133, 653–665. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.012>
- Jin, S., Tian, S., Chen, Y., Zhang, C., Xie, W., Xia, X., Cui, J., Wang, R., 2016. USP19 modulates autophagy and antiviral immune responses by deubiquitinating Beclin-1. *The EMBO Journal* 35, 866–880. <https://doi.org/10.15252/embj.201593596>
- Kahlhofer, J., Leon, S., Teis, D., Schmidt, O., 2021. The  $\alpha$ -arrestin family of ubiquitin ligase adaptors links metabolism with selective endocytosis. *Biol Cell* 113, 183–219. <https://doi.org/10.1111/boc.202000137>
- Kaiser, S.E., Riley, B.E., Shaler, T.A., Trevino, R.S., Becker, C.H., Schulman, H., Kopito, R.R., 2011. Protein standard absolute quantification (PSAQ) method for the measurement of cellular ubiquitin pools. *Nat Methods* 8, 691–696. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1649>
- Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., Wrana, J.L., 2000. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell* 6, 1365–1375. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00134-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00134-9)
- Kim, S., Ham, S., Yang, K., Kim, K., 2018. Protein kinase CK2 activation is required for transforming growth factor  $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition. *Mol Oncol* 12, 1811–1826. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12378>
- Kim, S., Jho, E., 2010. The protein stability of Axin, a negative regulator of Wnt signaling, is regulated by Smad ubiquitination regulatory factor 2 (Smurf2). *J Biol Chem* 285, 36420–36426. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.137471>
- Kim, W., Bennett, E.J., Huttlin, E.L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M.E., Rad, R., Rush, J., Comb, M.J., Harper, J.W., Gygi, S.P., 2011. Systematic and Quantitative Assessment of the Ubiquitin-Modified Proteome. *Molecular Cell* 44, 325–340. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.025>
- Kirchner, P., Bourdenx, M., Madrigal-Matute, J., Tiano, S., Diaz, A., Bartholdy, B.A., Will, B., Cuervo, A.M., 2019. Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs. *PLOS Biology* 17, e3000301. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000301>
- Kishikawa, T., Higuchi, H., Wang, L., Panch, N., Maymi, V., Best, S., Lee, S., Notoya, G., Toker, A., Matesic, L.E., Wulf, G.M., Wei, W., Otsuka, M., Koike, K., Clohessy, J.G., Lee, Y.-R., Pandolfi, P.P., 2021. WWP1 inactivation enhances efficacy of PI3K inhibitors while suppressing their toxicities in breast cancer models. *J Clin Invest* 131, e140436. <https://doi.org/10.1172/JCI140436>
- Komander, D., Rape, M., 2012. The Ubiquitin Code. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 203–229. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060310-170328>
- Komuro, A., Imamura, T., Saitoh, M., Yoshida, Y., Yamori, T., Miyazono, K., Miyazawa, K., 2004. Negative regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by WW domain-containing protein 1 (WWP1). *Oncogene* 23, 6914–6923. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207885>
- Krishnamoorthy, V., Khanna, R., Parnaik, V.K., 2018. E3 ubiquitin ligase HECW2 targets PCNA and lamin B1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1865, 1088–1104. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.05.008>

- Kuchitsu, Y., Mukai, K., Uematsu, R., Takaada, Y., Shinojima, A., Shindo, R., Shoji, T., Hamano, S., Ogawa, E., Sato, R., Miyake, K., Kato, A., Kawaguchi, Y., Nishitani-Isa, M., Izawa, K., Nishikomori, R., Yasumi, T., Suzuki, T., Dohmae, N., Uemura, T., Barber, G.N., Arai, H., Waguri, S., Taguchi, T., 2023. STING signalling is terminated through ESCRT-dependent microautophagy of vesicles originating from recycling endosomes. *Nat Cell Biol* 25, 453–466. <https://doi.org/10.1038/s41556-023-01098-9>
- Kuchitsu, Y., Taguchi, T., 2023. Lysosomal microautophagy: an emerging dimension in mammalian autophagy. *Trends Cell Biol* S0962-8924(23)00238–6. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.11.005>
- Kuratomi, G., Komuro, A., Goto, K., Shinozaki, M., Miyazawa, K., Miyazono, K., Imamura, T., 2005. NEDD4-2 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2) negatively regulates TGF-beta (transforming growth factor-beta) signalling by inducing ubiquitin-mediated degradation of Smad2 and TGF-beta type I receptor. *Biochem J* 386, 461–470. <https://doi.org/10.1042/BJ20040738>
- Laine, A., Ronai, Z., 2007. Regulation of p53 localization and transcription by the HECT domain E3 ligase WWP1. *Oncogene* 26, 1477–1483. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209924>
- Lauwers, E., Jacob, C., André, B., 2009. K63-linked ubiquitin chains as a specific signal for protein sorting into the multivesicular body pathway. *Journal of Cell Biology* 185, 493–502. <https://doi.org/10.1083/jcb.200810114>
- Lechtenberg, B.C., Rajput, A., Sanishvili, R., Dobaczewska, M.K., Ware, C.F., Mace, P.D., Riedl, S.J., 2016. Structure of a HOIP/E2~ubiquitin complex reveals RBR E3 ligase mechanism and regulation. *Nature* 529, 546–550. <https://doi.org/10.1038/nature16511>
- Lee, B.L., Singh, A., Mark Glover, J.N., Hendzel, M.J., Spyropoulos, L., 2017. Molecular Basis for K63-Linked Ubiquitination Processes in Double-Strand DNA Break Repair: A Focus on Kinetics and Dynamics. *J Mol Biol* 429, 3409–3429. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.05.029>
- Lee, Y.-R., Chen, M., Lee, J.D., Zhang, J., Lin, S.-Y., Fu, T.-M., Chen, H., Ishikawa, T., Chiang, S.-Y., Katon, J., Zhang, Y., Shulga, Y.V., Bester, A.C., Fung, J., Monteleone, E., Wan, L., Shen, C., Hsu, C.-H., Papa, A., Clohessy, J.G., Teruya-Feldstein, J., Jain, S., Wu, H., Matesic, L., Chen, R.-H., Wei, W., Pandolfi, P.P., 2019. Reactivation of PTEN tumor suppressor for cancer treatment through inhibition of a MYC-WWP1 inhibitory pathway. *Science* 364, eaau0159. <https://doi.org/10.1126/science.aau0159>
- Lee, Y.-R., Yehia, L., Kishikawa, T., Ni, Y., Leach, B., Zhang, J., Panch, N., Liu, J., Wei, W., Eng, C., Pandolfi, P.P., 2020. WWP1 Gain-of-Function Inactivation of PTEN in Cancer Predisposition. *N Engl J Med* 382, 2103–2116. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1914919>
- Levy, L., Howell, M., Das, D., Harkin, S., Episkopou, V., Hill, C.S., 2007. Arkadia Activates Smad3/Smad4-Dependent Transcription by Triggering Signal-Induced SnoN Degradation. *Mol Cell Biol* 27, 6068–6083. <https://doi.org/10.1128/MCB.00664-07>
- Li, F., Wang, L., Wang, Y., Shen, H., Kou, Q., Shen, C., Xu, X., Zhang, Y., Zhang, J., 2023. HECW2 promotes the progression and chemoresistance of colorectal cancer via AKT/mTOR signaling activation by mediating the ubiquitin-proteasome degradation of lamin B1. *J Cancer* 14, 2820–2832. <https://doi.org/10.7150/jca.87545>
- Li, H., Zhang, P., Zhang, Q., Li, C., Zou, W., Chang, Z., Cui, C.-P., Zhang, L., 2018. WWP2 is a physiological ubiquitin ligase for phosphatase and tensin homolog (PTEN) in mice. *J Biol Chem* 293, 8886–8899. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001060>
- Li, J., Mahajan, A., Tsai, M.-D., 2006. Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions. *Biochemistry* 45, 15168–15178. <https://doi.org/10.1021/bi062188q>

