

Cancer Res; 70(9) May 1, 2010

Microphthalmia-Associated Transcription Factor Controls the DNA Damage Response and a Lineage-Specific Senescence Program in Melanomas

Sandy Giuliano^{1,2}, Yann Cheli^{1,2}, Mickaël Ohanna^{1,2}, Caroline Bonet^{1,2}, Laurent Beuret^{1,2}, Karine Bille^{1,2}, Agnès Loubat^{2,4}, Véronique Hofman^{2,5}, Paul Hofman^{2,5}, Gilles Ponzio^{2,4}, Philippe Bahadoran³, Robert Ballotti^{1,2}, and Corine Bertolotto^{1,2}

Le gène Mitf (microphthalmia transcription factor) code une protéine bHLHLZ apparentée à l'oncogène Myc et se lie à l'ADN sous forme d'homodimères reconnaissant dans la région promotrice des gènes régulés, une boîte M de type TCACGTG.

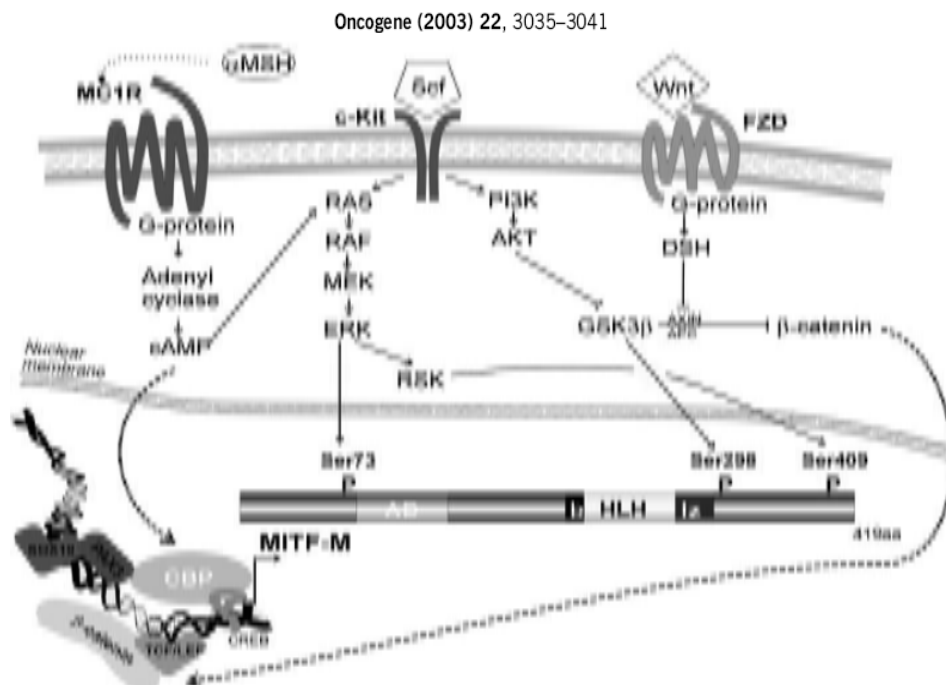


Figure 0.

Mitf est un facteur essentiel au développement, à la différenciation et à la survie des mélanocytes issus de la crête neurale, ainsi que des cellules pigmentées de la rétine pigmentaire (issue du tube neural). L'activité de Mitf est étroitement contrôlée par différentes voies de signalisation (Figure 1).

Les gènes cibles de Mitf incluent les enzymes responsables de la polymérisation de la tyrosine en mélanine (Tyrosinase, TRP1 et 2), les gènes codant les protéines du mélanosome dans lequel se déroule cette synthèse, des protéines remodelant le cytosquelette comme Dia1, le gène BCL2 (survie), différents récepteurs de facteurs de croissance (Met...), des activateurs du cycle (CDK2) et des inhibiteurs du cycle comme p21 (CDKN1a).

