

Etude moléculaire de la structure et de la fonction du produit d'un oncogène humain homologue à deux protéines GAPs, Msb3p et Msb4p, de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

1. Introduction

En 1995, lors de sa participation au projet de séquençage du génome de *Saccharomyces cerevisiae*, l'Unité de Biologie Animale et Microbienne de la FUSAGx a identifié un nouveau gène, *MSB4*, dont le produit est fortement similaire à la protéine levurienne Msb3p (55% d'identité sur 436 aa) et au produit de l'oncogène humain *Tre2* (47% d'identité sur 453 aa)¹.

Les gènes *MSB3* et *MSB4* codent pour deux protéines dont la structure primaire ressemble à celle des Ypt/Rab-GAPs (*GTPases Activating proteins* spécifiques des GTPases Ypt/Rabs impliquées dans le trafic vésiculaire). En effet, elles arborent le domaine catalytique très conservé des Ypt/Rab-GAPs, appelé domaine TBC. De plus, des études biochimiques *in vitro* ont montré que Msb3p² et Msb4p³ étaient deux GAPs potentielles pour un certain nombre de Ypt-GTPases. Par la suite, cette activité catalytique a été confirmée *in vivo* pour la GTPase Sec4p⁴. Par ailleurs, les précédentes études du laboratoire^{5,6} ont montré que la délétion simultanée des deux gènes *msb3* et *msb4* engendre une inhibition de croissance en présence de caféine ou DMSO, ainsi qu'une perte du mode de bourgeonnement bipolaire (perturbations dans l'organisation du cytosquelette d'actine, endomitoses, bourgeons multiples). Ces résultats sont en accord avec le rôle probable de Msb3p et Msb4p dans une des voies de liaison de la protéine Cdc42p au cytosquelette d'actine⁷. Elles seraient impliquées dans la régulation de l'exocytose et la réorganisation du cytosquelette d'actine en exerçant leur activité sur la GTPase Sec4p⁴.

L'oncogène *Tre2* a été identifié à la fin des années 80, lors d'essais de transfection-tumorigénicité à partir d'ADN issu de cellules du sarcome d'Ewing (lignée IARC-EW1)⁸. Des analyses de la séquence de *Tre2* ont révélé qu'il dérive de la fusion chimérique entre deux gènes : le gène récent *TBC1D3* qui code pour un domaine TBC et *NY-REN-60*, un gène ancien et hautement conservé⁹. Par ailleurs, l'étude de sa structure primaire met en évidence la ressemblance importante de l'oncoprotéine (786 aa) avec la protéine humaine *RNtre* (828 aa) (55% de similarité sur 460 aa)¹⁰, qui posséderait une fonction de connecteur moléculaire au sein des cellules. En effet, elle est la GAP spécifique de la GTPase Rab5 dans le processus d'internalisation du récepteur à l'EGF et d'autre part, elle joue le rôle d'effecteur de Rab5 dans une voie aboutissant à des remaniements de l'actine^{11,12}. Quant à l'oncoprotéine, Masuda *et al.* l'a décrite comme un effecteur des Rho GTPases Cdc42p et Rac1, impliqué dans la réorganisation de l'actine¹³ ainsi que comme un activateur d'Arf6 dans le système de recyclage des membranes plasmiques⁹. Les mécanismes moléculaires à l'origine du pouvoir tumoral de *Tre2* demeurent, à l'heure actuelle, inconnus. Cependant, il a été montré que l'oncogène *Tre2* exprimé dans les cellules du sarcome d'Ewing et également dans d'autres tumeurs solides humaines (leiomyosarcome, rhabdomyosarcome, carcinome de la vessie, ostéosarcome, cancer du sein), est responsable de l'apparition des cellules cancéreuses^{14,15}. Par ailleurs, dans certaines tumeurs du type ABC (*Aneurysmal bone cyst*) une translocation chromosomique t(16;17)(q22;p13) fusionne le promoteur du gène codant pour la cadhérine 11 (*CDH11*) à la phase codante de *Tre2*, entraînant une dérégulation de la transcription de l'oncogène¹⁶.

Au vu de ces données, le laboratoire a entrepris de caractériser la fonction biologique de l'oncoprotéine humaine par analyse comparative avec les deux protéines de levure, Msb3p et Msb4p. La levure, organisme "modèle et outil" par excellence chez les eucaryotes, permet en effet, d'analyser la plupart des fonctions cellulaires propres aux cellules eucaryotes supérieures^{17,18}.

