

E2F1 Uses the ATM Signaling Pathway to Induce p53 and Chk2 Phosphorylation and Apoptosis

Molecular Cancer Research Vol. 2, 203 – 214, April 2004

L'inactivation de Rb conduit à la prolifération cellulaire et est responsable du développement de certains cancers. En réponse à l'inactivation de Rb, la protéine p53 est activée ce qui conduit à une augmentation de l'apoptose et ainsi à un contrôle de la prolifération tumorale. Un certain nombre d'arguments expérimentaux indiquent que le facteur E2F1, négativement contrôlé par Rb est requis pour l'activation de p53 en réponse à l'inactivation de Rb. La dérégulation de E2F1 (par sur expression ou extinction de Rb) résulte en une accumulation de p53, son activation par phosphorylation sur les serines 15 et 20 et induction de l'apoptose.

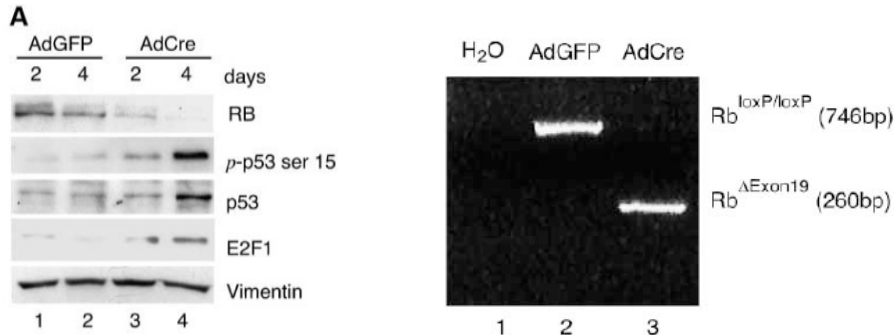
L'ataxia telangiectasia (AT) est une pathologie autosomale récessive, une ataxie cérébelleuse progressive, des télangiectasies oculocutanées une immunodéficience, une extrême sensibilité aux radiations ionisantes et une grande prédisposition aux cancers lymphoréticulaires. Le gène en cause, code une serine/thréonine kinase de haut poids moléculaire apparentée aux phosphatidylinositol 3-kinases. Les cellules dérivées de patients AT sont hyper sensibles aux irradiations ionisantes, aux produits radiomimétiques et aux inhibiteurs de topo isomérases. Les cellules mutantes ne s'arrêtent pas en G1 en réponse aux radiations ionisantes, et sont défectives pour l'induction de l'apoptose en réponse aux dommages de l'ADN. Les études moléculaires indiquent que ATM est indispensable pour faire la jonction entre les facteurs qui détectent les dommages de l'ADN ou d'autres stress cellulaires et la transmission de ces signaux aux effecteurs cellulaires appropriés, qui vont induire l'arrêt du cycle, la réparation de l'ADN ou l'induction de l'apoptose. ATM répond aux cassures double brin, alors que les pontages de thymines induits par les UV utilisent une autre kinase, ATM-and Rad3-related (ATR) kinase. Deux autres kinases, Chk1 et Chk2 sont phosphorylées et activées en réponse à ATM et ATR et sont des intermédiaires essentiels de la transduction du signal. Une cible de ces kinases est p53. ATM et ATR phosphorylent p53 sur la ser 15 et conduisent à sa phosphorylation additionnelle par Chk1, Chk2 et Pi3K. Ces phosphorylations stabilisent p53 en diminuant son interaction avec la protéine destabilisatrice mdm2. Mdm2 est négativement contrôlé par la protéine Arf, codée par le locus CDKN2A.

E2F1 est également une cible de ces kinases sur la ser31, conduisant là encore à la stabilisation de la protéine. La phosphorylation sur Ser31 crée un site de fixation pour la protéine TopBP1 qui porte un domaine d'interaction avec BRCA1 et entraîne E2F1 dans les foyers contenant BRCA1 induits en réponse aux dommages de l'ADN. La phosphorylation de E2F1 conduit à l'activation de p73, un proche parent de p53 également capable de déclencher une apoptose dépendante de E2F1. E2F1 active l'expression de Arf, ce qui stabilise p53.