- Li, W., Bengtson, M.H., Ulbrich, A., Matsuda, A., Reddy, V.A., Orth, A., Chanda, S.K., Batalov, S., Joazeiro, C.A.P., 2008. Genome-Wide and Functional Annotation of Human E3 Ubiquitin Ligases Identifies MULAN, a Mitochondrial E3 that Regulates the Organelle's Dynamics and Signaling. *PLOS ONE* 3, e1487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001487>
- Li, Y., Gao, Z., Wang, Yuhong, Pang, B., Zhang, B., Hu, R., Wang, Yuqing, Liu, C., Zhang, X., Yang, J., Mei, M., Wang, Yongzhi, Zhou, X., Li, M., Ren, Y., 2023. Lysine methylation promotes NFAT5 activation and determines temozolomide efficacy in glioblastoma. *Nat Commun* 14, 4062. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39845-z>
- Li, Y., Zhou, Z., Alimandi, M., Chen, C., 2009. WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 targets the full-length ErbB4 for ubiquitin-mediated degradation in breast cancer. *Oncogene* 28, 2948–2958. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.162>
- Li, Y., Zhou, Z., Chen, C., 2008. WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1 targets p63 transcription factor for ubiquitin-mediated proteasomal degradation and regulates apoptosis. *Cell Death Differ* 15, 1941–1951. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.134>
- Li, Yongjian, Cheng, Q., Gao, J., Chen, Z., Guo, J., Li, Zuyin, Tian, L., Zhang, C., Li, Yuzi, Zheng, J., Li, Zhao, Zhu, J., 2022. WWP1 upregulation predicts poor prognosis and promotes tumor progression by regulating ubiquitination of NDFIP1 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cell Death Discov.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-00882-0>
- Lin, J.-H., Hsieh, S.-C., Chen, J.-N., Tsai, M.-H., Chang, C.-C., 2013. *WWP1* gene is a potential molecular target of human oral cancer. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 116, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2013.05.006>
- Lin, L., Jin, Z., Tan, H., Xu, Q., Peng, T., Li, H., 2016. Atypical ubiquitination by E3 ligase WWP1 inhibits the proteasome-mediated degradation of mutant huntingtin. *Brain Res* 1643, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.03.027>
- Lin, X., Liang, M., Feng, X.H., 2000. Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 275, 36818–36822. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000580200>
- Linares, L.K., Kiernan, R., Triboulet, R., Chable-Bessia, C., Latreille, D., Cuvier, O., Lacroix, M., Le Cam, L., Coux, O., Benkirane, M., 2007. Intrinsic ubiquitination activity of PCAF controls the stability of the oncoprotein Hdm2. *Nat Cell Biol* 9, 331–338. <https://doi.org/10.1038/ncb1545>
- Liu, S., Jiang, M., Wang, W., Liu, W., Song, X., Ma, Z., Zhang, S., Liu, L., Liu, Y., Cao, X., 2018. Nuclear RNF2 inhibits interferon function by promoting K33-linked STAT1 disassociation from DNA. *Nat Immunol* 19, 41–52. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0003-0>
- Liu, X., Xu, F., Ren, L., Zhao, F., Huang, Y., Wei, L., Wang, Y., Wang, C., Fan, Z., Mei, S., Song, J., Zhao, Z., Cen, S., Liang, C., Wang, J., Guo, F., 2021. MARCH8 inhibits influenza A virus infection by targeting viral M2 protein for ubiquitination-dependent degradation in lysosomes. *Nat Commun* 12, 4427. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24724-2>
- Liu, Y., Du, N., Qian, B., Zou, C., Yu, Z., Xu, F., Wang, L., Qin, S., You, F., Tan, X., 2023. Characteristics of Shisa Family Genes in Zebrafish. *Int J Mol Sci* 24, 14062. <https://doi.org/10.3390/ijms241814062>
- Lopata, A., Kniss, A., Löhr, F., Rogov, V.V., Dötsch, V., 2020. Ubiquitination in the ERAD Process. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 5369. <https://doi.org/10.3390/ijms21155369>
- Lorenz, S., 2018. Structural mechanisms of HECT-type ubiquitin ligases. *Biol Chem* 399, 127–145. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0184>

- Lorenz, S., Cantor, A.J., Rape, M., Kuriyan, J., 2013. Macromolecular juggling by ubiquitylation enzymes. *BMC Biol* 11, 65. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-65>
- Lorick, K.L., Jensen, J.P., Fang, S., Ong, A.M., Hatakeyama, S., Weissman, A.M., 1999. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11364–11369.
- Lu, C., Pribanic, S., Debonneville, A., Jiang, C., Rotin, D., 2007. The PY motif of ENaC, mutated in Liddle syndrome, regulates channel internalization, sorting and mobilization from subapical pool. *Traffic* 8, 1246–1264. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00602.x>
- Lydeard, J.R., Schulman, B.A., Harper, J.W., 2013. Building and remodelling Cullin–RING E3 ubiquitin ligases. *EMBO reports* 14, 1050–1061. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.173>
- Mabbitt, P.D., Loreto, A., Déry, M.-A., Fletcher, A.J., Stanley, M., Pao, K.-C., Wood, N.T., Coleman, M.P., Virdee, S., 2020. Structural basis for RING-Cys-Relay E3 Ligase Activity and its Role in Axon Integrity. *Nat Chem Biol* 16, 1227–1236. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0598-6>
- Macias, M.J., Hyvönen, M., Baraldi, E., Schultz, J., Sudol, M., Saraste, M., Oschkinat, H., 1996. Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature* 382, 646–649. <https://doi.org/10.1038/382646a0>
- Maddika, S., Kavela, S., Rani, N., Palicharla, V.R., Pokorny, J.L., Sarkaria, J.N., Chen, J., 2011. WWP2 is an E3 ubiquitin ligase for PTEN. *Nat Cell Biol* 13, 728–733. <https://doi.org/10.1038/ncb2240>
- Mahlokozera, T., Patel, B., Chen, H., Desouza, P., Qu, X., Mao, D.D., Hafez, D., Yang, W., Taiwo, R., Paturu, M., Salehi, A., Gujar, A.D., Dunn, G.P., Mosammamarast, N., Petti, A.A., Yano, H., Kim, A.H., 2021. Competitive binding of E3 ligases TRIM26 and WWP2 controls SOX2 in glioblastoma. *Nat Commun* 12, 6321. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26653-6>
- Mari, S., Ruetalo, N., Maspero, E., Stoffregen, M.C., Pasqualato, S., Polo, S., Wiesner, S., 2014. Structural and functional framework for the autoinhibition of Nedd4-family ubiquitin ligases. *Structure* 22, 1639–1649. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.09.006>
- Massagué, J., 2008. TGF $\beta$  in Cancer. *Cell* 134, 215–230. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>
- McCullough, J., Clague, M.J., Urbé, S., 2004. AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. *J Cell Biol* 166, 487–492. <https://doi.org/10.1083/jcb.200401141>
- McCullough, J., Row, P.E., Lorenzo, O., Doherty, M., Beynon, R., Clague, M.J., Urbé, S., 2006. Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Curr Biol* 16, 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.11.073>
- McKeon, J.E., Sha, D., Li, L., Chin, L.-S., 2015. Parkin-mediated K63-polyubiquitination targets ubiquitin C-terminal hydrolase L1 for degradation by the autophagy-lysosome system. *Cell Mol Life Sci* 72, 1811–1824. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1781-2>
- Mevissen, T.E.T., Komander, D., 2017. Mechanisms of Deubiquitinase Specificity and Regulation. *Annual Review of Biochemistry* 86, 159–192. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044916>
- Meyer, H.-J., Rape, M., 2014. Enhanced Protein Degradation by Branched Ubiquitin Chains. *Cell* 157, 910–921. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.037>
- Micheau, O., Tschoop, J., 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181–190. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00521-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00521-x)



