

TD6 myc et réparation de l'ADN

article publié dans la revue Neoplasia 14, 1190-1202, 2012.

Les cellules transformées par l'oncogène Myc présentent des cassures double brin de l'ADN et une instabilité génomique. Afin de savoir si Myc influe sur l'induction des lésions et/ou sur leur réparation, des cellules exprimant c-Myc (H1299) sont irradiées (IR) à 5 Gy puis collectées avant irradiation (U = unirradiated) et après différents temps post-irradiation, variant de 15 min à 12h. L'immunodétection de c-Myc (anticorps secondaire alexa-488, vert) et γ -H2AX (anticorps secondaire alexa-594, rouge) est réalisée sur ces cellules, les cellules sont traitées au DAPI (intercalant de l'ADN permettant de visualiser la chromatine, bleu) et une superposition des images (Merge, vert+rouge, puis merge trois couleurs) est réalisée.

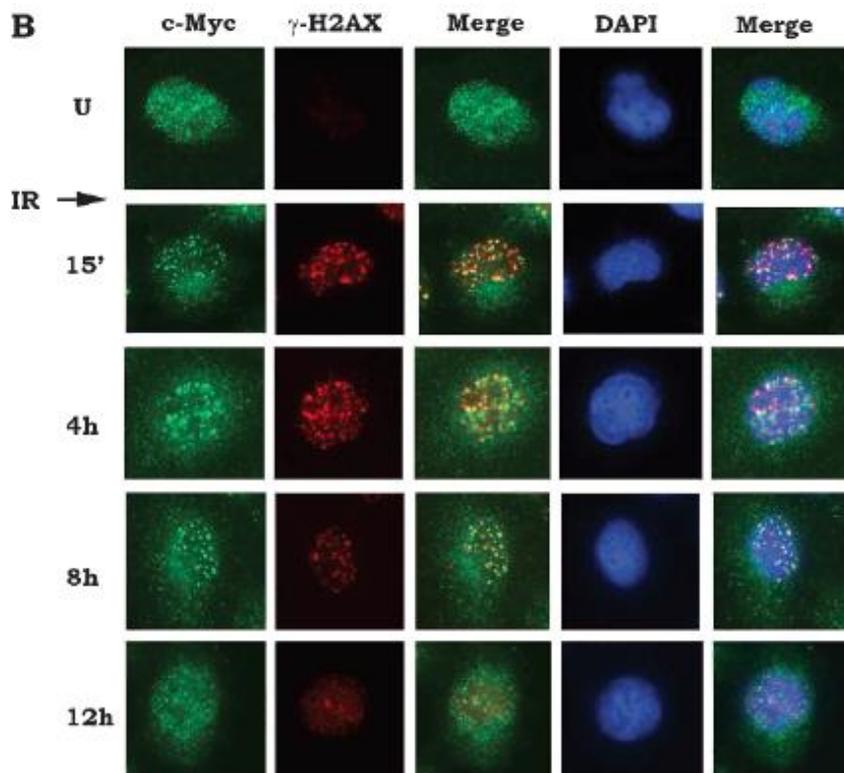
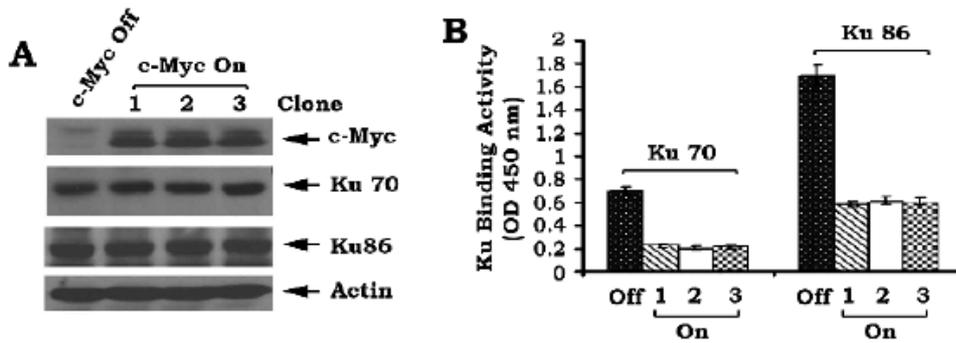


Figure 1

Question 1. Décrivez la fonction des protéines c-Myc et γ -H2AX.

