

Rôle des Chaperons d'Histone dans la Stabilité Génomique

ASFGENOMSTAB-Blanc 2007

Carl MANN-SBIGeM-CEA/Saclay



Colloque ANR-Biologie & santé 2011

Contexte et Objectifs

Chromatine et stabilité génomique:

1. Substrat des enzymes de réplication et réparation de l'ADN, et participe à la signalisation des dommages à l'ADN et le recrutement des protéines de checkpoint et de réparation.
2. Impliquée dans la répression stable des gènes de prolifération lors de la sénescence induite par des stress génotoxiques et l'expression des oncogènes chez les mammifères.

Les chaperons d'histone comme Asf1 sont impliqués dans la réponse aux stress génotoxiques et dans le silencing transcriptionnel.

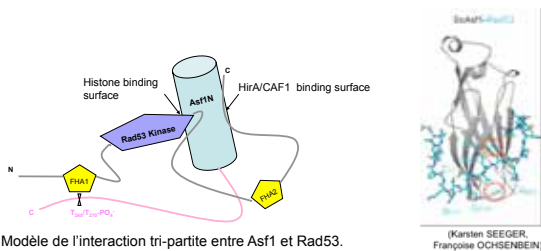
Les objectifs de ce projet:

1. Etudier la structure et la fonction d'un complexe entre Asf1 et Rad53, une kinase des checkpoints des dommages à l'ADN chez *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Construire et caractériser un modèle cellulaire permettant d'étudier le rôle des chaperons d'histone dans la sénescence induite par l'expression des oncogènes dans des fibroblastes humains.

Asf1-Rad53 structure et fonction: collaboration avec Françoise OCHSENBEIN-SB25M-CEA/Saclay

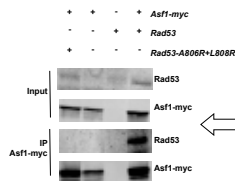
Chez la levure *S. cerevisiae*, Asf1 et Rad53 se trouvent en complexe en absence de stress génotoxique. Nous avons étudié la structure et la fonction du complexe avec les résultats suivants:

1. Le complexe est dissocié après traitement des cellules avec hydroxyurée (inhibiteur de RNR) mais pas MMS (agent méthylant), suggérant une régulation du complexe en fonction du stress génotoxique.
2. Le complexe implique 3 surfaces. F. Ochsenbein a déterminé la structure du complexe entre le peptide C-ter de Rad53 et Asf1. Ce peptide fixe la même surface d'Asf1 que les co-chaperons HirA et CAF1. Il y a donc compétition entre ces protéines pour la fixation d'Asf1. Nous avons isolé un mutant de Rad53 qui affaiblit le complexe. Ce mutant augmente la résistance aux stress génotoxiques des mutants rad9 ou rad24 qui sont partiellement défectueux pour l'activation de Rad53 en réponse aux stress génotoxiques.



Modèle de l'interaction tri-partite entre Asf1 et Rad53.

Structure d'Asf1 en complexe avec un peptide C-terminal de Rad53 montrant A806 et L808 contribuant à une surface hydrophobe.

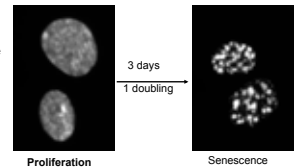


Le mutant Rad53-A806R+L808R ne co-immunoprécipite pas avec Asf1-myc montrant l'importance de cette séquence du peptide C-ter de Rad53 sur la stabilité du complexe Asf1-Rad53.

Rôle de l'hétérochromatine répressive dans la sénescence induite par l'expression des oncogènes dans des fibroblastes humains.