- Miller, S.L.H., Malotky, E., O'Bryan, J.P., 2004. Analysis of the Role of Ubiquitin-interacting Motifs in Ubiquitin Binding and Ubiquitylation\*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 33528–33537. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313097200>
- Min, M., Mevissen, T.E.T., De Luca, M., Komander, D., Lindon, C., 2015. Efficient APC/C substrate degradation in cells undergoing mitotic exit depends on K11 ubiquitin linkages. *Mol Biol Cell* 26, 4325–4332. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-02-0102>
- Miyazaki, K., Fujita, T., Ozaki, T., Kato, C., Kurose, Y., Sakamoto, M., Kato, S., Goto, T., Itoyama, Y., Aoki, M., Nakagawara, A., 2004. NEDL1, a Novel Ubiquitin-protein Isopeptide Ligase for Dishevelled-1, Targets Mutant Superoxide Dismutase-1\*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 11327–11335. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312389200>
- Morgan, J.E., Greer, S.F., 2017. Pulling a Ligase out of a “HAT”: pCAF Mediates Ubiquitination of the Class II Transactivator. *Int J Cell Biol* 2017, 8093813. <https://doi.org/10.1155/2017/8093813>
- Morris, J.R., Solomon, E., 2004. BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Hum Mol Genet* 13, 807–817. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh095>
- Moser, E.K., Oliver, P.M., 2019. Regulation of autoimmune disease by the E3 ubiquitin ligase Itch. *Cell Immunol* 340, 103916. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.04.004>
- Mosser, E.A., Kasanov, J.D., Forsberg, E.C., Kay, B.K., Ney, P.A., Bresnick, E.H., 1998. Physical and Functional Interactions between the Transactivation Domain of the Hematopoietic Transcription Factor NF-E2 and WW Domains. *Biochemistry* 37, 13686–13695. <https://doi.org/10.1021/bi9813101>
- Mukhopadhyay, D., Riezman, H., 2007. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315, 201–205. <https://doi.org/10.1126/science.1127085>
- Mund, T., Pelham, H.R.B., 2010. Regulation of PTEN/Akt and MAP kinase signaling pathways by the ubiquitin ligase activators Ndfip1 and Ndfip2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11429–11434. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911714107>
- Mund, T., Pelham, H.R.B., 2009. Control of the activity of WW-HECT domain E3 ubiquitin ligases by NDFIP proteins. *EMBO Rep* 10, 501–507. <https://doi.org/10.1038/embo.2009.30>
- Murata, S., Yashiroda, H., Tanaka, K., 2009. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 104–115. <https://doi.org/10.1038/nrm2630>
- Nabhan, J.F., Pan, H., Lu, Q., 2010. Arrestin domain-containing protein 3 recruits the NEDD4 E3 ligase to mediate ubiquitination of the beta2-adrenergic receptor. *EMBO Rep* 11, 605–611. <https://doi.org/10.1038/embo.2010.80>
- Nagano, T., Takehara, S., Takahashi, M., Aizawa, S., Yamamoto, A., 2006. Shisa2 promotes the maturation of somitic precursors and transition to the segmental fate in *Xenopus* embryos. *Development* 133, 4643–4654. <https://doi.org/10.1242/dev.02657>
- Nalefski, E.A., Falke, J.J., 1996. The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity. *Protein Science* 5, 2375–2390. <https://doi.org/10.1002/pro.5560051201>
- Nathan, J.A., Tae Kim, H., Ting, L., Gygi, S.P., Goldberg, A.L., 2013. Why do cellular proteins linked to K63-polyubiquitin chains not associate with proteasomes? *The EMBO Journal* 32, 552–565. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.354>
- Nguyen Huu, N., Ryder, W., Zeps, N., Flaszka, M., Chiu, M., Hanby, A., Poulson, R., Clarke, R., Baron, M., 2008. Tumour-promoting activity of altered WWP1 expression in breast cancer and its utility as a prognostic indicator. *The Journal of Pathology* 216, 93–102. <https://doi.org/10.1002/path.2385>