Question 2. Que pouvez-vous dire de la présence et de la localisation des protéines c-Myc et γ -H2AX en interprétant la figure 1.

Les cellules (HO15.19) n'exprimant pas c-Myc sont transfectées par un vecteur stable exprimant la protéine c-Myc sous contrôle d'un promoteur inductible actif en présence de doxycycline (état On). La protéine c-Myc n'est pas induite en absence de doxycycline (état Off). Trois clones distincts sont étudiés. L'efficacité de réparation des cassures de l'ADN est mesurée à l'aide d'un Kit commercial qui quantifie, grâce à un anticorps secondaire reconnaissant l'anticorps anti KU, l'efficacité de liaison à l'ADN des protéines KU présentes dans des extraits nucléaires. Les protéines KU70 et KU86, ainsi que les protéines c-Myc induites sont analysées par western blot à l'aide d'anticorps spécifiques (Figure 2A), et l'efficacité de liaison à l'ADN des protéines KU70 et KU86 est mesurée (Figure 2B).



Figures 2 A et 2B

Question 3. Précisez la fonction des protéines KU70 et KU86 ; dans quel mécanisme de réparation de l'ADN sont-elles impliquées ?

Question 4. Commentez les figures 2A et 2B ; Quelles hypothèses pouvez-vous faire concernant l'effet de c-Myc sur la fixation de KU70 et KU86 à l'ADN ?

Dans le but d'étudier l'efficacité de réparation de l'ADN lésé dans ces cellules, les cellules c-Myc Off et les cellules c-Myc On, sont irradiées à une dose de 5Gy (IR) et récoltées avant irradiation (U) et à différents temps post-irradiation. L'ADN de 5×10^6 cellules est déposé dans chaque puits et soumis à une électrophorèse en champ pulsé pendant 15h, ce qui permet de séparer des ADNs de très haut poids moléculaire (Figure 2C). Parallèlement à l'étude de l'ADN, le nombre de foyers γ -H2AX par cellule et le nombre de cellules qui présentent au moins un foyer γ -H2AX (Foci positive cells) sont déterminés pour les cellules c-Myc Off et c-Myc On (Figure 2D).

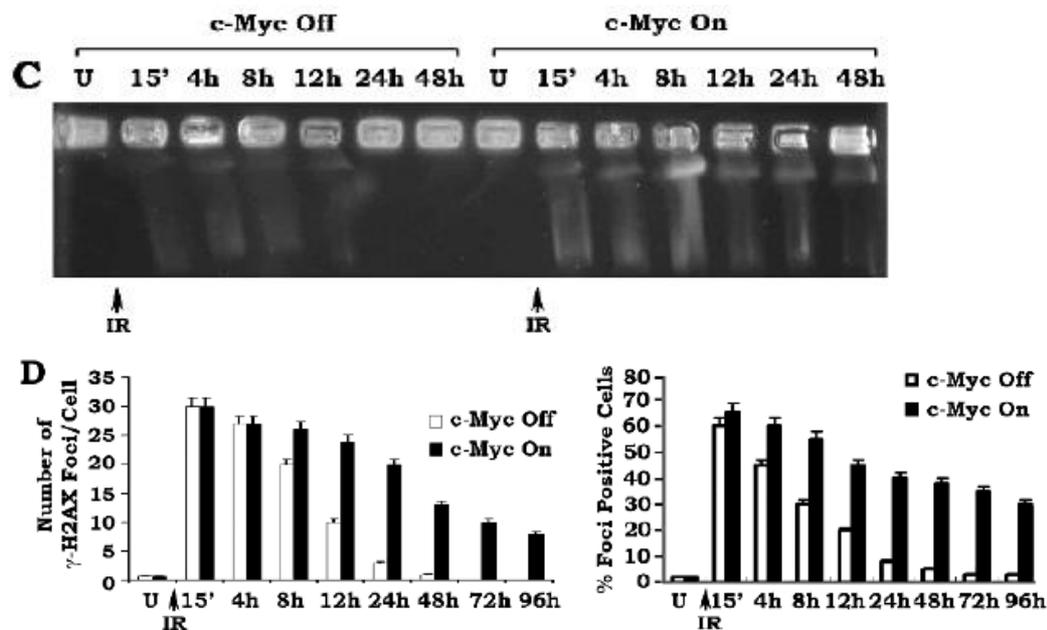


Figure 2

Pour mesurer l'effet au long cours de c-Myc sur les cultures, les cellules sont cultivées en présence de la doxycycline pendant 4 semaines, et 30 métaphases sont analysées par