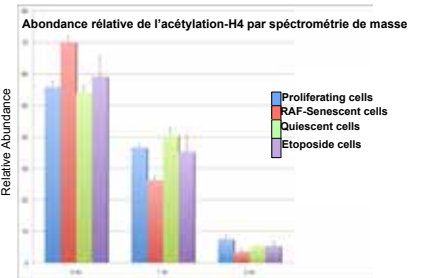
Nous avons isolé une lignée de fibroblaste humain WI-38/hTERT optimisée pour l'étude de la sénescence induite par l'activation de la kinase RAF. Cette lignée exprime une forme de la kinase RAF1 (cRAF) fusionnée à la GFP et au récepteur d'estrogène (GFP-ΔRAF1DD-ER). Après addition de 20 nM 4-hydroxy-tamoxifen, la kinase RAF s'active conduisant à une induction rapide de la sénescence manifestée par un arrêt durable de la prolifération cellulaire et la formation de foyers d'hétérochromatine (SAHFs) en 3 jours.

Foyers d'hétérochrome répressive assemblés rapidement dans des fibroblastes humains induits en sénescence par l'activation d'une kinase RAF1 oncogénique. Les figures montrent l'ADN génomique coloré au fluorochrome DAPI dans les noyaux des cellules et visualisé dans un microscope à fluorescence.



Nous avons utilisé cette lignée WI-38hTERT/GFP-RAF1-ER afin d'étudier les voies contribuant à l'entrée en sénescence après activation de la kinase RAF1. Deux voies parallèles sont impliquées. Primo, des cellules traversant la phase S après activation de la kinase RAF1 sont soumises à un stress réplicatif conduisant à l'expression du CKI (inhibiteur de kinase dépendante de cycline) p21-CIP1. La cause du stress réplicatif n'est pas bien définie, mais ne semble pas imputable à la génération des ROS (espèces actives d'oxygène). Une deuxième voie implique la dépression épigénétique du gène codant pour le CKI p16-INK4A. Le double knock-down de p16 + p21 permet une réversion rapide de cette sénescence en dépit des foyers d'hétérochromatine dans les cellules sénescences. Ce résultat suggère que l'assemblage d'hétérochromatine n'assure pas en soi un arrêt prolifératif durable. Au contraire, les résultats suggèrent que l'accumulation des CKIs est nécessaire à la maintenance de l'hétérochromatine et la répression continue des gènes de la prolifération.

Notre lignée nous permet de préparer des grandes quantités de cellules sénescences pour des analyses biochimiques de leur chromatine. Nous avons développé une nouvelle méthode pour l'analyse rapide des modifications post-translacionnelles des histones (Journal of Proteome Research. 2010. 9, 5501-5509.) et nous l'avons utilisée afin de mettre en évidence une diminution de l'acétylation de la lysine H4-K16 lors de la sénescence induite par l'activation de la kinase RAF1. Nos résultats préliminaires suggèrent que cette désacétylation contribue à la compaction de l'hétérochromatine des cellules sénescences.



Perte de 30% de H4-K16-Ac dans les cellules sénescences correspond à 15 millions de molécules/cellule! Déacétylation de H4-K16 est impliquée dans la compaction de l'ADN et le silencing transcriptionnel dans plusieurs contextes biologiques (chr X inactif, silencing chez la levure).

Perspectives:

- 1) Poursuite de l'analyse phénotypique du mutant Rad53-ALRR afin de mieux définir le rôle du complexe Asf1-Rad53 dans la stabilité génomique.
- 2) Rôle des chaperons d'histones dans la sénescence cellulaire utilisant notre lignée cellulaire et des si/shRNAs afin de dépléter les protéines.

Publications:

1. K. Contrepolis, E. Ezan, C. Mann, F. Fenaille. 2010. Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry for the fast profiling of histone post-translational modifications. J. Proteome Res. 9, 5501-5509.
2. Surprising complexity of the Asf1 histone chaperone-Rad53 kinase interaction. Yue Jiaoa, Karsten Seeger, Aurelie Lautrette, Albane Gaubert, Florence Mousson, Raphael Guerois, Carl Mann, and Françoise Ochsenbein. Soumis pour publication.
3. Parallel pathways in RAF-induced senescence and conditions for its reversion. Michael Jeanblanc, Sandrine Ragu, Claudia Gey, Kévin Contrepolis, Régis Courbeyrette, Jean-Yves Thuret, and Carl Mann. En révision à Oncogene.

CONTACT : Carl MANN

carl.mann@cea.fr

