



**HAL**  
open science

# La protéine ING2 : Nouvelles fonctions suppressives de tumeurs et régulation par sumoylation.

Damien Ythier

► **To cite this version:**

Damien Ythier. La protéine ING2 : Nouvelles fonctions suppressives de tumeurs et régulation par sumoylation.. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT : . tel-00448002

**HAL Id: tel-00448002**

**<https://theses.hal.science/tel-00448002>**

Submitted on 18 Jan 2010

**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.

# THESE

présentée pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER DE GRENOBLE  
(arrêtés ministériels du 07 août 2006)

Présentée et soutenue publiquement par

**Mr Damien YTHIER**

Le 06 Octobre 2009

## **La protéine ING2 : Nouvelles fonctions suppressives de tumeurs et régulation par sumoylation.**

Directeurs : Dr. Rémy PEDEUX et Dr. Sylvie GAZZERI

### **JURY**

Dr. Jean-François DORE  
Dr. Robert DANTE  
Dr. Marc PIECHACZYK  
Dr. Fabienne HANS  
Dr. Rémy PEDEUX  
Dr. Sylvie GAZZERI

Rapporteur  
Rapporteur  
Président du jury  
Examineur  
Examineur  
Examineur

Thèse réalisée au sein du laboratoire : Bases moléculaires de la progression des cancers du poumon  
(INSERM U-823), Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, Grenoble 1.



**A ma femme et ma famille...**

## **Remerciements,**

*Je remercie les Docteurs Jean-François DORE et Robert DANTE d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse, ainsi que les Docteurs Fabienne HANS et Marc PIECHACZYC pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.*

*J'exprime ma reconnaissance toute particulière aux Docteurs Sylvie GAZZERI et Rémy PEDEUX pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce doctorat, mais aussi pour la confiance qu'ils m'ont faite et les conditions de travail irréprochables qu'ils ont mises à ma disposition.*

*Je remercie les Docteurs Or GOZANI, Olivier BINDA et Curtis HARRIS pour nos collaborations fructueuses.*

*Je remercie tous les membres de l'U-578 devenue U-823 depuis, ainsi que tous ceux qui ont participé de loin ou de près à ces travaux.*

*Je dis MILLE MERCIS à Delphine LARRIEU et Romuald BINET pour leur précieuse aide à tout les niveaux, notamment pendant mes quelques mois de convalescence, ainsi que pour leur soutien, leur disponibilité, leur bonne humeur et surtout pour les quelques fous rires mémorables. Encore merci!*

*Enfin, j'exprime ma plus profonde reconnaissance à ma femme Karen ainsi qu'à mes parents, pour leur soutien indéfectible, sans lequel tout ça ne serait pas arrivé.*

## RESUME

Les gènes de la famille ING : « INhibitor of Growth » (ING1-5) jouent un rôle crucial dans l'inhibition de la prolifération cellulaire, en régulant notamment le cycle cellulaire, l'apoptose et la sénescence. De plus, plusieurs études (portant majoritairement sur ING1) montrent que ces gènes sont fréquemment perdus dans de nombreux cancers. Ils pourraient donc être impliqués dans l'émergence et le développement de tumeurs. Ainsi, l'objectif de mon projet de thèse était d'étudier le gène ING2, afin d'évaluer son intérêt en cancérogénèse.

Nous avons tout d'abord montré que l'expression d'ING2 (ARN et protéique) est perdue dans plus de la moitié des cancers bronchiques non à petites cellules, confortant ainsi un rôle d'ING2 comme gène suppresseur de tumeurs. Par ailleurs, nous avons montré que l'inhibition de l'expression d'ING2 conduit à des défauts de réplication et à une forte augmentation de l'instabilité génomique, mettant ainsi en évidence pour la première fois qu'ING2 est un gène suppresseur de tumeurs de type « caretaker ». Ceci permet aussi pour la première fois d'expliquer comment l'inactivation des ING, observée dans les tumeurs, pourrait contribuer à la cancérogénèse. Enfin, nous avons mis en évidence le premier mécanisme de régulation post-traductionnelle d'ING2. En effet, ING2 peut être sumoylée, et cette sumoylation est nécessaire pour son association avec le complexe de régulation Sin3A/HDAC afin de cibler ce dernier au niveau des promoteurs de gènes pour réguler leur expression.

Ces travaux ont donc contribué à démontrer l'intérêt d'ING2 en cancérogénèse et à mieux comprendre ses fonctions suppressives de tumeurs. De plus, ils ont permis d'ouvrir plusieurs voies d'investigation sur les fonctions et les mécanismes de régulation des protéines ING.

# Table des matières

<b>LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS .....</b>	<b>10</b>
<b>FIGURES ET TABLEAU .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>12</b>
<b>1. Présentation de la famille ING.....</b>	<b>12</b>
1.1. Découverte d'ING1.....	12
1.2. Mise en évidence des autres membres de la famille ING : ING2-5. ....	13
1.3. Organisation et structure des gènes ING.....	14
1.4. Structure des protéines ING. ....	17
1.5. Phylogénie des protéines ING.....	20
<b>2. Partenaires et fonctions des protéines ING.....</b>	<b>20</b>
2.1. Les protéines ING répriment la prolifération cellulaire. ....	21
2.2. ING2 est un récepteur nucléaire des phosphoinositides phosphates.....	23
2.3. Les protéines ING sont associées aux complexes HAT et HDAC.....	24
2.4. Les protéines ING, via leur PHD, sont des interprètes du code histone.....	26
2.4.1. Nucléosome, code histone et remodelage de la chromatine. ....	26
2.4.2. Les PHD des ING reconnaissent spécifiquement les formes méthylées de l'histone 3.	27
2.4.3. Fonction de l'interaction entre le PHD des ING et H3K4me3. ....	29
2.5. Les protéines ING et la réparation de l'ADN.....	31
<b>3. Mécanismes de régulation des ING.....</b>	<b>33</b>
3.1. Localisation subcellulaire. ....	33

3.2. La sumoylation.....	34
3.2.1. La famille des protéines SUMO.....	35
3.2.2. La réaction de sumoylation.....	35
3.2.3. Le site de sumoylation.....	39
3.2.4. Conséquences moléculaires de la sumoylation.....	40
3.2.5. Quelques exemples de fonctions de la sumoylation.....	42
<b>4. Les gènes ING sont-ils des gènes suppresseurs de tumeurs ? .....</b>	<b>43</b>
4.1. Les étapes de la carcinogénèse.....	43
4.2. Statut et fonction des gènes ING dans les tumeurs. (Publication n°1).....	44
4.3. Carcinogénèse Pulmonaire.....	53
4.3.1. Données épidémiologiques.....	53
4.3.2. Classification histologique.....	54
4.3.3. Principales caractéristiques moléculaires de la carcinogénèse pulmonaire.....	55
4.3.3.1. Susceptibilité.....	55
4.3.3.2. Principales voies suppressives de tumeurs inactivées dans les cancers du poumon.....	56
4.3.3.3. Principales voies oncogéniques activées dans les cancers du poumon.....	58
4.3.3.4. Les étapes de la carcinogénèse pulmonaire.....	60
<b>RESULTATS.....</b>	<b>62</b>
<b>1. Mécanisme de régulation d'ING2 par sumoylation. ....</b>	<b>62</b>
1.1. Résumé des principaux résultats.....	62
1.2. Manuscrit de la publication n°2.....	65
<b>2. Statut et fonctions des protéines ING dans la cancérogénèse. ....</b>	<b>91</b>
2.1. Statut d'ING2 dans les cancers du poumon.....	91
2.1.1. Résumé des principaux résultats.....	91
2.1.2. Manuscrit de la publication n°3.....	93
2.2. Rôle d'ING2 dans la stabilité du génome.....	121
2.2.1. Résumé des principaux résultats.....	121
2.2.2. Manuscrit de la publication n°4.....	123



<b>DISCUSSION .....</b>	<b>131</b>
<b>1. Rôle d'ING2 dans les pathologies cancéreuses. ....</b>	<b>132</b>
1.1. Statut de la protéine ING2 dans les tumeurs.....	132
1.2. Mécanisme d'inactivation d'ING2 dans les tumeurs. ....	133
<b>2. Mise en évidence du rôle de gène suppresseur de tumeurs d'ING2 en tant que « Caretaker ».135</b>	
2.1. ING2 est nécessaire au maintien de l'intégrité du génome.....	135
2.2. Implication d'ING2 dans la réplication.....	137
<b>3. Mise en évidence d'un nouveau mécanisme de régulation d'ING2 par sumoylation. ....</b>	<b>139</b>
3.1. ING2 est modifiée post-traductionnellement par sumoylation. ....	140
3.2. Conséquences de la sumoylation d'ING2. ....	141
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>144</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>146</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>152</b>

## Liste des principales abréviations

ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc :	ADN <u>c</u> omplémentaire
ARN :	Acide RiboNucléique
ATP :	Adénosine TriPhosphate
ARNm :	ARN <u>m</u> essenger
ARNi :	ARN <u>i</u> nterférent
BrdU :	5-bromo-2-deoxyuridine
CEF :	Chromatin Enriched Fraction
ChIP :	<u>C</u> hromatin ImmunoPrecipitation
DSB :	Double Strand Break
FACS :	Fluorescence Activated Cell Sorter
HAT :	Histone AcétylTransférase
HDAC :	Histone DésAcétylase ou Histone DeAcétylase
IF :	ImmunoFluorescence
ING :	INHibitor of Growth
IHC :	ImmunoHistoChimie
IP :	ImmunoPrécipitation
kDa :	<u>k</u> iloDalton
NLS :	Nuclear Localisation Signal ou Nuclear Localisation Sequence
PCR :	Polymerase Chain Reaction
pb :	<u>p</u> aire de <u>b</u> ases
PHD :	Plant HomeoDomain
PIP :	PhosphoInositide Phosphate
PI5P :	PhosphoInositide-5-Phosphate
SUMO :	Small Ubiquitin-like MOdifier

## Figures et tableau

### Figures

- Figure 1 :** Localisation chromosomique des gènes ING.
- Figure 2 :** Structure des gènes ING et de leurs transcrits.
- Figure 3 :** Structure des protéines ING.
- Figure 4 :** Représentation schématique de la structure d'un PHD.
- Figure 5 :** Modèle du mode d'action d'ING2 dans la réponse au stress génotoxique.
- Figure 6 :** Schéma récapitulatif des différents complexes HAT et HDAC contenant des protéines ING chez la levure ou l'Homme.
- Figure 7 :** Alignement des séquences polypeptidiques du PHD des protéines ING humaines.
- Figure 8 :** Modèle de régulation de la localisation subcellulaire d'ING1.
- Figure 9 :** Schéma général du processus de sumoylation.
- Figure 10 :** Conséquences moléculaires de la sumoylation.
- Figure 11 :** Altération des voies suppressives de tumeurs dans la carcinogénèse bronchique.
- Figure 12 :** Accumulations d'altérations génomiques et étapes de la carcinogénèse des NSCLC.
- Figure 13 :** Fonctions suppressives de tumeurs d'ING2 de type « Caretaker » et « Gatekeeper ».

### Tableau

- Tableau 1 :** Principaux oncogènes impliqués dans la carcinogénèse pulmonaire.

# Introduction

## 1. Présentation de la famille ING.

### 1.1. Découverte d'ING1.

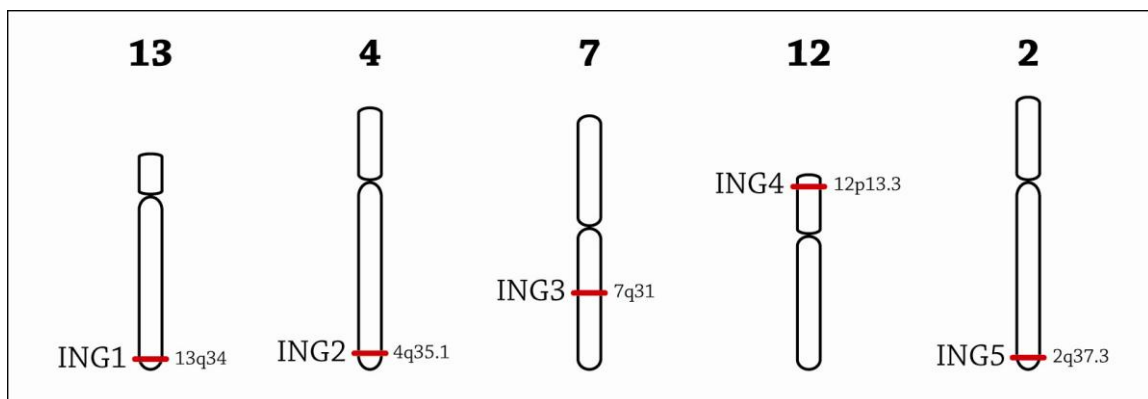
Le groupe qui a mis en évidence le gène ING1 (« INhibitor of Growth 1 »), cherchait à identifier des gènes suppresseurs de tumeurs, c'est-à-dire des gènes capables de promouvoir la transformation cellulaire lorsqu'ils sont inactivés. Pour identifier cette catégorie de gènes, le groupe de Dr Karl Riabowol est parti du principe que le passage d'une cellule préneoplasique à une cellule tumorale nécessite entre autre l'inactivation d'un ou plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs. Afin d'isoler spécifiquement ces gènes, ils ont réalisé une hybridation soustractive entre des ADNc générés à partir du transcriptome de cellules préneoplasiques et des ADNc générés à partir du transcriptome de cellules tumorales. Cette étape leur a donc permis d'isoler les ADNc issus des ARNm qui sont spécifiquement exprimés dans les cellules préneoplasiques mais plus dans les cellules tumorales. Ils ont alors cloné ces ADNc en anti-sens dans des vecteurs d'expression. Ces vecteurs exprimaient donc des ARN qui étaient complémentaires des ARNm exprimés dans les cellules préneoplasiques et étaient donc théoriquement capables d'inhiber leur expression. Pour cette raison ces vecteurs sont appelés éléments génétiques suppresseurs (EGS). Afin d'isoler quels gènes sont capables de faire passer à eux seuls une cellule du stade préneoplasique au stade tumoral lorsqu'ils sont réprimés, ils ont exprimé chacun de ces EGS dans des cellules préneoplasiques et ont injecté ces cellules à des souris. Si les souris développent des tumeurs, cela suppose que l'EGS correspondant inactive un gène qui permet à la cellule préneoplasique (incapable de former des tumeurs) de devenir tumorale (formant des tumeurs). C'est suite à l'analyse d'une des tumeurs qui se sont développées qu'ils ont isolé un EGS complémentaire du gène ING1.

Le gène ING1 a ensuite été cloné et des expériences complémentaires, dans lesquelles la protéine ING1 a été surexprimée, ont permis de mettre en évidence qu'elle

inhibe la prolifération cellulaire. En effet, des cellules surexprimant ING1 présentent une plus faible capacité à former des colonies et s'accumulent en phase G0/G1 du cycle cellulaire. Les auteurs de ces travaux ont donc proposé que le gène ING1 pourrait être un gène suppresseur de tumeurs (Garkavtsev et al., 1996).

## 1.2. Mise en évidence des autres membres de la famille ING : ING2-5.

La recherche d'homologie de séquence du gène ING1 dans les banques EST (« Expressed Sequence Tags ») a permis d'identifier quatre autres gènes dont les séquences présentes une forte homologie celle du gène ING1 : ING2, ING3, ING4 et ING5 (Nagashima et al., 2001; Nagashima et al., 2003; Shiseki et al., 2003). Ces cinq gènes de la famille ING sont localisés sur des chromosomes indépendants. En effet, le gène ING1 se trouve sur le chromosome 13 au locus 13q33-34, le gène ING2 sur le chromosome 4 au locus 4q35.1, le gène ING3 sur le chromosome 7 au locus 7q31, le gène ING4 sur le chromosome 12 au locus 12q13.3 et le gène ING5 sur le chromosome 2 au locus 2q37.3 (He et al., 2005) (Figure 1).



**Figure 1 : Localisation chromosomique des gènes ING.** Chaque gène ING (ING1-5) est représenté en rouge sur son chromosome, avec à gauche, son nom, et à droite, sa localisation. Le numéro des chromosomes est indiqué au-dessus. (Adapté d'après He et al., 2005)

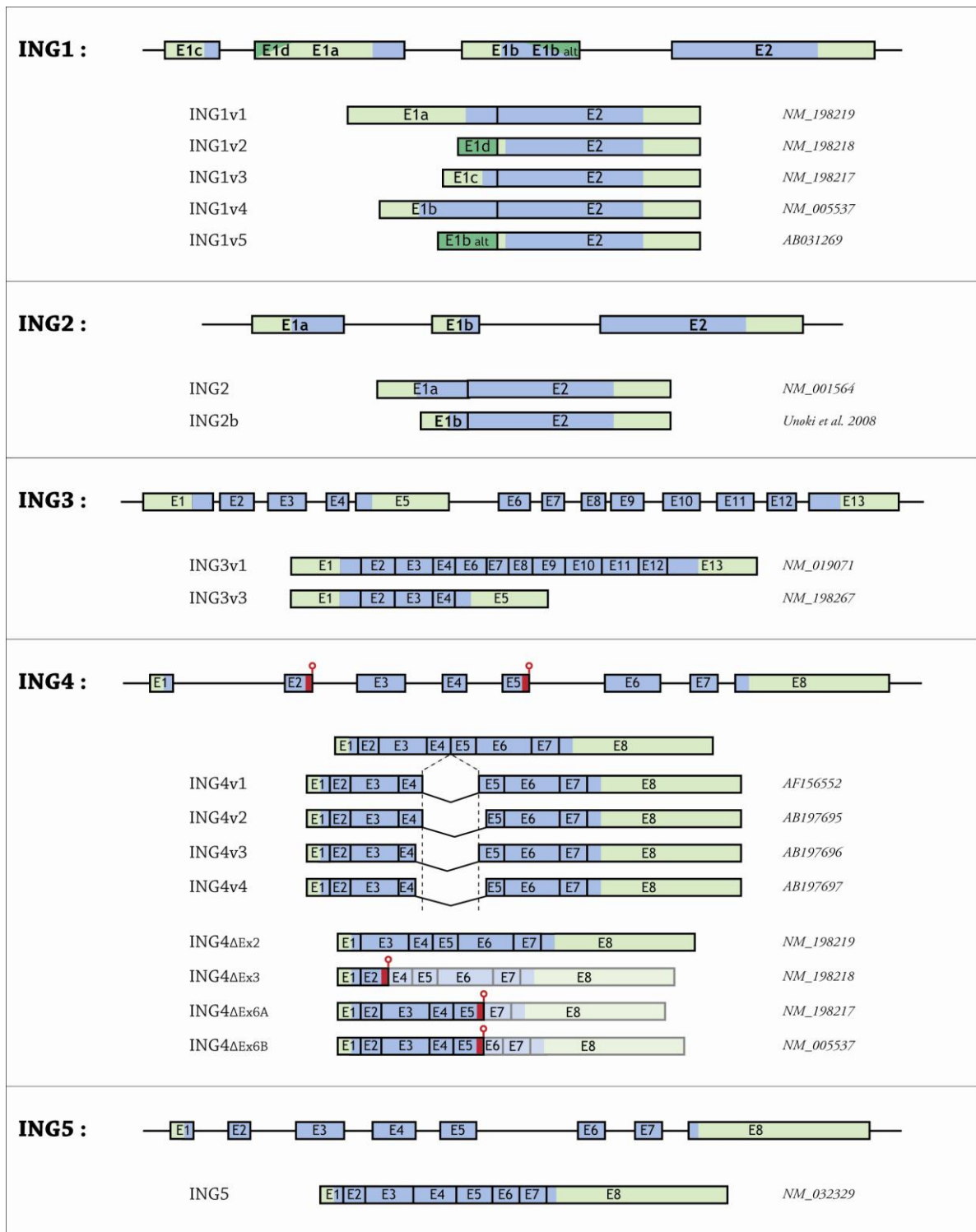
De manière intéressante, tous les gènes ING, à part ING3, se trouvent dans les régions subtélomériques de leur chromosome respectif. L'analyse du niveau d'homologie existant entre les séquences des gènes ING indique qu'ING1 et ING2 d'une part et ING4 et ING5 d'autre part présentent une très forte homologie entre eux et que ces quatre gènes partagent une homologie plus forte entre eux qu'avec ING3 (He et al., 2005). Ainsi, la localisation subtélomérique d'ING1, d'ING2, d'ING4 et d'ING5 et leur forte homologie laisse penser qu'ils pourraient résulter de duplications inter-chromosomiques. En revanche, la localisation chromosomique d'ING3 et sa plus faible homologie avec les autres protéines ING pourrait résulter d'une divergence beaucoup plus ancienne.

### **1.3. Organisation et structure des gènes ING.**

Depuis la découverte des gènes ING, plusieurs études ont montré que ces gènes expriment différents variants, résultant de promoteurs ou d'épissages alternatifs. Ainsi, la structure des gènes ING et les transcrits qu'ils expriment révèlent une certaine complexité (Figure 2).

#### **ING1**

Le gène ING1 est composé de quatre exons. Chacun des trois premiers exons (E1a, E1b et E1c) est sous le contrôle d'un promoteur différent. Ces trois exons peuvent être épissés avec l'exon 2 (E2) et permettre ainsi l'expression des trois transcrits ING1v1, ING1v3 et ING1v4, qui codent respectivement pour les protéines p33ING1b, p27ING1d et p47ING1a (Figure 3). Deux sites d'épissages alternatifs présents dans l'exon E1a ou E1b permettent l'expression de deux autres transcrits: ING1v2 et ING1v5 (Garkavtsev, 1999; Gunduz et al., 2000; Jager et al., 1999; Saito et al., 2000). Ces derniers sont sous le contrôle de deux promoteurs différents et présentent des séquences régulatrices 5'UTR différentes, mais curieusement, ils codent pour la même protéine p24ING1c.



**Figure 2 : Structure des gènes ING et de leurs transcrits.** La structure génomique de chaque gène ING est représentée avec en dessous la structure des différents transcrits qu'ils expriment. De part et d'autre de chaque transcrit est indiqué son nom (à gauche) et son numéro de référencement dans GenBank (à droite). Les différents exons (E) sont représentés par des rectangles au sein desquels les régions codantes et non codantes sont respectivement représentées en bleu ou vert. Les marques rouges représentent des codons STOP dont la présence dépend du type d'épissage réalisé. (*Adapté d'après Ythier et al., 2008*)

### **ING2**

Le gène ING2 est composé de trois exons (Figure 2). Chacun des deux exons 1a et 1b est épissé avec l'exon 2 et permet l'expression de deux transcrits distincts : ING2a et ING2b. Cependant, l'ARNm du variant ING2b est très faiblement exprimé et son expression au niveau protéique n'a pas été démontrée (Nagashima et al., 2001; Unoki et al., 2008).

### **ING3**

Le gène ING3 est composé de 13 exons (E1 à E13) (Figure 2). L'épissage des exons E1 à E4 entre eux, puis des exons E4 et E6, et enfin des exons E6 à E13 permet l'expression du transcrit ING3v1 (Nagashima et al., 2003). Un transcrit alternatif résultant d'un épissage alternatif des exons E1 à E5 entre eux a été décrit dans les banques EST (numéro d'accèsion NCBI : *NM\_198267*). Cependant, l'existence de ce variant n'a jamais été démontrée expérimentalement.

### **ING4**

Le gène ING4 est composé de 8 exons (E1 à E8) (Figure 2). Le transcrit ING4v1 est celui qui a été initialement identifié (Shiseki et al., 2003). Par la suite, un deuxième site donneur d'épissage ainsi qu'un deuxième site accepteur d'épissage ont été respectivement mis en évidence à la fin de l'exon 4 et au début de l'exon 5. La combinaison de ces différents sites d'épissages donne lieu à l'expression de quatre transcrits: ING4v1 à ING4v4 (Unoki et al., 2006). Ainsi, ING4v1 est le transcrit le plus long, ING4v2 présente une délétion des trois premiers nucléotides de l'exon 5, ING4v3 présente une délétion des neuf derniers nucléotides de l'exon 4 et enfin ING4v4 présente une délétion des neuf derniers nucléotides de l'exon 4 et des trois premiers nucléotides de l'exon 5. Récemment, quatre transcrits supplémentaires ont été décrits : ING4ΔEx2, ING4ΔEx3, ING4ΔEx6a et ING4ΔEx6b (Raho et al., 2007). ING4ΔEx2 est issu d'un épissage entre l'exon 1 et l'exon 3, induisant une délétion de l'exon 2. ING4ΔEx3 résulte d'un épissage entre l'exon 2 et l'exon 4 avec délétion de l'exon 3. La perte de l'exon 3 induit un décalage de cadre de lecture qui fait apparaître un codon STOP prématuré dans l'exon 4. ING4ΔEx6a et ING4ΔEx6b résulte d'un épissage entre l'exon 5



et l'exon 7 ou entre l'exon 5 et un site d'épissage accepteur alternatif présent à la fin de l'exon 6. Ces deux possibilités d'épissage induisent un décalage du cadre de lecture avec apparition de codons STOP prématurés dans l'exon 7 ou dans l'exon 6 des transcrits ING4ΔEx6a et ING4ΔEx6b respectivement.

### **ING5**

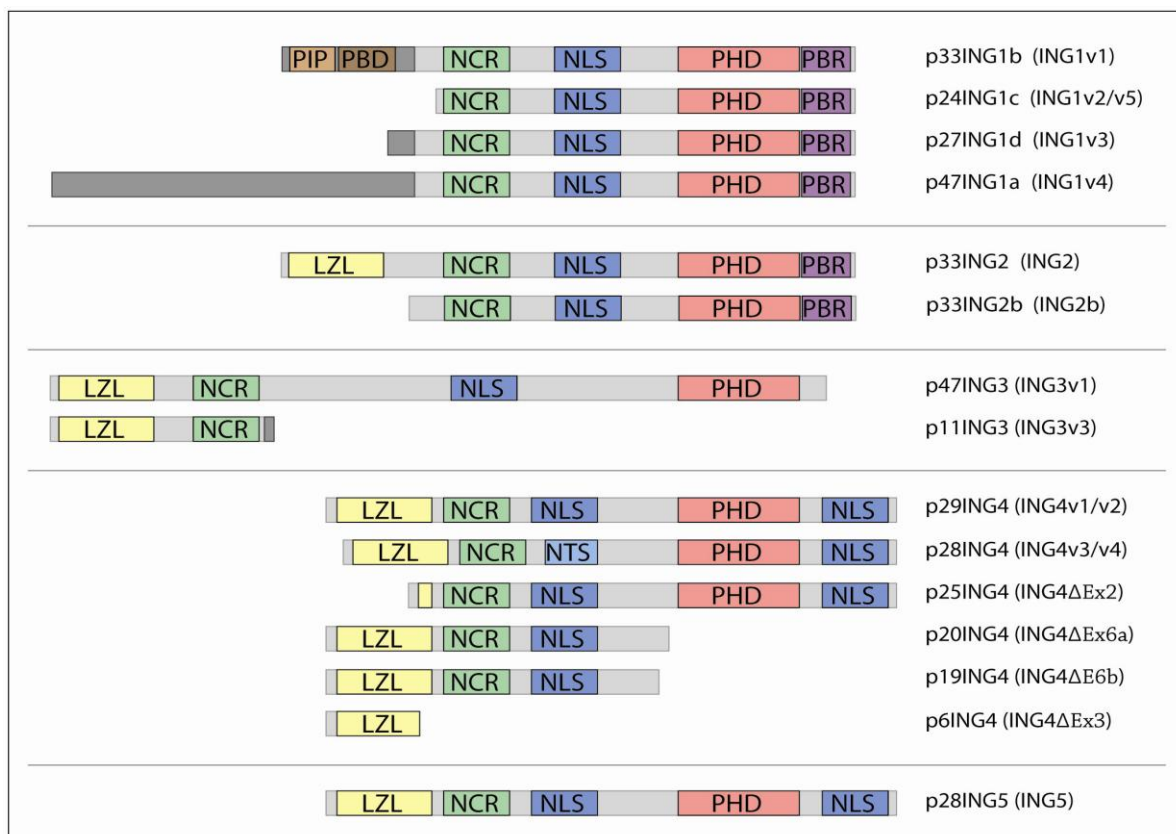
Le gène ING5 est composé de 8 exons (Figure 2). Actuellement, seul un transcrit d'ING5, résultant de l'épissage des 8 exons, a été décrit (Shiseki et al., 2003).

#### **1.4. Structure des protéines ING.**

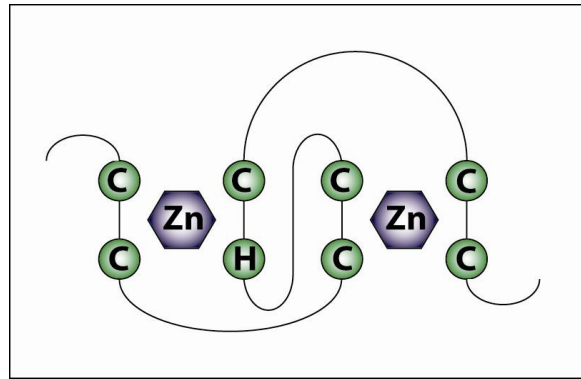
La caractéristique commune et hautement conservée au cours de l'évolution des protéines ING est la présence dans leur région C-terminale, d'un « Plant HomeoDomain » (PHD) (Figure 3). Les PHD ont une structure en doigt de zinc de type  $C_4HC_3$  (quatre cystéines (C), une histidine (H) et trois cystéines) (Figure 4). Ils sont connus pour être impliqués dans la formation de complexes ADN-protéines (Capili et al., 2001; Matthews and Sunde, 2002) et sont donc couramment retrouvés dans des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine (Bordoli et al., 2001; Kalkhoven et al., 2003). Dans le cas des protéines ING, leur PHD a été montré comme interagissant avec des marques spécifiques d'histones, tels que la mono, la di ou la triméthylation de la lysine 4 de la queue de l'histone 3 (H3K4me3) (Shi et al., 2006)(voir partie 2.4.3).

La deuxième structure la plus conservée dans les protéines ING est le domaine PCR (« Potential Chromatin Regulatory domain ») également appelée NCR (« Novel Conserved Region ») (Figure 3). Ce type de structure ne ressemble à aucune autre structure connue et semble de ce fait être spécifique aux protéines ING (He et al., 2005). Il a été proposé que ce domaine soit impliqué dans l'interaction des protéines ING avec les complexes HAT (Histone AcétylTransférase) ou HDAC (Histone Désacétylase). En effet, les 125 premiers acides

aminés de p33ING1b, qui contiennent la NCR, sont nécessaires pour son interaction avec la protéine Sap30, qui est un composant du complexe HDAC Sin3A/HDAC (Kuzmichev et al., 2002).



**Figure 3 : Structure des protéines ING.** Chaque protéine est représentée schématiquement et son nom ainsi que celui du transcrit qui la code (entre parenthèses) sont indiqués. Les différents domaines caractérisés sont représentés en couleur. Ainsi la partie C-terminale des protéines ING contient un « Plant HomeoDomain » (**PHD**) et une ou deux séquences de localisation nucléaire (**NLS**). L'extrémité C-terminale d'ING1 et d'ING2 contient une Région PolyBasique (**PBR**). Une petite région nommée Nouvelle Région Conservée (**NCR**) est présente dans la partie N-terminale des différentes protéines ING. L'extrémité N-terminale des protéines ING2 à ING5 contient un domaine de type leucine-zipper (**LZL** : « Leucine Zipper-Like motif »). Enfin, seul le variant p33ING1b possède un domaine d'interaction à PCNA (**PIP** : « PCNA-Interacting Protein motif ») et un BromoDomaine Partiel (**PBD**) à l'extrémité de sa partie N-terminale. (D'après Ythier et al., 2008)



**Figure 4 : Représentation schématique de la structure d'un PHD.** Les résidus cystéines (C) et le résidu histidine (H) impliqués dans l'interaction avec l'atome de zinc (Zn) sont représentés.

Une ou plusieurs séquences de localisation nucléaire : NLS (« Nuclear Localization Sequence ») sont retrouvées dans les protéines ING et sont responsables de leur adressage au noyau. Trois séquences de localisation nucléolaire (NTS: « Nucleolar Targetting Sequence ») sont présentes dans le NLS d'ING1, dont deux sont responsables de son adressage au nucléole en réponse au rayonnement UV (Scott et al., 2001a). Trois NTS potentielles sont également présentes dans le NLS d'ING2 et d'ING4.

Si les structures précédemment évoquées sont communes à toutes les protéines ING, il existe des domaines qui ne sont propres qu'à certaines d'entre elles. Un domaine de type LZL (« Leucine Zipper Like motif ») n'est retrouvé que sur les protéines ING2 à ING5. Ce type de domaine pourrait être impliqué dans l'interaction avec des partenaires protéiques. En effet, le LZL d'ING2 a été montré comme nécessaire pour les fonctions d'ING2 dans la réparation de l'ADN et l'apoptose, notamment en permettant l'association des protéines ING2, p300 et p53 au sein d'un même complexe (Wang et al., 2006b).

Les protéines ING1 et ING2 arborent un domaine PBR (« PolyBasic Region »), qui a été montré comme un domaine de liaison aux phosphoinositides phosphates (Gozani et al., 2003; Kaadige and Ayer, 2006) (voir partie 2.2).

Un PBD (« Partial BromoDomain »), dont la fonction est encore inconnue, ainsi qu'un domaine d'interaction à PCNA (PIP : « PCNA-Interacting Protein motif ») ne sont présents que sur p33ING1b. En réponse à des lésions de l'ADN causées par le rayonnement UV, le PIP

permet l'interaction entre ING1 et PCNA pour réguler l'apoptose (Scott et al., 2001b). La fonction du PBD est inconnue.

La forte homologie de la partie C-terminale des protéines ING, avec notamment la présence caractéristique d'un domaine NLS et d'un domaine PHD indique que les protéines ING doivent être impliquées dans des processus biologiques similaires. Cependant, la divergence de leur partie N-terminale suggère qu'au sein de ces processus elles doivent avoir des rôles qui leurs sont spécifiques.

### **1.5. Phylogénie des protéines ING.**

Suite à l'identification des gènes ING humains, trois gènes ING ont également été identifiés chez la levure (Yng1, Yng2 et Pho23) (Loewith et al., 2000). Par la suite, une analyse phylogénétique des gènes ING au sein de différentes espèces a été entreprise. Les séquences polypeptidiques des gènes ING humains ont été comparées à toutes les banques de séquences polypeptidiques de différents organismes (He et al., 2005). Ainsi, soixante séquences polypeptidiques présentant une forte homologie avec les protéines ING ont été identifiées dans des organismes allant de la levure jusqu'à l'homme en passant par les plantes, les champignons, le nématode, la drosophile, le xénope et les rongeurs. La haute conservation des protéines ING au cours de l'évolution suggère qu'elles doivent jouer des fonctions biologiques cruciales.

## **2. Partenaires et fonctions des protéines ING.**

Depuis leur découverte, les protéines ING ont été impliquées dans diverses fonctions. Cependant, aucune activité enzymatique propre des ING n'a été identifiée. Ainsi, leurs

fonctions connues sont directement liées aux partenaires protéiques avec lesquels elles interagissent.

### **2.1. Les protéines ING répriment la prolifération cellulaire.**

Suite à la découverte du gène ING1, les premières études fonctionnelles ont montré que la surexpression du variant p33ING1b dans des cellules contenant une protéine p53 intacte induisait un arrêt de leur prolifération. En revanche, la surexpression de p33ING1b dans ces mêmes cellules, après inactivation de la protéine p53 par l'antigène grand T du SV40, n'était pas capable d'induire un arrêt de prolifération. Des expériences d'immunoprécipitation ont montré que p33ING1b interagit physiquement avec p53 et qu'elle est nécessaire pour l'activité transcriptionnelle de p53 vis-à-vis de son gène cible p21WAF1 (Garkavtsev et al., 1998). Par la suite, lors de leur mise en évidence, toutes les protéines ING : ING2-ING5 ont été montrées comme capables, suite à leur surexpression, d'induire un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose cellulaire de manière dépendante de p53. Toutes les protéines ING sauf ING3 peuvent augmenter le niveau d'acétylation de p53 sur sa lysine 382 et donc augmenter son activité transcriptionnelle vis-à-vis de ses gènes cibles p21WAF1 et Bax. Plusieurs mécanismes contribuant à cette activation ont été décrits. D'une part p33ING1b peut séquestrer l'histone désacétylase hSir2 pour l'empêcher de désacétyler p53 (Kataoka et al., 2003). D'autre part p33ING1b peut également interagir avec MDM2 pour l'empêcher d'ubiquitiner p53 et donc d'induire sa dégradation par le protéasome (Leung et al., 2002). Enfin, p33ING1b, ING2, ING4 et ING5 interagissent avec l'acétylase p300. Dans le cas d'ING2 il a été montré qu'elle peut augmenter l'acétylation de p53 par p300 *in vitro* (Pedeux et al., 2005). Ainsi, il a été proposé que les protéines ING peuvent interagir avec p300 afin d'acétyler et donc d'activer p53.

p33ING1b et ING2 sont également impliquées dans les voies de p53 pour réguler la sénescence répliquative. En effet, une augmentation de l'expression de p33ING1b et d'ING2 ainsi qu'une augmentation de l'acétylation de p53 sont observées au cours de la sénescence. La surexpression de p33ING1b ou d'ING2 dans des fibroblastes jeunes induit l'entrée prématurée en sénescence de ces fibroblastes. A l'inverse, l'inhibition de l'expression de

p33ING1b ou d'ING2 dans des fibroblastes pré-sénescents, retarde de plusieurs doublements de population leur entrée en sénescence (Garkavtsev and Riabowol, 1997; Pedoux et al., 2005). Très récemment, il a été montré qu'au cours de la sénescence le ratio d'expression des variants p47ING1a:p33ING1b est augmenté de trente fois et que ce changement d'équilibre résulte d'un changement de régulation de l'épissage en faveur de p47ING1a. Les auteurs de cette étude montrent que p47ING1a inhibe la capacité de p33ING1b à induire l'apoptose et favorise ainsi l'entrée des cellules en sénescence. Leur étude suggère donc que l'activation préférentielle des voies de signalisation proapoptotiques au détriment de l'entrée en sénescence peut être régulée par la balance d'expression entre ces deux variants, et donc, que certaines fonctions du gène ING1 sont dépendantes de son épissage (Soliman et al., 2008).

Toutes les études précédemment citées s'accordent à impliquer les protéines ING dans les voies de suppression de tumeurs de p53. Cependant, ces données sont à interpréter avec prudence. En effet, deux études récemment réalisées sur des souris dans lesquelles le gène ING1 a été invalidé montrent que dans des conditions physiologiques, les fonctions d'ING1 sont majoritairement indépendantes de p53. En effet, l'inactivation d'ING1 conduit à une augmentation de la prolifération aussi bien en présence qu'en absence de p53. L'inactivation d'ING1 n'affecte pas non plus les fonctions de p53, telles que l'induction de la sénescence en réponse à un stress oncogénique ou encore l'arrêt de la prolifération suite à un stress génotoxique (Coles et al., 2007; Kichina et al., 2006). Pour le moment il n'y a pas d'évidence claire permettant d'expliquer ces observations en apparence contradictoires. Cependant, les premières études ayant impliqué les protéines ING dans les voies suppressives de tumeur de p53 reposaient sur des modèles de surexpression des protéines ING, alors que dans les études de Coles et de Kichina, l'expression d'ING1 a été inactivée. Une partie de mes travaux de thèse ayant permis d'apporter quelques éléments de réponse quant aux résultats contradictoires obtenus par surexpression ou par l'inhibition d'expression des protéines ING, cet aspect est plus amplement abordé dans la partie discussion (Discussion, partie 2.2)

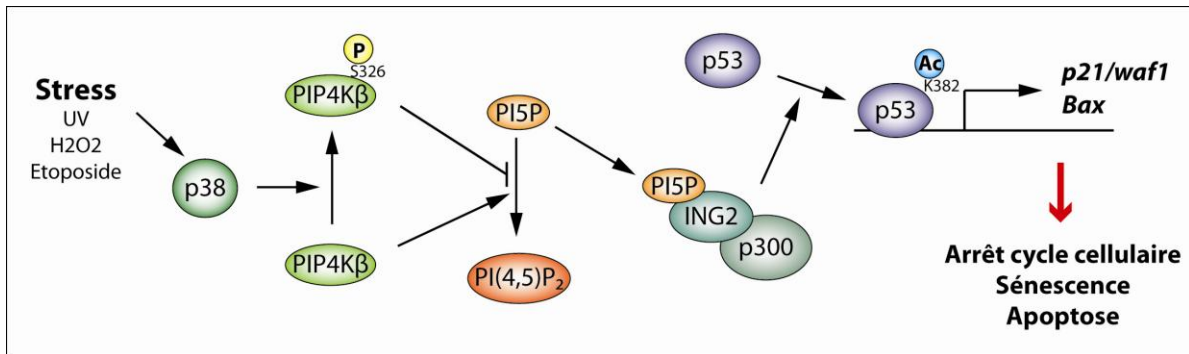
## 2.2. ING2 est un récepteur nucléaire des phosphoinositides phosphates.

Les phosphoinositides phosphates (PIP) sont des molécules lipidiques de signalisation qui régulent un grand nombre de processus biologiques comme notamment la réponse au stress (Irvine, 2003). Initialement, les PIP avaient été montrés comme synthétisés et métabolisés uniquement dans le cytoplasme. Par la suite il a été mis en évidence que les PIP sont également présents dans le noyau où ils jouent un rôle dans la régulation de l'expression des gènes, dans la réparation de l'ADN et dans le maintien des télomères (Irvine, 2003). Cependant, aucune protéine effectrice des PIP n'était clairement identifiée.

Dans ce contexte, Gozani et ses collaborateurs ont réalisé un criblage de molécules interagissant avec les PIP et ont ainsi identifié ING2 comme un récepteur nucléaire du phosphatidylinositol-5-phosphate (PI5P). Dans cette étude, la région C-terminale d'ING2, allant du début du PHD jusqu'à la fin de la protéine, a été impliquée dans l'interaction avec le PI5P. Etant donné que l'insertion de mutations dans le PHD d'ING2 induisait une perte d'interaction avec le PI5P, les auteurs avaient alors conclu que c'était le PHD qui était le domaine responsable de cette interaction (Gozani et al., 2003). Cependant, il a été montré par la suite que c'est la PBR (« PolyBasic Region »), directement adjacente au PHD, qui est en fait impliquée dans cette l'interaction (Kaadige and Ayer, 2006). Etant donné la proximité entre le PHD et la PBR, il semblerait que les mutations qui avaient été faites pour déstructurer le PHD d'ING2 affectaient également la conformation du PBR.

D'un point de vue fonctionnel, lors d'un stress génotoxique induit par l'étoposide, l'interaction entre ING2 et le PI5P permet d'activer p53 pour induire l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire (Gozani et al., 2003). Il a ensuite été montré qu'un stress génotoxique induit par le rayonnement UV ou par l'étoposide conduit à une augmentation du PI5P dans la fraction chromatinienne (CEF: « Chromatin-Enriched Fraction »). Cette augmentation de PI5P résulte d'une diminution de l'activité de la PIP4K $\beta$  (kinase phosphorylant le PI5P en PI(4,5)P<sub>2</sub>) qui est due à sa phosphorylation, sur la serine 326, par la kinase p38. Dans cette étude, les auteurs montrent de plus qu'en réponse aux UV, l'augmentation du PI5P dans la CEF est également accompagnée d'une augmentation d'ING2 dans la CEF. Ainsi, il a été proposé un modèle selon lequel, en réponse à un stress génotoxique (UV, etoposide, etc...), la kinase

p38 inhibe la PIP4K $\beta$ , permettant l'augmentation du PI5P pour stabiliser ING2 dans la CEF afin qu'elle puisse moduler l'activité transcriptionnelle de p53 et ainsi induire un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Jones et al., 2006) (Figure 5).



**Figure 5 : Modèle du mode d'action d'ING2 dans la réponse au stress génotoxique.** En réponse à un stress génotoxique, la kinase p38 est activée et va phosphoryler la phosphoinositide kinase 4 bêta (PIP4K $\beta$ ) sur la sérine 326 (S326). L'activité kinase de la PIP4K $\beta$ , qui permet la phosphorylation du PI5P pour donner du PI(4,5)P<sub>2</sub>, est alors inhibée. Il en résulte alors un enrichissement en PI5P. Ce dernier va alors interagir avec ING2 pour activer, en association avec p300, l'expression des gènes cibles de p53 (p21WAF1 et Bax) afin d'inhiber la prolifération cellulaire. (Adapté d'après Jones et al., 2006)

### 2.3. Les protéines ING sont associées aux complexes HAT et HDAC.

Lorsque Loewith et ses collaborateurs ont mis en évidence les trois gènes ING de la levure *S. cerevisiae* : yng1, yng2 et Pho23, ils ont observé que leur délétion respective conduisait entre autre, à des anomalies de prolifération, des défauts de bourgeonnement et une hypersensibilité au choc thermique et au rayonnement UV. Afin d'identifier les mécanismes responsables de ces phénotypes, ils ont recherché des partenaires protéiques de ces trois protéines ING par des expériences de double hybride et de co-immunoprécipitation. Ils ont ainsi mis en évidence que Yng2 interagit avec la protéine Tra1, qui est un composant du complexe HAT NuA4. C'est à la suite de ces observations que



l'hypothèse d'un potentiel rôle des protéines ING dans les complexes HAT et HDAC a été émise. Pour tester cette hypothèse, les protéines Yng1, Yng2 ou Pho23 ont été immunoprécipitées et l'analyse de l'activité associée aux complexes co-immunoprécipités a révélé que ces complexes possédaient des activités HAT. Cependant, chacune de ces activités HAT ciblait des histones différentes, suggérant que chaque protéine ING était associée à des complexes HAT distincts (Loewith et al., 2000). Par la suite, plusieurs études ont permis de montrer qu'effectivement chacune des trois protéines YNG1, YNG2 et Pho23 est associée à des complexes HAT ou HDAC distincts. En effet, YNG1 est un élément du complexe HAT NuA3 (Howe et al., 2002), YNG2 est un élément du complexe HAT NuA4 (Nourani et al., 2001) et Pho23 est un élément du complexe HDAC Rpd3 (Loewith et al., 2001) (Figure 6).

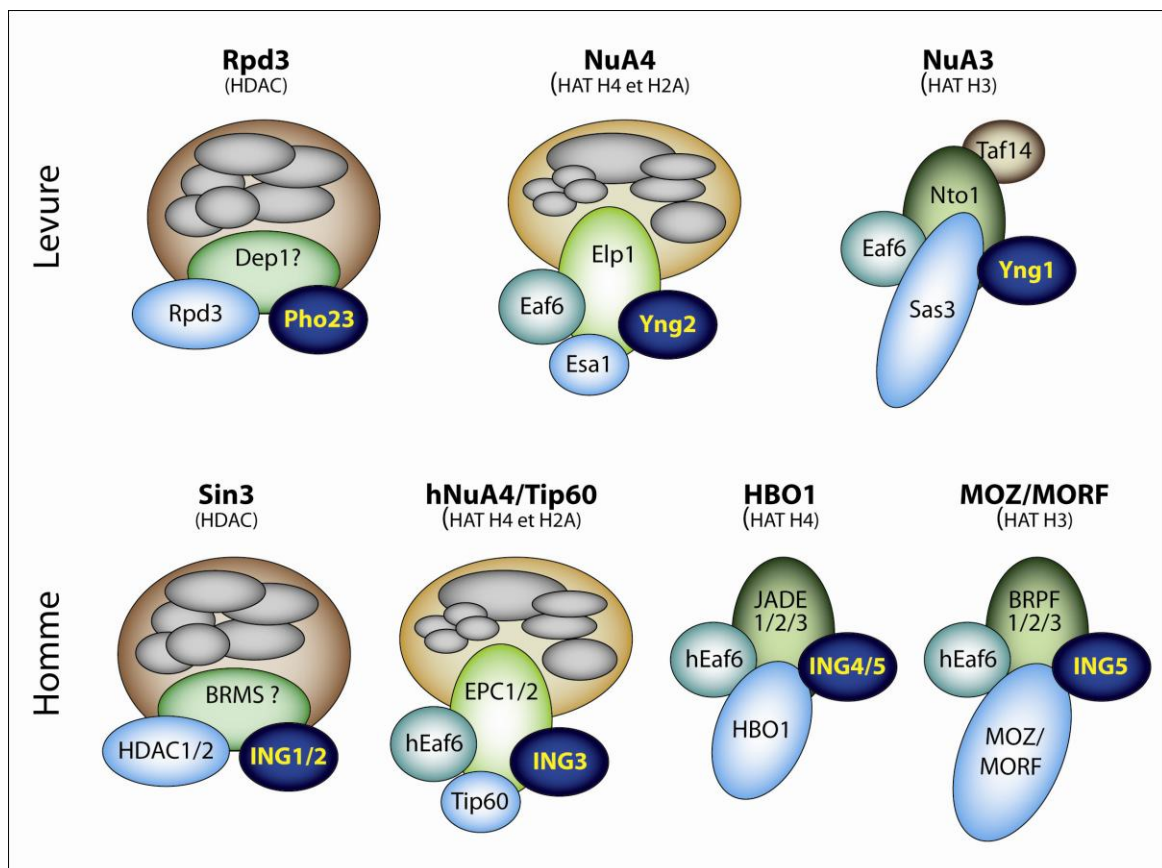


Figure 6 : Schéma récapitulatif des différents complexes HAT et HDAC contenant des protéines ING chez la levure ou l'Homme. (Adapté d'après Doyon et al., 2006)

La recherche de partenaires protéiques de p33ING1b par des expériences d'immunoprécipitation, suivies d'une analyse des protéines co-immunoprécipitées par spectrométrie de masse, a permis de mettre en évidence que p33ING1b est associée au complexe HDAC formé par Sin3A, HDAC1, HDAC2, et Sap30 (Skowyra et al., 2001). Des études complémentaires ont montré qu'ING1 s'associe au complexe Sin3A/HDAC via une interaction directe avec la protéine Sap30 (Kuzmichev et al., 2002). L'accumulation de données impliquant les protéines ING dans des complexes HAT et HDAC a conduit à la réalisation d'une étude ayant pour objectif de déterminer les complexes auxquels chacune des protéines ING (ING1-5) est associée. Chaque protéine ING a donc été purifiée et les protéines co-purifiées ont été identifiées par spectrométrie de masse. Ainsi, l'appartenance d'ING1 au complexe Sin3A/HDAC a été confirmée et ING2 a été montrée comme également capable de s'associer à ce même complexe. Cependant, ING2 ne co-purifiant pas avec ING1 et inversement, cela suggère que ces deux protéines sont associées à des complexes Sin3A/HDAC distincts. ING4 et ING5 sont associées au complexe HAT HBO1/JADE. Enfin, ING5 peut également être associée au complexe HAT MOZ/MORF (Doyon et al., 2006) (Figure 6).

## **2.4. Les protéines ING, via leur PHD, sont des interprètes du code histone.**

### **2.4.1. Nucléosome, code histone et remodelage de la chromatine.**

Dans les cellules, l'ADN génomique est organisé en une succession de nucléosomes. Le nucléosome est formé d'un octamère d'histones (deux H2A, deux H2B, deux H3 et deux H4) autour duquel s'enroulent 146 pb d'ADN. Du fait de leur prééminence à l'extérieur du nucléosome, les parties N-terminales des histones sont aussi appelées « queues d'histones ». Ces dernières sont soumises à de nombreuses modifications post-traductionnelles comme l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination ou encore la sumoylation (Jenuwein and Allis, 2001). La combinaison de toutes ces modifications permet

de générer une grande variété de marques, qui vont pouvoir être spécifiquement reconnues par différents complexes. Toutes ces modifications affectant la queue des histones ont été regroupées sous le nom de code histone. Le code histone est extrêmement dynamique. Les queues d'histones modifiées vont servir de plateforme d'entrée pour des protéines ou des complexes associés à des activités enzymatiques, comme notamment les complexes HAT et HDAC. L'entrée de ce type de complexe va changer localement le niveau d'acétylation des queues d'histones, ce qui a pour conséquence de modifier leur charge globale et donc la structure de la chromatine. Une hyperacétylation induit une décondensation de la chromatine et un état transcriptionnellement actifs, alors qu'à l'inverse, une hypoacétylation va induire une condensation de la chromatine et un état transcriptionnellement inactif. Tous ces processus dits de « remodelage de la chromatine » peuvent réguler l'expression de gènes en « ouvrant » ou « fermant » la chromatine, permettant ou non l'entrée de facteurs de transcription et de leurs complexes. Le remodelage de la chromatine ne se restreint cependant pas à la régulation de l'expression génique. En effet, il intervient dans tout les processus nécessitant un accès de protéines à l'ADN. Il est impliqué par exemple, dans les processus de réparation de l'ADN, afin de permettre l'accès des complexes de réparation au niveau des lésions de l'ADN qui doivent être éliminées. Il est également impliqué dans la réplication, afin de permettre l'entrée des complexes de réplication et l'ouverture des deux brins de l'ADN.

#### 2.4.2. Les PHD des ING reconnaissent spécifiquement les formes méthylées de l'histone 3.

Initialement, il avait été observé via des expériences de « GST pull-down », que le PHD d'ING2 interagissait avec H3 lorsqu'il provenait de nucléosomes purifiés à partir de cellules mais pas lorsqu'il provenait de nucléosomes recombinants reconstitués *in vitro*. Ce résultat suggérait que le PHD d'ING2 interagissait avec des formes post-traductionnellement modifiées de l'H3. L'étude de l'interaction du PHD d'ING2 avec une série de peptides de queues d'H3 modifiées *in vitro* montre que le PHD d'ING2 interagit fortement avec le

peptide tri-méthylé sur la lysine 4 et plus faiblement avec les peptides mono ou di-méthylés sur la lysine 4 (Pena et al., 2006; Shi et al., 2006). Afin de caractériser l'interaction entre ING2 et H3K4me3, le PHD d'ING2 ainsi que le complexe formé par ce PHD et par le peptide de la queue d'H3K4me3 ont été analysés par cristallographie. Ainsi la structure du PHD d'ING2 révèle la présence d'un canal dans lequel se logent les six premiers acides aminés de l'histone 3. Le long de ce canal se situent deux poches qui permettent de recevoir l'arginine 2 (H3R2) et la lysine 4 (H3K4) de l'H3. Dans la première poche, H3R2 établit des liaisons électrostatiques avec l'acide aspartique 230 (D230) d'ING2. H3K4 interagit avec les résidus : tyrosine 215 (Y215), sérine 222 (S222), méthionine 226 (M226) et tryptophane 238 (W238) qui constituent la seconde poche. Il est important de noter que les chaînes aromatiques des résidus Y215 et W238 sont responsables de l'interaction avec le groupement tri-méthyl et sont de ce fait responsables de la forte affinité du PHD d'ING2 pour H3K4me3 (Pena et al., 2006).