hybridation in situ avec une sonde télomère fluorescente. Les anomalies chromosomiques par métaphase sont également analysées dans la culture (Figure 2 E, F).

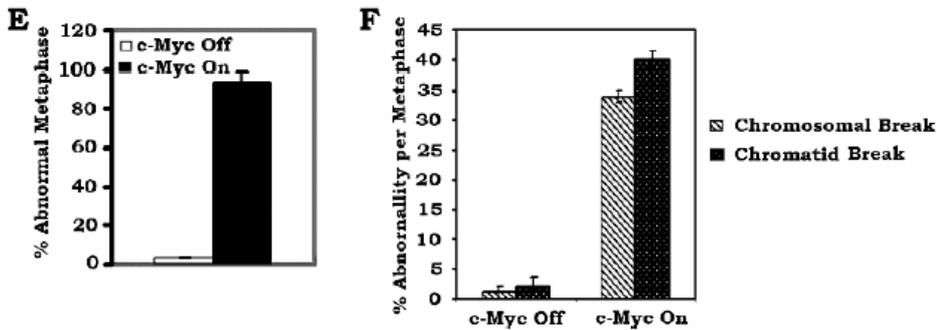


Figure 2 E et 2F

Question 5. Quel est l'effet de c-Myc sur la réparation de l'ADN et quelles en sont les conséquences prévisibles? Justifiez votre réponse en analysant les figures 2C, 2D, 2E et 2F.

Afin de préciser si c-Myc peut interagir avec la protéine KU70, des expériences de co-immunoprécipitation sont conduites sur les cellules H1299 irradiées recevant une dose croissante de rayonnement (Figure 3A). Les lysats sont immunoprécipités par des anticorps anti-c-Myc puis les protéines précipitées sont révélées par un western blot avec des anticorps anti KU70. Pour éliminer la possibilité que de l'ADN soit présent entre les protéines, les extraits de cellules irradiées à 5 Gy sont traités à la DNaseI et analysés comme précédemment (Figure 3B). Enfin, des expériences de co-immunoprécipitation sont conduites sur des protéines purifiées (Figure 3C). IgG, immunoglobuline contrôle. Input, quantité de protéines engagées dans l'expérience.

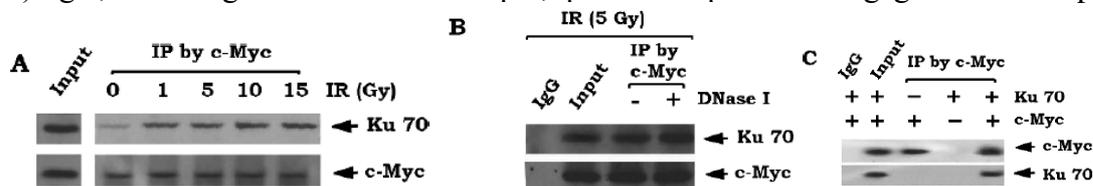


Figure 3

Question 6. Analysez les figures 3A, 3B et 3C; y a t'il interaction entre c-Myc et KU70 ? cette interaction est-elle directe ? Justifiez vos réponses.

La protéine c-Myc porte plusieurs domaines fonctionnels. Dans sa partie aminoterminal, deux domaines très conservés, les Myc-box (MB1, aa 45-63 et MBII, aa 129-143) importants pour les fonctions régulatrices de la transcription de c-Myc. Des mutants de délétion de ces boîtes sont construits, ainsi qu'un mutant ayant perdu le domaine bHLH de fixation à l'ADN et dimérisation de la protéine. Ces mutants sont exprimés grâce au vecteur inductible (On, Off) dans les cellules HO15.19 n'exprimant pas c-Myc. La Figure 4A montre un western blot réalisé sur les cellules traitées à la doxycycline, et le résultat d'un western blot Myc réalisé après immunoprécipitation des protéines avec un anticorps anti-KU70.