Des mutations hypomorphes de NBS1 cause le Nijmegen breakage syndrom (NBS), une pathologie ressemblant à AT. La protéine NBS1 fait partie du complexe de réparation contenant les protéines Mre11-Rad50, impliquées dans les réparations des cassures doubles brins par recombinaison homologue. Comme p53 et E2F1, NBS1 est phosphorylée par ATM en réponse aux dommages de l'ADN. En plus de son rôle dans la réparation de l'ADN, NBS1 est requis pour la signalisation ATM, car dans les cellules mutées pour NBS1, ATM ne peut activer Chk2. La partie N-terminale de NBS1 interagit avec la partie C-terminale de E2F1.

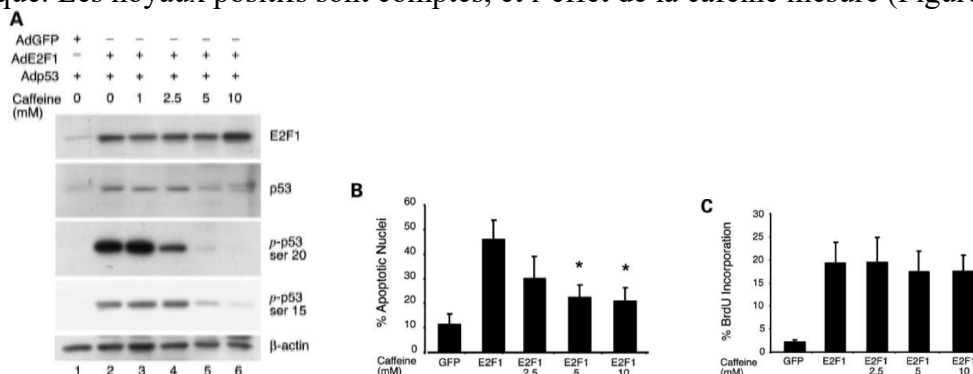
La figure 1 montre le résultat de l'inactivation de Rb en réponse à l'infection par un adenovirus porteur de la recombinaise cre (AdCre). Cette enzyme a la propriété de rabouter les séquences flox et ainsi supprimer l'ADN qu'il y a entre ces séquences ; Or les cellules

infectées portent un gène Rb recombinant floxé. Le virus AdGFP sert de contrôle. Les cellules sont récoltées 2 et 4 jours après infection, et une analyse en western blot réalisée avec des anticorps spécifiques pour détecter Rb, p53, et la p53 phosphorylée sur la serine15, E2F1 et la vimentine. Dans la partie B, l'ADN génomique des cellules est isolé et utilisé en PCR avec des oligonucléotides permettant d'amplifier l'exon 19 dans lequel les séquences flox ont été introduites.



Question 1 : décrivez brièvement la technique du western blot ; interprétez les résultats ; quel est l'intérêt de mesurer le taux de vimentine dans les cellules ? Quelle expérience additionnelle pourriez vous demander pour confirmer que la disparition de Rb est bien responsable des évènements moléculaires observés ?