Résumé des données acquises à ce jour par le laboratoire^{5,8,19,20,21,22,23}

- Il a été montré que *Tre2* est incapable de remplacer fonctionnellement les deux gènes levuriens MSB3 et MSB4 lorsqu'il est exprimé dans les cellules de levure doublement mutées, contrairement à *RNtre*.
- L'analyse de la structure primaire de *Tre2* révèle que deux acides aminés importants (arginine catalytique et glutamine stabilisatrice) pour l'activité GAP sont mutés au sein du domaine TBC. Ces résidus ont été remplacés par mutagenèse dirigée (mutations simples et double), et l'activité des protéines "corrigées" a été testée lors d'essais de complémentation fonctionnelle dans le mutant levurien *msb3msb4*. Les résultats ont montré que la présence des résidus mutés n'explique pas à elle seule l'absence d'activité catalytique de l'oncoprotéine.
- Plusieurs articles relatent l'importance des régions flanquant le domaine TBC sur l'activité catalytique des protéines Ypt/Rab-GAPs^{10,11,12}. Afin d'évaluer le rôle possible des régions situées en amont et en aval du domaine TBC sur l'absence d'activité, des protéines chimériques ont été construites par échange de séquence entre *Tre2* et *RNtre*. Ensuite, ces protéines ont été testées pour leur capacité à compléter la double mutation de levure *msb3msb4*.

L'ensemble des résultats a montré que le domaine TBC est intrinsèquement non fonctionnel mais qu'une deuxième région de 93 acides aminés en aval du TBC serait également impliquée dans la non fonctionnalité de l'oncogène humain.

2. Objectifs

2.1 Purification des protéines *Tre2* et *RNtre*

Les expériences de complémentation fonctionnelle, menées précédemment au laboratoire, ont montré que l'oncoprotéine humaine *Tre2* n'est pas active lorsqu'elle est synthétisée en levure, au contraire de la protéine *RNtre*, ou de sa forme tronquée *RNtre(408)*. Cependant, les expériences de complémentation de la double mutation *msb3msb4* n'apporte qu'une réponse indirecte quant à la fonctionnalité des protéines. Il a donc été envisagé de tester l'activité catalytique GAP *in vitro* de l'oncoprotéine et de son homologue *RNtre(408)*. Pour ce faire, un protocole de production et de purification a dû être mis au point pour chacune de ces protéines. De plus, la production en grande quantité de l'oncoprotéine est une étape nécessaire en vue de sa cristallisation et de la détermination de sa structure tridimensionnelle, qui par la suite devrait fournir des éclaircissements quant à sa fonctionnalité.

2.2 Construction de deux banques d'ADNc humaines

Afin de déterminer les protéines capables d'agir *in vivo* dans la même voie physiologique que l'oncoprotéine, la technique de l'isolement de supresseurs extragéniques a été utilisée. Pour ce faire, deux banques d'ADNc humaines ont été construites à partir d'ARN totaux de muscles squelettiques et d'ARN totaux de cellules HeLa. Ces banques seront ensuite transformées dans une souche de levure contenant une double mutation pour *msb3msb4* dans le but d'isoler les candidats humains supresseurs potentiels.

3. Résultats

3.1 Purification des protéines Tre2 et RNtre

3.1.1 Mise au point du protocole de purification

Divers essais d'expression de la protéine dans des systèmes bactériens et dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont déjà été effectués au laboratoire mais le niveau d'expression de la protéine ne se montrait pas satisfaisant. Il a donc été choisi de surexprimer la protéine dans la souche SMD1168 de *Pichia pastoris*, déficiente en protéases (Invitrogen). En effet, la levure *P. pastoris* est connue pour sa capacité à exprimer des protéines étrangères à un haut niveau d'expression.

Deux vecteurs d'expression ont été testés, un vecteur constitutif (pGAPzc – Invitrogen) et un vecteur inducible au méthanol (pPICzc - Invitrogen). Aucune expression de la protéine *Tre2* n'a été détectée pour le vecteur inducible au méthanol, contrairement au vecteur constitutif retenu pour cette protéine. Par contre, pour la protéine *RNtre*, l'utilisation du vecteur inducible au méthanol montre une meilleure expression et sera donc choisi pour cette dernière. Dans les deux cas, les protéines recombinantes sont fusionnées au tag 6xHIS du côté C-terminal, facilitant leur détection par la technique du Western Blot mais aussi leur purification par colonne d'affinité au nickel.