De la même manière que le PHD d'ING2, les PHD des autres protéines ING interagissent avec H3K4me3 *in vitro* (Shi et al., 2006). De manière intéressante, l'alignement des séquences des PHD d'ING1-5 indique que tous les résidus du PHD d'ING2 identifiés comme responsables de l'interaction avec H3K4me3 sont conservés (Figure 7). L'analyse cristallographique de la structure des PHD d'ING1, d'ING4 et d'ING5 montre que les résidus aromatiques Y212 et W235 d'ING1, Y198 et W221 d'ING4 et Y188 et W211 d'ING5 sont responsables de l'interaction avec le groupement tri-méthyl de la K4 (Champagne et al., 2008; Palacios et al., 2008; Pena et al., 2008). Les PHD d'autres protéines que les ING ont également été décrits comme reconnaissant spécifiquement H3K4me3 via des résidus aromatiques. C'est par exemple le cas des PHD des protéines BPTF, RAG2 ou TAF3 (Li et al., 2006; Matthews et al., 2007; van Ingen et al., 2008). En revanche les PHD de AIRE ou BHC80 interagissent avec l'H3 mais la triméthylation de K4 fait perdre cette interaction. De manière intéressante, le PHD de ces dernières ne possède pas de seconde poche contenant des résidus aromatiques (Lan et al., 2007; Org et al., 2008). Par ailleurs, un criblage de protéines interagissant avec H3K4me3 réalisé chez la levure a identifié un certain nombre de protéines contenant un PHD, dont les homologues des ING humaines de la levure Yng1, Yng2 et Pho23 (Shi et al., 2007). Ainsi, la reconnaissance de H3K4me3 par les PHD et plus particulièrement celui des ING est un mécanisme conservé au cours de l'évolution.

ING1	-	212	-	YCLCNQVSYGEMIGCDNDECPIEWFHFS	CVGLNHKPKGKWKYCPKC	-	256	
ING2	-	215	-	YCLCNQVSYGEMIGCDNEQCPIEWFHFS	CVSLTYKPKGKWKYCPKC	-	259	
ING4	-	198	-	YCLCHQVSYGEMIGCDNPDCSIWFHFA	CVGLTTKPRGKWF	CPRC	-	242
ING5	-	188	-	YCLCHQVSYGEMIGCDNPDCPIEWFHFA	CVDLTTKPKGKWF	CPRC	-	232
ING3	-	362	-	YICCNQVSYGEMVGCNQDCPIEWFH	HYGCVGLTEAPKGKWKYCPQC	-	406	

**Figure 7: Alignement des séquences polypeptidiques du PHD des protéines ING humaines.** Les résidus conservés entre les différentes protéines ING sont surlignés en gris. On notera la parfaite conservation des résidus cystéines et histidines impliqués dans l'interaction avec les atomes de zinc (C et H), ainsi que celle des résidus impliqués dans l'interaction du PHD avec la queue de l'histone 3 tri-méthylé sur la lysine 4 (représentés en vert).

#### 2.4.3. Fonction de l'interaction entre le PHD des ING et H3K4me3.

Initialement lorsque le groupe du Dr Or Gozani a mis en évidence que le PHD d'ING2 interagissait spécifiquement avec l'H3K4me3, il avait montré que cette interaction permettait de recruter le complexe Sin3A/HDAC au niveau de cette marque d'histone. En effet, en réponse à un stress génotoxique induit par la doxorubicine, ING2 est relocalisée au niveau des promoteurs des gènes de la prolifération cellulaire cycline-D1 et c-myc où il interagit avec H3K4me3. Cette interaction permet de recruter et de stabiliser le complexe Sin3A/HDAC sur ces promoteurs et par conséquent de réprimer l'expression de ces gènes. (Shi et al., 2006). Ainsi cette étude suggérait qu'une des fonctions des protéines ING pourrait être de reconnaître des marques spécifiques d'histone afin d'y recruter et d'y stabiliser les complexes auxquels elles sont associées. Ces dernières années, beaucoup d'efforts ont été faits pour identifier les protéines responsables de la modification du code histone ainsi que les conséquences de ces modifications. Cependant, les protéines impliquées dans l'interprétation de ce code sont méconnues. Ainsi, la découverte du rôle d'ING2 dans la reconnaissance de ce code était particulièrement intéressante puisqu'elle permettait de faire le lien entre des marques d'histone et le remodelage de la chromatine.

Depuis, les études réalisées sur la fonction de l'interaction du PHD des protéines ING avec l'H3K4me3 n'ont fait que conforter cette hypothèse. En effet, ING4 fait partie du complexe HBO1/JADE, qui présente une activité HAT pour l'H4 (Doyon et al., 2006). Comme

ING2, ING4 interagit via son PHD avec H3K4me3 *in vitro* et *in vivo* et cette interaction permet le recrutement du complexe HBO1/JADE au niveau d'H3K4me3 (Hung et al., 2009). En accord avec les observations de Doyon et ses collaborateurs, le complexe ING4/HBO1/JADE augmente le niveau d'acétylation de l'H4. Cependant, l'acétylation de H4 est indépendante de la tri-méthylation de H3K4. En revanche, la tri-méthylation de H3K4 induit l'acétylation de H3. Ces résultats indiquent que la tri-méthylation de H3K4 permettrait de basculer l'activité HAT du complexe HBO1/JADE vis-à-vis de H4 vers H3. Les gènes dont le promoteur est spécifiquement ciblé par ING4 par la reconnaissance d'H3K4me3 ont été recherchés par microarray. Cette étude a permis de montrer qu'en réponse à un stress induit par la doxorubicine, contrairement à un mutant d'ING4 incapable d'interagir avec H3K4me3, ING4 sauvage est recrutée au niveau des promoteurs des gènes *Smc4*, *Egln1* et *Ext1*. De plus, seule ING4 sauvage induit une augmentation du niveau d'acétylation de H3 et une activation de l'expression de ces gènes (Hung et al., 2009).

Très récemment, le PHD d'ING5 a également été montré comme interagissant avec H3K4me3 *in vivo*. Cette interaction permet de recruter le complexe HAT HBO1/JADE au niveau d'H3K4me3 et d'acétyler H3 (Saksouk et al., 2009). Dans cette étude, les auteurs ont également étudié le rôle des deux PHD présents dans JADE1, dans le ciblage du complexe HBO1/JADE au niveau des différentes formes d'H3 méthylé. L'étude de l'interaction de chacun des deux PHD de JADE1 avec les différents niveaux de méthylation d'H3K4 montrent que le premier PHD n'interagit qu'avec la forme non méthylée d'H3K4 et que le deuxième PHD interagit avec H3K4 indépendamment de son niveau de méthylation. De manière intéressante, lorsque les deux PHD sont présents dans JADE1, l'interaction se fait avec H3K4 non méthylé, suggérant que le premier PHD est dominant sur le deuxième. En absence d'ING5, la méthylation de H3K4 inhibe l'activité HAT de HBO1/JADE sur H3. En revanche, en présence d'ING5, la méthylation de H3K4 induit l'activité HAT d'HBO1/JADE sur H3. Ainsi, la présence d'ING5 dans le complexe HBO1/JADE permet à ce dernier d'acétyler spécifiquement les régions de la chromatine où H3 est méthylé sur K4.

Tous ces résultats montrent que les protéines ING interprètent le code histone pour y recruter des complexes HAT et HDAC. Le recrutement de ces complexes va permettre de moduler l'état de condensation de la chromatine afin de réguler son accessibilité pour des complexes de transcription (pour réguler l'expression de gènes) ou encore pour des

complexes de réparation de l'ADN comme cela a été montré pour ING1 et ING2 (voir ci-après).

## **2.5. Les protéines ING et la réparation de l'ADN.**

La première observation ayant suggéré un rôle de p33ING1b dans la réparation de l'ADN, était liée au fait, que suite à une irradiation de cellules MMRU (lignée cellulaire humaine issue de mélanome) par des UVB, l'expression d'ING1 était augmentée à la fois au niveau transcriptionnel et protéique (Cheung et al., 2000). Les UVB peuvent induire la formation d'une liaison covalente entre deux bases pyrimidiques adjacentes pour former un dimère de pyrimidines (PD). Si ces lésions ne sont pas réparées, elles conduisent à des mutations. Ainsi, suite à la formation de PD, un arrêt global de transcription est induit pour empêcher la production de protéines mutées, et les lésions sont réparées par un processus appelé réparation par excision de nucléotide (NER : « Nucleotide Excision Repair »). La NER permet ainsi de retirer les nucléotides endommagés et de les remplacer par les nucléotides initiaux. Une fois les lésions éliminées, l'expression des gènes reprend.

Afin de déterminer le rôle de p33ING1b dans la réponse au stress induit par les UVB, des expériences de « Host-cell-reactivation assay » (HCR) dans des cellules exprimant ou non p33ING1b ont été réalisées. Le principe de la HCR repose sur la transfection de vecteurs plasmidiques exprimant un gène rapporteur, qui ont été préalablement irradiés afin d'y créer des lésions. Après avoir été transfectés par ces plasmides « endommagés », les cellules vont identifier et réparer les lésions présentes sur ces plasmides et permettre une réactivation de leur expression. L'analyse du taux d'expression du gène rapporteur au cours du temps reflète donc la capacité des cellules à réparer les lésions de l'ADN. Dans cette étude, les auteurs montrent que p33ING1b est nécessaire pour permettre une réactivation d'expression des plasmides rapporteurs et que cette fonction est dépendante de p53. De plus ils montrent que p33ING1b et p53 sont nécessaires à l'élimination des dimères de pyrimidines présents dans l'ADN de cellules irradiées par des UVB (Cheung et al., 2001).

Le même type d'étude réalisé sur ING2 a permis de montrer qu'ING2 est également impliquée dans la réparation de l'ADN et qu'ING2 a également besoin de p53 pour cette fonction (Wang et al., 2006a). Etant donné l'étroite redondance de fonctions entre p33ING1b et ING2 et leur forte homologie, ce résultat n'est pas surprenant. Cependant, contrairement à ING1, l'expression d'ING2 n'est pas modifiée après une irradiation par les UV. Ces résultats suggèrent donc que ces protéines partagent des fonctions similaires mais sont soumises à des mécanismes de régulations différents.

Les études conduites pour déterminer par quel mécanisme p33ING1b et ING2 potentialisent la NER ont montré qu'en réponse à un stress induit par le rayonnement UV, p33ING1b et ING2 sont toutes deux requises pour augmenter l'acétylation globale de la queue de l'histone 4 (H4) et ainsi induire une décondensation de la chromatine (Kuo et al., 2007; Wang et al., 2006a). Cette ouverture de la chromatine permettrait aux complexes protéiques de la NER d'accéder aux lésions et de procéder à leur réparation. Des analyses d'immunofluorescences montrent que ni p33ING1b, ni ING2 ne co-localisent avec les lésions de PD. En revanche, elles semblent toutes les deux nécessaires au recrutement de la protéine Xeroderma Pigmentosum A (XPA) au niveau de la chromatine (Kuo et al., 2007; Wang et al., 2006a). XPA est un co-facteur crucial de la NER puisqu'il est responsable de la détection des PD. Ainsi, toutes ces observations suggèrent que p33ING1b et ING2 ne sont pas impliquées dans la NER à proprement parler mais auraient des fonctions en amont.

Une étude utilisant des formes mutées d'ING2 dans lesquelles les différents domaines d'ING2 ont été successivement tronqués, a montré que le domaine LZL d'ING2 est nécessaire à sa fonction dans la NER et notamment à l'induction de l'acétylation d'H4 (Wang et al., 2006b). Des expériences de co-immunoprécipitation montrent qu'en réponse à une irradiation par les UV, ING2, p53 et p300 font partie d'un même complexe. Le domaine LZL d'ING2 est nécessaire, d'une part à l'interaction entre ING2 et p53, et d'autre part entre p53 et l'histone acétylase p300. En revanche, il n'est pas impliqué dans l'interaction entre ING2 et p300 (Wang et al., 2006b). Ainsi, en réponse au rayonnement UV, ING2 permettrait de réunir p53 et p300 dans un même complexe. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer le rôle du complexe ING2/p53/p300 dans l'acétylation de l'H4.

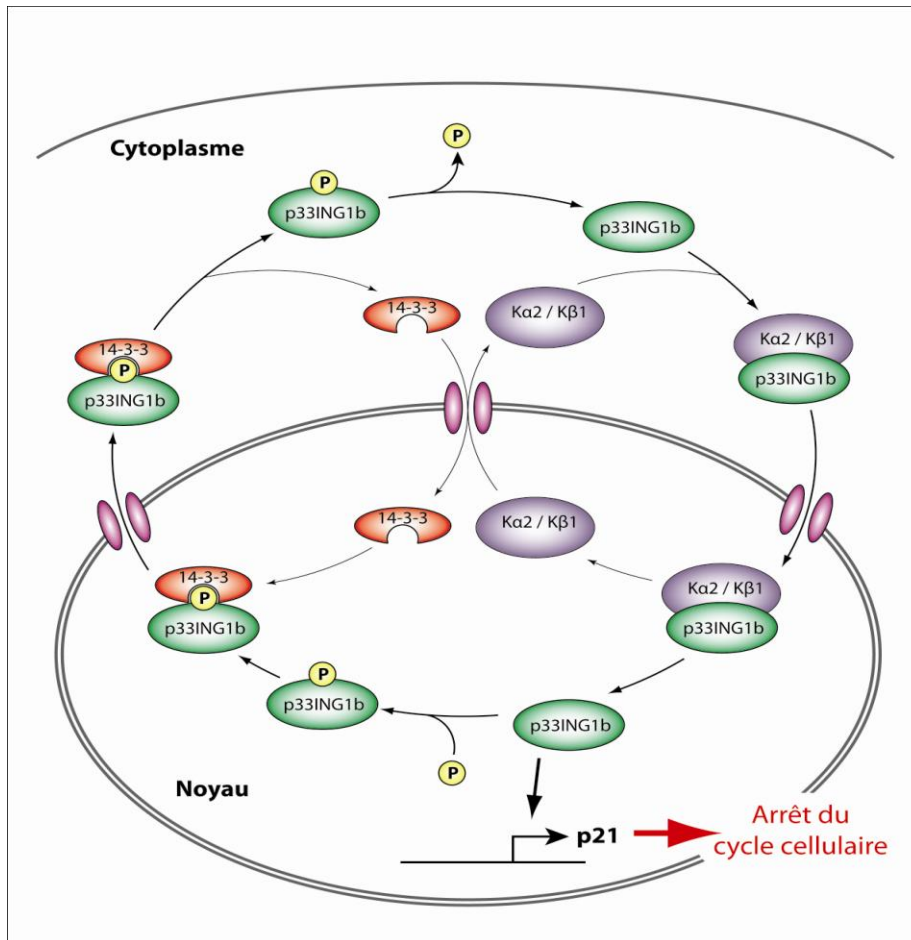


### 3. Mécanismes de régulation des ING.

#### 3.1. Localisation subcellulaire.

Les études conduites sur les ING à ce jour ont permis de mieux comprendre leurs fonctions et leur implication dans les processus cellulaires, notamment dans les processus de la cancérogénèse. En revanche, les mécanismes par lesquels les protéines ING sont elles-mêmes régulées sont quasiment inconnus. Il a récemment été montré que p33ING1b peut être phosphorylée sur la sérine 199 et que cette phosphorylation permet son interaction avec la protéine de transport 14-3-3 $\eta$ . La fonction de cette interaction est d'exporter p33ING1b vers le cytoplasme et de ce fait d'inhiber ses fonctions nucléaires comme notamment celle d'activer la transcription de p21WAF1 (Gong et al., 2006). A l'inverse il a été montré qu'ING1 interagit dans le cytoplasme avec les karyophérines  $\alpha$ 2 et  $\beta$ 1 pour être importée vers le noyau et de ce fait activer l'expression de p21WAF1 (Russell et al., 2008)(Figure 8). Ainsi, ces résultats suggèrent qu'ING1 peut être régulée par sa localisation subcellulaire. L'idée d'un tel mécanisme est en accord avec plusieurs études qui montrent que la localisation nucléaire d'ING1 est affectée dans les cancers du sein et du cerveau ainsi que dans le mélanome (Nouman et al., 2003; Nouman et al., 2002a; Nouman et al., 2002b; Vieyra et al., 2003).

Dans le cadre de ma thèse, nous avons mis en évidence un nouveau mécanisme de régulation post-traductionnelle d'ING2 par sumoylation. Ainsi, je consacrerai la suite de cette partie concernant les mécanismes de régulations des ING, à la présentation générale de la sumoylation.



**Figure 8: Modèle de régulation de la localisation subcellulaire d'ING1.** La phosphorylation d'ING1 permet son interaction avec la protéine 14-3-3 pour être exportée du noyau vers le cytoplasme. Dans le cytoplasme p33ING1b peut interagir avec le complexe des karyophérines  $\alpha 2$  et  $\beta 1$  ( $K\alpha 2$ ,  $K\beta 1$ ) pour être adressée vers le noyau. Ainsi, en condition normale, la phosphorylation de p33ING1b permettrait de maintenir p33ING1b à un faible niveau dans le noyau. A l'inverse, en réponse a un stress, les kariophérines permettraient d'enrichir p33ING1b dans le noyau afin d'augmenter l'expression de p21WAF1 et ainsi d'induire un arrêt du cycle cellulaire.

### 3.2. La sumoylation.

La sumoylation est une modification post-traductionnelle aboutissant à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO (« Small Ubiquitine-like Modifier ») sur une lysine d'une protéine cible. Le processus de sumoylation est très proche biochimiquement

de celui de l'ubiquitination, notamment par l'implication d'une cascade similaire d'enzymes. En revanche, alors que l'ubiquitination est principalement impliquée dans la stabilité des protéines, en régulant leur dégradation par le protéasome, la sumoylation régule de nombreuses fonctions (trafic intracellulaire, interactions protéiques, interaction ADN-protéine, activité transcriptionnelle...). La protéine SUMO a été découverte en 1990, et ce, 20 ans après la découverte de l'ubiquitine. Ce délai est dû à la nature instable du lien entre les protéines cibles et SUMO. C'est grâce à RanGap, une protéine fortement sumoylée et dont la sumoylation est particulièrement stable, que la découverte eu lieu (Matunis et al., 1996).

### 3.2.1. La famille des protéines SUMO.

Les protéines SUMO sont de petites protéines de l'ordre de 10-12 KDa. Bien qu'elles présentent une structure tri-dimensionnelle similaire à celle de l'ubiquitine, leurs séquences peptidiques présentent moins de 20% d'homologie avec celle de l'ubiquitine et la distribution de leurs charges de surface est différente. Les protéines SUMO ont été très conservées au cours de l'évolution et sont retrouvées depuis la Levure jusqu'à l'Homme. Les organismes les moins évolués, tels que la Levure, le Nématode ou la Drosophile, ne présentent qu'un unique gène SUMO. En revanche, les organismes comme les plantes ou les vertébrés présentent plusieurs gènes SUMO. Chez l'homme, quatre protéines SUMO (SUMO1-SUMO4) ont été caractérisées à ce jour.

### 3.2.2. La réaction de sumoylation.

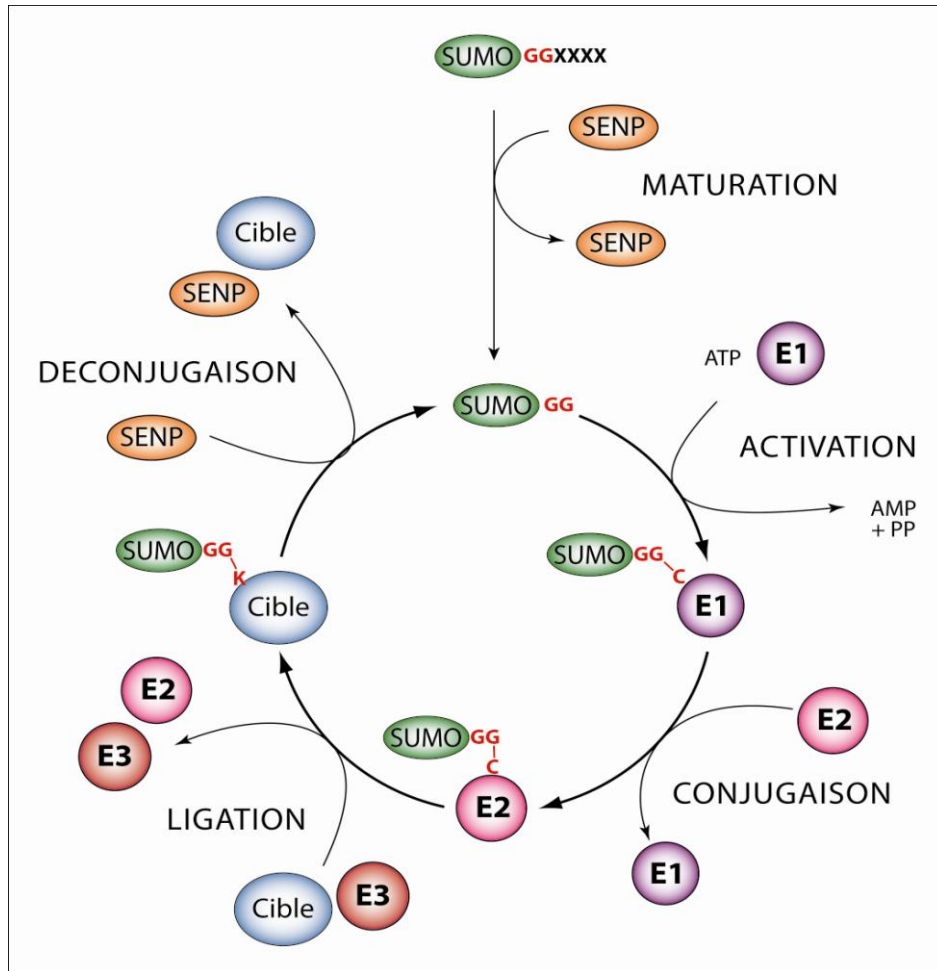
Les protéines SUMO sont exprimées sous une forme immature. Ainsi, la réaction de sumoylation commence par une étape de maturation des protéines SUMO, qui correspond

au clivage de leur extrémité C-terminal. Ce clivage est assuré par des enzymes carboxy-hydroxylases de la famille SENP (sentrin-specific protéase) et permet de découvrir le dipeptide de glycine qui va permettre l'interaction de SUMO avec l'enzyme d'activation E1 (Figure 9). La deuxième étape, dite d'activation, consiste en la création d'une liaison thioester de haute énergie (étape ATP-dépendante) entre SUMO et la cystéine catalytique de l'enzyme E1 activatrice (hétérodimère SAE1/SAE2). Dans une troisième étape, dite de conjugaison, SUMO est transférée depuis l'enzyme d'activation E1 sur la cystéine catalytique de l'enzyme de conjugaison E2 Ubc9. Ici encore, il existe une différence notable avec l'ubiquitination puisqu'à ce jour, Ubc9 est la seule enzyme de conjugaison E2 caractérisée pour la sumoylation alors qu'il existe de multiples E2 pour l'ubiquitination. Enfin, dans une dernière étape dite de ligation, Ubc9 transfère SUMO sur la protéine substrat par la formation d'une liaison isopeptidique entre la glycine de l'extrémité C-terminale de SUMO et la lysine de la protéine substrat. Contrairement à l'ubiquitination, l'intervention d'une enzyme de ligation E3 n'est pas indispensable, tout du moins *in vitro*. De nombreuses enzymes de type E3 ligases ont été récemment caractérisées pour SUMO. Ces études montrent que les E3 sont nécessaires pour une sumoylation efficace des protéines *in vivo*. Elles permettraient d'une part de stabiliser l'interaction entre Ubc9 et son substrat, et d'autre part de conférer la spécificité du substrat. Actuellement, trois familles d'E3 ligase ont été caractérisées : la famille des protéines PIAS, celle des protéines RanBP2 et celle du groupe polycomb Pc.

Dans la majorité des cas, la sumoylation aboutit à la liaison d'une seule protéine SUMO sur le substrat. Cependant, de la même manière que pour l'ubiquitination, il existe quelques études qui montrent que SUMO de *S. cerevisiae* (Smt3) ainsi que SUMO2 et SUMO3 humaines peuvent former des chaînes aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Bylebyl et al., 2003; Tatham et al., 2001). La formation de ces chaînes résulte de la sumoylation de la lysine 15 de Smt3 ou de la lysine 11 de SUMO2 et SUMO3. SUMO1 ne possède pas cette lysine et ne semble pas former de chaîne *in vivo*. Actuellement, les conséquences des chaînes de SUMO2 ou de SUMO3 sur la modulation des fonctions des protéines substrat sont très peu documentées. Cependant il semblerait qu'une sumoylation unique ou en chaîne puisse avoir des conséquences complètement opposées. C'est par exemple le cas de la protéine précurseur de la  $\beta$ -amyloïde (APP : « Amyloid Precursor Protein »). Dans le cadre de la

maladie d'Alzheimer, APP est anormalement clivée et génère un peptide dit  $\beta$ -amyloïde ( $A\beta$ ) qui s'agrège pour former des plaques de  $\beta$ -amyloïde. De par leur neurotoxicité, ces plaques sont à l'origine de la dégénérescence neuronale caractéristique de cette maladie. Ainsi, une étude montre que la formation de chaîne de SUMO3 sur APP réduit la production d' $A\beta$  et qu'à l'inverse, une sumoylation par une unique SUMO3 augmente la production d' $A\beta$  (Li et al., 2003). Il a également été montré que la formation de chaînes de SUMO3 sur les protéines PML (« Promyelocytic Leukemia Protein ») est particulièrement importante pour la structuration et la dynamique des corps nucléaires PML (Fu et al., 2005).

Enfin, comme l'ubiquitination, la sumoylation est un processus réversible et dynamique puisqu'il existe des protéases qui clivent la liaison entre SUMO et son substrat. Ces enzymes sont des isopeptidases de la famille SENP. Chez l'homme, il existe six SENP : SENP1-3 et SENP5-7. Les différentes SENPs diffèrent par leur activité vis-à-vis des différentes protéines SUMO. Par exemple, SENP3 et SENP5 désumoylent préférentiellement SUMO2 et SUMO3 (Di Bacco et al., 2006; Gong and Yeh, 2006). Les SENP diffèrent également par leur localisation subcellulaire. Par exemple, SENP2 et SENP5 sont respectivement enrichies au niveau des pores nucléaires ou dans les nucléoles (Hang and Dasso, 2002; Nishida et al., 2000; Nishida and Yamada, 2008; Zhang et al., 2002).



**Figure 9: Schéma général du processus de sumoylation.** L'étape de maturation, correspond au clivage de la partie C-terminale de la protéine SUMO pour donner une protéine SUMO activée, arborant un dipeptide de glycine (GG). Le clivage est assuré par des enzymes carboxy-hydrolases de la famille des Protéases Sentrine (SENP). L'étape d'activation, consiste en la création d'une liaison thioester (étape ATP-dépendante) entre le dipeptide GG de SUMO et la cystéine catalytique de l'enzyme E1 (hétérodimère SAE1/SAE2). L'étape de conjugaison de SUMO permet le transfert de SUMO depuis l'enzyme E1, sur la cystéine catalytique de l'enzyme E2 (Ubc9). Enfin le processus de sumoylation s'achève par l'étape de ligation de SUMO, par l'enzyme E2, sur la lysine acceptrice d'une protéine cible. Dans la grande majorité des cas cette dernière étape fait intervenir des enzymes E3 qui permettent notamment de stabiliser l'interaction de l'enzyme E2 avec le substrat et de conférer la spécificité vis-à-vis du substrat. Enfin, SUMO peut être clivée du substrat par les SENP.

### 3.2.3. Le site de sumoylation.

L'identification du résidu sumoylé dans les premières protéines à avoir été décrites comme étant sumoylées : RanGAP1, PML, Sp100, IKB $\alpha$ , p53 et c-Jun, a permis très rapidement d'identifier un site consensus de sumoylation :  $\Psi$ KxE/D (où  $\Psi$  est un acide aminé hydrophobe, K la lysine sumoylée, x n'importe quel acide aminé et E ou D respectivement un acide glutamique ou un acide aspartique). Ce site consensus permet l'interaction avec Ubc9. De manière surprenante, bien que l'ubiquitination soit connue depuis plus longtemps et bien qu'elle ait été beaucoup plus étudiée que la sumoylation, aucun site consensus d'ubiquitination n'a été identifié à ce jour. Ceci vient probablement en partie du fait qu'il n'existe qu'une seule E2 pour la sumoylation (Ubc9) contre plus d'une vingtaine pour l'ubiquitination.

Très récemment, un site consensus particulier de sumoylation a été décrit : le PDSM (« Phosphorylation-Dependant Sumoylation Motif »). Ce site consiste en un site consensus classique suivi, trois acides aminés plus loin, d'une serine phosphorylable et d'une proline ( $\Psi$ KxExxxSP) (Hietakangas et al., 2006). Il a été montré que la phosphorylation de la sérine augmente le niveau de sumoylation du site consensus. La mutation de la serine du PDSM d'HSF1 en acide aspartique (mimant une serine phosphorylée), augmente sa sumoylation *in vitro* (Hietakangas et al., 2003). Un certain nombre de protéines contient un PDSM, comme par exemple la protéine SNIP1 (« Smad Nuclear Interacting Protein 1 ») ou encore la protéine MEF2 (Hietakangas et al., 2006). Il semblerait que les charges négatives du groupement phosphate stabilisent l'interaction UBC9-substrat.

Dans la grande majorité des cas, la lysine acceptrice de sumoylation est incluse au sein d'un site consensus. Toutefois, il existe de très rares exceptions où la lysine sumoylée n'est pas dans un site consensus. C'est par exemple le cas de la lysine 164 de PCNA (« Proliferating Cell Nuclear Antigen ») de *S. cerevisiae* (Hoegge et al., 2002) ou de la lysine 14 de l'enzyme de conjugaison d'ubiquitine humaine E3-25K (Pichler et al., 2005). Cependant, Les mécanismes de reconnaissance de ces lysines « isolée » par Ubc9 sont inconnus.

### 3.2.4. Conséquences moléculaires de la sumoylation.

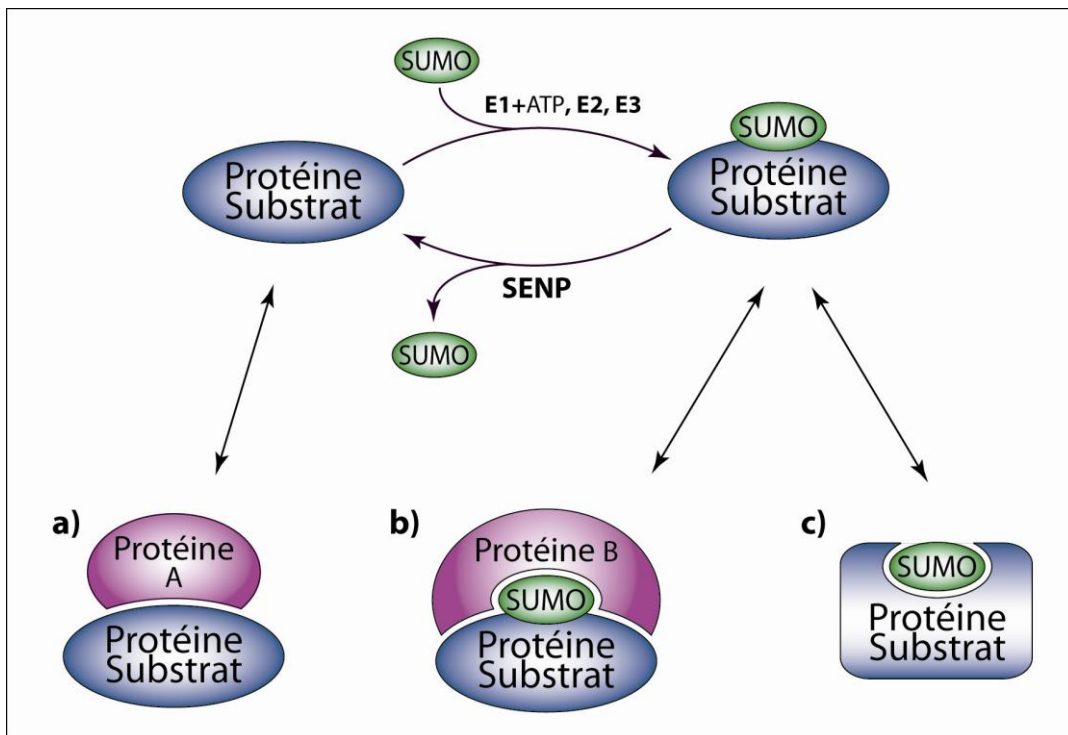
La sumoylation a été impliquée dans une grande variété de fonctions puisqu'elle module entre autre la stabilité, la localisation ou encore l'activité des protéines. Au niveau moléculaire, la sumoylation altère la structure de la surface des protéines et de ce fait module leurs interactions avec d'autres macromolécules. Par exemple, la sumoylation de RanGAP1 ou de p300 leur permet d'interagir respectivement avec RanBP2 ou HDAC6 (Girdwood et al., 2003; Mahajan et al., 1997). Inversement, la sumoylation peut empêcher deux protéines d'interagir en masquant un site d'interaction. C'est par exemple le cas du facteur de transcription ZNF76 dont le site de sumoylation est superposé à son domaine de liaison à la boîte TATA. Ainsi, sa sumoylation couvre le site et empêche donc l'interaction (Zheng and Yang, 2004).

D'un point de vue mécanistique le changement d'affinité entre deux partenaires protéiques suite à la sumoylation peut s'expliquer par le masquage d'un site d'interaction, par l'apport de nouveaux sites de liaisons présents sur SUMO (voir ci-après) ou encore par un changement de conformation de la protéine sumoylée (Figure 10). Dans cette optique, plusieurs études ont comparé les variations de structure de protéines selon la présence ou l'absence de sumoylation et montrent que tout les cas existent. Par exemple, la sumoylation de RanGAP1 (Macauley et al., 2004; Reverter and Lima, 2005), E2-25K (Pichler et al., 2005) et EST1 (Macauley et al., 2006) ne change pas leur conformation tri-dimensionnelle ni celle de SUMO. A l'inverse, la sumoylation de la protéine TDG (« Thymine DNA Glycosilase ») induit un changement de sa conformation et induit de ce fait une perte de son interaction avec l'ADN (Baba et al., 2005). Ainsi les conséquences moléculaires de la sumoylation sur l'interaction avec d'autres macromolécules sont spécifiques à chaque substrat.

Récemment, un domaine d'interaction non covalente avec SUMO, nommé SIM/SBM, a été décrit (Song et al., 2004). Le domaine SIM/SBM présente une forte affinité pour SUMO (de l'ordre du micromolaire) (Hecker et al., 2006). Ainsi, l'interaction entre une protéine sumoylée et une protéine partenaire sera d'autant plus stable si cette dernière possède un domaine SIM/SBM. C'est par exemple le cas des protéines PML. Elle contiennent un



domaine SIM/SBM qui est nécessaire à leur interaction et donc à leur structuration en corps nucléaires PML (Shen et al., 2006).



**Figure 10: Conséquences moléculaires de la sumoylation.** La sumoylation d'une protéine substrat peut avoir trois conséquences principales. **a)** Elle peut affecter l'interaction avec une protéine partenaire. Dans ce cas, l'interaction entre ces deux protéines n'a lieu qu'en absence de sumoylation. **b)** Elle peut apporter un site d'interaction à une protéine partenaire, comme par exemple pour les protéines contenant un motif SIM/SBM. **c)** Enfin, elle peut induire un changement de conformation avec toutes les conséquences que cela peut impliquer, tel qu'un changement d'activité ou une modification d'interaction avec des partenaires protéiques. (Adapté d'après Geiss-Fredlander et Melchior, 2007)

### 3.2.5. Quelques exemples de fonctions de la sumoylation.

Depuis la découverte de la sumoylation, un grand nombre de protéine sumoylées a été identifié et la liste ne cesse de s'allonger. De ce fait, la sumoylation a été impliquée dans un grand nombre de processus cellulaires tels que le cycle cellulaire, la transcription, la réplication, la réparation de l'ADN, la transformation cellulaire, la transduction de signaux, le métabolisme énergétique, etc. Pour cette raison, je me contenterai ici de ne présenter que quelques exemples à titre d'illustration des différentes fonctions que peut jouer la sumoylation.

La sumoylation peut être impliquée dans la localisation subcellulaire des protéines. En effet la sumoylation de RanGAP1 induit sa relocalisation depuis le cytoplasme vers les pores nucléaires où elle interagit de manière sumo-dépendante avec RanBP2 (Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1996).

La sumoylation a été impliquée dans la stabilité des protéines. Lorsque le facteur de transcription NF-KB est complexé à IKB il est inactif. L'activation de NF-KB résulte de la dégradation d'IKB par le protéasome, suite à son ubiquitination. Or, il a été montré que la lysine ubiquitinylée peut également être sumoylée. Ainsi, la sumoylation entre en compétition avec l'ubiquitination et stabilise IKB. De ce fait, l'inhibition de NF-KB par IKB est maintenue.

Parmi toutes les protéines identifiées comme sumoylées, une grande proportion sont des facteurs de transcription. La sumoylation de facteurs de transcription est très fréquemment associée à une répression de la transcription (Gill, 2005). Cependant, il existe quelque cas, comme pour HSF1 ou NFAT-1, pour lesquels la sumoylation augmente leur activité transcriptionnelle (Hong et al., 2001; Terui et al., 2004).

## **4. Les gènes ING sont-ils des gènes suppresseurs de tumeurs ?**

### **4.1. Les étapes de la carcinogénèse.**

Le développement de cancer résulte de l'accumulation successive d'anomalies dans l'ADN, c'est donc une « maladie du génome ». Ces anomalies ont principalement trois grandes origines. La première est une origine environnementale liée à l'exposition à des carcinogènes comme les produits chimiques mutagènes (pollution, tabac, alcool,...) et certains virus. La seconde est héréditaire. Enfin, la troisième provient des erreurs de réplication et de ségrégation des chromosomes lors de la division cellulaire.

L'homéostasie tissulaire nécessite, au sein d'une population cellulaire normale, de réguler la balance d'expression entre les gènes qui stimulent la prolifération cellulaire (oncogènes) et ceux qui la réprime (gènes suppresseurs de tumeur). Toute altération de cet équilibre peut ainsi conduire à une division incontrôlée des cellules, à l'origine du développement de cancer. L'accumulation d'anomalies génétiques va conduire à l'activation d'oncogènes et à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Bien que l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs soient les causes directes du développement de cancers, deux autres catégories de gènes jouent un rôle prépondérant dans le processus de carcinogénèse : les gènes de la réparation de l'ADN et les gènes du métabolisme de détoxification. En effet, ces deux catégories de gènes sont en amont du processus de cancérogénèse puisqu'ils préviennent respectivement l'apparition et l'accumulation d'anomalies génétiques. Comme leur nom l'indique, les gènes de la réparation de l'ADN permettent de réparer et donc d'éliminer les lésions qui sont apparues dans le génome. Les gènes du métabolisme de détoxification sont eux responsables de l'élimination des substances chimiques mutagènes et agissent donc en amont des gènes de la réparation pour prévenir la génération de mutations.

Il est maintenant communément admis qu'une cellule, pour qu'elle soit dite cancéreuse doit avoir acquis les caractéristiques suivantes:

- Indépendance vis-à-vis des signaux stimulant la prolifération. Les cellules normales ne se divisent que lorsqu'elles reçoivent un stimulus particulier. Les cellules tumorales n'ont plus besoin de ce signal.
- Insensibilité aux signaux inhibiteurs de la prolifération.
- Résistance à l'apoptose.
- Capacité proliférative illimitée (maintien de la longueur des télomères).
- Capacité de susciter l'angiogénèse. Pour croître, les tumeurs ont un besoin important en oxygène et nutriments. Les cellules tumorales vont donc stimuler la formation de nouveaux vaisseaux sanguins afin d'approvisionner la tumeur.
- Acquisition d'un pouvoir invasif. Les cellules tumorales sont capables d'aller s'implanter à distance de leur site d'origine. C'est le pouvoir métastatique.

#### **4.2. Statut et fonction des gènes ING dans les tumeurs. (Publication n°1)**

Au cours de ma thèse, plusieurs études bibliographiques relatant et discutant les fonctions des protéines ING avaient été publiées. Cependant, bien qu'un grand nombre d'études montre une fréquente perte ou une inactivation des protéines ING dans les tumeurs humaines, aucune analyse bibliographique récente, synthétisant le statut et l'implication des gènes ING dans les tumeurs, n'était disponible. Pour cette raison, nous avons entrepris ce type d'étude et elle a été publiée en 2008 dans International Journal of Cancer (Publication n°1, présentée à la page suivante).

## MINI REVIEW

# The new tumor suppressor genes ING: Genomic structure and status in cancer

Damien Ythier, Delphine Larrieu, Christian Brambilla, Elisabeth Brambilla and Rémy Pedeux\*

Molecular Bases of Lung Cancer Progression, INSERM U823, Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, Grenoble, 38706 Cedex, France

The Inhibitor of Growth 1 (ING1) gene has been identified and characterized as a Type-II tumor suppressor gene (TSG). Subsequently, 4 additional members of the family were identified by homology search. ING proteins contain a nuclear localization sequence (NLS) and a plant homeo domain (PHD) finger motif in their C-terminus. These proteins are involved in numerous signaling pathways especially in 2 tumor suppressor pathways: apoptosis and senescence. In human tumors, several studies have shown that the expression of ING1 is frequently lost or downregulated. It occurs most frequently at the RNA level, and thus epigenetics mechanism could be involved. We summarize the current knowledge on ING proteins functions and their involvement in various signaling pathways. We also review the studies that have investigated the ING protein status in human tumors. The interest of ING proteins as biomarkers and their role in tumor initiation and progression is discussed.

© 2008 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** ING1; ING2; p53; tumor suppressor gene; human neoplasia

Tumor suppressor genes (TSG) are defined as a class of genes encoding proteins that negatively regulate cell proliferation. They are divided into 2 classes: the “caretakers” of the genome (or Type I), they usually are DNA repair genes, which protect the genome from mutations (XPB, MSH2, etc.), and the gatekeepers (or Type II), which prevent cancer through direct control of cell growth (p53, p16, etc.).<sup>1</sup> Thus, restoration of missing gatekeeper functions to cancer cells leads to suppression of the neoplastic growth; whereas restoration of caretaker functions will not affect their growth. TSG inactivation by loss or mutation is a critical step for the development of tumors.

### ING1 identification

Identification of TSG is difficult because their expression may be low in normal cells and lost in cancer cells. Their expression is often required in response to stress only. To identify new TSG, Karl Riabowol's group designed a strategy aiming at identifying genes whose loss would promote cell growth and tumor formation (xenograft in nude mice).<sup>2</sup> To this aim, they designed genetic suppressor elements (GSE) which were obtained from cDNAs resulting from subtractive hybridization between cDNAs from normal epithelial cells and cancer epithelial cells that were cloned as antisense. These GSE were introduced into preneoplastic mammary epithelial cells that are unable to form tumors in nude mice. These cells were injected in nude mice, and when occurring, tumors were recovered and partial cDNAs and their corresponding complete open reading frame (ORF) were determined. Using this methodology, the authors identified a new “candidate” TSG, they named ING1 for Inhibitor of Growth 1.<sup>2</sup> Thus this gene was characterized as a Type-II candidate TSG.

The ING1 gene has been mapped to chromosome 13 at locus 13q33-34, and it has been found to encode 5 variants as a result of the usage of different promoters, exons and splices (Fig. 1). Its TSG status has been fully established as the loss of its expression occurs in numerous cancer types (see thereafter), and knockout mice are cancer prone. Indeed, disruption of the ING1 gene results in the earlier onset and higher incidence of lymphomas, a majority of them being follicular B-cell lymphomas.<sup>3</sup> Disruption of the

p37ING1 variant alone (corresponding to p33ING1b in human or ING1v4) results in the early and highly frequent occurrence of follicular B-cell lymphomas only.<sup>4</sup>

### ING family

Subsequently, 4 new members of the ING family have been identified by homology search: ING2-5.<sup>5-7</sup> All the ING genes were mapped on independent chromosomes and interestingly, all of the ING genes but ING3 are located in the subtelomeric region of their respective chromosome (Fig. 1a). ING genes have been reported in many species including human, mouse, rat, frog, yeast, etc., suggesting their importance in central biological processes.<sup>8</sup> The ING2 gene has been mapped on chromosome 4 at locus 4q35.1 and encodes 1 variant. The ING3 gene has been mapped on chromosome 7 at the locus 7q31 and encodes 2 variants as a result of two distinct splices. The ING4 gene has been mapped on chromosome 12 at locus 12q13.3 and encodes 8 variants as a result of several alternative splicings. The ING5 gene has been mapped on chromosome 2 at locus 2q37.3 and encodes 1 variant (Fig. 1b). One pseudogene has been identified; INGX, it has been mapped on chromosome X at locus Xq12.<sup>9</sup> A new nomenclature, used in Figure 1b, has been recently proposed in order to standardize the naming of the various ING genes and their transcripts.<sup>10</sup>

### ING protein functions

ING proteins are characterized by a C-terminal domain having a high homology; the N-terminal part of each ING protein is unique (Fig. 2). The C-terminal domain contains at least 1 nuclear localization sequence (NLS) and a plant homeo domain (PHD) finger (Fig. 2). The PHD finger is found on proteins that are involved in chromatin remodeling.<sup>11,12</sup> Phylogeny studies have shown that ING1 and ING2 proteins on one hand, and ING4 and ING5 proteins on the other hand have an overall high homology and; therefore, could have closely related or redundant functions.<sup>8</sup> Several studies have shown that ING proteins play a significant role in multiple critical cellular processes such as growth regulation, senescence, apoptosis, DNA repair, cell migration, etc.<sup>13,14</sup>

p33ING1b was originally described as interacting physically with the tumor suppressor protein p53 and as being necessary for p53 transcriptional activity. Thus, an intact p33ING1b is necessary for p53 to efficiently negatively regulate cell proliferation.<sup>15</sup> Further studies have shown that all the ING proteins may be part of p53 signaling pathways to induce cell cycle arrest, apoptosis and senescence.<sup>5-7,15,16</sup> However, a note of caution is necessary as studies on ING1 knockout mice and knockout cells suggest that in physiological conditions, ING1 proteins functions may be mostly independent from p53 signaling pathways.<sup>3,4</sup>

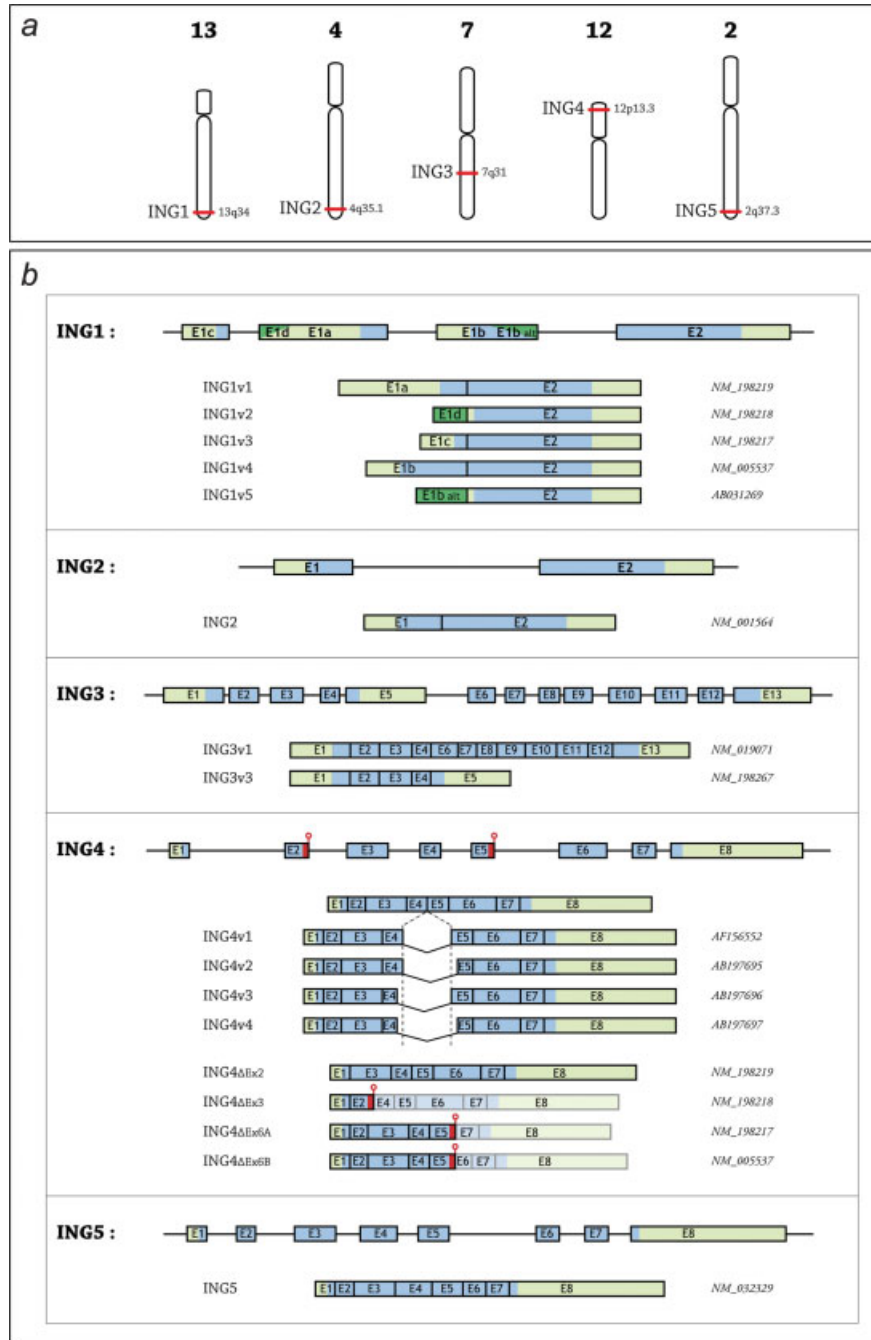
Grant sponsors: EU (Agir à dom grant, Marie Curie International Reintegration Grant), IASLC, INCa, French Ministry of Education and Research.

\*Correspondence to: Room 112, Institut Albert Bonniot, INSERM U823, UJF-Domaine de la Merci, 38706 La Tronche Cedex, France. Fax: +33-47-654-9413. E-mail: remy.pedeux@ujf-grenoble.fr

Received 25 January 2008; Accepted after revision 30 May 2008

DOI 10.1002/ijc.23790

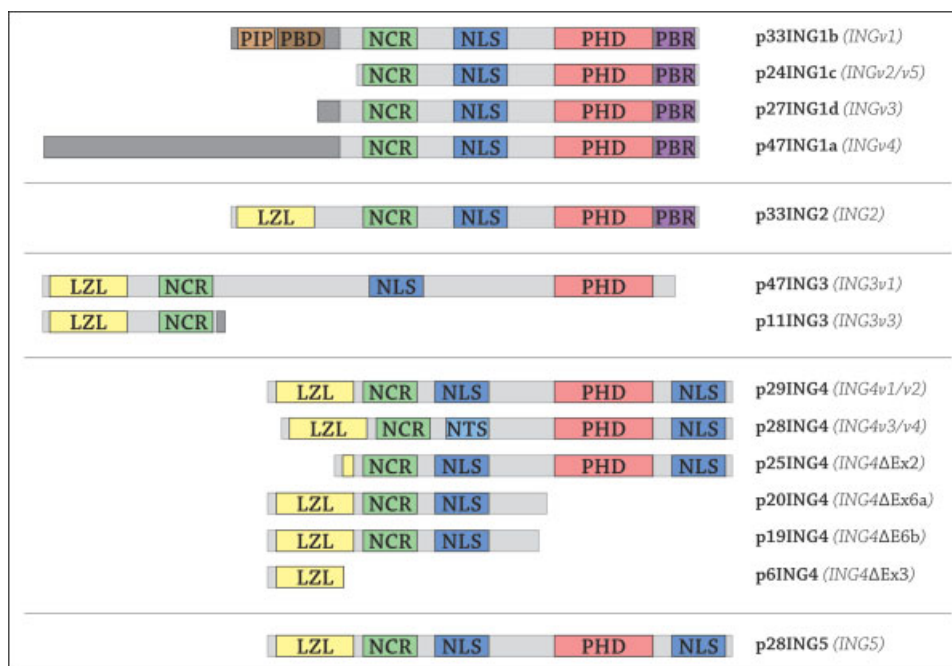
Published online 17 July 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).



**FIGURE 1** – ING genes localization, structure and transcripts. (a) Chromosomal localization. Each ING gene is located on a different chromosome and in the subtelomeric region except ING3. (b) Genomic organization of the ING genes. Genomic DNA is represented for each ING gene with the mRNA transcripts below. Exons (e) are numbered represented as boxes. Coding regions are in blue. Each identified variant is represented under the gene, with its name on the left and its Genebank accession number on the right. Red marks represent stop codons. ING1v2 and v5: Exons E1d and E1b alt (alternative) are represented in dark green. They both code for the same protein (see Fig. 2) as their ATG in the Exon 2 is the same. ING4: stop codons are represented by red marks. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

Studies in yeast have shown that ING proteins are components of histone acetylase (HAT) and histone deacetylase (HDAC) complexes.<sup>17,18</sup> As a matter of fact in human cells, every ING protein is involved in different HAT or HDAC complexes: ING1 and ING2 with the mSin3a HDAC1/2 complex, ING3 with the Tip60/NuA4 complex, ING4 with the HBO1 complex and ING5 with the HBO1 and MOZ/MORF complexes.<sup>19</sup> ING2 studies have highlighted 2 critical functions of the C-terminal domain. First, the polybasic region (PBR) located adjacent to the PHD finger is a do-

main to which PI3P (phosphoinositide 5 phosphate) is binding (Fig. 2). PI3P is a secondary messenger in cell signaling and is important in the p53 induced apoptosis in response to genotoxic stress. Thus, ING2 has been defined as a nuclear receptor of phosphoinositides.<sup>20,21</sup> Second, the PHD finger has a high affinity for the histone 3 trimethylated on lysine 4 and in response to genotoxic stress would target the mSin3a/HDAC repressor complex to the promoter of genes involved in cell cycle progression: cyclinD1 and c-myc.<sup>22,23</sup> Consequently, ING2 would be at the



**FIGURE 2** – ING proteins structure. Each ING protein with its name and coding variants mentioned on the right is represented with its characterized domains in color. The PHD and NLS domains are found in the C-terminal part of each ING protein. PIP, PCNA-interacting protein motif; PBD, partial bromo domain; NCR, novel conserved region; NLS, nuclear localization signal; NTS, nucleolar translocation sequence; PHD, plant homeo domain; PBR, poly basic region; LZL, leucine zipper-like region. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

crossroads between cell signaling, chromatin remodeling and gene expression.