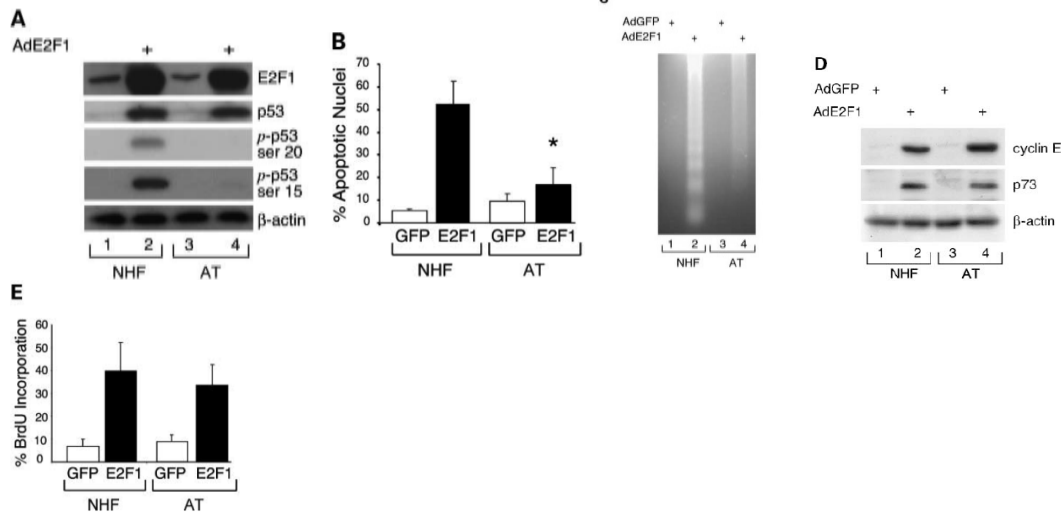
Afin d'étudier si ATM sert de médiateur à E2F1 pour phosphoryler p53 une expérience est entreprise pour étudier le rôle de la caféine un inhibiteur de l'activité kinase de ATM et ATR. Des adenovirus permettant d'exprimer E2F1 ou p53 sont utilisés pour infecter des fibroblastes, les cellules ont ensuite lysées et les extraits analysés par western blot avec des anticorps qui permettent de détecter E2F1, p53, et les formes phosphorylées de p53 sur la ser20 et la ser15 (Figure 2 A). L'induction de l'apoptose dans les cellules est mesurée en comptant le nombre de noyaux condensés observés en microscopie grâce à un intercalant de l'ADN observé après éclaircissement aux rayons ultra-violets, et l'effet de doses croissantes de caféine est mesuré (Figure 2B). L'entrée des cellules en phase S est mesurée par l'incorporation de BrdU, bromodeoxy-uridine, qui va ensuite être détectée par un anticorps spécifique. Les noyaux positifs sont comptés, et l'effet de la caféine mesuré (Figure 2C).



Question 2 : interprétez les résultats ; aurais t'on pu mesurer le taux de vimentine, comme dans la figure 1 ? quelles autres techniques auraient pu être utilisées pour mesurer l'apoptose ? quelles conclusions tirez vous du fait que la caféine diminue la phosphorylation de p53 et l'entrée des cellules en apoptose ? pourquoi étudier l'entrée des cellules en phase S ?

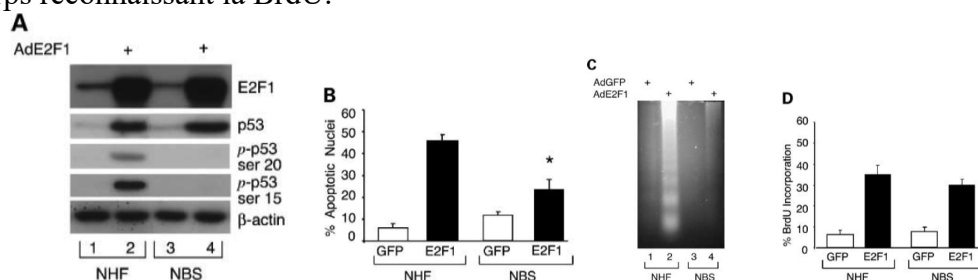
Afin de savoir si ATM est requis pour la phosphorylation de p53 induite par E2F1, des fibroblastes de patients AT sont mis en culture et comparés avec des fibroblastes non mutés. Les fibroblastes sont infectés avec des adénovirus codants E2F1, les lysats cellulaires sont préparés 48h après et traités en western blot avec des anticorps anti E2F1, p53, p53 phospho-ser 20, p53 phospho-ser15 et la beta actine (Figure 3A). L'induction de l'apoptose est

également mesurée sur ces cellules (Figure 3B) par le décompte des noyaux condensés. La Figure 3C montre une analyse de l'ADN de ces cellules qui a migrés dans un gel d'agarose, coloré ensuite à l'aide d'un intercalant de l'ADN et observé sous radiation UV. La Figure 3D montre un western blot réalisé avec des anticorps reconnaissant la cycline E et p73. La Figure 3E présente le décompte des noyaux marqués par un anticorps reconnaissant la BrdU.



Question 3 : quel est le rôle d'ATM dans l'expression de p53 induite par E2F1? dans la phosphorylation de p53 induite par E2F1? la phosphorylation de p53 est elle requise pour l'induction de l'apoptose en réponse à E2F1? et dans l'entrée des cellules en phase S? pourquoi mesurer le taux de cycline E? la p73 induite par E2F1 est elle requise pour l'induction de l'apoptose?