Pour la partie purification des protéines, divers colonnes de purification étaient à notre disposition : deux colonnes échangeuses d'ions anioniques (Resource Q 6 ml – Amersham Biosciences et DEAE), une colonne échangeuse d'ions cationiques (Resource S 6 ml - Amersham Biosciences), une colonne d'affinité au nickel sepharose et une colonne de tamis moléculaire. De nombreux essais de purification ont permis d'établir un protocole de purification spécifique pour chacune des protéines en collaboration avec l'équipe du Professeur V. Stalon (Laboratoire de Microbiologie, ULB, Bruxelles). Ces protocoles sont décrits au point 3.2 pour *Tre2* et 3.3 pour *RNtre*.

3.1.2 Purification de l'oncoprotéine *Tre2*

Tre2 est une protéine de 93 KDa et de PI de 8,7.

La mise au point du protocole de purification de *Tre2* a été obtenue comme suit. Une pré-culture de la souche de *P. pastoris* SMD1168, transformée avec le vecteur pGAPzc comprenant le gène *Tre2*, a été lancée pendant 12h dans 30 ml du milieu YPD (Milieu riche) à 29°C. La densité optique de cette pré-culture a été mesurée à 5,6. La culture a ensuite été lancée en ajoutant ce volume à 2,5 litres de milieu YPD. A une densité d'environ 8,6 ; et après 16h de temps d'incubation, la culture a été centrifugée et le culot récupéré.

Ensuite, les protéines totales ont été extraites après lyse des cellules par vortexage aux billes de verre dans du tampon phosphate de sodium 20 mM + glycérol 5% + inhibiteurs de protéases (Complete EDTA free - Roche) pH 7,5 et l'extrait brut obtenu a été dilué trois fois dans ce même tampon.

Cet extrait a été divisé en 3 fractions égales. Chacune de ces fractions a été déposée sur colonne échangeuse d'ions anioniques (DEAE). Après y avoir ajouté du NaCl 1M, les flow through de ces colonnes ont été récupérés, rassemblés et déposés sur une colonne d'affinité au nickel. Le pic de protéines obtenu sur cette colonne a ensuite été dialysé afin d'en ôter l'imidazole et de ramener la concentration de NaCl de 1M à 150 mM. L'échantillon ainsi obtenu a alors été déposé sur une colonne de tamis moléculaire. Grâce à l'étalonnage de cette colonne, effectué auparavant, nous avons récupéré les fractions correspondant au volume d'élution d'une protéine de 93 KDa. Ce protocole nous a donc permis d'obtenir un échantillon de 4 ml ayant une concentration en protéines d'environ 38 µg/ml. Cet échantillon contenant *Tre2* est pur à environ 50%. La présence de cette protéine a été vérifiée par migration de l'échantillon sur gel d'électrophorèse et coloration de ce gel au bleu de coomassie (figure 1).

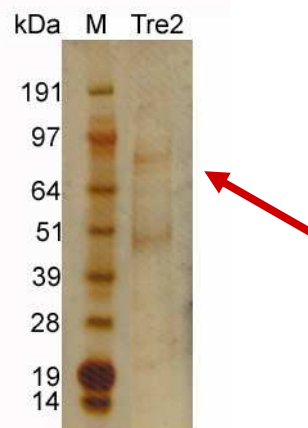


Figure 1 : Analyse SDS-PAGE. Purification de *Tre2*. L'échantillon analysé a été collecté après un tamis moléculaire. Les protéines ont été visualisées par coloration argentique du gel.

3.1.3 Purification de la protéine *RNtre*

RNtre est une protéine de 51,7 KDa et de PI de 6,9.

La mise au point du protocole de purification de *RNtre* a été obtenue comme suit. Une pré-culture de la souche de *P. pastoris* SMD1168, transformée avec le vecteur pPICzc comprenant le gène *RNtre*, a été lancée pendant 12h dans 200 ml du milieu BMGY (*Buffered Glycerol-complex Medium*). La densité optique de cette pré-culture a été mesurée à 7,6. La pré-culture a alors été centrifugée et les cellules contenues dans le culot resuspendues dans du milieu BMMY (*Buffered Methanol-complex Medium*) de sorte que la culture ait une densité optique de 1. A une densité d'environ 7, et après 16h de temps d'incubation, la culture a été centrifugée et le culot récupéré.