ING4 functional studies suggest that this gene in addition to the common functions of the ING proteins could play a completely different role in tumorigenesis. Actually, ING4 could be involved in preventing cell's spreading and migration as well as tumor angiogenesis. Indeed, its loss results in a loss of contact inhibition, inhibition of NF- $\kappa$ B transcriptional activity and enhanced cell migration.<sup>24–27</sup> Loss of ING4 may be an important step in malignant progression, especially for glioblastoma.<sup>25</sup>

#### Interplay between variants of a single ING gene

So far, multiple transcripts and proteins have been described for ING1 and ING4 genes. These variants share different functions. Several studies have suggested that the different variants have different functions and the balance of expression of these variants may play a role in tumorigenesis because some of the variants can have dominant negative effects.

Functional studies in cells showed that ING1 variants are involved in different HAT or HDAC complexes.<sup>3,4,28,29</sup> Overexpression of p33ING1b, but not of p47ING1a, induces hyperacetylation of histones H3 and H4, *in vitro* and *in vivo* at the single cell level. p47ING1a inhibits histone acetylation *in vitro* and *in vivo* and binds the histone deacetylase HDAC1.<sup>28</sup> In mice, when the whole ING1 locus is knocked down, the pattern of tumor occurrence is different from the one observed when inactivating only 1 of the variants, ING1v1.<sup>3,4</sup> This suggests that the different variants play different roles in tumorigenesis.

When ING4 was identified in a screen designed to identify genes that suppress loss of contact inhibition elicited by overexpression of the protooncogene MYCN, a comparative genomic hybridization technology detected deletion of the ING4 locus in 10–20% of human breast cancer cell lines and primary breast tumors suggesting that it may be a TSG.<sup>26</sup> Subsequently, these deletions were reinterpreted as being variants resulting from alternative splicing.<sup>27</sup> It was further established that the different splice

variants have different biological functions. ING4-v1 is mainly nuclear and has negative effects on cell proliferation, contact inhibition and angiogenesis. ING4-v2 is mainly cytoplasmic and suppresses cell migration, but not cell spreading. ING4-v4 plays a dominant negative role in the induction of p21 and in the suppression of cell motility by ING4-v1. This illustrates the complexity of the ING4 variants role and their regulation. Thus, the different variants and their balance of expression could play an important role in tumorigenesis.

#### ING and DNA repair

Accumulating evidences show that ING proteins could be involved in DNA repair. Thus, in response to DNA damage induced by UV, ING proteins (*e.g.*, ING1) could (*i*) trigger chromatin relaxation, (*ii*) alter histone acetylation dynamics and (*iii*) facilitate the accessibility of DNA repair proteins such as XPA.<sup>30–33</sup> In addition, some evidences indicate that p33ING1b affects the degree of physical association between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p300, an association that has been proposed to link DNA repair to chromatin remodeling.<sup>28,34</sup> Thus, ING proteins that have been described as Type-II TSG could also act as Type-I suppressor genes.

These functional studies implicate the ING proteins in tumor suppressor pathways such as apoptosis and senescence as well as in DNA repair which is critical for the maintenance of the genome integrity. Thus, ING proteins may play a critical role in tumorigenesis.

#### ING status and malfunction in tumors

##### ING1

As ING1 has been discovered as a candidate TSG,<sup>2</sup> many studies have been conducted to investigate its implication in human malignancies. Overall, ING1 gene expression has been found to be downregulated or lost in many cancer types: breast, gastric, esophageal, blood, lung and brain. These studies have shown both in tumor samples and cancer cells that the loss of ING1 protein

TABLE I – ING STATUS IN HUMAN TUMORS

Tissue type	Origin	Mutation type/ expression change	Methods	Position	Coding	Frequency	ING	References
Breast and ovarian cancer	Patient	Missense	PCR-SSCP	N-term (95)	Pro→Ser	1/442	ING1b	35
	Patient	Silent	PCR-SSCP	NLS/NTS (188)	Ser	18/442	ING1b	
	Patient	Silent	PCR-SSCP	C-term (166)	Arg	1/442	ING1b	
	Patient	Silent	PCR-SSCP	PHD (228)	Cys	1/442	ING1b	
	Patient	Downregulation	RT-PCR			21/48 (44%)	ING1b	
Lymphoid malignancies	Cell lines	No mutation	PCR-SSCP			0/16	ING1b	36
	Cell lines	Downregulation	RT-PCR			9/16	ING1b	
	Cell lines	No mutation	MM			0/29	ING1	
Colorectal carcinomas	Patient	No LOH	MM				ING1	37
Gastric cancer	Cell lines	missense	Sequencing	172	Glu→Lys	1/12		38
	Cell lines	Silent	Sequencing	188	Ser	2/12		
Human head and neck cancer	Patient	Downregulation	Q-PCR			15/20 (75%)	ING1a,b,c	39
	Cell lines	No mutation	Sequencing			0/5	ING1	
Breast cancer	Patient	No mutation	Sequencing			0/20	ING1	40
Melanoma	Patient	Downregulation	Q-PCR			17/24 (70.8%)	ING1a,b,c	
Human head and neck cancer	Patient	Nuclear expression loss	IHC			40–50%	ING1	41
	Patient	LOH	MM			23/34 (68%)	ING1	
Haematological malignancies	Patient	Missense	PCR-SSCP	PHD (215)	Cys→Ser	1/23	ING1	42
	Patient	Missense	PCR-SSCP	PHD (216)	Asn→Ser	1/23	ING1	
Childhood acute lymphoblastic leukemia	Patient	Missense	PCR-SSCP	NLS (192)	Ala→asp	1/23	ING1	43
	Patient	No mutation	NIRCA			0/49	ING1	
Childhood acute lymphoblastic leukemia	Patient	Nuclear expression loss	IHC			78% (n = 145)	ING1	44
Skin basal cell carcinoma	Patient	Missense	PCR-SSCP	PHD (244)	Asn→His	1/54	ING1	45
	Patient	Overexpression	IHC			6/24 (25%)	ING1	
Adenocarcinoma of the esophagogastric junction	Patient	Silent	PCR-SSCP	173		1/19 (5.3%)	ING1	46
	Patient	Missense	PCR-SSCP	NLS (147)	Ser→Ieu	1/19 (5.3%)	ING1	
Esophageal squamous cell cancer	Patient	Downregulation	IHC			12/19 (63%)	ING1	47
	Patient	LOH	MM			17/29 (58.9)	ING1	
Breast invasive carcinoma	Patient	Missense	PCR-SSCP	PHD (223)	Asn	1/31	ING1	48
	Patient	Silent	Sequencing	PHD (219)	Pro→Ser	1/31	ING1	
	Patient	Silent	Sequencing	PHD (214)	Ala→Glu	1/31	ING1	
	Patient	Missense	Sequencing	PHD (236)	Gly→Val	1/31	ING1	
	Patient	Missense	Sequencing	PHD (233)	Val→Ile	1/31	ING1	
	Patient	Missense	Sequencing	C-term (270)	Lys→Asn	1/31	ING1	
	Patient	Downregulation	IHC			31/31 (100%)	ING1	
	Patient	Nuclear expression loss	IHC			69/86	ING1	
Nonsmall cell carcinoma	Patient	No mutation	PCR-SSCP				ING1	49
	Patient	downregulation	Q-PCR			37/88 (42%)	ING1b	
Brain tumors	Patient	Missense	PCR-SSCP	N-term (80)	Arg→His	1/29 (3.5)	ING1	50
	Cell lines	Overexpression	Q-PCR			4/6	ING1b	
Melanoma	Patient	Missense				20%	ING1	51
Neuroblastomas	Patient	Silent	PCR-SSCP			0/32	ING1	52
	Patient	Downregulation					ING1	
Hepatocellular carcinoma	Patient	Missense	PCR-SSCP	PHD (215)	Cys→Ser	7,10%	ING1	53
Lung	Cell lines	Downregulation	Q-PCR			6/7 (85%)	ING2	54
	Cell lines	No mutation	PCR-SSCP			0/31	ING2	
	Patient	No mutation	PCR-SSCP			0/30	ING2	
Melanoma	Patient	Nuclear expression loss	IHC				ING2	55
Head and neck cancers	Patient	LOH	MM			98%	ING3	56
	Patient	Downregulation	RT-PCR			50%	ING3	
Brain tumors	Patient	Mutation	PCR-SSCP	LZL (20)	Asp→Gly	1/49	ING3	25
	Patient	Downregulation	Q-PCR				ING4	
Head and neck squamous cell carcinomas	Patient	LOH	MM			33/50 (66%)	ING4	57
	Patient	No mutation	Sequencing			0/50	ING4	
Breast cancer Tumors	Patient	Downregulation	Q-PCR			38/50 (76%)	ING4	26
	Patient	Overexpression	Q-PCR			7/50 (14%)	ING4	
	Patient	Gene locus deletion	CGH			10–20%	ING4	
	Cell lines	Deletion	Sequencing	155 Frame shift	Stop	1/9	ING4	
	Cell lines	Deletion	Sequencing	149 Frame shift	Stop	1/9	ING4	
Breast cancer Tumors	Cell lines	Deletion 4 AA	Sequencing	NLS (127–130)		5/9	ING4	26
	Cell lines	Missense	Sequencing	PHD (214)	Asn→Asp	1/9	ING4	
	Cell lines	Missense	Sequencing	121	Tyr→Asn	1/9	ING4	
	Cell lines	Missense	Sequencing	50	Met→Val	1/9	ING4	
	Cell lines	Missense	Sequencing				ING4	

RT-PCR, Retrotranscription-polymerase chain reaction; Q-PCR, Quantitative-polymerase chain reaction; MM, Microsatellite marker; PCR-SSCP, Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism; NIRCA, Nonisotopic mnase cleavage assay; IHC: Immunohistochemistry.



expression is due to a decrease of the expression or stability of the mRNA (Table I). Thus, mutational analyses of ING1 on a large variety of human tumors and cancer cell lines have revealed that mutation in ING1 is an infrequently occurring phenomenon. However, when mutations are occurring, most of them are found in either the NLS or the PHD domain finger (Table I). Consequently, mutation of ING1 gene is probably not the major mechanism of ING1 inactivation.

Several other mechanisms have been identified in tumors that may result in reduction or loss of ING1 expression: (i) ING1 LOH (Loss of Heterozygosity) has been observed in more than 50% of the studied cases into head and neck cancer and esophageal squamous cell carcinomas<sup>42,47</sup>; (ii) in ovarian cancer, hypermethylation of ING1 promoter has been reported in 25% of the cases.<sup>58</sup>

In addition to downregulation, mislocalization of ING1 from the nucleus to the cytoplasm has been observed in tumors of the breast, of the brain, in melanoma and lymphoblastic leukemia.<sup>44,48,50,59</sup> The mechanisms which result in subcellular mislocalization probably implicate ING1 partners. Indeed, a recent report shows that phosphorylated ING1b on Ser199 binds to the 14-3-3 $\eta$  (eta) protein in order to be relocated to the cytoplasm. In this study, the authors showed that this relocalization blocks some of the ING1 activities such as the upregulation of cyclin dependent kinase inhibitor p21<sup>Waf1</sup>.<sup>60</sup>

Overall, the mechanisms responsible for ING1 downregulation are still not fully identified. Several yet unexplored mechanisms could be involved: chromatin remodeling on the promoter, loss of activity of transcription factor(s) responsible for ING1 expression and miRNA expression are potential mechanisms that need to be tested.

**ING1 and p53.** Because of the numerous studies showing a physical and functional interaction between ING1 and p53 proteins, several groups have investigated the relationship between ING1 and p53 status in tumors. Indeed, some of these studies suggest that there is a link between the loss of ING1 and p53 status in some tumor types. Thus, in gastric cancers, p33ING1b expression is significantly decreased in a majority of tumors and in 80% of the tumors with a lack of p33ING1b expression, a wild-type p53 gene is retained.<sup>38</sup> In non small cell lung carcinoma (NSCLC), 1 study showed that although 42% of NSCLC had reduced p33ING1b expression, 47% had mutations of the p53 gene and 17% had both reduced p33ING1b expression and mutant p53. Overall, 72% had either reduced p33ING1b expression or mutant p53 and reduction of ING1 gene expression was associated with reduced expression of the p53 effector genes p21 and bax.<sup>49</sup> Those results suggest that reduced p33ING1b expression could play an important role in carcinogenesis in tumors bearing a wild-type p53 gene. In breast carcinoma, two studies suggest that optimum function of p53 is dependent on p33ING1b. Indeed, a reduction of nuclear p33ING1b expression as seen in a series of invasive breast carcinoma is predicted to compromise p53 function<sup>48</sup> and a significant decrease of ING1 mRNA is observed in tumors being considered as having a wild-type p53 (negative for p53 immunostaining).<sup>40</sup> Overall, these studies suggest that some tumor suppressor functions of ING1 and p53 require the activity of both genes. On the other hand, in adenocarcinomas of the esophagogastric junction, no association between p53 and ING1 alterations was apparent.<sup>46</sup>

To conclude, these studies suggest that there may be a link between ING1 and p53 status in some tumors, but it is not always the case, it may depend on tumor type. Studies including a sufficient number of samples are required to clearly establish the relationship between these 2 TSG.

**ING1 and prognosis.** Studies addressing the relationship between ING1 status in tumors and prognosis are rare. p33ING1b loss of nuclear expression is observed in a majority of cases in childhood acute lymphoblastic leukemia, and it is associated with an increase in the cytoplasmic expression of the protein. In these tumors, a trend toward a better prognosis is observed when nuclear expression of p33ING1b is lost.<sup>44</sup> To the contrary, in breast tumors, p33ING1b loss of expression has been found to be associ-

ated with more poorly differentiated tumors suggesting that it may be an indicator of poor prognosis.<sup>48</sup> In advanced stages of neuroblastoma, a decreased level of p33ING1b expression is an indicator of poor prognosis. Thus, ING1 gene could play a crucial role in genesis and progression of neuroblastoma.<sup>52</sup>

### ING2

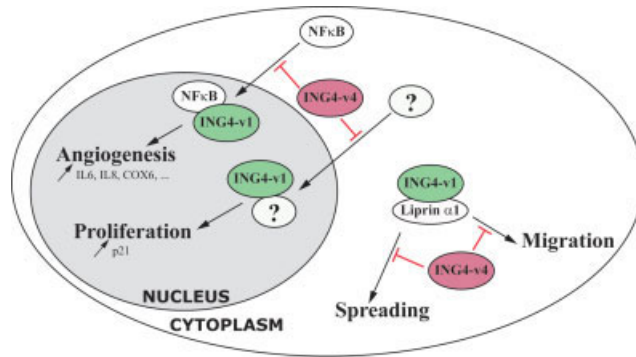
Studies on ING2 status in cancer are still rare. However, the first study underlying a potential role of ING2 in basal cell carcinomas showed a LOH in the region 4q32 in the long arm of the chromosome 4 in 20% of the cases analyzed. This region includes ING2 and SAP30 (another component of the mSin3a HDAC1/2 complex) genes. Two reports directly implicate ING2 in tumorigenesis. The first one reports that ING2 mRNA expression is reduced in 6 of 7 lung cancer cell lines.<sup>54</sup> However, no ING2 mutation was detected in 31 human cancer cell lines and 30 lung cancer biopsies. The second study reports that ING2 nuclear expression level is reduced in human melanomas compared to dysplastic nevi. In addition, no correlation between ING2 nuclear expression and tumor growth phase or tumor stage was found, suggesting that reduced ING2 expression may be involved in the initiation rather than progression of melanoma.<sup>55</sup> More recently, it has been reported that ING2 expression is lost in hepatocellular carcinoma, and it could be involved in the progression of the disease.<sup>61</sup> Thus, as observed for ING1, ING2 involvement in tumors seems to be linked to its level of expression rather than its mutational status. The mechanisms underlying the misregulation of ING2 are still unclear. More studies that will compare: LOH analysis of the chromosomal ING2 region, ING2 RNA expression level and cellular localization of ING2 will help to better characterize ING2 status and potential role in tumorigenesis. Moreover, additional studies on other types of tumors will determine if downregulation of ING2 is a common mechanism of tumorigenesis or if it is specific to certain type of tumors.

### ING3

One report implicates ING3 as a TSG in tumors.<sup>56</sup> The authors had shown a LOH of the region 7q31 that contains ING3 gene in 48 of the 49 human head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) biopsies that they analyzed, and they observed in only 1 case a missense mutation that causes an amino acid change from aspartic acid to glycine at the N-terminal of the ING3 protein (codon 20). Interestingly, this mutation occurs in a consensus leucine zipper-like motif (LZL), a domain involved in protein-protein interaction.<sup>8</sup> In addition, a loss or decreased expression of ING3 mRNA in 50% of primary tumors and 75% of tumor derived cell lines analyzed was observed. Low levels of ING3 mRNA could be the mark of an aggressive head and neck carcinoma.<sup>62,63</sup> In melanoma, ING3 nuclear expression is reduced, and as such, it could be an independent prognostic factor.<sup>64</sup> Thus, ING3 is involved in human tumorigenesis, but more studies are requested to fully establish its status and interest.

### ING4

After ING1, ING4 is the most investigated ING gene in tumors. Recently, Garkavtsev *et al.*<sup>25</sup> reported that ING4 expression was significantly suppressed at the RNA level in brain tumors and that this loss of expression correlates with tumor grade. Moreover, functional data supported the possibility that ING4 suppresses brain tumor angiogenesis through physical interaction and transcriptional repression of NF- $\kappa$ B.<sup>25</sup> Another study revealed a frequent LOH at ING4 locus that is accompanied with a loss of ING4 expression in HNSCC.<sup>64</sup> It was also found that ING4 locus is deleted in 10–20% of 146 breast cancer tissues analyzed by CGH. In this breast cancer model, ING4 has been shown to be able to suppress the loss of contact inhibition and growth in soft agar.<sup>26</sup> Most interestingly, 7 breast cancer cell lines out of 9 cancer cell lines were mutated. Five of these 7 cell lines contain the same deletion in ING4 transcripts which results in the loss of 4 highly charged amino acid residues (KGKK) that are part of one of the ING4 nuclear localization signal. The high frequency of this muta-



**FIGURE 3** – Hypothetical model of ING4-v4 dominant negative effect on ING4-v1. The ING4-v1 variant has the ability to bind to various protein partners in the nucleus. Thus, its interaction with NFκB represses angiogenesis, whereas its interaction with unidentified protein partners represses cell proliferation. ING4-v4 would anchor ING4-v1 nuclear partners in the cytoplasm, and thus would repress antiproliferating and antiangiogenic effect of ING4-v1. Within the cytoplasm, ING4-v4 also represses the ability of the ING4-v1-Liprin α1 complex to inhibit cell spreading and cell migration. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

tion cannot be explained by a simple hot spot mutation. Indeed, Unoki *et al.* have recently published a study in which they revealed 3 additional variants of ING4 as a result of alternative splicing between Exons 3 and 4 (ING4\_v2, ING4\_v3 and ING4\_v4).<sup>27</sup> These 3 new variants correspond to a deletion of 1, 3 or 4 amino acid in the NLS of the original ING4 (ING4\_v1) (Figs. 1b and 2). One of these 3 new variants correspond to the deleted form of ING4 (ING4-v4) initially observed by Kim *et al.* Regarding the ING4\_v4 variant, it exerts a dominant negative effect on ING4\_v1 in its ability to activate *p21/WAF1* promoter, cell spreading and cell migration.<sup>27</sup> It seems that the dominant negative effect is not due to a direct interaction by the formation of heterodimers suggesting that cytoplasmic ING4\_v4 may anchor ING4\_v1 nuclear protein partners such as HBO1<sup>19</sup> or NF-κB<sup>25</sup> in the cytoplasm. ING4\_v4 would anchor NF-κB in the cytoplasm, preventing its nuclear interaction with ING4\_v1 (Fig. 3). Serum starvation/activation or DNA-damaging agents (adriamycin, etoposide) do not seem able to differentially induce type-specific expression of the ING4 variants.<sup>27</sup> Therefore, the stimuli and mechanisms that regulate a preferential splice of the different ING4 variants are undetermined. Nevertheless, the relative amounts between the 4 splice variants of ING4 may modulate the recently reported functions in controlling the cell cycle checkpoint, cell contact inhibition, cell spreading and angiogenesis.

### ING5

So far, there is no report regarding the status of ING5 in cancer. A recent report shows a frequent LOH (68%) of the chromosome

2 at the region 2q37.3, that contains ING5 gene, in oral cancer, but studies are requested to establish the interest of this TSG in tumors.

### Conclusion

ING1 has been identified as a gene whose loss results in tumor promotion and growth. Its TSG status is now established as its expression is lost in a wide variety of human tumors and knockout mice develop tumors earlier and more frequently. The other ING genes (ING2–5) remain “candidate” TSG. Indeed, numerous studies have implicated ING genes in tumor suppressor pathways, but data are still lacking to strongly establish their role in human tumors, their tumor suppressor status and their interest as biomarkers for prognosis. As ING1 and ING2 on one hand and ING4 and ING5 on the other hand are structurally closely related, they may have redundant functions. Therefore, their status should be investigated in parallel in human tumors. In addition, ING2, 3, 4 and 5 knockout mice as well as combinations of double ING knockout or with other TSG, such as p53, would help to fully establish their tumor suppressor status.

For all ING genes but ING5, it is now becoming clear that their expression is lost or strongly reduced in many different types of tumors. However, the mechanisms resulting in their inactivation are not fully understood. It is well described that this loss is rarely due to mutation or rearrangement of the gene. As the decrease of expression occurs at the RNA level, analysis of epigenetic events (chromatin remodeling, DNA methylation, miRNA, etc.) should be conducted to establish if such events are involved. Understanding the mechanisms of INGS inactivation is especially important because, as Type-II TSG, the restoration of ING genes expression could be used for therapeutic purpose.

It is intriguing that ING genes are so broadly involved in human tumorigenesis. However, their importance in the tumorigenesis process is not clear yet. Therefore, studies with a high number of samples focusing their interest on INGS as diagnostic biomarkers for example are warranted. It needs to be established for the various cancer types at which stage their loss of expression occurs, and what interest they may have as biomarkers for the diagnostic and/or the therapeutic choice. The well-described ING genes involvement in p53 tumor suppressor pathways indicate that the relationship with p53 status also needs to be investigated. Moreover, the antagonist effects of variants of a single ING gene suggest that the crosstalk between the variants of a single ING gene needs to be investigated.

### Acknowledgements

R.P. was a recipient of an IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) fellowship and is supported by an “Agir à dom” grant and a Marie Curie International Reintegration Grant from the EU. D.Y. is a recipient of INCa a doctoral fellowship, and D.L. is a recipient of a doctoral fellowship from the French Ministry of Education and Research.

### References

- Kinzler KW, Vogelstein B. Landscaping the cancer terrain. *Science* 1998;280:1036–7.
- Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A, Riabowol K. Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat genet* 1996;14:415–20.
- Kichina JV, Zeremski M, Aris L, Gurova KV, Walker E, Franks R, Nikitin AY, Kiyokawa H, Gudkov AV. Targeted disruption of the mouse *ing1* locus results in reduced body size, hypersensitivity to radiation and elevated incidence of lymphomas. *Oncogene* 2006;25:857–66.
- Coles AH, Liang H, Zhu Z, Marfella CG, Kang J, Imbalzano AN, Jones SN. Deletion of p37Ing1 in mice reveals a p53-independent role for Ing1 in the suppression of cell proliferation, apoptosis, and tumorigenesis. *Cancer Res* 2007;67:2054–61.
- Shiseki M, Nagashima M, Pedoux RM, Kitahama-Shiseki M, Miura K, Okamura S, Onogi H, Higashimoto Y, Appella E, Yokota J, Harris CC. p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity. *Cancer Res* 2003;63:2373–8.
- Nagashima M, Shiseki M, Miura K, Hagiwara K, Linke SP, Pedoux R, Wang XW, Yokota J, Riabowol K, Harris CC. DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9671–6.
- Nagashima M, Shiseki M, Pedoux RM, Okamura S, Kitahama-Shiseki M, Miura K, Yokota J, Harris CC. A novel PHD-finger motif protein, p47ING3, modulates p53-mediated transcription, cell cycle control, and apoptosis. *Oncogene* 2003;22:343–50.
- He GH, Helbing CC, Wagner MJ, Sensen CW, Riabowol K. Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins. *Mol Biol Evol* 2005;22:104–16.
- Jager D, Stockert E, Scanlan MJ, Gure AO, Jager E, Knuth A, Old LJ, Chen YT. Cancer-testis antigens and ING1 tumor suppressor gene product are breast cancer antigens: characterization of tissue-specific

- ING1 transcripts and a homologue gene. *Cancer Res* 1999;59:6197–204.
10. Walzak AA, Veldhoen N, Feng X, Riabowol K, Helbing CC. Expression profiles of mRNA transcript variants encoding the human inhibitor of growth tumor suppressor gene family in normal and neoplastic tissues. *Exp Cell Res* 2007.
  11. Bienz M. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem Sci* 2006;31:35–40.
  12. Mellor J. It takes a PHD to read the histone code. *Cell* 2006;126:22–4.
  13. Gong W, Suzuki K, Russell M, Riabowol K. Function of the ING family of PHD proteins in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:1054–65.
  14. Russell M, Berardi P, Gong W, Riabowol K. Grow-ING, Age-ING and Die-ING: ING proteins link cancer, senescence and apoptosis. *Exp Cell Res* 2006;312:951–61.
  15. Garkavtsev I, Grigorian IA, Ossovskaya VS, Chernov MV, Chumakov PM, Gudkov AV. The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control. *Nature* 1998;391:295–8.
  16. Pedoux R, Sengupta S, Shen JC, Demidov ON, Saito S, Onogi H, Kumamoto K, Wincovitch S, Garfield SH, McMenamin M, Nagashima M, Grossman SR, et al. ING2 regulates the onset of replicative senescence by induction of p300-dependent p53 acetylation. *Mol Cell Biol* 2005;25:6639–48.
  17. Loewith R, Meijer M, Lees-Miller SP, Riabowol K, Young D. Three yeast proteins related to the human candidate tumor suppressor p33(ING1) are associated with histone acetyltransferase activities. *Mol Cell Biol* 2000;20:3807–16.
  18. Soliman MA, Riabowol K. After a decade of study-ING, a PHD for a versatile family of proteins. *Trends Biochem Sci* 2007.
  19. Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, Landry AJ, Cote V, Selleck W, Lane WS, Tan S, Yang XJ, Cote J. ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell* 2006;21:51–64.
  20. Gozani O, Karuman P, Jones DR, Ivanov D, Cha J, Lugovskoy AA, Baird CL, Zhu H, Field SJ, Lessnick SL, Villaseñor J, Mehrotra B, et al. The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* 2003;114:99–111.
  21. Kaadige MR, Ayer DE. The polybasic region that follows the plant homeodomain zinc finger 1 of Pf1 is necessary and sufficient for specific phosphoinositide binding. *J Biol Chem* 2006;281:28831–6.
  22. Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Pena P, Lan F, Kaadige MR, Lacoste N, Cayrou C, et al. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* 2006;442:96–9.
  23. Pena PV, Davrazou F, Shi X, Walter KL, Verkhusha VV, Gozani O, Zhao R, Kutateladze TG. Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature* 2006;442:100–3.
  24. Shen JC, Unoki M, Ythier D, Duperray A, Varticovski L, Kumamoto K, Pedoux R, Harris CC. Inhibitor of growth 4 suppresses cell spreading and cell migration by interacting with a novel binding partner, liprin alpha1. *Cancer Res* 2007;67:2552–8.
  25. Garkavtsev I, Kozin SV, Chernova O, Xu L, Winkler F, Brown E, Barnett GH, Jain RK. The candidate tumor suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis. *Nature* 2004;428:328–32.
  26. Kim S, Chin K, Gray JW, Bishop JM. A screen for genes that suppress loss of contact inhibition: identification of ING4 as a candidate tumor suppressor gene in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:16251–6.
  27. Unoki M, Shen JC, Zheng ZM, Harris CC. Novel splice variants of ING4 and their possible roles in the regulation of cell growth and motility. *J Biol Chem* 2006;281:34677–86.
  28. Vieyra D, Loewith R, Scott M, Bonnefin P, Boisvert FM, Cheema P, Pastyrkova S, Meijer M, Johnston RN, Bazett-Jones DP, McMahon S, Cole MD, et al. Human ING1 proteins differentially regulate histone acetylation. *J Biol Chem* 2002;277:29832–9.
  29. Vieyra D, Toyama T, Hara Y, Boland D, Johnston R, Riabowol K. ING1 isoforms differentially affect apoptosis in a cell age-dependent manner. *Cancer Res* 2002;62:4445–52.
  30. Cheung KJ, Jr, Mitchell D, Lin P, Li G. The tumor suppressor candidate p33(ING1) mediates repair of UV-damaged DNA. *Cancer Res* 2001;61:4974–7.
  31. Kuo WH, Wang Y, Wong RP, Campos EI, Li G. The ING1b tumor suppressor facilitates nucleotide excision repair by promoting chromatin accessibility to XPA. *Exp Cell Res* 2007;313:1628–38.
  32. Wang Y, Wang J, Li G. Leucine zipper-like domain is required for tumor suppressor ING2-mediated nucleotide excision repair and apoptosis. *FEBS Lett* 2006;580:3787–93.
  33. Wang J, Chin MY, Li G. The novel tumor suppressor p33ING2 enhances nucleotide excision repair via induction of histone H4 acetylation and chromatin relaxation. *Cancer Res* 2006;66:1906–11.
  34. Scott M, Bonnefin P, Vieyra D, Boisvert FM, Young D, Bazett-Jones DP, Riabowol K. UV-induced binding of ING1 to PCNA regulates the induction of apoptosis. *J Cell Sci* 2001;114:3455–62.
  35. Toyama T, Iwase H, Watson P, Muzik H, Saettler E, Magliocco A, DiFrancesco L, Forsyth P, Garkavtsev I, Kobayashi S, Riabowol K. Suppression of ING1 expression in sporadic breast cancer. *Oncogene* 1999;18:5187–93.
  36. Ohmori M, Nagai M, Tasaka T, Koeffler HP, Toyama T, Riabowol K, Takahara J. Decreased expression of p33ING1 mRNA in lymphoid malignancies. *Am J Hematol* 1999;62:118–9.
  37. Sarela AI, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. The candidate tumour suppressor gene, ING1, is retained in colorectal carcinomas. *Eur J Cancer* 1999;35:1264–7.
  38. Oki E, Maehara Y, Tokunaga E, Kakeji Y, Sugimachi K. Reduced expression of p33(ING1) and the relationship with p53 expression in human gastric cancer. *Cancer Lett* 1999;147:157–62.
  39. Sanchez-Cespedes M, Okami K, Cairns P, Sidransky D. Molecular analysis of the candidate tumor suppressor gene ING1 in human head and neck tumors with 13q deletions. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;27:319–22.
  40. Tokunaga E, Maehara Y, Oki E, Kitamura K, Kakeji Y, Ohno S, Sugimachi K. Diminished expression of ING1 mRNA and the correlation with p53 expression in breast cancers. *Cancer Lett* 2000;152:15–22.
  41. Nouman GS, Anderson JJ, Mathers ME, Leonard N, Crosier S, Lunec J, Angus B. Nuclear to cytoplasmic compartment shift of the p33ING1b tumour suppressor protein is associated with malignancy in melanocytic lesions. *Histopathology* 2002;40:360–6.
  42. Gunduz M, Ouchida M, Fukushima K, Hanafusa H, Etani T, Nishioka S, Nishizaki K, Shimizu K. Genomic structure of the human ING1 gene and tumor-specific mutations detected in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 2000;60:3143–6.
  43. Bromidge T, Lynas C. Relative levels of alternative transcripts of the ING1 gene and lack of mutations of p33/ING1 in haematological malignancies. *Leukemia Res* 2002;26:631–5.
  44. Nouman GS, Anderson JJ, Wood KM, Lunec J, Hall AG, Reid MM, Angus B. Loss of nuclear expression of the p33(ING1b) inhibitor of growth protein in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol* 2002;55:596–601.
  45. Chen B, Campos EI, Crawford R, Martinka M, Li G. Analyses of the tumour suppressor ING1 expression and gene mutation in human basal cell carcinoma. *Int J Oncol* 2003;22:927–31.
  46. Hara Y, Zheng Z, Evans SC, Malatjalian D, Riddell DC, Guernsey DL, Wang LD, Riabowol K, Casson AG. ING1 and p53 tumor suppressor gene alterations in adenocarcinomas of the esophagogastric junction. *Cancer Lett* 2003;192:109–16.
  47. Chen L, Matsubara N, Yoshino T, Nagasaka T, Hoshizima N, Shirakawa Y, Naomoto Y, Isozaki H, Riabowol K, Tanaka N. Genetic alterations of candidate tumor suppressor ING1 in human esophageal squamous cell cancer. *Cancer Res* 2001;61:4345–9.
  48. Nouman GS, Anderson JJ, Crosier S, Shrimankar J, Lunec J, Angus B. Downregulation of nuclear expression of the p33(ING1b) inhibitor of growth protein in invasive carcinoma of the breast. *J Clin Pathol* 2003;56:507–11.
  49. Kameyama K, Huang CL, Liu D, Masuya D, Nakashima T, Sumitomo S, Takami Y, Kinoshita M, Yokomise H. Reduced ING1b gene expression plays an important role in carcinogenesis of non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003;9:4926–34.
  50. Vieyra D, Senger DL, Toyama T, Muzik H, Brasher PM, Johnston RN, Riabowol K, Forsyth PA. Altered subcellular localization and low frequency of mutations of ING1 in human brain tumors. *Clin Cancer Res* 2003;9:5952–61.
  51. Campos EI, Martinka M, Mitchell DL, Dai DL, Li G. Mutations of the ING1 tumor suppressor gene detected in human melanoma abrogate nucleotide excision repair. *Int J Oncol* 2004;25:73–80.
  52. Takahashi M, Ozaki T, Todo S, Nakagawara A. Decreased expression of the candidate tumor suppressor gene ING1 is associated with poor prognosis in advanced neuroblastomas. *Oncol Rep* 2004;12:811–6.
  53. Zhu Z, Lin J, Qu JH, Feitelson MA, Ni CR, Li FM, Zhu MH. Inhibitory effect of tumor suppressor p33(ING1b) and its synergy with p53 gene in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005;11:1903–9.
  54. Okano T, Gemma A, Hosoya Y, Hosomi Y, Nara M, Kokubo Y, Yoshimura A, Shibuya M, Nagashima M, Harris CC, Kudoh S. Alterations in novel candidate tumor suppressor genes, ING1 and ING2 in human lung cancer. *Oncol Rep* 2006;15:545–9.
  55. Lu F, Dai DL, Martinka M, Ho V, Li G. Nuclear ING2 expression is reduced in human cutaneous melanomas. *Br J Cancer* 2006;95:80–6.
  56. Gunduz M, Ouchida M, Fukushima K, Ito S, Sitsumori Y, Nakashima T, Nagai N, Nishizaki K, Shimizu K. Allelic loss and reduced expression of the ING3, a candidate tumor suppressor gene at 7q31, in human head and neck cancers. *Oncogene* 2002;21:4462–70.
  57. Gunduz M, Nagatsuka H, Demircan K, Gunduz E, Cengiz B, Ouchida M, Tsujigiwa H, Yamachika E, Fukushima K, Beder L, Hirohata S, Ninomiya Y, et al. Frequent deletion and down-regulation of

- ING4, a candidate tumor suppressor gene at 12p13, in head and neck squamous cell carcinomas. *Gene* 2005;356:109–17.
58. Shen DH, Chan KY, Khoo US, Ngan HY, Xue WC, Chiu PM, Ip P, Cheung AN. Epigenetic and genetic alterations of p33ING1b in ovarian cancer. *Carcinogenesis* 2005;26:855–63.
  59. Nouman GS, Angus B, Lunec J, Crosier S, Lodge A, Anderson JJ. Comparative assessment expression of the inhibitor of growth 1 gene (ING1) in normal and neoplastic tissues. *Hybrid Hybridomics* 2002;21:1–10.
  60. Gong W, Russell M, Suzuki K, Riabowol K. Subcellular targeting of p33ING1b by phosphorylation-dependent 14-3-3 binding regulates p21WAF1 expression. *Mol Cell Biol* 2006;26:2947–54.
  61. Zhang HK, Pan K, Wang H, Weng DS, Song HF, Zhou J, Huang W, Li JJ, Chen MS, Xia JC. Decreased expression of ING2 gene and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2007.
  62. Gunduz M, Beder LB, Gunduz E, Nagatsuka H, Fukushima K, Pehlivan D, Cetin E, Yamanaka N, Nishizaki K, Shimizu K, Nagai N. Downregulation of ING3 mRNA expression predicts poor prognosis in head and neck cancer. *Cancer Sci* 2007.
  63. Wang Y, Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of nuclear ING3 expression in human cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:4111–6.
  64. Gunduz M, Nagatsuka H, Demircan K, Gunduz E, Cengiz B, Ouchida M, Tsujigiwa H, Yamachika E, Fukushima K, Beder L, Hirohata S, Ninomiya Y, et al. Frequent deletion and down-regulation of ING4, a candidate tumor suppressor gene at 12p13, in head and neck squamous cell carcinomas. *Gene* 2005;356:109–17.

### 4.3. Carcinogénèse Pulmonaire.

Comme nous avons pu le voir précédemment, la protéine ING2 est impliquée dans plusieurs fonctions suppressives de tumeur. Cependant, au commencement de ma thèse son statut dans les cancers était inconnu. Dans ce contexte, une partie de mes travaux a consisté à étudier le statut d'ING2 dans les cancers du poumon. Ainsi je consacrerai la fin de cette introduction à la présentation générale de ce type de cancer.

#### 4.3.1. Données épidémiologiques

Le cancer du poumon est le troisième cancer le plus fréquemment diagnostiqué. En effet, en Europe, en 2006, il a été estimé que parmi les cancers diagnostiqués, 12,1 % (386000 cas) sont des cancers du poumon, 12,9 % sont des cancers colo-rectaux (412900 cas) et 13,5 % (429900 cas) sont des cancers du sein. Bien que le cancer du poumon soit en troisième position des cancers diagnostiqués, il reste la première cause de mortalité par cancer, soit 19,7% des décès liés aux cancers (334800 décès) (Ferlay et al., 2007). Ainsi, le cancer du poumon est un problème de santé public majeur. En Europe, le taux de survie à 5 ans n'excède pas 10 % (Parkin et al., 2005). Ce très mauvais pronostic est principalement dû à un diagnostic trop tardif rendant impossible la résection chirurgicale de la tumeur.

La principale cause du cancer pulmonaire est bien entendu le tabagisme (actif et passif). Aux Etats-Unis, ce dernier est associé à 87 % des cancers du poumon (Wingo et al., 1999). Le taux d'exposition au tabac (quantité de cigarettes fumées) est directement corrélé à l'incidence (Williams and Sandler, 2001). L'exposition à d'autres substances comme l'amiante ou l'arsenic, en général dans le cadre professionnel, augmente le facteur de risque (Alberg et al., 2005).

#### 4.3.2. Classification histologique.

Selon la classification publiée par l'OMS en 1999, mise à jour depuis en 2004, les cancers pulmonaires peuvent être divisés en cinq principaux sous-types histologiques. Par ordre décroissant d'incidence ils sont représentés par les adénocarcinomes, les carcinomes malpighiens, les carcinomes à petites cellules, les carcinomes à grandes cellules et les carcinoïdes.

Les adénocarcinomes sont des tumeurs épithéliales et sont les plus fréquemment rencontrés (40% des carcinomes pulmonaires). Les carcinomes malpighiens sont également des tumeurs épithéliales caractérisées par une synthèse de kératine. Ce type histologique représente 30 % des carcinomes pulmonaires. Les carcinomes à petites cellules (CPC) sont des tumeurs neuroendocrines. Les CPC doivent leur nom aux cellules qui les constituent car elles présentent un rapport noyau/cytoplasme très élevé. Les carcinomes à grandes cellules ne présentent aucune des marques de différenciation des trois précédents sous types histologiques et sont de ce fait un diagnostic d'exclusion. Enfin les carcinoïdes présentent une différenciation neuroendocrine et se différencient des autres sous-types neuroendocriniens (CPC et carcinome à grandes cellules) par leur meilleur pronostic et par leur prévalence élevée chez le non fumeur.

D'un point de vue de la prise en charge thérapeutique, deux principales catégories de tumeurs sont actuellement reconnues : les CPC et les carcinomes pulmonaires non à petites cellules (NSCLC : « Non-Small Cell lung Carcinoma ») qui regroupent les autres sous-types de carcinomes pulmonaires.

### 4.3.3. Principales caractéristiques moléculaires de la carcinogénèse pulmonaire.

#### 4.3.3.1. Susceptibilité.

Bien que 80 % des cancers pulmonaires soient dus au tabac, seul 10 à 15 % des fumeurs développent un cancer du poumon. Cette observation suggère que des facteurs génétiques confèrent à certains fumeurs un terrain plus propice au développement de carcinomes bronchiques (Lippman and Spitz, 2001; Spivack et al., 1997).

Les carcinogènes du tabac sont des composés toxiques qui sont métabolisés par les cellules puis excrétés pour être éliminés par l'organisme. Les protéines de la famille du cytochrome p450 CYP1A1 oxydent ces carcinogènes, ce qui les rend très réactifs. Ces composés peuvent alors réagir avec l'ADN et générer des mutations. Les membres de la famille de la glutathione S transférase (GST) sont capables de réduire ces composés pour les convertir en formes solubles excrétables. Ainsi, l'équilibre entre activation et détoxification des carcinogènes du tabac joue un rôle important dans la carcinogénèse liée au tabac. En accord avec cela, il a été montré que des patients présentant à la fois une forme polymorphe de CYP1A1, dont l'activité est particulièrement élevée et une inactivation de la GSTM1, ont une susceptibilité accrue au cancer du poumon (Hecht, 2002).

Lors de la métabolisation des carcinogènes du tabac, les composés réactifs générés causent des lésions dans l'ADN. Afin de prévenir l'apparition de mutations, ces lésions sont détectées et éliminées par les systèmes de réparation de l'ADN qui incluent la NER (« Nucléotide Exision Repair ») et la BER (« Base Exision Repair »). Ainsi, l'altération des systèmes de réparation est également un facteur de prédisposition au cancer du poumon (Hung et al., 2005). De manière intéressante, l'altération des systèmes de réparation est également facteur de pronostic pour la réponse à la chimiothérapie. Par exemple, l'agent de chimiothérapie cisplatine empêche la réplication des cellules puisqu'il génère la formation de liaisons covalentes entre les deux brins complémentaires de l'ADN. La NER est étroitement impliquée dans l'élimination de ce type de lésion et il a été montré qu'elle est associée à la résistance au traitement par le cisplatine (Reed, 1998). Dans le cadre du cancer du poumon, il a été montré que contrairement aux patients n'exprimant pas la protéine

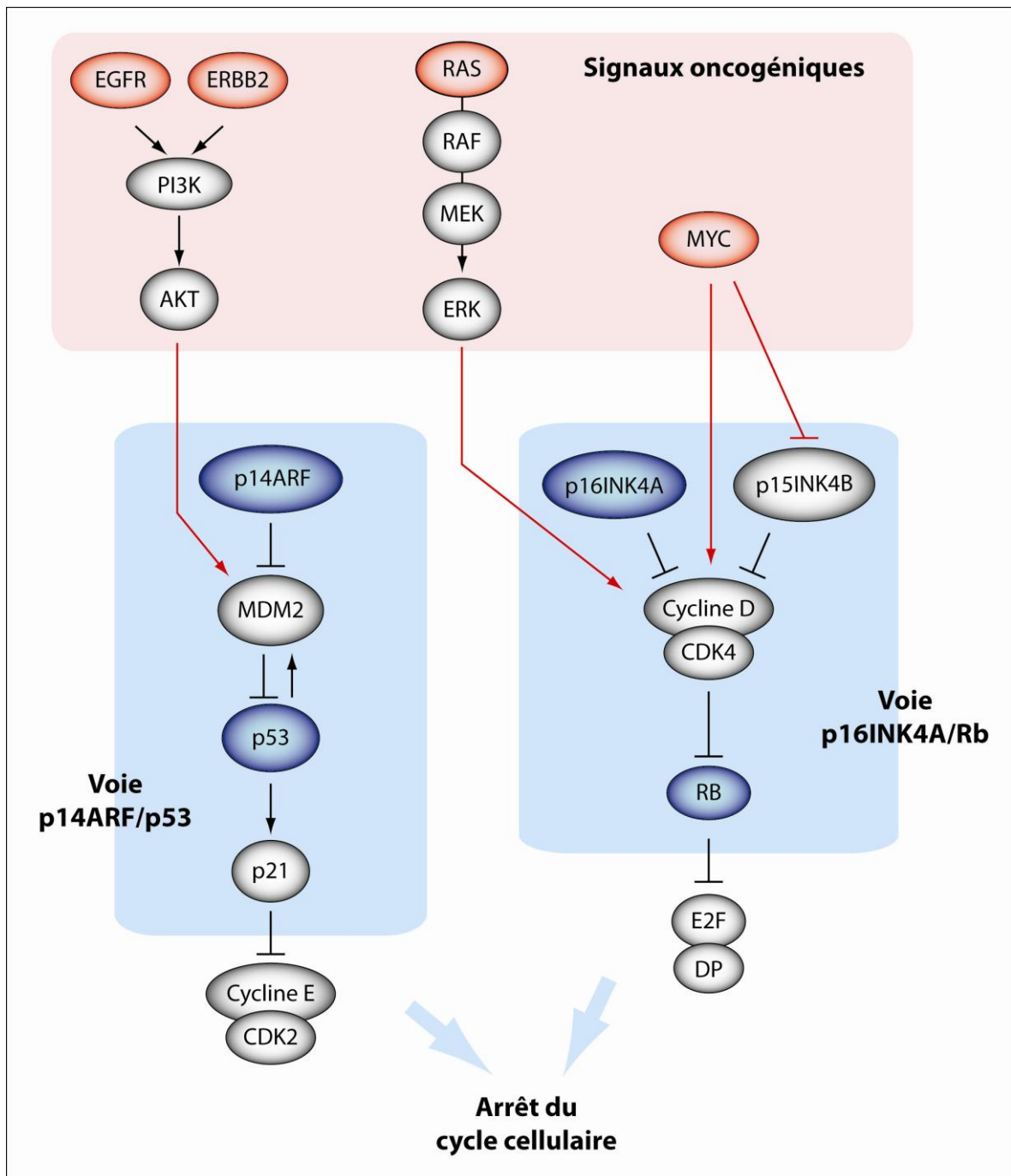
ERCC1 (acteur indispensable de la NER), les patients l'exprimant présentent une résistance au traitement par le cisplatine (Olaussen et al., 2006; Olaussen et al., 2007). Ainsi, une mauvaise réparation sensibilise au cancer mais permet une meilleure réponse au traitement.

#### 4.3.3.2. Principales voies suppressives de tumeurs inactivées dans les cancers du poumon.

Plusieurs études ont montré une fréquente perte d'hétérozygotie des locus 3p, 9p21, 13q14, and 17p13. La perte d'hétérozygotie de l'allèle 3p est l'événement le plus précoce observé dans la carcinogénèse bronchique et correspond à la délétion la plus fréquemment observée dans les cancers bronchiques, suggérant la présence d'un gène suppresseur de tumeurs important dans cette région. Les locus 9p21, 13q14, and 17p13 contiennent respectivement les gènes *p16INK4A/p14ARF/p15INK4B*, *RB* (rétinoblastome) et *TP53*. Ces protéines sont impliquées dans deux grandes voies de suppression des tumeurs, les voies de signalisation p14ARF/p53 et p16INK4/RB, qui sont inactivées dans les cancers pulmonaires (Figure 11).

Depuis la première mise en évidence d'une protéine p53 mutée dans le cancer du poumon (Takahashi et al., 1989), un grand nombre d'études ont permis de montrer que p53 est mutée dans environ 90% des CPC et dans 40-70 % des NSCLC. L'ubiquitine ligase E3 MDM2 inhibe p53 par ubiquitination de cette dernière pour induire sa dégradation dans le protéasome. Ainsi MDM2 fonctionne comme un oncogène (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997). Deux groupes indépendants ont montré que MDM2 est surexprimée dans 25-50 % des NSCLC et que de manière intéressante cette surexpression est associée à un facteur de bon pronostic (Higashiyama et al., 1997; Ko et al., 2000). p14ARF inactive MDM2 en inhibant son activité E3 ubiquitine ligase d'une part et en la séquestrant dans le nucléole d'autre part (Weber et al., 1999; Zhang and Xiong, 1999). Une perte d'expression de p14ARF a été observée dans 60% des cancers du poumon (Sanchez-Cespedes et al., 1999).





**Figure 11 : Altération des voies suppressives de tumeurs dans la carcinogénèse bronchique.** Deux principales voies, p14ARF/p53 et p16INK4/RB, impliquées dans les points de contrôle du cycle cellulaire, sont inactivées au cours de la carcinogénèse bronchique. L'inactivation de ces deux voies résulte d'une inactivation d'un ou plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs qui les composent (représentés en bleu). Elle peut également résulter d'une activation d'un ou plusieurs oncogènes (représentés en rouge) qui sont directement connectés à l'une de ces deux voies. (Adapté d'après Osada et Takahashi, 2002)

La voie de signalisation p16INK4/RB régule négativement le cycle cellulaire, notamment au niveau de la transition G1/S. En phase G1, RB est hypophosphorylée et dans cette forme, elle interagit avec le facteur de transcription E2F1 pour le séquestrer et donc l'inactiver. En réponse à un signal mitogénique ou suite à l'activation d'un oncogène, comme par exemple MYC (voir ci-après), RB va successivement être phosphorylée par les complexes CDK (Cyclin Dependent Kinase) CyclinD-CDK4/6 et CyclinE-CDK2. Cette modification induit la libération d'E2F1 qui va alors activer une série de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire (Muller et al., 2001). La protéine p16INK4 maintient RB dans sa forme hypophosphorylée en inhibant le complexe CyclinD-CDK4/6. Dans les CPC RB n'est plus exprimée dans plus de 90 % des cas (Beasley et al., 2003). Cette inactivation résulte principalement de la délétion d'un des deux allèles et de l'inactivation du deuxième allèle par mutation ou épissage aberrant (Gouyer et al., 1998). Dans les NSCLC, l'expression de RB n'est perdue que dans 15-30 % des cas. Cependant, au laboratoire il a été montré que dans 50 % des NSCLC RB est présente sous forme inactive suite à la perte d'expression de p16INK4 (Brambilla et al., 1999). La perte d'expression de p16INK4 résulte dans un tiers des cas d'une délétion du gène, dans la moitié des cas d'une hyperméthylation de son promoteur et dans quelques cas de mutations ponctuelles (Gazzeri et al., 1998).

#### 4.3.3.3. Principales voies oncogéniques activées dans les cancers du poumon.

A ce jour, un très grand nombre d'oncogènes ont été identifiés (Sekido et al., 2003). La liste de ceux qui sont le plus fréquemment impliqués et le mieux caractérisés dans les cancers bronchiques est présentée dans le Tableau 1. Ainsi, trois familles d'oncogènes sont principalement impliquées dans la cancérogénèse bronchique : les gènes de la famille RAS, les gènes de la famille MYC et les gènes de la famille des récepteurs aux facteurs de croissance ERBB.

**Tableau 1 : Principaux oncogènes impliqués dans la carcinogénèse pulmonaire.**

Nom	Fonction	Mécanisme d'activation	Fréquence d'activation	Références
<b>KRAS</b>	Protéine G sous-membranaire	Mutation sur codon 12, 13 et 61	30 % des ADK	(Rodenhuis and Slebos, 1992)
<b>MYC</b>	Facteur de transcription	Surexpression	50 % NSCLC 30 % ADK	(Richardson and Johnson, 1993)
<b>EGFR</b>	Récepteur membranaire à tyrosine kinase	Mutations Surexpression	60 % des cancers bronchiques	(Rusch et al., 1993)
<b>ERB2</b>	Récepteur membranaire à tyrosine kinase	Surexpression	30 % des cancers bronchiques	(Weiner et al., 1990)

La famille RAS est composée de trois gènes codant pour les trois protéines : KRAS, HRAS et NRAS. Dans leur forme active, ces protéines interagissent avec le GTP. Grâce à leur activité GTPase ces dernières retournent dans une forme inactive en hydrolysant le GTP en GDP. KRAS est très fréquemment affectée dans les cancers du poumon alors que HRAS et NRAS ne le sont que très rarement. L'activation de KRAS résulte dans la majorité des cas d'une perte de son activité GTPase suite à une mutation des codons 12, 13 ou 61 (Richardson and Johnson, 1993). KRAS est alors maintenue dans sa forme active liée au GTP et active de manière constitutive la voie RAF1/MAPK. L'activation de cette voie induit l'expression de gènes prolifératifs comme la Cycline D1 ou MYC (Schulze et al., 2001) (figure11).