- Nourashrafeddin, S., Aarabi, M., Modarressi, M.H., Rahmati, M., Nouri, M., 2015. The Evaluation of WBP2NL-Related Genes Expression in Breast Cancer. *Pathol. Oncol. Res.* 21, 293–300. <https://doi.org/10.1007/s12253-014-9820-8>
- Novelli, G., Liu, J., Biancolella, M., Alonzi, T., Novelli, A., Patten, J.J., Cocciadiferro, D., Agolini, E., Colona, V.L., Rizzacasa, B., Giannini, R., Bigio, B., Goletti, D., Capobianchi, M.R., Grelli, S., Mann, J., McKee, T.D., Cheng, K., Amanat, F., Krammer, F., Guarracino, A., Pepe, G., Tomino, C., Tandjaoui-Lambiotte, Y., Uzunhan, Y., Tubiana, S., Ghosn, J., COVID Human Genetic Effort, French COVID Cohort Study Group, CoV-Contact Cohort, Notarangelo, L.D., Su, H.C., Abel, L., Cobat, A., Elhanan, G., Grzymalski, J.J., Latini, A., Sidhu, S.S., Jain, S., Davey, R.A., Casanova, J.-L., Wei, W., Pandolfi, P.P., 2021. Inhibition of HECT E3 ligases as potential therapy for COVID-19. *Cell Death Dis* 12, 310. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03513-1>
- Ohi, M.D., Vander Kooi, C.W., Rosenberg, J.A., Chazin, W.J., Gould, K.L., 2003. Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. *Nat Struct Biol* 10, 250–255. <https://doi.org/10.1038/nsb906>
- Ohtake, F., Saeki, Y., Sakamoto, K., Ohtake, K., Nishikawa, H., Tsuchiya, H., Ohta, T., Tanaka, K., Kanno, J., 2015. Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. *EMBO Rep* 16, 192–201. <https://doi.org/10.15252/embr.201439152>
- Ohtake, F., Tsuchiya, H., 2017. The emerging complexity of ubiquitin architecture. *J Biochem* 161, 125–133. <https://doi.org/10.1093/jb/mvw088>
- Okatsu, K., Saisho, K., Shimanuki, M., Nakada, K., Shitara, H., Sou, Y.-S., Kimura, M., Sato, S., Hattori, N., Komatsu, M., Tanaka, K., Matsuda, N., 2010. p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes Cells* 15, 887–900. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01426.x>
- Oltion, K., Carelli, J.D., Yang, T., See, S.K., Wang, H.-Y., Kampmann, M., Taunton, J., 2023. An E3 ligase network engages GCN1 to promote the degradation of translation factors on stalled ribosomes. *Cell* 186, 346–362.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.12.025>
- Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kuno, T., Tanaka, C., Kikkawa, U., Nishizuka, Y., 1989. Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4868–4871. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.13.4868>
- Ordureau, A., Heo, J.-M., Duda, D.M., Paulo, J.A., Olszewski, J.L., Yanishevski, D., Rinehart, J., Schulman, B.A., Harper, J.W., 2015. Defining roles of PARKIN and ubiquitin phosphorylation by PINK1 in mitochondrial quality control using a ubiquitin replacement strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 6637–6642. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506593112>
- Ordureau, A., Sarraf, S.A., Duda, D.M., Heo, J.-M., Jedrykowski, M.P., Sviderskiy, V., Olszewski, J.L., Koerber, J.T., Xie, T., Beausoleil, S.A., Wells, J.A., Gygi, S.P., Schulman, B.A., Harper, J.W., 2014. Quantitative proteomics reveal a feed-forward model for mitochondrial PARKIN translocation and UB chain synthesis. *Mol Cell* 56, 360–375. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.007>
- Otten, E.G., Werner, E., Crespillo-Casado, A., Boyle, K.B., Dharamdasani, V., Pathe, C., Santhanam, B., Randow, F., 2021. Ubiquitylation of lipopolysaccharide by RNF213 during bacterial infection. *Nature* 594, 111–116. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03566-4>
- Panier, S., Durocher, D., 2009. Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 8, 436–443. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.01.013>
- Pao, K.-C., Wood, N.T., Knebel, A., Rafie, K., Stanley, M., Mabbitt, P.D., Sundaramoorthy, R., Hofmann, K., van Aalten, D.M.F., Virdee, S., 2018. Activity-based E3 ligase

- profiling uncovers an E3 ligase with esterification activity. *Nature* 556, 381–385. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0026-1>
- Pareja, F., Ferraro, D.A., Rubin, C., Cohen-Dvashi, H., Zhang, F., Aulmann, S., Ben-Chetrit, N., Pines, G., Navon, R., Crosetto, N., Köstler, W., Carvalho, S., Lavi, S., Schmitt, F., Dikic, I., Yakhini, Z., Sinn, P., Mills, G.B., Yarden, Y., 2012. Deubiquitination of EGFR by Cezanne-1 contributes to cancer progression. *Oncogene* 31, 4599–4608. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.587>
- Pavri, R., Zhu, B., Li, G., Trojer, P., Mandal, S., Shilatifard, A., Reinberg, D., 2006. Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell* 125, 703–717. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.029>
- Pei, J., Grishin, N.V., 2012. Unexpected diversity in Shisa-like proteins suggests the importance of their roles as transmembrane adaptors. *Cell Signal* 24, 758–769. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.11.011>
- Persaud, A., Alberts, P., Hayes, M., Guettler, S., Clarke, I., Sicheri, F., Dirks, P., Ciruna, B., Rotin, D., 2011. Nedd4-1 binds and ubiquitylates activated FGFR1 to control its endocytosis and function. *The EMBO Journal* 30, 3259–3273. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.234>
- Persaud, A., Alberts, P., Mari, S., Tong, J., Murchie, R., Maspero, E., Safi, F., Moran, M.F., Polo, S., Rotin, D., 2014. Tyrosine phosphorylation of NEDD4 activates its ubiquitin ligase activity. *Sci Signal* 7, ra95. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005290>
- Pichler, A., Knipscheer, P., Saitoh, H., Sixma, T.K., Melchior, F., 2004. The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type. *Nat Struct Mol Biol* 11, 984–991. <https://doi.org/10.1038/nsmb834>
- Pickart, C.M., 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503–533. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.503>
- Pirozzi, G., McConnell, S.J., Uveges, A.J., Carter, J.M., Sparks, A.B., Kay, B.K., Fowlkes, D.M., 1997. Identification of Novel Human WW Domain-containing Proteins by Cloning of Ligand Targets\*. *Journal of Biological Chemistry* 272, 14611–14616. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.23.14611>
- Plant, P.J., Yeager, H., Staub, O., Howard, P., Rotin, D., 1997. The C2 Domain of the Ubiquitin Protein Ligase Nedd4 Mediates Ca<sup>2+</sup>-dependent Plasma Membrane Localization\*. *Journal of Biological Chemistry* 272, 32329–32336. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.51.32329>
- Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M.R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P., Di Fiore, P.P., 2002. A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 416, 451–455. <https://doi.org/10.1038/416451a>
- Puca, L., Chastagner, P., Meas-Yedid, V., Israël, A., Brou, C., 2013.  $\alpha$ -arrestin 1 (ARRDC1) and  $\beta$ -arrestins cooperate to mediate Notch degradation in mammals. *Journal of Cell Science* 126, 4457–4468. <https://doi.org/10.1242/jcs.130500>
- Putz, U., Howitt, J., Lackovic, J., Foot, N., Kumar, S., Silke, J., Tan, S.-S., 2008. Nedd4 family-interacting protein 1 (Ndfip1) is required for the exosomal secretion of Nedd4 family proteins. *J Biol Chem* 283, 32621–32627. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804120200>
- Qin, Y., Zhou, M.-T., Hu, M.-M., Hu, Y.-H., Zhang, J., Guo, L., Zhong, B., Shu, H.-B., 2014. RNF26 Temporally Regulates Virus-Triggered Type I Interferon Induction by Two Distinct Mechanisms. *PLOS Pathogens* 10, e1004358. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004358>
- Raasi, S., Orlov, I., Fleming, K.G., Pickart, C.M., 2004. Binding of Polyubiquitin Chains to Ubiquitin-associated (UBA) Domains of HHR23A. *Journal of Molecular Biology* 341, 1367–1379. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.06.057>