La transformation des mélanocytes conduit au développement de mélanomes, et compte tenu de son importance dans la physiologie des cellules pigmentées, l'implication de Mitf dans le développement tumoral a été étudiée. Les résultats obtenus sont complexes, avec des arguments en faveur d'un rôle positif dans la croissance tumorale (amplification du gène dans les tumeurs de mauvais pronostic, décroissance tumorale dans certains modèles de xénogreffes après inhibition de Mitf) ou négatif (certains mélanomes perdent le chromosome 3 sur lequel est situé Mitf, et l'extinction de Mitf dans certaines cellules de mélanomes conduit à un phénotype invasif).

La figure 1 présente les résultats qui indiquent que le traitement des cellules par 150μmol d'hydroxyurée (HU : inhibe la ribonucleotide reductase qui catalyse la synthèse de

novo des dXTP) pendant 96 heures, conduit à l'extinction de Mitf (Figure 1A) dans les cellules de mélanome (501 mel) associé à un phénotype sénescence dans ces cellules (mis en évidence par l'expression de betagalactosidase acide dans 70% des cellules, coloration bleu). Le % de cellules dans les différentes phases du cycle est mesuré après marquage par un intercalant de l'ADN.

Afin de déterminer si la diminution de Mitf induite par HU pouvait être responsable de l'induction de la sénescence, l'extinction spécifique de Mitf est réalisée à l'aide de siRNA interférant (siMi), et les effets comparés à ceux d'un siRNA contrôle (siCt) (Figure 1B). L'induction de la sénescence est mesurée comme en A après 2 (D2) 3 (D3) et 4 (D4) jours. L'expression de la protéine marquant l'hétérochromatine (HP1beta) est utilisée pour observer l'allure de la chromatine dans les noyaux de ces cellules.

L'effet de l'extinction de Mitf sur la prolifération est mesuré en Figure 1C, et l'induction de la sénescence dans différents types cellules de mélanome mesurée après extinction de Mitf (Figure 1D).