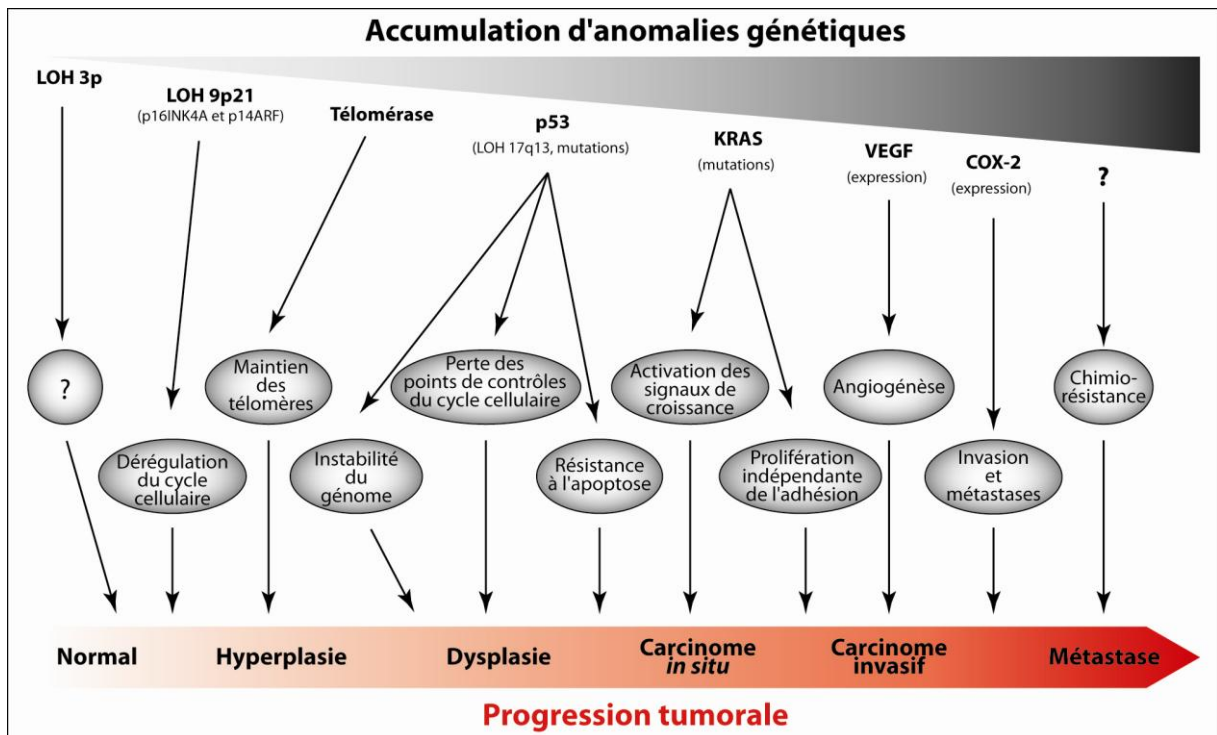
Parmi les trois gènes de la famille MYC (MYC, MYCN et MYCL) c'est MYC qui est le plus fréquemment activé dans les cancers bronchiques. MYC active la prolifération par plusieurs mécanismes. Par exemple, MYC inhibe la protéine Miz-1 qui est connue pour activer l'expression de p15INK4B. De ce fait, MYC régule négativement la voie de suppression des tumeurs p16INK4A/RB. D'autre part, MYC active l'expression des Cyclines D1 et D2 (Perez-Roger et al., 1999). De manière intéressante, MYC est capable d'activer la voie de suppression des tumeurs p14ARF/p53 (Zindy et al., 1998) (figure11). Bien que cela soit contradictoire avec un rôle oncogénique de MYC, ceci est en accord avec le fait que le pouvoir transformant de MYC nécessite une voie p14ARF/p53 inactive (Vonlanthen et al., 2001). Ceci est également en accord avec le fait qu'une protéine p53 mutée accompagnée

d'une surexpression de MYC est très fréquemment rencontrée dans les cancers bronchiques (Richardson and Johnson, 1993).

La famille des récepteurs membranaires de la famille ERBB est en amont d'une cascade de signalisation qui stimule la prolifération cellulaire. Au sein de cette famille, l'EGFR (ERBB1) et ERBB2 sont fréquemment activés dans les cancers du poumon. Ces deux récepteurs stimulent la prolifération en activant les voies RAS/RAF (Figure 11) (Schlessinger, 2000). Les ligands de l'EGFR (EGF, TGF- $\alpha$ , amphireguline (AR)) sont fréquemment surexprimés dans les tumeurs. Par exemple, le TGF- $\alpha$  est surexprimé dans 60 % des NSCLC (Rusch et al., 1993), formant ainsi une boucle autocrine/paracrine stimulant la prolifération.

#### 4.3.3.4. Les étapes de la carcinogénèse pulmonaire.

La dérégulation des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes impliqués dans la cancérogénèse bronchique, précédemment cités, participe à l'acquisition des six caractéristiques inhérentes à une cellule cancéreuse. L'analyse des pièces opératoires issues de cancer bronchique a permis de mettre en évidence un réel continuum lésionnel de l'épithélium bronchique, allant de l'hyperplasie basale au carcinome invasif en passant par la métaplasie, la dysplasie puis le carcinome *in situ*. Un parallélisme entre ce continuum lésionnel et l'accumulation séquentielle des anomalies génétiques a pu être établi et est schématisé dans la figure 12. Ainsi, l'accumulation séquentielle d'anomalies génétiques accompagne l'augmentation du potentiel prolifératif et invasif des lésions précancéreuses.



**Figure 12 : Accumulations d'altérations génomiques et étapes de la carcinogénèse des NSCLC.** L'exposition à des carcinogènes (tabac, environnement) conduit à une accumulation d'anomalies génétiques et épigénétiques. Ces dernières participent à la transformation d'un épithélium bronchique sain jusqu'à un carcinome métastatique, en passant par un épithélium hyperplasique, dysplasique puis en carcinome *in situ* et en carcinome invasif. Les conséquences biologiques résultantes des principales altérations génomiques observées dans les NSCLC sont indiquées. Bien entendu, ce schéma est représentatif, puisqu'il ne présente que les altérations génomiques les plus fréquemment rencontrées dans les NSCLC. Il n'est donc pas systématique, notamment dans le type d'altération considéré et dans la chronologie. (Adapté d'après Osada et Takahashi, 2002)

# Résultats

## 1. Mécanisme de régulation d'ING2 par sumoylation.

Lorsque nous avons initié ce projet, les fonctions des ING dans les voies de p53 et dans le remodelage de la chromatine commençaient à être comprises. En revanche, les mécanismes par lesquels les protéines ING étaient elles-mêmes régulées, étaient totalement inconnus. A cette époque, une étude venait de montrer que toutes les protéines ING faisaient partie de complexes HAT et HDAC et notamment qu'ING2 co-purifiait avec le complexe Sin3A/HDAC. En accord avec cela, suite à une immunoprécipitation (IP) de Sin3A, nous détectons ING2, ainsi qu'une autre forme d'ING2 d'une dizaine de kDa supplémentaire suggérant qu'il s'agissait d'une modification post-traductionnelle. Dans le cadre de notre collaboration avec le groupe du Dr. Or Gozani nous savions que la protéine ING2 de souris était sumoylable *in vitro*. Ainsi, nous avons fait l'hypothèse que cette deuxième forme d'ING2 pourrait-être une protéine ING2 sumoylée.

### 1.1. Résumé des principaux résultats.

#### ING2 est sumoylée sur la lysine 195.

Par des expériences de sumoylation *in vitro* d'une part, et de co-expression d'ING2 et de SUMO1 dans des cellules d'autre part, nous avons tout d'abord montré qu'ING2 pouvait être sumoylée *in vitro* et *in vivo*. A l'aide de différentes formes tronquées d'ING2 nous avons montré qu'ING2 est sumoylée dans la région comprise entre les acides aminés 165 et 204. La recherche bioinformatique de sites consensus de sumoylation, combinée à des expériences de mutagenèse dirigée nous a permis de confirmer ce dernier résultat puisque nous avons identifié la lysine 195 (K195) contenue dans le site consensus de sumoylation A194KQE197 comme étant le résidu sumoylé d'ING2.

### L'association entre ING2 et Sin3A est dépendante de la sumoylation d'ING2.

Puisque le site de sumoylation d'ING2 se trouve à l'extrémité de son domaine NLS, et puisqu'une des fonctions connues de la sumoylation est de réguler la localisation subcellulaire de protéines, nous avons tout d'abord fait l'hypothèse que la sumoylation d'ING2 pourrait réguler ce mécanisme. Par des expériences d'immunofluorescence (IF) et de fractionnement cellulaire, nous montrons que dans nos conditions expérimentales, la localisation nucléaire d'ING2 ainsi que son adressage au niveau de la chromatine sont indépendants de sa sumoylation sur la lysine 195. La forme d'ING2 hypothétiquement sumoylée a été mise en évidence au sein du complexe Sin3A; nous avons testé si la sumoylation d'ING2 pourrait réguler son interaction avec ce complexe. Par des expériences d'IP de Sin3A nous montrons que contrairement à une protéine ING2 sauvage, les formes mutées d'ING2 non sumoylées (ING2 K195R et ING2 E197A) ne co-immunoprécipitent pas avec Sin3A. Ces résultats indiquent qu'ING2 doit être sumoylée sur la lysine 195 pour interagir avec Sin3A.

### ING2 et Sin3A régulent l'expression de gènes de manière dépendante de la sumoylation d'ING2.

Il a été montré qu'ING2 et Sin3A peuvent être impliquées dans la régulation de l'expression des gènes (Dannenberget al., 2005; Feng et al., 2006; Shi et al., 2006). De plus, la sumoylation module l'activité transcriptionnelle d'un grand nombre de protéines. Nous avons donc fait l'hypothèse que la sumoylation d'ING2 pourrait réguler son interaction avec Sin3A pour moduler l'expression de gènes. Une analyse préliminaire, réalisée au laboratoire, via des puces à ADN, avait permis d'identifier sept gènes (SPP1, TMEM71, CMKOR1, SLC26A4, LY96, H6PD et DUSP19) dont l'expression était fortement réprimée suite à l'inhibition de l'expression d'ING2. Ces résultats ont tout d'abord été confirmés par des expériences de PCR en temps réel. Afin de mieux comprendre les mécanismes par lesquels ING2 pourrait réguler l'expression de ces gènes, nous avons recherché si ING2 était présente sur leur promoteur. Pour ce faire, nous avons donc réalisé des expériences de précipitation de chromatine (ChIP) d'ING2 et avons ainsi montré qu'elle est présente sur les promoteurs des gènes SPP1 et TMEM71, suggérant une régulation directe de ces gènes par ING2. Afin de

déterminer si la sumoylation d'ING2 est impliquée dans l'expression des sept gènes précédemment identifiés, nous avons étudié si le mutant ING2 E197A (non sumoylable) est capable de réguler leur expression. Pour cela, nous avons analysé le niveau d'expression de ces sept gènes dans un modèle cellulaire de complémentation. Dans ce modèle, l'expression endogène d'ING2 a été spécifiquement inhibée et une protéine ING2 sauvage (ING2 WT) ou le mutant ING2 E197A à été ré-exprimé. Nous avons ainsi pu montrer que l'expression d'une partie de ces gènes (TMEM71, SPP1, LY96 et H6PD) est dépendante de la sumoylation d'ING2.

La sumoylation d'ING2 est donc nécessaire pour son association avec Sin3A ainsi que pour l'expression de certains gènes. Nous avons donc étudié plus en détail les mécanismes par lesquels la sumoylation d'ING2 et Sin3A pourrait réguler l'expression du gène TMEM71 (gène dont l'expression est la plus dépendante de la sumoylation d'ING2). Nous avons tout d'abord montré que l'expression de TMEM71 est dépendante de Sin3A. Ensuite, par des expériences de CHIP de Sin3A nous avons montré que Sin3A est présente sur le promoteur de ce gène et que sa présence est dépendante d'ING2. Afin de déterminer si la sumoylation d'ING2 est impliquée dans le recrutement de ces deux protéines sur le promoteur de TMEM71, nous avons réalisé des expériences de CHIP d'ING2 et de Sin3A dans des cellules exprimant ING2 WT ou ING2 E197A. Ces expériences ont permis de déterminer que la présence d'ING2 et de Sin3A sur le promoteur de TMEM71 est dépendante de la sumoylation d'ING2.

### Conclusion.

Dans cette étude nous montrons qu'ING2 est sumoylée et que cette sumoylation est nécessaire pour son interaction avec la protéine Sin3A. Nous montrons également qu'ING2 régule l'expression de gènes et que l'expression d'une partie de ces gènes est dépendante de sa sumoylation. De plus, une analyse plus approfondie des mécanismes de régulation de l'un de ces gènes (TMEM71) montre qu'ING2 et Sin3A sont présentes sur son promoteur de manière dépendante de la sumoylation d'ING2. Ainsi nous avons mis en évidence pour la première fois un mécanisme de régulation post-traductionnelle d'ING2.



## 1.2. Manuscrit de la publication n°2.

Ces travaux ont donné lieu à l'écriture d'un manuscrit pour publication intitulé : « **Sumoylation of ING2 regulates the transcription mediated by Sin3A** ». Ce manuscrit est en cours de relecture par nos collaborateurs du groupe du Dr Or Gozani. Après avis de ces derniers, ce manuscrit sera soumis au journal Oncogene. Ce manuscrit est présenté à la page suivante.

# Sumoylation of ING2 regulates the transcription mediated by Sin3A

Damien Ythier<sup>1</sup>, Delphine Larrieu<sup>1</sup>, Romuald Binet<sup>1</sup>, Sylvie Gazzeri<sup>1</sup>, Olivier Binda<sup>2</sup>, Elisabeth Brambilla<sup>1</sup>, Christian Brambilla<sup>1</sup>, Or Gozani<sup>2</sup> and Rémy Pedeux<sup>1, 3\*</sup>

<sup>1</sup>Molecular Bases of Lung Cancer Progression, INSERM U823, Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, Grenoble, 38706 cedex, France

<sup>2</sup>Department of Biological Sciences, Stanford University, Stanford, California 94305, USA.

<sup>3</sup> INSERM U917, IFR140, Faculté de Médecine, Université de Rennes1, 35043 Rennes Cedex

**\* Corresponding author:**

Rémy Pedeux

Room 112

Institut Albert Bonniot, INSERM U823

UJF-Domaine de la Merci

38706 La Tronche Cedex

France

Tel: 33 (0)4 76 54 94 64

Fax : 33 (0)4 76 54 94 13

Email : [remy.pedeux@ujf-grenoble.fr](mailto:remy.pedeux@ujf-grenoble.fr)

Running title: ING2 sumoylation regulates genes expression

Key words: sumoylation, Sin3A, SUMO1, transcription

## ABSTRACT

ING2 (Inhibitor of Growth 2) is a candidate tumor suppressor gene involved in cell cycle control, apoptosis and senescence. Although functions of ING2 in the chromatin remodeling complex Sin3A/HDAC and in p53 pathway have been described, how ING2 itself is regulated remains unknown. Here, we report for the first time that ING2 can be sumoylated by SUMO1 on lysine 195 both *in vitro* and *in vivo*. Strikingly, ING2 must be sumoylated to associate with Sin3A. We provide evidences that ING2 can bind to the promoter of genes to mediate their expression and sumoylation of ING2 is required for this binding to some of these genes. Thus, we identified one gene, TMEM71, whose expression is regulated by ING2 sumoylation. ING2 must be sumoylated to bind to the promoter of TMEM71 and to recruit the Sin3A chromatin remodelling complex to this promoter, in order to regulate TMEM71 transcription. Thus sumoylation of ING2 is necessary for its binding to the Sin3A/HDAC complex to regulate gene transcription.

## INTRODUCTION

ING2 is a member of the INGs (INhibitor of Growth) candidate tumor suppressor genes family. The founding member of the family, ING1, was initially discovered thanks to a screen which was designed to identify genes that allow neoplastic transformation when repressed (Garkavtsev et al., 1996). Subsequently, homology search allowed the identification of the other members of the family: ING2-ING5 (Nagashima et al., 2001; Nagashima et al., 2003; Shiseki et al., 2003). INGs are nuclear proteins and one important structural feature of these proteins is the presence of a highly conserved Plant HomeoDomain (PHD) zinc finger in their C-terminal part. Such domains are commonly found in proteins involved in chromatin remodeling (Bienz, 2006; Mellor, 2006). Accordingly, all INGs proteins have been described as being associated with either histone acetyltransferase (HAT) or histone deacetylase (HDAC) complexes which implicate them in chromatin remodeling (Doyon et al., 2006).

ING2 has been described as a stable component of the histone deacetylase complex Sin3A/HDAC1/2 and also interacts with the acetyltransferase protein p300 (Doyon et al., 2006; Pedoux et al., 2005). Subsequently, the PHD of ING2 was shown as having a high affinity for the Histone 3 tri-methylated on the lysine 4. The interaction between ING2 and this post-translationally modified histone allows the recruitment of the Sin3A/HDAC complex onto the promoter of the proliferative genes *c-myc* and *cyclin D1* to mediate their repression (Shi et al., 2006). Initially, ING2 was reported as enhancing p53 acetylation to negatively regulate cell growth, to induce apoptosis and to regulate the onset of replicative senescence (Nagashima et al., 2001; Pedoux et al., 2005). In these pathways, it has been reported that ING2 is activated by binding to the lipid signaling molecule phosphatidylinositol-5-phosphate (Gozani et al., 2003). Altogether, these studies indicate that ING2 may have tumor suppressor functions. Accordingly, ING2 is frequently lost in human tumors. Indeed, ING2 locus is deleted in head and neck squamous cell carcinoma (Borkosky et al., 2008). In melanoma and in hepatocellular carcinoma a loss of ING2 nuclear expression has been observed (Lu et al., 2006; Zhang et al., 2008). Moreover, we have recently shown a strong decrease of ING2 expression, both at the protein and the mRNA level, in a large proportion of non-small cell lung carcinoma (Ythier et al., 2009).

Sumoylation is a reaction in which the Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO), a polypeptide of 11kDa, is covalently linked to a variety of proteins. Similarly to ubiquitination, sumoylation is achieved by activating E1, conjugating E2 and ligating E3 enzymes. In contrast to ubiquitination, proteins sumoylation has been implicated in various cellular

process involving different mechanisms. Thus, sumoylation has been reported to regulate protein subcellular localization, protein stabilization by competition with ubiquitination, protein-protein interaction and transcription factors activity (Hay, 2005). Many studies have reported sumoylation of transcription factors (e.g. Sp3, Smad4, Elk-1, etc.) and most of the time, it was associated with transcriptional repression (Gill, 2005). However, in a limited number of cases, sumoylation was reported to increase transcriptional activity of proteins such as the heat shock factor 1 (HSF1) or the nuclear factor of activated T cells (NFAT-1) (Hong et al., 2001; Terui et al., 2004).

Although ING's functions in cellular process have received much attention, how ING2 itself may be regulated remains poorly understood. In this study, we report that ING2 can be sumoylated by SUMO1 and that sumoylation is critical for ING2 association with Sin3A. We also show that the transcriptional regulation of several genes requires ING2, among which some of them are also dependent on ING2 sumoylation. Moreover, detailed analysis of one of these genes shows that the sumoylation of ING2 is required for the presence of both ING2 and Sin3A on its promoter to allow its expression. Thus, we identified for the first time a mechanism of ING2 regulation by a post-translational modification.

## RESULTS

### ING2 is sumoylated by SUMO1 *in vitro* and *in vivo*.

ING2 was previously described as a component of the Sin3A/HDAC1/2 complex. Indeed, immunoprecipitation (IP) of Sin3A results in the detection of ING2 and of a second band approximately 10 kDa higher (**Figure 1a**). The reduced intensity of this higher band in cells transfected with a siRNA targeting ING2 indicates that it is specific to ING2 and therefore that it may be a post-translationally modified form of ING2. Consequently, we hypothesized that the higher band could be a sumoylated ING2 protein. *In vitro* sumoylation experiments show that GST-ING2 can be sumoylated by SUMO1 two times. Since SUMO1 can't be sumoylated and thus don't form chains, we conclude that ING2 can be sumoylated on two residues *in vitro* (**Figure 1b**). Co-transfection in U2OS cells of ING2 and SUMO1 fused to a histidine tag (His-SUMO1) followed by a histidine purification results in the detection of two ING2 sumoylated forms (**Figure 1c**). Taken together, these results indicate that ING2 can be sumoylated by SUMO1 both *in vitro* and *in vivo*.

### ING2 is sumoylated by SUMO1 on lysine 195

To determine which region of the ING2 protein is sumoylated, we generated ING2 mutants truncated in their N or C terminal part (ING2- $\Delta$ C165, ING2- $\Delta$ C204 and ING2- $\Delta$ N240) (**Figure 2a**). The ING2 truncated mutants were co-transfected with His-SUMO1 and the resulting protein extracts were subjected to histidine purification (**Figure 2b**). The KMP1 antibody that recognizes the N-terminal part of ING2 was used to detect ING2- $\Delta$ C165 and ING2- $\Delta$ C204 truncated constructs. The 14H3D2 antibody that recognizes the C-terminal part of ING2 was used to detect the ING2- $\Delta$ N240 truncated construct. Similarly to what is observed for full length ING2, ING2- $\Delta$ C204 and ING2- $\Delta$ N240 are sumoylated on two residues (**Figure 2b**). On the contrary, ING2- $\Delta$ C165 shows a weak sumoylation and only one sumoylated form (**Figure 2b**). This result indicates that the predominantly sumoylated lysine residue of ING2 may be located between residues 165 and 204. Lysines subjected to sumoylation are commonly found in a sumoylation consensus motif,  $\Psi$ KxE (where  $\Psi$  is a hydrophobic residue, K the sumoylated lysine, x is any residue and E a glutamic acid) (Rodriguez et al., 2001). Bioinformatics analysis of the amino acid sequence of ING2 with the SumoPlot software (<http://www.abgent.com.cn/doc/sumoplot/sendmail.asp>) revealed the presence of three potential consensus sites of sumoylation (**Figure 2a**). To identify the sumoylated lysine residues we have generated ING2 mutants in which the lysine

corresponding to the three potential sumoylated consensus sites identified by bioinformatics were replaced by an arginine (R) (ING2 K72R, ING2 K139R and ING2 K195R). Co-transfection of these mutants with His-SUMO1 followed by a histidine purification shows that the mutants ING2 K72R and ING2 K139R are sumoylated like wild-type ING2. On the contrary, in accordance with the result obtained with the truncated form of ING2, the ING2 K195R mutant is not sumoylated (**Figure 2c**). This result indicates that ING2 is mainly sumoylated on the K195 residue.

Mutation of lysine 195 prevents ING2 sumoylation but also other potential post-translational modifications such as ubiquitination or acetylation. Thus, we have generated a mutant of ING2 within the consensus sequence changing the glutamic acid 197 into an alanine (ING2 E197A). Such mutation is reported to disrupt sumoylation by affecting the interaction of the substrate with the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 (Bernier-Villamor et al., 2002). Consequently, this mutant may be post-translationally modified on K195 but not sumoylated. As a matter of fact, co-transfection of the ING2 E197A mutant with His-SUMO1 followed by a histidine purification shows that ING2 E197A cannot be sumoylated (**Figure 2d**).

### **Subcellular localization of ING2 is independent of sumoylation.**

Initially, SUMO modifications have been reported to regulate proteins subcellular localization. Indeed, RanGAP sumoylation was shown to regulate its targeting to nuclear pore complexes (Matunis et al., 1996). Since the sumoylated residue K195 is found within the NLS we hypothesized that ING2 sumoylation may be involved in its subcellular localization. To test this hypothesis, we performed immunofluorescent staining of ING2 in U2OS cells overexpressing ING2, ING2 K195R or ING2 E197A. Overexpressed ING2, ING2 K195R and ING2 E197A are targeted to the nucleus (**Figure 3a**). Thus, ING2 sumoylation on lysine 195 is not involved in its nuclear targeting. Furthermore, since ING2 has been reported to interact with chromatin, we hypothesized that ING2 sumoylation may be involved in its targeting to the chromatin (Shi et al., 2006). To test this hypothesis we performed Chromatin Enriched Fraction (CEF) isolation in cells overexpressing ING2, ING2 K195R or ING2 E197A. This experiment shows that the same amount of protein is present to the CEF for all the constructs (**Figure 3b**). Taken together, these results indicate that sumoylation of ING2 is not involved in the targeting of ING2 to the nucleus or to the chromatin.

### **ING2 sumoylation on residue K195 is required for its binding to the Sin3A complex.**

Since we initially identified ING2 sumoylation in the Sin3A complex, we hypothesized that ING2 binding to the Sin3A complex may be regulated by its sumoylation. To test this hypothesis, we performed Sin3A IP in U2OS cells overexpressing ING2, ING2 K195R or ING2 E297A. While wild-type ING2 co-immunoprecipitates (co-IP) with Sin3A, neither ING2 K195R nor ING2 E197A co-IP with Sin3A (**Figure 4a**). This result suggests that ING2 must be sumoylated to associate with the Sin3A complex. However, the loss of binding between ING2 and Sin3A could also be due to the mutation being present in the domain of ING2 necessary for the physical interaction with Sin3A. Consequently, we have determined which region of ING2 is involved in its binding to Sin3A (**Figure 4b and c**). Sin3A IP in U2OS cells overexpressing ING2 truncated forms: ING2  $\Delta$ N140 and ING2  $\Delta$ N240 shows that ING2  $\Delta$ N240 but not the ING2  $\Delta$ N140 co-IP with Sin3A (**Figure 4b and 4c**). This result indicates that, as previously described for p33ING1b (Skowrya et al., 2001), the region of ING2 protein responsible for the association with the Sin3A complex is located between the amino acid 40 and 140. Thus, since the lysine 195 is outside the 40-140 region, the lack of interaction between ING2 K195R or ING2 E197A and Sin3A is due to the absence of sumoylation. Taken together, these results indicate that ING2 binding to the Sin3A complex may require sumoylation of ING2.

### **Sumoylation of ING2 regulates gene expression.**

Accumulating evidences have involved ING2 in gene expression regulation. Indeed, one study has shown that in response to stress induced by doxorubicin, ING2 recruits the Sin3A /HDAC complex to the promoter of *cyclin D1* and *c-myc* to repress their expression (Shi et al., 2006). Another study has identified eight genes which are upregulated after ING2 overexpression (Feng et al., 2006). However, in these two studies, genes regulated by ING2 were identified after a stress or under non physiological conditions. Thus, to identify genes that are regulated by ING2 in normal cell growth conditions, we have inhibited ING2 expression by transfection of a siRNA targeting ING2 (siING2) into two different cell lines (U2OS and RKO) and we have analyzed genes expression by microarrays (data not shown). This experiment allowed the identification of seven genes strongly downregulated after ING2 downregulation in both U2OS an RKO cell lines (**Figure 5a**). Using quantitative real-time PCR (qPCR) the expression fold change of these seven genes after ING2 downregulation was confirmed (**Figure 5c**) while the efficiency of ING2 downregulation was verified by WB (**Figure 5b**). Among these genes, SPP1 and TMEM71 are the most strongly affected by ING2



repression. Thus, to determine whether these two genes are directly regulated by ING2, we assessed the presence of ING2 on their promoter region by chromatin immunoprecipitation (ChIP) followed by PCR analysis (**Figure 5d**). This experiment shows that ING2 is present on SPP1 and TMEM71 promoters in siCT transfected cells but not in siING2 transfected cells. This indicates that the regulation of these two genes may be directly mediated by ING2. Since many studies have reported that sumoylation of proteins can regulate their transcriptional activities, we hypothesized that ING2 sumoylation could be involved in the regulation of its targeted genes. To address this possibility, we have analyzed the expression level of the seven genes previously identified, in cells expressing WT ING2 or the non-sumoylated mutant ING2E197. Hence, cells were co-transfected with a siRNA targeting the 3'UTR region of ING2 mRNA (to suppress ING2 endogenous expression) and with a plasmid expressing either WT ING2 cDNA or ING2 E197A cDNA. Such co-transfection allows to obtain cells expressing WT ING2 or ING2 E197A with reduced endogenous ING2 expression. The equal expression level of these two forms of ING2 was verified by WB (**Figure 5e**). qPCR analysis shows that SPP1, TMEM71, LY96 and H6PD genes have a significantly lower expression in cells overexpressing ING2 E197A as compared to WT ING2, indicating that their expression is dependent on ING2 sumoylation (**Figure 5f**). On the contrary, CMKOR1, SLC26A4 and DUSP19 have the same level of expression in both WT ING2 and ING2 E197A expressing cells, suggesting that in these conditions ING2 sumoylation is not involved in their regulation (**Figure 5f**). Overall, these results show that ING2 directly regulates the expression of several genes and that the regulation of a subset of these genes also requires the sumoylation of ING2.

### **ING2 sumoylation and Sin3a mediate genes expression.**

Since we have shown that the sumoylation of ING2 is required for its association with Sin3A and for the mediation of genes expression, we hypothesized that ING2 sumoylation, in association with Sin3A, could mediate genes expression. To address this question, we further analyzed the regulation of TMEM71 gene whose expression appeared to be the most dependent on ING2 sumoylation (**Figure 5f**). In a first step, we have analyzed the expression level of TMEM71 in cells transfected either with a siCT or a siRNA directed against Sin3A (siSin3A). The efficiency of Sin3A downregulation was analyzed by WB (Figure 6a), and qPCR analysis shows a strong reduction of TMEM71 expression in siSin3A transfected cells as compared to control (**Figure 6b**). This result indicates that TMEM71 expression is also dependent on Sin3A. To gain further insights into the mechanism of TMEM71 regulation by

Sin3A and its relationship with ING2, we performed a Sin3A ChIP in siCT or siING2 transfected cells. PCR analysis of ChIP products (**Figure 6c**) shows that Sin3A is present on the promoter of TMEM71 in siCT cells but not in siING2 cells, indicating that the regulation of TMEM71 expression by Sin3A may be direct and that its presence on this promoter is dependent on ING2. To further determine whether ING2 sumoylation is involved in this process we have performed another ChIP experiment of ING2 or Sin3A in cells co-transfected with siING2 3'UTR and WT ING2 or ING2 E197A. PCR analysis of these ChIPs shows that Sin3A targeting on this promoter required ING2 sumoylation and that ING2 itself needs to be sumoylated to bind TMEM71 promoter (**Figure 6c**). Altogether, these results show that both ING2 and Sin3A are present on TMEM71 promoter in an ING2 sumoylation dependent manner to mediate the expression of this gene.

## Discussion

Previous studies based on overexpression experiments have shown that ING2 acts as a cell proliferation inhibitor by regulating cell cycle progression, apoptosis and senescence. As a matter of fact it has been proposed to act as gatekeeper tumor suppressor gene. Recently, we have shown that reduced ING2 expression, as it occurs in human tumors, results in an impaired DNA replication process and increased genome instability (Larrieu et al., 2009). Thus, ING2 would also act as a caretaker tumor suppressor protein to prevent tumorigenesis. However, how ING2 itself is regulated is unknown.

In this study, we show that ING2 can be post-translationally modified by SUMO1 on lysine 195 (K195), both *in vitro* and *in vivo*. This residue is found within the sumoylation consensus motif A194KQE197. Thus, it is the first time that a post-translational modification of ING2 is reported. Bioinformatics analysis of the amino acid sequence of the other members of the ING proteins family with the SumoPlot online software (<http://www.abgent.com.cn/doc/sumoplot/sendmail.asp>) shows the presence of several sumoylation consensus sequences. This suggests that all INGs proteins could also be subjected to sumoylation. Thus our findings provide new insights on how INGs could be regulated.

Interestingly, the sumoylated consensus site that we identified for ING2 is found within a PDSM (phosphorylation-dependent sumoylation motif). Such domain has recently been described and is composed of a sumoylation consensus site followed by two or three amino acids further by a serine and a proline ( $\Psi$ KxExxSP) (Hietakangas et al., 2006). In this study the authors show that the phosphorylation of the serine can regulate the sumoylation of the juxtaposed sumoylation consensus site. The potential PDSM of ING2 (A194KQEREASP202) is conserved on p33ING1b (A192KAEREASP200) suggesting that p33ING1b could also be sumoylated. p33ING1b has been reported to be phosphorylated on serine 199 (S199) to regulate its amount in the nucleus. Indeed, this phosphorylation was shown to be required for p33ING1 binding to the 14-3-3 $\eta$  cargo protein in order to be exported from the nucleus (Gong et al., 2006). Interestingly, the S199 of ING1 is the serine of the potential PDSM that we mentioned before. Since the potential PDSMs of ING2 and p33ING1b are sumoylated or phosphorylated respectively, this strongly suggests that ING2 sumoylation could be regulated by an adjacent phosphorylation and reciprocally that ING1 phosphorylation could regulate its possible sumoylation. Thus, even if under our experimental conditions, we observed that ING2 subcellular localization is independent of its sumoylation,

we cannot exclude that in other conditions sumoylation of ING2 could be involved in this process. Indeed, Gong et al., observed p33ING1b exportation from the nucleus after 14-3-3 $\eta$  overexpression.

Since we initially suspected that ING2 could be sumoylated in the Sin3A complex, we have investigated the role of ING2 sumoylation for its association with Sin3A. We show that ING2 sumoylation is required to associate with Sin3A. Sin3A is a stable component of the Sin3A/HDAC chromatin modifying complex and is thus involved in the regulation of a large number of genes (Dannenberg et al., 2005). ING2 and Sin3A were previously shown to associate to regulate genes expressions (Shi et al., 2006). Thus, we investigated the role of ING2 sumoylation in this process. We found that among seven genes identified as regulated by ING2, four of them were also dependent on ING2 sumoylation. We also show that this regulation can occur directly via the recruitment of ING2 and Sin3A on the promoter of genes in a sumoylation dependent manner. Hence, it would be interesting to determine whether ING2 sumoylation could be involved in the regulation of genes previously identified in response to genotoxic stress (Shi et al., 2006) or after overexpression of ING2 (Feng et al., 2006). This would help determining in which condition ING2 is sumoylated and how this sumoylation is regulated.

We show that ING2 sumoylation regulates its association with Sin3A, it is then possible that it can also regulate its association with other protein partners. For example, we have recently identified that ING2 can interact with the DNA replication elongation protein PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) to regulate normal DNA replication. Thus, it would be interesting to investigate the role of ING2 sumoylation in this process. Further investigations on the sumoylation of other ING proteins could provide informations on how their association with their known partners such as HAT and HDAC complexes could be regulated. Overall this study highlights the first mechanism of ING2 posttranslational regulation by sumoylation to regulate genes expression mediated by Sin3A and thus provides new insights into how INGs proteins could be regulated.

## Materials and Methods

**Cell culture.** The colon carcinoma cell line RKO and the osteosarcoma cell line U2OS were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and McCoy's 5A medium respectively supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, and 100 Ag/ml streptomycin. Cell were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>.

**Plasmide construction, siRNA and transfection.** The truncated ING2 sequences, ING2 ΔC165, ING2 ΔC204, ING2 ΔN240 and ING2 ΔN140, were generated with polymerase chain reaction from pcDNA3.1-ING2 (Nagashima et al., 2001) using site-specific primers and subcloned into the pcDNA3.1 between BamHI and EcoRV. The primers were: 5'-GAGCTCGGATCCATGTTAGGG-3' (sense) and 5'-CGGCGATATCCTAGTGACATAAATCACGGCTTTC-3' (anti-sense) for ING2 ΔC165, 5'-GAGCTCGGATCCATGTTAGGG-3' (sense) and 5'-CGGCGATATCCTACTCAACAGGTGAAGCTTCCC-3' (anti-sens) for ING2 ΔC204, 5'-GTCGGGATCCGACATGCAGAGGAACGTGTCTG-3' (sense) and 5'-GCGGCCGCCACTGTGCTGG-3' (anti-sens)for ING2 ΔN240, 5'-GTCGGGATCCATGGATTCCAGCCAACCAG-3' (sense) and 5'-GCGGCCGCCACTGTGCTGG-3' (anti-sense) for ING2 ΔN140. The ING2 mutants, ING2 K72R, ING2 K139R, ING2 K195R and ING2 E197A were generated with the QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) from pcDNA3.1-ING2. The primers were: 5'-GAAAAATATAAGAGAGAAGATGATTTAAAC-3' (sense) and 5'-GTTTAAATCATCTTCTCTTATATTTTTC-3' (anti-sense) for ING2 K72R, 5'-CCTCAGATAAAGCAAGGATGGATTCCAGCC-3' (sense) and 5'-GGCTGGAATCCATCCTTGCTTTATCTGAGG-3' (anti-sense) for ING2 K139R, 5'-AACGCTCCAAGGCCAGGCAGGAAAGGGAAG-3' (sense) and 5'-CTTCCCTTTCCTGCCTGGCCTTGGAGCGTT (anti-sens) for ING2 K195R, 5'-CCAAGGCCAAGCAGGCAAGGGAAGCTTCACC-3'(sense) and 5'-GGTGAAGCTTCCCTTGCCTGCTTGGCCTTGG-3' (anti-sense)for ING2 E197A. All the truncated and mutated ING2 were verify by sequencing. Stealth siRNA (Invitrogen) sequence targeting the coding region of ING2 mRNA (siING2) or the 3'UTR region of ING2 mRNA (siING2 3'UTR) are: 5'-CAA AUGGAGUUACACUCACAGUGUU-3' and 5'-AGGGUAAAUGCAUAAGACUAUGCAAUAAU-3' respectively. For the control (siCT), the universal stealth siRNA negative controle (Invitrogen) was used.

Plasmides were transfected using Lipofectamine Reagent in combination with PLUS Reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Stealth siRNA were transfected using Lipofectamine RNAimax (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Plasmide and stealth siRNA were co-transfected using Lipofectamine2000 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions.

**Western blot.** Protein samples were subjected to electrophoresis using the NuPAGE® Novex® Bis-Tris Gel Electrophoresis system (Invitrogen). The antibodies used in this study included rabbit polyclonal anti-ING2 (Ping2) (Nagashima et al., 2001), rat monoclonal anti-ING2 (Gozani et al., 2003), mouse monoclonal anti-Sin3A (Santa Cruz Biotechnology), anti-b-actin, ( Invitrogen).

**Immunoprecipitation.** 48h after siRNA transfection or 24h after plasmid transfection, cells were harvested in IP buffer (50 mM Tris pH 8, 500 mM KCl, 1 mM DTT, 20% glycerol, 0.1% NP40) containing protease inhibitor cocktail (Roche) and were subjected to three times Freeze (liquid nitrogen) and thaw (37°C). Cell extracts were centrifuge at 12 000 g for 10 min.and supernatant were recovered. Equal amount of protein extract were incubated with with Sin3A antibody bound to protein A coupled to agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) for 4h with rocking at 4°C. Agarose beads were washed four times with IP buffer. Immunoprecipitated samples were analyzed by western blotting.

**Histidine purification.** 24h after plasmides transfection cells were harvested and subjected to a histidine purification under denaturing conditions using the ProBond™ Purification System (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. The purified extracts were analyzed by western blotting

**CEF isolation.** 24h after plasmids transfection, cells were harvested and their nucleus were isolated using the Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent kit (NE-PER, Pierce) according to manufacturer's instructions. The CEF was then isolated by resuspending cell nuclei in ice-cold hypotonic buffer (3 mM EDTA, 0.2 mM EGTA and 1mM DTT, pH 7.8) containing protease inhibitor cocktail (Roche). After centrifugation at 1700g for 5 min., the soluble fraction (supernatant) was removed and the CEF (pellet) was washed twice with the hypotonic buffer. The CEF was then resuspended by sonication in sonication buffer (10 mM

Tris pH 7.4, 10 mM MgCL<sub>2</sub> and 10% sucrose) containing protease inhibitor cocktail (Roche). Same protein amount of CEF were analyzed by western blotting.

***In vitro* sumoylation.** GST-ING2 (Abnova) subjected to in vitro sumoylation by SUMO1 using the SUMOylation kit (BIOMOL) according to manufacturer's instructions. Since sumoylation reaction required ATP, negative in vitro sumoylation reaction control was done without ATP. The resulting reaction products were analyzed by western blotting.

**Immunofluorescence staining.** U2OS cells were grown on coverslips in 6-well plates. 24h after transfection, immunofluorescences were carried out as described previously (Sengupta et al., 2003) with rat monoclonal anti-ING2. Images were visualized with UV microscope.

**RNA isolation and RT-PCR analysis.** Cells were lysed with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and total RNA was isolated according to the manufacturer's instructions. RNA integrity was assessed by spectrophotometry with A260/A280 ratios > 1.7. One µg of RNA were used for reverse transcription using the SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Obtained cDNA were subjected Real Time PCR using Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) with the Mx3005P™ Real-Time PCR System (Stratagene). Gene expression was calculated following normalization to 18S levels by the comparative Ct (Cycle threshold) method. Sequences of the primers used are summarized in **supplemental table 1**.

**Chromatin immunoprecipitation (ChIP).** ChIP experiments were performed using the EZ-Magna ChIP kit (Millipore) according to the manufacturer's instructions.

## Figure Legends

**Figure 1: ING2 is sumoylated *in vitro* and *in vivo*.** **a)** Immunoprecipitation (IP) of endogenous Sin3A in U2OS transfected with stealth control (siCT) or stealth ING2 (siING2). Proteins were detected using the indicated antibodies. ING2 post-translational modified forms are indicated (black arrows). Actin and IgG light chain (IgG LC) were used as loading control for the input and the I.P. respectively. **b)** Western blot analysis of GST-ING2 *in vitro* sumoylation. Unmodified ING2 and ING2 sumoylated forms are indicated. **c)** Western blot analysis of proteins from histidine purification in U2OS cell transfected with the indicated vectors. ING2 sumoylated forms are indicated (black arrows).

**Figure 2: ING2 is sumoylated on lysine 195.** **a)** Schematic representation of ING2 amino acid sequence. Sumoylation consensus sites identified by Sumoplot bioinformatics analysis and ING2 truncated mutants are represented. **b)** WB analysis of proteins from histidine purification in U2OS cells co-transfected with his-SUMO1 and the different ING2 truncated forms. ING2 sumoylated forms are indicated by black arrows. **c)** WB analysis of proteins from histidine purification in U2OS cell co-transfected with his-SUMO1 and the different indicated ING2 mutants for sumoylation consensus sites. **d)** WB analysis of proteins from histidine purification in U2OS cell co-transfected with his-SUMO1 and the indicated vectors.

**Figure 3: ING2 sumoylation on K195 is not required for its targeting to the nucleus or the CEF.** **a)** Immunofluorescence pictures of ING2 or DNA staining (Dapi) in U2OS cells transfected with the indicated vectors. Pictures of cells overexpressing ING2, ING2 K195R or ING2 E197A were acquired with the same exposure time. To detect the staining of endogenous ING2, exposure time was increased three times. **b)** Western blot analysis of the Whole Cell Extract (WCE) or the Chromatin Enriched Fraction (CEF) of U2OS cells transfected with the indicated vectors. Actin and Histone 3 (H3) were used as loading controls.

**Figure 4: ING2 sumoylation on K195 is required for its binding to the Sin3A complex.** **a)** Western blot analysis of ING2 after endogenous Sin3A IP in U2OS cells transfected with the indicated vectors. **b)** Schematic representation of ING2 truncated mutants (ING2  $\Delta$ N140 and



ING2  $\Delta$ N240) used. **c)** Western blot analysis of endogenous Sin3A IP in U2OS cells transfected for 24h with the indicated vectors.

**Figure 5: ING2 sumoylation mediates genes expression.** **a)** Summary of genes identified by microarray showing the strongest reduced expression after ING2 downregulation in both U2OS and RKO cell lines. **b)** WB analysis of U2OS cells transfected with the indicated siRNA. **c)** qPCR analysis showing the mean of expression change for the indicated genes in cells transfected with siING2 (shown in b) compared and normalized to control cells. **d)** PCR products of ChIP analysis performed with rat monoclonal ING2 antibody in cells transfected with the indicated siRNA, using specific primers for the indicated genes promoters. Input corresponds to 2% of cells lysate used for ChIP and rat IgG were used as control of ChIP specificity. **e)** WB analysis of U2OS co-transfected with the indicated siRNA and plasmid. **f)** qPCR analysis of the indicated genes from cells shown in e). The level of expression in WT ING2 cells was normalized to 1.

**Figure 6: Sumoylation of ING2 is required for ING2 and Sin3A binding to TMEM71 promoter.** **a)** WB analysis of U2OS transfected with the indicated siRNA. **b)** qPCR analysis of the indicated genes from cells shown in a). The level of expression in control cells was normalized to 1. **c)** PCR products of ChIP analysis performed with rat monoclonal ING2 or mouse monoclonal Sin3A antibodies in cells transfected or co-transfected with siRNA and plasmids when indicated, using specific primers for the TMEM71 promoter. Input corresponds to 2% of cells lysate used for ChIP and rat or mouse IgG were used as control of ChIPs specificity.

**Supplemental table 1: Sequences of primers used for qPCR and ChIP analysis.**

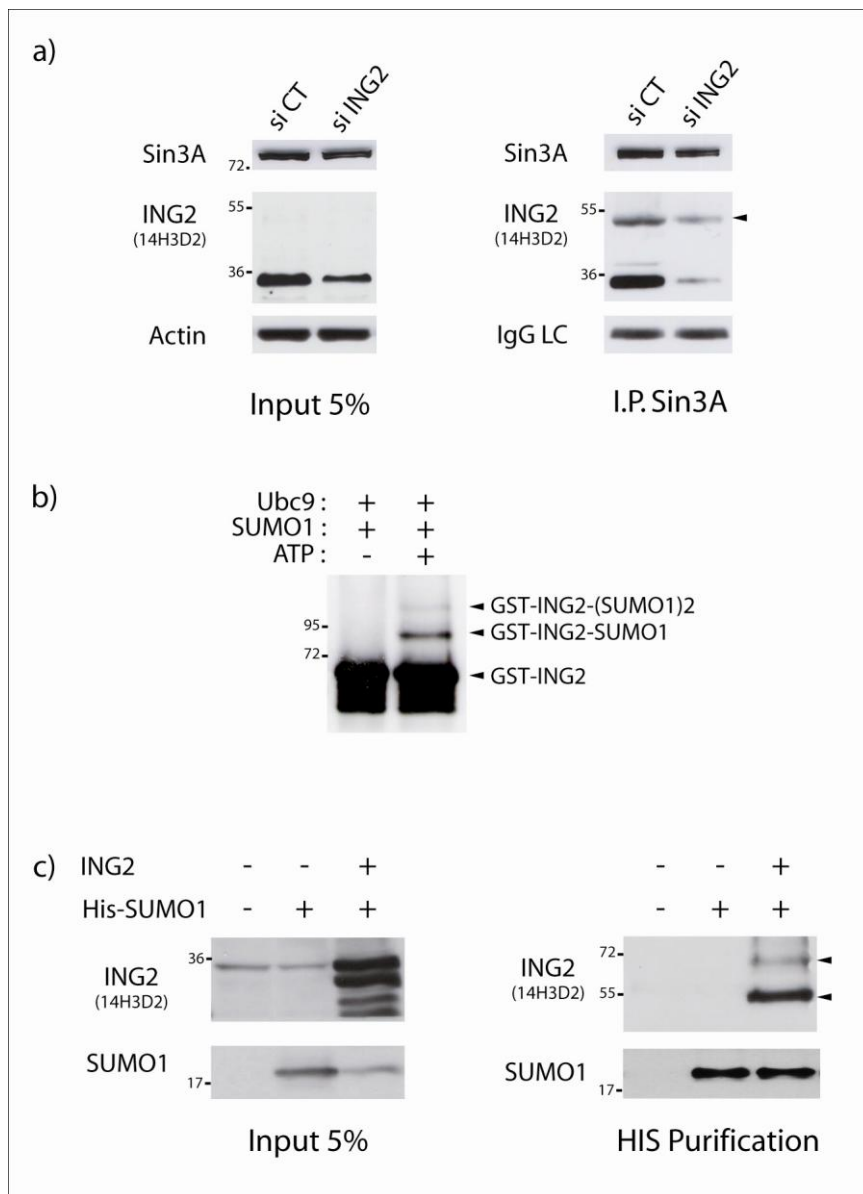
## **Acknowledgements**

We thank Dr Marc Piechaczyk and Dr Guillaume Bossis for scientific discussion and advising. R.P. was supported by the IASLC, an “Agir à dom” grant and a Marie Curie International Reintegration Grant (MIRG-CT-2006-042148). D.Y., R.B., D.L. are funded by, the INCa, the FRM and the French Ministry of Education and Research respectively.

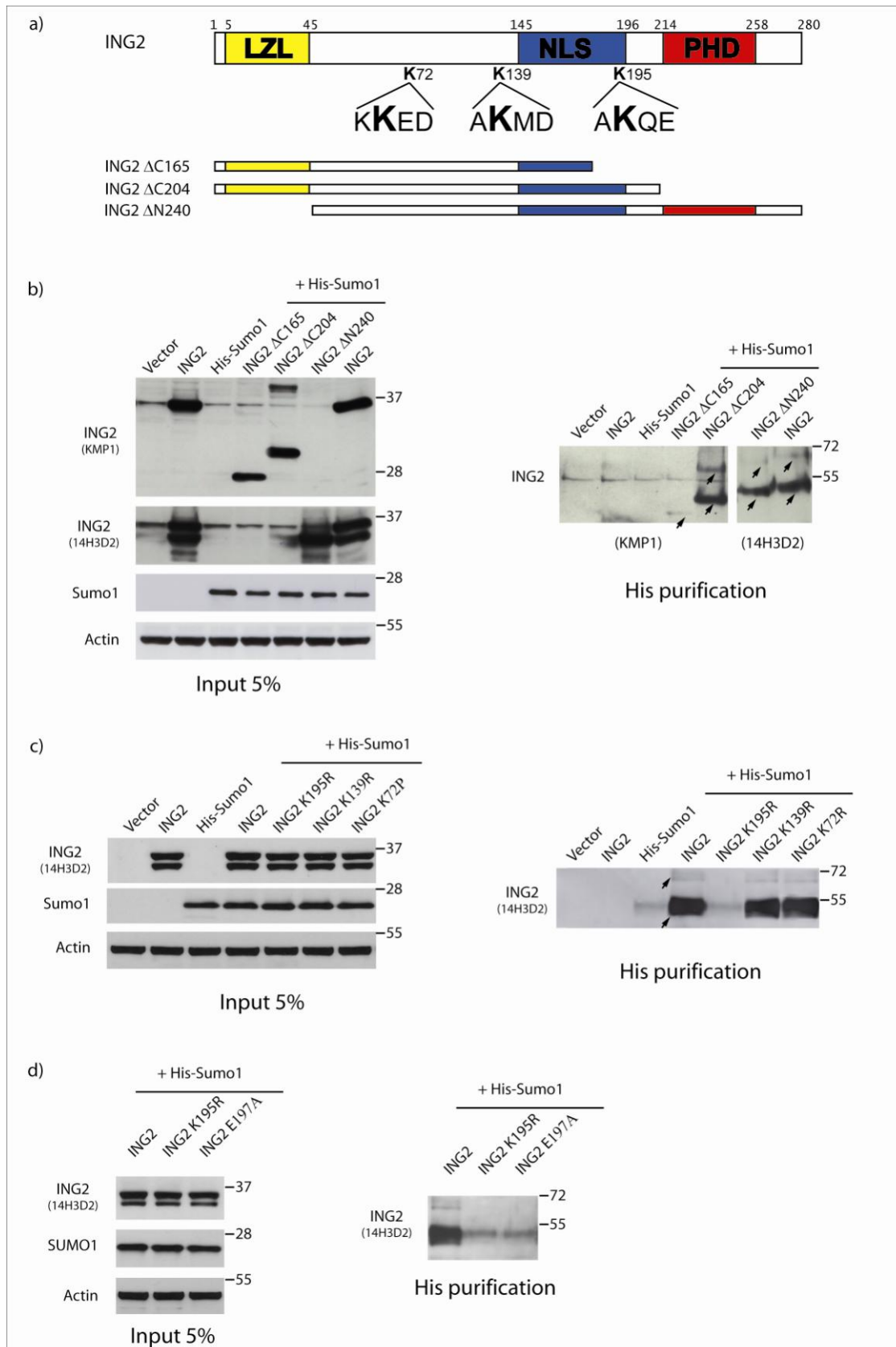
## References

- Bernier-Villamor V, Sampson DA, Matunis MJ and Lima CD. (2002). *Cell*, **108**, 345-56.
- Bienz M. (2006). *Trends Biochem Sci*, **31**, 35-40.
- Borkosky SS, Gunduz M, Nagatsuka H, Beder LB, Gunduz E, Al Sheikh Ali M, Rodriguez AP, Cilek MZ, Tominaga S, Yamanaka N, Shimizu K and Nagai N. (2008). *J Cancer Res Clin Oncol*.
- Dannenberg JH, David G, Zhong S, van der Torre J, Wong WH and Depinho RA. (2005). *Genes Dev*, **19**, 1581-95.
- Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, Landry AJ, Cote V, Selleck W, Lane WS, Tan S, Yang XJ and Cote J. (2006). *Mol Cell*, **21**, 51-64.
- Feng X, Bonni S and Riabowol K. (2006). *Mol Cell Biol*, **26**, 9244-55.
- Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A and Riabowol K. (1996). *Nat Genet*, **14**, 415-20.
- Gill G. (2005). *Curr Opin Genet Dev*, **15**, 536-41.
- Gong W, Russell M, Suzuki K and Riabowol K. (2006). *Mol Cell Biol*, **26**, 2947-54.
- Gozani O, Karuman P, Jones DR, Ivanov D, Cha J, Lugovskoy AA, Baird CL, Zhu H, Field SJ, Lessnick SL, Villasenor J, Mehrotra B, Chen J, Rao VR, Brugge JS, Ferguson CG, Payrastre B, Myszka DG, Cantley LC, Wagner G, Divecha N, Prestwich GD and Yuan J. (2003). *Cell*, **114**, 99-111.
- Hay RT. (2005). *Mol Cell*, **18**, 1-12.
- Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A and Sistonen L. (2006). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 45-50.
- Hong Y, Rogers R, Matunis MJ, Mayhew CN, Goodson ML, Park-Sarge OK and Sarge KD. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 40263-7.
- Larrieu D, Ythier D, Binet R, Brambilla C, Brambilla E, Sengupta S and Pedoux R. (2009). *EMBO Reports*, **In Press**.
- Lu F, Dai DL, Martinka M, Ho V and Li G. (2006). *Br J Cancer*, **95**, 80-6.
- Matunis MJ, Coutavas E and Blobel G. (1996). *J Cell Biol*, **135**, 1457-70.
- Mellor J. (2006). *Cell*, **126**, 22-4.
- Nagashima M, Shiseki M, Miura K, Hagiwara K, Linke SP, Pedoux R, Wang XW, Yokota J, Riabowol K and Harris CC. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9671-6.
- Nagashima M, Shiseki M, Pedoux RM, Okamura S, Kitahama-Shiseki M, Miura K, Yokota J and Harris CC. (2003). *Oncogene*, **22**, 343-50.
- Pedoux R, Sengupta S, Shen JC, Demidov ON, Saito S, Onogi H, Kumamoto K, Wincovitch S, Garfield SH, McMenemy M, Nagashima M, Grossman SR, Appella E and Harris CC. (2005). *Mol Cell Biol*, **25**, 6639-48.
- Rodriguez MS, Dargemont C and Hay RT. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 12654-9.
- Sengupta S, Linke SP, Pedoux R, Yang Q, Farnsworth J, Garfield SH, Valerie K, Shay JW, Ellis NA, Wasylyk B and Harris CC. (2003). *Embo J*, **22**, 1210-22.
- Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Pena P, Lan F, Kaadige MR, Lacoste N, Cayrou C, Davrazou F, Saha A, Cairns BR, Ayer DE, Kutateladze TG, Shi Y, Cote J, Chua KF and Gozani O. (2006). *Nature*, **442**, 96-9.
- Shiseki M, Nagashima M, Pedoux RM, Kitahama-Shiseki M, Miura K, Okamura S, Onogi H, Higashimoto Y, Appella E, Yokota J and Harris CC. (2003). *Cancer Res*, **63**, 2373-8.
- Skowrya D, Zeremski M, Neznanov N, Li M, Choi Y, Uesugi M, Hauser CA, Gu W, Gudkov AV and Qin J. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 8734-9.
- Terui Y, Saad N, Jia S, McKeon F and Yuan J. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 28257-65.
- Ythier D, Brambilla E, Binet R, Nissou D, Vesin A, de Fraipont F, Moro-Sibilot D, Lantuejoul S, Brambilla C, Gazzeri S and Pedoux R. (2009). *Submitted*.
- Zhang HK, Pan K, Wang H, Weng DS, Song HF, Zhou J, Huang W, Li JJ, Chen MS and Xia JC. (2008). *Cancer Lett*, **261**, 183-92.