- Raiborg, C., Bache, K.G., Gillooly, D.J., Madshus, I.H., Stang, E., Stenmark, H., 2002. Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat Cell Biol* 4, 394–398. <https://doi.org/10.1038/ncb791>
- Ren, X., Hurley, J.H., 2010. VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo. *EMBO J* 29, 1045–1054. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.6>
- Riling, C., Kamadurai, H., Kumar, S., O’Leary, C.E., Wu, K.-P., Manion, E.E., Ying, M., Schulman, B.A., Oliver, P.M., 2015. Itch WW Domains Inhibit Its E3 Ubiquitin Ligase Activity by Blocking E2-E3 Ligase Trans-thiolation. *J Biol Chem* 290, 23875–23887. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.649269>
- Rossi, M., Aqeilan, R.I., Neale, M., Candi, E., Salomoni, P., Knight, R.A., Croce, C.M., Melino, G., 2006. The E3 ubiquitin ligase Itch controls the protein stability of p63. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12753–12758. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603449103>
- Rossi, M., De Laurenzi, V., Munarriz, E., Green, D.R., Liu, Y., Vousden, K.H., Cesareni, G., Melino, G., 2005. The ubiquitin–protein ligase Itch regulates p73 stability. *The EMBO Journal* 24, 836–848. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600444>
- Rotin, D., Prag, G., 2024. Physiological Functions of the Ubiquitin Ligases Nedd4-1 and Nedd4-2. *Physiology* 39, 18–29. <https://doi.org/10.1152/physiol.00023.2023>
- Saeki, Y., Kudo, T., Sone, T., Kikuchi, Y., Yokosawa, H., Toh-e, A., Tanaka, K., 2009. Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *EMBO J* 28, 359–371. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.305>
- Sahin, U., de Thé, H., Lallemand-Breitenbach, V., 2022. Sumoylation in Physiology, Pathology and Therapy. *Cells* 11, 814. <https://doi.org/10.3390/cells11050814>
- Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C.C., Cannizzo, E.S., Scharf, B., Follenzi, A., Potolicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A.M., Santambrogio, L., 2011. Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes. *Developmental Cell* 20, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.12.003>
- Salah, Z., Alian, A., Aqeilan, R., 2012. WW domain-containing proteins: retrospectives and the future. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 17, 331–48.
- Salas-Lloret, D., González-Prieto, R., 2022. Insights in Post-Translational Modifications: Ubiquitin and SUMO. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 3281. <https://doi.org/10.3390/ijms23063281>
- Sanarico, A.G., Ronchini, C., Croce, A., Memmi, E.M., Cammarata, U.A., De Antoni, A., Lavorgna, S., Divona, M., Giacò, L., Melloni, G.E.M., Brendolan, A., Simonetti, G., Martinelli, G., Mancuso, P., Bertolini, F., Coco, F.L., Melino, G., Pelicci, P.G., Bernassola, F., 2018. The E3 ubiquitin ligase WWP1 sustains the growth of acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 32, 911–919. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.342>
- Sánchez-Tena, S., Cubillos-Rojas, M., Schneider, T., Rosa, J.L., 2016. Functional and pathological relevance of HERC family proteins: a decade later. *Cell Mol Life Sci* 73, 1955–1968. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2139-8>
- Sasaki, K., Iwai, K., 2023. LUBAC-mediated linear ubiquitination in tissue homeostasis and disease. *The Journal of Biochemistry* 174, 99–107. <https://doi.org/10.1093/jb/mvad045>
- Sato, M., Konuma, R., Sato, Katsuya, Tomura, K., Sato, Ken, 2014. Fertilization-induced K63-linked ubiquitylation mediates clearance of maternal membrane proteins. *Development* 141, 1324–1331. <https://doi.org/10.1242/dev.103044>
- Sato, Y., Yoshikawa, A., Mimura, H., Yamashita, M., Yamagata, A., Fukai, S., 2009. Structural basis for specific recognition of Lys 63-linked polyubiquitin chains by tandem UIMs of RAP80. *EMBO J* 28, 2461–2468. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.160>

- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D., Howley, P.M., 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495–505. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90384-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90384-3)
- Schreiber, A., Stengel, F., Zhang, Z., Enchev, R.I., Kong, E.H., Morris, E.P., Robinson, C.V., da Fonseca, P.C.A., Barford, D., 2011. Structural basis for the subunit assembly of the anaphase-promoting complex. *Nature* 470, 227–232. <https://doi.org/10.1038/nature09756>
- Schulman, B.A., Wade Harper, J., 2009. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 319–331. <https://doi.org/10.1038/nrm2673>
- Scott, D., Oldham, N.J., Strachan, J., Searle, M.S., Layfield, R., 2015. Ubiquitin-binding domains: Mechanisms of ubiquitin recognition and use as tools to investigate ubiquitin-modified proteomes. *PROTEOMICS* 15, 844–861. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400341>
- Seo, S.R., Lallemand, F., Ferrand, N., Pessah, M., L’Hoste, S., Camonis, J., Atfi, A., 2004. The novel E3 ubiquitin ligase Tiul1 associates with TGIF to target Smad2 for degradation. *EMBO J* 23, 3780–3792. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600398>
- Shah, S.S., Kumar, S., 2021. Adaptors as the regulators of HECT ubiquitin ligases. *Cell Death Differ* 28, 455–472. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00707-6>
- Shaid, S., Brandts, C.H., Serve, H., Dikic, I., 2013. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ* 20, 21–30. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.72>
- Shearwin-Whyatt, L.M., Brown, D.L., Wylie, F.G., Stow, J.L., Kumar, S., 2004. N4WBP5A (Ndfip2), a Nedd4-interacting protein, localizes to multivesicular bodies and the Golgi, and has a potential role in protein trafficking. *Journal of Cell Science* 117, 3679–3689. <https://doi.org/10.1242/jcs.01212>
- Shih, S.C., Katzmann, D.J., Schnell, J.D., Sutanto, M., Emr, S.D., Hicke, L., 2002. Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* 4, 389–393. <https://doi.org/10.1038/ncb790>
- Shu, L., Zhang, H., Boyce, B.F., Xing, L., 2013. Ubiquitin E3 ligase Wwp1 negatively regulates osteoblast function by inhibiting osteoblast differentiation and migration. *J Bone Miner Res* 28, 1925–1935. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1938>
- Sicari, D., Weber, J., Maspero, E., Polo, S., 2022. The NEDD4 ubiquitin E3 ligase: a snapshot view of its functional activity and regulation. *Biochemical Society Transactions* 50, 473–485. <https://doi.org/10.1042/BST20210731>
- Sigismund, S., Argenzio, E., Tosoni, D., Cavallaro, E., Polo, S., Di Fiore, P.P., 2008. Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev Cell* 15, 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.06.012>
- Snyder, L.B., Lai, Y., Doviak, H., Freeburg, L.A., Laney, V.K., Moore, A., Zellars, K.N., Matesic, L.E., Spinale, F.G., 2021. Ubiquitin ligase Wwp1 gene deletion attenuates diastolic dysfunction in pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 321, H976–H984. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00032.2021>
- Sobhian, B., Shao, G., Lilli, D.R., Culhane, A.C., Moreau, L.A., Xia, B., Livingston, D.M., Greenberg, R.A., 2007. RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science* 316, 1198–1202. <https://doi.org/10.1126/science.1139516>
- Spratt, D.E., Walden, H., Shaw, G.S., 2014. RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions. *Biochem J* 458, 421–437. <https://doi.org/10.1042/BJ20140006>
- Strickland, M., Watanabe, S., Bonn, S.M., Camara, C.M., Starich, M.R., Fushman, D., Carter, C.A., Tjandra, N., 2022. Tsg101/ESCRT-I recruitment regulated by the dual binding modes of K63-linked diubiquitin. *Structure* 30, 289–299.e6. <https://doi.org/10.1016/j.str.2021.09.006>