Ensuite, les cellules contenues dans le culot ont subi une lyse par extraction aux billes de verre dans du tampon phosphate de sodium 20 mM + glycérol 5% + inhibiteurs de protéases pH 8,0 et l'extrait brut obtenu a été dilué deux fois dans ce même tampon.

Cet extrait a été divisé en 3 fractions égales. Chacune de ces fractions a été déposée sur colonne échangeuse d'ions anioniques (Resource Q 6 ml – Amersham Biosciences). Les flow through de ces colonnes ont été récupérés et chacun d'eux a ensuite été déposé sur un diaflow (membrane avec un cut-off de 10 KDa) afin de concentrer l'échantillon et d'éliminer certains contaminants de petite taille. Chaque échantillon concentré a alors été déposé sur une colonne d'affinité au nickel. Deux pics ont été obtenus. Les deuxièmes pics des trois colonnes d'affinités, où se situe en majorité la protéine *RNtre*, ont été rassemblés et déposés sur une colonne échangeuse d'ions cationiques (Resource S 6 ml - Amersham Biosciences). Finalement, le flow through de cette dernière colonne a été récupéré et concentré grâce à un diaflow (cut-off de 10 KDa) afin d'obtenir un échantillon de 19 ml ayant une concentration de 0,40 mg/ml. Cet échantillon contient la protéine *RNtre* pure à environ 98 %. La présence de celle-ci a été vérifiée par migration de l'échantillon sur gel d'électrophorèse et coloration au bleu de coomassie (figure 2) ainsi que par Western Blot.

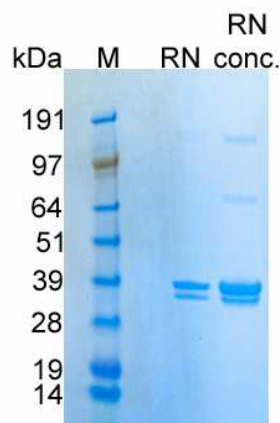


Figure 2 : Analyse SDS-PAGE. Purification de *RNtre*. Le puits de gauche représente l'échantillon contenant la protéine *RNtre* non concentré et celui de droit, l'échantillon concentré sur diaflow et pure à environ 98 %. Les protéines ont été visualisées par coloration du gel au bleu de Coomassie.

3.2 Construction de deux banques d'ADNc humaines

Les banques d'ADNc ont été créées grâce au « Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit » (BD Biosciences). Le vecteur contenu dans ce kit est un vecteur bactérien. Pour plus de facilité pour la suite, un vecteur navette, le pYX112-Sfi, a été construit à partir du pYX112 (Ingenius) et utilisé à la place de celui du kit.

Pour tester le vecteur pYX112-Sfi et réaliser un contrôle positif dans nos expériences, un dernier vecteur a été construit. Ce vecteur correspond au vecteur navette pYX112-Sfi dans lequel le gène *RNtre* a été cloné. En effet, comme décrit dans l'introduction, *RNtre* est capable de remplacer fonctionnellement la double mutation *msb3msb4* en levure.

3.2.1 Construction du vecteur navette

Afin de construire le vecteur navette, pYX112-Sfi, un vecteur intermédiaire, pYX112-GAP, a dû être obtenu.

3.2.1.1 Construction du pYX112-GAP

La partie GAP (1,1 Kb) du gène *Tre2* a été amplifiée par PCR grâce à des amorces contenant les sites de restriction *EcoRI*, *SfiIA* et *BamHI* respectivement du côté de l'amorce forward et les sites *HindIII*, *SfiIB*, *ApaI* et *BamHI* respectivement du côté de l'amorce reverse.

Après que ce produit PCR ait été obtenu et purifié, ce dernier, ainsi que le vecteur pYX112, a été restreint en *EcoRI* et *HindIII*. Le vecteur matrice (pYX112) a ensuite été déphosphorylé à l'aide de la CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase – Fermentas) et la ligation a alors pu être réalisée entre le produit PCR restreint et le vecteur matrice restreint et déphosphorylé. Finalement, le produit de ligation a été transformé dans des cellules thermocompétentes DH5 α d'*Escherichia coli*. Les candidats ont été vérifiés par restrictions diagnostiques à l'aide de l'enzyme de restriction *SfiI*.