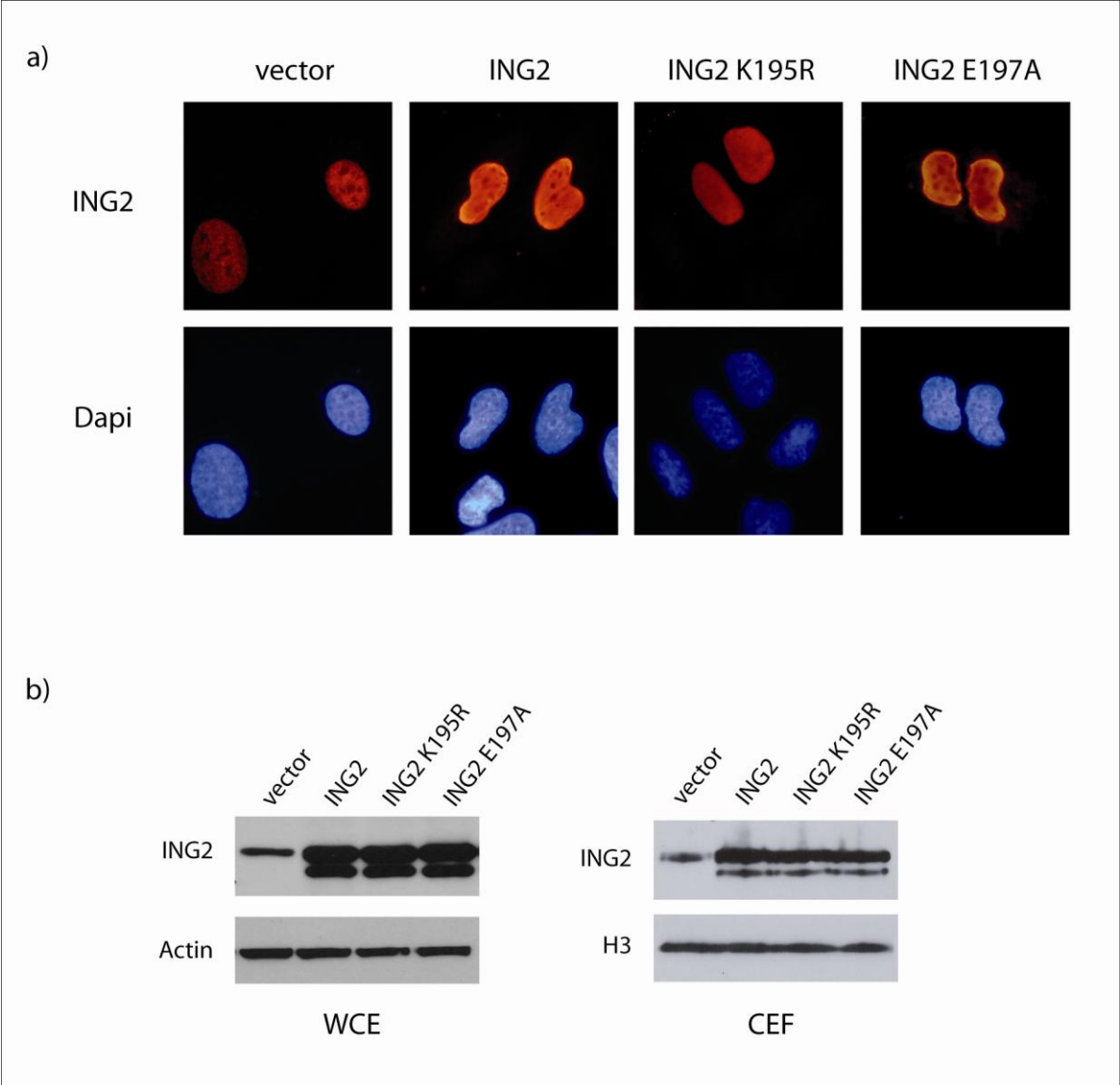
**Figure 1**



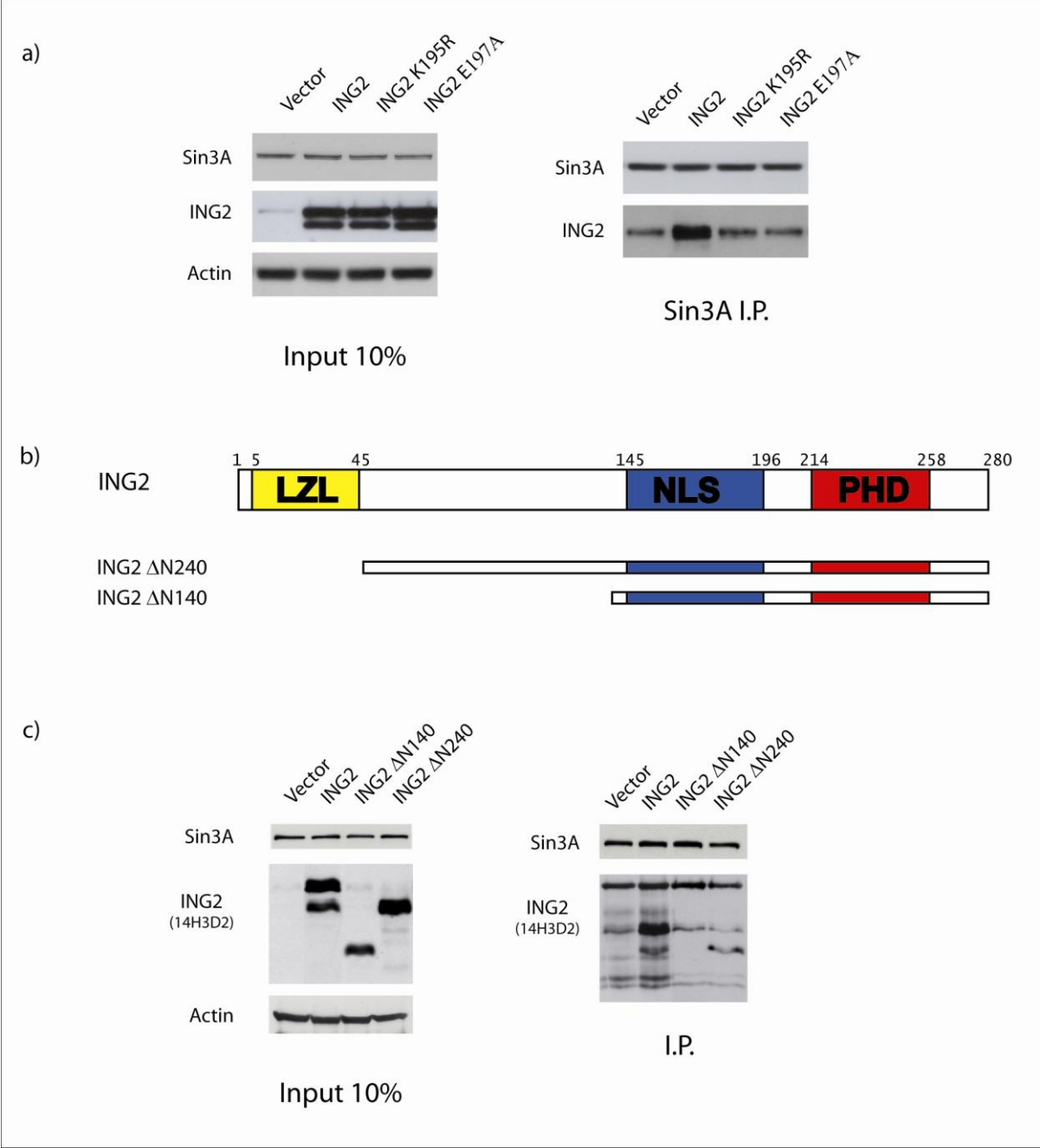
**Figure 2**



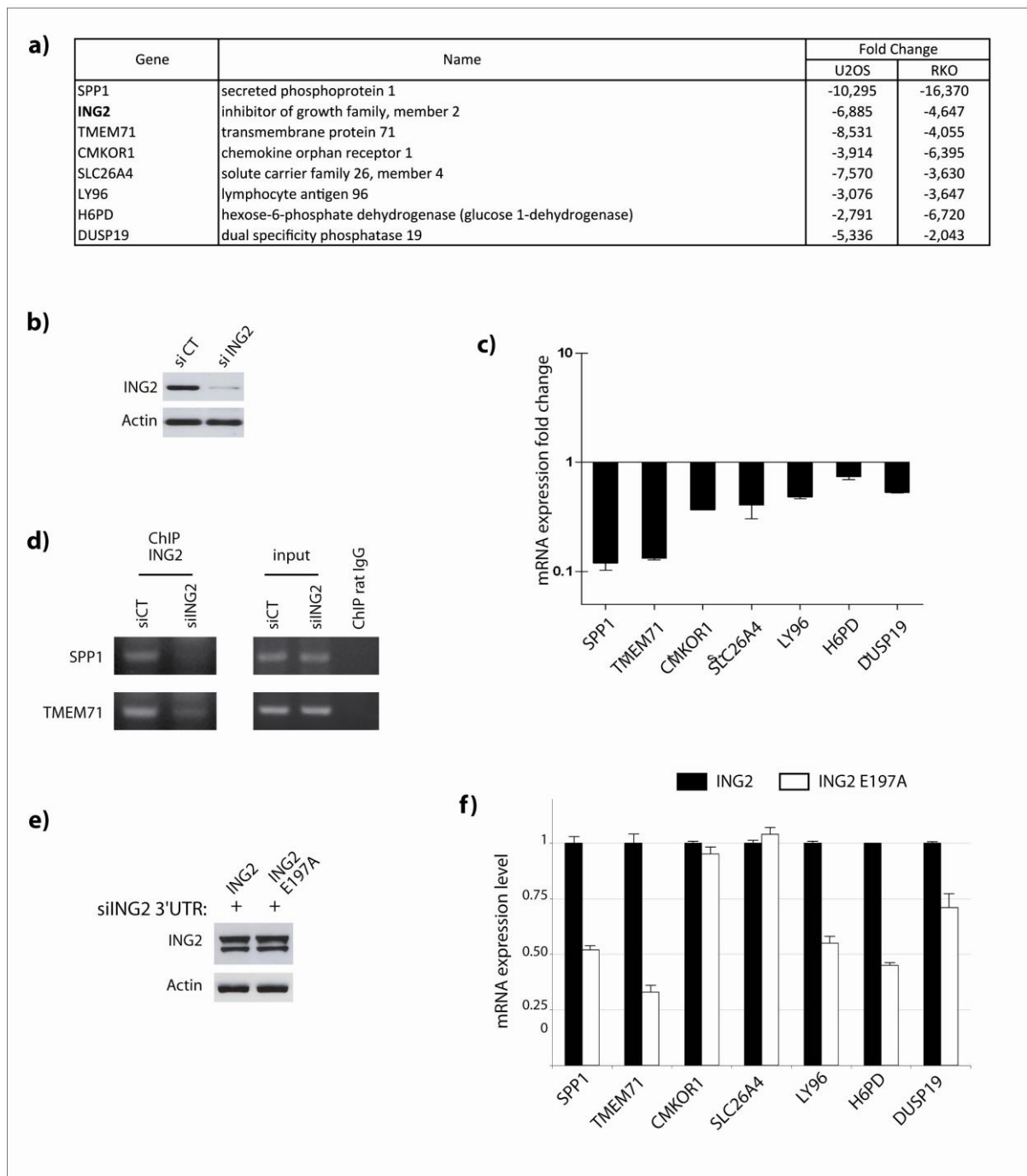
**Figure 3**



**Figure 4**

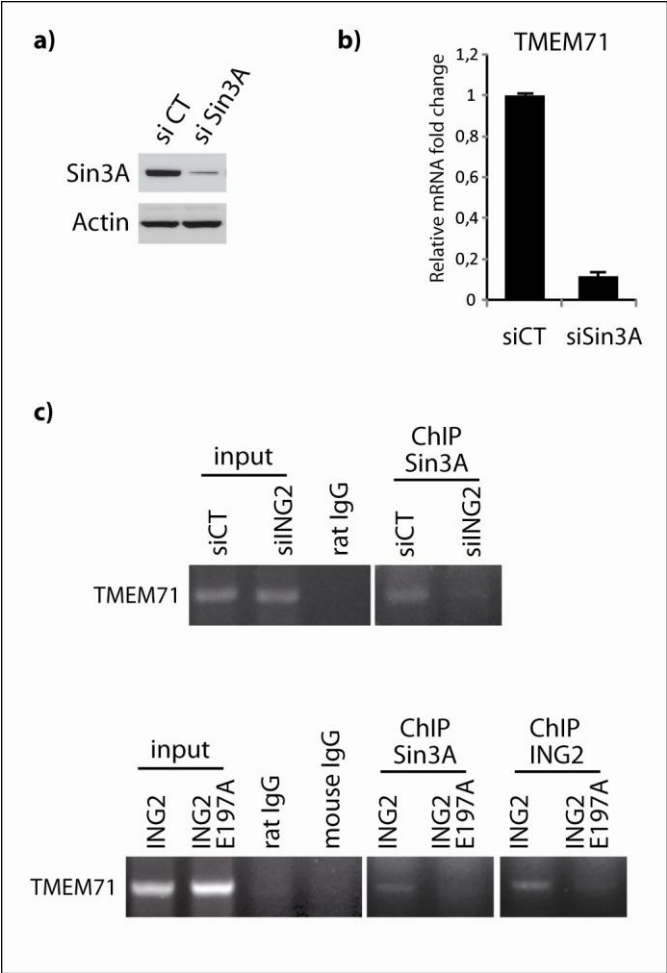


**Figure 5**





**Figure 6**



**Supplemental table 1**

	<b>Primers</b>	
	Sense	Anti-sense
<b>Genes</b>		
ING2	tgctacgtgcaggactacct	gacacgttcctctgcatgc
SPP1	ttgcagtgattgcttttgc	gccacagcatctgggtattt
TMEM71	ggaggttgacacagacat	tccctgactcccagtcac
CMKOR1	acgtggtggctctccttgc	agggatgtagtgcaggatgg
SLC26A4	ggcttgacagattggattcat	ctgtgagaccagcacttggg
LY96	ttccaaagcgcaaagaagt	cacagtctctcccttcagagc
H6PD	cttggccatgaccacttct	taatggccacccggtagat
DUSP19	accaggggtgacaacgctaac	ccactgctcggctctacttc
<b>Promoters</b>		
SPP1	tgcttgcctcttataaaat	ggttctgaattccgctgtgt
TMEM71	tgccatgatgagcaaga	ggcaaagaagcagaatgagg

## **2. Statut et fonctions des protéines ING dans la cancérogénèse.**

### **2.1. Statut d'ING2 dans les cancers du poumon.**

Le statut de suppresseur de tumeurs du gène ING1 était clairement admis. En revanche le statut des autres gènes ING et notamment celui du gène ING2 dans les tumeurs était quasiment inconnu. Seule une étude, portant sur des carcinomes baso-cellulaires avait montré une fréquente perte d'hétérozygotie sur le grand bras du chromosome 4 au locus 4q32, qui contient les gènes ING2 et SAP30 (Sironi et al., 2004). Dans le cadre de notre collaboration avec le groupe du Dr. Curtis Harris, nous savions que l'expression d'ING2 était perdue dans la majorité des lignées cellulaires issues de cancers du poumon qu'ils avaient analysées (ces données ont depuis été publiées (Okano et al., 2006)). Ainsi, toutes ces données suggéraient qu'ING2 pourrait participer à la cancérogénèse pulmonaire. Nous avons donc étudié le statut d'ING2 dans les tumeurs pulmonaires.

#### 2.1.1. Résumé des principaux résultats.

##### L'expression protéique d'ING2 est perdue dans les NLCLC.

Nous avons initié cette étude par l'analyse du profil immunohistochimique (IHC) d'ING2 dans 120 tumeurs bronchiques non à petites cellules (NSCLC) incluant 71 adénocarcinomes (ADK) et 49 carcinomes malpighiens (SCC). L'analyse des marquages IHC a montré que l'expression d'ING2 est perdue dans 58% des tumeurs analysées avec une perte plus fréquente dans les ADK que dans les SCC (68% contre 45%). Aucune relation n'a pu être établie entre le statut en IHC d'ING2 et le sexe des patients, leur survie à cinq ans ou le stade des tumeurs. L'expression d'ING2 est cependant perdue dans une forte proportion de tumeurs de stade I, suggérant que cette perte a lieu tôt dans le processus de tumorigénèse.

### La perte d'expression d'ING2 à lieu au niveau ARN.

L'analyse de la perte d'hétérozygotie (LOH) du gène ING2 montre que ce dernier n'est pas délété. Aucune mutation n'a été trouvée suite au séquençage des deux exons du gène ING2. En revanche, le niveau d'expression de l'ARNm est corrélé au niveau d'expression de la protéine. Ainsi, lorsque l'expression d'ING2 est perdue dans les tumeurs, cette perte a lieu au niveau ARN. La méthylation des îlots CpG présents dans les promoteurs des gènes, notamment des gènes suppresseurs de tumeurs, est un mécanisme fréquemment décrit comme responsable de l'inactivation de leur expression. Etant donné que l'analyse bioinformatique de la séquence du gène ING2 révèle la présence de trois îlots CpG répartis dans le promoteur, le premier exon et le premier intron, nous avons analysé l'état de méthylation de l'ADN dans ces trois régions à la fois par PCR spécifique de la méthylation (MSP : Methyl Specific PCR) et par séquençage après traitement de l'ADN au bisulfite. Cependant, aucune méthylation n'a été observée, indiquant que cette dernière n'est pas responsable de la perte d'expression d'ING2.

### La perte d'expression d'ING2 est indépendante de p53.

Le fait, d'une part, qu'ING2 soit impliquée dans l'activation des voies de suppression de tumeurs de p53 (Nagashima et al., 2001; Pedoux et al., 2005) et, d'autre part, que l'expression d'ING2 puisse être directement régulée par p53 (Kumamoto et al., 2008), nous a conduit à étudier s'il existait une relation entre le statut d'ING2 et de p53. Pour ce faire, nous avons réalisé le marquage IHC de p53 sur la même série de tumeurs précédemment analysée pour ING2. En accord avec ce qui avait déjà été montré, nous avons observé que 46% des ADK et 63% des SCC présentent un profil IHC d'une protéine p53 mutée. Cependant, aucune corrélation n'a été observée entre le statut IHC de p53 et le statut IHC d'ING2. Ces résultats indiquent que la perte d'expression d'ING2 dans les NSCLC est indépendante de p53 et suggèrent que les mécanismes par lesquels ING2 et p53 participent au développement de NSCLC sont différents.

## Conclusion

L'étude du statut d'ING2 dans les cancers du poumon nous a permis de montrer que son expression est perdue dans plus de la moitié des tumeurs analysées et que cette perte a lieu au niveau ARN. De plus, nos résultats suggèrent que cette perte d'expression est un événement précoce. Par ailleurs, bien que certaines fonctions d'ING2 soient dépendantes de p53 et inversement, et bien que p53 puisse réguler l'expression d'ING2, nous montrons que la perte d'expression d'ING2 dans les tumeurs pulmonaires est indépendante de p53. Cela suggère que ces deux protéines pourraient participer à la cancérogénèse pulmonaire par des mécanismes différents..

### 2.1.2. Manuscrit de la publication n°3.

Ces travaux ont donné lieu à l'écriture d'un manuscrit pour publication intitulé :  
« **Expression of candidate tumor suppressor gene ING2 is lost in Non-Small Cell Lung Carcinoma** », qui a été soumise au journal Lung Cancer. Ce manuscrit est présenté à la page suivante.

# Expression of candidate tumor suppressor gene ING2 is lost in Non-Small Cell Lung Carcinoma

Running title: ING2 in lung tumors

Damien Ythier<sup>1,2</sup>, Elisabeth Brambilla<sup>1,2,3</sup>, Romuald Binet<sup>1,2</sup>, Damien Nissou<sup>1</sup>, Aurélien Vesin<sup>4</sup>, Florence de Fraipont<sup>5</sup>, Denis Moro-Sibilot<sup>1,2,6</sup>, Sylvie Lantuejoul<sup>1,2,3</sup>, Christian Brambilla<sup>1,2,6</sup>, Sylvie Gazzeri<sup>1,2</sup>, and Rémy Pedoux<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Molecular Basis of Lung Cancer Progression, INSERM U823, Albert Bonniot Institute, La Tronche 38706 cedex, France.

<sup>2</sup>Joseph Fourier University, 38041 Grenoble cedex 09, France.

<sup>3</sup>Anatomy department and Pathological Cytology, Albert Michallon Hospital, BP217, 38043 Grenoble Cedex 09, France.

<sup>4</sup>Epidemiology of Cancers and Severe Diseases INSERM U823, Albert Bonniot Institute, La Tronche 38706 cedex, France.

<sup>5</sup>Biological Oncology and Biotherapies, Pole of Biology, CHU Grenoble, France.

<sup>6</sup>Pole of Acute Medicine, Pneumology, Albert Michallon Hospital, BP217, 38043 Grenoble Cedex 09.

## **Corresponding author:**

Rémy Pedoux

Room 112

Institut Albert Bonniot, INSERM U823

UJF-Domaine de la Merci

38706 La Tronche Cedex

France

Tel: 33 (0)4 76 54 94 64

Fax : 33 (0)4 76 54 94 13

Email : [remy.pedoux@ujf-grenoble.fr](mailto:remy.pedoux@ujf-grenoble.fr)

## **Abstract**

ING2 is a candidate tumor suppressor gene involved in cell cycle control, apoptosis and senescence. Furthermore, we have recently shown that loss of ING2 expression is associated with increased genome instability. We investigated its status in a series of 120 non-small cell lung cancer (NSCLC) by using immunohistochemistry (IHC). The results showed that ING2 protein expression is downregulated in more than 50% of NSCLC, with a higher frequency in adenocarcinoma (ADK) as compared to squamous cell carcinoma (SCC) (68% versus 45%,  $P=0.021$ ). Loss of ING2 expression occurs in a high proportion of tumors from stage I and was not associated with patient's gender, age and 5-year survival. When investigating the possible mechanisms responsible for the decrease of ING2 expression, we did not observe any loss of heterozygosity or mutation in the ING2 gene. However, in 95% of the cases examined, we identified a silent single nucleotide polymorphism (SNP). By using quantitative RT-PCR, we found that ING2 loss of expression may be due to the decrease of its mRNA level. Analysis of CpG islands present in the promoter region of the ING2 gene did not allow for the detection of methylation. Mechanistically, although p53 can regulate ING2 transcription and ING2 enhances p53 activity, no correlation between ING2 and p53 IHC status was observed. Overall, these results indicate that loss of ING2 expression could contribute to lung tumorigenesis independently of p53.

**Keywords:** ING2, p53, NSCLC, ADK, SCC

## Introduction

Lung cancer is the main cause of cancer deaths worldwide, claiming more lives than breast, colon and prostate cancer combined. Early diagnosis allowing for surgical resection has a 60 to 80% five-year survival, but is performed in less than 25% of all patients, stressing the need for identifying molecular biomarkers to improve early detection and therapies. Lung carcinogenesis is associated with multifocal morphologic transformation and multistep accumulation of genetic and epigenetic alterations due to carcinogens exposure (tobacco, asbestos,...) targeting genes controlling the cell cycle, DNA repair, apoptosis, senescence, differentiation and cell migration. Genotoxic effects of tobacco components have been well described, leading to the inactivation of tumor suppressor genes such as TP53 and RB, and to the activation of oncogenes such as KRAS[1-4]. Although several tumor suppressor genes involved in lung tumorigenesis have been identified, many others remain to be discovered[5].

A screen designed to identify new tumor suppressor genes allowed the discovery of the ING1 (INhibitor of Growth 1) gene in 1996[6]. Several studies have suggested that ING1 protein is involved in cell cycle regulation, DNA repair, apoptosis, senescence and neoplastic transformation[6-9]. Subsequently, homology searches have allowed the identification of the ING gene family (ING1-5)[10-13]. ING proteins are characterized by the presence of a nuclear localization sequence (NLS) and a plant homeodomain (PHD) in their C-terminal region. The ING2 gene is a member of the family that shares the highest homology with ING1. ING2 protein has been shown to mediate cell cycle arrest in G1-phase and to induce apoptosis[12]. ING2 cooperates with p300 to enhance p53 acetylation in order to induce cellular senescence[14]. In addition, ING2 has been proposed to regulate responses to DNA damage by acting as a phosphoinositide nuclear receptor[15]. The PHD of ING2 has a high affinity for the histone 3 tri-methylated on lysine 4(H3K4(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)[16]. This interaction allows the repression of Cyclin D1 and c-myc by recruiting the deacetylase complex Sin3A/HDAC1 onto their promoters in response to stress. Recently, it has been reported that p53 could repress ING2 expression by binding two p53-DNA binding consensus sequences present in its promoter[17].

In human tumors, the expression of ING genes is frequently lost or downregulated[18]. Most of these studies have been conducted on ING1 and have shown that ING1 mutation is a rare event, but when it occurs, mutations are found in two critical



domains: the NLS and the PHD[19]. A majority of studies have reported a strong decrease or loss of ING1 at the mRNA level. In lung tumors, ING1 mRNA expression is reduced in 42% of cases, suggesting that ING1 could play a role in lung carcinogenesis[20]. Since ING2 shares strong homology and function with ING1 [21], and since downregulation of ING2 expression has been reported in several lung cancer cell lines[22], we investigated the status of ING2 in NSCLC. Our results demonstrate that expression of ING2 protein is frequently downregulated in NSCLC by a mechanism which may involve the decrease of its mRNA expression level. These data highlight ING2 as a gene whose deregulation could contribute to lung carcinogenesis.

## **Material and Methods**

**Tissue samples.** One hundred and twenty human lung tumors were included in this study. They consisted of 71 adenocarcinomas and 49 squamous cell carcinomas (See Table 1). Tissue samples were taken at the time of surgical resection of lung tumors. Tumor tissues and normal lung parenchyma were immediately frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. For histological classification, tumor samples were fixed in formalin and the diagnoses were made on paraffin-embedded material using the current World Health Organization International Histological Classification of Lung Tumors criteria[23].

**Immunohistochemistry.** ING2 and p53 immunohistochemical analyses were carried out on formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections. Tissue sections were dehydrated in xylene and rehydrated in graded ethanol solutions. Endogenous peroxidase activity was blocked by immersion in  $\text{H}_2\text{O}_2$  solution. Cut sections were boiled for 60 minutes in citrate buffer (pH6) for heat-induced epitope retrieval. Immunodetections were performed using the Ventana Autostainer (Ventana Medical International Inc., Illkirch, France). The primary antibodies ING2 (KMP1[12]) and P53 (DO-7, Santa Cruz) were used at a 1:100 dilution for 1 h. Slide incubation with normal rabbit or mouse IgG at the same concentration as the primary antibodies, as well as competition with ING2 immunization peptide, served as negative controls.

**Immunohistochemical staining evaluation.** Immunostainings were evaluated by two independent observers (SL and EB) in distinct areas of slide sections for correlation and confirmation of tissues analysis and scored by taking into account tumor heterogeneity. A final score (0-300) was established by multiplying the percentage of labeled cells (0-100%) with the intensity of staining (1, 2 or 3). Subsequently, tumor samples were divided into two classes as follows: for ING2 class 0, score  $\leq 50$ ; class 1, score  $> 50$ ; for p53 class 0, score  $\leq 40$ ; class 1, score  $> 40$ . For ING2, samples with a score  $> 50$  were considered as tumor with normal ING2 expression. For p53, samples with a score  $> 40$  were considered as a mutant profile as previously established[24]. In all the slides analyzed, the type two pneumocytes present in the normal lung tissue surrounding the tumor, as well as lymphocytes present within the tumor, were used as the positive internal control.

**Statistical analysis.** The association of ING2 expression with histological type and tumor staging was assessed using the Chi square test. The same test was used to investigate the relationship between ING2 expression and p53 status. Kaplan-Meier estimates were computed to compare the overall survival of patients according to their value regarding ING2 expression and p53 status (individually and combined). The Log rank test was used to test for differences between survival curves. All tests were two-tailed and p values <0.05 were considered significant. The statistical analyses were done using SAS 9.13 (Cary, NC) and R 2.4.0 (R foundation, Vienna, Austria).

**RNA isolation and RT-PCR.** Tumor samples and their matched normal lung tissue were ground with a potter in TrizolReagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and total RNAs were isolated according to the manufacturer's recommendations. RNA purity was assessed by spectrophotometry with A260/A280 ratios > 1.7. One to 5 µg of RNA were used for reverse transcription using SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen) according to manufacturer instructions. cDNAs were then submitted to Real Time PCR using Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). 18S primers were used for normalization and MX Pro software (Stratagene) was used for analysis. The following primer pairs were used : ING2 forward 5'-TGC TAC GTG CAG GAC TAC CTT-3' and ING2 reverse 5'-GAC ACG TTC CTC TGC ATG TC-3', 18S forward 5'-CGC CGC TAG AGG TGA AAT TC-3' and 18S reverse 5'-TTG GCA AAT GCT TTC GCT C-3'.

**Genomic DNA extraction and sequencing.** Genomic DNA from frozen tumors and normal lung tissues samples were digested with proteinase K and extracted using the DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) according to the manufacturer's recommendations. The two reverse primers specific for ING2 exons 1 and 2 were: 5'-TGT CAC GGG AGA AAG GGA AG-3' and 5'-CCC TCT TCC TGT TCC CTG CTC-3', respectively.

**DNA methylation analysis.** ING2 gene methylation analysis was performed on lung tumors and their normal related tissue after bisulfite DNA conversion with a CpGenome DNA modification kit (MP Biomedicals, Illkirch, France). DNA was then analyzed by methylation-specific PCR (MSP). For MSP, DNA was amplified with FastStart DNA polymerase (Roche, Meylan, France) using specific primers for the methylated or

unmethylated sequences of the three regions analyzed (see figure 4). The sequences of primers used to amplify and detect the unmethylated ING2 promoter were: (forward) 5'-GTTTTAGGTTGTTTGAAAAGGAATT-3' and (reverse) 5'-CTAAAAAAAAACAACCTCCAACCTCCAC-3' for region 1 ; (forward) 5'-GGGTTGTGAGATGGTATTT-3' and (reverse) 5'-ACCCAAAAACAAAACAAA-3' for region 2 ; (forward) 5'-TAGTAATTGTATTTGTTGGTTGT-3' and (reverse) 5'-TCACAACACAAACACATTCCT-3' for region 3. The sequences of primers used to amplify and detect methylated ING2 promoter were: (forward) 5'-TTAGGTCGTTTCGAAAAGGAATC-3' and (reverse) 5'-TAAAAAAAAACAACCTCCAACCTCCG-3' for region 1 ; (forward) 5'-GGTTGCGAGACGGTATTC-3' and (reverse) 5'-CCCAAAAACGAAACGAAA-3' for region 2 ; (forward) 5'-TAATTGTATTCGTCGGTCGC-3' and (reverse) 5'-TCGCAACACAAACACGTT-3' for region 3. DNA from peripheral blood lymphocytes (Buffy coat), treated or untreated with Sss1 methyltransferase (New England Biolabs, Ozyme, St. Quentin Yvelines, France) was used as a positive and negative control respectively. PCR products were analyzed using 3% agarose gel electrophoresis.

## Results

### **ING2 protein expression is lost in lung tumors.**

One hundred and twenty cases of NSCLC were analyzed in this study. Their clinicopathological features are summarized in Table 1. They consisted in 71 ADK and 49 SCC all originating from smokers. There were 90 males and 30 females and the median age was 65 years old, ranging from age 36 to 86 years. First, we examined ING2 protein expression by IHC in these tumor samples and their matched normal tissues. Samples were scored as described in the Material and Methods. In normal lung tissue, ING2 shows a strong nuclear staining of Type II pneumocytes in the alveolar and bronchiolar epithelium (Figure 1). ING2 score was greater than 100 in more than 90% of 30 samples examined and a score higher than 50 was observed in all cases. As compared to normal lung, lung tumors exhibited a general decrease of ING2 expression. Initially, we considered three populations: normal expression (score >120), low expression ( $50 < \text{score} \leq 120$ ) and lost expression (score  $\leq 50$ ). However, since ING genes have been proposed as candidate tumor suppressor genes and since tumor suppressor genes are inactivated or lost in tumors, we have focused our analysis on tumor samples whose ING2 expression is lost. Therefore, for the analysis of ING2 expression in NSCLC, we considered two populations: expressed ING2 (score >50) and ING2 loss of expression (score  $\leq 50$ ). According to this, loss of ING2 expression is observed in 58% (70/120) of NSCLC (Table 2). ING2 loss is more frequent in ADK, 68% (48/71), than in SCC, 45% (22/49) ( $\chi^2$  test,  $p=0,021$ ). No relationship was observed between ING2 IHC status and gender or stage. Previous reports have indicated that loss of ING1 or ING2 expression is able to extend replicative lifespan [9, 14]. No clear cut statistical difference ( $p=0.08$ ) in ING2 loss of expression in patients below or above age 65 was observed (Table 2). No difference in patient survival is observed when taking into account ING2 status (loss versus normal expression) in NSCLC, ADK or SCC (data not shown). However, we noticed that a large proportion of tumor samples exhibited a loss of ING2 expression from Stage I (56%, 18/32) both in ADK (55%, 10/18) and SCC (57%, 8/14) (Table 2). No statistical difference in the proportion of ING2 loss was observed between samples of Stage I, II, III or IV.

### **Loss of ING2 expression occurs at the RNA level.**

To determine the mechanism(s) by which ING2 loss of expression occurs in lung tumors, we first investigated ING2 gene deletion by loss of heterozygosity (LOH). A set of 12 tumors was analyzed: seven ADK (five with lost ING2 expression) and five SCC (three with lost ING2 expression). Genomic DNA from these 12 tumor samples and their matched normal tissues were extracted, and subjected to PCR analysis using specific primers for five microsatellite markers surrounding the ING2 gene[25]. No LOH was observed (data not shown). We next investigated the presence of mutations within the ING2 gene in the same samples. ING2 gene is made of two exons, which were sequenced and compared to ING2 GenBank referenced sequence (accession number: NM\_001564). A cytosine to a thymidine substitution was observed on nucleotide 39 on one or two alleles both in tumors and their matched normal tissue. This substitution did not change the amino acid (alanine). To ensure that this mutation was not restricted to this set of 12 tumors, we performed sequencing on 10 additional tumors (five out of six ADK and two out of four SCC with lost ING2 expression). Similar results were obtained and a total of 21 out of 22 cases exhibited a cytosine to thymidine change (15 cases, 68%: GCT, 6 cases, 27%: GCT/GCC and one case, 5%: GCC) (Figure 2). The high rate of this substitution in our samples and its presence both in normal and the corresponding tumor tissue strongly suggests that it is a polymorphism (submitted to NCBI SNP database). Finally, we investigated ING2 mRNA expression by qPCR in the same set of 22 tumors and their matched normal lung tissue. In normal lung tissue we have observed that ING2 level of expression varies from 1 to 10 fold when normalizing with 28S RNA(data not shown). Thus, we have preferred to compare ING2 mRNA expression in tumors with their matched normal tissue instead of the mean of several normal lung tissues. A significant decrease in ING2 mRNA expression was found in 15 tumors. No significant change was observed in six cases, and in one case ING2 mRNA increased significantly (Figure 3). Strikingly, all tumor samples with a decreased ING2 transcript also exhibited a loss of ING2 protein expression (Figure 3). This correlation indicates that loss of ING2 expression could occur at the mRNA level.

### **The ING2 promoter is not methylated.**

Since promoter methylation is a general mechanism to inactivate mRNA expression of tumor suppressor genes, we investigated ING2 promoter methylation. Using the Methyl Primer Express Software (available at: <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=602121>), we identified three CpG islands within the promoter, first exon and intron of ING2 (Figure 4a). Therefore, we analyzed ING2 CpG island methylation in these three areas by methyl specific PCR (MSP) (Figure 4b) and by DNA sequencing (data not shown) following DNA bisulfite treatment. The 12 tumor samples and their matched normal tissue used for LOH study were analyzed. The results showed the absence of ING2 gene methylation at these sites either by MSP (Figure 4b) or by sequencing (data not shown). Thus, ING2 promoter methylation may not be a frequent event in lung tumors and does not explain the high rate of ING2 mRNA expression loss.

### **ING2 loss of expression is independent of p53 status.**

Since ING2 is involved in the activation of p53 tumor suppression pathways[12, 15], and it has been recently reported that p53 could regulate ING2 gene expression[17], we investigated the relationship between ING2 and p53 status in our set of NSCLC. Tumor samples previously analyzed for ING2 status by IHC were stained for p53 with DO-7 antibody and scored (see Material and Methods). As previously reported, a p53 score  $\leq 40$  is considered as a wild type protein expression; whereas, a p53 score  $> 40$  is considered as a mutant protein profile[24]. In agreement with previous studies on p53 status[24], we observed a p53 mutant profile in 46% of ADK and in 63% of SCC. No correlation was observed between ING2 and p53 status in all NSCLC, or ADK and SCC when analyzed separately (Table 3). No correlation between p53 status and patient survival was observed (data not shown). In addition, when analyzing patient's survival according to ING2 and p53 status, no effect was observed in NSCLC, ADK or SCC (data not shown).

## Discussion

Several studies have reported the involvement of ING2 in tumor suppressor pathways such as cell growth arrest, senescence, apoptosis and DNA repair [12, 14, 26]. However, limited information is available on ING2 status in human tumors. In hepatocellular carcinoma, a reduced ING2 expression has been reported and is associated with poor prognosis[27]; whereas a decreased ING2 nuclear expression has been found in melanoma[28]. In our study, we report on a large series of lung tumor samples that ING2 expression is frequently downregulated in human lung cancer, both at the protein and mRNA levels.

Analysis of 120 tumors showed that ING2 expression is lost in 58% of NSCLC. We observed that the loss of ING2 expression was significantly different when taking into account the histological tumor type with ING2 being lost in a higher percentage of ADK than SCC. ADK and SCC development results from the accumulation of genetic abnormalities. However, some abnormalities appear to be more frequent in specific histological types. For examples: i) KRAS mutation in the exon 12 is found in 30 to 40% of the ADK but is extremely rare in SCC[29, 30], ii) the methylation rates of APC, CDH13 and RARbIn are significantly higher in ADK than in SCC[31]. The difference of the frequency of ING2 expression loss between ADK and SCC suggests that ING2 may have role in cellular process that may be differentially regulated in ADK or SCC etiology. As we found that ING2 expression was lost in NSCLC, we investigated the mechanisms involved in the downregulation of ING2 protein expression. No deletion of the ING2 gene was observed. In addition, as previously observed by Okano et al., we did not detect any ING2 mutation in tumors[22]. We identified a silent SNP on nucleotide 39 that was unpublished yet and not observed by Okano and colleagues. This could be due to differences in ethnicity as our population was mainly of Caucasian origin and that of Okano's study of Asian origin. This SNP is described in SNP databases (NCBI, HapMap). The reported frequency of this polymorphism in the databases is the same than in our observation. To further understand the mechanism leading to ING2 protein downregulation, we investigated ING2 mRNA expression in tumors. We found that expression of the ING2 transcript is downregulated in lung tumors and we observed a good correlation between ING2 mRNA and protein status. Altogether, these results indicate that the decrease of ING2 expression in NSCLC may occur at the mRNA level. One of the main mechanism identified for ING1 loss of expression in human tumors is its downregulation at the mRNA level[18]. It should be noticed that in lung tumors a similar



downregulation of ING1 mRNA expression was reported but the status of ING1 protein was not investigated[20]. Promoter methylation is a general mechanism to inactivate mRNA expression. Furthermore, methylation of ING1 promoter was reported in ovarian cancer. Therefore, we investigated the possibility that methylation of ING2 gene was responsible for the loss of ING2 mRNA expression in lung tumors. Bioinformatic analysis of the ING2 gene revealed the presence of CpG rich regions in the promoter, first exon and first intron (Figure 4). We analyzed ING2 methylation in these three regions but did not find any DNA methylation at these sites. These results indicate that methylation is probably not involved in the decrease of ING2 transcript. Finally, since it has been reported that p53 can regulate ING2 transcription (two p53 transcriptional repression sequences were identified on ING2 promoter[17]), we investigated the possibility that the decrease of ING2 expression might depend on p53 status. No relationship between ING2 and p53 IHC status was observed, suggesting that ING2 and p53 play independent roles in lung tumorigenesis. Although ING proteins were initially identified as p53 activity enhancer when overexpressed, some groups using ING1 KO model have reported ING1 tumor suppressor function mostly independent of p53 pathway[32, 33]. At this time, the mechanism(s) responsible for the decrease of ING2 mRNA in lung tumors remains to be determined. Several mechanisms such as: i) misregulation of a transcription factor, ii) abnormal epigenetic modification, other than DNA methylation, of the gene, and iii) misregulation of micro RNA targeting ING2, could be responsible for ING2 downregulation. Further information on ING2 regulation is needed to test these hypotheses. A similar downregulation of mRNA in human tumors is also reported for the other members of the ING gene family but the main mechanism involved in this process remains also unknown.

Accumulating evidences implicate ING2 in tumor suppressor pathways. We and others have reported that in response to genotoxic stress the overexpression of ING2 can enhance p53 activation in order to repress cell cycle and/or to promote apoptosis or senescence. However, in tumors, in accordance with its candidate tumor suppressor status, ING2 gene expression is lost. Recently, using ING2 knockdown experiments, we reported a new function for ING2 in the control of DNA replication and in the maintenance of genome stability [34]. Furthermore, some evidences also support a role for ING2 in DNA repair which is critical for the maintenance of the genome integrity[26, 35]. Thus, ING2 may act as a tumor suppressor gene by maintaining directly DNA integrity. Since genomic instability is strongly involved in the early stages of the lung

tumorigenesis process [36] and since we found that ING2 loss of expression occurs from stage I in NSCLC, we hypothesize that ING2 may play a role in these events. Consequently, it would also be of interest to investigate the status of ING2 in preneoplastic lesion. Overall, our results indicate that ING2 loss of expression could contribute to the development of lung tumors.

## **Acknowledgements**

D.Y. is a recipient of INCa doctoral fellowship. R.B. is a recipient of a doctoral fellowship from La Fondation pour la Recherche Médicale (Prix Mariane Josso). R.P. was a recipient of an IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) fellowship and the work was supported by INSERM, “Agir a dom”, La Ligue Contre le Cancer (Savoie), PNES Poumon (INCa) and Marie Curie International Reintegration (MIRG-CT-2006-042148)(EU) grants. We thank the technicians of the “Biological Oncology and Biotherapies” unit for their technical support, and Nicolas Morzol for data management.

## **Conflict of interest statement**

None declared

## Bibliography

1. Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH, Cote ML. The molecular epidemiology of lung cancer. *Carcinogenesis* 2007; 28: 507-518.
2. Brambilla E, Gazzeri S, Moro D, Lantuejoul S, Veyrenc S, Brambilla C. Alterations of Rb pathway (Rb-p16INK4-cyclin D1) in preinvasive bronchial lesions. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 243-250.
3. Suzuki Y, Orita M, Shiraishi M, Hayashi K, Sekiya T. Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene* 1990; 5: 1037-1043.
4. Mounawar M, Mukeria A, Le Calvez F, Hung RJ, Renard H, Cortot A, Bollart C, Zaridze D, Brennan P, Boffetta P, Brambilla E, Hainaut P. Patterns of EGFR, HER2, TP53, and KRAS mutations of p14arf expression in non-small cell lung cancers in relation to smoking history. *Cancer Res* 2007; 67: 5667-5672.
5. Risch A, Plass C. Lung cancer epigenetics and genetics. *Int J Cancer* 2008; 123: 1-7.
6. Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A, Riabowol K. Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* 1996; 14: 415-420.
7. Garkavtsev I, Grigorian IA, Ossovskaya VS, Chernov MV, Chumakov PM, Gudkov AV. The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control. *Nature* 1998; 391: 295-298.
8. Shen DH, Chan KY, Khoo US, Ngan HY, Xue WC, Chiu PM, Ip P, Cheung AN. Epigenetic and genetic alterations of p33ING1b in ovarian cancer. *Carcinogenesis* 2005; 26: 855-863.
9. Garkavtsev I, Riabowol K. Extension of the replicative life span of human diploid fibroblasts by inhibition of the p33ING1 candidate tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 2014-2019.
10. Shimada Y, Saito A, Suzuki M, Takahashi E, Horie M. Cloning of a novel gene (ING1L) homologous to ING1, a candidate tumor suppressor. *Cytogenet Cell Genet* 1998; 83: 232-235.
11. Shiseki M, Nagashima M, Pedoux RM, Kitahama-Shiseki M, Miura K, Okamura S, Onogi H, Higashimoto Y, Appella E, Yokota J, Harris CC. p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity. *Cancer Res* 2003; 63: 2373-2378.
12. Nagashima M, Shiseki M, Miura K, Hagiwara K, Linke SP, Pedoux R, Wang XW, Yokota J, Riabowol K, Harris CC. DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 9671-9676.
13. Nagashima M, Shiseki M, Pedoux RM, Okamura S, Kitahama-Shiseki M, Miura K, Yokota J, Harris CC. A novel PHD-finger motif protein, p47ING3, modulates p53-mediated transcription, cell cycle control, and apoptosis. *Oncogene* 2003; 22: 343-350.
14. Pedoux R, Sengupta S, Shen JC, Demidov ON, Saito S, Onogi H, Kumamoto K, Wincovitch S, Garfield SH, McMenemy M, Nagashima M, Grossman SR, Appella E, Harris CC. ING2 regulates the onset of replicative senescence by induction of p300-dependent p53 acetylation. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 6639-6648.
15. Gozani O, Karuman P, Jones DR, Ivanov D, Cha J, Lugovskoy AA, Baird CL, Zhu H, Field SJ, Lessnick SL, Villasenor J, Mehrotra B, Chen J, Rao VR, Brugge

- JS, Ferguson CG, Payraastre B, Myszka DG, Cantley LC, Wagner G, Divecha N, Prestwich GD, Yuan J. The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* 2003; 114: 99-111.
16. Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Pena P, Lan F, Kaadige MR, Lacoste N, Cayrou C, Davrazou F, Saha A, Cairns BR, Ayer DE, Kutateladze TG, Shi Y, Cote J, Chua KF, Gozani O. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* 2006; 442: 96-99.
  17. Kumamoto K, Spillare EA, Fujita K, Horikawa I, Yamashita T, Appella E, Nagashima M, Takenoshita S, Yokota J, Harris CC. Nutlin-3a activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate mir-34a, mir-34b, and mir-34c expression, and induce senescence. *Cancer Res* 2008; 68: 3193-3203.
  18. Ythier D, Larrieu D, Brambilla C, Brambilla E, Pedeux R. The new tumor suppressor genes ING: genomic structure and status in cancer. *Int J Cancer* 2008; 123: 1483-1490.
  19. Feng X, Hara Y, Riabowol K. Different HATS of the ING1 gene family. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 532-538.
  20. Kameyama K, Huang CL, Liu D, Masuya D, Nakashima T, Sumitomo S, Takami Y, Kinoshita M, Yokomise H. Reduced ING1b gene expression plays an important role in carcinogenesis of non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4926-4934.
  21. He GH, Helbing CC, Wagner MJ, Sensen CW, Riabowol K. Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins. *Mol Biol Evol* 2005; 22: 104-116.
  22. Okano T, Gemma A, Hosoya Y, Hosomi Y, Nara M, Kokubo Y, Yoshimura A, Shibuya M, Nagashima M, Harris CC, Kudoh S. Alterations in novel candidate tumor suppressor genes, ING1 and ING2 in human lung cancer. *Oncol Rep* 2006; 15: 545-549.
  23. Travis WD. Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* 2002; 23: 65-81, viii.
  24. Brambilla E, Gazzeri S, Moro D, Caron de Fromentel C, Gouyer V, Jacrot M, Brambilla C. Immunohistochemical study of p53 in human lung carcinomas. *Am J Pathol* 1993; 143: 199-210.
  25. Sironi E, Cerri A, Tomasini D, Sirchia SM, Porta G, Rossella F, Grati FR, Simoni G. Loss of heterozygosity on chromosome 4q32-35 in sporadic basal cell carcinomas: evidence for the involvement of p33ING2/ING1L and SAP30 genes. *J Cutan Pathol* 2004; 31: 318-322.
  26. Wang J, Chin MY, Li G. The novel tumor suppressor p33ING2 enhances nucleotide excision repair via inducement of histone H4 acetylation and chromatin relaxation. *Cancer Res* 2006; 66: 1906-1911.
  27. Zhang HK, Pan K, Wang H, Weng DS, Song HF, Zhou J, Huang W, Li JJ, Chen MS, Xia JC. Decreased expression of ING2 gene and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2008; 261: 183-192.
  28. Lu F, Dai DL, Martinka M, Ho V, Li G. Nuclear ING2 expression is reduced in human cutaneous melanomas. *Br J Cancer* 2006; 95: 80-86.
  29. Cooper CA, Carby FA, Bubb VJ, Lamb D, Kerr KM, Wyllie AH. The pattern of K-ras mutation in pulmonary adenocarcinoma defines a new pathway of tumour development in the human lung. *J Pathol* 1997; 181: 401-404.
  30. Rodenhuis S, Slebos RJ. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 2665s-2669s.

31. Toyooka S, Maruyama R, Toyooka KO, McLerran D, Feng Z, Fukuyama Y, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, Tsukuda K, Sugio K, Shimizu N, Shimizu K, Lee H, Chen CY, Fong KM, Gilcrease M, Roth JA, Minna JD, Gazdar AF. Smoke exposure, histologic type and geography-related differences in the methylation profiles of non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2003; 103: 153-160.
32. Kichina JV, Zeremski M, Aris L, Gurova KV, Walker E, Franks R, Nikitin AY, Kiyokawa H, Gudkov AV. Targeted disruption of the mouse *ing1* locus results in reduced body size, hypersensitivity to radiation and elevated incidence of lymphomas. *Oncogene* 2006; 25: 857-866.
33. Coles AH, Liang H, Zhu Z, Marfella CG, Kang J, Imbalzano AN, Jones SN. Deletion of *p37Ing1* in mice reveals a *p53*-independent role for *Ing1* in the suppression of cell proliferation, apoptosis, and tumorigenesis. *Cancer Res* 2007; 67: 2054-2061.
34. Larrieu D, Ythier D, Binet R, Brambilla C, Brambilla E, Sengupta S. *ING2* controls DNA replication forks progression to maintain genome stability. *EMBO Reports* 2009; In Press.
35. Wang Y, Wang J, Li G. Leucine zipper-like domain is required for tumor suppressor *ING2*-mediated nucleotide excision repair and apoptosis. *FEBS Lett* 2006; 580: 3787-3793.
36. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, Ditullio RA, Jr., Kastriakis NG, Levy B, Kletsas D, Yoneta A, Herlyn M, Kittas C, Halazonetis TD. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 2005; 434: 907-913.

**Table 1:** Clinicopathological parameters of 120 NSCLC cases.

	No. of patients	%
Age		
≤65	62	52
>65	58	48
Gender		
Male	90	75
Female	30	25
NSCLC subtype		
ADK	71	59
SCC	49	41
Pathological stage		
Stage I	32	26
Stage II	38	32
Stage III	38	32
Stage IV	12	10
Total NSCLC	120	100

**Table 2:** Immunohistochemical analysis of ING2 expression in NSCLC.

	No. of patients	ING2 expression		<i>P</i>
		Normal	Loss	
Gender				
Male	90	39	51	<i>0,18</i>
Female	30	11	19	
Age				
≤65	62	30	32	0.08
>65	58	18	40	
Histological type				
ADK	71	23	48	<i>0,02</i>
SCC	49	27	22	
NSCLC Pathological stage				
Stage I	32	14	18	<i>0,85</i>
Stage II	38	14	24	
Stage III	38	16	22	
Stage IV	12	6	6	
ADK Pathological stage				
Stage I	18	8	10	<i>0,34</i>
Stage II	18	3	15	
Stage III	27	9	18	
Stage IV	8	3	5	
SCC Pathological stage				
Stage I	14	6	8	<i>0,61</i>
Stage II	20	11	9	
Stage III	11	7	4	
Stage IV	4	3	1	

ING2 Normal: score >50; ING2 Loss: score ≤50. *P*: Chi square test P value.



**Table 3:** Immunohistochemical analysis of ING2 and p53 expression in NSCLC.

	No. of patients	ING2 expression		
		Normal	Loss	<i>P</i>
ING2 and p53 status in NSCLC				
p53 WT	56	24	32	<i>0,99</i>
p53 Mt	63	26	37	
ING2 and p53 status in ADK				
p53 WT	38	14	24	<i>0,60</i>
p53 Mt	32	9	23	
ING2 and p53 status in SCC				
p53 WT	18	10	8	<i>0,80</i>
p53 Mt	31	17	14	

P53 WT: score  $\leq 40$ ; P53 Mt: score  $> 40$ . ING2 Normal: score  $> 50$ ; ING2 Loss: score  $\leq 50$ .  
*P*: Chi square test P value.