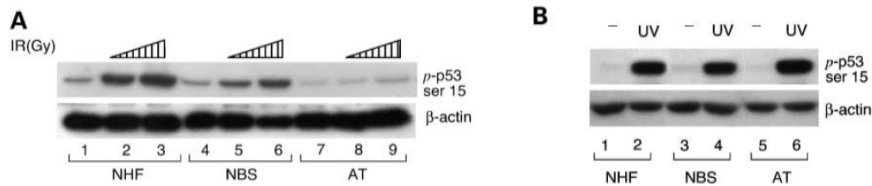
La protéine NBS1 est également requise pour que E2F1 induise la phosphorylation de p53. Afin d'étudier le rôle de NBS1 dans la phosphorylation de p53 induite par ATM en réponse à l'expression de E2F1, des fibroblastes sont préparés à partir de patients atteints du Nijmegen breakage syndrome. Les fibroblastes sont infectés avec des adénovirus codant E2F1, et les lysats cellulaires préparés 48h après et traités en western blot avec des anticorps anti E2F1, p53, p53 phospho-ser 20, p53 phospho-ser15 et la beta actine (Figure 4A). l'induction de l'apoptose est également mesurée sur ces cellules (Figure 4B) par le décompte des noyaux condensés. La figure Figure 4C montre une analyse de l'ADN de ces cellules qui a migrés dans un gel d'agarose, coloré ensuite à l'aide d'un intercalant de l'ADN et observé sous radiation UV. La figure Figure 4D présente le décompte des noyaux marqués par un anticorps reconnaissant la BrdU.



Question 4 : quel est le rôle de NBS1 dans l'expression de p53 induite par E2F1? dans la phosphorylation de p53 induite par E2F1? quelle critique peut on faire à la figure C? la protéine NBS1 est elle requise pour l'entrée des cellules en phase S?

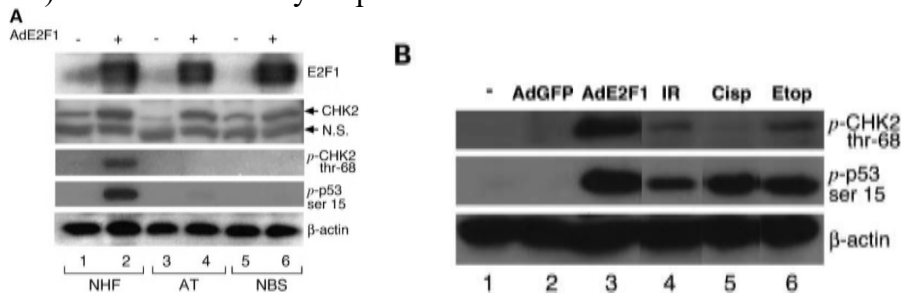
Afin de vérifier si la perte de NBS1 empêchait toute phosphorylation de p53, ces cellules mutantes pour ce gène sont traitées aux rayons ionisants et comparées avec les cellules contrôles (NHF) ou les cellules mutantes pour ATM (AT). Les cellules sont irradiées avec 3, 6, et 9 Gy IR (1Gy : énergie 1Joule/Kg ; 1 Kjoule vaut 238,85 calories). Les cellules sont récoltées 2,5 heures après exposition, lysées et les extraits analyses en western blot avec

les anticorps reconnaissant la p53 phospho-ser15 et la beta actine (Figure 5A). Dans la figure 5B, les cellules ont traitées par une irradiation UVB de 100 J/M², collectées 8 h après et les lysats traités en western blot avec les même anticorps.



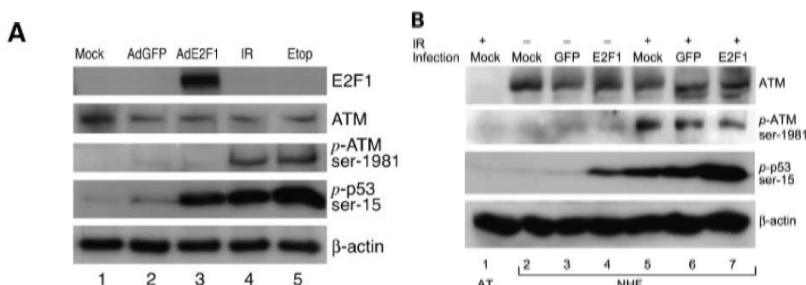
Question 5 : les mécanismes d'activation de p53 sont-ils identiques dans toutes ces cellules ? pourquoi l'activation de p53 est elle observé après irradiation UV dans les cellules mutantes pour ATM ? quelle est la kinase responsable de la phosphorylation observée ?