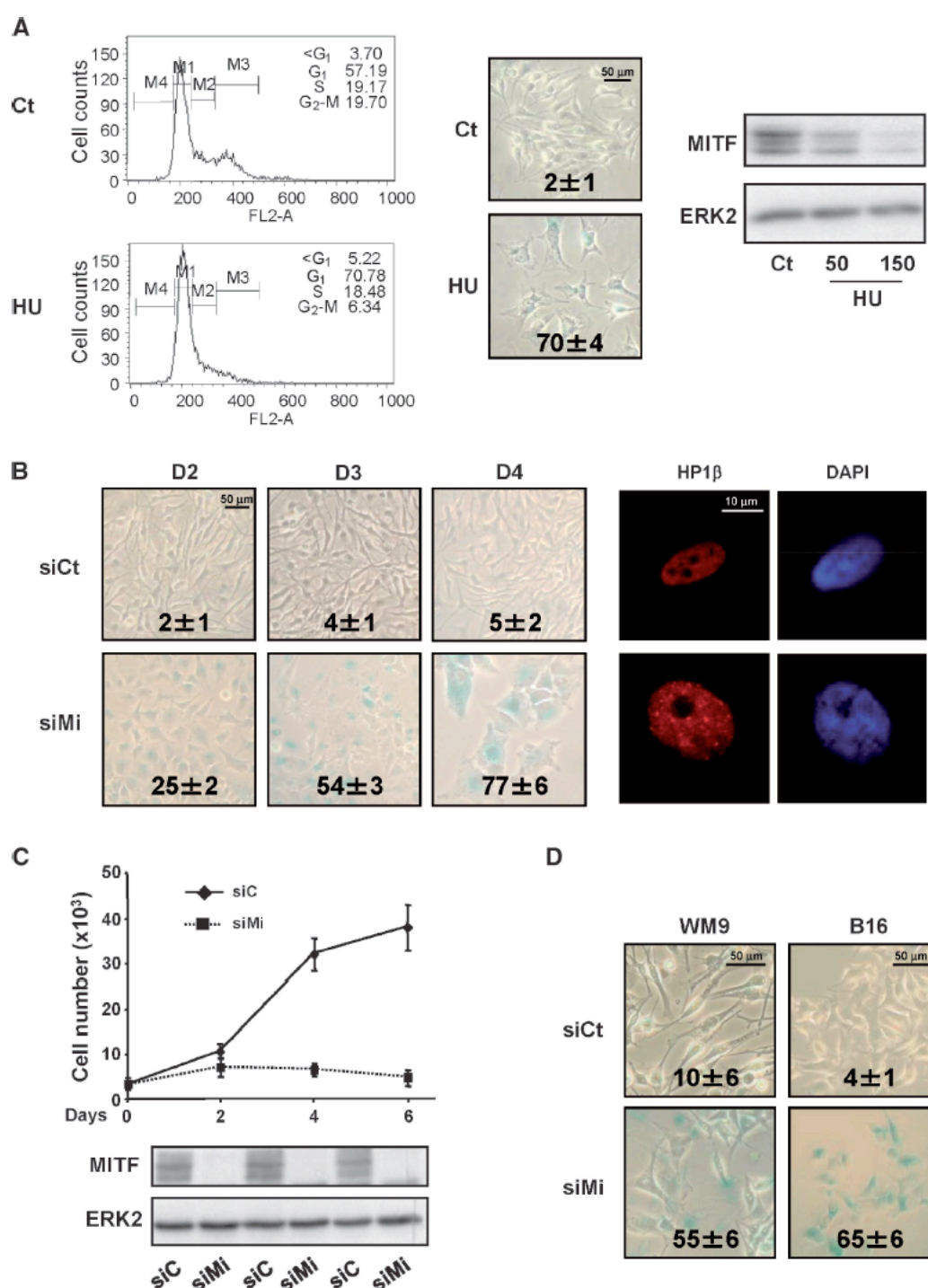


Figure 1

Q1 : HU induit il l'apoptose ?

Q2 : quel est l'effet de Mitf sur la prolifération des cellules de mélanome ? sur l'induction de la sénescence ? l'induction de la sénescence suite à l'extinction de Mitf est elle généralisable à des cellules autres que pigmentaires?

Afin d'étudier la structure des noyaux des cellules de mélanome dans lesquelles l'expression de Mitf a été invalidée, une observation de la chromatine (noyaux marqués au DAPI, coloré en vert par souci de netteté) montre des pontages internucléaires, qui peuvent être expliqués par l'induction de cassures doubles brin (Figure 2A). Pour étudier les mécanismes de réparation de l'ADN activés dans ces noyaux, une détection de l'histone gammaH2AX ainsi que de la protéine Mitf est réalisée par immunomarquage (Figure 2B). La quantité d'histone γ H2AX dans ces cellules est mesurée à l'aide d'un western blot (Figure 2B).

La présence de la protéine 53BP1 est également détectée dans les noyaux de ces cellules (figure 2C).