Figure 1

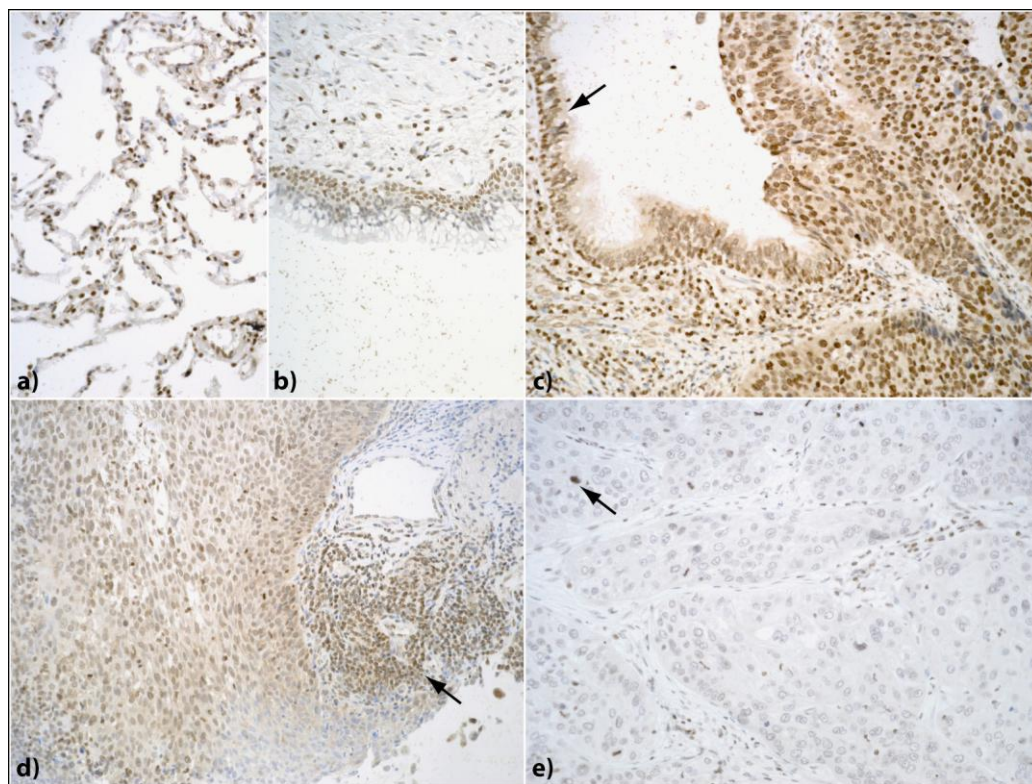


Figure 2

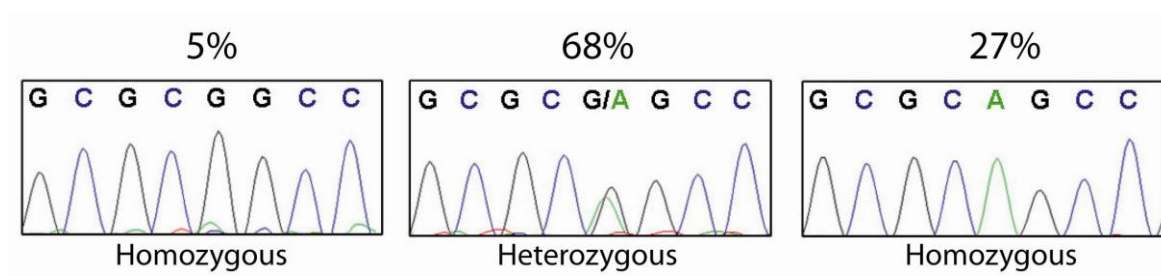


Figure 3

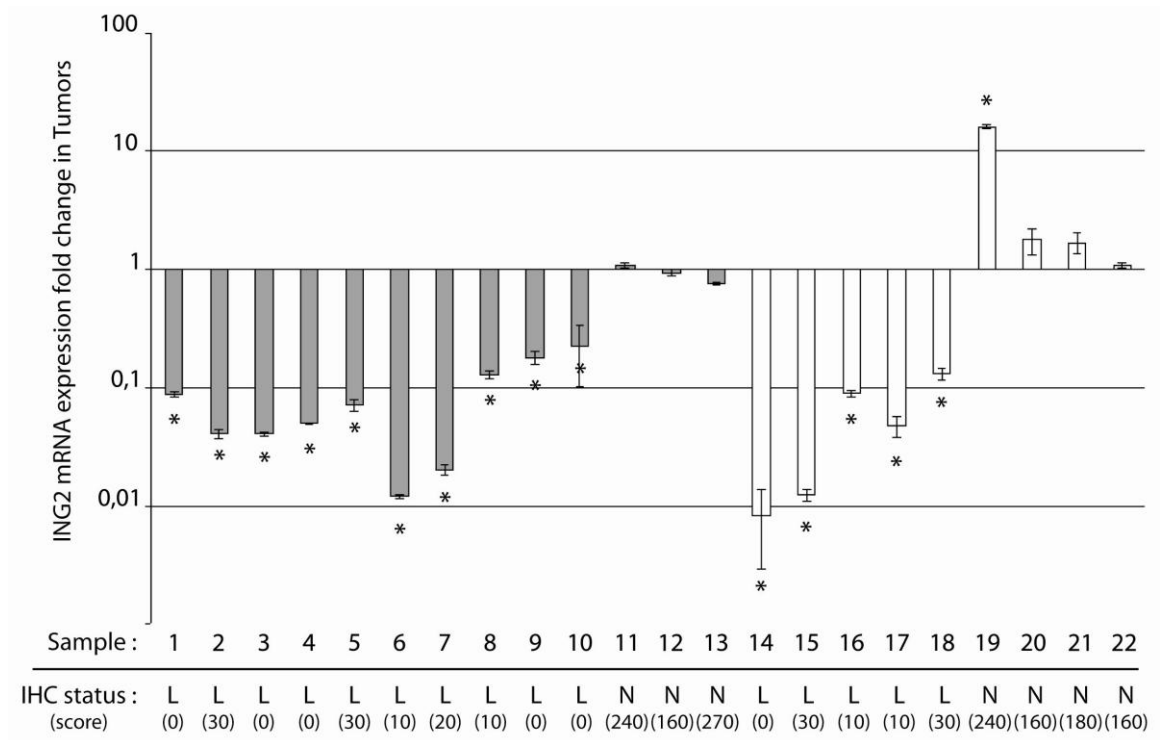
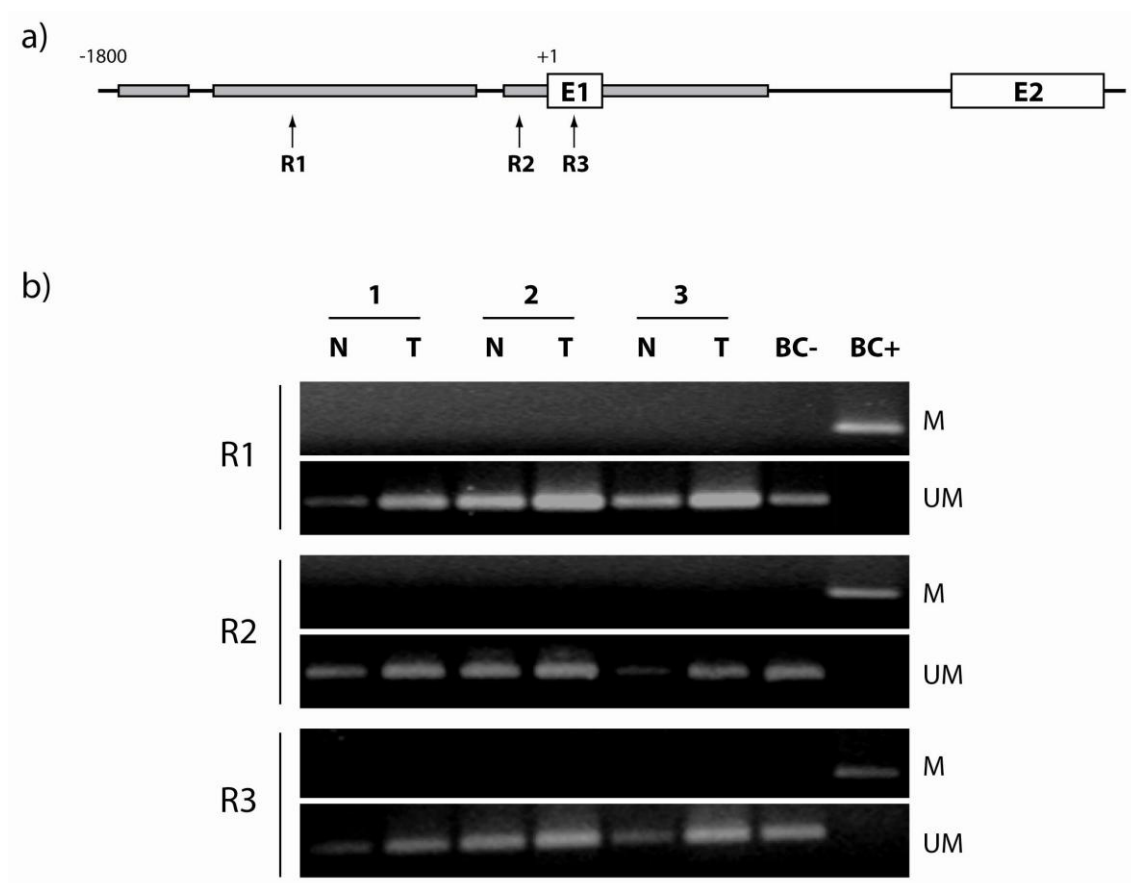


Figure 4



## Legends to Figures

Figure 1: Immunostaining of normal lung parenchyma and lung cancer tissue using an anti-ING2 polyclonal antibody (KMP1). (a) In normal lung, ING2 is expressed with nuclear staining in alveolar pneumocytes at a moderate to high score (mean 100), (b) and in bronchial and bronchiolar epithelial basal cells as well as lymphocytes. (c) Strong expression with nuclear staining (score 240) in squamous cell carcinoma as well as in normal bronchial cells (→). (d) Moderate ING2 expression in a squamous cell carcinoma (score 100) as compared to normal lymphocytes (score 200) (→). (e) Negative ING2 expression (score 0) in a solid type adenocarcinoma as compared with lymphocytes (score 200).

Figure 2: ING2 gene polymorphism: sequencing diagrams obtained with a reverse primer specific for exon 1. The observed percentages for each genotype are shown.

Figure 3: ING2 mRNA expression in NSCLC. Results are shown as the ING2 mRNA expression fold change in NSCLC. ING2 mRNA expression in ADK (grey bars), SCC (white bars) and in their normal related tissues were evaluated by Real-Time PCR. For each case (numbered 1-22) ING2 mRNA was normalized using 18S RNA expression, and the ING2 mRNA expression ratio between tumors and their related tissue were calculated. Cases with a significant change in ING2 mRNA expression in tumors are denoted with a star (\*). For each case, the IHC status is shown (L: loss expression (score  $\leq 50$ ); N: normal expression (score  $> 50$ )).

Figure 4: ING2 promoter methylation. a) Representation of the ING2 gene promoter and two exons (E1 and E2). The CpG rich regions (grey box) and the three regions analyzed by MSP (R1,R2 and R3) are represented. b) Agarose gel showing the PCR products obtained with the primers specific for methylated DNA (M) or unmethylated DNA (UM) for each of the three regions analyzed (R1,R2 and R3). Three representative cases (1, 2 and 3) of tumor (T) and the corresponding normal lung (N) are presented. DNA from Buffy coats treated with (BC+) or untreated (BC-) with SSI methylase was used as a positive and negative control, respectively.

**Manuscript submission: Expression of candidate tumor suppressor gene ING2 is lost in Non-Small Cell Lung Carcinoma**

The authors declare that they have no conflict of interest.

Rémy PEDEUX, PhD

## 2.2. Rôle d'ING2 dans la stabilité du génome.

La plupart des études ayant mis en évidence les fonctions des protéines ING dans les processus cellulaires ont utilisé des systèmes de surexpression. Or, l'étude du statut des protéines ING dans les cancers montre que ces dernières y sont inactivées. Ainsi, nous avons voulu identifier quelles fonctions d'ING2 pourraient conduire à la transformation cellulaire lorsqu'elles sont inactivées. Pour cela, nous avons mené une étude où nous avons diminué l'expression d'ING2 dans des cellules à l'aide d'ARN interférents (ARNi).

### 2.2.1. Résumé des principaux résultats.

#### ING2 est nécessaire pour une progression optimale des fourches de réplication.

Etant donné que la surexpression d'ING2 l'avait impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire, nous avons étudié l'effet de l'inhibition de l'expression d'ING2 sur le cycle cellulaire. L'analyse en cytométrie de flux (FACS) et IF du taux d'incorporation de BrdU montre que les cellules transfectées par un ARNi ciblant ING2 présentent une diminution d'incorporation de BrdU en comparaison à des cellules témoins. Cependant, l'analyse par IF montre que le nombre de foyers de réplication ainsi que leur distribution dans les noyaux ne sont pas affectés par une diminution d'expression d'ING2. Ainsi, ces résultats suggèrent qu'ING2 n'est pas impliquée dans l'initiation des fourches de réplication mais plutôt dans leur vitesse de progression au cours de la réplication. Cette hypothèse a été confirmée par des expériences d'étalement de fibres d'ADN à partir desquelles nous montrons que la vitesse de synthèse de l'ADN est significativement réduite dans les cellules où l'expression d'ING2 est inhibée, en comparaison avec des cellules témoins.



### ING2 interagit avec PCNA et régule la quantité de PCNA présente à la chromatine.

Dans le but d'identifier par quel mécanisme ING2 participe à la réplication, nous avons analysé l'expression de différentes protéines impliquées dans ce processus ainsi que leur présence dans la fraction chromatinienne (CEF). L'analyse par western blot de la protéine ORC2 qui est un membre du complexe d'origine de réplication, des protéines MCM6 (Mini Chromosome Maintenance 6) et cdc45 (cell division cycle 45) qui sont toutes les deux des membres des complexes de réplication et enfin de la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) qui fait partie du complexe d'élongation et qui est impliquée dans la processivité de les ADN polymérase, montre que leur expression dans la fraction cellulaire totale n'est pas affectée par l'inhibition de l'expression d'ING2. Dans la CEF, l'expression d'ORC2, MCM6 et cdc45 n'est pas non plus affectée. En revanche, l'inhibition d'expression d'ING2 induit une diminution de la quantité de PCNA dans la CEF. De plus, par des expériences d'IP *in vitro* et *in vivo* nous montrons qu'ING2 et PCNA interagissent au sein d'un même complexe. Ces résultats suggèrent qu'ING2 recrute PCNA à la chromatine pour permettre une réplication optimale.

### ING2 maintient la stabilité du génome.

En accord avec un ralentissement de la phase S, nous montrons que l'inhibition d'ING2 induit un ralentissement de la prolifération. Etant donné que la protéine PCNA a été montrée comme nécessaire pour la progression de la phase S ainsi que pour le maintien de la stabilité du génome, nous avons cherché à déterminer l'effet d'une inactivation prolongée de l'expression d'ING2. Nous montrons que cette inhibition conduit à l'apparition d'une population de cellules avec un contenu 8N d'ADN, caractéristique d'une endoreduplication. Nous observons également une augmentation du taux d'échange entre chromatides sœurs dans ces cellules. Par ailleurs, en accord avec une augmentation de l'instabilité génomique causée par l'inhibition d'ING2, nous montrons une activation des points de contrôle des dommages de l'ADN, accompagnée d'une augmentation du taux d'entrée des cellules en apoptose et en sénescence.

### Conclusion.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence une nouvelle fonction d'ING2 dans la réplication. D'un point de vue mécanistique nous montrons qu'ING2 interagit avec la protéine du complexe d'élongation de la réplication PCNA et qu'ING2 est nécessaire pour la présence de PCNA à la chromatine. Enfin, nous montrons que l'inhibition prolongée de l'expression d'ING2 augmente les phénomènes d'instabilité génomique tels que l'endoréduplication et l'échange entre chromatides sœurs. Cette étude nous a donc permis de proposer pour la première fois i) qu'ING2 pourrait agir comme un gène suppresseur de tumeur de type « caretaker » ii) un mécanisme par lequel la perte d'expression des ING observée dans les tumeurs pourrait participer au processus de tumorigénèse.

#### 2.2.2. Manuscrit de la publication n°4.

Ces travaux ont donné lieu à une publication intitulée : « **ING2 controls DNA replication forks progression to maintain genome stability** », qui a été soumise puis acceptée dans le journal EMBO reports. Le manuscrit de cette publication, tel qu'il a été accepté, est présenté à la page suivante.

# ING2 controls the progression of DNA replication forks to maintain genome stability

Delphine Larrieu<sup>1</sup>, Damien Ythier<sup>1</sup>, Romuald Binet<sup>1</sup>, Christian Brambilla<sup>1</sup>, Elisabeth Brambilla<sup>1</sup>, Sagar Sengupta<sup>2</sup> & Rémy Pedeux<sup>1,3+</sup>

<sup>1</sup>Molecular Bases of Lung Cancer Progression, INSERM U823, Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, Grenoble, France,

<sup>2</sup>National Institute of Immunology, Aruna Asaf Ali Marg, New Delhi, India, and <sup>3</sup>INSERM U917, IFR140, Faculté de Médecine, Université de Rennes 1, Rennes, France

**Inhibitor of growth 2 (ING2) is a candidate tumour suppressor gene the expression of which is frequently lost in tumours. Here, we identified a new function for ING2 in the control of DNA replication and in the maintenance of genome stability. Global replication rate was markedly reduced during normal S-phase in small interfering RNA (siRNA) ING2 cells, as seen in a DNA fibre spreading experiment. Accordingly, we found that ING2 interacts with proliferating cell nuclear antigen and regulates its amount to the chromatin fraction, allowing normal replication progression and normal cell proliferation. Deregulation of DNA replication has been previously associated with genome instability. Hence, a high proportion of siRNA ING2 cells presented endoreduplication of their genome as well as an increased frequency of sister chromatid exchange. Thus, we propose for the first time that ING2 might function as a tumour suppressor gene by directly maintaining DNA integrity.**

Keywords: DNA replication; genome stability; ING2; PCNA; tumour suppressor

EMBO reports (2009) 10, 1168–1174. doi:10.1038/embor.2009.180

## INTRODUCTION

Inhibitor of growth 2 (ING2) belongs to the ING family of candidate tumour suppressor genes (Garkavtsev *et al*, 1996). Its expression is lost in human tumours (Ythier *et al*, 2008), but its tumour suppressor functions remain unclear. ING2 has been described as a stable component of the repressor complex mouse SIN3A–histone deacetylase 1 (HDAC1; Doyon *et al*, 2006). Owing to a high affinity with the histone 3 trimethylated on lysine 4 (H3K4me3), ING2 recruits SIN3A–HDAC1 to the chromatin (Shi *et al*, 2006) to regulate the expression of genes

involved in cell-cycle control. ING2 can also promote transforming growth factor- $\beta$ -induced transcription (Sarker *et al*, 2008) and enhance the activation of p53 in response to genotoxic stress (Gozani *et al*, 2003; Pedeux *et al*, 2005). Furthermore, ING2 has been involved in DNA repair pathways in response to ultraviolet irradiation (Wang *et al*, 2006). Most of the previous studies examining the role of ING2 in cellular processes have resulted from overexpression experiments. In this study, as ING2 is lost in many human tumour types, we investigated the consequences of its downregulation. Using this strategy, we characterized a new function for ING2 in the control of DNA replication and in the maintenance of genome stability. These results suggest, for the first time to our knowledge, that ING2 might act as a caretaker tumour suppressor gene by directly protecting DNA integrity, particularly during normal replication of the genome.

## RESULTS AND DISCUSSION ING2 ensures normal DNA synthesis

To identify the effects of ING2 downregulation on global S-phase, asynchronous populations of cells transfected with either a small interfering RNA control (siCT) or a small interfering RNA (siRNA) directed against ING2 (siING2#1) were analysed for bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation. The efficiency of ING2 knockdown was assessed by western blotting (data not shown). In comparison with control cells, S-phase cells, downregulated for *ING2*, showed a deficiency in BrdU incorporation, as indicated by a flattened horseshoe when analysed by fluorescence-activated cell sorting (FACS; Fig 1A). This phenotype was confirmed with a siRNA directed against another part of ING2 (siING2#2, supplementary Fig S1A online) and was also observed in normal human telomerase reverse transcriptase (hTERT)-immortalized MRC5 cells (data not shown). Thus, a population of cells in S-phase incorporated more BrdU in the control cells than in the absence of ING2. ING2 has high homology with ING1 and it has been suggested that they might have redundant functions (He *et al*, 2005). However, the deficiency of BrdU incorporation was not observed in siING1 cells (supplementary Fig S1C,D online), showing that ING1 is not involved in the regulation of BrdU incorporation during S-phase. To determine whether the

<sup>1</sup>Molecular Bases of Lung Cancer Progression, INSERM U823, Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, Grenoble, 38706 Cedex, France

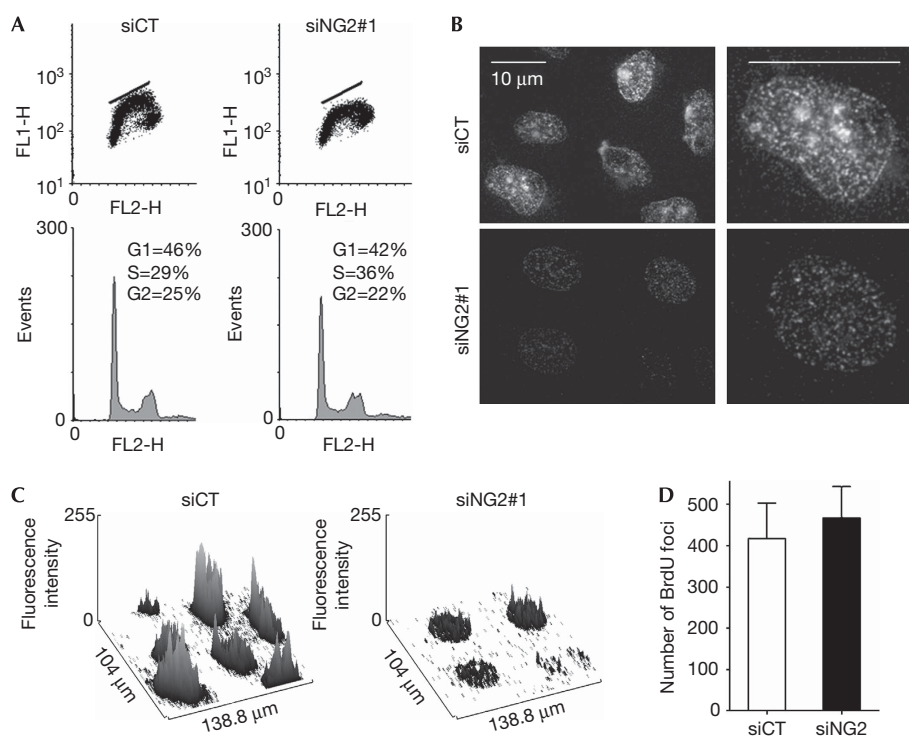
<sup>2</sup>National Institute of Immunology, Aruna Asaf Ali Marg, New Delhi 110067, India

<sup>3</sup>INSERM U917, IFR140, Faculté de Médecine, Université de Rennes 1, 35043 Rennes Cedex, France

+Corresponding author. Tel: +33 (0) 4 7654 9464; Fax: +33 (0) 4 7654 9413;

E-mail: remy.pedeux@ujf-grenoble.fr

Received 6 March 2009; revised 1 July 2009; accepted 2 July 2009;  
published online 4 September 2009



**Fig 1** | ING2 ensures normal DNA synthesis. U2OS cells were transfected with siCT or siING2. (A) FACS analysis showing BrdU incorporation. (B) Representative immunofluorescence images of BrdU incorporation. Pictures were acquired with the same exposure time. (C) Graphic ImageJ (NIH) representation of BrdU intensity measured for immunostained cells shown in (B). (D) Number of replication foci per nucleus counted on 10 nuclei for each condition. BrdU, bromodeoxyuridine; FACS, fluorescence-activated cell sorting; ING2, inhibitor of growth 2; siCT, small interfering RNA control.

downregulation of ING2 affects the spatial organization and the activation of replication sites at the single-cell level, microscopic observations of cells immunostained with BrdU were carried out. This experiment again showed low BrdU incorporation in the nuclei of cells downregulated for ING2 using both siRNAs, as observed by a significant decrease of the staining intensity (Fig 1B,C; supplementary Fig S1A,B online). However, the number of replication foci was the same in siCT and siING2 cells (Fig 1D). Within each focus, many replication forks are activated. Hence, we hypothesized that the deficiency of BrdU incorporation was not due to a defect in the establishment and activation of replication foci but might be due to a slowdown of the progression of the replication fork within each active focus.

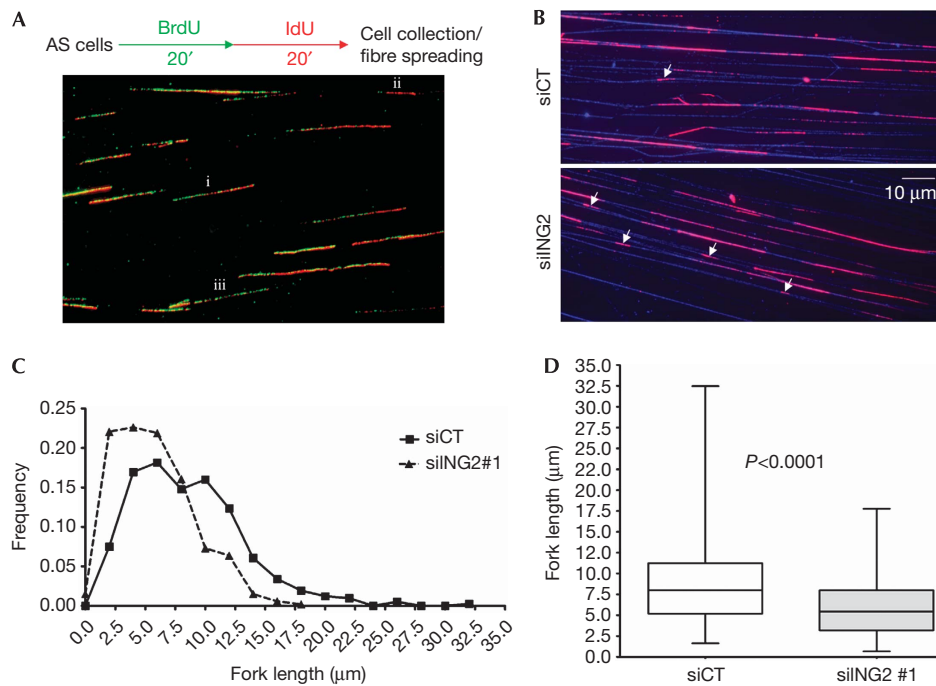
### ING2 controls replication progression rate

To investigate the speed of replication forks, we carried out a DNA fibre spreading experiment (Fig 2) and studied the function of ING2 on global replication fork progression rate during an ‘unperturbed’ S-phase. The experiment was carried out on asynchronous cells (Fig 2A). The progression of the replication forks was visualized by sequential incorporation of BrdU and iododeoxyuridine (IdU, red) in siCT- and siING2-transfected cells (Fig 2A). DNA fibres were spread onto microscopic slides, and BrdU- and IdU-positive DNA fibres were visualized microscopically (green and red tracks, Fig 2A). The double BrdU and IdU staining allowed us to distinguish between (i) ongoing forks appearing as double-labelled tracks, (ii) newly initiated forks appearing as red-only tracks, and (iii) terminated forks appearing

as green-only tracks. Thus, to calculate specifically the speed of the elongation of DNA replication, we measured the length of the IdU tracks (red tracks, Fig 2B) on double-labelled forks only. Single-strand DNA fibres were also immunostained (blue fibres, Fig 2B) to avoid the measure of aborted red tracks, which might appear because of broken fibres. Unlike control cells, siING2 cells showed a high proportion of very short IdU tracks (Fig 2B; supplementary Fig S2A online, white arrows), reflecting slowly progressing replication forks. Fork length re-partition clearly showed that most siING2 cells had shorter replication forks when compared with control cells, with many forks progressing very slowly (Fig 2C; supplementary Fig S2B online). Slow fork progression might result in a longer S-phase. Accordingly, U2OS and hTERT MRC5 siING2 cells proliferate more slowly (supplementary Fig S5A online). Global replication fork speed—determined by measuring more than 500 forks for each condition—was reduced from 20% (siING2#1, Fig 2D) to 30% (siING2#2, supplementary Fig 2SC online) when compared with the control ( $P < 0.0001$ ). Overall, these experiments indicate that ING2 is required to ensure normal progression of replication forks, suggesting a role in the elongation process.

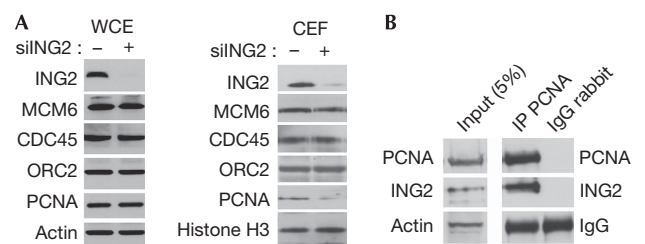
### ING2 interacts with PCNA

A decrease in the speed of the replication fork prompted us to study whether ING2 regulates proteins of the replication machinery. Indeed, DNA replication is a multi-step process, requiring efficient coordination between DNA unwinding and DNA synthesis. The synchronization of these events is crucial to maintain normal



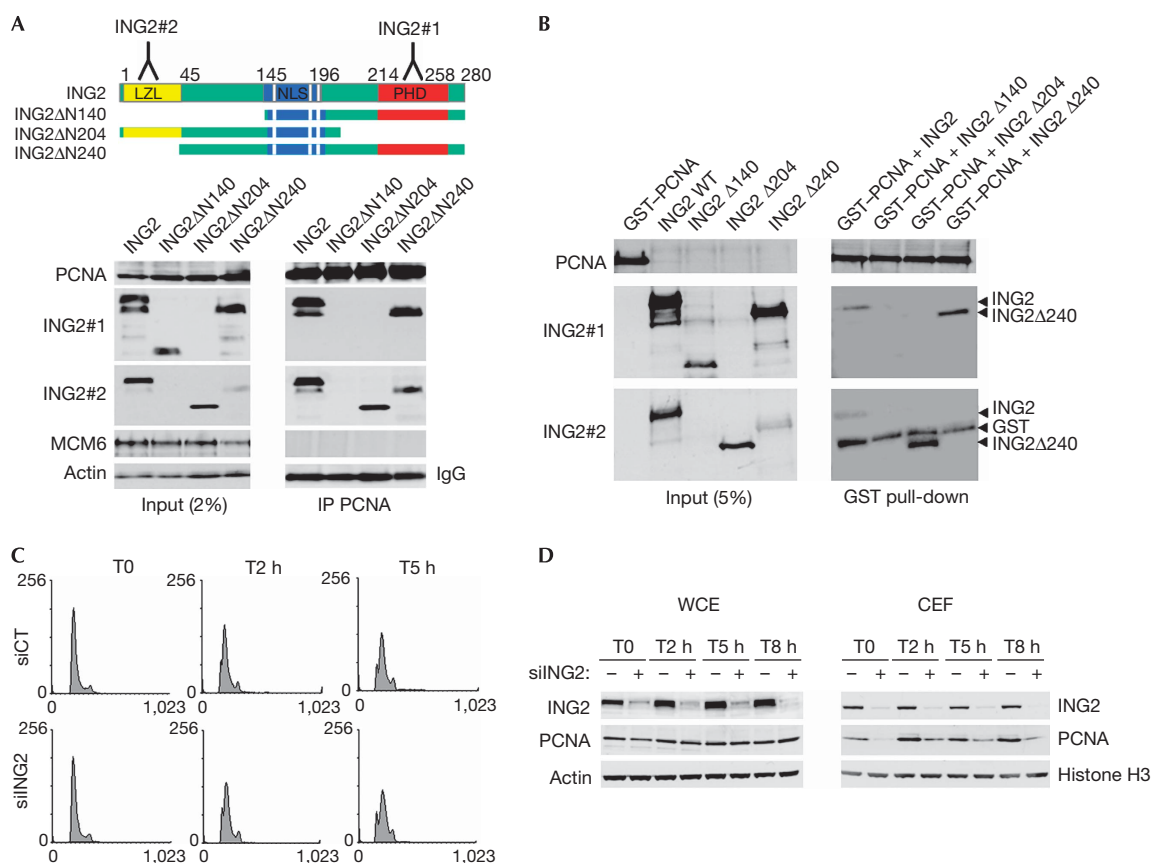
**Fig 2** | ING2 controls the progression of the replication fork. (A) U2OS cells transfected with siCT or siING2 were pulsed sequentially with BrdU and IdU, as shown in the experimental protocol. DNA fibres were spread onto microscopic slides (Jackson & Pombo, 1998) and immunostained with antibodies recognizing BrdU or IdU to distinguish between (i) ongoing forks, (ii) newly initiated forks, and (iii) terminated forks. (B) Representative immunofluorescence images showing IdU-positive tracks (pink) on DNA fibres (blue). White arrows indicate short IdU-positive tracks. (C) Fork length re-partition measured in micrometres ( $\mu\text{m}$ ) using ImageJ software (NIH) for siCT ( $n = 520$ ) and siING2#1 ( $n = 601$ ). (D) Boxplots represent interquartile ranges and extreme values of fork lengths for siCT and siING2. Horizontal bar denotes the median. The  $P$ -value was measured using analysis of a variance test followed by a Mann-Whitney test. AS, asynchronous; BrdU, bromodeoxyuridine; IdU, iododeoxyuridine; ING2, inhibitor of growth 2; siCT, small interfering RNA control.

replication rate and subsequent genome stability. The firing of new replication forks requires the regulated loading of many proteins. In early G1-phase, the mini chromosome maintenance 2–7 (MCM2–7) helicase complex binds to the origin recognition complex proteins at the replication forks (Bell & Dutta, 2002). The MCM proteins are assembled in the pre-replicative complex and are required for DNA unwinding. CDC45 protein is then recruited to the pre-replicative complex during the G1–S transition to initiate DNA replication (Pacek *et al*, 2006). The processing of DNA synthesis at these forks then requires the loading of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), which acts during elongation until the end of S-phase by increasing the processivity of DNA polymerases (Hao *et al*, 2008). The level of these proteins was assessed by western blotting in siCT- or siING2-transfected cells in the whole-cell extract and in the chromatin-enriched fraction (CEF; Fig 3A; supplementary Fig S3A online). In the whole-cell extract, the amount of these proteins was not altered after *ING2* downregulation (Fig 3A). In the CEF, the same amount of MCM6, CDC45 and origin recognition complex 2 proteins was present in control or in siING2-transfected cells (CEF, Fig 3A). By contrast, we saw a marked decrease in the chromatin-bound fraction of PCNA in cells downregulated for *ING2*, also apparent by immunofluorescence (supplementary Fig S3C online). Similar results were obtained in normal human fibroblasts (supplementary Fig S3B online). This is in accordance with the known ability of ING2 in recruiting or regulating proteins such as SIN3A–HDAC1



**Fig 3** | ING2 interacts with PCNA. (A) Western blotting analysis of the WCE or the CEF proteins in U2OS cells. Actin and histone H3 were used as loading controls. (B) Immunoprecipitation (IP) of endogenous PCNA. Actin and IgG were used as the loading control. CEF, chromatin-enriched fraction; ING2, inhibitor of growth 2; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; WCE, whole-cell extract.

to the chromatin (Shi *et al*, 2006). To investigate whether the regulation of PCNA by ING2 could occur through an interaction between the two proteins, we carried out an immunoprecipitation experiment. Indeed, we found that PCNA co-immunoprecipitated endogenous ING2 (Fig 3B). The use of different truncated forms of ING2, transfected in the cells, showed that the region located between the leucine zipper-like motif and the nuclear localization sequence domains of ING2 is required for PCNA binding (Fig 4A). The interaction between PCNA and ING2 was confirmed *in vitro*

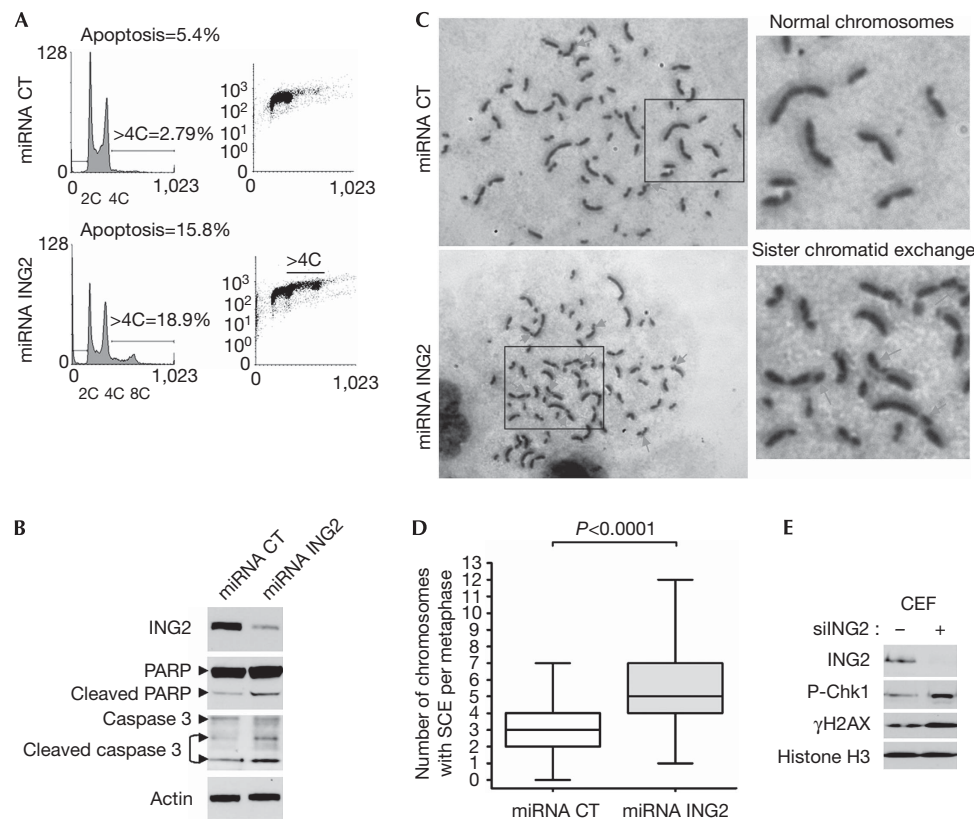


**Fig 4** | ING2 regulates the amount of PCNA in the chromatin fraction. (A) PCNA was immunoprecipitated in U2OS cells transfected with the truncated forms of ING2 (top panel). The proteins were detected using the indicated antibodies. MCM6 was used as a negative control of the IP. (B) GST pull-down experiment of recombinant GST-PCNA with ING2 *in vitro* translated constructs. Actin and IgG were used as loading controls for the Input and the IP, respectively. (C) Cells were collected from early (T0) to the end (T8 h) of S-phase. (D) The total expression of ING2 and PCNA was assessed in WCE. In parallel, the chromatin-bound proteins were detected in CEF. CEF, chromatin-enriched fraction; GST, glutathione S-transferase; ING2, inhibitor of growth 2; IP, immunoprecipitation; MCM6, mini chromosome maintenance 6; PCNA, proliferating cell nuclear antigen, WCE, whole-cell extract.

by a glutathione S-transferase pull-down experiment using recombinant proteins (Fig 4B). It is interesting to point out that ING1 has been previously described as interacting with PCNA. However, this interaction was only seen in response to the stress induced by ultraviolet irradiation and was involved in DNA repair pathways (Scott *et al*, 2001). Furthermore, ING1 interacts with PCNA through a PCNA-interacting protein motif, whereas ING2 seems to interact with PCNA through another motif—as is the case for the protein GADD45, for example (Vairapandi *et al*, 2000)—which has very low homology with ING1 (He *et al*, 2005). This suggests that the ING1-PCNA and ING2-PCNA interactions have different roles in the cells. The ING2-PCNA interaction would occur during normal DNA synthesis to regulate the amount of PCNA chromatin, enhancing elongation complex processivity, whereas ING1 might interact with PCNA in response to DNA damage. This is in accordance with our observation that siING1 cells show a normal rate of BrdU incorporation, compared with that in siING2 cells (supplementary Fig S1 online). However, this does not rule out the possibility that the ING2-PCNA interaction might also have a function in DNA repair.

### ING2 regulates the amount of PCNA to the chromatin

ING2 might be important for the presence of PCNA in the chromatin fraction when the elongation complex is assembling in early S-phase or, alternatively, ING2 might intervene later during S-phase progression to stabilize PCNA at the chromatin until replication is complete. To distinguish between these two possibilities, cells transfected with siCT or siING2 were synchronized in G1-S-phase and collected for 8 h during S-phase progression (T0-T8 h), as previously established (supplementary Fig S4A online). FACS analysis confirmed that siCT and siING2 cells entered the cell cycle with the same kinetics (Fig 4C), and presented the same amount of replication protein A (a single-strand DNA binding protein) to the CEF (data not shown), suggesting that initiation might occur properly in siING2 cells. However, siCT cells reached late S-phase slightly faster than siING2 cells, showing that completion of DNA synthesis is delayed by ING2 downregulation (supplementary Fig S4B online). The expression of ING2 and PCNA was assessed by western blot in the whole-cell extract and in the CEF (Fig 4D). In the whole-cell extract, we observed that ING2 downregulation had no consequence on the overall amount of



**Fig 5** | ING2 protects DNA integrity. Stable U2OS clones were established using miRNA. (A) Propidium iodide (left panels) and BrdU incorporation (right panels) were analysed by FACS to detect genome instability (>4C cells), endoreduplication (8C cells) and apoptosis (sub-G1 population). (B) Western blot analysis of caspase 3 and PARP in miRNA cells shown in (A). (C) Representative images of SCEs assessed in BrdU-labelled, giemsa-stained chromosome spreads from miRNA CT and miRNA ING2 cells. (D) At least 45 metaphases were counted for each condition and the number of SCE was normalized to the number of chromosomes per metaphase. The boxplots represent interquartile ranges and extreme values of SCEs per cell. The horizontal bars denote the median. The  $P$ -value was measured using an analysis of variance test followed by a Mann-Whitney  $U$ -test. (E) Western blot analysis of  $\gamma$ H2AX and phospho-Chk1 (P-Chk1) in the CEF in siCT and siING2 cells. Histone H3 was used as a loading control. BrdU, bromodeoxyuridine; FACS, fluorescence-activated cell sorting; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; miRNA, microRNA; SCE, sister chromatid exchange; siCT, small interfering RNA control.

PCNA, regardless of S-phase progression. In the CEF of siCT cells, a small amount of PCNA was present in the chromatin at T0. At 2 h after G1/S release, when cells entered S-phase, the amount of PCNA to the chromatin had markedly increased and remained high and stable throughout S-phase progression (from T2 h to T8 h). By contrast, in siING2 cells the amount of PCNA in the CEF was barely detectable at T0. At T2 h, the amount of PCNA increased but remained markedly lower throughout S-phase until T8 h. These results show that ING2 regulates the amount of PCNA to the chromatin fraction from the moment the elongation complex forms at the chromatin until replication is complete. Altogether, these data show that the downregulation of ING2 leading to the decrease of chromatin-bound PCNA during S-phase progression is associated with a defect in the elongation process. To exclude any function of ING2 in the initiation process, further investigations are necessary to determine whether siING2 cells would present the same density of active forks as do control cells.

### ING2 maintains genome stability

PCNA has been shown previously to be involved in normal S-phase progression and in the maintenance of genome stability (Nedelcheva-Velleva *et al*, 2006; Urtishak *et al*, 2009). To determine the consequences of the deregulated replication observed in siING2 cells after several rounds of DNA replication, we established stable clones downregulated for ING2. The cell-cycle profiles of three different stable U2OS clones maintained in culture for two weeks were assessed and the representative cell-cycle profile of one clone is presented in Fig 5A (micro RNA (miRNA) ING2). FACS analysis of propidium iodide (left panel) and BrdU incorporation (right panel) clearly showed that the downregulation of Ing2 (see western blot, Fig 5B) markedly increased the percentage of cells with more than 4C in DNA content to almost 20% compared with only 3% in miRNA CT cells. More specifically, we detected a distinct population of 8C cells, which are indicators of genome endoreduplication. Endoreduplication of the genome can initiate chromosomal aberrations.

This was assessed by a sister chromatid exchange (SCE) experiment (Fig 5C), showing an increase in the number of SCE counted per metaphase in miRNA ING2 cells with a mean of 5.4 SCE per cell compared with a mean of 2.9 SCE per cell in miRNA CT cells (Fig 5C,D). Furthermore, this genome instability can generate DNA double-strand breaks. Indeed, in siING2 cells, we detected an increase of H2AX phosphorylation (Fig 5E), a marker of DNA double-strand breaks (Bonner *et al*, 2008), as well as the activation of the DNA damage checkpoint Chk1, seen by its phosphorylation. Activation of DNA damage checkpoint pathways can drive cells into apoptosis or senescence, which are two mechanisms that protect cells against neoplastic transformation; FACS analysis showed that nearly 16% of cells downregulated for ING2 underwent apoptosis (Fig 5A), and western blotting revealed the cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase and caspase 3 (Fig 5B). This 10% increase of cells undergoing apoptosis might account, in part, for the 30% decrease in proliferation (supplementary Fig S5A online). Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase assay showed that the occurrence of senescence was almost double in these cells compared with control cells (supplementary Fig S5B online), as previously described for another cell line downregulated for ING2 (Kumamoto *et al*, 2008). Thus, ING2 downregulation enhances genome instability.

Our study shows, for the first time to our knowledge, that loss of ING2, which occurs in human tumours, results in an impaired DNA replication process and increased genome instability. Thus, ING2 could function as a caretaker tumour suppressor protein to prevent tumorigenesis. A previous study of ING5 has shown its interaction with the MCM helicase complex (Doyon *et al*, 2006), suggesting a potential model in which ING5 would be involved in DNA unwinding, whereas ING2 would simultaneously enhance the processivity of the elongation complex in association with PCNA. As each ING protein associates with a specific histone acetyltransferase or HDAC complex, we can hypothesize that different ING proteins in complex with various histone acetyltransferases and HDACs might be required at different steps during the initiation and progression of DNA replication.

## METHODS

**Cell lines.** U2OS osteosarcoma cells and hTERT MRC5 normal lung fibroblasts were used.

**RNA-mediated interference.** Stealth RNA-mediated interference (RNAi) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used for ING2 downregulation (siING2). The universal RNAi negative control (#12935-110, Invitrogen) was used (siCT). Transfections were carried out using lipofectAMINE RNAimax (#13778-075, Invitrogen). For stable clones downregulated for ING2, we used the BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (# K4936-00, Invitrogen). The miRNA duplex was inserted into the pcDNA 6.2-GW miR. Stable transfected clones were selected by the addition of 5 mg/ml of blasticidin to the culture medium.

**Western blotting of chromatin-enriched fraction.** Nuclear fraction was isolated using the NE-PER kit (#78833, Pierce, Rockford, IL, USA). The CEF was then isolated by re-suspending cell nuclei in an ice-cold hypotonic buffer (3 mM EDTA, 0.2 mM EGTA and 1 mM DTT (pH 7.85) with protease inhibitor cocktail). Soluble fraction was removed and the pellet (CEF) was washed twice in the hypotonic buffer. The CEF was re-suspended and sonicated in a sonication buffer (10 mM Tris, 10% sucrose, 10 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7.4) with protease inhibitor cocktail).

**DNA fibre spreading.** Asynchronous cells were pulsed sequentially with 100  $\mu$ M BrdU (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA) and 100  $\mu$ M IdU (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) for 20 min each. Cells were collected and DNA fibres were spread onto microscope slides as described by Jackson & Pombo (1998).

**Immunofluorescence staining.** Immunofluorescences were carried out as described previously by Sengupta *et al* (2003). An Axiolmager Apotome (Zeiss, Germany) microscope was used.

**Sister chromatid exchange experiment.** SCE was carried out on stable U2OS clones as described previously by Perry & Wolff (1974). At least 45 metaphases were counted for each condition.

**Supplementary information** is available at *EMBO reports* online (<http://www.emboreports.org>).

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank O. Gozani for providing the ING2 antibody and T. Gostan (Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier) for the fibre spreading analysis using the IDeFlx software. This study was supported by the International Association for the Study of Lung Cancer, an 'Agir à dom' grant and a Marie Curie International Reintegration Grant (MIRG-CT-2006-042148) (RP); DL, DY and RB are funded by the French Ministry of Education and Research, Institut National du Cancer and Fondation pour la Recherche Médicale, respectively. SS was supported by National Institute of Immunology core funds and the National Institutes of Health (BT/PR5936/BRB/10/408/2005).

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

## REFERENCES

- Bell SP, Dutta A (2002) DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **71**: 333–374
- Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y (2008) GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* **8**: 957–967
- Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, Landry AJ, Cote V, Selleck W, Lane WS, Tan S, Yang XJ, Cote J (2006) ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell* **21**: 51–64
- Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A, Riabowol K (1996) Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* **14**: 415–420
- Gozani O *et al* (2003) The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* **114**: 99–111
- Hao H, Xin T, Nancai Y, Yanxia W, Qian L, Wei M, Yandong Y, Hanju H (2008) Short-interfering RNA-mediated silencing of proliferating cell nuclear antigen inhibit proliferation and induce apoptosis in HeLa cells. *Int J Gynecol Cancer* **18**: 36–42
- He GH, Helbing CC, Wagner MJ, Sensen CW, Riabowol K (2005) Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins. *Mol Biol Evol* **22**: 104–116
- Jackson DA, Pombo A (1998) Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *J Cell Biol* **140**: 1285–1295
- Kumamoto K, Spillare EA, Fujita K, Horikawa I, Yamashita T, Appella E, Nagashima M, Takenoshita S, Yokota J, Harris CC (2008) Nutlin-3a activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate mir-34a, mir-34b, and mir-34c expression, and induce senescence. *Cancer Res* **68**: 3193–3203
- Nedelcheva-Velleva MN, Krastev DB, Stoynov SS (2006) Coordination of DNA synthesis and replicative unwinding by the S-phase checkpoint pathways. *Nucleic Acids Res* **34**: 4138–4146
- Pacek M, Tutter AV, Kubota Y, Takisawa H, Walter JC (2006) Localization of MCM2-7, Cdc45, and GINS to the site of DNA unwinding during eukaryotic DNA replication. *Mol Cell* **21**: 581–587



- Pedoux R *et al* (2005) ING2 regulates the onset of replicative senescence by induction of p300-dependent p53 acetylation. *Mol Cell Biol* **25**: 6639–6648
- Perry P, Wolff S (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* **251**: 156–158
- Sarker KP, Kataoka H, Chan A, Netherton SJ, Pot I, Huynh MA, Feng X, Bonni A, Riabowol K, Bonni S (2008) ING2 as a novel mediator of transforming growth factor-beta-dependent responses in epithelial cells. *J Biol Chem* **283**: 13269–13279
- Scott M, Bonnefin P, Vieyra D, Boisvert FM, Young D, Bazett-Jones DP, Riabowol K (2001) UV-induced binding of ING1 to PCNA regulates the induction of apoptosis. *J Cell Sci* **114**: 3455–3462
- Sengupta S *et al* (2003) BLM helicase-dependent transport of p53 to sites of stalled DNA replication forks modulates homologous recombination. *EMBO J* **22**: 1210–1222
- Shi X *et al* (2006) ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* **442**: 96–99
- Urtishak KA, Smith KD, Chanoux RA, Greenberg RA, Johnson FB, Brown EJ (2009) Timeless maintains genomic stability and suppresses sister chromatid exchange during unperturbed DNA replication. *J Biol Chem* **284**: 8777–8785
- Vairapandi M, Azam N, Balliet AG, Hoffman B, Liebermann DA (2000) Characterization of MyD118, Gadd45, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacting domains. PCNA impedes MyD118 AND Gadd45-mediated negative growth control. *J Biol Chem* **275**: 16810–16819
- Wang J, Chin MY, Li G (2006) The novel tumor suppressor p33ING2 enhances nucleotide excision repair via inducement of histone H4 acetylation and chromatin relaxation. *Cancer Res* **66**: 1906–1911
- Ythier D, Larrieu D, Brambilla C, Brambilla E, Pedoux R (2008) The new tumor suppressor genes ING: genomic structure and status in cancer. *Int J Cancer* **123**: 1483–1490

## Discussion

En France, le nombre total de décès dus aux cancers était de 152 708 en 2006, soit environ 241 décès pour 100 000 habitants. Cette proportion hisse les cancers à la première place des causes de mortalité dues aux pathologies, juste avant les maladies cardiovasculaires (147 323 décès en 2004 en France). Si l'on prend pour exemple le cancer du poumon, qui a fait l'objet d'une partie de mon travail de thèse, il est la principale cause de décès par cancer dans le monde. En effet, celui-ci cause plus de décès que les cancers du sein, du colon et de la prostate réunis et le taux de survie à 5 ans est inférieur à 15% (Greenlee et al., 2000). Ce très mauvais pronostic est étroitement lié au fait que les patients, lorsqu'ils sont diagnostiqués, sont à un stade trop avancé de la pathologie pour qu'ils soient opérables. D'où la nécessité de caractériser les mécanismes conduisant à la cancérogénèse, afin d'identifier des biomarqueurs moléculaires pour améliorer la détection précoce et d'établir des thérapeutiques ciblées.

Il est maintenant communément admis que l'émergence de cancers résulte d'une accumulation séquentielle, sur une période relativement longue, d'anomalies génomiques qui dérèglent par étapes successives les mécanismes de contrôle de la prolifération cellulaire. Ces anomalies sont la conséquence d'une instabilité génomique qui se traduit par des mutations à l'échelle nucléotidique, par des modifications épigénétiques aberrantes (hypo ou hyper-acétylation des histones, hypo ou hyper-méthylation des histones et des îlots CpG, expression aberrante de micro ARN) à l'échelle de la chromatine, et par des anomalies qualitatives (translocations, délétions) ou quantitative (amplification génique, polyploïdie, aneuploïdie,...) à l'échelle chromosomique. Ces anomalies vont contribuer à l'activation de gènes promouvant la prolifération cellulaire : les oncogènes. Elles vont également contribuer à l'inactivation, d'une part, de gènes réprimant la croissance cellulaire : les gènes suppresseurs de tumeurs de type II ou « gatekeepers », et d'autre part, de gènes impliqués dans le maintien de la stabilité du génome (gènes de détoxification des agents mutagènes, gènes de la réparation et de la réplication de l'ADN,..): les gènes suppresseurs de tumeurs de type I ou « Caretakers ».

Lorsque je suis arrivé au laboratoire, la famille des gènes ING avait récemment été mise en évidence. L'étude de leur statut dans les cancers et de leurs fonctions suggérait qu'ils pourraient agir comme des gènes suppresseurs de tumeurs. Ainsi, partant de ces notions, mes travaux de thèse ont permis de préciser le rôle de gène suppresseur de tumeurs de l'un des membres de cette famille : le gène ING2.

## **1. Rôle d'ING2 dans les pathologies cancéreuses.**

Au commencement de ce projet, un grand nombre d'études avait montré que l'expression d'ING1 est fréquemment perdue dans une variété de cancers. Toutes ces études ont montré que dans la grande majorité des cas la perte d'ING1 a lieu au niveau ARN et que la protéine ING1 est très rarement mutée dans les tumeurs (Ythier et al., 2008). En revanche, aucune information sur le statut d'ING2 dans les cancers n'était disponible. Etant donné la forte homologie existante entre ING1 et ING2, nous avons émis l'hypothèse qu'ING2 pourrait également être perdue dans les tumeurs. Nous avons donc étudié son statut dans les tumeurs pulmonaires.