- Subik, K., Shu, L., Wu, C., Liang, Q., Hicks, D., Boyce, B., Schiffhauer, L., Chen, D., Chen, C., Tang, P., Xing, L., 2012. The ubiquitin E3 ligase WWP1 decreases CXCL12-mediated MDA231 breast cancer cell migration and bone metastasis. *Bone* 50, 813–823. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.12.022>
- Sudol, M., Hunter, T., 2000. NeW Wrinkles for an Old Domain. *Cell* 103, 1001–1004. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00203-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00203-8)
- Sun, C., Chen, Y., Gu, Q., Fu, Y., Wang, Y., Liu, C., Xie, H., Liao, Y., Zheng, Z., Liu, P., Li, M., 2024. UBE3C tunes autophagy via ATG4B ubiquitination. *Autophagy* 20, 645–658. <https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2299514>
- Sun, Y., Zhou, M., Fu, D., Xu, B., Fang, T., Ma, Y., Chen, J., Zhang, J., 2011. Ubiquitination of heat shock protein 27 is mediated by its interaction with Smad ubiquitination regulatory factor 2 in A549 cells. *Exp Lung Res* 37, 568–573. <https://doi.org/10.3109/01902148.2011.619627>
- Suzuki, C., Murakami, G., Fukuchi, M., Shimanuki, T., Shikauchi, Y., Imamura, T., Miyazono, K., 2002. Smurf1 Regulates the Inhibitory Activity of Smad7 by Targeting Smad7 to the Plasma Membrane\*210. *Journal of Biological Chemistry* 277, 39919–39925. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201901200>
- Swanson, K.A., Kang, R.S., Stamenova, S.D., Hicke, L., Radhakrishnan, I., 2003. Solution structure of Vps27 UIM-ubiquitin complex important for endosomal sorting and receptor downregulation. *EMBO J* 22, 4597–4606. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg471>
- Swatek, K.N., Komander, D., 2016. Ubiquitin modifications. *Cell Res* 26, 399–422. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.39>
- Tanno, H., Yamaguchi, T., Goto, E., Ishido, S., Komada, M., 2012. The Ankrd 13 family of UIM-bearing proteins regulates EGF receptor endocytosis from the plasma membrane. *MBoC* 23, 1343–1353. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-09-0817>
- Thorslund, T., Ripplinger, A., Hoffmann, S., Wild, T., Uckelmann, M., Villumsen, B., Narita, T., Sixma, T.K., Choudhary, C., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., 2015. Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature* 527, 389–393. <https://doi.org/10.1038/nature15401>
- Tofaris, G.K., Kim, H.T., Hourez, R., Jung, J.-W., Kim, K.P., Goldberg, A.L., 2011. Ubiquitin ligase Nedd4 promotes  $\alpha$ -synuclein degradation by the endosomal–lysosomal pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 17004–17009. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109356108>
- Tokunaga, F., 2013. Linear ubiquitination-mediated NF- $\kappa$ B regulation and its related disorders. *The Journal of Biochemistry* 154, 313–323. <https://doi.org/10.1093/jb/mvt079>
- Toma-Fukai, S., Hibi, R., Naganuma, T., Sakai, M., Saijo, S., Shimizu, N., Matsumoto, M., Shimizu, T., 2020. Crystal structure of GCN5 PCAF N-terminal domain reveals atypical ubiquitin ligase structure. *J Biol Chem* 295, 14630–14639. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013431>
- Toma-Fukai, S., Shimizu, T., 2021. Structural Diversity of Ubiquitin E3 Ligase. *Molecules* 26, 6682. <https://doi.org/10.3390/molecules26216682>
- Totland, M.Z., Knudsen, L.M., Rasmussen, N.L., Omori, Y., Sørensen, V., Elster, V.C.W., Stenersen, J.M., Larsen, M., Jensen, C.L., Zickfeldt Lade, A.A., Bruusgaard, E., Basing, S., Kryeziu, K., Brech, A., Aasen, T., Lothe, R.A., Leithe, E., 2024. The E3 ubiquitin ligase ITCH negatively regulates intercellular communication via gap junctions by targeting connexin43 for lysosomal degradation. *Cell Mol Life Sci* 81, 171. <https://doi.org/10.1007/s00018-024-05165-8>

- Tu, J., Zhang, B., Fang, G., Chang, W., Zhao, Y., 2020. Neddylation-mediated Nedd4-2 activation regulates ubiquitination modification of renal NBCe1. *Experimental cell research*. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111958>
- Ulrich, H.D., Walden, H., 2010. Ubiquitin signalling in DNA replication and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 479–489. <https://doi.org/10.1038/nrm2921>
- Vecchione, A., Marchese, A., Henry, P., Rotin, D., Morrione, A., 2003. The Grb10/Nedd4 complex regulates ligand-induced ubiquitination and stability of the insulin-like growth factor I receptor. *Mol Cell Biol* 23, 3363–3372. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.9.3363-3372.2003>
- Verdaguer, N., Corbalan-Garcia, S., Ochoa, W.F., Fita, I., Gómez-Fernández, J.C., 1999. Ca(2+) bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase Calpha directly to phosphatidylserine. *EMBO J* 18, 6329–6338. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.22.6329>
- Verdecia, M.A., Joazeiro, C.A.P., Wells, N.J., Ferrer, J.-L., Bowman, M.E., Hunter, T., Noel, J.P., 2003. Conformational flexibility underlies ubiquitin ligation mediated by the WWP1 HECT domain E3 ligase. *Mol Cell* 11, 249–259. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00774-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00774-8)
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., Zhang, Y., 2004. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431, 873–878. <https://doi.org/10.1038/nature02985>
- Wang, Q., Liu, X., Cui, Y., Tang, Y., Chen, W., Li, S., Yu, H., Pan, Y., Wang, C., 2014. The E3 ubiquitin ligase AMFR and INSIG1 bridge the activation of TBK1 kinase by modifying the adaptor STING. *Immunity* 41, 919–933. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.11.011>
- Wang, X., Trotman, L., Koppie, T., Alimonti, A., Gao, Z., Wang, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P.P., Jiang, X., 2007. NEDD4-1 Is a Proto-Oncogenic Ubiquitin Ligase for PTEN. *Cell* 128, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.039>
- Wang, Z., Liu, Z., Chen, X., Li, J., Yao, W., Huang, S., Gu, A., Lei, Q.-Y., Mao, Y., Wen, W., 2019. A multi-lock inhibitory mechanism for fine-tuning enzyme activities of the HECT family E3 ligases. *Nat Commun* 10, 3162. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11224-7>
- Wang, Z., Spoel, S.H., 2022. HECT ubiquitin ligases as accessory proteins of the plant proteasome. *Essays in Biochemistry* 66, 135–145. <https://doi.org/10.1042/EBC20210064>
- Wang, Z., Wang, J., Li, X., Xing, L., Ding, Y., Shi, P., Zhang, Y., Guo, S., Shu, X., Shan, B., 2014. Bortezomib prevents oncogenesis and bone metastasis of prostate cancer by inhibiting WWP1, Smurf1 and Smurf2. *International Journal of Oncology* 45, 1469–1478. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2545>
- Weber, J., Polo, S., Maspero, E., 2019. HECT E3 Ligases: A Tale With Multiple Facets. *Front Physiol* 10, 370. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00370>
- Wiesner, S., Ogunjimi, A.A., Wang, H.-R., Rotin, D., Sicheri, F., Wrana, J.L., Forman-Kay, J.D., 2007. Autoinhibition of the HECT-Type Ubiquitin Ligase Smurf2 through Its C2 Domain. *Cell* 130, 651–662. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.050>
- Woelk, T., Oldrini, B., Maspero, E., Confalonieri, S., Cavallaro, E., Di Fiore, P.P., Polo, S., 2006. Molecular mechanisms of coupled monoubiquitination. *Nat Cell Biol* 8, 1246–1254. <https://doi.org/10.1038/ncb1484>
- Won, M., Park, K.A., Kim, S., Ju, E., Ko, Y., Yoo, H., Ro, H., Lee, J., Oh, J., Lee, E.G., Kim, S.Y., Nam, S.W., Shen, H.-M., Yeo, M.-K., Kim, J.M., Hur, G.M., 2021. ANKRD13a controls early cell-death checkpoint by interacting with RIP1 independent of NF-κB. *Cell Death Differ*. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00906-9>