Afin d'explorer le rôle de Chk2, kinase requise en aval d'ATM dans la transmission du signal de lésion de l'ADN, dans la phosphorylation de p53 induite par E2F1, les fibroblastes utilisés dans les expériences précédentes sont infectés par un adénovirus contrôle (-) ou un adénovirus codant E2F1. Les lysats cellulaires sont ensuite traités en western blots avec des anticorps reconnaissant Chk2 (NS est un signal non spécifique obtenu avec l'anticorps Chk2), Chk2 phospho-thr68 et p53 phospho-ser15, ainsi que la beta actine (Figure 6A). Dans la figure 6B, les cellules normales (NHF) sont traitées avec des agents qui créent des lésions de l'ADN, l'irradiation ionisante (IR, 10 Gy, récupérées 2h post irradiation) le cisplatine (cisp, récupérées 48h post traitement) ou l'etoposide (récupérées 48h post traitement) et les extraits analysés par western blot.



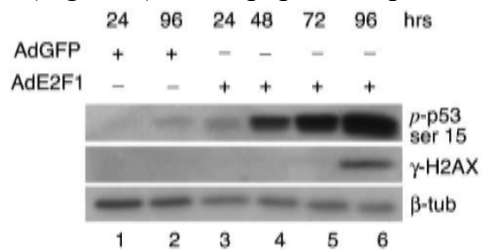
Question 6 : la phosphorylation de Chk2 en réponse à l'expression de E2F1 est elle dépendante de ATM ? Chk2 est-elle une cible transcriptionnelle de E2F1 ? quelle différence peut il y avoir entre E2F1 et les agents endommageant l'ADN dans le contrôle de Chk1 ?

La kinase ATM est activée par phosphorylation sur la serine 1981 en réponse aux dommages de l'ADN. Afin de savoir si E2F1 conduisait à l'activation d'ATM sur cette même serine, des expériences sont réalisées sur des fibroblastes infectés par l'adenovirus codant E2F1, et les lysats sont traités en western blot avec les anticorps reconnaissant les E2F1, ATM, ATM phospho-ser1981, p53 phospho-ser15 et la beta actine (Figure 7A). Les NHF sont également traités avec des radiations ionisantes afin de comparer la phosphorylation de ATM induite par les lésions de l'ADN avec l'expression de E2F1 (Figure 7B), ligne1 mutant AT.



Question 7 : ATM est elle activée par E2F1 ? l'activation de p53 par E2F1 et les radiations ionisantes sont elles indépendantes ou pas ? les mécanismes d'activation d'ATM sont ils identiques pour E2F1 et les lésions de l'ADN (IR) ?

Afin de préciser si E2F1 induit des lésions de l'ADN, l'induction de gamma H2AX est étudiée dans les NHF infectées par E2F1. Les lysats cellulaires sont traités en western blot avec des anticorps reconnaissant les protéines gamma H2AX, p53phospho-ser15 et beta tubuline (Figure 8). Une apoptose importante est observée dans les cellules à 96 heures.



Question 8 : quel est l'intérêt de rechercher l'expression de gamma H2AX ? E2F1 induit il des lésions dans l'ADN ?

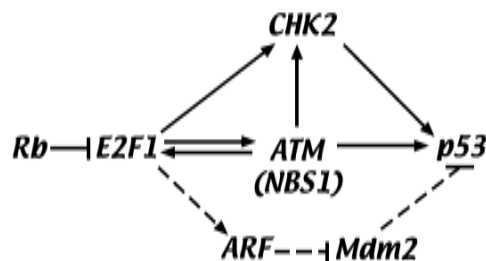


FIGURE 9. Schematic model depicting the signaling pathway between E2F1 and p53.

Question 9 ; En quoi L'absence d'apoptose induite par E2F1 dans les cellules mutantes pour ATM ou NBS1 explique-t'elle pourquoi les patients mutés dans ces gènes développent plus de cancers que les autres ?