### **1.1. Statut de la protéine ING2 dans les tumeurs.**

Le marquage immunohistochimique (IHC) d'ING2 de 120 tumeurs bronchiques montre que son expression est perdue dans 58% des cas. La mise en relation de cette perte d'expression avec les données clinicopathologiques des patients montre que l'expression d'ING2 est déjà perdue dans 56% des tumeurs de stade I, mais qu'il n'existe aucun lien significatif entre la perte d'expression d'ING2 et le stade des tumeurs ou la survie des patients à 5 ans. Ces résultats suggèrent donc que la perte d'expression d'ING2 est un événement précoce et qu'ING2 serait donc impliquée plutôt dans l'initiation que dans la

progression tumorale. L'étude du statut d'ING2 dans des lésions pulmonaires préneoplasiques permettrait de clarifier cette hypothèse. Une étude récemment réalisée sur des mélanomes suggère également que l'inactivation d'ING2 est un événement précoce (Lu et al., 2006). En effet, les auteurs de cette étude montrent que l'expression nucléaire d'ING2 est perdue dès les premiers stades tumoraux et qu'il n'existe aucune corrélation entre cette perte d'expression nucléaire et les données clinicopathologiques des patients, comme la progression des tumeurs ou la survie des patients.

Au cours de ma thèse, nous avons montré que l'inhibition de l'expression d'ING2 conduit à une forte instabilité génomique, illustrée par l'apparition d'endoréduplication et d'échanges entre chromatides sœurs. D'autre part, ING2 a récemment été montrée comme impliquée dans les processus de réparation de l'ADN suite à une exposition au rayonnement UV (Wang et al., 2006a; Wang et al., 2006b). Le maintien de la stabilité du génome et la réparation de l'ADN sont étroitement impliqués dans les étapes précoces de la cancérogénèse en prévenant l'accumulation des altérations génétiques qui mènent à l'émergence des cancers. Ainsi, l'implication d'ING2 dans ces deux fonctions conforte l'hypothèse d'un rôle d'ING2 dans les événements précoces de la tumorigénèse.

## **1.2. Mécanisme d'inactivation d'ING2 dans les tumeurs.**

Puisque nous avons observé une perte de l'expression protéique d'ING2 dans les NSCLC, nous avons ensuite recherché les mécanismes qui en sont à l'origine. Comme Okano et ses collaborateurs l'avaient déjà observé dans une série d'une trentaine de tumeurs pulmonaires, nous n'avons pas non plus identifié de mutation dans les deux exons du gène ING2 (Okano et al., 2006). Ce résultat indique que la perte d'expression d'ING2 ne résulte pas de mutations qui auraient pu par exemple occasionner l'apparition d'un codon non-sens ou d'un décalage de lecture. De plus, ce résultat est en accord avec les nombreuses études montrant que les protéines ING sont rarement mutées dans les cancers. Néanmoins, on ne peut pas exclure la présence de mutations dans les régions introniques ou promotrices du

gène ING2, qui pourraient, par exemple, affecter la régulation de l'expression et/ou l'épissage. Le séquençage de ces vastes régions permettrait de clarifier cette hypothèse.

Puisque les études portant sur le statut des protéines ING dans les tumeurs ont montré que leur fréquente perte d'expression résulte en majorité d'une perte d'expression de leur ARNm, nous avons donc analysé le niveau d'expression de l'ARNm d'ING2 dans 22 tumeurs. Nos résultats montrent une très bonne corrélation entre le niveau d'expression de l'ARNm d'ING2 et de la protéine ING2, indiquant donc que dans les NSCLC, lorsque l'expression d'ING2 est perdue, cette perte a principalement lieu au niveau ARN. De plus, nos résultats montrent que cette perte d'expression ne résulte ni d'une délétion du gène ING2 ni d'une hyperméthylation de sa région promotrice suggérant que la perte d'expression d'ING2 résulte d'un autre mécanisme.

Récemment, une étude a montré que l'expression d'ING2 peut être régulée par p53. En effet, deux sites de liaison à p53 ont été identifiés dans la région promotrice du gène ING2 et il a été montré que p53 réprime l'expression de gènes rapporteurs clonés sous le contrôle de la région promotrice d'ING2 (Kumamoto et al., 2008). Dans notre étude, nous montrons qu'il n'existe aucune corrélation entre les statuts IHC d'ING2 et de p53. Ces résultats indiquent donc que p53 n'est pas responsable de la perte d'expression de l'ARNm d'ING2 dans les NSCLC. De plus, ces résultats suggèrent que les mécanismes par lesquels ING2 participe à la cancinogénèse bronchique sont indépendants de p53. Cette observation semble donc en contradiction avec plusieurs études reposant sur des modèles de surexpression qui montrent qu'une partie des fonctions de la protéine ING2, notamment dans le contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose ou de la sénescence, sont dépendantes de p53 (Gozani et al., 2003; Nagashima et al., 2001; Pedoux et al., 2005). Cependant de récentes études réalisées sur des souris dont le gène ING1 a été invalidé (ING1 KO) suggèrent qu'*in vivo*, et dans des conditions où les ING sont inactivées, comme cela est observé dans les tumeurs, leurs fonctions sont principalement indépendantes de p53. Ces résultats en apparence contradictoires sont discutés dans la deuxième partie de la discussion (Partie 2.1).

Ainsi, trois hypothèses principales peuvent être faites quant au mécanisme à l'origine de la perte d'expression d'ING2 dans les NSCLC. Premièrement cette perte pourrait résulter d'une dérégulation d'un facteur de transcription responsable de l'expression d'ING2. Si de

futures études identifient un tel facteur, il sera alors possible de déterminer s'il existe une relation entre le statut de ce dernier et le statut d'ING2. Deuxièmement, la perte d'expression d'ING2 pourrait résulter de modifications épigénétiques aberrantes du gène ING2, maintenant la chromatine dans un état condensé et donc transcriptionnellement inactif. Enfin troisièmement, il a été montré que dans les cancers du poumon, l'expression d'un grand nombre de micro ARN (miRNA) est dérégulée (Yanaihara et al., 2006). Ainsi, la perte d'expression d'ING2 pourrait résulter d'une dérégulation de l'expression de miARN ciblant l'ARNm d'ING2.

## **2. Mise en évidence du rôle de gène suppresseur de tumeurs d'ING2 en tant que « Caretaker ».**

### **2.1. ING2 est nécessaire au maintien de l'intégrité du génome.**

Nous avons montré que l'inhibition prolongée de l'expression d'ING2 conduit à une forte augmentation de l'instabilité du génome, illustrée par l'apparition d'une population de cellules ayant un contenu 8N d'ADN, caractéristique d'une endoreduplication, et par l'augmentation du taux d'échange entre chromatides sœurs. Ce résultat est particulièrement intéressant puisque toutes les études réalisées jusqu'alors ont mis en évidence des fonctions d'ING2 en tant que gène suppresseur de tumeurs de type « Gatekeeper », et surtout ces fonctions ont été identifiées suite à une surexpression d'ING2 et en réponse à un stress. Or notre étude montre un rôle d'ING2 en tant que gène suppresseur de tumeurs de type « Caretaker » et cela par des expériences d'inhibition de son expression, comme cela est observé dans les cancers, et en absence de stress exogène. Ainsi, cette nouvelle fonction d'ING2 permet, au moins en partie, d'expliquer pour la première fois comment l'inactivation des ING, et plus particulièrement ING2, observée dans les tumeurs pourrait participer à l'émergence de tumeurs.

Récemment, une étude a montré que l'inhibition de l'expression d'ING2 conduisait à une augmentation du nombre de cellules entrant en sénescence et en apoptose. Cependant, les mécanismes par lesquels l'inhibition de l'expression d'ING2 induit ces deux réponses n'ont pas été déterminés (Kumamoto et al., 2008). Cette étude semble donc indiquer qu'ING2 prévient l'entrée des cellules en sénescence et en apoptose, et semble donc en parfaite contradiction avec ce qui était connu jusqu'alors sur ING2, puisque une augmentation de son expression induit également le même phénotype (Nagashima et al., 2001; Pedoux et al., 2005). L'étude de Kumamoto et ses collaborateurs suggérait donc que toutes les études antérieures réalisées sur les protéines ING dans des conditions de surexpression, ne seraient pas représentatives des conditions observées *in vivo* puisque l'expression des gènes ING est fréquemment perdue dans les tumeurs (Ythier et al., 2008).

L'instabilité génomique peut générer des cassures double brins (DSB) qui par voie de conséquence vont activer les points de contrôle des dommages de l'ADN. Dans ce contexte, nos résultats montrent que l'inhibition de l'expression d'ING2 est accompagnée d'une augmentation de la phosphorylation de H2AX qui est un marqueur de la présence de DSB (Bonner et al., 2008). En accord avec une activation des points de contrôle des dommages de l'ADN, lorsque l'expression d'ING2 est inhibée, nous montrons une augmentation de la phosphorylation de Chk1 ainsi que du taux d'apoptose et une augmentation du nombre de cellules entrant en sénescence. Ces résultats confirment donc ceux de Kumamoto et ses collaborateurs. Nous montrons de plus que l'augmentation du nombre de cellules entrant en sénescence ou en apoptose suite à la répression d'ING2 pourrait résulter de l'instabilité génomique elle-même occasionnée par la répression d'ING2. Ainsi, l'induction d'apoptose et de sénescence observée ne serait qu'une conséquence secondaire de l'instabilité génomique occasionnée par l'inhibition d'ING2. Toutes ces données suggèrent donc qu'ING2 serait impliquée dans plusieurs voies de signalisation qui ne seraient pas affectées de la même manière suivant le niveau auquel ING2 est exprimée. En effet, en conditions normales de croissance cellulaire, ING2 jouerait son rôle dans le bon déroulement de la réplication et de ce fait préviendrait l'apparition d'instabilité génomique. En conditions de stress, ING2 activerait des voies de réponse à ces stress, comme par exemple celle du gène suppresseur de tumeurs p53 pour réprimer la prolifération cellulaire et ainsi prévenir la transformation cellulaire. En conséquence, dans les cancers la perte d'expression d'ING2 serait doublement

impliquée dans les processus de transformation puisque d'une part, elle augmenterait le taux d'instabilité génomique et d'autre part, elle n'activerait plus les voies de réponse aux stress, comme notamment celles occasionnées par l'augmentation d'instabilité génomique (Figure 13).

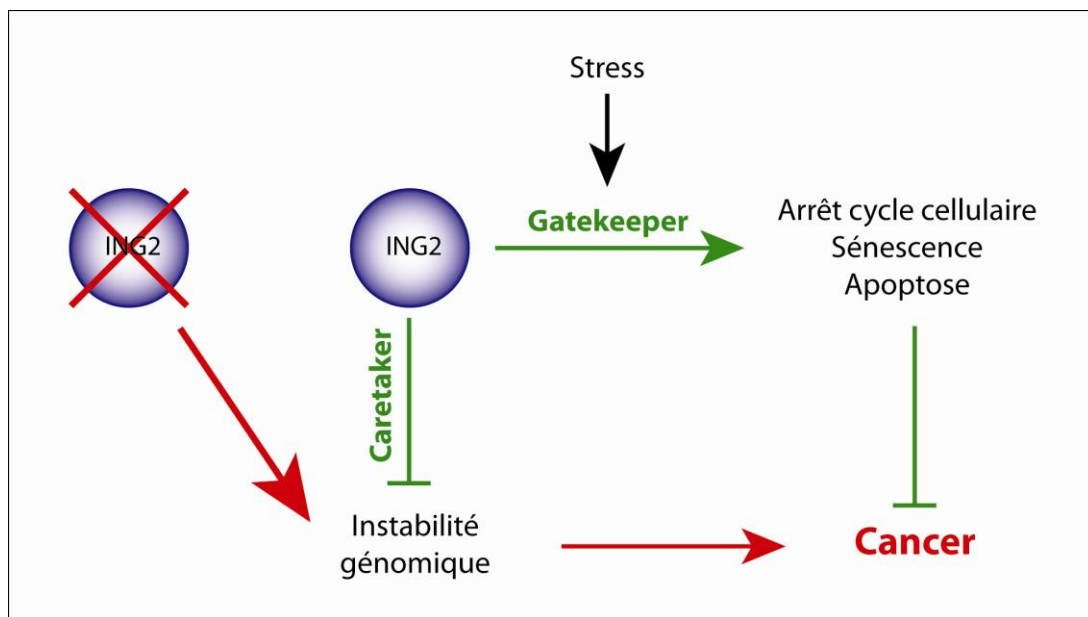


Figure 13: Fonctions suppressives de tumeurs d'ING2 de type « Caretaker » et « Gatekeeper ».

## 2.2. Implication d'ING2 dans la réplication.

Bien que le rôle d'ING2 dans le maintien de la stabilité du génome soit l'observation la plus marquante, elle est la conséquence de la dérégulation de mécanismes en amont. En effet, initialement nous avons observé que l'inhibition de l'expression d'ING2 conduit à une diminution du taux d'incorporation de BrdU, suggérant une diminution du taux de synthèse global d'ADN au cours de la phase S. Par des expériences d'étalement de fibres de l'ADN nous avons montré que l'inhibition de l'expression d'ING2 conduit à une diminution



significative de la vitesse de progression des fourches de réplication, suggérant qu'ING2 joue un rôle dans l'étape d'élongation de la réplication.

La réplication est un processus en trois étapes, d'abord l'initiation, puis l'élongation et enfin la terminaison. Ces étapes nécessitent une bonne coordination entre l'ouverture des deux brins de l'ADN et la synthèse de l'ADN. La synchronisation de ces événements est cruciale pour le déroulement normal de la réplication et de ce fait pour le maintien de l'intégrité du génome. Au début de la phase G1, le complexe formé par les hélicases MCM2-7 (« Mini Chromosome Maintenance ») interagit avec le complexe de reconnaissance des origines de réplication (ORC) déjà présent sur l'ADN et forme alors, avec d'autres protéines comme Cdt1 et Cdc6, le complexe de pré-réplication (pre-RC) (Bell and Dutta, 2002; Machida et al., 2005; Nishitani and Lygerou, 2002). Au cours de la transition G1/S, d'autres protéines, dont entre autre Cdc45 qui est un facteur activateur des hélicases, sont recrutées dans le pre-RC pour ouvrir l'ADN et ainsi initier la réplication (Pacek et al., 2006). La progression de la fourche de réplication nécessite ensuite le recrutement des ADN polymérases, et de la protéine PCNA dont la fonction est d'augmenter la processivité des ADN polymérases (Hao et al., 2008; Waga and Stillman, 1998). En accord avec un rôle d'ING2 au cours de l'étape d'élongation des fourches de réplication, nous montrons que l'inhibition de l'expression d'ING2 est accompagnée d'une forte diminution de la quantité de PCNA dans la fraction chromatinienne sans que son niveau global d'expression ne soit affecté. Par ailleurs, nous montrons qu'ING2 et PCNA interagissent *in vitro* et *in vivo*, indiquant que ces deux protéines peuvent faire partie d'un même complexe. Ainsi ces résultats suggèrent qu'ING2 est nécessaire pour l'enrichissement de PCNA au niveau de la chromatine pour permettre une progression efficace des fourches de réplication.

La protéine de la famille ING qui a la plus forte homologie avec ING2, p33ING1b, a également été montrée comme interagissant avec PCNA. Cependant, cette interaction a été observée suite à un stress induit par les UV et est impliquée dans la réparation de l'ADN (Scott et al., 2001b). De plus, p33ING1b interagit avec PCNA via un domaine d'interaction à PCNA (PIP : «PCNA Interacting Protein »), domaine fréquemment observé sur d'autres partenaires protéiques de PCNA tel que p21WAF1 (Warbrick, 2000). Or, ING2 ne possède pas de domaine PIP. Nos résultats montrent qu'ING2 interagit avec PCNA via une autre région (comprise entre les acides aminés 45 et 140) dont l'homologie avec ING1 est très faible. Ces

observations indiquent que les mécanismes d'interaction d'ING1 ou d'ING2 avec PCNA sont différents et suggèrent donc que l'association d'ING1 ou d'ING2 avec PCNA ont des fonctions différentes. Cette hypothèse est confortée par nos résultats montrant que l'inhibition de l'expression de la protéine ING1 n'affecte pas le taux global de synthèse d'ADN au cours de la phase S.

Tous ces résultats apportent donc de nouvelles informations quant aux mécanismes potentiels par lesquels ING2 pourrait exercer ses fonctions suppressives de tumeurs. Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels ING2 intervient dans le recrutement de PCNA sur la chromatine pour permettre une progression optimale des fourches de réplication restent inconnus. Un élément de réponse peut être apporté par une étude récente montrant qu'ING5 est également impliquée dans l'initiation et l'élongation de la réplication (Doyon et al., 2006). Les auteurs de cette étude montrent que par son association avec les complexes HAT MOZ-MORF et HBO1, ING5 remodelerait la chromatine pour permettre l'interaction du complexe hélicase MCM avec le pré-RC. Puisqu'ING2 est un composant du complexe Sin3A/HDAC, il est donc possible qu'en association avec ce complexe ou d'autres protéines, ING2 puisse modifier l'accessibilité de la chromatine à PCNA au niveau des complexes d'élongation de la réplication. Par ailleurs, il serait particulièrement intéressant de déterminer si, comme pour ING2, une inhibition prolongée d'ING5 conduit à une augmentation de l'instabilité génomique.

### **3. Mise en évidence d'un nouveau mécanisme de régulation d'ING2 par sumoylation.**

Depuis sa découverte, ING2 a clairement été montrée comme une protéine cruciale dans la réponse aux stress, et notamment aux stress de type génotoxique comme ceux induits par les agents de chimiothérapie, tels que l'étoposide et la doxorubicine ou les rayonnements ionisants tel que le rayonnement UV (Chin et al., 2005; Gozani et al., 2003; Nagashima et al., 2001; Wang et al., 2006a). Cependant, à part une étude montrant que

l'expression d'ING2 pouvait légèrement augmenter en réponse à un stress induit par l'étoposide ou la néocarzinostatine (Nagashima et al., 2001), toutes les autres montrent que le niveau d'expression d'ING2 reste inchangé. Ces observations indiquent qu'il existe donc des mécanismes de régulation d'ING2 qui ne font pas intervenir son niveau d'expression, suggérant ainsi qu'elle pourrait être régulée par des modifications post-traductionnelles. Dans ce contexte, nous avons pu mettre en évidence qu'ING2 est modifiée post-traductionnellement par sumoylation et permettant son association avec Sin3A et le ciblage du complexe ainsi formé au niveau des promoteurs de gènes, pour réguler leur expression.

### **3.1. ING2 est modifiée post-traductionnellement par sumoylation.**

La première observation nous ayant permis d'émettre l'hypothèse qu'ING2 pourrait être modifiée par sumoylation fut que suite à une immunoprécipitation de la protéine Sin3A, nous détectons ING2, ainsi qu'une forme modifiée d'ING2 d'une dizaine de kDa de plus. Nous avons donc confirmé cette hypothèse *in vitro* et *in vivo*. Nous avons également montré qu'ING2 est sumoylée sur son résidu lysine 195. Ce dernier se trouve au sein du site consensus de sumoylation A194KQE197. Cette découverte est particulièrement importante puisqu'elle ouvre de nouvelles voies d'investigation sur les mécanismes par lesquels les protéines ING pourraient être régulées. D'autant plus que l'analyse des séquences polypeptidiques de toutes les protéines ING avec le logiciel SumoPlot© (logiciel accessible sur internet permettant d'identifier la présence de séquences consensus de sumoylation et de déterminer la probabilité qu'elles soient effectivement sumoylées *in vivo*) indique que toutes contiennent plusieurs sites consensus de sumoylation, dont au moins un présente une très forte probabilité d'être sumoylé. Ainsi il est très probable que les autres membres de la famille ING soient également sumoylés.

C'est particulièrement le cas pour ING1, puisque le site consensus que nous avons identifié comme sumoylé dans ING2 se trouve dans une région dont l'homologie est très forte avec ING1 et ce site consensus y est conservé (A192KAE195). De manière intéressante, la sérine 199 d'ING1 qui a été montrée comme phosphorylable se trouve juste quelques acides aminés plus loin et cette sérine est également présente sur ING2. Or, une étude a récemment montré qu'il existe une sous-catégorie de sites de sumoylation nommés PDSM

(Phosphorylation-Dependent Sumoylation motif) qui sont constitués d'un site consensus de sumoylation classique ( $\Psi$ KxE) suivi quelques acides aminés plus loin (deux ou trois), d'une sérine sujette à la phosphorylation, puis d'une proline ( $\Psi$ KxE<sub>xxx</sub>SP) (Hietakangas et al., 2006). Dans cette étude, les auteurs montrent que la phosphorylation de la sérine augmente le niveau de sumoylation du site consensus adjacent. Ainsi, le site consensus d'ING2 que nous avons identifié comme sumoylé et celui qui est conservé dans ING1 font tous les deux partie d'un potentiel PDSM : A194KQEREASP202 et A192KAEREASP200 respectivement. Il est possible que le PDSM d'ING2 soit donc également phosphorylé, comme il est possible que celui d'ING1 soit sumoylé. Il serait donc particulièrement intéressant de répondre à cette question afin de déterminer si la phosphorylation de ces PDSM peut moduler leur niveau de sumoylation. De plus, dans leur étude, Gong et ses collaborateurs montrent que des mutants d'ING1 non phosphorylables sur la S199 ne co-immunoprécipitent pas avec la protéine 14-3-3 et que ces mutants ne sont donc pas relocalisés vers le cytoplasme suite à la surexpression de 14-3-3 comme cela est observé avec une protéine ING1 sauvage. Cependant, bien que dépendant de la phosphorylation de la S199, les mécanismes par lesquels ING1 interagit avec 14-3-3 sont inconnus (Gong et al., 2006). Ainsi, il est possible que cette interaction soit en réalité dépendante de la sumoylation d'ING1, comme nous l'avons observé pour ING2 et Sin3A (voir ci-après), et qu'en fait la phosphorylation soit nécessaire pour la sumoylation d'ING1.

### **3.2. Conséquences de la sumoylation d'ING2.**

Depuis la découverte de la sumoylation, un grand nombre de protéines ont été montrées comme étant sumoylées et ce nombre augmente sans cesse. Cet état de fait témoigne de l'importance fonctionnelle de cette modification post-traductionnelle et de l'engouement pour comprendre la sumoylation. Si l'on considère le mécanisme par lequel les protéines SUMO sont attachées à leur substrat, alors la sumoylation ressemble beaucoup à l'ubiquitination. Par contre, si l'on considère la dynamique de la réaction de sumoylation/désomoylation ou les conséquences fonctionnelles de la sumoylation d'une

protéine, alors sumoylation et ubiquitination se distinguent. En effet, la sumoylation est extrêmement dynamique, et est donc beaucoup moins stable que l'ubiquitination. De plus, contrairement à l'ubiquitination, dont la fonction majeure est de réguler la stabilité des protéines via leur dégradation par le protéasome, la sumoylation a été impliquée dans une variété de processus cellulaires. Ainsi, la mise en évidence de la sumoylation d'une protéine est délicate et de plus elle ne permet pas de prédire quelle va être sa fonction.

La sumoylation a initialement été associée à la régulation de la localisation cellulaire de protéines. C'est par exemple le cas de la protéine RanGAP, dont la sumoylation permet son ciblage au niveau des pores nucléaires. Dans nos conditions expérimentales, nous avons observé que la localisation subcellulaire d'ING2 est indépendante de sa sumoylation. Cependant, on ne peut pas exclure que dans d'autres conditions expérimentales, la sumoylation puisse jouer un rôle dans la localisation cellulaire d'ING2, notamment si l'on tient compte du fait que la phosphorylation du PDSM potentiel présent dans ING1 est impliquée dans cette fonction (discuté précédemment).

Une des principales conséquences moléculaires de la sumoylation d'une protéine est de changer sa structure de surface et/ou sa conformation (Figure 10), ce qui a pour conséquence de changer l'affinité qu'elle a pour ses partenaires protéiques. En accord avec cela nous avons montré que la sumoylation d'ING2 est nécessaire pour son association avec Sin3A. Ainsi, nos résultats ouvrent de nouvelles voies d'investigation sur les mécanismes par lesquels l'interaction des ING avec leurs partenaires protéiques et donc leurs fonctions peuvent être régulées. Il serait donc intéressant de déterminer si la sumoylation d'ING2 peut être impliquée dans l'interaction avec ses autres partenaires protéiques comme notamment PCNA, et donc si la sumoylation d'ING2 est impliquée dans la vitesse de progression des fourches de réplication et dans le maintien de la stabilité du génome.

La protéine Sin3A s'associe avec les protéines HDAC1 et HDAC2 au sein d'un complexe de co-répression de la transcription nommé Sin3A/HDAC. De nombreuses études ont montré que le complexe Sin3A/HDAC de par son activité de désacétylation de la chromatine est associé à la répression de la transcription de gènes. La protéine Sin3A est donc cruciale dans un grand nombre de processus, notamment dans les points de contrôle prévenant la transformation cellulaire ou régulant l'apoptose et la prolifération (Dannenberg

et al., 2005). A ce titre, elle a été proposée comme une protéine suppressive de tumeurs. L'importance de cette protéine est confortée par la nature létale de la délétion du gène Sin3A dans des souris. A ce jour, une étude a rapporté que l'expression de Sin3A est réduite dans les cancers du poumon (61% des cas) (Suzuki et al., 2008). La découverte la plus frappante concernant la protéine ING2 est que son PHD interagit spécifiquement avec l'histone 3 tri-méthylé sur la lysine 4 (H3K4me3) (Shi et al., 2006). Les auteurs de cette étude montrent qu'en réponse à un stress induit par la doxorubicine, l'interaction du PHD d'ING2 avec H3K4me3 permet le recrutement du complexe Sin3A/HDAC au niveau du promoteur des gènes de la prolifération Cycline D1 et c-myc afin de réprimer leur expression et donc de réprimer la prolifération cellulaire (Shi et al., 2006). Dans ce contexte nous montrons que l'interaction de Sin3A avec ING2 ainsi que leur recrutement au niveau de la chromatine est dépendante de la sumoylation d'ING2. Cependant contrairement à Shi et ses collaborateurs nous montrons que le recrutement de ce complexe permet également une activation transcriptionnelle de ces gènes.

Les données de la littérature ainsi que tous les résultats obtenus dans le cadre de cette étude permettent de proposer un modèle dans lequel la sumoylation d'ING2 permettrait son association avec le complexe Sin3A et le ciblage de ce complexe au niveau des promoteurs de gènes. Le complexe y serait alors stabilisé via l'interaction du PHD d'ING2 avec l'H3K4me3.

## Conclusion et perspectives

Il y a maintenant un peu plus de 10 ans que le gène ING1 a été découvert. Par la suite, les quatre autres gènes de la famille ING ont été mis en évidence. Les premières études fonctionnelles des protéines ING montraient qu'elles étaient des éléments cruciaux de la réponse aux dommages de l'ADN et donc de la prévention du processus de transformation cellulaire. Les gènes ING ont alors été proposés comme des gènes suppresseurs de tumeurs « candidats ». Le statut de gène suppresseur de tumeur d'ING1 est maintenant clairement admis, de part sa perte d'expression dans les cancers et les études chez le souris où il a été invalidé. En revanche pour les autres gènes ING peu d'informations sont disponibles quant à leur statut dans les tumeurs et leur invalidation dans les souris n'a pas encore été réalisée.

Les travaux réalisés pendant ma thèse ont eu pour objectif d'étudier l'implication d'ING2 dans la cancérogénèse. Ces travaux ont permis de montrer que l'expression d'ING2 est perdue dans une grande proportion de tumeurs pulmonaires et que cette perte semble être un événement précoce dans la tumorigénèse. Ainsi, ces travaux encouragent à la réalisation d'études plus approfondies sur le rôle d'ING2 dans la cancérogénèse bronchique, notamment pour évaluer son rôle en tant que biomarqueur moléculaire. De plus, nous avons mis en évidence que l'inhibition d'expression d'ING2 augmente l'instabilité génomique, ce qui permet pour la première fois de proposer un mécanisme par lequel ING2 pourrait prévenir l'émergence de tumeurs.

Par ailleurs, nous avons également mis en évidence qu'ING2 est modifiée post-traductionnellement par sumoylation. De plus, nous avons montré que cette sumoylation peut réguler l'association entre ING2 et le complexe Sin3A ainsi que l'adressage de ce complexe au niveau des promoteurs de gènes pour réguler leur expression.

Tous les travaux de ma thèse ont contribué à préciser le statut suppresseur de tumeurs d'ING2. Cependant, il reste trois points majeurs à clarifier avant de pouvoir définitivement affirmer qu'ING2 est un gène suppresseur de tumeurs :

- Premièrement, les informations disponibles sur le statut d'ING2 dans les différents cancers restent très limitées. Dans ce contexte, une analyse du statut d'ING2 dans un autre type de cancer (les lymphomes) est en cours.
- Deuxièmement, il est nécessaire d'étudier les conséquences de l'inactivation du gène ING2 chez la souris. Pour ce faire, notre groupe est impliqué dans la réalisation et l'étude de ces souris. Au stade où en est ce projet, la seule information disponible est que cette inactivation n'est pas létale.
- Enfin troisièmement, il faut déterminer les mécanismes par lesquels la perte d'expression d'ING2 contribue au développement tumoral. Etant donné que i) la perte d'expression d'ING2 semble être un événement précoce dans la cancérogénèse pulmonaire ii) l'inhibition de l'expression d'ING2 augmente l'instabilité génomique, iii) l'instabilité génomique est particulièrement impliquée dans les étapes précoces de la cancérogénèse, nous souhaitons déterminer si l'expression d'ING2 est perdue dans les lésions préneoplasiques pulmonaires et si la perte d'expression d'ING2 observée dans les tumeurs bronchiques est corrélée à une augmentation de l'instabilité génomique.



# Références

- Alberg, A. J., Brock, M. V., and Samet, J. M. (2005). Epidemiology of lung cancer: looking to the future. *J Clin Oncol* 23, 3175-3185.
- Baba, D., Maita, N., Jee, J. G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugawara, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H., and Shirakawa, M. (2005). Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. *Nature* 435, 979-982.
- Beasley, M. B., Lantuejoul, S., Abbondanzo, S., Chu, W. S., Hasleton, P. S., Travis, W. D., and Brambilla, E. (2003). The P16/cyclin D1/Rb pathway in neuroendocrine tumors of the lung. *Hum Pathol* 34, 136-142.
- Bell, S. P., and Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 71, 333-374.
- Bonner, W. M., Redon, C. E., Dickey, J. S., Nakamura, A. J., Sedelnikova, O. A., Solier, S., and Pommier, Y. (2008). GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 957-967.
- Bordoli, L., Husser, S., Luthi, U., Netsch, M., Osmani, H., and Eckner, R. (2001). Functional analysis of the p300 acetyltransferase domain: the PHD finger of p300 but not of CBP is dispensable for enzymatic activity. *Nucleic Acids Res* 29, 4462-4471.
- Brambilla, E., Moro, D., Gazzeri, S., and Brambilla, C. (1999). Alterations of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance. *J Pathol* 188, 351-360.
- Bylebyl, G. R., Belichenko, I., and Johnson, E. S. (2003). The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast. *J Biol Chem* 278, 44113-44120.
- Capili, A. D., Schultz, D. C., Rauscher, I. F., and Borden, K. L. (2001). Solution structure of the PHD domain from the KAP-1 corepressor: structural determinants for PHD, RING and LIM zinc-binding domains. *Embo J* 20, 165-177.
- Champagne, K. S., Saksouk, N., Pena, P. V., Johnson, K., Ullah, M., Yang, X. J., Cote, J., and Kutateladze, T. G. (2008). The crystal structure of the ING5 PHD finger in complex with an H3K4me3 histone peptide. *Proteins* 72, 1371-1376.
- Cheung, K. J., Jr., Bush, J. A., Jia, W., and Li, G. (2000). Expression of the novel tumour suppressor p33(ING1) is independent of p53. *Br J Cancer* 83, 1468-1472.
- Cheung, K. J., Jr., Mitchell, D., Lin, P., and Li, G. (2001). The tumor suppressor candidate p33(ING1) mediates repair of UV-damaged DNA. *Cancer Res* 61, 4974-4977.
- Chin, M. Y., Ng, K. C., and Li, G. (2005). The novel tumor suppressor p33ING2 enhances UVB-induced apoptosis in human melanoma cells. *Exp Cell Res* 304, 531-543.
- Coles, A. H., Liang, H., Zhu, Z., Marfella, C. G., Kang, J., Imbalzano, A. N., and Jones, S. N. (2007). Deletion of p37Ing1 in mice reveals a p53-independent role for Ing1 in the suppression of cell proliferation, apoptosis, and tumorigenesis. *Cancer Res* 67, 2054-2061.
- Dannenberg, J. H., David, G., Zhong, S., van der Torre, J., Wong, W. H., and Depinho, R. A. (2005). mSin3A corepressor regulates diverse transcriptional networks governing normal and neoplastic growth and survival. *Genes Dev* 19, 1581-1595.
- Di Bacco, A., Ouyang, J., Lee, H. Y., Catic, A., Ploegh, H., and Gill, G. (2006). The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division. *Mol Cell Biol* 26, 4489-4498.
- Doyon, Y., Cayrou, C., Ullah, M., Landry, A. J., Cote, V., Selleck, W., Lane, W. S., Tan, S., Yang, X. J., and Cote, J. (2006). ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell* 21, 51-64.
- Feng, X., Bonni, S., and Riabowol, K. (2006). HSP70 induction by ING proteins sensitizes cells to tumor necrosis factor alpha receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 26, 9244-9255.
- Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., and Boyle, P. (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 18, 581-592.
- Fu, C., Ahmed, K., Ding, H., Ding, X., Lan, J., Yang, Z., Miao, Y., Zhu, Y., Shi, Y., Zhu, J., et al. (2005). Stabilization of PML nuclear localization by conjugation and oligomerization of SUMO-3. *Oncogene* 24, 5401-5413.
- Garkavtsev, I., Grigorian, I. A., Ossovska, V. S., Chernov, M. V., Chumakov, P. M., and Gudkov, A. V. (1998). The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control. *Nature* 391, 295-298.
- Garkavtsev, I., Kazarov, A., Gudkov, A., and Riabowol, K. (1996). Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* 14, 415-420.
- Garkavtsev, I., and Riabowol, K. (1997). Extension of the replicative life span of human diploid fibroblasts by inhibition of the p33ING1 candidate tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 17, 2014-2019.
- Garkavtsev, I. I. (1999). Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* 23, 373.
- Gazzeri, S., Gouyer, V., Vour'ch, C., Brambilla, C., and Brambilla, E. (1998). Mechanisms of p16INK4A inactivation in non small-cell lung cancers. *Oncogene* 16, 497-504.
- Geiss-Friedlander, R., and Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 947-956.

- Gill, G. (2005). Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* 15, 536-541.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thain, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N. D., and Hay, R. T. (2003). P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* 11, 1043-1054.
- Gong, L., and Yeh, E. T. (2006). Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *J Biol Chem* 281, 15869-15877.
- Gong, W., Russell, M., Suzuki, K., and Riabowol, K. (2006). Subcellular targeting of p33ING1b by phosphorylation-dependent 14-3-3 binding regulates p21WAF1 expression. *Mol Cell Biol* 26, 2947-2954.
- Gouyer, V., Gazzeri, S., Bolon, I., Drevet, C., Brambilla, C., and Brambilla, E. (1998). Mechanism of retinoblastoma gene inactivation in the spectrum of neuroendocrine lung tumors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18, 188-196.
- Gozani, O., Karuman, P., Jones, D. R., Ivanov, D., Cha, J., Lugovskoy, A. A., Baird, C. L., Zhu, H., Field, S. J., Lessnick, S. L., et al. (2003). The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* 114, 99-111.
- Greenlee, R. T., Murray, T., Bolden, S., and Wingo, P. A. (2000). Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 50, 7-33.
- Gunduz, M., Ouchida, M., Fukushima, K., Hanafusa, H., Etani, T., Nishioka, S., Nishizaki, K., and Shimizu, K. (2000). Genomic structure of the human ING1 gene and tumor-specific mutations detected in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 60, 3143-3146.
- Hang, J., and Dasso, M. (2002). Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore. *J Biol Chem* 277, 19961-19966.
- Hao, H., Xin, T., Nancai, Y., Yanxia, W., Qian, L., Wei, M., Yandong, Y., and Hanju, H. (2008). Short-interfering RNA-mediated silencing of proliferating cell nuclear antigen inhibit proliferation and induce apoptosis in HeLa cells. *Int J Gynecol Cancer* 18, 36-42.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299.
- He, G. H., Helbing, C. C., Wagner, M. J., Sensen, C. W., and Riabowol, K. (2005). Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins. *Mol Biol Evol* 22, 104-116.
- Hecht, S. S. (2002). Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol* 3, 461-469.
- Hecker, C. M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P., and Dikic, I. (2006). Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem* 281, 16117-16127.
- Hietakangas, V., Ahlskog, J. K., Jakobsson, A. M., Hellesuo, M., Sahlberg, N. M., Holmberg, C. I., Mikhailov, A., Palvimo, J. J., Pirkkala, L., and Sistonen, L. (2003). Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol* 23, 2953-2968.
- Hietakangas, V., Anckar, J., Blomster, H. A., Fujimoto, M., Palvimo, J. J., Nakai, A., and Sistonen, L. (2006). PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 45-50.
- Higashiyama, M., Doi, O., Kodama, K., Yokouchi, H., Kasugai, T., Ishiguro, S., Takami, K., Nakayama, T., and Nishisho, I. (1997). MDM2 gene amplification and expression in non-small-cell lung cancer: immunohistochemical expression of its protein is a favourable prognostic marker in patients without p53 protein accumulation. *Br J Cancer* 75, 1302-1308.
- Hoegel, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-141.
- Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M. J., Mayhew, C. N., Goodson, M. L., Park-Sarge, O. K., and Sarge, K. D. (2001). Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 276, 40263-40267.
- Howe, L., Kusch, T., Muster, N., Chaterji, R., Yates, J. R., 3rd, and Workman, J. L. (2002). Yng1p modulates the activity of Sas3p as a component of the yeast NuA3 Hhistone acetyltransferase complex. *Mol Cell Biol* 22, 5047-5053.
- Hung, R. J., Hall, J., Brennan, P., and Boffetta, P. (2005). Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 162, 925-942.
- Hung, T., Binda, O., Champagne, K. S., Kuo, A. J., Johnson, K., Chang, H. Y., Simon, M. D., Kutateladze, T. G., and Gozani, O. (2009). ING4 mediates crosstalk between histone H3 K4 trimethylation and H3 acetylation to attenuate cellular transformation. *Mol Cell* 33, 248-256.
- Irvine, R. F. (2003). Nuclear lipid signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 349-360.
- Jager, D., Stockert, E., Scanlan, M. J., Gure, A. O., Jager, E., Knuth, A., Old, L. J., and Chen, Y. T. (1999). Cancer-testis antigens and ING1 tumor suppressor gene product are breast cancer antigens: characterization of tissue-specific ING1 transcripts and a homologue gene. *Cancer Res* 59, 6197-6204.
- Jenuwein, T., and Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- Jones, D. R., Bultsma, Y., Keune, W. J., Halstead, J. R., Elouarrat, D., Mohammed, S., Heck, A. J., D'Santos, C. S., and Divecha, N. (2006). Nuclear PtdIns5P as a transducer of stress signaling: an in vivo role for PIP4Kbeta. *Mol Cell* 23, 685-695.
- Kaadige, M. R., and Ayer, D. E. (2006). The polybasic region that follows the plant homeodomain zinc finger 1 of Pf1 is necessary and sufficient for specific phosphoinositide binding. *J Biol Chem* 281, 28831-28836.
- Kalkhoven, E., Roelfsema, J. H., Teunissen, H., den Boer, A., Ariyurek, Y., Zantema, A., Breuning, M. H., Hennekam, R. C., and Peters, D. J. (2003). Loss of CBP acetyltransferase activity by PHD finger mutations in Rubinstein-Taybi syndrome. *Hum Mol Genet* 12, 441-450.
- Kataoka, H., Bonnefin, P., Vieyra, D., Feng, X., Hara, Y., Miura, Y., Joh, T., Nakabayashi, H., Vaziri, H., Harris, C. C., and Riabowol, K.

- (2003). ING1 represses transcription by direct DNA binding and through effects on p53. *Cancer Res* 63, 5785-5792.
- Kichina, J. V., Zeremski, M., Aris, L., Gurova, K. V., Walker, E., Franks, R., Nikitin, A. Y., Kiyokawa, H., and Gudkov, A. V. (2006). Targeted disruption of the mouse *ing1* locus results in reduced body size, hypersensitivity to radiation and elevated incidence of lymphomas. *Oncogene* 25, 857-866.
- Ko, J. L., Cheng, Y. W., Chang, S. L., Su, J. M., Chen, C. Y., and Lee, H. (2000). MDM2 mRNA expression is a favorable prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 89, 265-270.
- Kubbutat, M. H., Jones, S. N., and Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.
- Kumamoto, K., Spillare, E. A., Fujita, K., Horikawa, I., Yamashita, T., Appella, E., Nagashima, M., Takenoshita, S., Yokota, J., and Harris, C. C. (2008). Nutlin-3a activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate mir-34a, mir-34b, and mir-34c expression, and induce senescence. *Cancer Res* 68, 3193-3203.
- Kuo, W. H., Wang, Y., Wong, R. P., Campos, E. I., and Li, G. (2007). The ING1b tumor suppressor facilitates nucleotide excision repair by promoting chromatin accessibility to XPA. *Exp Cell Res* 313, 1628-1638.
- Kuzmichev, A., Zhang, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2002). Role of the Sin3-histone deacetylase complex in growth regulation by the candidate tumor suppressor p33(ING1). *Mol Cell Biol* 22, 835-848.
- Lan, F., Collins, R. E., De Cegli, R., Alpatov, R., Horton, J. R., Shi, X., Gozani, O., Cheng, X., and Shi, Y. (2007). Recognition of unmethylated histone H3 lysine 4 links BHC80 to LSD1-mediated gene repression. *Nature* 448, 718-722.
- Leung, K. M., Po, L. S., Tsang, F. C., Siu, W. Y., Lau, A., Ho, H. T., and Poon, R. Y. (2002). The candidate tumor suppressor ING1b can stabilize p53 by disrupting the regulation of p53 by MDM2. *Cancer Res* 62, 4890-4893.
- Li, H., Ilin, S., Wang, W., Duncan, E. M., Wysocka, J., Allis, C. D., and Patel, D. J. (2006). Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature* 442, 91-95.
- Li, Y., Wang, H., Wang, S., Quon, D., Liu, Y. W., and Cordell, B. (2003). Positive and negative regulation of APP amyloidogenesis by sumoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 259-264.
- Lippman, S. M., and Spitz, M. R. (2001). Lung cancer chemoprevention: an integrated approach. *J Clin Oncol* 19, 74S-82S.
- Loewith, R., Meijer, M., Lees-Miller, S. P., Riabowol, K., and Young, D. (2000). Three yeast proteins related to the human candidate tumor suppressor p33(ING1) are associated with histone acetyltransferase activities. *Mol Cell Biol* 20, 3807-3816.
- Loewith, R., Smith, J. S., Meijer, M., Williams, T. J., Bachman, N., Boeke, J. D., and Young, D. (2001). Pho23 is associated with the Rpd3 histone deacetylase and is required for its normal function in regulation of gene expression and silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 276, 24068-24074.
- Lu, F., Dai, D. L., Martinka, M., Ho, V., and Li, G. (2006). Nuclear ING2 expression is reduced in human cutaneous melanomas. *Br J Cancer* 95, 80-86.
- Macauley, M. S., Errington, W. J., Okon, M., Scharpf, M., Mackereth, C. D., Schulman, B. A., and McIntosh, L. P. (2004). Structural and dynamic independence of isopeptide-linked RanGAP1 and SUMO-1. *J Biol Chem* 279, 49131-49137.
- Macauley, M. S., Errington, W. J., Scharpf, M., Mackereth, C. D., Blaszcak, A. G., Graves, B. J., and McIntosh, L. P. (2006). Beads-on-a-string, characterization of ETS-1 sumoylated within its flexible N-terminal sequence. *J Biol Chem* 281, 4164-4172.
- Machida, Y. J., Hamlin, J. L., and Dutta, A. (2005). Right place, right time, and only once: replication initiation in metazoans. *Cell* 123, 13-24.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., and Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88, 97-107.
- Matthews, A. G., Kuo, A. J., Ramon-Maiques, S., Han, S., Champagne, K. S., Ivanov, D., Gallardo, M., Carney, D., Cheung, P., Ciccone, D. N., et al. (2007). RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature* 450, 1106-1110.
- Matthews, J. M., and Sunde, M. (2002). Zinc fingers--folds for many occasions. *IUBMB Life* 54, 351-355.
- Matunis, M. J., Coutavas, E., and Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 135, 1457-1470.
- Muller, H., Bracken, A. P., Vernell, R., Moroni, M. C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J. D., and Helin, K. (2001). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* 15, 267-285.
- Nagashima, M., Shiseki, M., Miura, K., Hagiwara, K., Linke, S. P., Pedoux, R., Wang, X. W., Yokota, J., Riabowol, K., and Harris, C. C. (2001). DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9671-9676.
- Nagashima, M., Shiseki, M., Pedoux, R. M., Okamura, S., Kitahama-Shiseki, M., Miura, K., Yokota, J., and Harris, C. C. (2003). A novel PHD-finger motif protein, p47ING3, modulates p53-mediated transcription, cell cycle control, and apoptosis. *Oncogene* 22, 343-350.
- Nishida, T., Tanaka, H., and Yasuda, H. (2000). A novel mammalian Smt3-specific isopeptidase 1 (SMT3IP1) localized in the nucleolus at interphase. *Eur J Biochem* 267, 6423-6427.
- Nishida, T., and Yamada, Y. (2008). SMT3IP1, a nucleolar SUMO-specific protease, deconjugates SUMO-2 from nucleolar and cytoplasmic nucleophosmin. *Biochem Biophys Res Commun* 374, 382-387.
- Nishitani, H., and Lygerou, Z. (2002). Control of DNA replication licensing in a cell cycle. *Genes Cells* 7, 523-534.

- Nouman, G. S., Anderson, J. J., Crosier, S., Shrimankar, J., Lunec, J., and Angus, B. (2003). Downregulation of nuclear expression of the p33(ING1b) inhibitor of growth protein in invasive carcinoma of the breast. *J Clin Pathol* 56, 507-511.
- Nouman, G. S., Anderson, J. J., Mathers, M. E., Leonard, N., Crosier, S., Lunec, J., and Angus, B. (2002a). Nuclear to cytoplasmic compartment shift of the p33ING1b tumour suppressor protein is associated with malignancy in melanocytic lesions. *Histopathology* 40, 360-366.
- Nouman, G. S., Anderson, J. J., Wood, K. M., Lunec, J., Hall, A. G., Reid, M. M., and Angus, B. (2002b). Loss of nuclear expression of the p33(ING1b) inhibitor of growth protein in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol* 55, 596-601.
- Nourani, A., Doyon, Y., Utley, R. T., Allard, S., Lane, W. S., and Cote, J. (2001). Role of an ING1 growth regulator in transcriptional activation and targeted histone acetylation by the NuA4 complex. *Mol Cell Biol* 21, 7629-7640.
- Okano, T., Gemma, A., Hosoya, Y., Hosomi, Y., Nara, M., Kokubo, Y., Yoshimura, A., Shibuya, M., Nagashima, M., Harris, C. C., and Kudoh, S. (2006). Alterations in novel candidate tumor suppressor genes, ING1 and ING2 in human lung cancer. *Oncol Rep* 15, 545-549.
- Olaussen, K. A., Dunant, A., Fouret, P., Brambilla, E., Andre, F., Haddad, V., Taranchon, E., Filipits, M., Pirker, R., Popper, H. H., et al. (2006). DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 355, 983-991.
- Olaussen, K. A., Mountzios, G., and Soria, J. C. (2007). ERCC1 as a risk stratifier in platinum-based chemotherapy for non-small-cell lung cancer. *Curr Opin Pulm Med* 13, 284-289.
- Org, T., Chignola, F., Hetenyi, C., Gaetani, M., Rebane, A., Liiv, I., Maran, U., Mollica, L., Bottomley, M. J., Musco, G., and Peterson, P. (2008). The autoimmune regulator PHD finger binds to non-methylated histone H3K4 to activate gene expression. *EMBO Rep* 9, 370-376.
- Osada, H., and Takahashi, T. (2002). Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene* 21, 7421-7434.
- Pacek, M., Tutter, A. V., Kubota, Y., Takisawa, H., and Walter, J. C. (2006). Localization of MCM2-7, Cdc45, and GINS to the site of DNA unwinding during eukaryotic DNA replication. *Mol Cell* 21, 581-587.
- Palacios, A., Munoz, I. G., Pantoja-Uceda, D., Marcaida, M. J., Torres, D., Martin-Garcia, J. M., Luque, I., Montoya, G., and Blanco, F. J. (2008). Molecular basis of histone H3K4me3 recognition by ING4. *J Biol Chem* 283, 15956-15964.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55, 74-108.
- Pedoux, R., Sengupta, S., Shen, J. C., Demidov, O. N., Saito, S., Onogi, H., Kumamoto, K., Wincovitch, S., Garfield, S. H., McMenamin, M., et al. (2005). ING2 regulates the onset of replicative senescence by induction of p300-dependent p53 acetylation. *Mol Cell Biol* 25, 6639-6648.
- Pena, P. V., Davrazou, F., Shi, X., Walter, K. L., Verkhusha, V. V., Gozani, O., Zhao, R., and Kutateladze, T. G. (2006). Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature* 442, 100-103.
- Pena, P. V., Hom, R. A., Hung, T., Lin, H., Kuo, A. J., Wong, R. P., Subach, O. M., Champagne, K. S., Zhao, R., Verkhusha, V. V., et al. (2008). Histone H3K4me3 binding is required for the DNA repair and apoptotic activities of ING1 tumor suppressor. *J Mol Biol* 380, 303-312.
- Perez-Roger, I., Kim, S. H., Griffiths, B., Sewing, A., and Land, H. (1999). Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *Embo J* 18, 5310-5320.
- Pichler, A., Knipscheer, P., Oberhofer, E., van Dijk, W. J., Korner, R., Olsen, J. V., Jentsch, S., Melchior, F., and Sixma, T. K. (2005). SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nat Struct Mol Biol* 12, 264-269.
- Raho, G., Miranda, C., Tamborini, E., Pierotti, M. A., and Greco, A. (2007). Detection of novel mRNA splice variants of human ING4 tumor suppressor gene. *Oncogene* 26, 5247-5257.
- Reed, E. (1998). Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 24, 331-344.
- Reverter, D., and Lima, C. D. (2005). Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex. *Nature* 435, 687-692.
- Richardson, G. E., and Johnson, B. E. (1993). The biology of lung cancer. *Semin Oncol* 20, 105-127.
- Rodenhuis, S., and Slebos, R. J. (1992). Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res* 52, 2665s-2669s.
- Rusch, V., Baselga, J., Cordon-Cardo, C., Orazem, J., Zaman, M., Hoda, S., McIntosh, J., Kurie, J., and Dmitrovsky, E. (1993). Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. *Cancer Res* 53, 2379-2385.
- Russell, M. W., Soliman, M. A., Schriemer, D., and Riabowol, K. (2008). ING1 protein targeting to the nucleus by karyopherins is necessary for activation of p21. *Biochem Biophys Res Commun* 374, 490-495.
- Saito, A., Furukawa, T., Fukushige, S., Koyama, S., Hoshi, M., Hayashi, Y., and Horii, A. (2000). p24/ING1-ALT1 and p47/ING1-ALT2, distinct alternative transcripts of p33/ING1. *J Hum Genet* 45, 177-181.
- Saksouk, N., Avvakumov, N., Champagne, K. S., Hung, T., Doyon, Y., Cayrou, C., Paquet, E., Ullah, M., Landry, A. J., Cote, V., et al. (2009). HBO1 HAT complexes target chromatin throughout gene coding regions via multiple PHD finger interactions with histone H3 tail. *Mol Cell* 33, 257-265.
- Sanchez-Cespedes, M., Reed, A. L., Buta, M., Wu, L., Westra, W. H., Herman, J. G., Yang, S. C., Jen, J., and Sidransky, D. (1999). Inactivation of the INK4A/ARF locus frequently coexists with TP53 mutations in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 18, 5843-5849.