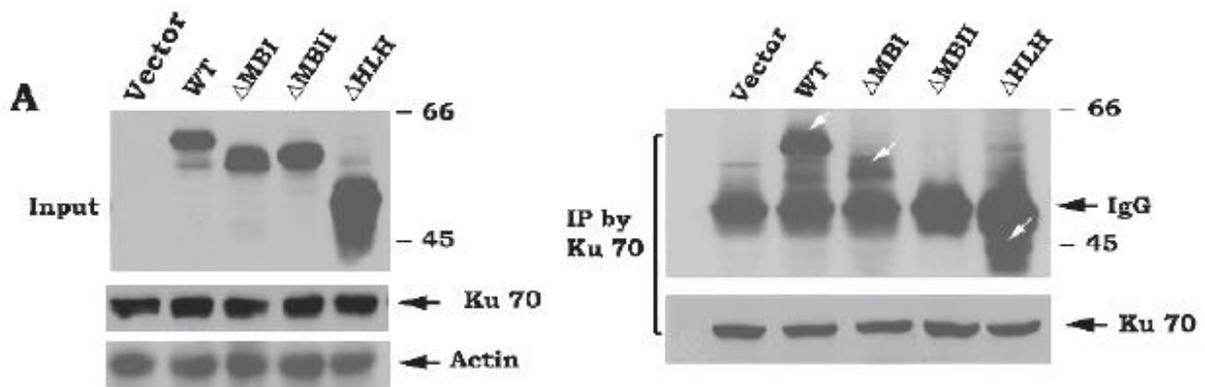


Figure 4A

La capacité de liaison à l'ADN de KU70 et KU86 est mesurée sur les différentes cellules exprimant les formes tronquées de c-Myc et irradiées à une dose de 5 Gy ; les extraits cellulaires sont préparés 24h après irradiation. La Figure 4B montre la fixation des différentes protéines KU à l'ADN mesurée à l'aide du Kit déjà décrit.

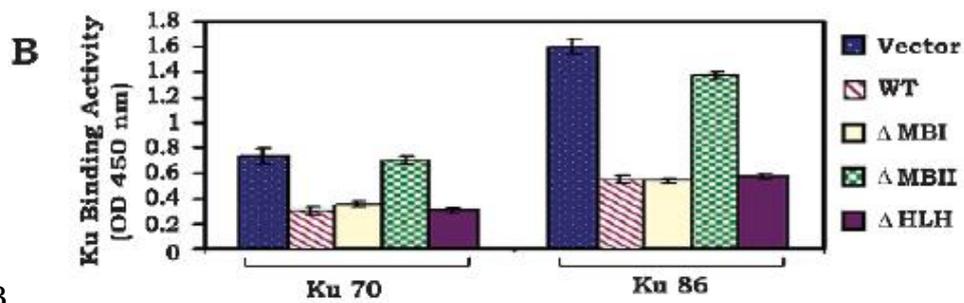


Figure 4B

Question 7. Quelle est la partie de Myc nécessaire à l'interaction avec les protéines KU ?

L'efficacité de réparation des lésions de l'ADN post irradiation pour ces différentes cellules est étudiée par la technique d'électrophorèse en champ pulsé (Figure 4C ; WT, les cellules expriment la protéine c-Myc entière). La détection des foyers de réparation est analysée dans ces cellules grâce à l'immunodétection de γ -H2AX, post irradiation (IR) et 24h après (Figure 4D).