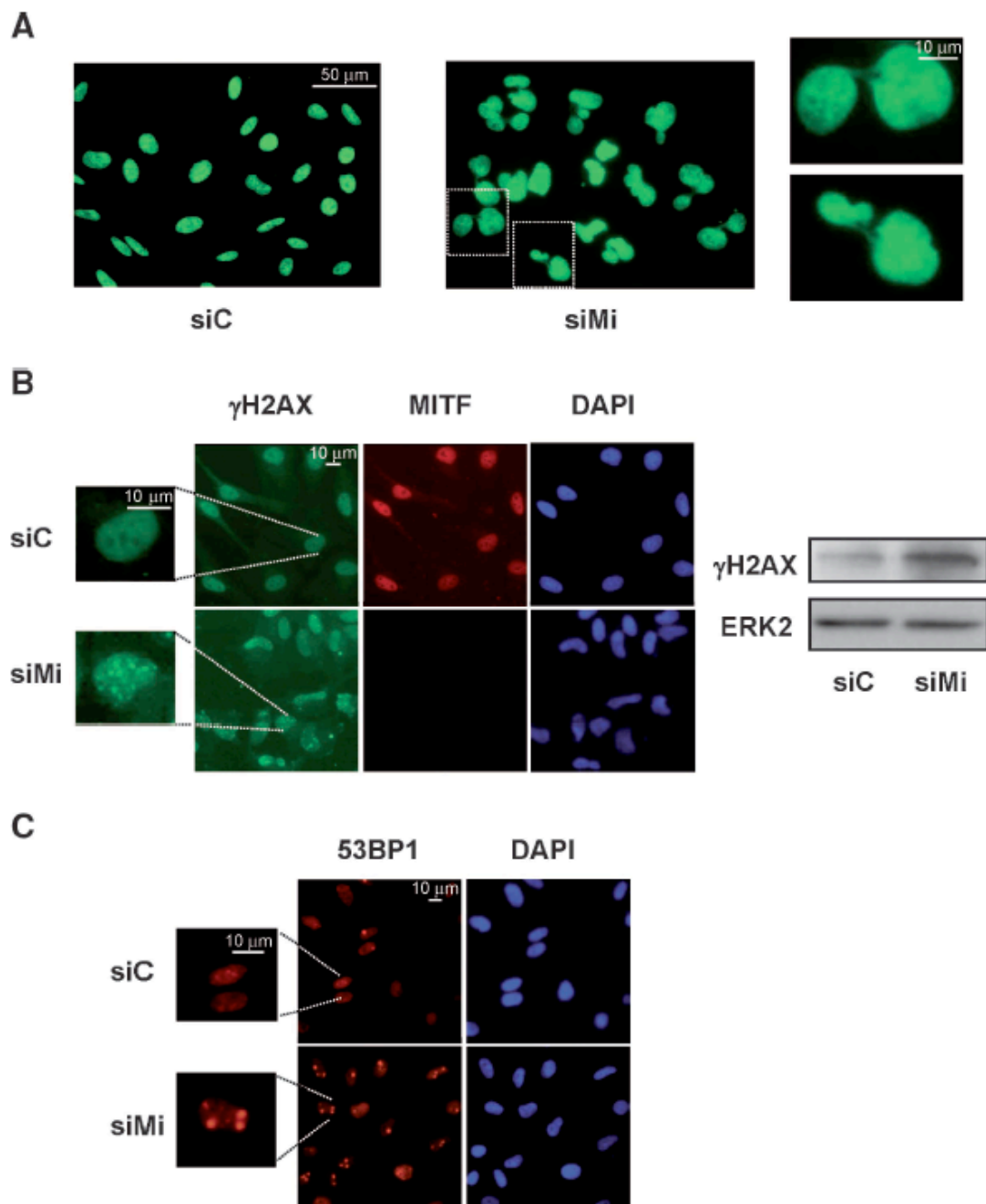


Figure 2

Q3 : que signifie la présence de l'histone gammaH2AX ? quel est le rôle de ce variant des histones ?

Q4 : que signifie la présence de 53BP dans les foyers apparus dans le noyau des cellules invalidées pour Mitf ?

Afin de caractériser la réponse DDR (DNA damage response) dans ces cellules, la détection de la forme phosphorylée sur la thréonine 68 de la protéine Chk2 est entreprise. pT68 est en effet le premier site phosphorylé sur Chk2 pour permettre à cette kinase de s'homodimériser et de s'activer par auto-phosphorylation sur la thréonine 387. La détection de Mitf dans ces cellules est également entreprise par immunofluorescence, ou après un western blot (Figure 3A).

Afin de savoir si l'activation de Chk2 est nécessaire pour induire la sénescence dans ces cellules, un traitement pharmacologique de ces cultures avec un inhibiteur (inhChk2) est réalisé (Figure 3B) ; l'utilisation de cet inhibiteur réduit de façon importante le nombre de cellules en sénescence (on passe de 68% à 15% de cellules positives pour la betagalactosidase acide).

Chk2 étant activé par des kinases amont, des inhibiteurs d'ATM (KU55935) ou de DNAPK (Nu7076) sont utilisés sur les cellules de mélanomes traitées par siRNA, et l'activation de Chk2 mesurée à l'aide de l'anticorps reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée sur T68 (Figure 3C). L'incidence de ces inhibiteurs sur l'induction de la sénescence est également mesurée.

Enfin, l'activation d'ATM est mesurée dans ces cellules à l'aide de l'anticorps reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée d'ATM sur la S1981 (Figure 3D).