- Schlessinger, J. (2000). New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis. *Cell* 100, 293-296.
- Schulze, A., Lehmann, K., Jefferies, H. B., McMahon, M., and Downward, J. (2001). Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. *Genes Dev* 15, 981-994.
- Scott, M., Boisvert, F. M., Vieyra, D., Johnston, R. N., Bazett-Jones, D. P., and Riabowol, K. (2001a). UV induces nucleolar translocation of ING1 through two distinct nucleolar targeting sequences. *Nucleic Acids Res* 29, 2052-2058.
- Scott, M., Bonnefin, P., Vieyra, D., Boisvert, F. M., Young, D., Bazett-Jones, D. P., and Riabowol, K. (2001b). UV-induced binding of ING1 to PCNA regulates the induction of apoptosis. *J Cell Sci* 114, 3455-3462.
- Sekido, Y., Fong, K. M., and Minna, J. D. (2003). Molecular genetics of lung cancer. *Annu Rev Med* 54, 73-87.
- Shen, T. H., Lin, H. K., Scaglioni, P. P., Yung, T. M., and Pandolfi, P. P. (2006). The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol Cell* 24, 331-339.
- Shi, X., Hong, T., Walter, K. L., Ewalt, M., Michishita, E., Hung, T., Carney, D., Pena, P., Lan, F., Kaadige, M. R., *et al.* (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* 442, 96-99.
- Shi, X., Kachirskaia, I., Walter, K. L., Kuo, J. H., Lake, A., Davrazou, F., Chan, S. M., Martin, D. G., Fingerma, I. M., Briggs, S. D., *et al.* (2007). Proteome-wide analysis in *Saccharomyces cerevisiae* identifies several PHD fingers as novel direct and selective binding modules of histone H3 methylated at either lysine 4 or lysine 36. *J Biol Chem* 282, 2450-2455.
- Shiseki, M., Nagashima, M., Pedoux, R. M., Kitahama-Shiseki, M., Miura, K., Okamura, S., Onogi, H., Higashimoto, Y., Appella, E., Yokota, J., and Harris, C. C. (2003). p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity. *Cancer Res* 63, 2373-2378.
- Sironi, E., Cerri, A., Tomasini, D., Sirchia, S. M., Porta, G., Rossella, F., Grati, F. R., and Simoni, G. (2004). Loss of heterozygosity on chromosome 4q32-35 in sporadic basal cell carcinomas: evidence for the involvement of p33ING2/ING1L and SAP30 genes. *J Cutan Pathol* 31, 318-322.
- Skowrya, D., Zeremski, M., Neznanov, N., Li, M., Choi, Y., Uesugi, M., Hauser, C. A., Gu, W., Gudkov, A. V., and Qin, J. (2001). Differential association of products of alternative transcripts of the candidate tumor suppressor ING1 with the mSin3/HDAC1 transcriptional corepressor complex. *J Biol Chem* 276, 8734-8739.
- Soliman, M. A., Berardi, P., Pastyryeva, S., Bonnefin, P., Feng, X., Colina, A., Young, D., and Riabowol, K. (2008). ING1a expression increases during replicative senescence and induces a senescent phenotype. *Aging Cell* 7, 783-794.
- Song, J., Durrin, L. K., Wilkinson, T. A., Krontiris, T. G., and Chen, Y. (2004). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14373-14378.
- Spivack, S. D., Fasco, M. J., Walker, V. E., and Kaminsky, L. S. (1997). The molecular epidemiology of lung cancer. *Crit Rev Toxicol* 27, 319-365.
- Suzuki, H., Ouchida, M., Yamamoto, H., Yano, M., Toyooka, S., Aoe, M., Shimizu, N., Date, H., and Shimizu, K. (2008). Decreased expression of the SIN3A gene, a candidate tumor suppressor located at the prevalent allelic loss region 15q23 in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 59, 24-31.
- Takahashi, T., Nau, M. M., Chiba, I., Birrer, M. J., Rosenberg, R. K., Vinocour, M., Levitt, M., Pass, H., Gazdar, A. F., and Minna, J. D. (1989). p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 246, 491-494.
- Tatham, M. H., Jaffray, E., Vaughan, O. A., Desterro, J. M., Botting, C. H., Naismith, J. H., and Hay, R. T. (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* 276, 35368-35374.
- Terui, Y., Saad, N., Jia, S., McKeon, F., and Yuan, J. (2004). Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1. *J Biol Chem* 279, 28257-28265.
- Unoki, M., Kumamoto, K., Robles, A. I., Shen, J. C., Zheng, Z. M., and Harris, C. C. (2008). A novel ING2 isoform, ING2b, synergizes with ING2a to prevent cell cycle arrest and apoptosis. *FEBS Lett* 582, 3868-3874.
- Unoki, M., Shen, J. C., Zheng, Z. M., and Harris, C. C. (2006). Novel splice variants of ING4 and their possible roles in the regulation of cell growth and motility. *J Biol Chem* 281, 34677-34686.
- van Ingen, H., van Schaik, F. M., Wienk, H., Ballering, J., Rehmann, H., Dechesne, A. C., Kruijzer, J. A., Liskamp, R. M., Timmers, H. T., and Boelens, R. (2008). Structural insight into the recognition of the H3K4me3 mark by the TFIID subunit TAF3. *Structure* 16, 1245-1256.
- Vieyra, D., Senger, D. L., Toyama, T., Muzik, H., Brasher, P. M., Johnston, R. N., Riabowol, K., and Forsyth, P. A. (2003). Altered subcellular localization and low frequency of mutations of ING1 in human brain tumors. *Clin Cancer Res* 9, 5952-5961.
- Vonlanthen, S., Heighway, J., Altermatt, H. J., Gugger, M., Kappeler, A., Borner, M. M., van Lohuizen, M., and Betticher, D. C. (2001). The bmi-1 oncoprotein is differentially expressed in non-small cell lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression. *Br J Cancer* 84, 1372-1376.
- Waga, S., and Stillman, B. (1998). The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 67, 721-751.
- Wang, J., Chin, M. Y., and Li, G. (2006a). The novel tumor suppressor p33ING2 enhances nucleotide excision repair via inducement of histone H4 acetylation and chromatin relaxation. *Cancer Res* 66, 1906-1911.
- Wang, Y., Wang, J., and Li, G. (2006b). Leucine zipper-like domain is required for tumor suppressor ING2-mediated nucleotide excision repair and apoptosis. *FEBS Lett* 580, 3787-3793.
- Warbrick, E. (2000). The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays* 22, 997-1006.
- Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J., and Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1, 20-26.

Weiner, D. B., Nordberg, J., Robinson, R., Nowell, P. C., Gazdar, A., Greene, M. I., Williams, W. V., Cohen, J. A., and Kern, J. A. (1990). Expression of the neu gene-encoded protein (P185neu) in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res* 50, 421-425.

Williams, M. D., and Sandler, A. B. (2001). The epidemiology of lung cancer. *Cancer Treat Res* 105, 31-52.

Wingo, P. A., Ries, L. A., Giovino, G. A., Miller, D. S., Rosenberg, H. M., Shopland, D. R., Thun, M. J., and Edwards, B. K. (1999). Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst* 91, 675-690.

Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R. M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., *et al.* (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9, 189-198.

Ythier, D., Larrieu, D., Brambilla, C., Brambilla, E., and Pedeut, R. (2008). The new tumor suppressor genes ING: genomic structure and status in cancer. *Int J Cancer* 123, 1483-1490.

Zhang, H., Saitoh, H., and Matunis, M. J. (2002). Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex. *Mol Cell Biol* 22, 6498-6508.

Zhang, Y., and Xiong, Y. (1999). Mutations in human ARF exon 2 disrupt its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of MDM2 and p53. *Mol Cell* 3, 579-591.

Zheng, G., and Yang, Y. C. (2004). ZNF76, a novel transcriptional repressor targeting TATA-binding protein, is modulated by sumoylation. *J Biol Chem* 279, 42410-42421.

Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H., Kamijo, T., Cleveland, J. L., Sherr, C. J., and Roussel, M. F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 12, 2424-2433.

## **Annexes**

# Inhibitor of Growth 4 Suppresses Cell Spreading and Cell Migration by Interacting with a Novel Binding Partner, Liprin $\alpha$ 1

Jiang-Cheng Shen,<sup>1</sup> Motoko Unoki,<sup>1</sup> Damien Ythier,<sup>2</sup> Alain Duperray,<sup>2</sup> Lyuba Varticovski,<sup>1</sup> Kensuke Kumamoto,<sup>1</sup> Remy Pedoux,<sup>2</sup> and Curtis C. Harris<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Human Carcinogenesis, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, NIH, Bethesda, Maryland and <sup>2</sup>Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale U823, Institut Albert Bonniot, La Tronche, France

## Abstract

**Inhibitor of growth 4 (ING4) is a candidate tumor suppressor that plays a major role in gene regulation, cell cycle control, apoptosis, and angiogenesis. ING4 expression is down-regulated in glioblastoma cells and head and neck squamous cell carcinoma. Here, we identified liprin  $\alpha$ 1/PPFIA1, a cytoplasmic protein necessary for focal adhesion formation and axon guidance, as a novel interacting protein with ING4. ING4 and liprin  $\alpha$ 1 colocalized at lamellipodia in the vicinity of vinculin. Overexpressed ING4 suppressed cell spreading and cell migration. In contrast, overexpressed liprin  $\alpha$ 1 enhanced cell spreading and cell migration. Knockdown of endogenous ING4 with RNA interference induced cell motility, whereas knockdown of endogenous liprin  $\alpha$ 1 suppressed cell motility. ING4 also suppressed cell motility that was enhanced by liprin  $\alpha$ 1. However, ING4 did not further suppress cell motility when liprin  $\alpha$ 1 was suppressed with RNA interference, suggesting a functional and mechanistic interdependence between these proteins. In addition to its nuclear functions, cytoplasmic ING4 interacts with liprin  $\alpha$ 1 to regulate cell migration and, with its known antiangiogenic function, may prevent invasion and metastasis. [Cancer Res 2007;67(6):2552–8]**

## Introduction

Inhibitor of growth (ING) gene family is composed of six members in humans, including *ING1*, *ING2*, *ING3*, *ING4*, *ING5*, and *INGx* (1, 2). The first *ING* gene (*ING1*) was identified by using a strategy for tumor suppressor gene isolation (3). *ING4* and other family members were subsequently identified by a sequence homology search (4–7). As a candidate tumor suppressor, *ING4* is associated with a loss of heterozygosity on chromosomes in head and neck cancers (8). The *ING* genes negatively regulate cell proliferation (2, 9, 10). *ING4* binds to p53 and acetyltransferase p300 and, thus, facilitates p53 acetylation by p300, especially on Lys<sup>382</sup> (7). The *ING4* protein also associates with the HBO1 histone acetyltransferase complex (11) and interacts with the methylated lysine 4 of histone H3 (12, 13), suggesting a role in chromatin remodeling and transcription regulation.

*ING4* overexpression induces apoptosis in cells (7). In addition, *ING4* plays a major role in cellular responses to hypoxia, repressing hypoxia-inducible factor (HIF) activation by interacting with HIF

prolyl hydroxylase (14). *ING4* regulates angiogenesis induced by human glioblastoma cells in severe combined immunodeficient mice by interfering with the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway (15) and was also reported to suppress loss of contact inhibition (16). *ING4* overexpression in breast cancer cells showed the attenuation of anchorage-independent cell growth in soft agar (16).

The conversion of a cancer cell into an invasive metastatic type is a hallmark of tumor progression as well as the deregulation of cell proliferation (17). During this switch, cancer cells lose control of several morphologic features, such as cell polarization, filopodia and lamellipodia formation, cell spreading, and cell migration (18), which are key regulating steps between the static and metastatic transition of a cancer cell. The morphologic transition toward a migrating cell involves multiple regulatory components at different steps (19). Elucidating the regulatory networks among the known tumor suppressors and identifying new candidate tumor suppressor genes may provide valuable therapeutic strategies for preventing tumor progression and metastasis.

To reveal the molecular basis of *ING4* function, we examined *ING4*-interacting proteins by a protein pull-down assay. We identified several *ING4*-associated proteins. We show here that *ING4* interacts and colocalizes in lamellipodia with liprin  $\alpha$ 1/PPFIA1 [protein tyrosine phosphatase, receptor type f polypeptide, interacting protein (liprin),  $\alpha$ 1]. Liprin  $\alpha$ 1 was identified as a binding protein of leukocyte common antigen-related (LAR) family receptor tyrosine phosphatases and colocalized with LAR at focal adhesions (LAR-RPTP; ref. 20). Liprin  $\alpha$ 1 is required for the trafficking of synaptic vesicles (21) and involved in the development and maintenance of excitatory synapses (22). We further show that *ING4* overexpression leads to the suppression of cell spreading and cell migration, and liprin  $\alpha$ 1 is required for these functions. We propose that *ING4* regulates cell motility by interacting with liprin  $\alpha$ 1.

## Materials and Methods

**Cell lines and culture.** RKO, HEK-293, and U-87 MG cells were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD) and cultured under recommended conditions. Transient transfections of plasmids were done with LipofectAMINE and Plus reagent according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA).

**Plasmid construction.** pFLAG-CMV2-*ING4*, pFLAG-CMV6-*ING2*, and pFLAG-CMV2-*ING5* were constructed previously (7, 23). The liprin  $\alpha$ 1 expression plasmid pMT2-myc-liprin  $\alpha$ 1 was a generous gift from Dr. Morgan Sheng (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA).

**Antibodies and reagents.** FLAG M2 mouse monoclonal antibody (mAb), rabbit anti-FLAG polyclonal antibody, and mouse anti-vinculin mAb were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Chicken anti-liprin  $\alpha$ 1 polyclonal antibody was purchased from Genway (San Diego, CA), and mouse anti-myc mAb was from Invitrogen. Fluorophor-conjugated secondary antibodies for immunofluorescence were purchased from

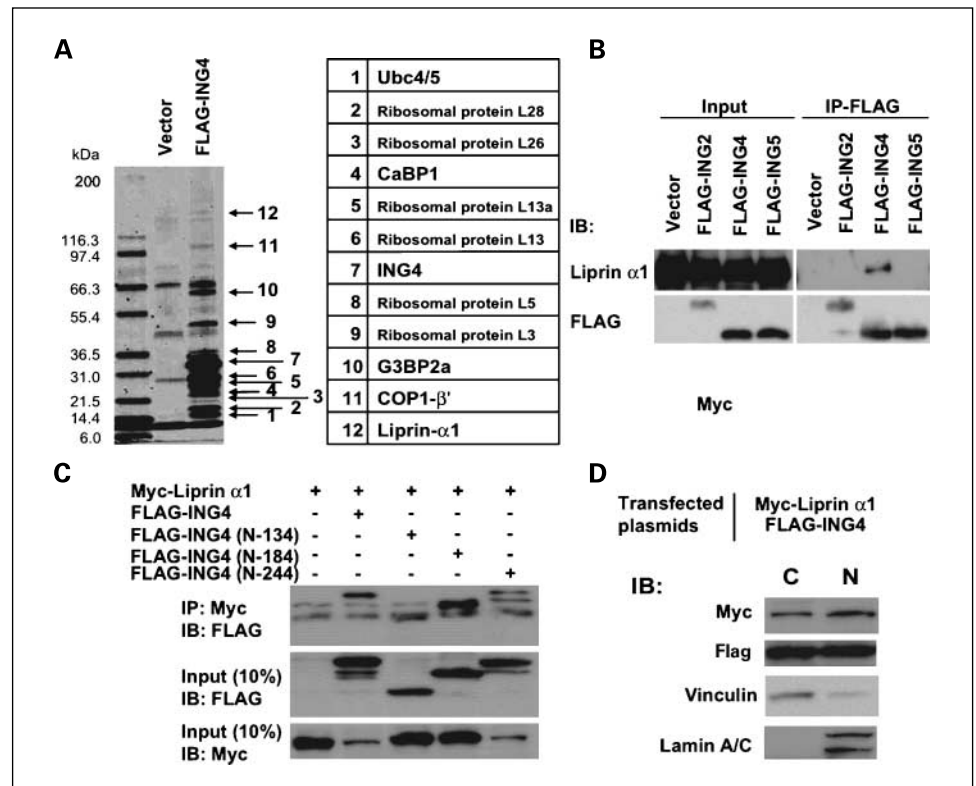
**Note:** Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

**Requests for reprints:** Curtis C. Harris, Laboratory of Human Carcinogenesis, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, NIH, 37 Convent Drive, Building 37, Room 3068, Bethesda, MD 20892-4258. Phone: 301-496-2048; Fax: 301-496-0497; E-mail: Curtis\_Harris@nih.gov.

©2007 American Association for Cancer Research.  
doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3870



**Figure 1.** ING4 interacts with liprin  $\alpha$ 1. **A**, cell extracts from RKO cells transfected with FLAG-ING4 were used for the pull-down assay. The binding proteins were separated by 12% SDS-PAGE, visualized by Coomassie blue staining, and extracted for MS analysis. The identified proteins were listed. **B**, whole-cell lysates from RKO cells expressed FLAG-tagged ING2 and ING4 or 5 were used for immunoprecipitation (IP) using FLAG M2 resin. Liprin  $\alpha$ 1 was detected by immunoblot (IB) using chicken anti-liprin  $\alpha$ 1 antibody. **C**, whole-cell lysates from RKO cells that expressed myc-tagged liprin  $\alpha$ 1 and three kinds of FLAG-tagged COOH-terminal-truncated ING4 (N-134, N-180, and N-244) were used for immunoprecipitation using anti-myc antibody. **D**, subcellular fractionations of cell lysate from RKO cells that expressed FLAG-tagged ING4 and myc-tagged liprin  $\alpha$ 1 were resolved in SDS-PAGE. C, cytoplasmic; N, nuclear.



Jackson ImmunoResearch Laboratory (West Grove, PA). Alexa Fluor 488 or rhodamine-phalloidin was from Molecular Probes (Eugene, OR). Rabbit anti-ING4 polyclonal antibody was created as described previously (7), and mouse anti-ING4 mAb was obtained from BD Biosciences (San Jose, CA).

**Protein pull-down assay.** RKO cells were transfected with FLAG-ING4 plasmid. After 48 h of transfection, cells were harvested, resuspended in lysis buffer A [20 mmol/L HEPES (pH 7.9), 20% glycerol, 10 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.2 mmol/L EDTA, 0.1% NP40, 1 mmol/L DTT, protease inhibitor cocktail (Calbiochem, La Jolla, CA)], kept on ice for 10 min, and centrifuged at  $500 \times g$  for 5 min at  $4^\circ C$ . The supernatant, which contains mostly cytoplasmic extracts, was saved for future experiments. The precipitate that contains perinuclear and nuclear extracts was resuspended in lysis buffer B (same as lysis buffer A but with 500 mmol/L NaCl), kept on ice for 30 min, and centrifuged at  $13,000 \times g$  for 15 min at  $4^\circ C$ . The supernatant was incubated with FLAG M2-conjugated resins (Sigma-Aldrich) for 4 h at  $4^\circ C$  (salt concentration is 250 mmol/L), centrifuged, and washed thrice with wash buffer 1 [20 mmol/L HEPES (pH 7.9), 150 mmol/L KCl, 0.2 mmol/L EDTA, 0.2 mmol/L EGTA, 0.1% NP40, 10% glycerol, 1 mmol/L DTT, protease inhibitor cocktail] followed by three washes with wash buffer 2 (same as wash buffer 1 but with 300 mmol/L KCl). The pull-down proteins were eluted by elution buffer [20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 150 mmol/L KCl, 1 mmol/L DTT, 5% glycerol] containing 0.2 mg/mL of FLAG peptide at  $4^\circ C$  for 4 h.

**Coimmunoprecipitation.** RKO cells transfected with FLAG-ING4 expression plasmids were harvested after 48 h of transfection, resuspended in extraction buffer A [50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 500 mmol/L KCl, 20% glycerol, 0.1% NP40, 1 mmol/L DTT, protease inhibitor cocktail], subjected to three rounds of freeze thawing (liquid nitrogen,  $37^\circ C$ ), and centrifuged at  $13,000 \times g$  for 10 min at  $4^\circ C$ . The cellular extracts (400  $\mu g$ ) were immunoprecipitated with FLAG M2 resin (salt concentration is 266 mmol/L) for 4 h at  $4^\circ C$ , centrifuged, and washed four times with extraction buffer A.

**Subcellular fractionation.** RKO cells transfected with FLAG-ING4 plasmid were grown for 48 h before being harvested. Cytoplasmic and nuclear fractions were separated by NE-PER kit (Pierce, Rockford, IL).

**Immunofluorescence microscopy.** Cells were plated on glass coverslips at  $4 \times 10^4/cm^2$  and cultured for designated incubation times with designated cell treatments. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde, permeated by 0.1% Triton X-100, and blocked by 1% bovine serum albumin in PBS. Cells were incubated with a primary antibody at room temperature for 1 h and then treated with fluorophore-conjugated secondary antibody for another hour at room temperature. The cells were examined by fluorescence microscopy (AxioPlan 2 imaging, Carl Zeiss, Thornwood, NY).

**Small interfering RNAs.** Small interfering RNA (siRNA) targeting *ING4* and *liprin  $\alpha$ 1* transcripts was designed and synthesized by Qiagen (Valencia, CA). siRNA sequences for *ING4* were as follows: *ING4* siRNA-1, 5'-TCCCTTTGAATTACAGAGAAA-3'; *ING4* siRNA-2, 5'-ATGCCTGTGGATCC-CAACGAA-3'; *ING4* siRNA-3, 5'-GAGGCTGATCTCAAGGAGAAA-3'; and *ING4* siRNA-4, 5'-AAGGAGAAACAGATTGAGTCA-3'. siRNA sequences for *liprin  $\alpha$ 1* were as follows: *liprin  $\alpha$ 1* siRNA-1, 5'-CACGAGGTTGGTCAT-GAAAGA-3' and *liprin  $\alpha$ 1* siRNA-2, 5'-CTGGTGTTCGAGACGGATA-3'. LipofectAMINE 2000 was used for transfection of the siRNAs.

**Cell spreading assay.** RKO cells transfected with *ING4* expression plasmids were plated on glass coverslips in serum-free medium and cultured overnight. The starved cells were stimulated by 5% fetal bovine serum (FBS) in DMEM without glutamine and antibiotics. At designated time points, cells were fixed and stained on filamentous actin (F-actin) by rhodamine-phalloidin. Membrane protrusion and spreading was observed by immunofluorescence microscopy based on the staining. The ratio of cells that had filopodia and/or lamellipodia over cells with green fluorescent protein (GFP) expression was calculated by counting cells and is referred to as the percentage of cell spreading. The average surface area per cell was measured by NIH ImageJ software. The statistical analysis was done by Student's *t* test with data from more than three independent fields in the experiment.

**Modified Boyden chamber cell migration assay.** Modified Boyden chamber cell migration assay was done using a migration chamber containing 8- $\mu m$  pore size polystyrene membranes coated with FluoroBlok materials (BD Biosciences). RKO cells were plated at  $2 \times 10^4/cm^2$  in a 100-mm dish and cultured for 16 h. Cells were transfected with 1  $\mu g$  plasmid

and incubated for 16 h. The transfected cells were harvested, washed once with serum-free DMEM, and resuspended in serum-free DMEM at a concentration of  $1 \times 10^5$ /mL. For the FluoroBlok transmembrane migration assay, 0.5 mL of the cell suspension was transferred to the upper chamber of the assay and 0.75 mL of complete DMEM was laid in the lower chamber. The 24-well plate of the migration assay was immediately incubated at 37°C for 22 h. Quantitative cell migration data were obtained by fluorescence spectrometry (Victor II, Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA) after the transverse cells in the lower chamber were stained with calcein AM (Molecular Probes) at 37°C for 1 h.

## Results

**ING4 interacts with liprin  $\alpha$ 1.** We did a pull-down assay using FLAG-tagged ING4 (ING4\_v1) protein overexpressed in RKO cells to understand the network of ING4-interacting proteins. Several cytoplasmic proteins, Ubc4/5, calcium-binding protein 1, Ras GTPase-activating protein, SH3 domain-binding protein 2a, COP1- $\beta'$ , liprin  $\alpha$ 1, and several ribosomal proteins, were identified as ING4-interacting proteins by mass spectrometry (MS; Fig. 1A). Among these pull-down proteins, we focused on liprin  $\alpha$ 1 in this report. The MS results were further confirmed by coimmunoprecipitation of FLAG-ING4 with endogenous liprin  $\alpha$ 1, which was detected by anti-liprin  $\alpha$ 1 antibody in a Western blot (Fig. 1B). This interaction was specific for ING4 among other ING family proteins; ING2 and ING5 did not coimmunoprecipitate with liprin  $\alpha$ 1 (Fig. 1B). We determined the ING4 motif responsible for the interaction using three COOH-terminal-truncated FLAG-ING4 constructs coexpressed with myc-tagged liprin  $\alpha$ 1. The peptide sequence between codons 135 and 180 was essential for ING4-liprin  $\alpha$ 1 interaction (Fig. 1C).

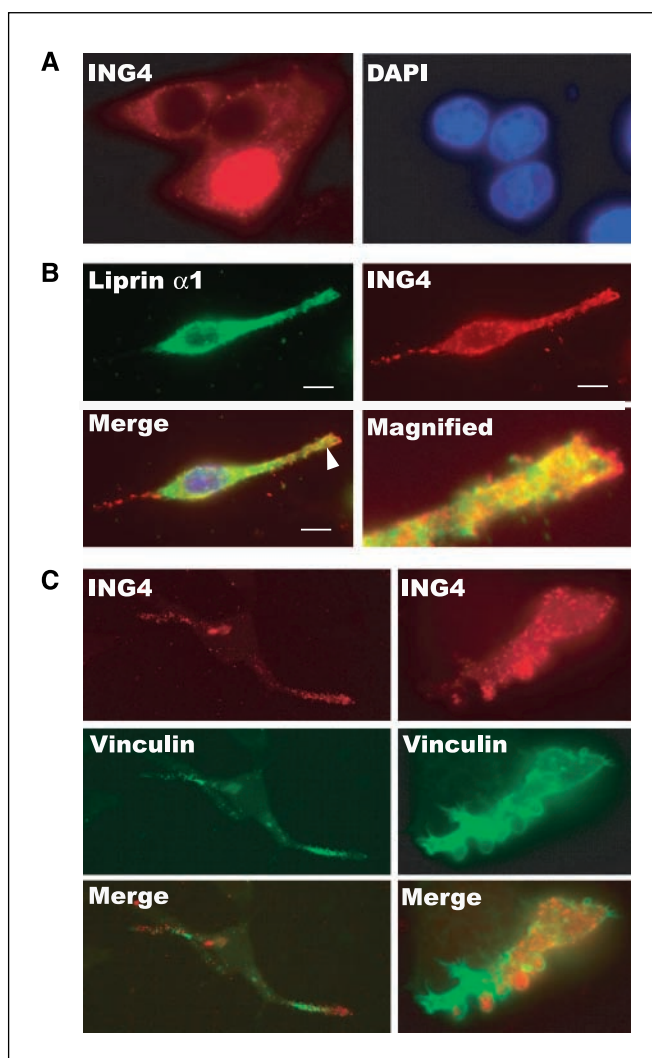
Because liprin  $\alpha$ 1 is known to carry out its function mainly in the cytoplasm, and ING4 has been shown to possess gene regulatory activities in the nucleus, we investigated whether ING4 was also present in the cytoplasm. By subcellular fractionation and Western blotting, we showed that ING4 was present in both nuclear and cytoplasmic extracts (Fig. 1D). We also found that liprin  $\alpha$ 1 was present in both nuclear and cytoplasmic extracts, whereas the focal adhesion molecule vinculin was more strictly found in the cytoplasmic extract, and a nuclear marker, lamin A/C, was only detected in the nuclear extract (Fig. 1D).

**ING4 colocalizes with liprin  $\alpha$ 1 in protruding membranes.** The subcellular localization of ING4 and liprin  $\alpha$ 1 was examined by immunofluorescence. We have observed that overexpressed ING4 (ING4\_v1) mainly localized in the nucleus when cells were in contact with each other (24). However, overexpressed ING4 had a tendency to be distributed in the cytoplasm under low cell density conditions in RKO cells (Fig. 2A). ING4 was widely spread out but mostly in the cytoplasm, with elongated protruding membranes stimulated by serum in the cells (Fig. 2B). It is intriguing that ING4 proteins preferred to cluster around the perinuclear areas and, most remarkably, assembled into intensive foci along the protruding membrane. Looking closely at the protruding membrane, we found that ING4 localized densely at the forefront of the leading edge, suggesting a role for ING4 in mechanisms of membrane protrusion, such as focal adhesion (Fig. 2B). Similar to ING4, endogenous liprin  $\alpha$ 1 resided all around the cytoplasm and formed puncta in the polar lamellipodium. The colocalization of ING4 and liprin  $\alpha$ 1 in the protruding membrane or polar lamellipodium was significant (Fig. 2B). The colocalization was further confirmed by confocal microscopy analyses in RKO cells cotransfected with liprin  $\alpha$ 1 and ING4 (Supplementary

Fig. S1A). We also observed similar colocalization of ING4 and liprin  $\alpha$ 1 in protruding membranes or polar lamellipodia in HEK-293 cells and U-87 MG glioblastoma cells (Supplementary Fig. S1B and C).

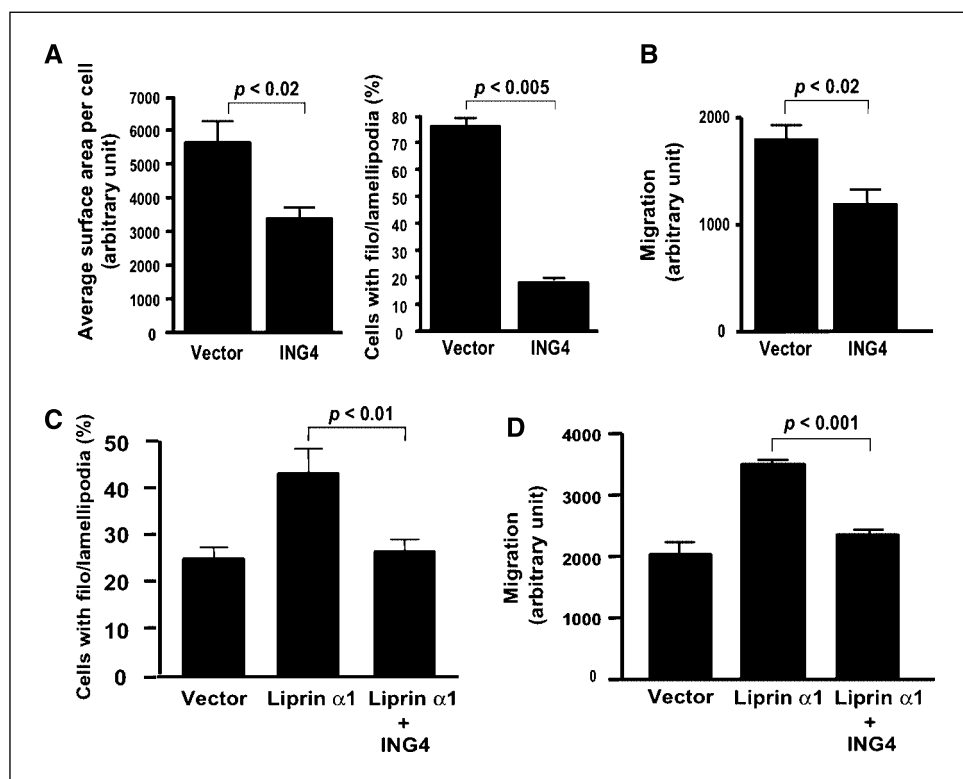
Because ING4 and liprin  $\alpha$ 1 colocalized mainly at the protruding membranes, we surmised that ING4 may be involved in a focal adhesion complex. We examined whether ING4 colocalizes with the focal adhesion molecule vinculin in the cells. ING4 clustered at the tip of polar lamellipodia in front of vinculin or at the front edge of membrane ruffles that was surrounded by vinculin (Fig. 2C).

**Effect of overexpressed ING4 and liprin  $\alpha$ 1 on cell motility.** Liprin  $\alpha$ 1 plays a major role in neuron cell growth, particularly in axon guidance and in terminal branches during dendrite extension



**Figure 2.** ING4 colocalizes with liprin  $\alpha$ 1 at lamellipodia in the vicinity of vinculin. **A**, RKO cells transfected with ING4 plasmid were seeded on glass coverslips and cultured in complete medium for 24 h. Red, ING4 was detected by rabbit anti-ING4 antibody. **B**, FLAG-ING4-transfected RKO cells were seeded on fibronectin-coated glass coverslips, starved overnight, and stimulated by 5% FBS. Cells in growing status were observed by immunofluorescence microscopy. Liprin  $\alpha$ 1 (green) was detected by chicken anti-liprin  $\alpha$ 1 antibody, and FLAG-ING4 (red) was detected by rabbit anti-FLAG antibody. **C**, RKO cells transfected with FLAG-ING4 were treated the same way as (B). ING4 (red) was detected by rabbit anti-FLAG antibody, and vinculin (green) was detected by mouse anti-vinculin antibody.

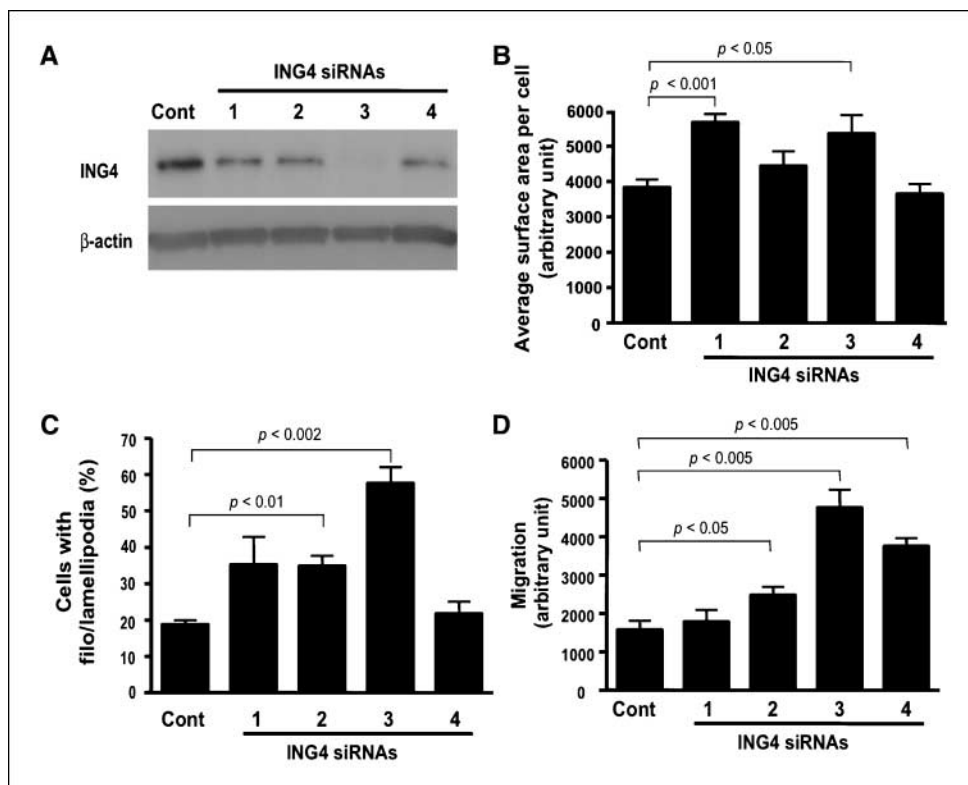
**Figure 3.** Effect of overexpressed ING4 and liprin  $\alpha 1$  on cell spreading and migration. *A, left*, RKO cells transfected with enhanced GFP (EGFP) vector and EGFP-ING4 were starved overnight and stimulated by serum. After 1 h of serum stimulation, average surface area per cell was measured (Supplementary Fig. S2B). *Right*, starved RKO cells transfected with pFLAG vector or pFLAG-ING4 were subjected to the cell spreading assay as in (A). After 1 h of serum stimulation, the ratio of cells with filopodia and/or lamellipodia formation versus cells transfected with EGFP or EGFP-ING4 was calculated (Supplementary Fig. S3A). *B*, RKO cells transfected with pcDNA vector or pcDNA-ING4 plasmid were used for the modified Boyden chamber assay. Cell migration was quantified by measuring the total fluorescence of cells that traveled to the lower chamber. *C*, starved RKO cells transfected with pcDNA-ING4 and/or myc-liprin  $\alpha 1$  expression plasmids were subjected to the cell spreading assay. After 45 min of serum stimulation, the ratio of cells with filopodia and/or lamellipodia formation was calculated (Supplementary Fig. S4). *D*, RKO cells transfected with pcDNA-ING4 and/or myc-liprin  $\alpha 1$  expression plasmids were used for a modified Boyden chamber assay as in (B).



(22). Because ING4 interacts with liprin  $\alpha 1$ , we were interested in understanding whether ING4 regulates cell spreading and cell motility. First, we did a cell spreading assay. Cells were synchronized by serum starvation and stimulated by adding serum.

The membrane morphology was observed by F-actin staining. The transfection efficiency, evaluated by a GFP expression vector, was high enough (80–90%) for the cells to be used for this experiment (Supplementary Fig. S2A). The surface area of ING4-overexpressed

**Figure 4.** Down-regulation of ING4 enhances cell motility. *A*, the down-regulation of ING4 by four different siRNAs was detected by mouse monoclonal anti-ING4 antibody. *B*, RKO cells transfected with the four ING4 siRNAs for 72 h were starved and used for the cell spreading assay. After 30 min of serum stimulation, average cell surface area was measured (Supplementary Fig. S5). *C*, RKO cells transfected with the four ING4 siRNAs for 72 h were used for the cell spreading assay as in (A). Quantitative data were presented as percentage of cells with filopodia and/or lamellipodia (Supplementary Fig. S5). *D*, the modified Boyden chamber assay was carried out by using RKO cells transfected with ING4-siRNAs for 72 h.



cells was significantly smaller than that of the control cells (Fig. 2A, left; Supplementary Fig. S2B). The ratio of cells that had filopodia and/or lamellipodia over cells with GFP expression was calculated and is referred to as the percentage of cell spreading. The results showed that, 1 h after serum stimulation, ING4 significantly delayed cell spreading by ~4-fold relative to the vector control (Fig. 3A, right; Supplementary Fig. S2A). The mechanism by which ING4 suppresses cell spreading may also assist in cell migration regulation, particularly to the polarized protrusion membranes during migration. Thus, we next did a modified Boyden chamber assay to measure transmembrane cell migration by fluorescence scoring. Overexpressed ING4 also significantly suppressed cell migration (Fig. 3B). This result was further confirmed by the *in vitro* scratch assay (Supplementary Fig. S3A and B and Supplementary Video 1). Time-lapsed motion pictures that monitored cell migration taken every 5 min over a 24-h period showed a marked suppression of cell migration when ING4 was overexpressed in RKO cells.

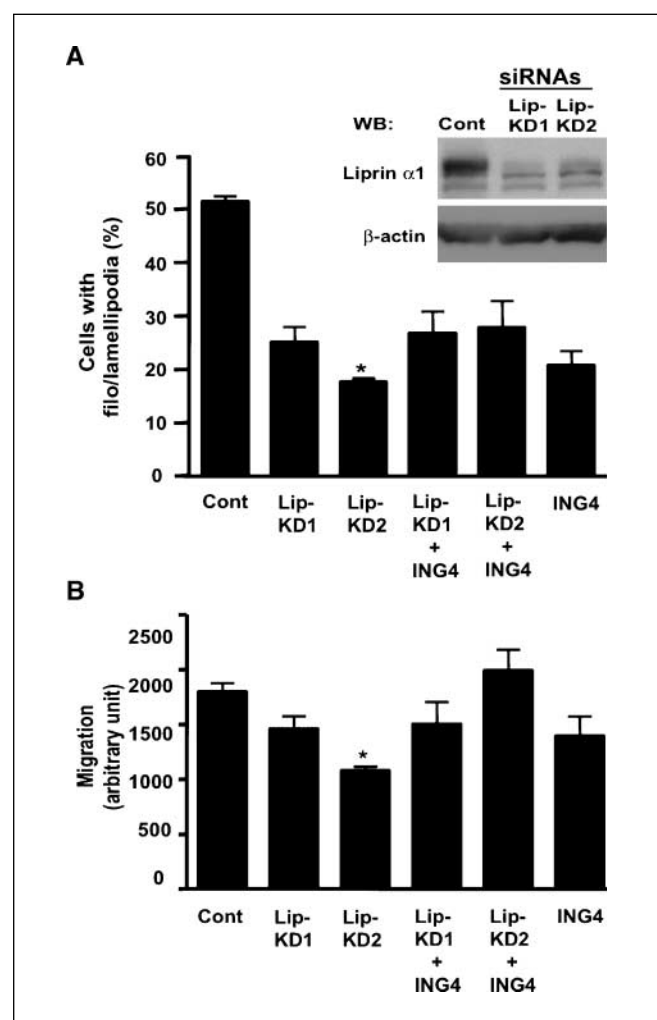
Next, we examined the effect of overexpressed liprin  $\alpha 1$  on cell motility. After 45 min of serum stimulation, overexpressed liprin  $\alpha 1$  enhanced cell spreading (Fig. 3C; Supplementary Fig. S4). Coexpression of ING4 with liprin  $\alpha 1$  suppressed the cell spreading enhanced by liprin  $\alpha 1$  (Fig. 3C). Overexpression of liprin  $\alpha 1$  also induced cell migration, but this induction was suppressed by ING4 (Fig. 3D).

**Effect of endogenous ING4 on cell motility.** To understand the role of endogenous ING4, we reduced endogenous ING4 by four siRNAs. All four siRNAs reduced protein levels >50%, and siRNA-3 almost completely eliminated ING4 protein expression detected by anti-ING4 antibody (Fig. 4A). For the spreading assay, F-actin in the cells transfected with the siRNAs was stained after 30 min of serum stimulation. Cells with control siRNA did not spread out much in 30 min, whereas the ING4 siRNA-transfected cells were swiftly extending their membranes in the form of filopodia and/or lamellipodia (Fig. 4B and C; Supplementary Fig. S5). siRNA-3 showed statistical significance in results determined by either scoring the percentage of cells with the formation of filopodia and/or lamellipodia (Fig. 4B) or measuring the average cell surface area (Fig. 4C) consistent with ING4 protein levels (Fig. 4A). Next, we did the modified Boyden chamber assay. The result showed that siRNA knockdown of ING4 also enhanced cell migration (Fig. 4D). Again, siRNA-3 enhanced cell migration most effectively consistent with the protein level (Fig. 4A).

**Regulation of cell migration by ING4 and liprin  $\alpha 1$ .** Two siRNAs against liprin  $\alpha 1$  (Lip-KD1 and Lip-KD2) significantly decreased protein levels of liprin  $\alpha 1$  in RKO cells and suppressed cell spreading after 1 h of serum stimulation compared with control vector (Fig. 5A; Supplementary Fig. S6), but overexpressed ING4 in the cells with liprin  $\alpha 1$  knockdown (Fig. 5A, lanes *Lip-KD1+ING4* and *Lip-KD2+ING4*) did not further suppress cell spreading. Next, we did a modified Boyden chamber cell migration assay. As shown in Fig. 5B, knockdown of liprin  $\alpha 1$  by siRNAs suppressed cell migration; on the other hand, ING4 overexpression in liprin  $\alpha 1$  knockdown cells (Fig. 5B, lanes *Lip-KD1+ING4* and *Lip-KD2+ING4*) did not further confer migration suppression. We summarize these results as the following: (a) liprin  $\alpha 1$  positively regulates cell spreading and migration; (b) ING4 counteracts the positive influence of liprin  $\alpha 1$  on spreading and migration; and (c) in the absence of liprin  $\alpha 1$  (or dissociation of the ING4-liprin  $\alpha 1$  interaction), ING4 loses the specificity to suppress cell spreading and migration.

## Discussion

In addition to the previously reported nucleus-based functions, we provided evidence of ING4 cytoplasmic functions. We show here that ING4 binds to a cytoplasmic protein, liprin  $\alpha 1$ , and translocated to lamellipodia where it is colocalized with liprin  $\alpha 1$ , suggesting a dynamic change of ING4 subcellular localization under some conditions. Liprin  $\alpha 1$  was originally identified as a binding protein of LAR-RPTP and was shown to be colocalized with LAR at focal adhesions, where the location of liprin  $\alpha 1$  is proximal to the rear end of focal adhesion, which disassembles in migration during membrane protrusion (20). ING4 interaction with liprin  $\alpha 1$  may explain the subcellular localization of ING4 being proximal to the focal adhesion molecule vinculin. Although the exact function of liprin  $\alpha 1$  in the formation and disassembly of focal adhesion is unknown, it has been suggested that liprin  $\alpha 1$  may play a role in the regulation of focal adhesion disassembly.



**Figure 5.** Interaction of liprin  $\alpha 1$  and ING4 on regulating cell motility. **A**, endogenous liprin  $\alpha 1$  in RKO cells transfected with control vector (*Cont*) and two siRNAs (*Lip-KD1* and *Lip-KD2*) was detected by chicken liprin  $\alpha 1$  antibody. RKO cells transfected with the control vector, pcDNA-ING4, and the two liprin  $\alpha 1$  siRNAs with/without ING4 for 72 h were used for the cell spreading assay. After 1 h of serum stimulation, the ratio of cells with filopodia and/or lamellipodia was calculated. \*,  $P < 0.0001$ , Student's *t* test, compared with the control. **B**, RKO cells transfected with the same vector and/or siRNAs used for (A) were subjected to a modified Boyden chamber assay. \*,  $P < 0.002$ , Student's *t* test, compared with the control.

Recent studies in axon guidance indicated that liprin  $\alpha$ 1 is required for the trafficking of synaptic vesicles (21) and involved in the development and maintenance of excitatory synapses (22). Thus, liprin  $\alpha$ 1 could serve as a scaffold protein that is able to assemble protein complexes in a transportation vehicle destined to the presynapse. Interestingly, in our study, *ING4* tends to cluster at the perinuclear area or at lamellipodium in RKO, U-87 MG, and HEK-293 cells, suggesting a transportation pathway from the nucleus to lamellipodium. In addition, the physical interaction of *ING4* with COP1- $\beta'$ , another protein identified by the present experiment, may further support this hypothesis.

Cell migration is a highly coordinated process involving multiple components and steps that mirror the complexity of embryonic morphogenesis (18). A migration movement begins with cell polarization, which includes vesicle trafficking toward the leading edge, followed by membrane protrusion and adhesion. At the lagging end, adhesion disassembles to allow forward movement. Although liprin  $\alpha$ 1 has not been specifically studied for its role in the polarity of cell migration, its associated protein, GIT1, has been shown to play a major role in the regulation of membrane protrusive activity and cell migration (25). Here, we showed that *ING4* suppressed membrane protrusion by delaying actin polymerization in the spreading cells. This negative regulation of actin polymerization may play a major role in suppressing cell migration. By liprin  $\alpha$ 1 knockdown and *ING4* overexpression simultaneously, we found that liprin  $\alpha$ 1 was required for the capacity of *ING4* to suppress cell spreading and migration. These results suggest that appropriate subcellular localization and/or proper protein-protein interactions are critical for *ING4* function in regulating the cell motility. Liprin  $\alpha$ 1 may play an essential role in the trafficking of *ING4* to its destination and/or in assembling the required protein complex for *ING4* activities.

We and others have previously shown that liprin  $\alpha$ 1 and *ING4* are expressed in both normal tissue and multiple cancer types (24). Recently, *ING4* was identified in a screening assay designed to search for genes that suppress loss of contact inhibition among cells. Ectopic expression of *ING4* attenuated anchorage-independent cell growth and suppressed loss-of-contact inhibition (16). Garkavtsev et al. (15) reported that an interaction between *ING4* and NF- $\kappa$ B plays an important role during angiogenesis. The interaction between *ING4* and liprin  $\alpha$ 1 may also participate in endothelial cell migration and angiogenesis. In addition, development and function of the mammary gland is impaired in

homozygous *LAR*-deficient mice (26). Thus, the interaction of *ING4* and liprin  $\alpha$ 1 may play a role during development. The role of *ING4* interaction with liprin  $\alpha$ 1 in normal cell migration (e.g., endothelial cells) and during development warrants further investigation.

Previously, we reported that the endogenous *ING4* expression level was induced by serum starvation and reduced by serum activation in normal fibroblast cells (24). This observation is consistent with the present observation using siRNAs against *ING4*. Therefore, endogenous *ING4* seems to suppress cell migration in normal cells, and the decreased *ING4* expression in cancer cells (8, 15) could lead to cancer cell migration and metastasis. In the same report (24), we described four splice variants of *ING4* (*ING4\_v1*, *ING4\_v2*, *ING4\_v3*, and *ING4\_v4*). In this report, we focused on the initially described *ING4*, *ING4\_v1*, because of its strong binding affinity to liprin  $\alpha$ 1. Other splice variants have a partially missing nuclear localization signal (deletion is between amino acid 128 and amino acid 132) that corresponds to a flanking region that is critical for binding with liprin  $\alpha$ 1 (amino acid 135 to amino acid 180) identified in this report. One of the four splice variants, *ING4\_v4*, showed dominant-negative effects on the functions of *ING4\_v1*. Therefore, *ING4* may regulate multiple cellular functions by changing its subcellular localization, binding partners, and associations with the variants.

In summary, we have identified an *ING4*-associated protein, liprin  $\alpha$ 1, which may function in directing *ING4* to its cytoplasmic destination where *ING4* may function as a regulator of membrane dynamics and, consequently, cell motility. These findings shed a new light on our understanding of the biological role of the candidate tumor suppressor, *ING4*, in addition to its documented nuclear transcription regulation.

## Acknowledgments

Received 10/19/2006; revised 12/8/2006; accepted 1/8/2007.

**Grant support:** Intramural Research Program of Center for Cancer Research, National Cancer Institute, NIH. The microscopy facility was partly funded by Association pour la Recherche sur le Cancer (Villejuif, France).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank the Institut Albert Bonniot microscopy facility for the production of cell migration videos, Dr. Paul Randazzo for scientific advice, Damien Nissou and Alexei Grichine for technical assistance, and Dr. Tom Holroyd and Dorothea Dudek-Creaven for editorial assistance.

## References

1. He GH, Helbing CC, Wagner MJ, Sensen CW, Riabowol K. Phylogenetic analysis of the *ING* family of PHD finger proteins. *Mol Biol Evol* 2005;22:104–16.
2. Russell M, Berardi P, Gong W, Riabowol K. *Grow-ING*, *Age-ING*, and *Die-ING*: *ING* proteins link cancer, senescence, and apoptosis. *Exp Cell Res* 2006;312:951–61.
3. Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A, Riabowol K. Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* 1996;14:415–20.
4. Nagashima M, Shiseki M, Miura K, et al. DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9671–6.
5. Nagashima M, Shiseki M, Pedoux R, et al. A novel PHD-finger motif protein, p47ING3, modulates p53-mediated transcription, cell cycle control, and apoptosis. *Oncogene* 2003;22:343–50.
6. Shimada Y, Saito A, Suzuki M, Takahashi E, Horie M. Cloning of a novel gene (*ING1L*) homologous to *ING1*, a candidate tumor suppressor. *Cytogenet Cell Genet* 1998;83:232–5.
7. Shiseki M, Nagashima M, Pedoux RM, et al. p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity. *Cancer Res* 1003;63:2373–8.
8. Gunduz M, Nagatsuka H, Demircan K, et al. Frequent deletion and down-regulation of *ING4*, a candidate tumor suppressor gene at 12p13, in head and neck squamous cell carcinomas. *Gene* 2005;356:109–17.
9. Campos EI, Chin MY, Kuo WH, Li, G. Biological functions of the *ING* family tumor suppressors. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2597–613.
10. Shi X, Gozani O. The fellowships of the *ING*s. *J Cell Biochem* 2005;96:1127–36.
11. Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, et al. *ING* tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell* 2006;21:51–64.
12. Pena PV, Davrazou F, Shi X, et al. Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of *ING2*. *Nature* 2006;442:100–3.
13. Shi X, Hong T, Walter KL, et al. *ING2* PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* 2006;442:96–9.
14. Ozer A, Wu LC, Bruick RK. The candidate tumor suppressor *ING4* represses activation of the hypoxia inducible factor (HIF). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:7481–6.
15. Garkavtsev I, Kozin SV, Chernova O, et al. The candidate tumor suppressor protein *ING4* regulates brain tumour growth and angiogenesis. *Nature* 2004;428:328–32.

16. Kim S, Chin K, Gray JW, Bishop JM. A screen for genes that suppress loss of contact inhibition: identification of ING4 as a candidate tumor suppressor gene in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:16251-6.
17. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
18. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 2003;302:1704-9.
19. Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 1998;280:1614-7.
20. Serra-Pages C, Kedersha NL, Fazikas L, Medley Q, Debant A, Streuli M. The LAR transmembrane protein tyrosine phosphatase and a coiled-coil LAR-interacting protein co-localize at focal adhesions. *EMBO J* 1995;14:2827-38.
21. Miller KE, DeProto J, Kaufmann N, Patel BN, Duckworth A, Van VD. Direct observation demonstrates that Liprin- $\alpha$  is required for trafficking of synaptic vesicles. *Curr Biol* 2005;15:684-9.
22. Dunah AW, Hueske E, Wyszynski M, et al. LAR receptor protein tyrosine phosphatases in the development and maintenance of excitatory synapses. *Nat Neurosci* 2005;8:458-67.
23. Pedoux R, Sengupta S, Shen JC, et al. ING2 regulates the onset of replicative senescence by induction of p300-dependent p53 acetylation. *Mol Cell Biol* 2005;25:6639-48.
24. Unoki M, Shen JC, Zheng ZM, Harris CC. Novel splice variants of ING4 and their possible roles in regulation of cell growth and motility. *J Biol Chem* 2006;281:34677-86.
25. Manabe R, Kovalenko M, Webb DJ, Horwitz AR. GIT1 functions in a motile, multi-molecular signaling complex that regulates protrusive activity and cell migration. *J Cell Sci* 2002;115:1497-510.
26. Schaapveld RQ, Schepens JT, Robinson GW, et al. Impaired mammary gland development and function in mice lacking LAR receptor-like tyrosine phosphatase activity. *Dev Biol* 1997;188:134-46.

## RESUME

Les gènes de la famille ING : « INhibitor of Growth » (ING1-5) jouent un rôle crucial dans l'inhibition de la prolifération cellulaire, en régulant notamment le cycle cellulaire, l'apoptose et la sénescence. De plus, plusieurs études (portant majoritairement sur ING1) montrent que ces gènes sont fréquemment perdus dans de nombreux cancers. Ils pourraient donc être impliqués dans l'émergence et le développement de tumeurs. Ainsi, l'objectif de mon projet de thèse était d'étudier le gène ING2, afin d'évaluer son intérêt en cancérogénèse.

Nous avons tout d'abord montré que l'expression d'ING2 (ARN et protéique) est perdue dans plus de la moitié des cancers bronchiques non à petites cellules, confortant ainsi un rôle d'ING2 comme gène suppresseur de tumeurs. Par ailleurs, nous avons montré que l'inhibition de l'expression d'ING2 conduit à des défauts de réplication et à une forte augmentation de l'instabilité génomique, mettant ainsi en évidence pour la première fois qu'ING2 est un gène suppresseur de tumeurs de type « caretaker ». Ceci permet aussi pour la première fois d'expliquer comment l'inactivation des ING, observée dans les tumeurs, pourrait contribuer à la cancérogénèse. Enfin, nous avons mis en évidence le premier mécanisme de régulation post-traductionnelle d'ING2. En effet, ING2 peut être sumoylée, et cette sumoylation est nécessaire pour son association avec le complexe de régulation Sin3A/HDAC afin de cibler ce dernier au niveau des promoteurs de gènes pour réguler leur expression.

Ces travaux ont donc contribué à démontrer l'intérêt d'ING2 en cancérogénèse et à mieux comprendre ses fonctions suppressives de tumeurs. De plus, ils ont permis d'ouvrir plusieurs voies d'investigation sur les fonctions et les mécanismes de régulation des protéines ING.

## ABSTRACT

*ING tumor suppressor genes family (ING1-5) was identified between 1996 and 2001 and was shown to repress cell proliferation by regulating cell cycle progression, apoptosis and/or senescence in a p53 dependent manner, when overexpressed. The founding member of the family, ING1, has been described as frequently inactivated in many human cancer types. Moreover ING1 KO mice develop tumors earlier and more frequently, indicating a role for ING1 in tumor suppression. Although ING1 has received much attention, limited information on the status and functions of the other members of the family are available. In this context, I have studied ING2 member of the ING family having the highest homology to ING1, in order to determine its potential tumor suppressive role in human cancers. To address this question we have first determined its status in human lung tumor biopsies and have shown that its expression is lost (both at protein and mRNA levels) in more than half of the 120 tumors screened. Concomitantly, we have looked for ING2 relevant functions that may contribute to tumor development when inactivated. Indeed, we have shown that ING2 knock-down induces replication defects and increases genome instability. In the mean time, we have shown that ING2 can be post-translationally modified by sumoylation which is critical for ING2 association with the Sin3A chromatin remodeling complex to regulate gene expression. Overall, these studies have contributed to comfort ING2 involvement in tumorigenesis and have highlighted new functions that document how ING proteins inactivation may contribute to cancer development.*

Mots clés : ING2, cancer, instabilité génomique, sumoylation, SUMO, poumon, NSCLC, Sin3A, PCNA, réplication, gène suppresseur de tumeurs, caretaker.