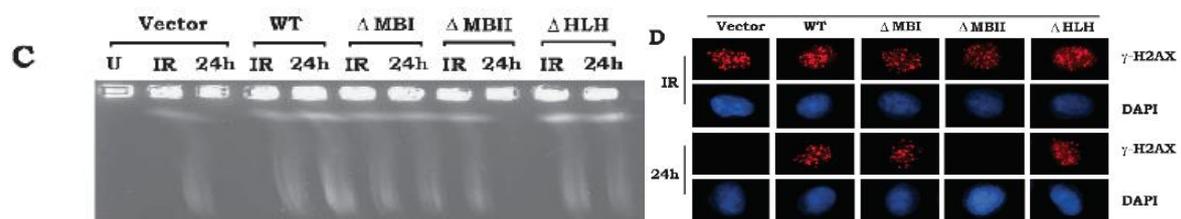
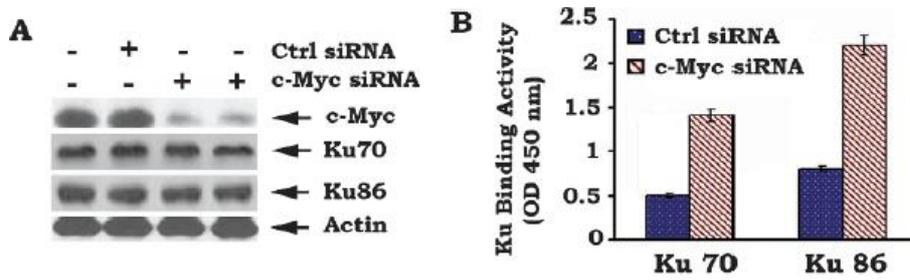


Figure 4C

Question 8. Quel est l'effet de l'interaction de c-Myc avec les protéines KU sur l'efficacité de réparation des cassures de l'ADN ? Justifiez votre réponse.

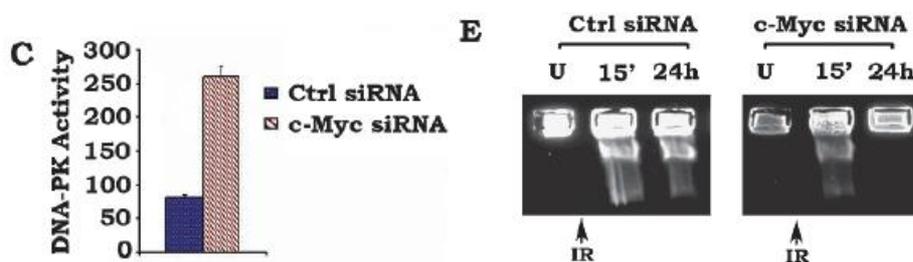
L'influence de c-Myc sur l'efficacité de la réparation de l'ADN est étudiée dans des cellules H460, exprimant des niveaux élevés de c-Myc endogène. La Figure 5A montre la détection des protéines d'intérêt par western blot dans les cellules traitées par un siRNA

contrôle ou par un siRNA anti-c-Myc. L'efficacité de fixation à l'ADN des protéines KU dans ces différents lysats est analysée (Figure 5B).



Figures 5A et 5B

L'activité kinase de DNA-PK est mesurée sur les mêmes lysats (Figure 5C) et l'efficacité de réparation de l'ADN de cellules irradiées à une dose de 5Gy est mesurée 15 min et 24h post irradiation par électrophorèse en gel pulsé (Figure 5E).



Figures 5C et 5E

La détection par des anticorps anti- γ -H2AX des foyers de réparation 15 min ou 24h post irradiation sur les cellules irradiées à une dose de 5Gy est réalisée dans la Figure 5F.

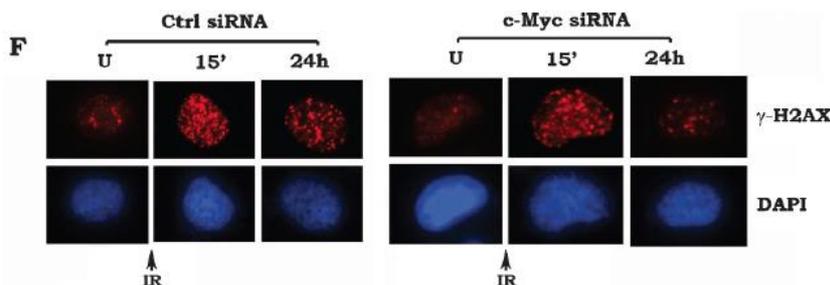


Figure 5F

Question 9. Quelle est la voie de réparation de l'ADN affectée par c-Myc? Pensez-vous que les résultats présentés dans cet article puissent contribuer aux fonctions transformantes de c-Myc? De quelle façon? Justifiez vos réponses.