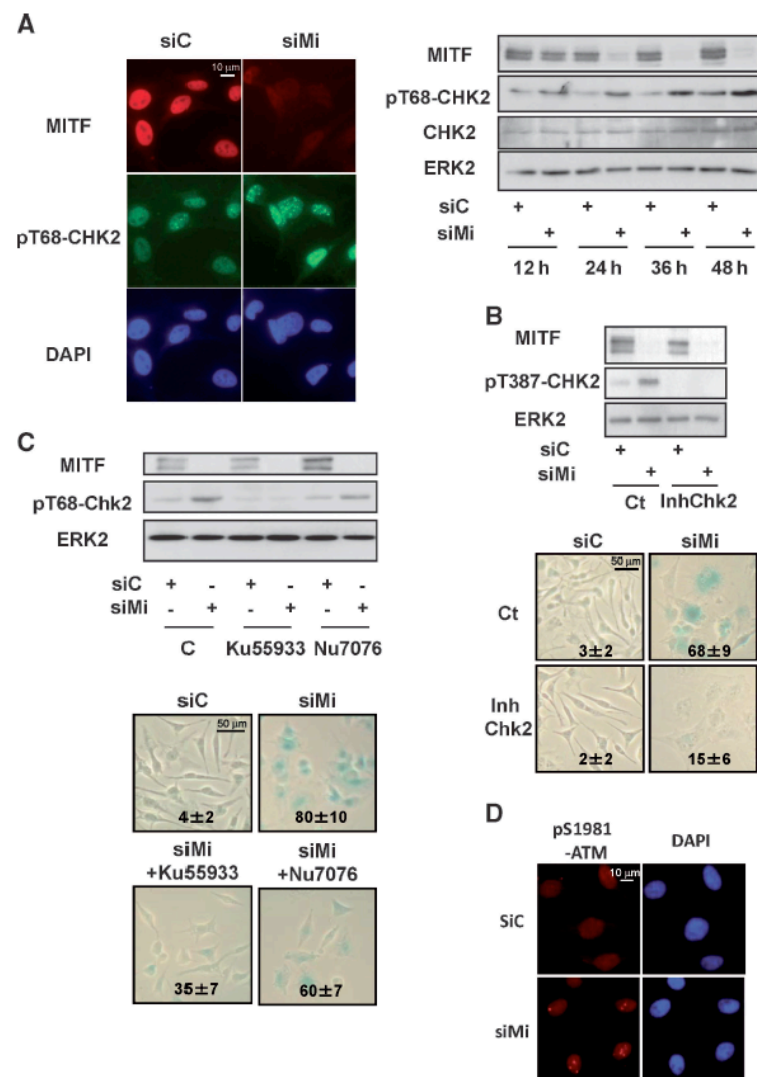


Figure 3

Q5 : quelle est la cinétique d'induction de pT68-Chk2 en réponse à l'extinction de Mitf ?

Q6 : quel est le rôle de Chk2 dans l'induction de la sénescence ?

Q7 : quelle est la kinase située en amont de Chk2 dans la voie de réparation des cassures de l'ADN suite à l'extinction de Mitf ?

Afin d'apprécier le rôle de p53 dans l'induction de la réponse DDR induite par l'extinction de Mitf, la figure 4A montre l'effet de siRNA Mitf sur l'immunolocalisation de p53 dans les cellules. La figure 4B montre l'effet de l'extinction de Mitf sur l'accumulation de p53, et sa phosphorylation sur la serine 15, mesurée 36 heures après l'ajout de siRNAMitf (siMi). Cette phosphorylation est requise pour la stabilisation de p53. L'activité d'un promoteur cible de p53 (pG13) lié à la luciférase est mesurée dans les cellules traitées avec un siRNA contrôle (siC) ou un siRNA anti Mitf (siMi). La sécrétion d'inhibiteur du plasminogène (PAI-1) est mesurée dans ces cellules. L'effet des siRNA sur la protéine Mitf est comparé à l'effet sur la protéine Erk.

Le PAI-1 étant un gène cible de p53, l'activité du promoteur du PAI-1 est mesurée après extinction de Mitf, p53, ou de ces deux gènes (Figure 4C). La fixation de p53 sur le promoteur de PAI-1 est mise en évidence par la technique de chromatine immunoprécipitation dans les 501 mel, l'ADN du gène de ménage GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate déhydrogenase) servant de contrôle (Figure 4D).