- Wu, Q., Huang, J.H., Sampson, E.R., Kim, K.-O.K., Zuscik, M.J., O'Keefe, R.J., Chen, D., Rosier, R.N., 2009. Smurf2 induces degradation of GSK-3 $\beta$  and upregulates  $\beta$ -catenin in chondrocytes: a potential mechanism for Smurf2-induced degeneration of articular cartilage. *Exp Cell Res* 315, 2386–2398. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.05.019>
- Wu, W., Nishikawa, H., Hayami, R., Sato, K., Honda, A., Aratani, S., Nakajima, T., Fukuda, M., Ohta, T., 2007. BRCA1 ubiquitinates RPB8 in response to DNA damage. *Cancer Res* 67, 951–958. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3187>
- Wu, Z., Zan, P., Li, S., Liu, J., Wang, J., Chen, D., Wang, H., Qian, Y., Luo, L., Huang, X., 2015. Knockdown of WWP1 inhibits growth and invasion, but induces apoptosis of osteosarcoma cells. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 7869–7877.
- Xia, Y., Chang, X., Lian, S., Zhu, W., 2018. WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1 depletion evokes antitumor effect in cutaneous squamous cell carcinoma by inhibiting signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway. *J Int Med Res* 46, 2898–2912. <https://doi.org/10.1177/0300060518778905>
- Xiao, J., Shi, Q., Li, W., Mu, X., Peng, J., Li, M., Chen, M., Huang, H., Wang, C., Gao, K., Fan, J., 2018. ARRDC1 and ARRDC3 act as tumor suppressors in renal cell carcinoma by facilitating YAP1 degradation. *Am J Cancer Res* 8, 132–143.
- Xie, P., Zhang, M., He, S., Lu, K., Chen, Y., Xing, G., Lu, Y., Liu, P., Li, Y., Wang, S., Chai, N., Wu, J., Deng, H., Wang, H.-R., Cao, Y., Zhao, F., Cui, Y., Wang, J., He, F., Zhang, L., 2014. The covalent modifier Nedd8 is critical for the activation of Smurf1 ubiquitin ligase in tumorigenesis. *Nat Commun* 5, 3733. <https://doi.org/10.1038/ncomms4733>
- Xu, H., Wang, W., Li, C., Yu, H., Yang, A., Wang, B., Jin, Y., 2009. WWP2 promotes degradation of transcription factor OCT4 in human embryonic stem cells. *Cell Res* 19, 561–573. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.31>
- Xu, H.M., Liao, B., Zhang, Q.J., Wang, B.B., Li, H., Zhong, X.M., Sheng, H.Z., Zhao, Y.X., Zhao, Y.M., Jin, Y., 2004. Wwp2, an E3 ubiquitin ligase that targets transcription factor Oct-4 for ubiquitination. *J Biol Chem* 279, 23495–23503. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400516200>
- Xu, P., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., Peng, J., 2009. Quantitative Proteomics Reveals the Function of Unconventional Ubiquitin Chains in Proteasomal Degradation. *Cell* 137, 133–145. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.041>
- Xu, Y., Qu, M., He, Y., He, Q., Shen, T., Luo, J., Tan, D., Bao, H., Xu, C., Ji, X., Hu, X., Barkat, M.Q., Zeng, L.-H., Wu, X., 2023. Smurf1 polyubiquitinates on K285/K282 of the kinases Mst1/2 to attenuate their tumor-suppressor functions. *J Biol Chem* 299, 105395. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105395>
- Xu, Z., Guo, Y., Wang, L., Cui, J., 2024. HECW1 restrains cervical cancer cell growth by promoting DVL1 ubiquitination and downregulating the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Experimental Cell Research* 435, 113949. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2024.113949>
- Yang, C., Wang, X., 2021. Lysosome biogenesis: Regulation and functions. *Journal of Cell Biology* 220, e202102001. <https://doi.org/10.1083/jcb.202102001>
- Yau, R.G., Doerner, K., Castellanos, E.R., Haakonsen, D.L., Werner, A., Wang, N., Yang, X.W., Martinez-Martin, N., Matsumoto, M.L., Dixit, V.M., Rape, M., 2017. Assembly and Function of Heterotypic Ubiquitin Chains in Cell-Cycle and Protein Quality Control. *Cell* 171, 918-933.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.040>
- Yeung, B., Ho, K.-C., Yang, X., 2013. WWP1 E3 Ligase Targets LATS1 for Ubiquitin-Mediated Degradation in Breast Cancer Cells. *PLOS ONE* 8, e61027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061027>