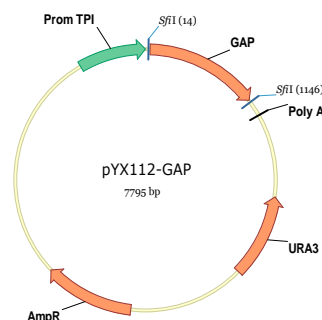


Figure 3 : Carte plasmidique du pYX112-GAP.

3.2.1.2 Construction du pYX112-Sfi

Le vecteur pYX112-GAP a été restreint à l'aide de l'enzyme de restriction *Bam*HI et passé sur gel d'agarose. La bande supérieure correspondant au vecteur pYX112-GAP sans la partie GAP a été récupérée, purifiée, déphosphorylée et reliquée sur elle-même. Le produit de ligation a ensuite été transformé dans des cellules thermocompétentes DH5 α d'*E. coli*. Les candidats à la transformation ont alors été vérifiés par restriction diagnostique grâce à l'enzyme *Hind*III.

3.2.2 Construction des banques

Les banques ont été créées à partir d'ARN totaux de cellules de muscle squelettique, d'ARN totaux de cellules HeLa et d'ARN messager de cellules humaines placentaires à l'aide du « CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction Kit » (BD Biosciences).

La première étape de construction de ces banques consiste à transcrire l'ARNm en un ADN simple brin grâce à l'allongement d'une amorce 1 (contenant un site de restriction *Sfi*B et une queue polyT qui reconnaît la queue polyA des ARNm) par une transcriptase reverse. Cette transcriptase ajoute quelques deoxycytidines à l'extrémité 3' de l'ADN nouvellement synthétisé. Ces polyC sont alors reconnus par une amorce 2 (contenant un site de restriction *Sfi*A et une queue polyG qui reconnaît la queue polyC du brin d'ADN) et un ADN double brin est alors synthétisé. Le processus est ensuite amplifié (20 cycles) en utilisant les mêmes amorces afin d'amplifier les brins complètement synthétisés. En effet, les brins qui ne sont pas complets ne seront pas amplifiés car ils ne posséderont pas d'extrémité poly G permettant à l'amorce 2 de se fixer.

Lors d'une deuxième étape, l'activité de la polymérase est inhibée par un traitement à la protéinase K. L'ADN est ensuite purifié et restreint par l'enzyme *Sfi*I. Ce produit de restriction est alors ligué au plasmide pYX112-Sfi restreint lui aussi par cet enzyme et déphosphorylé. Le produit de ligation est finalement transformé dans des cellules électrocompétentes d'*E. coli* (Ep Max 10B – BioRad). Le produit de transformation est étalé sur des boîtes de pétri contenant du milieu LB + ampicilline.

La dernière étape consiste à titrer la banque et à l'amplifier. La banque ainsi obtenue pourra alors être transformée en cellules de levure *S. cerevisiae* afin d'effectuer des tests de complémentation dans la souche doublement mutées (*msb3msb4*).