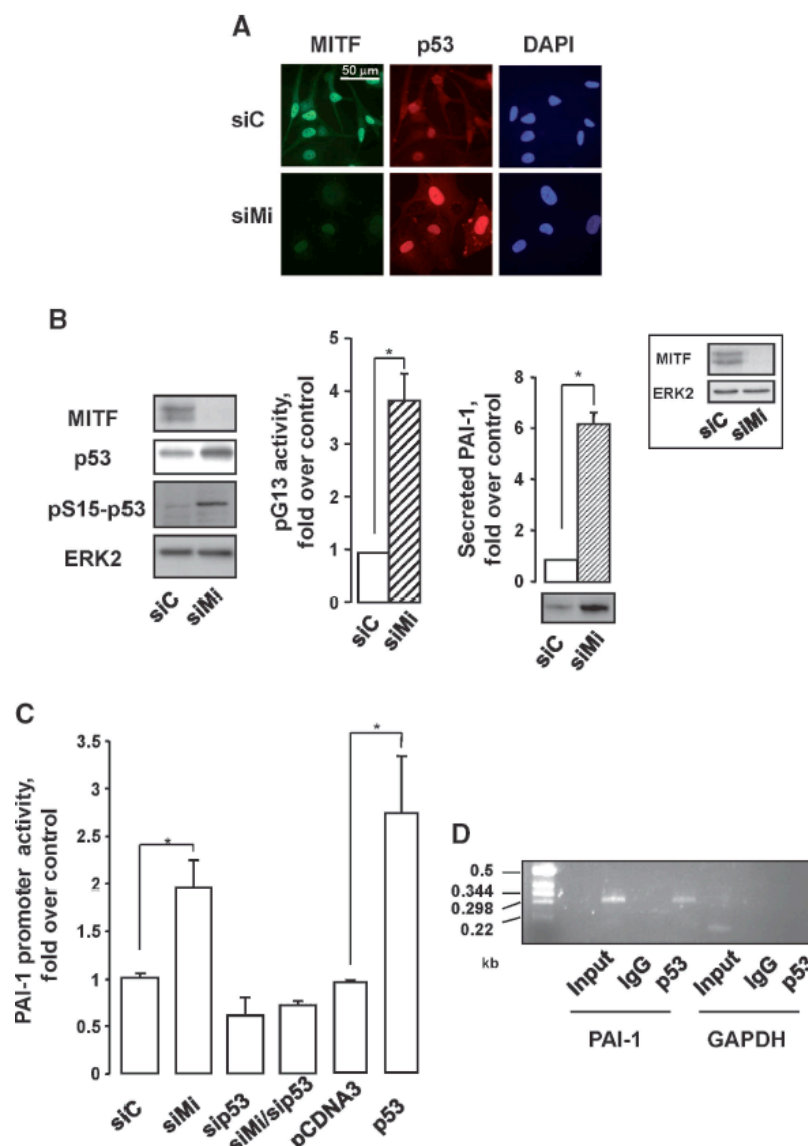


Figure 4

Q8 : quel est l'effet de l'extinction de Mitf sur p53 ?

Q9 : quel est l'effet de Mitf sur l'expression et la sécrétion de PAI-1 ?

Q10 : quel est l'effet de p53 sur l'expression de PAI-1 ?

Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- κ B-associated secretome (PNAS)

Mickaël Ohanna,^{1,2} Sandy Giuliano,^{1,2} Caroline Bonet,^{1,2} Véronique Imbert,^{2,3} Véronique Hofman,^{2,4,5} Joséphine Zangari,^{1,2} Karine Bille,^{1,2} Caroline Robert,⁶ Brigitte Bressac-de Paillerets,⁷ Paul Hofman,^{2,4,5} Stéphane Rocchi,^{1,2,8} Jean-François Peyron,^{2,3,9,10} Jean-Philippe Lacour,⁸ Robert Ballotti,^{1,2,8} and Corine Bertolotto^{1,2,8,11}