- You, S., Xu, J., Guo, Y., Guo, X., Zhang, Y., Zhang, N., Sun, G., Sun, Y., 2024. E3 ubiquitin ligase WWP2 as a promising therapeutic target for diverse human diseases. *Molecular Aspects of Medicine* 96, 101257. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2024.101257>
- Yu, J.-J., Zhou, D.-D., Yang, X.-X., Cui, B., Tan, F.-W., Wang, J., Li, K., Shang, S., Zhang, C., Lv, X.-X., Zhang, X.-W., Liu, S.-S., Yu, J.-M., Wang, F., Huang, B., Hua, F., Hu, Z.-W., 2020. TRIB3-EGFR interaction promotes lung cancer progression and defines a therapeutic target. *Nat Commun* 11, 3660. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17385-0>
- Yu, L., Chen, Y., Tooze, S.A., 2018. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy* 14, 207–215. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1378838>
- Yuan, W.-C., Lee, Y.-R., Lin, S.-Y., Chang, L.-Y., Tan, Y.P., Hung, C.-C., Kuo, J.-C., Liu, C.-H., Lin, M.-Y., Xu, M., Chen, Z.J., Chen, R.-H., 2014. K33-Linked Polyubiquitination of Coronin 7 by Cul3-KLHL20 Ubiquitin E3 Ligase Regulates Protein Trafficking. *Molecular Cell* 54, 586–600. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.035>
- Yunus, A.A., Lima, C.D., 2009. Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 Ligase Siz1 and Determinants Required for SUMO Modification of PCNA. *Molecular Cell* 35, 669–682. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.07.013>
- Zaarour, R.F., Chirivino, D., Maestro, L.D., Daviet, L., Atfi, A., Louvard, D., Arpin, M., 2012. Ezrin Ubiquitylation by the E3 Ubiquitin Ligase, WWP1, and Consequent Regulation of Hepatocyte Growth Factor Receptor Activity. *PLOS ONE* 7, e37490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037490>
- Zhang, L., Qin, Y., Wu, G., Wang, J., Cao, J., Wang, Y., Wu, D., Yang, K., Zhao, Z., He, L., Lyu, J., Li, H., Gu, H., 2020. PRRG4 promotes breast cancer metastasis through the recruitment of NEDD4 and downregulation of Robo1. *Oncogene* 39, 7196–7208. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01494-7>
- Zhang, L., Wu, Z., Ma, Z., Liu, H., Wu, Y., Zhang, Q., 2015. WWP1 as a potential tumor oncogene regulates PTEN-Akt signaling pathway in human gastric carcinoma. *Tumor Biol.* 36, 787–798. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2696-0>
- Zhang, X.-F., Chao, J., Pan, Q.-Z., Pan, K., Weng, D.-S., Wang, Q.-J., Zhao, J.-J., He, J., Liu, Q., Jiang, S.-S., Chen, C.-L., Zhang, H.-X., Xia, J.-C., 2015. Overexpression of WWP1 promotes tumorigenesis and predicts unfavorable prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 6, 40920–40933. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5712>
- Zhang, Y., Chang, C., Gehling, D.J., Hemmati-Brivanlou, A., Derynck, R., 2001. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 974–979. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.974>
- Zhao, D., Zhong, G., Li, J., Pan, J., Zhao, Y., Song, H., Sun, W., Jin, X., Li, Yuheng, Du, R., Nie, J., Liu, T., Zheng, J., Jia, Y., Liu, Zifan, Liu, W., Yuan, X., Liu, Zizhong, Song, J., Kan, G., Li, Youyou, Liu, C., Gao, X., Xing, W., Chang, Y.-Z., Li, Yingxian, Ling, S., 2021. Targeting E3 Ubiquitin Ligase WWP1 Prevents Cardiac Hypertrophy Through Destabilizing DVL2 via Inhibition of K27-Linked Ubiquitination. *Circulation* 144, 694–711. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.054827>
- Zhao, L., Huang, J., Zhang, H., Wang, Y., Matesic, L.E., Takahata, M., Awad, H., Chen, D., Xing, L., 2011. Tumor necrosis factor inhibits mesenchymal stem cell differentiation into osteoblasts via the ubiquitin E3 ligase Wwp1. *Stem Cells* 29, 1601–1610. <https://doi.org/10.1002/stem.703>
- Zhao, P., Wang, M., An, J., Sun, H., Li, T., Li, D., 2019. A positive feedback loop of miR-30a-5p-WWP1-NF- $\kappa$ B in the regulation of glioma development. *Int J Biochem Cell Biol* 112, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.04.003>

- Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J.L., Thomsen, G.H., 1999. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 400, 687–693. <https://doi.org/10.1038/23293>
- Zhu, K., Shan, Z., Chen, X., Cai, Y., Cui, L., Yao, W., Wang, Z., Shi, P., Tian, C., Lou, J., Xie, Y., Wen, W., 2017. Allosteric auto-inhibition and activation of the Nedd4 family E3 ligase Itch. *EMBO Rep* 18, 1618–1630. <https://doi.org/10.15252/embr.201744454>
- Zou, J., Zhou, L., Le, Y., Fang, Zhi, Zhong, M., Nie, F., Wei, X., Zhang, X., Chen, Z., Cai, L., Wang, H., Xiong, J., Fang, Ziling, Xiang, X., 2023. WWP2 drives the progression of gastric cancer by facilitating the ubiquitination and degradation of LATS1 protein. *Cell Commun Signal* 21, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01050-2>
- Zucchelli, S., Codrich, M., Marcuzzi, F., Pinto, M., Vilotti, S., Biagioli, M., Ferrer, I., Gustincich, S., 2010. TRAF6 promotes atypical ubiquitination of mutant DJ-1 and alpha-synuclein and is localized to Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease brains. *Human Molecular Genetics* 19, 3759–3770. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq290>

**Résumé :**

L'ubiquitination joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en régulant la fonction et/ou la dégradation des protéines. Les E3 ubiquitine ligases sont les acteurs clés du mécanisme d'ubiquitination en transférant la molécule d'ubiquitine sur le substrat. Parmi les E3 ubiquitine ligases, WWP1 est fréquemment amplifiée dans de nombreux cancers, notamment les cancers mammaires, et est associée à un mauvais pronostic. En accord avec ces observations, WWP1 favorise la survie et la prolifération cellulaire et inhibe l'apoptose. Mes travaux de thèse ont permis d'identifier la protéine CYYR1, qui n'avait jusqu'à ce jour pas de fonction cellulaire connue, comme étant un nouveau régulateur de la E3 ubiquitine ligase WWP1. Nous montrons que CYYR1 interagit avec WWP1 de façon PY/WW-dépendante au niveau des endosomes tardifs, et que cette interaction conduit à l'induction de l'auto-polyubiquitination en chaîne K63 de WWP1 et à sa dégradation lysosomale. Par ailleurs, nous observons que la protéine à domaine UIM, ANKRD13A, lie CYYR1 et la forme polyubiquitinée de WWP1 et est impliquée dans la dégradation de WWP1 induite par CYYR1. De plus, nous montrons que l'expression de CYYR1 limite la croissance des cellules cancéreuses mammaires dépendante et indépendante d'ancrage *via* ses motifs PY. Enfin, nous observons que l'expression de *CYYR1* est diminuée dans les cancers mammaires et associée à un pronostic favorable. Ensemble, mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme de régulation de la E3 ubiquitine ligase WWP1 impliquée dans la tumorigenèse.

**Mots-clés :** E3 ubiquitine ligase, WWP1, CYYR1, ubiquitination, cancer mammaire

**Characterization of a new mechanism of regulation for the E3 ubiquitin ligase WWP1 implicated in tumorigenesis.****Abstract:**

Ubiquitination plays a crucial role in cellular homeostasis by regulating the function and/or the degradation of proteins. E3 ubiquitin ligases are key component of the ubiquitination reaction by transferring the ubiquitin molecule on the substrate. Among E3 ubiquitin ligases, WWP1 is frequently amplified in numerous cancers, such as breast cancers, and associated with poor prognosis. Consistent with these observations, WWP1 stimulates cell proliferation and survival and inhibits apoptosis. My thesis works led to identify the protein CYYR1, which as to date no know cellular function, as a novel regulator for the E3 ubiquitin ligase WWP1. We show that CYYR1 interacts with WWP1 in a PY/WW-dependent manner at late endosomes and that this interaction leads to induce the K63-linked auto-polyubiquitination of WWP1 resulting to its lysosomal degradation. Furthermore, we observe that the UIM-containing protein ANKRD13A binds CYYR1 and the polyubiquitinated form of WWP1 and is implicated in CYYR1-mediated WWP1 degradation. Moreover, we show that CYYR1 limits breast cancer anchorage-dependent an independent cell growth *via* its PY motifs. Finally, we highlight that *CYYR1* expression is decreased in breast cancer and is associated with beneficial clinical outcome. Taken together, my thesis works describe a novel mechanism of regulation for the E3 ubiquitin ligase WWP1 implicated in tumorigenesis.

**Keywords:** E3 ubiquitin ligase, WWP1, CYYR1, ubiquitination, breast cancer