Bibliographie

- ¹ Thuriaux P. 1998. Suppression. *M/S* **14**:780-786
- ² Albert S. and Gallwitz D. 1999. Two new members of a family of Ypt/Rab GTPase activating proteins. *J. Biol. Chem.* **274**:33186-33189
- ³ Albert S. and Gallwitz D. 2000. Msb4p, a protein involved in Cdc42p-dependent organization of the actin cytoskeleton, is a Ypt/Rab-specific GAP. *Biol. Chem.* **381**:453
- ⁴ Gao X.D., Albert S., Tcheperegine S.E., Burd C.G., Gallwitz D. and Bi E. 2003. The GAP activity of Msb3p and Msb4p for the Rab GTPase Sec4p is required for efficient exocytosis and actin organization. *J. Cell. Biol.* **162**:635-46
- ⁵ Bach S. Etude de la fonction cellulaire codée par l'oncogène humain Tre2 impliqué dans le sarcome d'Ewing par analyse comparative des gènes *MSB3* et *MSB4* de *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de doctorat, décembre 2000, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, promoteurs: M. Vandenbol et D. Portetelle
- ⁶ Bach S., Bouchat O., Portetelle D. and Vandenbol M. 2000. Co-deletion of *MSB3* and *MSB4* coding regions affects bipolar budding and perturbs the organisation of the actin cytoskeleton. *Yeast* **16**:1015-1023
- ⁷ Bi E., Chiavetta J. B., Chen H., Chen G.-G., Chan C. S. M. and Pringle J. R. 2000. Identification of novel, evolutionarily conserved Cdc42p-interacting proteins and of redundant pathways linking Cdc24p and Cdc42p to actin polarization in yeast. *Mol. Biol. Cell.* **11**:773-793
- ⁸ Nakamura T., Hillova J., Mariage-Samson R. and Hill M. 1988. Molecular cloning of a novel oncogene generated by DNA recombination during transfection. *Oncogene Research* **2**:357-370
- ⁹ Paulding C.A., Ruovolo M. and Haber D.A. 2003. The Tre2 (USP6) oncogene is a hominoid-specific gene. *PNAS* **100**:2507-2511
- ¹⁰ Matoskova B., Wong W. T., Seki N., Nagase T., Nomura N., Robbins K. and Di Fiore P. P. 1996. RN-tre identifies a family of tre-related proteins displaying a novel potential protein binding domain. *Oncogene* **12**:2563-2571
- ¹¹ Lanzetti L., Rybin V., Malabarba M.G., Christoforidis S., Scita G., Zerial M. and Di Fiore P.P. 2000. The Eps8 protein coordinates EGF receptor signalling through Rac and trafficking through Rab5. *Nature* **408**:374-377
- ¹² Lanzetti L., Palamidessi A., Areces L., Scita G., Di Fiore P.P. 2004. Rab5 is a signalling GTPase involved in actin remodelling by receptor tyrosine kinases. *Nature* 2004 **429**:309-314
- ¹³ Masuda-Robens J.M., Kutney S.N., Qi H. and Chou M.M. 2003. The TRE17 oncogene encodes a component of a novel effector pathway for Rho GTPases Cdc42 and Rac1 and stimulates actin remodeling. *Mol. Cell. Biol.* **23**:2151-2161
- ¹⁴ Nakamura T., Hillova J., Mariage-Samson R., Onno M., Huebner K., Cannizzaro L. A., Boghosian-Sell L., Croce C. M. and Hill M. 1992. A novel transcriptional unit of the tre oncogene widely expressed in human cancer cells. *Oncogene* **7**:733-741
- ¹⁵ Shen C., Ye Y., Robertson S.E., Lau A.W., Mak D.O., Chou M.M. 2005. Calcium/calmodulin regulates ubiquitination of the ubiquitin-specific protease TRE17/USP6. *J Biol Chem.*
- ¹⁶ Oliveira A.M., Hsi B.L., Weremowicz S., Rosenberg A.E., Dal Cin P., Joseph N., Bridge J.A., Perez-Atayde A.R., Fletcher J.A. 2004. USP6 (Tre2) fusion oncogenes in aneurysmal bone cyst. *Cancer Res.* **64**:1920-1923
- ¹⁷ Fink G.R. and Boeke J.D. 1999. Yeast, an experimental organism for all times. *ASM News* **65**:351-357
- ¹⁸ Foury F. 1997. Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene* **195**:1-10
- ¹⁹ Bizimungu C. Etude de l'expression, dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, d'un oncogène humain codant pour une protéine GAP putative. Mémoire de fin d'études, septembre 2001, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, promoteurs: M. Vandenbol et D. Portetelle
- ²⁰ Bizimungu C. Etude moléculaire de la structure et de la fonction du produit d'un oncogène humain homologue à deux protéines GAPs, Msb3p et Msb4p, de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Mémoire de DEA, août 2002, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, promoteurs: M. Vandenbol et D. Portetelle
- ²¹ De Neve N. Caractérisation du site catalytique GAP (GTPase Activating Protein) du produit de l'oncogène oncTre210, impliqué dans le sarcome d'Ewing, par mutagenèse dirigée. Mémoire de fin d'études, septembre 2003, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, promoteur: M. Vandenbol
- ²² Bizimungu C., Vandenbol M. At least two regions of the oncoprotein Tre2 are involved in its lack of GAP activity. *Biochem Biophys Res Commun.* **335**(3):883-890
- ²³ Dechamps C., Portetelle D., Vandenbol M. 2005. Multicopy suppression screen in the *msb3msb4 Saccharomyces cerevisiae* double mutant, affected in Ypt/RabGAP activity. *Biotechnology letters* – in press.